

# Exploration de la dissémination de *Leishmania*, un parasite délivré et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte Vertébré

*Dissemination of Leishmania : a parasite sampled and picked up by the sandfly in the dermis of its vertebrate host. Study of an experimental model: Leishmania major and C57Bl/6 mouse.*

Par Geneviève MARIGNAC<sup>(1)</sup>, Maï LEBASTARD<sup>(2)</sup>,  
Gamou FALL<sup>(2)</sup>, Luc NICOLAS<sup>(2)</sup> et Geneviève MILON<sup>(2)</sup>  
(communication présentée le 20 mars 2003)

## RÉSUMÉ

Qu'elles soient visibles cliniquement ou asymptomatiques, la pérennité des parasites est sous-tendue par les interactions dynamiques qu'ils établissent avec leurs hôtes. *Leishmania major* est un parasite protozoaire dépendant de deux autres organismes hôtes : (a) un insecte hématophage et telmophage, le phlébotome, (b) un rongeur. À partir de quand et où des leishmanies au stade amastigotes peuvent-elles émigrer du site initial où elles ont été inoculées ? Dans notre laboratoire, un modèle d'infection a été développé en tenant compte de ce qui est connu sur l'hématophagie par telmophagie des phlébotomes. 1000 leishmanies au stade promastigote métacyclique sont préparées et inoculées en face interne du pavillon auriculaire de souris C57Bl/6, par voie intradermique.

Ce travail, fondé sur la quantification par PCR en temps réel (PCRq) de l'ADN kinétoplastique (ADNk), a permis de montrer que les leishmanies s'établissaient au centre de l'oreille (site de l'inoculation). Au quatrième jour après l'injection, nous avons détecté l'ADNk des leishmanies à la périphérie de cette même oreille et dans le ganglion drainant. La charge parasitaire dans le centre augmente régulièrement, jusqu'au jour 28, puis diminue entre les jours 28 et 49. Pour le centre de l'oreille, la valeur maximale a été  $\approx 10\ 000$  parasites au jour 28, elle est moindre pour le bord. La peau de la queue a été le site cutané distant où il a été possible le plus régulièrement de détecter de l'ADN kinétoplastique et ce, dès le quatrième jour.

Outre la confirmation des données sur la cinétique de la charge parasitaire au site d'injection, nos résultats sont en faveur de l'existence, dans les jours qui suivent l'inoculation, de quelques parasites dans des sites cutanés asymptomatiques. Les applications de la PCRq dans le cadre du concept de portage asymptomatique concernent aussi bien la Médecine Vétérinaire que la Santé Publique. Les implications potentielles par rapport au cycle parasitaire sont soulignées.

**Mots-clés :** portage asymptomatique, transmission, charge parasitaire, *Leishmania*, PCR quantitative, PCR en temps réel.

### Note

(1) Unité de Parasitologie, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort cedex

(2) Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire, Institut Pasteur, Paris

## SUMMARY

*Parasites establish with their host a series of dynamic interactions, clinically visible or asymptomatic, on which depends their durability. Leishmania major is a protozoan parasite dependent on two hosts: (a) a hemophage and telmophage insect, the sandfly, and (b) a rodent. Following the inoculation, when and where do the Leishmania in their amastigote form migrate from the initial site? In our laboratory, an infection model was developed based on current knowledge on hemophagia in telmophage sandflies. We prepared 1000 metacyclic promastigote Leishmania and inoculated them to C57Bl/6 mice via intradermal injections in the centre of the right pinna.*

*This study, based on real-time/quantitative PCR (qPCR) to quantify kinetoplastic DNA (kDNA), has shown that Leishmania were established in the centre of the inoculated pinna. On day 4 after the injection, we detected Leishmania kDNA in the periphery of that pinna and in the draining lymph node. The parasitic load grew regularly until day 28, then decreased between days 28 and 49. The maximum value recorded in the centre of the ear was 10,000 parasites on day 28, less in the periphery. The skin of the tail was the distant skin site where the detection of kinetoplastic kDNA was most consistent, starting on day 4.*

*These results confirm the data on the kinetics of the parasitic load at the injection site. They also support the presence, within days after the inoculation, of a few parasites in asymptomatic distant cutaneous sites. The technique of qPCR to detect asymptomatic carriage has several applications both in Veterinary Medicine and in Public Health. The potential implications of these results on the parasite cycle are also emphasized.*

**Key words:** asymptomatic carriage, transmission, parasitic load, Leishmania, quantitative PCR, real time PCR.

### • INTRODUCTION

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés parasites obligatoires dihéteroxyènes<sup>(2)</sup> de la Famille des trypanosomatidés (PETERS et KILLICK-KENDRICK, 1987). Leur cycle évolutif nécessite l'alternance entre un hôte invertébré insecte telmophage les phlébotomes, et un hôte vertébré dans lequel les parasites sont essentiellement dans les leucocytes de la lignée phagocytaire du compartiment extra-cellulaire (macrophages, leucocytes dendritiques). Le genre *Leishmania* regroupe diverses espèces et sous-genres d'importance vétérinaire et médicale dont la classification est encore en évolution (RIOUX *et al.* 1986 ; PETERS et KILLICK-KENDRICK, 1987).

Ainsi, l'effectif des populations humaines exposées au risque de « piqûres infestantes » par les phlébotomes est autour de 350 millions (DESJEUX, 2001 ; KLAUS *et al.* 1999). L'impact du VIH et de toutes interventions visant à atténuer plus ou moins durablement les fonctions leucocytaires (chimiothérapies, greffes) ont permis de révéler chez l'Homme – ce qui était connu chez les Mammifères hôtes sauvages – l'existence d'un parasitisme asymptomatique (DESJEUX, 2001). Les implications de ce concept, familières depuis longtemps aux vétérinaires, ont du être prises en compte par les acteurs de la médecine humaine et de la santé publique (DESJEUX, 2001 ; RIOUX, 1986).

Du fait des caractéristiques de la telmophagie<sup>(2)</sup> des phlébotomes (trompe fine et courte, sondages multiples, formation d'un lac sanguin dermique...) (BUSSIERAS et

CHERMETTE, 1992), une hypothèse logique est que la piqûre de ces insectes s'effectue plutôt au niveau d'un site asymptomatique qu'au niveau d'une lésion du fait de l'inflammation, de l'œdème (lésion active) ou de la fibrose (lésion chronique ou cicatricielle), d'où l'importance de l'exploration des mécanismes de la dissémination des leishmanies dans le territoire cutané.

Cette communication présente les données sur lesquelles reposent des choix d'ordre méthodologiques, la validation de ces méthodes dans le cadre de cette exploration et les résultats des expérimentations en cours sur la cinétique de la dissémination de *Leishmania major* depuis le site d'inoculation jusqu'à des sites distants, en particulier cutanés.

### • CHOIX MÉTHODOLOGIQUE

*Leishmania major* a été retenue pour la présente étude du fait de son tropisme cutané prononcé voire exclusif du point de vue clinique. Comme l'exploration concernait surtout le portage asymptomatique et son importance dans la dissémination des leishmanies, le choix d'un hôte expérimental, comme la souris C56Bl/6, chez lequel les manifestations cliniques sont transitoires et restreintes au site d'inoculation (BELKAID *et al.* 2000) s'est imposé.

L'étude des travaux publiés sur *Leishmania spp.* montre que, le plus souvent, les doses injectées (10<sup>6</sup>) et le site d'injection (coussinet plantaire) choisis ne miment pas l'infection naturelle. En effet, le phlébotome ne délivre probablement pas plus de 100 voire 1000 promastigotes métacy-

#### Note

(1) Dihétéroxyène se dit pour un parasite dont le cycle évolutif nécessite deux hôtes différents pour son évolution, dans le cas de *Leishmania spp.* : un hôte vertébré et un hôte invertébré, un phlébotome.

(2) Telmophagie: mode particulier d'hématophagie souvent rencontré chez les insectes à « trompe » plutôt courte, comme les phlébotomes. L'insecte injecte de la salive. Un lac sanguin est formé dans le derme, dont le contenu est prélevé par l'insecte.

cliques (forme infectante) (CELIO de ALMEIDA, 2002). Il présente en outre un appareil piqueur fin et court, l'épiderme fortement hyperkératosique du coussinet plantaire est donc peu favorable à la telmophagie. Enfin, une inoculation expérimentale à la seringue délivre la suspension de leishmanies plutôt en « intra-coussinet » ou en « intra-ligament » que dans le derme. Les conséquences sur la réponse immunologique à l'infection parasitaire sont nombreuses (LIRA *et al.* 2000). Pour ces raisons, MILLON *et al.* ont développé la voie intradermique (ID) en face interne du pavillon auriculaire. S'agissant d'un double feuillet cutané, l'expérimentateur est sûr que son inoculum est déposé dans le derme. Cette méthodologie originale permet en outre l'exploration du trafic des leucocytes dans le derme (méthode des explants cutanés), l'épiderme (méthode des feuillets épidermiques...) et dans le nœud lymphatique drainant qui est unique pour ce territoire cutané (BELKAID, 1996).

Cette étude du portage asymptomatique a été envisagée parce que des méthodes de détection sensibles sont à présent disponibles : l'intérêt et la fiabilité de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative sur LightCycler® (Roche) ont été démontrés dans notre laboratoire par NICOLAS *et al.* (2002a et 2002b) pour plusieurs espèces de leishmanies, dont *L. major*. Diverses expérimentations ont été effectuées afin de valider la méthode de PCR et la gamme standard utilisée dans notre cadre expérimental qui implique une quantification de l'ADN leishmanien au sein de tissus, c'est-à-dire d'une quantité élevée d'ADN de souris (résultats non présentés).

#### • MÉTHODE

À partir d'une culture de *Leishmania major* arrivée en phase stationnaire, un enrichissement en promastigotes métacycliques est effectué par la méthode des gradients de Ficoll™ (SPÄTH et BEVERLEY, 2001). Mille parasites sont injectés par voie ID au centre de la face interne du pavillon auriculaire droit chez 40 souris femelles C57Bl/6. A 24 h, 96 h, puis chaque semaine pendant sept semaines, quatre souris sont sacrifiées. La présence des lésions auriculaires est vérifiée et leur taille est mesurée avec un vernier électronique et neuf prélèvements sont effectués (tableau I).

Après pesée, lyse des tissus et extraction de l'ADN (DNeasy tissue kit™, Qiagen), les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées en « hot start » (Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit, Roche) (ouvrage collectif, 2000 ; SCHMITTGEN, 2001). Le terme « hot start » fait référence à la nécessité de porter à 95°C l'enzyme de polymérisation de l'ADN (Taq polymérase) de ce kit afin de l'activer. Cela évite des polymérisations erratiques avant que soit atteinte la température d'hybridation spécifique.

Les amorces choisies par NICOLAS *et al.* (2000, 2002a) pour amplifier l'ADN de *Leishmania spp.* sont des séquences conservées, présentes dans l'ADN des minicer-

cles du kinétoplaste (ADNk). Le kinétoplaste, organe présent à la base du flagelle, est considéré comme une mitochondrie modifiée. Son ADN est circulaire. Les minicercles constituent des cibles de choix pour l'amplification car leur nombre est estimé à environ 10 000 copies par génome de *Leishmania* (SCHNEIDER, 2001). Le protocole expérimental est décrit par NICOLAS *et al.* (2002a). Pour les deux amorces utilisées ici, le pic de fluorescence spécifique est situé entre 82,5 et 83,0°C. Tout pic à une température différente est le signe d'une polymérisation non-spécifique.

#### • RÉSULTATS

##### Détermination des seuils de détection

Des leishmanies sont quantifiables dans le centre de l'oreille droite (site d'inoculation) durant toute l'expérimentation. Dans le bord de l'oreille droite et le nœud lymphatique qui draine le pavillon auriculaire (appelé ici ganglion droit), la quantification n'est possible qu'à partir de 96 heures.

Dans les autres organes, la présence d'ADNk est parfois détectable grâce à l'observation de pics spécifiques (figure 1) des courbes températures de fusion de chaque capillaire (NICOLAS *et al.* 2002a ; LOGAN *et al.* 2001 ; MOMMERT *et al.* 2001). La quantification est alors impossible car les résultats chiffrés sont en dessous du seuil de détection (tableau I).

##### Cinétique

Les résultats des tissus pour lesquels une quantification est possible sont illustrés par les courbes de la figure 2 et ceux des autres tissus, présentés sous forme de tableau (tableau II). Ils montrent que :

- au sein des souris C57Bl/6 inoculées avec une faible dose de *L. major*, la dissémination parasitaire au bord de l'oreille infectée, dans le nœud lymphatique drainant et dans des sites cutanés distants, se fait en moins de 96 h (figure 2) ;

- des parasites sont détectables dans divers tissus qui ne sont pas le siège de processus pathologiques (tableau II). Dans la peau de la queue, de l'ADNk est détectable mais non quantifiable dès 96 h dans tous les échantillons analysés. La présence d'ADNk est plus aléatoire dans les autres sites cutanés distants et la moëlle osseuse fémorale ;

- la charge parasitaire maximale au site d'inoculation et dans le ganglion drainant a lieu environ quatre semaines après l'inoculation de 1000 métacycliques ;

- dans le bord de l'oreille droite, la charge parasitaire augmente jusqu'à la deuxième semaine, puis elle varie peu jusqu'à la semaine 6 (1000-10 000 parasites/mg), pour décroître (environ 100 parasites/mg) à la semaine 7. Il n'y a pas de variation significative du poids de ces prélèvements (résultats non présentés)

- aucun signe clinique n'est observé au site d'inocula-

tion à la semaine 2, alors que près de 100 000 parasites y sont quantifiés (soit une multiplication d'un facteur 1000 par rapport à ce qui persiste à 24h). Les signes cliniques (ici mesurés par l'évolution de l'épaisseur de la lésion et le poids moyen du prélèvement au cours du temps) sont observés à partir de la semaine 3, avec un pic à 35 jours, soit une semaine plus tard que celui de la charge parasitaire ;

- dans le « ganglion droit », une grande disparité entre les souris est observée à la semaine 7 : pour une souris, 86 000 parasites sont quantifiés, alors qu'une baisse significative de la charge parasitaire est bien observée pour les trois autres (30 à 850 parasites.). Le nombre de parasites dans le pavillon auriculaire droit est semblable pour les quatre du même lot, ce qui n'est donc pas en faveur d'une multiplication parasitaire chez cette première souris. Il s'agirait plutôt de variations individuelles dans le délai de clairance du parasite.

### • DISCUSSION

L'amplification en parallèle d'un gène spécifique de l'hôte (dit « gène de ménage ») aurait permis de gommer la variabilité de l'efficacité de la PCR qui existe entre les différents échantillons, en particulier entre les différents tissus (BRETAGNE *et al.* 2001) et d'effectuer une comparaison directe entre échantillons. *Leishmania* étant un eucaryote comme son hôte, le choix d'un gène pertinent est long et délicat. Nous avons utilisé le poids comme base de la quantification pour les prélèvements cutanés et l'organe en entier pour les autres.

Une question centrale lorsque la PCR est utilisée est de savoir si l'ADN détecté est celui d'une cellule vivante ou celui qui persiste après mort de la cellule. Une étude est en cours afin de déterminer la cinétique de dégradation de l'ADN après la mort de leishmanies présentes à l'intérieur de cellules macrophagiques cultivées *in vitro*. Les résultats des recherches de l'équipe de G. Snounou *et al.* sur *Plasmodium* sont en faveur d'un défaut de détection de l'ADN du protozoaire parasite moins de 48h après sa mort (JARRA et SNOUNOU, 1998).

### • PERSPECTIVES

Les résultats présentés ici montrent que la PCR quantitative en temps réel pourrait être intéressante dans la détection du portage asymptomatique des parasites, au niveau d'un tissu comme d'un individu. Sa sensibilité pourrait encore être augmentée par l'utilisation de PCR nichée ou de sondes spécifiques. Les applications potentielles incluent (COCKERILL et SMITH, 2002) :

- *le suivi épidémiologique* dans les populations animales ou humaines. Il s'agit probablement de l'application la plus importante pour la connaissance et la lutte contre ces protozooses. Leur impact ne se restreint pas à la médecine vétérinaire, soit qu'il s'agisse de zoonoses, comme par exemple leishmaniose à *Leishmania infantum* dans le Sud de la France et tous les pays méditerranéens dont l'hôte

mammifère principal est le Chien, soit qu'il s'agisse d'un véritable problème de Santé Publique comme *Leishmania major*, soit qu'il s'agisse de protozoose empêchant tout élevage sur sa zone d'endémie (trypanosomose bovine africaine).

- *le suivi thérapeutique*. De nombreux micro-organismes (VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, etc.) atteignent des stades de latence. Une nouvelle phase d'expansion est alors possible, que ce soit pour des causes liées à l'individu (ex : virus immunodépresseurs, traitements immunosuppresseurs, etc.) ou au micro-organisme, qui peut se traduire par des processus pathogènes. La guérison clinique est un critère insuffisant pour décider de l'arrêt d'un traitement (AEBISHER, 1994 ; COSTA *et al.* 2001).

- *le dépistage d'éventuels portages asymptomatiques* en vue de l'instauration d'un traitement immunosuppresseur : greffe, chimiothérapie anti-cancéreuse, traitement d'une maladie auto-immune (COSTA *et al.* 2002)

- *le suivi des essais thérapeutiques*. Les populations latentes se caractérisent souvent par la suspension des processus de réplication et leur présence dans des sites peu accessibles aux principes actifs conventionnels (LANGUNNASCH et MURPHY, 1998). Une démarche thérapeutique optimale devrait donc reposer sur des molécules actives sur les deux stades de développement.

Cette communication a, d'autre part, permis d'établir plusieurs données dont certaines dépassent le domaine des processus morbides initiés par les parasites. De l'ADN parasitaire est détectable, soit dans divers tissus qui ne sont pas le siège de processus pathologiques ou avant que ceux-ci soient visibles. L'hypothèse selon laquelle les leishmanies pourraient détourner, voire amplifier des systèmes régulateurs qui maintiennent les cellules d'un tissu dans un état non activable (homéostasie), paraît plausible, y compris à distance du site d'inoculation. Une telle exploration a été effectuée en partie par BELKAID *et al.* (2002) qui montrent que, chez la souris C57Bl/6 (inoculum de 1000 métacycliques), la persistance asymptomatique de 100 à 10 000 parasites au site d'inoculation, après guérison clinique de la lésion (semaines 8-10), est liée à la présence de lymphocytes T CD4+CD25+.

La pérennité des leishmanies dans leur écosystème naturel passe par un cycle de vie dominé par sa transmissibilité. Comme cela a été établi pour différents protozoaires parasites, ces stades transmissibles sont en état de suspension de la réplication de l'ADN : les bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, les sporozoïtes et les gamétocytes de *Plasmodium falciparum*, les promastigotes métacycliques de *Leishmania* (SACKS et KAMHAWI, 2001). Cette observation a mené à poser l'hypothèse déjà évoquée selon laquelle les amastigotes prélevés par le phlébotome, et qui s'établiront chez ce dernier, sont eux aussi en phase G<sub>0</sub>. Atteindre ces stades de développement est un processus complexe qui, pour chacun des parasites cités ci-dessus, a

lieu dans un tissu particulier de l'hôte, mammifère ou arthropode. Pour les amastigotes de *Leishmania major*, nos résultats sont en faveur de l'existence de quelques

parasites dans des sites cutanés asymptomatiques au sein desquels une telle suspension de la réplication de l'ADN pourrait avoir lieu.

## BIBLIOGRAPHIE

- EBISHER T (1994) Recurrent cutaneous leishmaniasis : a role for persistent parasites ? *Parasitology Today*, **10**(1), 25-28.
  - BELKAID Y, JOUIN H, MILON G (1996) A method to recover, enumerate and identify lympho-myeloid cells present in an inflammatory dermal site : a study in laboratory mice. *Journal of Immunological Methods*, **199**, 5-25.
  - BELKAID Y, MENDES S *et al.* (2000) A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged « silent » phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology*, **165**, 969-977.
  - BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S *et al.* (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, **420**, 502-507.
  - BOGDAN C, GESSNER A *et al.* (1996) Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Current Opinion in Immunology*, **8**, 517-525.
  - BRETAGNE S *et al.* (2001). Real-Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver of infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**(4), 828-831.
  - BUSSIERAS J, CHERMETTE R. (1992) *Protozoologie et Acaro-entomologie Vétérinaire*. École Nationale Vétérinaire d'Alfort. 267p.
  - CELIO de AIMEIDA MC (2002) Infective inoculum for *Leishmania*. News and comments *In : Trends in Parasitology*. **18**(4), 154-155.
  - COCKERILL FR, SMITH TF (2002) Rapid-cycle real-time PCR : a revolution for clinical microbiology. *ASM News*, **68**(2), 77-83).
  - COSTA JM, PAUTAS C *et al.* (2000) Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(8), 2929-2932.
  - DESJEUX P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans.R. Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**, 239-243.
  - JARRA W, SNOUNOU G. (1998) Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment on immune responses. *Infection and Immunity*, **66**(8), 3783-3787.
  - KLAUS SN, FRANKEBURG S, INGBER A (1999) Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Dermatology*, **17**, 257-260.
  - LANG-UNNASCH N, MURPHY AD (1998) Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annual Review of Microbiology*, **52**, 561-590.
  - LIRA R, DOHERTY M *et al.* (2000) Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response and reservoir potential in C57Bl/6 mice following high- and low dose challenge with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, **68**, 5176-5182.
  - LOGAN JMJ, EDWARDS KJ *et al.* (2001) Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(6), 2227-2232.
  - MILON G, DAVID PH (1999) Transmission stages of *Plasmodium* : does the parasite use the one same signal, provided by the host and the vector, for gametocytogenesis and sporozoite maturation? *Parasitologia*, **41**, 159-162.
  - MOMMERT S, GUTZMER R *et al.* (2001) Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(7), 2663-2667.
  - NICOLAS L, SIDJANSKI S *et al.* (2000) *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node : a study in laboratory mice. *Infection and Immunity*, **68**, 6561-6566.
  - NICOLAS L, PRINA E *et al.* (2002a) Real-Time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(5), 1666-1669.
  - NICOLAS L, MILON G, PRINA E (2002b) Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **51** : 295-299
  - OUMEISH OY (1999) Cutaneous leishmaniasis : a historical perspective. *Clinical Dermatology*, **17**, 249-254.
- Ouvrage collectif. (2000) LightCycler Operator's Manual. Version 3.3 Roche Molecular Biochemicals, avril 2000, 456p.
- SCHMITTGEN TD (2001) Real-time quantitative PCR. *Methods*, **25**(4), 383-429.
  - PETERS W, KILLICK-KENDRICK R (1987). *The leishmaniasis in biology and medicine, Vol. 1 : Biology and Epidemiology*. Academic Press, London, UK.
  - RIOUX JA. *et al.* (1986) Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. In : RIOUX JA, éditeur. *Leishmania, Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, IMEE, Montpellier, 365p.
  - SACKS D, KAMHAWI S (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 453-483.
  - SCHNEIDER A (2001) Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *International Journal for Parasitology*, **31**, 1403-1415.
  - SPÄTH GF, BEVERLEY SM. (2001) A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Experimental Parasitology*, **99**, 97-103