ANALYSE CHIMIOTAXONOMIQUE DE VINGT-DEUX SOUCHES DE *LEISHMANIA* ISOLÉES AU NORD-OUEST DE L'ÉQUATEUR

ARMIJOS R.X.*, THOMAS-SOCCOL V.***, LANOTTE G.***, RACINES J.**, PRATLONG F.*** & RIOUX J.A.***

Summary : CHEMOTAXONOMIC ANALYSIS OF TWENTY-TWO *LEISHMANIA* STRAINS ISOLATED IN NORTH-WEST ECUADOR.

The cladistic analysis applied to enzymatic proteins completes the taxonomy of *Leishmania* from Ecuador. The 22 strains isolated are distributed into ten zymodemes. Only one of these belongs to the phylogenetic complex *L. mexicana* : it is an original variant form, distantly related to the WHO reference strain. The nine other zymodemes are grouped in the phylogenetic complex *L. guyanensis*, but form three distinct branches. The first one is centered on the reference strain of *L. guyanensis*. The second one includes the reference strain of *L. panamensis*. The third one is represented by a single zymodeme and is placed in an intermediate position between the two others, owing to a "heterozygous" aspect of the phosphogluconate dehydrogenase (PGD).

KEY WORDS : *Leishmania guyanensis*. *L. mexicana*. *L. panamensis*. zymodemes. cladogram. Ecuador.

Résumé :

La méthode cladistique, appliquée aux protéines enzymatiques, apporte un complément substantiel à la taxonomie des *Leishmania* d'Équateur. Après analyse électrophorétique, les 22 souches étudiées se répartissent dans dix zymodèmes. Un seul appartient au complexe phylogénétique *L. mexicana*, sous la forme d'un variant original, éloigné de la souche de référence OMS. Les neuf autres se regroupent dans le complexe *L. guyanensis*, en formant trois branches distinctes. La première est centrée sur la souche de référence *L. guyanensis*. La seconde inclut la souche de référence *L. panamensis*. La troisième, représentée par un seul zymodème, se place en position intermédiaire, en raison d'une phosphogluconate déshydrogénase hétérozygote.

MOTS CLÉS : *Leishmania guyanensis*. *L. mexicana*. *L. panamensis*. zymodèmes. cladogramme. Équateur.

Depuis quelque vingt ans, l'électrophorèse des isoenzymes a démontré son efficacité en matière d'identification des *Leishmania*. Aujourd'hui encore, ce procédé demeure la technique de référence (OMS, 1990), à la condition toutefois de la compléter par une construction taxonomique prenant en compte simultanément les isoenzymes (caractères) et les profils enzymatiques ou zymodèmes (unités de base) (Godfrey, 1979). Dans ce domaine, la méthode cladistique utilisée dans le présent travail s'avère d'un grand intérêt (Lanotte *et al.*, 1986; Rioux *et al.*, 1990; Thomas-Soccol *et al.*, 1993). Elle s'applique ici à 22 isolats provenant du Nord-Ouest de l'Équateur. Les résultats obtenus complètent les travaux réalisés précédemment dans ce pays (Mimori *et al.*, 1989; Armijos *et al.*, 1990; Hashiguchi *et al.*, 1991, 1994; Le Pont *et al.*, 1994; Dereure *et al.*, 1994).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'analyse porte sur 22 souches, isolées dans huit provinces du Nord-Ouest de l'Équateur : Chimborazo, Cotopaxi, Esmeraldas, Imbabura, Los Rios, Manabi et Pichincha (tableau I). Parmi les stations inventoriées, huit se situent dans la strate bioclimatique tropicale humide occidentale, deux dans la strate tropicale sèche et deux dans la strate tempérée froide (fig. 1). Toutes les souches proviennent de formes cutanées humaines.

Dix souches de référence ont été utilisées pour comparer les profils et classer les isolats étudiés (OMS, 1990). Elles appartiennent aux principales « espèces » rencontrées en Amérique latine (tableau II) (Lainson & Shaw, 1987).

Deux techniques d'électrophorèse des isoenzymes ont été employées : l'électrophorèse en gel épais d'amidon et l'isofocalisation. La première constitue la technique de référence, la seconde permet le contrôle de certains électromorphes litigieux.

- L'électrophorèse en gel épais d'amidon a pour support un gel de 1 cm d'épaisseur à 10 % d'amidon hydrolysé, en tampon-pont dilué au 1/10^e. La migration s'effectue à 100 mA, entre 80 et 100V.; sa durée est de six heures en moyenne. Trois tampons ont été

* École de Médecine, Université Centrale d'Équateur, Quito, Équateur

** Département de Biologie Basique, Université Fédérale du Parana, 81531-970 Curitiba PR, Brésil

*** Faculté de Médecine, Université Montpellier I, Montpellier, France

Code OMS	n° LEM	Localités		Province
MHOM/EC/90/UI.031	LEM2318	Chontaduro	1	ESMERALDAS
MHOM/EC/90/AR.017	LEM2281	Muisne	2	ESMERALDAS
MHOM/EC/90/AR.031	LEM2325	Quinindé	3	ESMERALDAS
MHOM/EC/90/L.M.	LEM2284	Gar. Moreno	4	IMBABURA
MHOM/EC/90/AR.027	LEM2326	Gar. Moreno	4	IMBABURA
MHOM/EC/90/AR.024	LEM2315	Pacto	5	PICHINCHA
MHOM/EC/90/AR.021	LEM2317	Maldonado	6	PICHINCHA
MHOM/EC/90/JUBERLY	LEM2319	Maldonado	6	PICHINCHA
MHOM/EC/90/MORENO	LEM2293	San Miguel	7	PICHINCHA
MHOM/EC/90/IZURIETA	LEM2323	San Miguel	7	PICHINCHA
MHOM/EC/90/AR.032	LEM2278	Sto Domingo	8	PICHINCHA
MHOM/EC/90/TERESA	LEM2280	Sto Domingo	8	PICHINCHA
MHOM/EC/90/NARANJO	LEM2316	Sto Domingo	8	PICHINCHA
MHOM/EC/90/AR.026	LEM2324	Sto Domingo	8	PICHINCHA
MHOM/EC/90/AR.023	LEM2283	El Carmen	9	MANABI
MHOM/EC/90/TORRES	LEM2295	El Carmen	9	MANABI
MHOM/EC/90/BEATRIZ	LEM2320	El Carmen	9	MANABI
MHOM/EC/90/UI.030	LEM2282	El Corazon	10	COTOPAXI
MHOM/EC/90/MICHUY	LEM2279	Montalvo	11	LOS RIOS
MHOM/EC/90/NATALY	LEM2294	Guamote	12	CHIMBORAZO
MHOM/EC/90/DEDO	LEM2321	non préc.	-	prov. non préc.
MHOM/EC/90/CALDERON	LEM2322	non préc.	-	prov. non préc.

Tableau I. – Distribution géographique des souches de *Leishmania* analysées.

Fig. 1. – Zonage bioclimatique du nord-ouest de l'Équateur et localisation des zymodèmes identifiés : 1 – Chontaduro (MON*163); 2 – Muisne (MON*147); 3 – Quinindé (MON*100); 4 – Garcia Moreno (MON*110, MON*159); 6 – Pedro Vicente Maldonado (MON*159, MON*160); 7 – San Miguel de los Bancos (MON*100, MON*147); 8 – Santo Domingo de los Colorados (MON*143, MON*147, MON*162); 9 – El Carmen (MON*145, MON*147); 10 – El Corazon (MON*147); 11 – Montalvo (MON*147); 12 – Guamote (MON*147).

Espèce	Code OMS	Zymodème
<i>L. amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269	MON* 132
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/00/LTB300	MON* 166
<i>L. enriettii</i>	MCAV/BR/45/L88	MON* 97
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147	MON* 45
<i>L. lainsoni</i>	MHOM/BR/81/M6426	MON* 149
<i>L. mexicana</i>	MHOM/BZ/82/BEL21	MON* 156
<i>L. naiffi</i>	MDAS/BR/79/M5533 ♦	MON* 148
<i>L. panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94	MON* 47
<i>L. peruviana</i>	MHOM/PE/84/LC39	MON* 128
<i>L. shawi</i>	MCEB/BR/84/M8408 ♦	MON* 144

Tableau II. – *Leishmania* d'Amérique latine : souches de référence OMS (exceptés *L. naiffi* et *L. shawi*, indiqués par ♦).

utilisés : tris-maléate pH 7,4, tris-maléate EDTA pH 7,4 et tris-citrate aux pH 8,6 et 9,5. Après migration, le gel est découpé en lames de 1 mm d'épaisseur, colorées à l'aide du substrat spécifique. Treize systèmes ont été utilisés : ME [ec 1.1.1.40], ICD [ec 1.1.1.42], PGD [ec 1.1.1.44], G6PD [ec 1.1.1.49], DIA [ec 1.6.2.2], NP1 [ec 2.4.2.1], NP2 [ec 2.4.2.*], GOT1, GOT2 [ec 2.6.1.1], PGM [ec 5.4.2.2], FH [ec 4.2.1.2], MPI [ec 5.3.1.8], GPI [ec 5.3.1.9].

• L'isofocalisation en gradient de pH a été réalisée en gel de polyacrylamide à 5 %, avec présence d'ampho-

lytes, de TEMED et de persulfate de Na à 10 %. Seuls les gradients 4-6,5 et 5-8 ont été retenus. La migration a été effectuée sur un appareil Multiphor, après une préfocalisation de 20 mn à 15000 mA. Les révélations enzymatiques utilisent les mêmes produits qu'en gel d'amidon. Sept systèmes ont été utilisés : DIA, NP1, NP2, GOT1, PGM, MPI, GPI.

Les zymodèmes ont été ordonnés selon la méthode cladistique, basée sur les principes de Hennig (1965) : partage des caractères ancestraux et dérivés, parcimonie des changements. L'étude a été effectuée en deux temps, à l'aide du programme MIX (ensemble PHYLIP) : 1) recherche du réseau minimal ; 2) recherche de l'arbre minimal.

RÉSULTATS

PROFILS ENZYMATIQUES

Sur les 22 souches analysées, 21 se placent dans le complexe *L. guyanensis*, une seule dans le complexe *L. mexicana* (tableau III).

Les souches du complexe *L. guyanensis* en possèdent les trois enzymes diagnostiques ICD⁷⁰, NP1⁸⁰⁰ et FH⁸⁷ (Moreno *et al.*, 1986). Elles se répartissent en neuf zymodèmes MON*100 (LEM 2293, 2325); MON*143

MON*	Profils enzymatiques													Espèces
	ME	ICD	PGD	G6PD	DIA	NP1	NP2	GOT1	GOT2	PGM	FH	MPI	GPI	
45	87	70	70	103	50	800	100	145	120	111	87	60	87	<i>L. guyanensis</i>
147	87	70	70	106	50	800	100	145	120	111	87	60	87	
161	87	70	70	106	50	800	100	145	120	111/123	87	60	87	
163	87	70	70	103	50	800	100	145	120	111/123	87	60	87	
162	87	70	45/70	103	50	800	100	145	120	111	87	60	87	
47	87	70	45	95	50	800	100	145	120	111	87	60	87	<i>L. panamensis</i>
100	87	70	45	103	50	800	100	145	120	111	87	60	87	
143	87	70	45	98	50	800	100	149	118	113	87	60	87	
145	87	70	45	103	50	800	100	145	120	111	87	70	87	
159	87	70	45	98	50	800	100	149	118	111	87	60	87	
160	87	70	45	106	50	800	100	145	120	111	87	60	87	
156	100	130	110	65	75	295	90	80	105	133	95	150	35	<i>L. mexicana</i>
110	109	130	115	70	75	290	87	75	114	114	95	102/115	38	
97	65	120	110	83	20	-	135	120	120	111	75	137	79	<i>L. enriettii</i>
132	105	130	110/116	65/75	98	-	90	70	112	111	95	115	45	<i>L. amazonensis</i>
144	87	75	55	103	55	800	100	145	135	98	87	60	87	<i>L. shawi</i>
148	85	48	55	84	40	345	125	145	125	95	80	75	61	<i>L. naiffi</i>
149	85	55	45	70	40	750	130	148	123	118	90/99	98	89	<i>L. lainsoni</i>
166	92	55/70	55	90	45	380	112	131	125	115	82	71	74/87	<i>L. braziliensis</i>
128	85	48	55	90	50	380	112	132	115	115	82	60	87	<i>L. peruviana</i>

Tableau III. – Profils enzymatiques des souches étudiées. Les MON* de référence et leur profil sont indiqués en gras. Les zymodèmes équatoriens sont ordonnés par rapport aux complexes phylogénétiques correspondants.

Fig. 2. – Le cladogramme le plus parcimonieux, construit à l'aide des dix zymodèmes équatoriens identifiés (symboles blancs) et de dix zymodèmes de référence (symboles noirs), fait apparaître deux grands rameaux, à droite, celui du sous-genre *Leishmania*, à gauche, celui du sous-genre *Viannia*.

(LEM 2278, 2321); MON*145 (LEM 2295, 2315); MON*159 (LEM 2317, 2326); MON*160 (LEM 2319); MON*147 (LEM 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2294, 2316, 2320, 2323); MON*161 (LEM 2322); MON*163 (LEM 2318); MON*162 (LEM 2324). Les cinq premiers se rattachent à la souche de référence *L. panamensis* (PGD⁴⁵), les trois suivants à la souche de référence de *L. guyanensis* (PGD⁷⁰). Le dernier zymodème, MON*162, reste isolé en position intermédiaire, en raison de la présence de l'hétérozygote, PGD^{45/70}. Quant au LEM 2284, zymodème MON*110, il possède l'enzyme diagnostique DIA⁷⁵ du complexe *L. mexicana*. Il diffère cependant de la souche de référence par dix électromorphes sur 13.

TAXONOMIE

L'arbre phylogénétique, construit à partir des dix zymodèmes identifiés et de dix souches de référence (fig.2), reproduit les cladogrammes des *Leishmania* du Nouveau Monde, récemment décrits (Thomas-Soccol *et al.*, 1993; Cupolillo *et al.*, 1994). Cette congruence structurale s'explique essentiellement par l'importance des distances entre les différents complexes. Quant aux relations des zymodèmes équato-

riens, au sein des complexes correspondants, deux modalités se présentent :

1) dans le complexe *L. guyanensis*, les zymodèmes forment un rameau trifurqué. Les trois branches ont comme base les unités taxonomiques MON*100, MON*45 et MON*162 qui ne se distinguent que par une seule enzyme, la phosphogluconate déshydrogénase (PGD). La branche correspondant à MON*100 inclut la souche de référence *L. panamensis* (MON*47). La deuxième comprend MON*45, souche de référence de *L. guyanensis*. La troisième, de situation intermédiaire, est formée par un seul zymodème, MON*162, comportant une PGD de type hétérozygote. Notons qu'une structure comparable a été observée dans le groupe monophylétique *L. infantum* – *L. archibaldi* – *L. donovani* (Rioux *et al.*, 1990). Par ailleurs, l'important polymorphisme constaté en Équateur dans le complexe *L. guyanensis* est essentiellement le fait de neuf souches isolées dans la province de Pichincha. Celles-ci se répartissent, en effet, dans sept zymodèmes, sur les neuf individualisés dans la présente étude.

2) dans le complexe *L. mexicana*, la souche équatorienne, MON*110, est éloignée de la souche de réf-

rence OMS (MON*156). Cette disposition traduit, une nouvelle fois, l'hétérogénéité de ce complexe (Thomas-Soccol *et al.*, 1993).

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus témoignent de la diversité des *Leishmania* dans la partie nord-occidentale de l'Équateur (forêt tropicale humide de pente). Une étude étendue à l'ensemble des hôtes, réservoirs et vecteurs, et élargie aux secteurs tropical humide oriental (B), tropical sec (D), tropical aride (E) et tempéré froid (A), devrait confirmer ce polymorphisme, en préciser la nature et, dès lors, permettre de mieux appréhender la structure des foyers.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont à Mlle Christina Romaña pour l'aide efficace qu'elle nous a apportée dans la réalisation pratique de cette étude.

RÉFÉRENCES

- ARMIJOS R.X., CHICO M.E., CRUZ M.E., GUDERIAN R.H., KREUTZER R.D., BERMAN J.D., ROGERS M.D. & GROGL M. Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador. Identification of parasites by enzyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990, 42, 424-428.
- CUPOLILLO E., GRIMALDI G. JR & MOMEN H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994, 50, 296-311.
- DEREURE J., ESPINEL L., BARRERA C., GUERRINI F., MARTINI A., ECHEVERRIA R., GUDERIAN R.H. & LE PONT F. Leishmaniose en Equateur. 4. Infestation naturelle du chien par *Leishmania panamensis*. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1994, 74, 29-33.
- GODFREY D.J. The zymodemes of Trypanosomes. In : Problems in the identification of parasites and their vectors. *Symposium of the British Society of Parasitology*, Taylor A.E.R., Muller R. eds, Blackwell Scientific Publications, 1979, Oxford/London, 17, 31-54.
- HENNIG W. Phylogenetic Systematics. *Annales de la Revue d'Entomologie*, 1965, 10, 97-116.
- HASHIGUCHI Y. & GOMEZ LANDIRES E.A. A review of leishmaniasis in Ecuador. *Bulletin of PAHO*, 1991a, 25, 64-76.
- HASHIGUCHI Y., GOMEZ E.A., DE CORONEL V.V., MIMORI T., KAWABATA M., FURUYA M., NONAKA S., TAKAOKA H., ALEXANDER J.B., QUIZHPE A.M., GRIMALDI G. JR, KREUTZER R.D. & TESH R.B. Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1991b, 44, 205-217.
- LAINSON R. & SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In : *The leishmaniasis in biology and medicine*. Peters W., Killick-Kendrick R. eds, Academic Press, London, 1987, 1-120.
- LANOTTE G., RIOUX J.A. & SERRES E. Approche cladistique du genre *Leishmania* Ross, 1903. À propos de 192 souches de l'Ancien Monde. Analyse numérique de 50 zymodèmes identifiés par 15 enzymes et 96 isoenzymes. In : *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse*. Rioux J.A. ed, IMEEE, Montpellier, 1986, 269-288.
- LE PONT F., LEON R., GUERRINI F., GANTIER J.C., MOUCHET J., ECHEVERRIA R. & GUDERIAN R.H. Leishmaniose en Equateur. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vecteur de *Leishmania panamensis*. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 1994, 74, 23-28.
- MIMORI T., GRIMALDI G., KREUTZER R.D., GOMEZ E.A., MCMAHON-PRATT D., TESH R.B. & HASHIGUCHI Y. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1989, 40, 154-158.
- MORENO G., PRATLONG F., VELEZ I.D., RESTREPO M. & RIOUX J.A. Individualisation du complexe *L. guyanensis*. À propos de l'analyse numérique de sept zymodèmes. In : *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse*. Rioux J.A. éd, IMEEE, Montpellier, 1986, 165-172.
- O.M.S. *Lutte contre les leishmanioses*, TRS 793, OMS, Genève, 1990, 176 p.
- RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PÉRIÈRE J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 1990, 65, 11-125.
- THOMAS-SOCCOL V., LANOTTE G., RIOUX J.A., PRATLONG F., MARTINI-DUMAS A. & SERRES E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 1993, 68, 104-106.

Accepté le 3 avril 1995