Fonctionnement des foyers de leishmanioses tel que révélé par analyses génétiques

Thierry De Meeûs*, Coodinateur du projet, DR2 CNRS, thierry.demeeus@ird.fr; Virginie Rougeron, Investigatrice principale, Thésarde, rougeron.virginie@gmail.com; Anne-Laure Bañuls, Co-Coordinatrice du projet, CR1 IRD, anne-laure.banuls@ird.fr.

Adresses: Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, UMR IRD-CNRS-UMI 2724, Montpellier, F-34394, France,

* Depuis Mars 2009, UMR 177 IRD-CIRAD, Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina-Faso.

Résumé: Les leishmanioses vectorisées par des femelles de diptères hématophages (phlébotomes) sont des maladies qui touchent un large éventail de Mammifères dont l'homme. Les agents de ces maladies, les *Leishmania*, ont longtemps été considérés comme fondamentalement clonaux, avec des phénomènes de recombinaison occasionnelle. Nos travaux montrent qu'en réalité, pour les différentes espèces que nous avons pu étudier, le génome des leishmanies porte la signature d'une reproduction sexuée assez importante (au moins 60%, dont 28% en autofécondation, pour *L. guyanensis*). Il apparaît également que les populations de leishmanies se structurent en petites sous-populations où la dérive génétique agit rapidement. Il est donc indispensable d'échantillonner ces organismes à des échelles spatio-temporelles restreintes telles que moins de 100 km² de surface (voire même beaucoup moins) et un intervalle de temps maximum d'un an). Pour *L. guyanensis*, pour qui ce calcul a été possible grâce au géoréférencement des souches, nous avons pu constater des capacités de diffusion maximales modestes de l'ordre de 19 km par an (et probablement beaucoup moins), ce qui laisse supposer une diffusion passive par les acteurs naturels du cycle (mammifères sauvages et femelles phlébotomes).

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies vectorielles qui touchent un large éventail de Mammifères dont l'homme. L'OMS a estimé à 367 millions le nombre de personnes exposées à la maladie, à 14 millions le nombre de personnes infectées, et à 1,5-2 millions le nombre de nouveaux cas par an (WHO, 2002). Malgré les recherches menées depuis le début du siècle, des études récentes (Gaunt et al., 2003; Gradoni et al., 2003; Guan et al., 2003; Nasereddin et al., 2005) montrent la réactivation de nombreux foyers, l'apparition de nouveaux foyers épidémiques, ainsi qu'une sous-estimation de la gravité de ces affections et de leur impact socio-économique. Par ailleurs, les associations leishmaniose/VIH posent un problème de plus en plus préoccupant, y compris dans les pays industrialisés (sud de l'Europe, dont la France) (Wolday et al., 2001; Desjeux, 2004).

Les *Leishmania*, parasites protozoaires kinétoplastidés, sont les agents pathogènes des leishmanioses, et les femelles phlébotomes (insectes diptères) leurs vecteurs. La transmission s'effectue par l'inoculation des parasites à un hôte vertébré lors du repas sanguin d'un phlébotome femelle infecté. Le cycle de développement cellulaire est complet quand, lors d'un repas sanguin, un phlébotome femelle ingère des cellules hôtes contenant des parasites.

Avant nos travaux, il était globalement admis que le genre *Leishmania* présentait un système de reproduction fondamentalement clonal, associé à des phénomènes de recombinaison occasionnelle (Dujardin et al., 1995; Bañuls et al., 1999a; Bañuls et al., 1999b; Tibayrenc & Ayala, 2002). Cependant, toutes les études publiées ont été réalisées à partir de marqueurs, de stratégies d'échantillonnage et de méthodes d'analyse mal ou peu adaptés. L'utilisation de l'hétérozygotie locale, à une échelle spatiotemporelle la plus réduite possible, mesurable chez les organismes diploïdes comme c'est le cas pour les *Leishmania*, s'avère un outil précieux (De Meeûs & Balloux, 2004, , 2005; De Meeûs et al., 2006). De plus, récemment il a été démontré pour la première fois expérimentalement qu'une éventuelle recombinaison sexuée entre souches leishmaniennes d'une même espèce pouvait avoir lieu chez le vecteur (Akopyants et al., 2009). Néanmoins, ces

expériences ne permettent pas d'inférer la fréquence de ces échanges génétiques. Il est donc essentiel pour toutes ces raisons de réaliser des études de génétique des populations avec des outils d'analyse, des marqueurs moléculaires et des échantillonnages adaptés.

Dans ce contexte, l'un des objectifs de notre projet de recherche ANR, et sans aucun doute le plus abouti, a consisté en l'analyse de la stratégie de reproduction de divers échantillons de *Leishmania* avec des outils permettant de contrôler au mieux l'aspect échantillonnage. Pour cela, nous avons considéré une échelle spatio-temporelle la plus restreinte possible et les échantillons ont été caractérisés par un grand nombre de marqueurs microsatellites. Ces marqueurs sont caractérisés par des séquences d'ADN répétées en tandem, très polymorphes et en principe non codantes, donc non soumises à sélection naturelle (Jarne & Lagoda, 1996) et dont la distribution du polymorphisme ne devrait refléter que des processus démographiques (systèmes de reproduction, dispersion, taille de populations).

Nous allons résumer dans ce qui suit les résultats obtenus sur trois jeux de données qui montrent que le génome des leishmanies porte une forte empreinte de reproduction sexuée et que leurs populations sont structurées à très petite échelle.

Matériel et Méthodes

Le premier jeu de données concerne des souches de l'espèce *Leishmania braziliensis* collectées en Forêt Amazonienne dans deux départements de surfaces de 100-200 km² environ, l'un situé au Pérou (32 isolats en 1993, 24 isolats en 1994) et l'autre en Bolivie (33 isolats en 1994, 36 souches en 1998) isolées de 125 patients humains. Ces souches ont été génotypées au niveau de 12 loci microsatellites (Rougeron et al., 2008).

Le second jeu de données concerne 28 souches du complexe *Leishmania guyanensis* contenant des souches présentant le profil isoenzymatique diagnostique soit de *L. panamensis*, espèce au statut controversé, soit de *L. guyanensis*. Au Pérou, 10 souches identifiées comme *L. guyanensis* ont été génotypées. En Equateur, quatre souches identifiées comme *L. guyanensis* et 14

souches de *L. panamensis* ont été génotypées. Cinq souches de référence ont également été rajoutées, trois de *L. guyanensis*, une de *L. panamensis* et une de *L. braziliensis* comme racine des deux autres espèces. Malheureusement la distribution temporelle n'est pas très homogène avec des souches isolées entre 1991 et 1992 en Equateur et entre 1987 et 2000 au Pérou. Ces souches ont été génotypées au niveau de 12 microsatellites mis au point pour l'étude à partir de différentes sources (Russell et al., 1999; Rougeron et al., 2008).

Le troisième jeu de données concerne les échantillons prélevés en Guyane dans le cadre des missions financées par l'ANR. Les souches de 153 patients ont été isolées, 37 en 2006, 52 en 2007 et 64 en 2008. Chaque souche a été géoréférencée, identifiée comme *L. guyanensis* par PCR-RFLP (Rotureau et al., 2006; Simon et al., 2010) et génotypée au niveau des 12 loci microsatellites mis au point lors du travail précédent.

Les méthodes d'analyses utilisées font appel à l'estimation non biaisée des *F*-statistiques de Wright (Wright, 1965) par la méthode de Weir et Cockerham (Weir & Cockerham, 1984). Le F_{IS} mesure la consanguinité relative des individus par rapport à la consanguinité des sous-populations. Il varie entre -1 (tous les individus hétérozygotes pour les deux mêmes allèles) et 1 (tous les individus homozygotes avec au moins deux allèles dans une sous-population) et il est nul quand la probabilité d'identité entre deux allèles d'un même individu est égale à celle entre individus de la même sous-population (attendu sous Hardy-Weinberg). C'est donc une mesure de la déviation par rapport au modèle de rencontre aléatoire des gamètes (panmixie). On peut inférer par exemple, en cas d'excès d'homozygotie, le taux d'autofécondation $s=2F_{IS}/(1-F_{IS})$ (voir par exemple (De Meeûs & McCoy, 2009)). Le F_{ST} mesure la consanguinité relative des sous-populations par rapport à celle de la population totale. Il varie entre 0 (la consanguinité locale est égale à celle mesurée entre sous-populations) à 1 (chaque sous-population ne contient qu'un seul des allèles présents). Il s'agit donc d'une mesure de la différenciation génétique entre sous-populations qui est reliée à la quantité de migrants échangée entre sous-populations. Entre deux sous-populations par exemple le nombre de migrants par génération $N_e m=(1-F_{ST})/8F_{ST}$ (voir par exemple (De Meeûs & McCoy, 2009)) où N_e

est l'effectif efficace (effectif génétique) d'une population locale et m la proportion d'immigrants; alors que dans un modèle en pas japonais (stepping stone) en deux dimensions et entre deux sous-populations adjascentes $N_e m=1/2\pi b$ où b est la pente de la régression $F_{ST}/(1-F_{ST})=a+b\mathrm{Log}(D_G)$ et où D_G est la distance géographique entre deux sous-populations (isolement par la distance) (voir par exemple (De Meeûs & McCoy, 2009)). Il est également intéressant de noter que le F_{ST} mesure aussi l'effet Wahlund, c'est à dire le F_{IS} produit par la différenciation génétique entre sous-populations si ces dernières étaient réunies en une seule, et en corrigeant pour les effets dus au régime de reproduction local.

La déviation par rapport au 0 attendu est testée par randomisations. Estimations et randomisations sont effectuées par le logiciel Fstat (Goudet, 1995) ou, pour l'isolement par la distance, le logiciel Genepop (Rousset, 2008).

Pour détecter un effet Wahlund dans nos sous-échantillons (excès d'homozygotes dans un sous-échantillon dus à la présence d'individus appartenant à des sous-populations différentes) nous avons utilisé un logiciel de clusterisation Bayesienne, BAPS (Corander et al., 2004; Corander & Marttinen, 2006) qui recherche parmi toutes les partitions possibles, celle qui agrège les individus les plus ressemblants.

Afin d'identifier par simulation le set de paramètres possibles correspondant au mieux à nos données obtenues, nous avons utilisé le logiciel EasyPop 2.0.1 (Balloux, 2001).

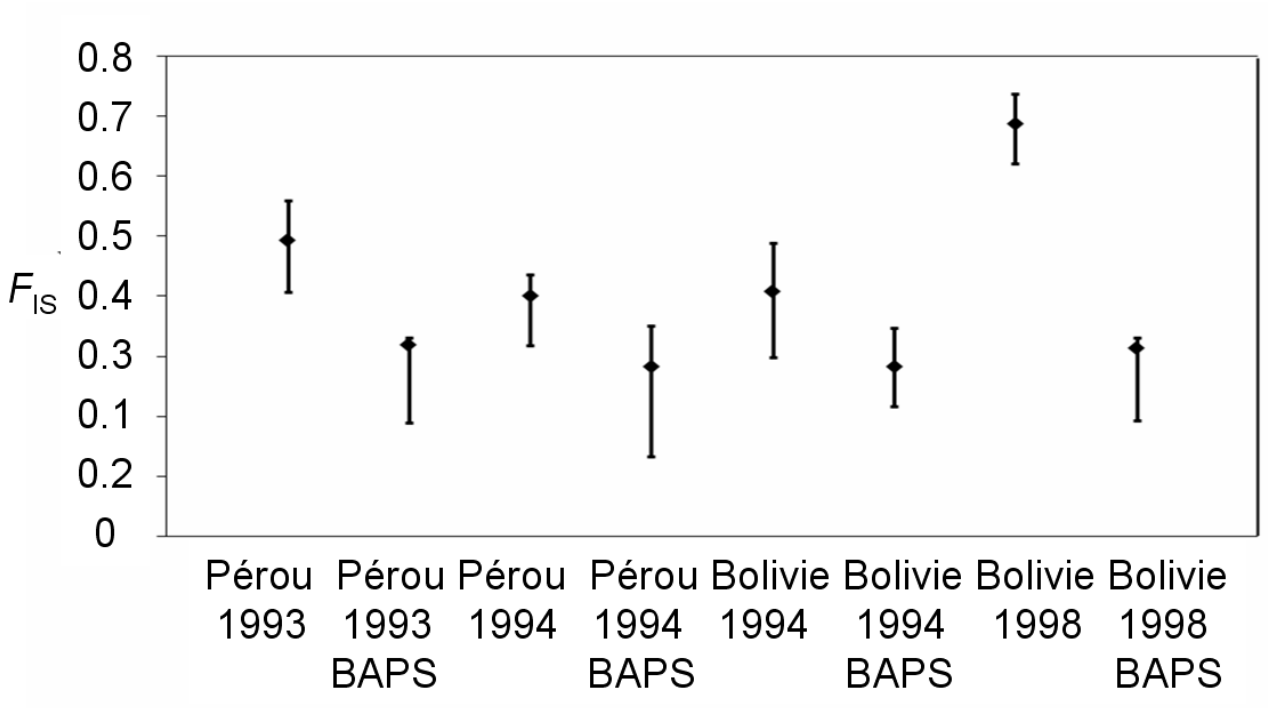
Quand les données le permettaient, nous avons également utilisé les méthodes du logiciel MLNE (Wang & Whitlock, 2003) pour estimer les effectifs efficaces et les taux de migrations sur données spatio-temporelles.

Résultats et discussion

L'analyse des données de *L. braziliensis* révèle un très important excès d'homozygotes dans tous les échantillons par rapport aux attendus sous l'hypothèse de croisements au hasard des gamètes (Figure 1). Une analyse spécifique suggère que ces homozygoties ne peuvent être dues à

des allèles nuls (non amplifiés par PCR) car aucun blanc (homozygotes nuls) n'est apparu durant le génotypage. Par ailleurs une analyse de régression entre le nombre de sites hétérozygotes et la taille des allèles (avec une corrélation attendue négative) ne plaide pas en faveur des conversions géniques, fréquentes chez les leishmanies (Mauricio et al., 2007). Par contre, une analyse avec le logiciel BAPS permet d'expliquer une grande part (40 %) de cette homozygotie par un effet Wahlund, c'est à dire un mélange d'individus n'appartenant pas aux mêmes unités démographiques.

Figure 1: Les F_{IS} mesurés dans les différents sous-échantillons de *L. braziliensis* ainsi que ceux obtenus dans les clusters construits par le logiciel BAPS.



L'homozygotie résiduelle reste cependant significative avec un F_{IS}≈0,3, compatible avec une autofécondation de s=0,46. Il est cependant possible que BAPS ne soit pas parvenu à trouver toutes les partitions possibles étant donnée la taille des aires échantillonnées et le nombre de souches dont nous disposions. La structure pourrait se situer à une échelle beaucoup plus petite.

Du fait que la plus grande part de la distribution de l'information génétique est expliquée par les clusters définis par BAPS, nous trouvons des différenciations résiduelles modestes mais

significatives entre le Pérou et la Bolivie en 1994 (7% de la variation totale) et entre années pour un même pays, ce dernier point témoignant d'une dérive génétique (stochasticité des populations) significative même à grande échelle et de la nécessité de ne pas mélanger des souches non contemporaines comme cela est cependant trop souvent le cas dans ce type d'études.

Pour les données de *L. guyanensis/panamensis* au Pérou et en Équateur, eu égard à la modestie de l'échantillonnage, les conclusions ne sont pas définitives mais apportent d'intéressantes ouvertures. Tout d'abord l'homozygotie est très forte (F_{IS} entre 0,7 et 0,8) sans aucune donnée manquante (pas d'allèle nul). La faiblesse des échantillons ne nous a pas permis d'explorer plus en avant les causes possibles de cette homozygotie prononcée. Nous supposons qu'un effet Wahlund doit également s'exprimer ici en plus du système de reproduction. Ensuite, la géographie et le statut spécifique (controversé) séparant *L. guyanensis* de la contestée *L. panamensis* jouent un rôle structurant important et significatif. La différenciation géographique reste le facteur majeur. La différenciation entre "espèces" est plus modeste et souffre d'un possible passage de gènes entre les deux taxons comme cela semble relativement fréquent chez les leishmanies (Bañuls et al., 2007).

Pour *L. guyanensis* en Guyane Française, aux échelles les plus fines possibles (localités) nous observons encore ici une importante et très significative homozygotie ($F_{IS}\approx 0,3$, valeur identique à celle trouvée dans les clusters BAPS de *L. braziliensis*) et une absence de données manquantes qui exclut l'existence d'allèles nuls. L'absence de déséquilibre de liaison, qui peut aussi être attribuée à un manque de puissance, mais surtout l'absence de tout génotype répété, confirment cette fois que les populations de *L. guyanensis* ne sont pas majoritairement clonales et au contraire produisent de nombreux descendants par voie sexuée. Nous avons pu estimer, à l'aide des outils de génétiques des populations ainsi que par simulations sous EasyPop 2.0.1 que nos résultats étaient compatibles avec un taux de clonalité de c=0,4, une autofécondation de $s'=(1-c)s=(1-0,4)\times 0,47=0,28$ et une allofécondation de 0,32. Une importante différenciation génétique sépare les différentes années et un important et significatif isolement par la distance a pu être mis en évidence. Avec l'aide des résultats donnés par MLNE et en estimant que la surface d'un foyer correspondait à

peu près à celle des localités (entre 10 et 100 km²), nous avons pu estimer une densité variant de 0,13 à 1,3 souches/km² (avec une moyenne de N_e=13 individus par sous-population) et une dispersion de 1 à 3 km par cycle, correspondant à un nombre de migrants de $N_e m$=2,8 individus par générations entre sous-populations mitoyennes, soit au maximum (pas de retours en arrière) 6 à 19 km par an.

La conclusion de ces études est que la clonalité influence peu la distribution de l'information génétique dans les populations de leishmanies qui allouent une large part de leur effort reproductif dans la voie sexuée. Les unités de base populationnelles de ces parasites se situent à une faible échelle réunissant peu d'individus. La dérive est donc rapide. Échantillonner sur de grandes surfaces et intégrer des individus non contemporains sont donc des pratiques qu'il faudra désormais éviter dans les futures études. Ces dernières permettront de préciser les résultats que nous avons obtenus et de savoir si ces derniers se répètent ou si au contraire la structure des populations des leishmanies et leur stratégie de reproduction dépend de l'espèce et/ou de l'environnement. Les modestes convergences observées entre *L. guyanensis* et *L. braziliensis* laissent présager une homogénéité, au moins pour les espèces de forêts tropicales du Nouveau Monde. Des données sur *L. donovani* dans un village du Soudan et sur *L. infantum* au Sénégal permettront de tester cette hypothèse sur deux espèces de l'Ancien Monde (analyse et article en cours de finalisation, Rougeron et al. en préparation).

Publications obtenues grâce au financement de l'ANR

Faye B, Bañuls AL, Bucheton B, Dione MM, Bassanganam O, Hide M, Dereure J, Choisy M, Ndiaye JL, Konaté O, Claire M, Senghor MW, Faye MN, Sy I, Niang AA, Molez JF, Victoir K, Marty P, Delaunay P, Knecht R, Mellul S, Diedhiou S, Gaye O, 2010, Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? Microbes Infect. [Epub ahead of print].

Faye B, Bucheton B, Bañuls A-L, Senghor MW, Niang AA, Diedhiou S, Konaté O, Dione MM, Hide M, Mellul S, Knecht R, Delaunay P, Marty P, Gaye O. Sero-prevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: Analysis of risk factors involved in transmission to humans. En 2nde révision dans Trans. Trop. Med. Hyg.

Rougeron, V., Bañuls, A.L., Carme, B., Simon, S., Couppié, P., Nacher, M., Hide M., De Meeûs, T. Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*, the case of *L. guyanensis*: another brick in the wall? (submitted)

Rougeron, V., Catzeflis, F., Hide, M., De Meeûs, T., Bañuls, A.L. First report of infection with *Leishmania Viannia braziliensis* in a domestic cat (Felis catus) in French Guiana. (submitted).

Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J.C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F.J., Bañuls, A.L., 2009, Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 10224-10229.

Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Waleckx, E., Dereure, J., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Bañuls, A.L., 2010, A battery of 12 microsatellite markers for genetic analysis of the *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* complex. Parasitology 137, 1879-1884.

Rougeron, V., De Meeûs, T., Kako Ouraga, S., Hide, M., Bañuls, A.-L., 2010. "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. PLoS Pathog 6, e1001004.

Rougeron, V., De Meeûs, T., Hide, M., Le Falher, G., Bucheton, B., Dereure, J., El-Safi, S. H., Bañuls, A.L. Reproductive strategy within *Leishmania donovani* complex: focus on a Sudanese sample. (en préparation).

Senghor, M. W., Faye, M. N., Faye, B., Diarra, K., Elguero, E., Gaye, O., Bañuls, A. L., Niang, A. A. Ecology of Phlebotomine Sand flies in the Rural Community of Mont Rolland (Thiès Region, Senegal): Area of Transmission of Canine Leishmaniasis. En 2nde révision dans PLoS One.

Simon, S., Veron, V., Carme, B., 2010, *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. Diagn Microbiol Infect Dis 66, 175-180.

Faits marquants, retombées prévisibles et perspectives de valorisation.

En parallèle d'une meilleure connaissance du modèle, un des résultats remarquable issu des travaux présentés ici concerne les recommandations en termes de stratégies d'échantillonnage pour ce type d'organismes (ex. Trypanosomatidés). La prise en compte de ces recommandations devrait permettre de beaucoup mieux appréhender l'épidémiologie et la transmission des maladies qui encore aujourd'hui recèlent bien des zones d'ombre. A terme, les connaissances issues de ce type d'études permettront une bien meilleure évaluation des risques dans les différentes zones concernées. La valorisation à court terme se traduira sous forme de publications et communications internationales. Nous espérons également préciser nos connaissances à l'aide des résultats de portage et d'identification d'espèces des prélèvements faits sur la faune sauvage ou domestique et sur les vecteurs dans différentes zones plus ou moins anthropisées (travail en cours, Faye et al. 2010, Senghor et al. en 2nde révision, Faye et al. en 2nde révision).

Littérature citée

Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M., Sacks, D.L., 2009, Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science 324, 265-268.

Balloux, F., 2001, EASYPOP (version 1.7): A computer program for population genetics simulations. J. Hered. 92, 301-302.

Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007, *Leishmania* and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv. Parasitol. 64, 1-109.

Bañuls, A.L., Hide, M., Tibayrenc, M., 1999a, Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. Int. J. Parasitol. 29, 1137-1147.

Bañuls, A.L., Jonquieres, R., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., Tibayrenc, M., 1999b, Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* distinct taxa? Am. J. Trop. Med. Hyg. 61, 838-845.

Corander, J., Marttinen, P., 2006, Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. Mol. Ecol. 15, 2833-2843.

Corander, J., Waldmann, P., Marttinen, P., Sillanpaa, M.J., 2004, BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. Bioinformatics 20, 2363-2369.

De Meeûs, T., Balloux, F., 2004, Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study. Infect. Genet. Evol. 4, 345-351.

De Meeûs, T., Balloux, F., 2005, F-statistics of clonal diploids structured in numerous demes. Mol. Ecol. 14, 2695-2702.

De Meeûs, T., Lehmann, L., Balloux, F., 2006, Molecular epidemiology of clonal diploids: A quick overview and a short DIY (do it yourself) notice. Infect. Genet. Evol. 6, 163-170.

De Meeûs, T., McCoy, K.D., 2009, La génétique des populations comme outil en épidémiologie, In: Guégan, J.F., Choisy, M. (Eds.) Introduction à l'Epidémiologie Intégrative des Maladies Infectieuses et Parasitaires. De Boek Université, Bruxelles, pp. 277-310.

Desjeux, P., 2004, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27, 305-318.

Dujardin, J.C., Bañuls, A.L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., DeDoncker, S., Jacquet, D., Leray, D., Arevalo, J., Tibayrenc, M., 1995, Putative *Leishmania* Hybrids in the Eastern Andean Valley of Huanuco, Peru. Acta Trop. 59, 293-307.

Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, I.A., Stothard, J.R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., Mena, S.S., Veazey, P., Miles, G.A.J., Acosta, N., de Arias, A.R., Miles, M.A., 2003, Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421, 936-939.

Goudet, J., 1995, FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. J. Hered. 86, 485-486.

Gradoni, L., Gramiccia, M., Scalone, A., 2003, Visceral leishmaniasis treatment, Italy. Emerg Infect Dis 9, 1617-1620.

Guan, L.R., Zuo, X.P., Yimamu, 2003, [Reemergence of visceral leishmaniasis in Kashi Prefecture, Xinjiang]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 21, 285.

Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996, Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol 11, 424-429.

Mauricio, I.L., Gaunt, M.W., Stothard, J.R., A., M.M., 2007, Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. Int. J. Parasitol. 37, 565–576.

Nasereddin, A., Baneth, G., Schonian, G., Kanaan, M., Jaffe, C.L., 2005, Molecular fingerprinting of Leishmania infantum strains following an outbreak of visceral leishmaniasis in central Israel. J Clin Microbiol 43, 6054-6059.

Rotureau, B., Ravel, C., Couppie, P., Pratlong, F., Nacher, M., Dedet, J.P., Carme, B., 2006, Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J. Clin. Microbiol. 44, 459-467.

Rougeron, V., Waleckx, E., Hide, M., De Meeûs, T., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Bañuls, A.L., 2008, A set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensis*. Molecular Ecology Resources 8, 351-353.

Rousset, F., 2008, GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8, 103-106.

Russell, R., Iribar, M.P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J.M., Dye, C., Ajioka, J.W., 1999, Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. Mol. Biochem. Parasitol. 103.

Simon, S., Veron, V., Carme, B., 2010, Leishmania spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. Diagn Microbiol Infect Dis 66, 175-180.

Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2002, The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol. 18, 405-410.

Wang, J.L., Whitlock, M.C., 2003, Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. Genetics 163, 429-446.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984, Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38, 1358-1370.

WHO, 2002, Leishmaniases. Available at http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/.

Wolday, D., Berhe, N., Akuffo, H., Desjeux, P., Britton, S., 2001, Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa. Med Microbiol Immunol (Berl) 190, 65-67.

Wright, S., 1965, The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. Evolution 19, 395-420.

De Meeûs Thierry, Rougeron V., Banuls Anne-Laure.

Fonctionnement des foyers de leishmanioses tel que révélé par analyses génétiques.

In : Colloque bilan des projets financés dans le cadre du programme SEST 2006. Paris : ANR, 2011, 13 p.

Colloque Santé-Environnement Santé-Travail, 2011/01/20-21, Paris