

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE - ALGER
المدرسة الوطنية للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

En vue de l'Obtention du Diplôme de
Docteur Vétérinaire

THEME

Etude bibliographique de la leishmaniose
et de son diagnostic par Pcr

Présenté par : KAFIA Zahra
OUZANI Riad

Soutenu le : 27/06/2005

14/09/2005

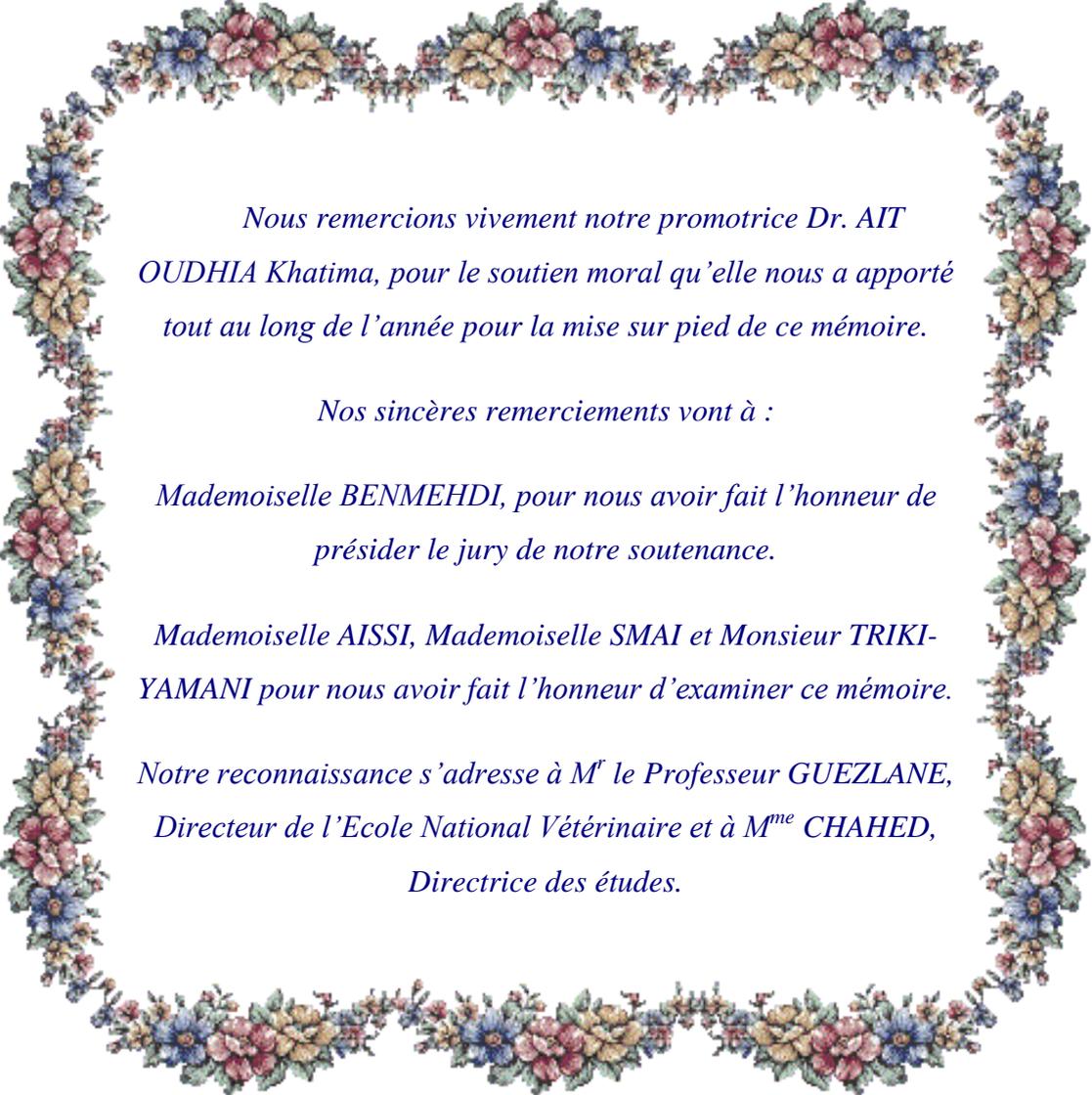
Le Jury :

Président : Dr. BENMEHDI M., Maître de conférence à l'ENV
Promoteur : Dr. AIT OUDHIA Kh., Maître Assistante à l'ENV
Examineur : Dr. AISSI M., de conférence à l'ENV
Examineur : Dr. TRIKI-YAMANI R. R., Maître Assistant à l'ENV
Examineur : Dr SMAI A., Maître Assistante à l'ENV

Année Universitaire : 2004/2005



Remerciements



Nous remercions vivement notre promotrice Dr. AIT OUDHIA Khatima, pour le soutien moral qu'elle nous a apporté tout au long de l'année pour la mise sur pied de ce mémoire.

Nos sincères remerciements vont à :

Mademoiselle BENMEHDI, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

Mademoiselle AISSI, Mademoiselle SMAI et Monsieur TRIKI-YAMANI pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Notre reconnaissance s'adresse à M^r le Professeur GUEZLANE, Directeur de l'Ecole National Vétérinaire et à M^{me} CHAHED, Directrice des études.



Dédicaces

A mes chers parents.

A mes sœurs et mon frère.

A tous mes ami(e)s.

Y.L.



Dédicaces

A mes chers parents.

A mes sœurs et mes frères.

A tous mes ami(e)s.

Riad

TABLE DES MATIERES

- Remerciements
- Dédicaces
- Résumé (français)
- Résumé (anglais)
- Résumé (arabe)
- Table des matières
- Liste des tableaux
- Liste des figures

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Tableau schématique des principaux complexes du genre <i>Leishmania</i> répartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique principale	04
Tableau 2.	Inventaire par station des phlébotomes capturés dans l'Algérois (avril – octobre 1992)	10
Tableau 3.	Distribution géographique, expression clinique, principal réservoir et vecteur	16
Tableau 4.	Comparaison des résultats des enquêtes sur la leishmaniose canine réalisées à Alger, depuis 1910	17
Tableau 5.	Nombre de cas de leishmaniose canine (<i>L. Can</i>), cutanée (<i>LCH</i>) et viscérale (<i>LVH</i>) humaines dans l'Algérois diagnostiqués à l'Institut Pasteur durant la période 1990 – 1997	18
Tableau 6.	Tableau clinique de la leishmaniose générale canine	21
Tableau 7.	Examens complémentaires réalisables face à une suspicion de leishmaniose	33
Tableau 8.	Avantages et limites des techniques PCR	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Ultrastructure de l'amastigote	6
Figure 2.	Frottis de suc ganglionnaire coloré au MGG.....	6
Figure 3.	Formes promastigotes (flagellées) de Leishmania en culture	7
Figure 4.	Ultrastructure du promastigote	7
Figure 5.	Organisation de kinetoplaste	9
Figure 6.	Organisation d'un minicercle	9
Figure 7.	Aspect général du phlébotome	10
Figure 8.	Cycle évolutif des leishmanioses	15
Figure 9.	Localisation des principaux foyers d'endémie des trois leishmanioses	16
Figure 10.	Dépilation et cachexie chez un chien en phase finale	18
Figure 11.	Étapes de la PCR	21

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont un groupe de maladies dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *leishmania*. Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères dont l'homme, auxquelles ils sont transmis par piqûre infestant d'un insecte vecteur, le phlébotome. Largement répandues à la surface du globe, les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées (DEDET, 1999).

Présentes sur quatre continents, elles affectent 88 pays, dont 72 parmi les plus faiblement développés. La population exposée au risque est estimée à 370 millions de personnes et le nombre de nouveaux cas annuellement diagnostiqués, toutes formes cliniques confondues est évalué entre 1,5 et 2 millions (WHO, 2000).

Les leishmanioses incluent des formes viscérales, des formes cutanées et des formes muqueuse, dont les taux de morbidité et de mortalité sont variables (CEDET, 2001). La leishmaniose canine quant à elle, comporte une association de lésions cutanéo-muqueuse et de lésions viscérales : c'est une leishmaniose générale. L'importance de cette maladie est très grande (BETTINI et GRADONI, 1986) :

- Sur le plan médical, pour les animaux malades : maladie grave et difficilement curable, à rechutes habituelles.
- Sur le plan social : les chiens parasités sont des réservoirs de parasites pour l'homme.

Le chien en tant que réservoir principal et très rarement en tant qu'agent contaminant, joue donc un rôle majeur dans ces régions enzootiques. Malgré la progression remarquable des connaissances sur la pathogénie ces 20 dernières années, tant pour la leishmaniose humaine que canine, les traitements et les suivis sont toujours insuffisants. La gravité de la maladie et le rôle fondamental de chien dans l'épidémiologie de cette infection, soulignent l'importance d'utiliser des méthodes fiables, précises et rapides de diagnostic, telle que la PCR.

Cette dernière est déjà utilisée avec succès comme technique puissante de diagnostic par détection de l'agent causal. Cette détection n'est possible qu'en exploitant les connaissances précises sur une partie du génome leishmanien : l'ADN kinetoplastique (MATHIS et al., 1996)

I. HISTORIQUE DES LEISHMANIOSES

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leur forme cutanées comme en témoigne le nom de **kala-azar** (fièvre noire) qui désigne la leishmaniose viscérale indienne. En effet, la constatation des lésions cutanées bien évidente remonte à plus haute antiquité aussi bien dans l'ancien que le nouveau monde, alors que l'individualisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pu se faire qu'au XIX^{ème} siècle. D'autre part l'omniprésence de ces affections, en rapport avec des parasites, vecteurs et réservoirs, a interpellé de nombreux observateurs, ce qui explique la fréquence des descriptions de cette parasitose.

Ainsi les leishmanioses tégumentaires de l'ancien monde, sont des affections dermatologiques connues depuis très longtemps. Al Boukhari, médecin arabe du X^{ème} décrit incontestablement cette affection cutanée et l'attribuait à une piqûre de moustique.

La première description moderne est celle de McNaught en **1882** et c'est Cunnigham en **1885** qui découvrit les parasites dans un prélèvement de « **bouton d'Orient** ».

En **1889**, en Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans les prélèvements d'ulcère, sans en déterminer le statut taxonomique. Ce même parasite fut étudié en **1903** par Wright chez un enfant arménien vivant à Boston, il fut considéré comme une microsporidie et reçu le nom de *Helcosoma tropicum*. La même année, les leishmanies sont mises en évidence par Marchand dans la rate d'un sujet mort de kala-azar. Le genre *Leishmania* est établi par Ross à la même année.

En **1909**, Lindenberg et Garini attribuent aux leishmanies toutes les lésions ulcéreuses observées chez les habitants du Brésil.

En **1910**, Pedrosa et Da Silva, réussissent à cultiver pour la première fois *Leishmania Brasiliensis* sur milieu NNN.

Vianna en **1911**, observe et décrit chez l'homme une lésion ulcéroproliférative du visage, chez des habitants du Brésil.

En **1912**, Laveran et Nattan appellent *L. tropica* l'agent du bouton d'Orient. Velez et Lopez, en 1913, parlent pour la première fois de *L. peruana* pour désigner le parasite de *l'uta*.

en 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle des vecteurs phlébotomes, en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées. Mais la transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Alder et Ber. Knowles. Parrot et Donatien le font pour la leishmaniose canine en 1930 (DEDET, 2001).

II. GENERALITES DES LEISHMANIOSES

II.1. Le parasite « *Leishmania* »

II.1.1. Taxonomie et Classification

Les Leishmanias sont des protozoaires flagellés appartenant à :

Règne	:	Eucaryota
Phylum	:	Protozoa (SIEBOLD, 1845)
Sous-phylum	:	Sarcomastigophora (HONIGBERG et BALAMUTH, 1963)
Super-classe	:	Mastigophora (DIESING, 1866)
Classe	:	Zoomastigophora (CALKING, 1909)
Order	:	Kinetoplastida (HONIGBERG ? 1963)
Sous-ordre	:	Trypanosomatina (KENT, 1880)
Famille	:	Trypanosomatidae (DOLFEIN, 1901)
Genre	:	<i>Leishmania</i> (ROSS, 1903)

Depuis la description de la première espèce de *Leishmania* par Laveran et Mensil en 1903, le nombre, d'entités taxonomiques a augmenté pour atteindre une trentaine de taxons distincts. Impossibles à différencier par la morphologie, les leishmanies ont toujours posé des problèmes d'identification, et par voie de conséquence de classification (DEDET, 2001).

Plusieurs types de classification se sont succédés et complétés. De 1916 à 1987, ont été essentiellement proposées des classifications monothétiques linnéennes, basées sur l'utilisation d'un petit nombre de caractères hiérarchisés. A partir des années 1980, ont émergé des classifications phénétiques, qui prennent en compte un grand nombre de caractères, tous de même valeur (absence de hiérarchisation), utilisés simultanément et sans hypothèse biologique. Parallèlement s'est développée la taxonomie cladistique à visée phylogénique, qui met en évidence des filiations au sein des espèces (DEDET & PRATLONG, 2000).

En pratique, le genre *Leishmania* est divisé en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia*. Au sein de ces sous-genres, ont été individualisés des complexes d'espèces, de valeur taxonomique différente suivant les types de classification (Tableau. 1) (RIOUX & LANOTTE, 1993)

Tableau 1. Tableau schématique des principaux complexes du genre *Leishmania* répartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique principales.

Sous-genre <i>Leishmania</i>			Sous-genre <i>Viannia</i>	
Ancien Monde	<i>L. donovani</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. killichi</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. arabica</i>		
	<i>L. infantum</i>			
Nouveau Monde		<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. Shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. braziliensis</i>
Clinique	Leishmaniose viscérale	Leishmaniose cutanée		Leishmaniose cutanéomuqueuse

II.1.2. Morphologie et Localisation

Au cours de son cycle reproductif, une leishmanie passe obligatoirement par deux hôtes : un arthropode et un vertébré. Outre la multiplication, ces derniers semblent déterminer des modifications morphologiques du parasite (HOARE et WALLACE, 1966). Actuellement, la terminologie : promastigote et amastigote est acceptée par tous les auteurs.

II.1.2.1. La forme amastigote

Le parasite est ovoïde, de 5 µm de long sur 2µm de large. Contrairement à ce que leur nom pourrait conduire à penser, les amastigotes sont également munis d'un flagelle, mais celui-ci est très court et ne dépasse pas le corps cellulaire. Le kinetoplaste de ces formes est le plus souvent juxta nucléaire (figure.1).

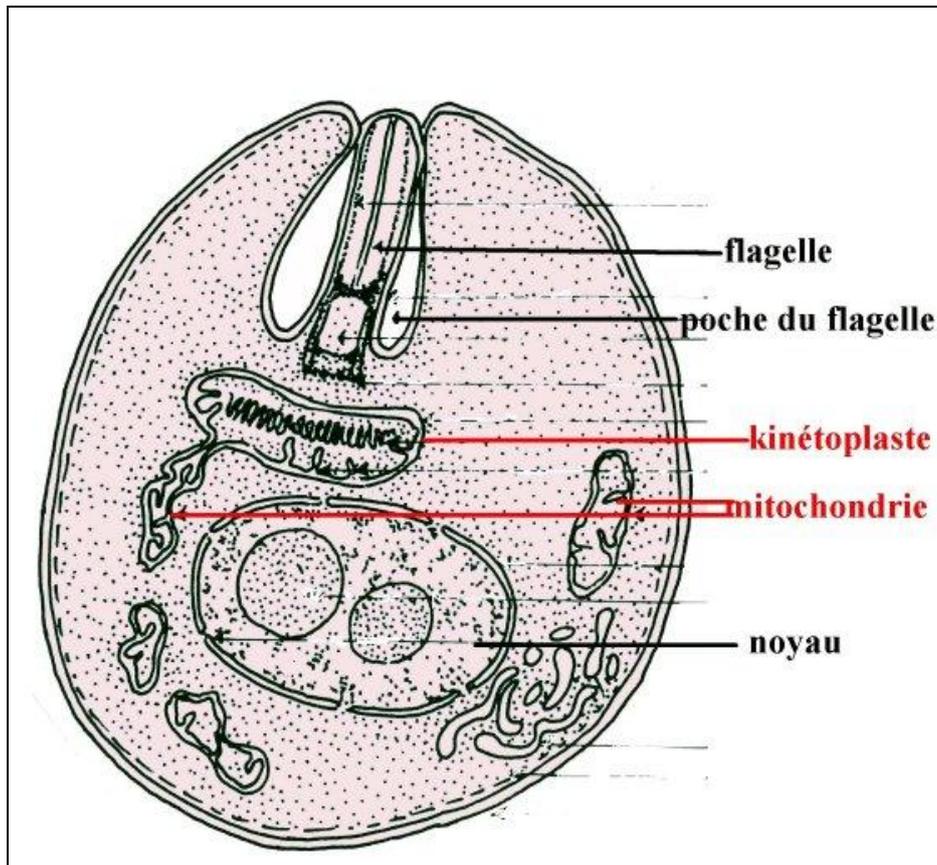


Figure .1. Ultrastructure d'un amastigote (Antoine J.C et al., 1999)

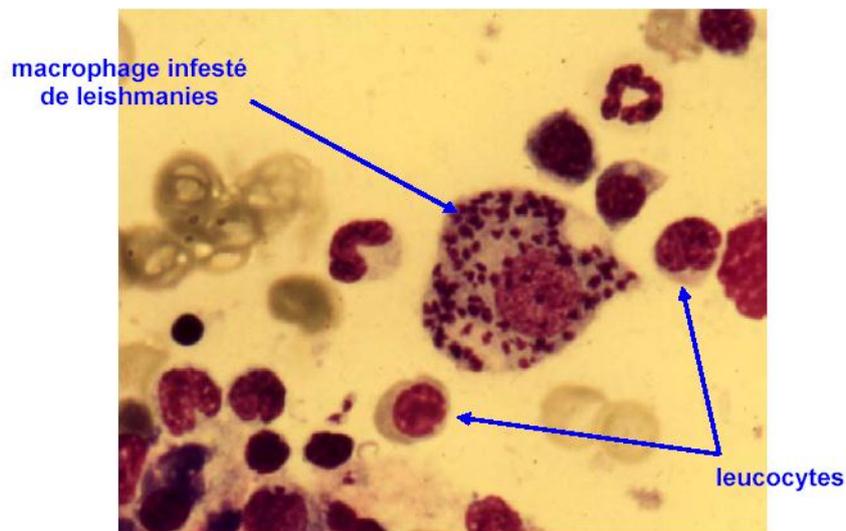


Figure .2. Frottis de suc ganglionnaire coloré au MGG
(Parasitologie et mycologie médicale - Faculté de Médecine de Strasbourg – 2004-2005)

La forme amastigote occupe une situation endocellulaire dans les éléments du système réticuloendothélial de l'hôte vertébré (Figure.2). Hormis l'aspect arrondi, la taille et le flagelle réduit, l'ultra structure paraît être comparable à celle de la forme promastigote (MAAZOUN, 1982).

II.1.2.2. La forme promastigote

Les promastigotes sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif de diptères hématophage piqueurs, connus sous le terme générique de phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 μm de longueur et de 1 à 4 μm de largeur, prolongé par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm le longueur et qui émerge de leur pole antérieur (Figure.3). Dans ces formes parasitaires, le kinetoplaste, une partie spécialisée du compartiment mitochondrial qui contient l'ADN de cet organe, est situé entre le noyau et la base du flagelle (Figure.4).

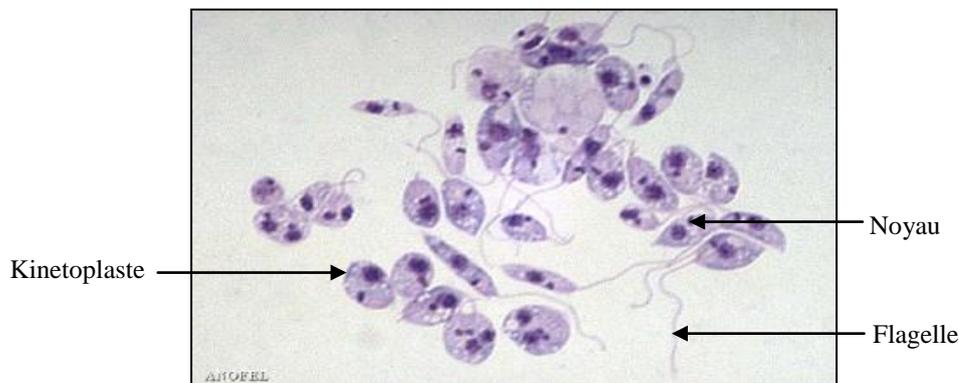


Figure.3. Formes promastigotes (flagellées) de Leishmania en culture
(Parasitologie et mycologie médicale - Faculté de Médecine de Strasbourg – 2004-2005)

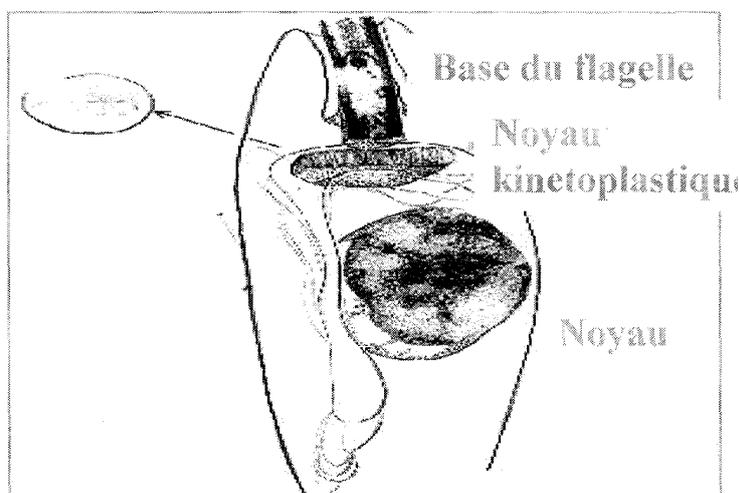


Figure.4. Ultrastructure de la forme promastigote (Antoine JC et al., 1999)

II.1.3. Biologie

Comme la plupart des parasites, les *Leishmania* sont étonnantes par leurs capacités adaptatives qui, au cours du cycle biologique, leur permettent de coloniser des habitats variés. La morphologie de ces parasites, notamment celle de leur stade promastigote, et leur métabolisme sont d'ailleurs très sensibles aux paramètres environnementaux et à leurs variations. La température, le pH, l'osmolarité du milieu, la pression en O₂ et en CO₂ ont été décrits comme influençant la forme parasitaire et les métabolismes du glucose et de certains acides aminés.

Deux paramètres subissent de grandes variations au cours du cycle, à savoir le pH et la température semblent plus particulièrement importants et pourraient commander la mise en route du programme de différenciation (ANTOINE et al., 1999). Lorsque les *Leishmania* passent des insectes vecteurs à sang froid à leurs hôtes mammaliens, elles subissent tout d'abord une augmentation de température d'environ 10°C puis, après internalisation par les macrophages, une chute du pH externe d'environ 2 unités

II.1.4. Kinetoplaste

Leishmania, comme tous les kinetoplastida, possède deux génomes, l'un nucléaire et l'autre kinetoplastique. Le génome kinetoplastique est constitué par deux catégories de molécules d'ADN circulaire qui sont entrelacées et organisées en réseau : les maxi-cercles, équivalents du génome mitochondrial des mammifères, et les mini-cercles qui interviennent en modifiant la transcription des gènes portés par les maxi-cercles (SIMPSON, 1987).

Le kinetoplaste contient 10 à 30 maxi-cercles identiques, d'une taille de 20 à 40 kb selon les espèces et environ 1000 à 10 000 mini ADN circulaires appelés mini-cercles (Figure.5), avec une taille inférieure à 2 kb. Ces mini-cercles codent pour des ARN guides impliqués dans l'editing des gènes mitochondriaux des plasmides trypanosomiaux. L'editing est une étape supplémentaire nécessaire de maturation après la transcription pour l'expression des gènes (READ et al., 1993).

Chaque mini-cercle présente une région variable d'environ 600 paires de base (pb) et une région constante d'environ 200 pb, conservée parmi les différentes espèces de *Leishmania* à travers le monde (Figure.6). Le nombre important de copies de mini-cercles au sein de chaque *Leishmania*, donc de ces séquences conservées, en fait des cibles idéales pour les amorces de la PCR qui peut amplifier toutes les classes connues de mini-cercles des différentes espèces de *Leishmania* (RODGERS et al., 1990).

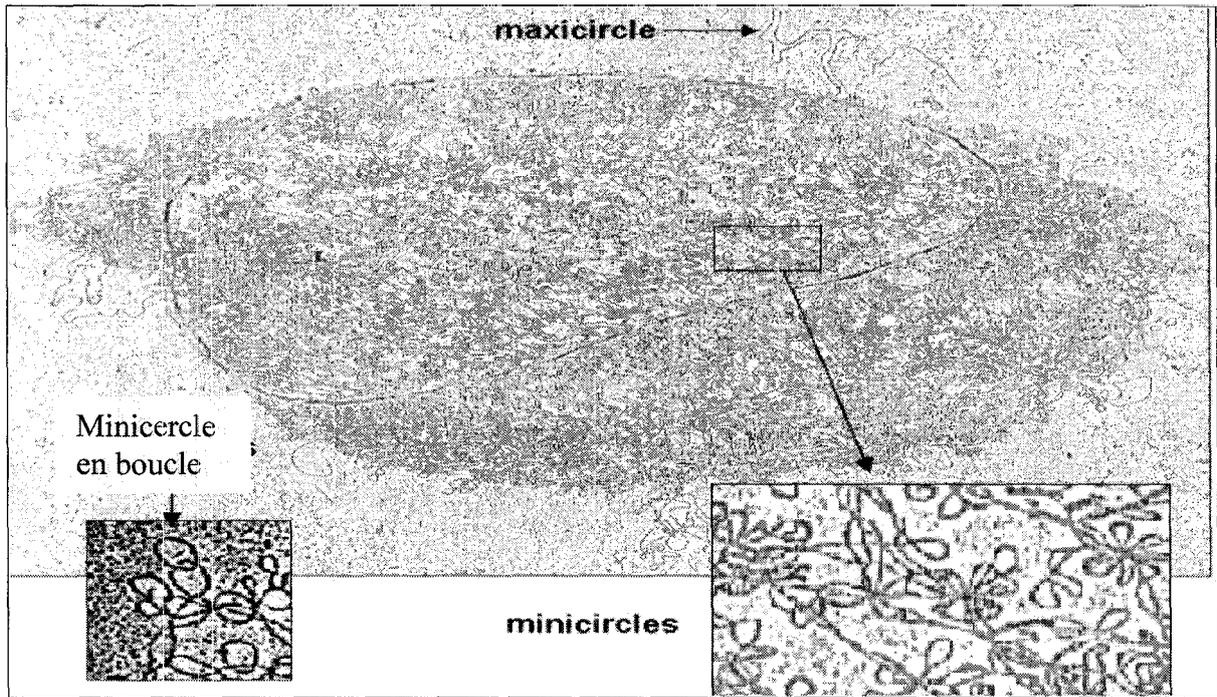


Figure.5. Organisation du kinetoplaste (Adini I et al., 1998)

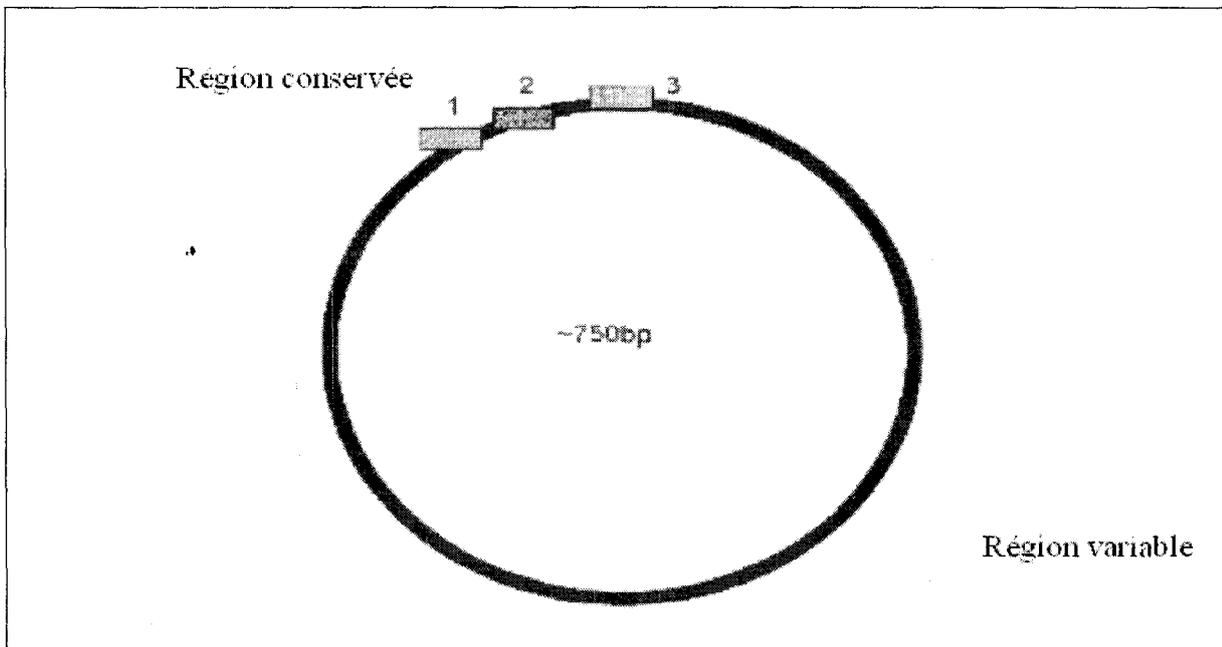


Figure.6. Organisation d'un mini-cercle (Adini I et al., 1998)

II.2. Le Vecteur « phlébotome »

II.2.1. Taxonomie et Classification

Les phlébotomes sont des diptères hématophages de petite taille, qui constituent au sein de la famille des Psychodidae, la sous-famille des Phlébotominae qui comporte environ 700 espèces actuellement décrites. L'intérêt qu'ils ont depuis longtemps, vient du fait que tous les vecteurs de la leishmaniose sont des phlébotomes (DEDET, 1999).

Phylum	: Arthropoda
Sous-phylum	: Tracheata
Classe	: Insecta
Sous-classe	: Pterygota
Super-ordre	: Neuropteroida
Ordre	: Diptera
Sous-ordre	: Nematocera
Famille	: Psychodidae (BIGOT, 1854)
Sous-famille	: Phlebotominae (KERTESZ, 1904)
Genre	: <i>Phlebotomus</i> (RONDANI, 1840).

II.2.2. Morphologie

Les phlébotomes sont des diptères hématophages présentant un corps frêle de 2 à 5 mm de long, possède une tête allongée, formant avec le corps un angle de 45°. Cette disposition lui confère une allure bossue. Velu, la garniture en poils sur les ailes et le corps lui donne une couleur générale jaune pâle ou grisâtre (Figure.7). Les pattes sont longues et les ailes, au repos sont relevées, et forment un angle de 45°.



Figure 7. Aspect général du phlébotome (Léger & Depaquit, 1999)

▪ **INVENTAIRE PAR STATION DES PHLEBOTOMES CAPTURES DANS L'ALGEROIS**

Pour l'échantillonnage des phlébotomes, nous avons utilisé les pièges adhésifs (papier 20 x 20 cm de côté, imprégnés d'huile de ricin)

La période de capture s'étalait sur sept mois (Avril – Octobre 1992, les pièges ont été régulièrement placés et retirés tous les 10 jours.

Huit stations ont été prospectées (El Annasers, Kouba, Alger Centre, Bir Mourad Raïs, Hydra, Draria, El Harrach et Chéraga.)

Tableau 2. Inventaire par station des phlébotomes capturés dans l'Algérois

(avril – octobre 1992)

(BELKAID et HARRAT, 1997)

Phlébotomes Station	S. m . parotti		P. perniciosus		P. longicurspis		Total
	M	F	M	F	M	F	
El Annasers	133	90	6	1	7	-	237
Kouba	215	161	32	8	63	13	492
Alger Centre	128	77	7	1	17	2	232
Bir Mourad Raïs	228	166	15	3	18	4	434
Hydra	169	136	19	4	10	1	339
Draria	242	221	37	5	22	3	530
El Harrach	205	133	27	3	18	1	387
Chéraga		74	21	5	13	-	308
Total	1515	1058	164	30	168	24	2959

Ce tableau montre la répartition des espèces de phlébotomes par station, il met en évidence la prédominance de *Sergentomyia minuta parroti*, suivi de phlébotomes *perniciosus* et de phlébotomes *longicurspis*.

L'abondance de *Sergentomyia minuta parroti* dans notre série s'explique par le choix des sites de captures, ils sont constitués essentiellement dans les barbacanes et les trous des murs qui offrent un gîte idéal pour cette espèce qui se nourrit aux dépens des animaux à sang froid (réptiles) ; par contre, les captures réalisées au niveau des chenils et aux alentours des habitations, ont montré la prédominance de *phlébotomus perniciosus* et de *phlébotomus longicurspis*, la première espèce est un vecteur prouvé de la leishmaniose viscérale, le rôle vecteur de la seconde reste à démontrer.

Les travaux antérieurs de Louis PARROT (PARROT L., 1951) ont permis l'isolement des leishmanias chez plusieurs spécimens femelles de cette espèce capturée au voisinage d'un chien leishmanien dans l'ancien chenil de l'Institut Pasteur d'Alger. Il est fort probable que cette espèce zoophile jouerait à côté de *P. perniciosus* un rôle majeur dans la transmission de la leishmaniose canine urbaine.

II.2.3. Biologie

Généralement nocturne, le phlébotome a un vol saccadé et de courte durée. Son activité paraît obéir au cycle saisonnier et nyctéméral. Le biotope des phlébotomes est variable selon l'espèce ; sa détermination est fortement influencée par des facteurs abiotiques (température, humidité) et biotique (besoins trophiques). L'aire de répartition du phlébotome est à priori délimitée par l'effet des paramètres précités (MAAZOUN, 1982).

Les phlébotomes sont largement répandus dans le monde partout où règne une température assez élevée pour leur permettre d'entrer en activité, au moins pendant une partie de l'année. Le stimulus qui provoque l'oviposition chez le phlébotome est le contact avec une surface humide, leurs oeufs se développent ensuite en larves sur le sol, dans les terriers, les nids, des rochers, de vieux murs ou les tas de débris végétaux, puis se transforment en pupes et enfin en imago (DEDET, 1999).

De mœurs nocturnes, les phlébotomes adultes gâtent durant la journée dans des endroits retirés, sombres et relativement humides. Se déplacent par vols courts avec des arrêts fréquents, leur rayon maximum de déplacement, variable selon les espèces, est d'environ 1 km. Ils ne commencent à s'agiter qu'à la tombée de la nuit lorsque les températures sont suffisamment élevées (19-20°C), s'il n'y a pas de vent (limite : 1 m/sec) et si le degré hygrométrique est élevé. Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, d'autres ne manifestent que peu ou pas de phototropisme (GOLVAN et al., 1963).

Seule, la femelle est hématophage, elle se nourrit sur les mammifères, les oiseaux, les reptiles, ou les batraciens. Certaines espèces sont très éclectiques, d'autres plus ou moins spécialisées dans l'exploitation d'un ou de plusieurs hôtes. Les espèces qui piquent l'homme sont généralement zoophiles, ce qui explique la transmission de ces zoonoses que sont les leishmanioses (DEDET, 1999).

Chez l'homme ce sont les parties découvertes qui sont exposées aux piqûres (visage, cou, mains et pieds), chez les animaux, ce sont les zones les moins velues (museau, oreilles). La piqûre est douloureuse, mais l'intensité des réactions de l'hôte varie selon l'espèce de phlébotomes en cause (douleur, apparition d'une papule ou d'une tache hémorragique) (GOLVAN et al., 1963).

II.3. Le Réservoir

Les leishmanioses sévissent dans les foyers endémiques, lorsque coexistent le mammifère-réservoir et l'insecte-vecteur, nécessaires au développement du protozoaire parasite (DEREURE, 1993).

Les mammifères peuvent être réservoirs ou hôtes accidentels pour le parasite. En fonction de l'hôte, il est admis de distinguer des cycles primaires et secondaires (zoonotiques) dans lesquels les mammifères sauvages ou domestiques interviennent en tant que réservoirs (GARBHAM, 1965).

II.3.1. La leishmaniose animale

Le spectre de vertébrés atteints de leishmanioses est aussi large que varié, en effet, Lézards, Marsupiaux, Edentés, Insectivores, Rongeurs, Carnivores et Primates peuvent constituer un maillon de la chaîne épidémiologique. Les espèces infestant l'homme, admettent généralement un rongeur ou un canidé comme réservoir d'infection. Les rongeurs incriminés appartiennent à plus de 15 genres (*Meriones*, *Rattus*, *Xerus*, *Rhombomys*...). Ils entrent dans les cycles de *Leishmania* à tropisme cutané (RIOUX et al., 1972).

Les canidés sont surtout réservoirs des leishmanies à tropisme viscéral, quoique l'implication de certaines espèces dans plusieurs foyers de leishmaniose cutanée, soit suspectée. *Canis familiaris*, *C. aureus*, *C. lupus* ; *Vulpus vulpus*, *V. pallida*, *Lycolapex vetulus* sont les réservoirs les plus connus. *Cerdocyon thous*, *Fennecus zerda*, constituent d'autres réservoirs d'importance moindre (BETTINI et GRADONI, 1986).

Depuis longtemps considéré comme la clef de voûte des foyers secondaires de leishmaniose viscérale, le réservoir canin se divise au sens écologique en classes sociales qui ne sont pas impliquées de la même manière dans la dynamique du complexe leishmanien (GIRAUD et al., 1950). Le comportement du chien profondément influencé par son mode de vie, intervient en effet souvent de façon décisive, ne serait-ce qu'en augmentant les probabilités de contact avec les vecteurs ou en permettant une circulation plus rapide du parasite.

Après avoir constaté l'infestation naturelle du renard (GOLVAN et RIOUX, 1963), une étude des préférences alimentaires du vecteur habituel, *Phlebotomus ariasi*, a été conduite sur le renard comparativement au chien, aux rongeurs et aux reptiles. Pour ce faire, les animaux ont été mis en contact pendant une nuit, sous une moustiquaire bordée, avec un certain nombre de phlébotomes non gorgés. Le matin, les femelles étaient re-capturées et identifiées, et les résultats exprimés en pourcentage de femelles gorgées. Cette méthode confirme la préférence tropique de

Phlebotomus ariasi à l'égard du chien (91%), 55% chez le renard, à l'inverse des Lagomorphes (26%), des Rongeurs et des Reptiles (0%) (GOLVAN et RIOUX, 1963).

II.3.2. La leishmaniose humaine

II.3.2.1. Leishmaniose viscérale

En région méditerranéenne, elle se caractérise par la présence du parasite dans les organes profonds (moelle osseuse, rate, foie). La leishmanie endoparasite, envahit rarement le système sanguin. De ce fait, il paraît peut probable que le phlébotome puisse s'infecter sur l'homme. Ceci plaide fortement en faveur du caractère secondaire du rôle joué par l'homme dans le maintien de la parasitose. Il constituerait une « impasse parasitaire », ce qui implique la nécessité du concours d'un autre hôte vertébré dans le cycle épidémiologique.

L'infestation inter humaine, quoique exceptionnelle, est également possible, contamination transfusionnelle (ANDRE et al., 1957), vénérienne (SYMMERS, 1960) et transplacentaire (LOW et COOCK, 1926).

II.3.2.2. Leishmaniose cutanée

La multiplicité des formes cliniques et épidémiologiques cutanée humaine, a servi pour individualiser plusieurs espèces. Sur le plan épidémiologique, on peut opposer les foyers où la maladie s'exprime sur la mode épidémique à ceux où elle se propage sur les modes : endémique ou sporadique. Dans les deux cas, l'homme peut constituer avec les hôtes, domestiques ou sauvages, canidés ou rongeurs, un réservoir d'infection.

Les tableaux cliniques de cette affection vont des lésions bénignes, uniques ou multiples, non ulcérées ou ulcérées, jusqu'aux formes cutanéomuqueuses dont l'évolution peut être maligne.

II.4. Le Cycle Evolutif

Le cycle des leishmanioses est un cycle hétéroxène présentant deux hôtes, un hôte invertébré (phlébotome) et un hôte vertébré (homme, chien, renard...) (figure 8.).

C'est au cours du repas sanguin pris sur un animal ou un sujet infecté que le phlébotome absorbe les leishmanies sous la forme **amastigote**, parasite intracellulaire du système réticulo-histiocytaire du sang et de la peau des vertébrés. La rupture des cellules hôtes intervient au cours de l'ingestion et les amastigotes sont libérées.

Chez les insectes, le repas sanguin est rapidement entouré par la membrane péritrophique sécrétée par les cellules intestinales abdominales. En effet, au cours de 24-48 heures qui suivent le repas sanguin, les leishmanies se multiplient une ou deux fois dans l'intestin du phlébotome sous la forme amastigote. Il semblerait qu'il existe dans le sang de l'hôte vertébré un facteur inhibant leur transformation en forme **promastigote**, caractéristique de la phase hôte invertébré, qui ne pourrait intervenir qu'après destruction de ce facteur par les enzymes protéolytiques sécrétées par l'insecte. Ainsi ce n'est qu'après ce temps de latence que les formes promastigotes apparaissent et se multiplient. Au bout de 3-4 jours, elles s'échappent de la membrane péritrophique qui est déchirée et gagnent leur lieu de multiplication qui varie en fonction de l'espèce de *Leishmania*. Ce critère a permis la mise en place d'une classification des *Leishmania* en : **Hypopylaria** (au niveau de l'intestin postérieur) ; **Péripylaria** (de part et d'autre du pylore) ; **Suprapylaria** (au niveau de l'intestin antérieur et moyen).

Les leishmanies gagnent ensuite les pièces buccales. La durée du cycle chez le phlébotome est de 4-7 jours suivant la température. Le vecteur peut alors transmettre le parasite à un animal ou à l'homme. Les promastigotes injectés seront transformés en amastigotes lors de leur passage en **phagolysosome**, dans lesquels ils se multiplient entraînant la lyse cellulaire successive des macrophages du sang ou de la peau de l'hôte vertébré (DEDET, 2001). Les phlébotomes infectés ont des difficultés à prendre leur repas sanguin de façon continue, ce qui peut être un facteur de multiplication des piqûres et donc d'augmentation de transmission.

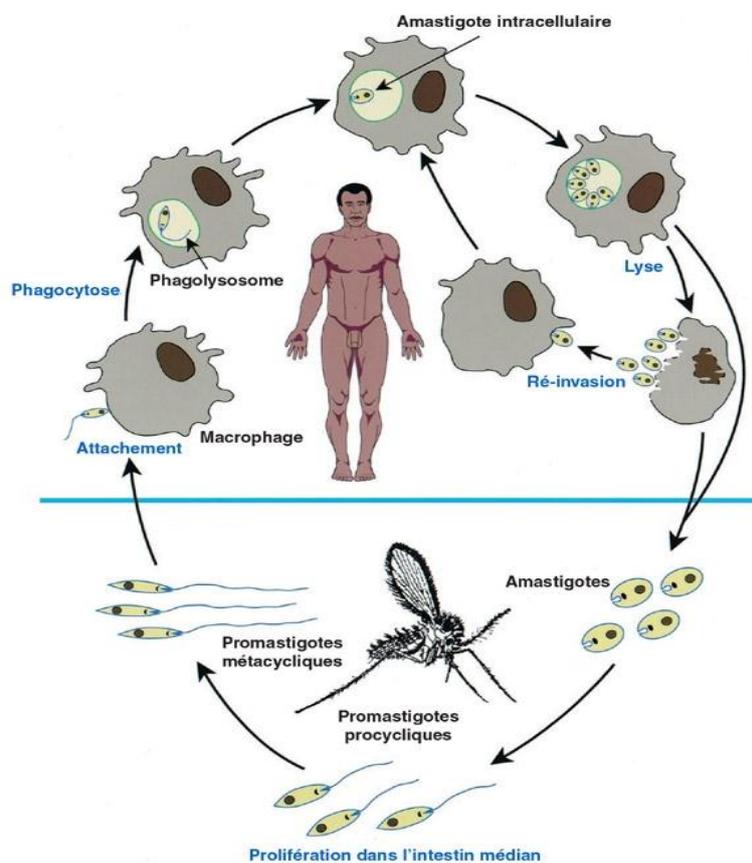


Figure .8. Cycle Evolutif des Leishmanioses (DEDET, 2001)

III. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES LEISHMANIOSES

Largement répandues à la surface du globe, les leishmanioses possèdent une aire géographique globalement intertropicale, mais débordant fortement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe et d'Asie (Figure.9.).

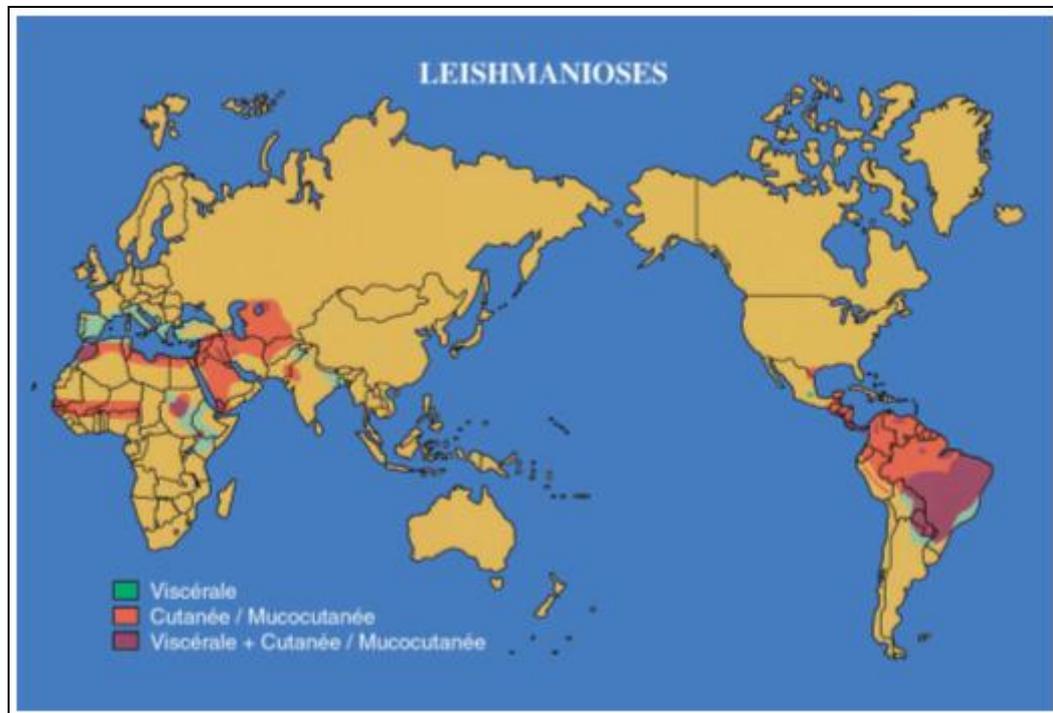


Figure.9. Localisation des Principaux Foyers d'Endémie des Trois Leishmanioses

Présentes sur quatre des cinq continents, elles affectent 88 pays dont 21 dans le nouveau et 66 dans l'ancien. La population exposée au risque de leishmaniose est estimée à 350 millions de personnes, et l'incidence annuelle mondiale comprise entre 1.5 et 2 millions, dont un demi-million pour la leishmaniose viscérale et 1 à 1,5 million pour la leishmaniose cutanée et mucocutanée. Soixante douze (72) des quatre vingt huit (88) pays où les leishmanioses sont endémiques sont des pays en développement, dont treize parmi les plus pauvres (DESJEUX, 1999).

Parmi les deux espèces couramment responsables de leishmaniose viscérale, *Leishmania donovani* est anthroponotique et sévit principalement en Inde et en Afrique de l'Est (Tableau 2.;, cependant que *Leishmania infantum* est une espèce zoonotique (réservoir canin) s'étendant de la Chine à l'Amérique de Sud. En ce qui concerne les leishmanioses cutanées, l'Ancien Monde présente des espèces à aire géographique vaste, telles *Leishmania major* et *L. tropica*, ainsi que des espèces à distribution restreinte comme *L. killicki* (Tunisie), *L. aethiopica* (Ethiopie), *L. arabica* (Arabie Saoudite).

Tableau 3. Distribution géographique, expression clinique, principal réservoir et vecteur

(KILLICK-KENDRICK, 1990 ; LANE, 1993 ; COLLIER et al., 1998).

<i>Espèces</i>	<i>Maladies</i>	<i>Distribution</i>	<i>Réservoir</i>	<i>Vecteur</i>
<i>L. tropica</i>	Cutanée sèche: urbaine et rurale	Europe, Asie, Afrique	Chiens	<i>P. sergenti</i> <i>P. guggisbergi</i>
<i>L. major</i>	Cutanée humide: rurale	Asie, Afrique	Rongeurs	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>
<i>L. aethiopica</i>	Cutanée sèche: Diffuse	Ethiopie, Kenya	Rongeurs	<i>P. longi</i> <i>P. pedifer</i>
<i>L. donovani</i>	Viscérale (Kala-Azar)	Asie, Afrique	Chiens	<i>P. alixandri</i> <i>P. martini</i> <i>P. celiae</i> <i>P. argentipes</i>
<i>L. infantum</i>	viscérale Infantile	Méditerranée	Chiens, Renards	<i>P. ariasi</i> <i>P. perfliewi</i> <i>P. perniciosus</i> <i>P. syriacus</i>

IV. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DE LA LEISHMANIOSE DANS L'ALGEROIS

L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 et 2 millions de cas (DEJEUX P., 1996). L'Algérie qui compte parmi les pays les plus exposés est concernée par trois formes cliniques sévissant à l'état eudémique : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) et la leishmaniose cutanée zoonotique.

La leishmaniose viscérale infantile et la LCS se répartissent sur toute la partie nord du pays et leur distribution géographique correspond à celle de la leishmaniose canine.

Il est important de noter que le foyer de la Grande Kabylie regroupe à lui seul près de 50% de cas recensés (HARRAT Z., HAMRIOUI B., BALKAID M & TABEL DERRAZ O., 1995).

A la suite de la notification du premier cas de leishmaniose canine à Alger par les frères SERGENTS en 1910 (SERGENT ED et SERGENT ET, 1910), plusieurs enquêtes ont été réalisées dans le but de préciser la fréquence et l'évolution de cette zoonose dans la capitale du pays (DEDET JP, DESJEUX P., HARRAT Z., LEMAIRE G. POUL J. LOUFRANI G., SENEVET G. et al)

Matériel et Méthodes

1800 sérums canins et 22 sérums provenant de malades suspects de Kala-Azar, originaire d'Alger, ont été analysé pendant la période de 1990 à 1997.

Les chiens examinés par les vétérinaires provenant tous de la zone d'Alger et sa banlieue.

- La recherche d'anticorps anti-leishmanien a été effectuée par la technique d'himmunorescence utilisait un antigène figuré, provenant d'une souche canine de leishmania infantum (MC CAN/DZ/83/LIPA116), le seuil de positivité est fixé à 1/80 et la recherche des parasites chez le chien a été réalisée par ponction à l'aiguille du ganglion poplité et par hémoculture.
- Chez l'homme, les souches ont été isolées par ponction-aspiration de la moelle osseuse et à partir des lésions cutanées par partage, suivi de ponction aspiration du suc dermique.
- Les parasites isolées sur les milieux NNN et sur milieu de sérum de lapin coagulé (BELKAID M., HARRAT Z., HAMRIOUI B., THELLIER M., DARTY A. et DANIS M., 1996) ont été identifiés par la technique d'électrophorèse des isoenzymes sur gel épais d'amidon sur la base de quinze systèmes enzymatiques (RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P et PERRIERES, 1990).

Tableau .4. Comparaison des résultats des enquêtes sur la leishmaniose canine réalisées à Alger, depuis 1910
(BELKAID et HARRAT, 1997)

Chiens examinés				
Période	Total	Positifs	%	Auteurs
1910 – 1913	833	25	3 %	SERGENT Ed, SERGENT Et (14) SENEVET (13), LEMAIRE et coll, (8)
1949 – 1950	444	35	7,8 %	LOUFRANI (9), POUL (11)
1972 – 1973	357	9	2,5 %	DEDET et coll. (2)
1990 - 1997	1800	666	37%	Auteurs (5)

Les trois premières enquêtes ont été effectuées de façon systématique au niveau de la fourrière canine. La dernière enquête concernait huit centres urbains de la capitale. Noter l'augmentation importante du nombre de cas de chiens leishmaniens au cours de la dernière décennie.

D'après le tableau 4, que le nombre de chiens leishmaniens du Gouvernorat d'Alger est important ; que les 1800 individus testés, 666 se sont révélés positifs.

En comparant les résultats de cette étude avec ceux des enquêtes antérieures, on remarque que la fréquence de la leishmaniose canine a considérablement augmenté insignifiante au début du siècle dernier où elle était au alentour de 3 % elle a atteint au cours des années quatre-vingt dix, un taux inquiétant de 37 %.

A travers cette étude, nous avons également remarqué que certaines races canines sont particulièrement sensibles à l'infection leishmanienne, 80% des chiens positifs sont des bergers allemands. Suivis des chiens doberman. La race commune est curieusement moins affectée que les autres. Ce phénomène est probablement lié à la réceptivité de l'hôte réservoir.

Dans notre série, 70% des chiens positifs présentent des signes communs à la leishmaniose canine. L'amaigrissement et les lésions cutanées occupent l'essentiel du tableau clinique (tableau 4). Cependant, la fréquence des chiens « porteurs saints » est de 25%. Cinq souches d'origine canine (MCAN/DZ/90/LIPA 250, MCAN/DZ/96/LIPA 463, MCAN/DZ/97/LIPA 731, MCAN/DZ/97/LIPA 732, MCAN/DZ/97/LIPA 733) ont été isolées.

L'identification a révélé que tous les isolats s'apparentaient à leishmania infantum zymodème Mon-1, principal agent de la LV en Algérie et dans le bassin méditerranéen (HARRAT Z., PRATLONG F, BELLAZOUG S., DEREUR J., DENIAU M., et al, 1996).

Tableau.5. Nombre de cas de leishmaniose canine (L. Can), cutanée (LCH) et viscérale (LVH) humaines dans l'Algérois diagnostiqués à l'Institut Pasteur durant la période 1990 – 1997 (BELKAID et HARRAT, 1997)

Forme clinique		1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	Total
L.Can	Positif	18	30	77	104	79	137	109	112	666 (37%)
	Négatif	15	72	114	174	180	223	164	192	1134
	Total	33	102	191	278	259	360	273	304	1800
L C H	Positif	2	1	2	4	2	6	6	17	40
	Négatif	17	24	19	33	11	45	33	51	233
	Total	19	25	21	37	13	51	39	68	273
LV H	Positif	1	2	2	1	5	3	7	1	22
	Négatif	13	11	9	16	33	31	28	17	158
	Total	14	13	11	17	38	34	35	18	180

Les poussées de la maladie chez le chien s'accompagnent souvent d'une augmentation du nombre de cas de leishmaniose viscérale et cutanées humaines (tableau 5), atteinte de l'homme est observée de plus en plus de nos jours.

40 cas de leishmaniose cutanée et 22 cas de leishmaniose viscérale ont été diagnostiqués, la parasitologie a été apportée dans tous les cas cutanés.

Pour la forme viscérale où 18 cas sur 22 cas ont été confirmés par l'examen direct et/ou par la culture. Quatre souches d'origine humaine, dont 3 cutanées (MHOM/DZ/92/LIPA 350, MHOM/DZ/92/LIPA 364, MHOM/DZ/93/LIPA 406), et viscérale (MHOM/DZ/96/LIPA 482) ont été isolées.

Les souches dermatotropes identifiées appartiennent au zymodèmes MON-24 de *leishmania infantum*. La souche viscérale isolée est identique au Zymedème MON-1 du même complexe.

V. LA LEISHMANIOSE CANINE

Des études portant sur des chiens soumis à des conditions d'infestation en milieu naturel ont permis de démontrer que l'affection débute par un chancre d'inoculation, déjà suspecté en 1,932 (ALDER et THEODOR, 1932). Celui-ci siège au niveau de la truffe, du chanfrein ou de la face interne de l'oreille. Les lésions peuvent être uniques ou multiples (VIDOR et al., 1991) et surviennent de un à six mois après la fin de la période d'activité des phlébotomes-vecteurs, avec un maximum au troisième mois. La durée d'évolution de ces lésions est de trois à neuf mois. La cicatrisation est la règle et la viscéralisation survient dans un délai variable, de quelques mois le plus souvent, à plusieurs années exceptionnellement.

Il a été constaté que certains chiens, bien qu'ayant présenté un chancre d'inoculation, confirmé parasitologiquement, ne présentent pas de signes, ni cliniques ni sérologiques, de leishmaniose viscérale. Il pourrait s'agir soit de cas de résistance spontanée de l'animal, soit de formes infra-cliniques déjà mentionnées par certains auteurs (PINELLI et al., 1994).

Les signes cliniques de la leishmaniose canine ont déjà été décrits de longue date (Tableau.3.). Les signes majeurs de l'affection canine sont à la fois généraux et cutanés. Au plan général, le chien leishmanien présente un amaigrissement généralisé (Figure 10.), bien que l'appétit soit conservé, responsable d'un état d'asthénie et de faiblesse. L'amyotrophie est particulièrement marquée au niveau de la face, donnant à l'animal un aspect sénile, atonique et triste. L'hyperthermie est aussi présente et se manifeste par une polydipsie.

Au niveau des organes profonds, hépato-splénomégalie et adénopathies sont fréquentes. Les signes cutanées sont nombreux : hyperkératose, dépigmentation et dépilation (signe des lunettes), mais pouvant également intéresser d'autres régions du corps (bord des oreille, l'arrière train, queue...). L'onychogryphose est un signe très fréquemment retrouvé. Des ulcérations des muqueuses nasales, associées à la thrombopénie, sont responsables d'epistaxix. Les lésions de l'oeil affectant les paupières (granulomes), la conjonctive (hyperhémie), la cornée (kératite), l'uvéite (uvéite) ainsi que la rétine (choriorétine), sont généralement associées aux tableau clinique (McCONNEL et al., 1970).

En résumé, l'expression clinique est la conséquence directe du statut immunitaire, elle dépend en particulier des interactions entre les *Leishmania* d'une part et les cellules immunitaires d'autre part.



Figure.10. dépilation et cachexie chez un chien en phase terminale.

(DEDET, 1999)

Tableau.6. Tableau clinique de la leishmaniose générale canine
(DURATE et al., 1986)

Organes touchés	Symptômes observés
Comportement, état général	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Modification du caractère ✦ Abattement ✦ Amaigrissement important
Organes du SPM	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Hypertrophie des ganglions lymphatiques ✦ Anémie ✦ Troubles de la coagulation ✦ Splénomégalie
Peau	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Lésions cutanées : dépilation avec squamosis ✦ Hyperkératose, ulcérations muco-cutanées ✦ Allongement des griffes
Reins	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Insuffisance rénale ✦ Syndrome néphrotique
Yeux	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Conjonctivite ✦ Uvéite ✦ Kératite
Appareil digestif	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Vomissement ✦ Diarrhée, méléna
Système nerveux/ ostéo-musculaire	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Parésie, paraplégie ✦ Arthrite ✦ Atrophie musculaire
Appareil respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Toux ✦ Eternuements

VI. RELATION HOTE VERTEBRE-PARASITE

VI.1. Infection et dissémination

Les leishmanies parasitent généralement les cellules phagocytaires mononuclées. Le promastigote inoculé se transforme en amastigote. La survie et la division des amastigotes dépend en premier lieu, de la sensibilité du macrophage, et en second lieu de la capacité du parasite de contrer le processus de défense cellulaire.

Au sein du macrophage, la leishmanie se situe à l'intérieur d'une vacuole phagocytaire (phagosome) qui devrait normalement fusionner avec les lysosomes contenant les précurseurs des enzymes digestives. L'ensemble constituerait le phagolysosome. L'amastigote doit, pour assurer sa survie et sa multiplication, éviter les enzymes en inhibant la fusion, résister à la protéolyse si la fusion a lieu ou encore échapper du phagosome.

Le parasite diffuse soit lors de l'éclatement des cellules lourdement infectées ou bien en excréant des substances mitogènes qui induisent la division du macrophage (LUMSDEN, 1974), ou encore par la sortie un à un des parasites sans détérioration de la cellule. Dans tous les cas, la dissémination du parasite est assurée.

VI.2. Pouvoir pathogène des leishmanies

Dans certains cas, les leishmanies se multiplient sans aucun pouvoir pathogène vis à vis de l'hôte sauf si ce dernier est immunodépressif (BRYCESON et al., 1972). Par ailleurs, comme pour plusieurs bactéries et protozoaires parasites, elles peuvent perdre de leur pathogénicité par passage sur milieux de culture et la regagner lorsqu'elles sont inocuées à un animal sensible (WONDE et LAMY, 1967).

VI.3. Réactions immunitaires de l'hôte

VI.3.1. Mécanisme d'action

L'immunité humorale et cellulaire agissent, généralement d'une manière synergique, pour attaquer l'organisme infectieux et inhiber l'action éventuelle de ses excréments. Le processus de sensibilisation des macrophages sains n'est pas clarifié. On pourrait penser que les macrophages infestés envoient un signal aux cellules saines, sous formes d'interférons. On pourrait penser aussi que ces antigènes sont à l'origine de la sensibilisation des lymphocytes B, ces derniers enverraient un signal, qui, décodé par les lymphocytes T, induit leur différenciation en cellules à action cytotoxique.

VI.3.2. Guérison spontanée

La guérison spontanée peut être observée surtout dans les affections à tropisme cutané, dans de tels cas, le phénomène d'hypersensibilité retardée est précoce, le test cutané ou l'IDR est positif et l'action des anticorps circulants n'est pas mis en évidence. Le test cutané peut être positif au début de l'infection, il est négatif pendant la phase de généralisation. Les anticorps circulants sont mis en évidence pendant la phase d'état (WALTON et VALVERDE, 1974 ; ALLAIN et KAGAN, 1975)

VI.3.3. Protection

La leishmaniose cutanée forme humide (*L. major*) détermine une protection hétérologue (*L. major* et *L. tropica*) alors que la forme sèche (*L. tropica*) est protectrice uniquement contre la réinfection homologue.

En aire endémique, la réinfection est rare, en expérimentation elle est impossible sauf si la seconde inoculation est quantitativement importante. Comme dans le cas de guérison spontanée, la protection semble être due à l'immunité cellulaire médiate (ALDER, 1964).

VII. DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES

Le diagnostic de la leishmaniose, orienté par le tableau clinique et des notions épidémiologiques, conforté par des données biologiques non spécifiques ou des résultats immunologiques ou sérologiques, repose sur des arguments parasitologiques (microscopie et culture) complétés, plus récemment par ceux des techniques de biologie moléculaire.

VII.1. Arguments d'orientation

Bien que polymorphes, les lésions cutanées sont les plus caractéristiques. Leur évolution sur plusieurs mois et leur siège en zone découverte doivent attirer l'attention. Pour la leishmaniose viscérale, le tableau clinique complet est évocateur, mais ce n'est pas toujours le cas, notamment chez l'adulte.

L'origine géographique et la notion de séjour en zone d'endémie sont à prendre en considération, tout comme les notions d'immunodépression, de co-infection avec le HIV ou de toxicomanie.

VII.2. Arguments de présomption

Le bilan biologique n'est profondément perturbé que dans les leishmanioses viscérales. Une pancytopenie plus ou moins associée à une hypergammaglobulinémie sont évocatrices.

- ✱ Anomalies hématologiques, sont principalement dues à une hypersplénisme. L'anémie est très fréquente, modérée en début d'évolution, elle s'aggrave progressivement. La leucopénie est aussi très fréquente, associée à une granulopénie responsable d'infections bactériennes intercurrentes. La thrombopénie quant à elle est plus tardive, mais peut atteindre des chiffres très bas. Elle est généralement associée à un déficit des facteurs de coagulation hépatiques, des manifestations hémorragiques graves et une aggravation de l'anémie.
- ✱ Syndrome inflammatoire est marqué par une forte accélération de la vitesse de sédimentation.
- ✱ Déséquilibre protéinique dominés par une hypergammaglobulinémie, associée à une hypoalbuminémie sont à l'origine de la positivité du test de formol-gélification (CHOWDHURY et al., 1992).
- ✱ Les fonctions hépatiques sont rarement perturbés, Marty et al., 1994 ont noté une hypertriglycéridémie sans hypercholestérolémie.

VII.3. Arguments parasitologiques

VII.3.1. Prélèvements

Leur obtention revêt un caractère fondamental pour parvenir à une certitude diagnostique. Le succès est conditionné par la qualité des prélèvements.

- ❑ ***Prélèvement de peau*** : Bien que des leishmanies ont pu être isolées à partir de lésions cutanées au cours et après l'évolution de la LV, voir même en peau saine au cours de la co infection leishmania – VIH, mais le matériel ainsi prélevé convient plutôt à la confection de frottis et de culture et plusieurs penchons sont nécessaires pour obtenir assez de matériel.
- ❑ ***Prélèvement de moelle osseuse*** : C'est la matériel le plus utilisé pour le diagnostic de la leishmaniose, une partie du matériel destinée à la culture, est préservé de la coagulation sur héparine, le reste sert à la confection de frottis, il existe des difficultés d'obtention d'un matériel de qualité optimale chez certains patients, notamment au cours du SIDA.
- ❑ ***Ponction splénique*** : Elle est considérée comme plus performante mais elle est peu pratiquée en raison des risques qu'elles présentent en cas de troubles de la crase sanguine.

- ❑ ***Prélèvement de sang périphérique*** : Dans le cadre de la co-infection leishmania – VIH, ce type de prélèvement se révèle adapté au diagnostic parasitologique direct et à la culture (IZRI et Coll., 1996) peu invasif et bien accepté, il peut être répété pour le dépistage et pour le suivi post thérapeutique.

- ❑ ***Ponction ganglionnaire*** : Le moyen le plus usité pour mettre en évidence et isoler les parasites au cours de la leishmaniose canine.

- ❑ ***Ponction biopsie hépatique*** : peu utilisé comme la ponction splénique.

VII.3.2. Examen direct

La coloration la plus adaptée à la recherche des leishmanies sur frottis est le May-Grunwald-Giemsa ou ses dérivés. Compte tenu de la petite taille des éléments parasitaires, la culture microscopique est faite à l'objectif x 1000, l'examen doit être minutieux et prolongé car la densité parasitaire peut être très faibles.

La réalisation minutieuse de cet examen microscopique est primordiale pour avoir des arguments diagnostiques positifs rapides, mais sa sensibilité n'est pas absolue et ne permet pas une caractérisation du parasite au niveau spécifique.

VII.3.3. Culture

La culture (CHANG et HENDRICKS, 1985 ; EVANS, 1987) est un complément indispensable permettant de rendre plus sensible le diagnostic parasitologique, d'identifier précisément le parasite (étude des profil isoenzymatique, serotypage par des anticorps mononucléaux...) et de tester la sensibilité de la souche isolée aux médicaments disponibles. Le classique milieu NNN est le plus utilisé avec ses deux phases solide et liquide modifiée par l'ajout de bouillon cœur-cerveau, de milieu RPMI 1640, de milieu drosophile de Schneider, avec ou sans sérum de veau fœtal.

L'incubation se déroule entre 21-27 °C. La vérification des culture est habituellement une fois par semaine. Une culture est déclarée négative après 4-5 semaines. La recherche des promastigotes est facilitée par leur mobilité.

VII.3.4. Inoculation aux animaux de laboratoires

Selon le tropisme cutané ou viscéral des souches, l'inoculation du hamster est faite dans les coussinets plantaires, le museau ou par voie intra péritonéale. Les souches à tropisme cutané à l'exception des souches dermatropes de *L. infantum*, donnent des lésions locales au point d'inoculation mais la viscéralisation est possible. Les souches à tropisme viscéral, donnent une maladie expérimentale généralisée.

La durée d'évolution de la maladie animale est longue, variant de quelques semaines à plusieurs mois. La surveillance des lésions cutanées chez l'animal est clinique, celle de la viscéralisation dépendra de la courbe pondérale hebdomadaire, le plus souvent, un amaigrissement (ANJILI et al., 1996).

VII.4. Arguments immunologiques

VII.4.1. Immunité à médiation cellulaire

Elle est explorée par Intra-Dermo-Réaction (IDR) à la leishmanine ou réaction de monté négro (1926). Weigle et Coll. (1991) ont standardisé cette réaction. L'angigerie injecté sous un volume de 100 ml est une suspension phéniquée de promastigotes (5×10^6 / ml), sa positivité (Sokal, 1975), marquée par la palpation d'une papule d'au moins 5 mm de diamètre à la 48ème heure, et le témoin d'un contact avec le parasite et , peut être, d'un portage asymptomatique (intérêt épidémiologique), elle est positive au cours de la Leishmanix Cutanée Localisé (LCL) et des leishmanioses cutané-muqueuses.

Elle est négative au cours des leishmanioses cutanées diffusées et son apport diagnostiqué est donc plus modeste.

VII.4.2. Immunité humorale

La recherche d'anticorps spécifiques est pleinement justifiée dans les LV et LCD. En fonction des techniques et de la nature des antigènes utilisés, il peut exister des réactions croisées avec les plasmodiums, les tympanosomes, les mycobactéries, les schistosomes, la réactivité sérologique peut varier lors de la coinfection avec le VIH avec la plupart des techniques, la sérologie a un intérêt modeste dans le suivi post thérapeutique, des titres très élevés persistant très longtemps. Gradoni et Coll. (1993), il est d'ailleurs recommandé d'associer plusieurs techniques ainsi que l'utilisation de souches locales, d'isolement récent (WHO, 1995). Bien que n'apportant pas une certitude diagnostique, la sérologie est d'un intérêt certain, ne serait-ce que pour justifier l'indication ou la répétition des explorations parasitologiques qui demeurent la référence.

✱ ***L'Immuno-Fluorescence Indirecte (IFI)*** : est la technique la plus répandue (Quilci et Coll., 1986). L'antigène figuré est habituellement constitué de promastigotes et le conjugué une antiglobuline anti-IgG. La réaction sur amastigotes aurait une sensibilité moindre (Badaro et

Coll, 1983). Les résultats seraient meilleurs avec les antigènes les plus proches de l'espèce sévissant dans la zone de contamination (Gradone et Coll., 1993), la fluorescence intéresse l'ensemble du promastigotes, flagelle compris.

- ✱ ***L'hémagglutination indirecte*** : peut être utilisée en raison de défauts de sensibilité et de spécificité et doit être confirmée par une autre technique.
- ✱ ***L'hémagglutination directe*** : sur promastigotes fixés et prypsinés, aurait un défaut de spécificité. Des titre élevés persistants au décours de la maladie.
- ✱ ***L'électrophorèse*** : est très appréciée par certaines équipes.
- ✱ ***Les techniques immuno-enzymatiques*** : sont très sensibles mais souffrent d'une absence de standardisation, sensibilité et spécificité varient en fonction de l'antigène utilisé : antigène total soluble, antigène dp72, antigène gp63 et différentes variantes de la technique : Dot-Elissa, Fast-Elissa et recherche d'anticorps anti-phosphatase acide du parasite et elle serait mieux adaptée au suivi post-thérapeutique.
- ✱ ***L'immunoempreinte*** : est une technique très sensible mais sa relative lourdeur fait qu'elle n'intervient souvent que comme argument de confirmation. Sa réalisation n'est pas standardisée, notamment différentes concentrations de polyacrylamides, peuvent conduire à la détection d'anticorps différents.
- ✱ ***Recherche d'antigènes solubles*** : Elle a été encore très peu exploitée à des fins diagnostiques, Mary et Coll., (1993), ces antigènes disparaîtraient assez rapidement sous traitement d'où un certain intérêt dans le cadre du suivi.

VII.5. Arguments moléculaires

L'avènement et la généralisation des techniques de biologie moléculaire ont conduit au concept de diagnostic moléculaire. Ces techniques sont basées sur la détection, éventuellement l'amplification et l'analyse, des acides nucléiques du parasite dans divers prélèvements. Le diagnostic moléculaire des leishmanies vient compléter les approches parasitologiques et sérologiques classiques dans le cadre du diagnostic initial de la maladie. Mais ses excellentes performances ont ouvert de nouveaux champs d'investigation au niveau du suivi post-thérapeutique, du typage des isolats et de l'étude des suets porteurs asymptomatiques du parasite.

La mise au point d'un diagnostic basé sur les techniques de biologie moléculaires commence par le choix de l'ADN cible (WEISS, 1995). Les séquences répétées de l'ADN sont les cibles privilégiées. L'ADN kinetoplastique en fait partie : mini-cercles et maxi-cercles. La principale caractéristique de ce matériel, réside dans son hétérogénéité d'un isolat à l'autre selon son origine géographique.

Le diagnostic moléculaire des leishmanies peut être appliqué à tout type d'échantillon biologique selon les formes cliniques : ponctions ou biopsies de moelle osseuse, rate, ganglion ou de peau, parfois du sang, compte tenu du gain de sensibilité apporté par certaines techniques comme la **Polymerase Chaine Reaction (PCR)**.

VIII. POLYMERASE CHAINE REACTION (PCR)

VIII.1. Définition

La PCR est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotides spécifiques. La découverte d'une eubactérie thermophyles vivant dans les sources chaudes (70-75°C) du Yellowstone National Park, *Thermus aquaticus*, et l'utilisation par la suite de sa polymérase, stables jusqu'à des températures proches de 100°C, sont à l'origine du développement de cette technique.

VIII.2. Principe

Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus (MULLIS, 1990) (Figure.11.) :

- ✱ La dénaturation des deux brins d'ADN à températures élevées (environ 94°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares.
- ✱ L'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 50 et 60°C afin de permettre une bonne fixation des amorces).
- ✱ La réaction d'élongation par une ADN polymérase stable (la *Taq polymerase*) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimal de 60-70°C

Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle. Le nombre de copie de fragments d'ADN est doublé.

Cette technique de PCR a littéralement révolutionné les recherches en biologie moléculaire et trouve de nombreuses applications aussi bien dans le clonage et l'étude de l'expression des gènes que dans la recherche d'un polymorphisme génétique.

1- **digestion enzymatique** par endonucléase de restriction

Quantité infime d'ADN d'un échantillon de sang

2- **dénaturation** de l'ADN à 94°C

3- préparation de deux **sondes** nucléotidiques complémentaires des extrémités de la séquence cible

4- ajout des sondes en excès à 50-60°C : **hybridation**

5- synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces (=primers) à 60-70°C : **extension**

6- **dénaturation** des duplex néoformés à 95°C puis retour à 60°C

Reprise de la polymérisation du fait de l'excès d'amorces

Cycle 1

Cycle n

Répétition de cycles de synthèse/dénaturation réalise une augmentation exponentielle de la quantité initiale d'ADN (à chaque cycle, le nombre d'exemplaires de la séquence encodée par les deux amorces double !)

Figure.11. Etapes de la PCR (McPherson, 2000)

VIII.3. Avantages et Inconvénients de la PCR

Dans le domaine du diagnostic, la sensibilité et la spécificité de ces techniques semble supérieure à celle de la recherche du parasite par culture. Le PCR permet, en outre, de réaliser un typage moléculaire des souches sans passer par la culture.

L'avantage majeur (HARRIS, 1998) de ces techniques de biologie moléculaire est donc leur sensibilité, spécificité, rapidité, l'utilisation de matériel génétique spécifique, l'automatisation de la plupart des étapes rendant possible le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillon

Cependant des inconvénients sont à signaler, c'est d'abord le risque de contamination entre prélèvements mais surtout par de l'ADN précédemment amplifié. Un autre inconvénient est lié à la sensibilité extrême de ces techniques permettent la détection d'un portage asymptomatique des leishmanies.

VIII.4. PCR et la leishmaniose

VIII.4.1. PCR dans le programme de dépistage

Parmi les nombreuses régions d'ADN de *Leishmania* identifiées et susceptibles d'être amplifiées, certains ont été étudiées dans l'intérêt d'établir des protocoles de diagnostic en médecine humaine et vétérinaire. De nombreuses études ont comparé la technique PCR à d'autres tests pour diagnostiquer la leishmaniose humaine et canine. Les résultats dépendent de nombreux facteurs ; le type de prélèvement, le protocole d'extraction et d'amplification de l'ADN, le moment du prélèvement, malgré des différents facteurs de variation, il est possible d'évaluer et de préciser l'intérêt de la PCR dans ce type de diagnostic.

En médecine humaine, la PCR a d'abord été comparée aux méthodes conventionnelles directes de détection parasitaire. Une étude en 1993 a ainsi conclu à la nette supériorité de la méthode de détection de l'ADN en matière de sensibilité pour poser un diagnostic de certitude. Une autre étude en médecine humaine réalisée un an plus tard à Marseille sur des patients cliniquement suspects, a également mis en évidence la plus grande sensibilité de la PCR par rapport à la détection directe sur frottis de moelle osseuse. La spécificité était en outre également élevée. Les auteurs concluent ainsi à l'intérêt de la PCR comme aide au diagnostic de la leishmaniose viscérale, en particulier chez certains patients immunodéprimés où la sérologie n'est pas suffisante.

OSMAN confirme l'intérêt de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose en 1997, en soulignant la meilleure sensibilité du test à partir des ponctions ganglionnaires ou médullaire.

En 1995, deux études indépendantes (MATHIS et al ; ASHFORD et al) réalisées sur des chiens leishmaniens ont développé d'autres protocoles avec succès, puisqu'ils ont réussi à détecter l'ADN de *Leishmania* avec une sensibilité et une spécificité de 100%. Ces valeurs ne sont retrouvées qu'à partir de ponctions ganglionnaires et médullaires. En outre ASHFORD montre dans son étude de dépistage de la leishmaniose viscérale canine au Brésil, que la sérologie a une plus faible sensibilité (63 %) lorsqu'elle est comparée à la PCR comme méthode de référence au lieu de la culture ou du test d'inoculation au hamster.

La PCR est donc une méthode extrêmement sensible et spécifique pour diagnostiquer la leishmaniose canine. Sa sensibilité est nettement supérieure à celle de la sérologie en phase chronique ou sur des patients asymptomatiques.

La grande sensibilité de la PCR dépend en grande partie de la méthode d'extraction de l'ADN à partir des prélèvements et des amorces d'amplification choisies en fonction de la région à amplifier.

Malgré ses nombreux avantages, la PCR ne doit pas être utilisée en première intention. En effet, l'intérêt des tests sériques a été confirmé depuis longtemps, alors que les tests de détection d'ADN ne sont appliqués au diagnostic de la leishmaniose que depuis peu. Un certain recul s'impose donc comme pour tout nouveau test de diagnostic. Cependant, cette méthode indépendante du statut immunitaire s'impose réellement pour établir un diagnostic expérimental fiable dans certains cas particuliers où le taux d'anticorps est très faible voire nul : chiens asymptomatiques, forme bénigne, forme chronique. Cette détection peut donc contribuer à prévenir rapidement le développement et la contamination d'une infection à *Leishmania*.

VIII.4.2. PCR pour un suivi de traitement

Les divers traitements de la leishmaniose canine sont généralement long et coûteux, entraînant des problèmes de résistance pour certains chiens traités, ce qui fait que les signes cliniques disparaissent souvent quelque semaines après la fin du traitement. De plus les titres sériques demeurent élevés pendant des mois même en absence de signes cliniques. Dans ces circonstances, un résultat PCR positif indique que l'animal héberge encore le parasite et donc il est conseillé de continuer le traitement.

La PCR peut donc être utile dans le suivi de chiens traités. Elle permet de savoir si l'animal est encore infecté ou s'il a réussi à éliminer les germes. La PCR est donc une méthode de choix pour mettre en évidence les infections persistantes malgré le traitement.

VIII.4.3. PCR comme outil épidémiologique de la leishmaniose canine

Le développement des connaissances épidémiologique est fondamental pour la mise au point de meilleures stratégies thérapeutiques et prophylactiques. L'obtention de données épidémiologique plus nombreuses et précises revêt une importance particulière lorsque l'on sait que le chien représente un risque potentiel pour la santé humaine en région enzootique.

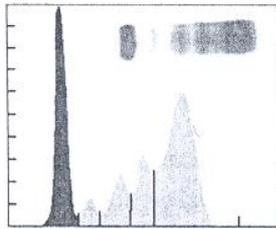
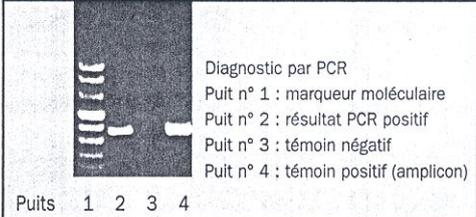
Les tests sériques ayant tendance à sous-estimer la prévalence de la leishmaniose canine, la PCR est donc conseillé pour déterminer la prévalence dans les régions d'enzootie, en particulier dans celles où la maladie n'a pas encore été contrôlée. La PCR est donc un outil intéressant pour étudier les caractéristiques de la transmission de la maladie.

VIII.4.4. Limite de la PCR

Malgré les performances de cette technique, elle ne permet pas la mise en évidence des parasites dans leur ensemble. Cette méthode ne fait pas non plus la différence entre un germe vivant ou mort. Il est nécessaire d'employer des protocoles d'extraction et d'amplification d'ADN, ainsi les rares parasites parfois présents dans les prélèvements peuvent être perdus lors de purification. Les problèmes d'inhibition d'amplification d'ADN par certaines substances peuvent aussi provoquer la perte d' l'ADN. Et enfin les faux positifs dus aux contaminations présentes la principale limite à l'utilisation de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose.

Tableau 7. Examens complémentaires réalisables face à une suspicion de leishmaniose

(Franck GUETTA, ALFORT 1995)

<i>Examens indirects</i>	<i>Spécimens</i>	<i>Critères diagnostiques</i>
Biochimie classique	▪ Sérum ou plasma	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Urémie et créatinémie augmentées ; ▪ Activité des enzymes hépatiques augmentée ; ▪ Hyperprotéïnémie.
	▪ Urine	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Protéïnurie ; ▪ Hématurie.
Electrophorèse	▪ Sérum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hypergammaglobulinémie : gammopathie polyclonale (rarement monoclonale avec parfois une augmentation des β_2 et bloc β_γ) ▪ Hypo-albuminémie. 
Numération et formule sanguines	▪ Sang EDTA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anémie hypo à arégénérative ; ▪ Thrombocytopénie ; ▪ Leucopénie ou leucocytose avec déviation à gauche de la courbe d'Arneth ; ▪ Lymphopénie ; ▪ Monocytose.
Sérologie	▪ Sérum ou plasma	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Titre en anticorps supérieur à 1/80^e par immunofluorescence ou supérieur à 50 par ELISA (selon le laboratoire)
<i>Examens indirects</i>	<i>Spécimens</i>	<i>Diagnostic de certitude</i>
Examen microscopique après coloration	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ponction ganglionnaire ▪ Ponction de moelle osseuse ▪ Calques cutanés, sérosités dermiques 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Visualisation des leishamnies (formes amastigotes) ;
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biopsie ou pièces d'exérèse, intéressant les organes du SPM et la peau 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lésions caractéristiques et visualisation des leishmanies (formes amastigotes)
PCR (Polymérase Chain Reaction) sur mini-tube EDTA ou frottis sur lame	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ponction ganglionnaire ▪ Ponction de moelle osseuse ▪ Calques cutanés, sérosités dermiques ▪ Frottis conjonctivaux (cytobrosse) ▪ Biopsies ou pièces d'exérèse cutanées et du SPM 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Visualisation et fragments d'ADN ou d'ARN spécifiques de <i>Leishmania sp.</i> Amplifiés après migration électrophorétique  <p>Diagnostic par PCR Puit n° 1 : marqueur moléculaire Puit n° 2 : résultat PCR positif Puit n° 3 : témoin négatif Puit n° 4 : témoin positif (amplicon)</p>

Les examens complémentaires sont indispensables pour poser le diagnostic avec certitude (cf. tableau 7). Si l'ensemble des résultats de l'hémogramme ne permet généralement que d'orienter vers un phénomène infectieux, l'électrophorèse des protéines est l'examen biochimique de choix. Malgré son manque de précision, il conforte la suspicion clinique en présence d'une hyperprotéïnémie, d'un rapport albumine / globuline diminué et d'une hypergammaglobulinémie polyclonale.

Les tests sérologiques sont les premiers tests spécifiques à réaliser pour confirmer l'infection. L'interprétation du titre sérique doit être établie avec prudence en tenant compte de la technique utilisée (immunofluorescence ou Elisa) de la date présumée d'infection et des valeurs usuelles du laboratoire. Les premiers anticorps immunoglobulines G (IgG) apparaissent à partir de la troisième semaine post-infection. Ils commencent à diminuer généralement entre quarante cinq et quatre vingt jours après le traitement.

L'interprétation doit aussi tenir compte de certains inconvénients liés aux tests sériques. La sensibilité maximale en immunofluorescence serait de 80% selon certains auteurs (C. Dye et Coll, Serological diagnostic of leishmaniasis on detecting infection as well as disease. *Epid. Infect.*, 1993, 103, 647-656). Elle n'apparaît, en outre, qu'après une longue période d'incubation et diminue rapidement en deux à trois mois. Ce manque de sensibilité est particulièrement observé chez les chiens infectés asymptomatiques.

Une étude réalisée à partir de chiens infectés naturellement et expérimentalement a montré que tous les chiens asymptomatiques (huit au total) étaient caractérisés par une bonne réponse immunitaire cellulaire, et qu'un seul d'entre eux présentait des anticorps détectables (E. Pinelle et coll., 1994)

D'autres études ont également mis en évidence le manque de spécificité de certains tests sériques, inconvénient majeur pour les études épidémiologiques de dépistage et de contrôle des chiens infectés en zone enzootique (D – A Ashford et coll., 1995).

L'objectif des examens directs est de mettre en évidence directement le parasite au microscope après étalement sur lame du spécimen seul, ces examens confirment avec certitude une leishmaniose, car ils sont tous bien réalisés. En revanche, leur sensibilité est très variable et dépend directement de la nature du spécimen examiné. La recherche à partir de sang est ainsi abandonnée, car elle est trop rarement fructueuse, la parasitémie étant trop faible voire nulle et trop courte.

On préfère donc une recherche sur ponction ou biopsie d'organes du SPM (Système des Phagocytes Mononucléés), tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate, ou à partir de matériels provenant de lésions cutanées telles que des biopsies, des calques ou des sérosités dermiques.

La sensibilité maximale est obtenue avec les spécimens de la moelle osseuse, puis des ganglions lymphatiques, il existe d'autres examens directs plus sensibles, utilisés en médecine humaine, comme la mise en culture ou les tests d'inoculation au hamster doré, mais leur lourdeur de réalisation et leur pris interdisent leur utilisation pratique en médecine vétérinaire.

On réalisera, donc, les tests sérologiques en première intention, car ils ne nécessitent qu'un prélèvement sanguin et confirment l'infection dans la majorité des cas. Les examens directs seront effectués seulement si les résultats sérologiques sont difficilement interprétables (valeurs limites des titres sériques) ou ne confirment pas la suspicion clinique (possibilité de faux négatifs). Ils peuvent également être réalisés, d'emblée, à l'occasion de l'exécution d'un myélogramme ou d'un adéno gramme dans un contexte respectivement d'anémie ou d'hypertrophie ganglionnaire d'origine inexplicée.

Pour les diagnostics des parasitoses animales, la PCR est de loin, la plus utilisée ces dernières années, car, elle permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique cible (ADN ou ARN) afin de la visualiser ensuite par d'autres techniques : migration électrophorétique.

Après coloration au bromure d'éthidium (cf. tableau 7), hybridation avec des sondes marquées ainsi que d'autres méthodes calorimétriques et lumineuse. C'est un outil extrêmement performant, puisqu'il permet l'amplification de millions de copies d'un fragment d'acide nucléique à partir d'une très faible quantité de spécimens biologiques.

Son principe est de détecter la présence du parasite dans le spécimen prélevé via une partie infime de son matériel génétique, donc cette recherche doit tenir compte des connaissances actualisées des caractéristiques du Génome de leishmania.

De nombreux protocoles de PCR ont été comparés et publiés afin de définir les plus sensibles et les plus spécifiques. Les premières études, spécifiquement vétérinaires, réalisées en 1995, ont montré une sensibilité et une spécificité, diagnostiques de 100% (D-A Ashford et coll., 1995). Ces bons résultats doivent être nuancés, car ils ne sont observés qu'à partir de matériels

ganglionnaire et médullaires. La recherche sur sang est en effet beaucoup moins sensible. Ces données ont été confirmées en 1999 avec une étude réalisée en Sicile sur 124 chiens (S. Reale et Coll., 1999), comportant les résultats obtenus par PCR avec des matériels sanguins et ganglionnaires. Les auteurs ont montré une sensibilité, une spécificité, des valeurs prédictives positive et négative de 100% sur ponction ganglionnaire et de respectivement 85, 80, 95 et 57% à partir du sang. L'étude a également confirmé le nombre important de faux négatifs (40%) obtenus par sérologie.

On retiendra donc l'intérêt des techniques PCR pour la détection de *leishmania infantum* sans oublier l'importance de la nature du spécimen analysé et du protocole adapté.

La PCR est surtout indiquée, lorsque les résultats sérologiques ne sont pas satisfaisants ou lorsque l'examen direct est négatif (ou douteux), en présence d'un contexte clinique évocateur. Cette méthode étant indépendante du statut immunitaire, est particulièrement utile dans les cas particuliers de chiens infectés à réponse humorale faible : asymptomatique,, formes bénignes ou chroniques.

L'interprétation du résultat soit tenir compte de la nature du spécimen analysé, des autres résultats d'examens et évidemment de la clinique et de l'anamnèse.

Tableau 8. Avantages et limites des techniques PCR
(Franck GUETTA, ALFORT 1995)

<i>Avantages</i>	<i>Limites</i>
Sensibilité et spécificité excellente	Faux positifs, liés aux problèmes de contamination lors du prélèvement ou de l'analyse au laboratoire.
Aucun milieu de transport nécessaire	Choix judicieux du prélèvement en fonction de la pathogénie, des symptômes et de l'évolution de la maladie.
Réalisable en routine	Faux négatifs, liés à la présence dans le spécimen d'inhibiteurs d'amplification ou d'une quantité d'acides nucléiques cibles, trop faible.
Diagnostic précoce	Plus onéreux que la sérologie.
Ne nécessite qu'une très faible quantité d'acide nucléique cible dans les spécimens	Laboratoire spécialisé.
Réalisable même sur des parasites morts	Personnel technique qualifié et expérimenté.
Indépendante de la réponse immunitaire	
Résultats rapides (48 heures en moyenne)	
Suivi thérapeutique	

La PCR, comme toute technique d'analyse, comporte également des limites. Son extrême sensibilité considérée comme son avantage majeur est également son talon d'Achille.

En effet, nombreux sont les risques de contamination entre le prélèvement et la dernière étape analytique. Les différents instruments, l'air où les solutions peuvent contenir d'infimes quantités de fragments d'ADN amplifiés, pouvant servir de cibles d'amplification. De plus, des contaminations croisées horizontales peuvent s'effectuer d'un spécimen à un autre.

Toutes ces contaminations entraînent des faux positifs. Les laboratoires spécialisés adoptent ainsi de nombreuses précautions associées à des solutions techniques et des contrôles de qualité.

La PCR peut aussi être utile dans le choix et le suivi thérapeutique en détectant et en suivant l'élimination des leishmanies par ces techniques, des auteurs ont réalisé de nombreuses avancées en matière d'évolution d'efficacité des différents traitements anti leishmanies (A. Moritz et coll., 1998). Deux études allemandes (A. Moritz et coll., S. Stember et coll., 1998) ont utilisé cette méthode et ont effectué l'élimination thérapeutique des parasites sur la moelle osseuse de chiens leishmaniens. Elles ont ainsi confirmé l'intérêt d'un traitement permanent à l'allopurinol au Glucantime[®]. La détection par PCR peut alors préciser la durée de traitement.

On sait en effet, que la Glucantime[®] est contenue et qu'il entraîne des effets secondaires parfois importants. Une évaluation précise par les méthodes classiques est difficile, voire impossible. Les symptômes peuvent disparaître quelques semaines après le début de la thérapie. Les titres sériques peuvent rester élevés plusieurs mois en l'absence de signes cliniques et les examens directs conventionnels ne sont alors pas assez sensibles, le principe d'un suivi plus sensible et plus précis par PCR serait donc de traiter l'animal jusqu'à obtenir un résultat négatif. Il est important de savoir, toute fois, qu'en raison de l'existence d'une lénik de détection, aussi faible soit elle, un tel résultat ne permet jamais de conclure à l'absence totale de parasites dans les spécimens analysés, et a fortiori, dans l'organisme d'origine. En pratique, Ferrer propose néanmoins l'arrêt du traitement après disparition des symptômes, normalisation des examens de routine et deux résultats PCR négatifs espacés de six mois sur un spécimen de moelle osseuse. La mise au point de futurs protocoles avec des limites de détection encore plus basse permettant certainement à l'avenir de préciser encore l'arrêt du traitement et on pourra utiliser les techniques PCR comme outils pronostiques, comme c'est déjà le cas pour la leishmaniose cutanée humaine.

IX. CONCLUSION

Si la recherche avance aussi vite sur la leishmaniose canine, c'est en grande partie à cause de son lien incontournable avec la leishmaniose humaine. On peut s'attendre encore à de nouvelles avancées dans les connaissances sur cette maladie d'actualité, car elle mobilise de nombreuses équipes de recherche à travers le monde.

La PCR est une technique et une méthode indispensables pour ce genre d'études diagnostiques mais aussi thérapeutiques et épidémiologiques.

Comme le souligne BLACKWELL, l'avenir des études épidémiologiques sur la leishmaniose sera fondée sur les études génomiques.

REFERENCES

- Adini I., Jacobson M., Kasap Y., Jaffe L, 1998. Leishmanial Kinetoplast DNA. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92 :35-37.
- Alder S et Theodor O., 1932. Investigation on Mediterranean kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. Proc R Soc. London. 110: 402-41.
- Alder S., 1964. *Leishmania* in „Advences in Parasitology”. 2. Acad Press. New York. Pp. 35-96.
- Allain D S., Kagan I S, 1975. A direct agglutination test for leishmaniasis. Am Trop Med Hyg. 24: 232-37
- Andre R., Brumpt I., Dreyfus B., Passeleq A., Jacob S, 1957. Leishmaniose cutanée, leishmaniose cutanéoganglionnaire et kala-azar transfusionnel. Bull Mem Sos Med Hôp Paris, 73 : 854-60.
- Anjili C O., Mbatia P A., Nwangi R W., Githure J I., Koech D k. 1996. A simple method for maintaining, detecting and recovering virulent *Leishmania donovani* in hamsters. Acta Tropica. 60: 263-67.
- Antoine JC., Lang T., Prina E., Courret N., Hellio R., 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. Amazonensis* and *L. Mexicana*. J Cell Sci., 112: 2559-70
- Ashford D A. et coll., Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, Am J. Trop. Med. Hyg. 1995, 53, 251-255
- BELKAID M., HARRAT Z., HAMRIOUI B., THELLIER M., DATRY A & DANIS M. – A propos d'un milieu simple pour l'isolement et la culture des leishmanies, Bull Soc PatholExot, 1996, 89: 276 – 277.
- Bettini S & Gradoni L., 1986. Canine leishmaniasis in the mediterranean area and its application for human leishmaniasis. Infect Sci Applic. 7: 241-45.
- Blackwell J M.:– Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. Parasitology .104. Suppl: S19
- Bryceson A D M., Preston B M., Bray R S., Dumonde D C. 1972. Experimental cutaneous leishmaniasis: effect of immunosuppression and antigenic competition. Clin Exp Immunol. 23: 87-102.
- Chang K P et Hendricks L D, 1985. Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In leishmaniasis. Elsevier Amsterdam. 211-243.
- Chowdhury M A., Rafiqueuddin A K M., Hussein A.1992. Aldehyde test (formol-gel test) in the diagnosis of kala-azar. Trop Doct. 22 : 185-86.

- Collier L., Balows A., Sussman M., 1998. Leishmaniasis in the Old World, In: France, E. G., Julius, P., Derek, W. (Eds), Microbiology and microbial infections, 9th Edition. Oxford University Press, Inc, New York, pp. 215-240.
- Dedet JP., Addadi K & Pascal R., Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : 2- : fluctuation saisonnière de la leishmaniose canine à Alger. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1973, 51 : 195-201.
- Dedet JP., 1999. Les leishmanioses. Edition Ellipses, 253 pp.
- Dedet JP., 2001. *Leishmania*, leishmanioses: Biologie, clinique et thérapeutique. Encycl Med Chir. Maladies Infectieuses. 8-506-A-10. 11 pp
- Dereure J., 1993. Place du chien dans les complexes pathogènes leishmaniens des pays du pourtour méditerranéen et du Moyen-Orient (Algérie, Egypte, France, Maroc, Syrie et Yémen). Thèse. Université Montpellier I, Faculté de Médecine. 180p.
- Desjeux P., Aspect de santé publique et lutte. In : Dedet JP, ed. Les leishmanioses. Paris: AUPELF-UREFF-Ellipses, 219-38.
- Dey C. et coll., Serological diagnosis of leishmaniasis : on detecting infection as well as disease, *Epid. Infect.*, 1993, 103, 647 – 656.
- Durate M I S., Corbett C E P., Lorenti M D., Nunes V L B., Rego Jr F A., Oshiro E T. 1986. canine intestinal pneumonitis in a new endemic area in visceral leishmaniasis in western Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80 : 992-93.
- Evans DA, 1987. *Leishmia: in vitro* methods for parasite cultivation. Acad Press. London. 52-75.
- Garnham PCC., 1965. The *Leishmania*, with special references of the rote of animal reservoir. *Am Zool.*, 5: 141-51.
- Giraud P., Ranque J., Chabassu H. 1950. Epidemiologie de la leishmaniose viscérale humaine méditerranéenne, en particulier dans ces rapports avec la leishmaniose canine. *Rev Pat:h Comp Hyg Gén.*, 617: 282-300.
- Golvan YJ., Rioux JA., Chabaud AG., 1963. Infestation spontanée de phlébotomes par le spirudie *Mastophorus muris* (Gmelin). *Ann Paras Him Comp.* 38: 914.
- Harrat Z., Benkherrouf K., Taharboucht Z., Bendali-Braham S., Yah T. et Hamrioui B., La leishmaniose canine urbaine, *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1995, 60 : 157-165.
- Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M. et al. *Leishmania infantum* and *leishmania major* in Algeria *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 90: 625-629.
- Harris E, 1998. A low colt approach to PCR. Appropriate transfer of bimolecular techniques. Oxford University Press. New York. Oxford.
- Hoare CA & Wallace FG., 1966. developmental stages of trypanosomatid falgellates: new terrminology. *Nature. London*, 212: 1385-86.

- Killick-Kendrick R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmanases. A Review. *Med. Vet. Entomol.* 4: 1-24.
- Lane R. P., 1993. Sandflies (Phlebotominae). In: *Medical Insects and Arachnids* (eds R. P. Lane and R. W. Crosskey). Chapman and Hall, London. Pp. 78-119.
- Léger N., Depaquit J, 1999. Les Phlébotomes. *Les Leishmanioses. Me Tropicale.* Pp.89-108
- Lemaire G. Sergent E & Lheritier A., Recherche sur la leishmaniose du chien d'Alger. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1913, 6: 579-581.
- Loufrani G. Les caractères épidémiologiques du Kala-Azar dans le monde. Contribution à l'étude de la leishmaniose du chien à Alger. Thèse de Doctorat Pharmacie, Alger, 1949, 94 pp.
- Low G C et Coock W E. 1926. A congenital case of Kala-Azar. *Lancet*, 211: 1209-11.
- Lumsden W H R., 1974. Leishmaniasis and Trypanosomiasis : the causative organism compared and contrasted, in *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*, CIBA Symposium n°20. Medica North Holland Publ. Amsterdam. 3-25 pp.
- Maazoun R., 1982. Identification des leishmanies dans l'ancien monde: Signification de la variation isozymique. Thèse de Doctorat d'Etat.
- Marty P., Leger I., Albertini M., Gari-Toussaint M., Tommasi C., Le Fichoux Y. 1994. Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis area : experience in a highly endemic focus in Alpes Maritime (France). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88 : 658-59.
- Mathis A., Deplazes P., Kohler P., Eckert J., 1996. PCR for detection and characterization of parasites. *Schweiz Arch Teirheilkd.* 138: 133-38.
- Mathise A, Deplazes P. : PCR and in vitro cultivation for detection of leishmania spp. In diagnostic samples from human and dogs. *J Clin microbial* . 33:1145-1149.1995
- McConnel E E., Chaffee E F., Cashell I G., Garner F M., 1970. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in dog. *J Am Vet Med Ass.* 156: 197-203.
- McPherson M J., Moller S G, 2000. PCR. Springer. 276.
- Moritz A. et coll., Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis , *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 1998, 23 : 279-283.
- Mullis K B, 1990. the unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am*, 262: 56-61, 64-5.
- Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J. Bernadina W., Del Real J., Ruitenbergh J, 1994. Cellular and humoral human response in dogs naturally and naturally infected with *L. Infantum*. *Infect Immunol.*, 62: 229-35.
- Poul J. Sur la fréquence de la leishmaniose canine à Alger et sur la valeur diagnostique de la formol-gélification. *Arch. Int. Pasteur Algérie*, 1950, 28 : 449-456.

- Read LK., Fish WR., Muthiana AM., Stuart K., 1993. Maxicercle DNA and edited mRNA sequenced of closely related trypanosoma species: implications of kDNA editing for evaluation of maxicercle genomes. *Nucleic Acids Res.* 21: 4073-78.
- Reale et coll., Detection of leishmania infantum in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood, *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37 : 2931-2935.
- Rioux JA., Lanotte G., 1993. Apport de la cladistique à l'analyse du genre *Leishmania* Ross 1903 (kinetoplastida-Trypanozomatidea). *Corollaire éco-épidémiologiques*. *Biosystema.* 8:79-90.
- Rioux JA., Lanotte G., Dedet JP., Martini-Dumas A. 1972. Ecologie des leishmaniose dans le Sud de la France: Réceptivité des rongeurs à *Leishmania donovani*. *Ann Paras Hum Comp.* 47 : 147-57.
- Rioux JA., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P. et Perrieres. Taxonomy of leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol Hum. Comp.*; 1990, 65: 111-125.
- Rodgers MR., Popper SJ., Wirth DF., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 71: 267-75.
- Senevet G., Sur la fréquence de la leishmaniose canine à Alger et ses variations saisonnières. *Bull. Soc. Pathol Exot.*, 1912, 5: 89-91.
- Sergent ED. & Sergen ET. Kala-Azar, existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1910, 3 : 510-511.
- Simpson L., 1987. Le mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization. *Ann Rev Microbiol.* 41: 363-82.
- Symmers W St C., 1960. Leishmaniasis acquired by contagion; a case of marital infection in Britain. *Lancet*, 1: 127-30.
- Vidor E., Dereure J., Pratlong F., Dubreuil N., Bissuel., Moreaux Y., Rioux JA, 1991. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Etude d'une cohorte d'une région cévenole. *Prat Med Chir Anim Comp.* 26: 133-37.
- Walton b.c., Valverde L. 1974. Racial differences in the evolution of *Leishmania*. *Proc Third Int Cong Parasit.* 245.
- Weigle K A., Valderamma L., Arias A L., Santrich C., Saravia N G. 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction sensitization. *Am J Trop Med Hyg.* 44: 260-71
- Weiss J.B., 1995. DNA probe for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*, 8: 113-30.
- WHO., 2000. *Leishmania* and HIV co-infection. *Leprosy Rev.* 71 (1): 104-5.
- Wonde D.E & Lamy L. 1967. Différences de comportement de *Leishmania donovani* dans les macrophages de souris. *Acad Sci Paris.* 265 : 810-13.

RESUME

La leishmaniose est une anthrope-zoonose endemo-epidémique, potentiellement grave, rarement contagieuse, due à un protozoaire flagellé de l'espèce *Leishmania*. La répartition géographique de la maladie dépend généralement de la présence d'insectes vecteurs et d'animaux réservoirs. Le diagnostic clinique est souvent difficile car la maladie est très polymorphe. Cependant, la variété de la symptomatologie, la gravité de la maladie et la lourdeur du traitement, nécessitent des examens complémentaires adéquats pour la confirmation du diagnostic, ce qui souligne l'importance d'utiliser en routine des méthodes fiables, précises et surtout rapide, telle que la PCR.

Le but de cette étude est de mettre en évidence la technique PCR dans l'établissement d'un diagnostic fiable de la leishmaniose.

SUMMARY

The leishmaniasis is an anthropozoonosis, endemo-epidemic, potentially serious, rarely contagious, caused by Flagellate protozoa of the leishmania specie. The geographical distribution of the disease depend generally of the presence of vectors insects and reservoirs animals. The clinical diagnostic is often difficult because the disease is very polymorph, however, the large variety of symptomatology, the gravity of the disease and the heaviness treatment required a complementary and appropriate examination for the confirmation of the diagnostic, it's what underline the importance to use usually a reliable accurate method and particularly swift, such as **PCR**.

The objective of this study is to demonstrate the **PCR** method in the establishment of a reliable diagnostic of the leishmaniasis.

ملخص

الليشمانايوز هو أنتروبوزونوز، وباء استيطاني، متفاوت الخطورة و هذا الأخير نادرا ما يكون معدي، ناتج عن بروتيازات السوط من نوع ليشمانيا. التوزيع الجغرافي للمرض مرتبط بتواجد الحشرات الناقلة و الحيوانات الحاملة للعدوى.

التشخيص المخبري للمرض يكون في غالب الأحيان صعبا، لنتوع أشكال هذا الأخير و كثرته. في حين أن التنوع العرضي، خطورة المرض و كذا تكاليف العلاج تتطلب فحوصات إضافية دقيقة و ناجعة مثل طريقة "PCR" و الهدف من هذه الدراسة هو إظهار فعالية هذه الأخيرة.