

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTRE 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 DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

THEME

***APPORT ET LIMITE DE LA
TECHNIQUE PCR DANS LE
DIAGNOSTIC DE LA
LEISHMANIOSE CANINE***

**Présenté par : DADDI ADDOUN El Mehdi
RAHMANI Elias Mourad
Soutenu le : 27/06/06**

Le jury

**Président : Dr. BENMAHDI. M, Maître de conférence à l'ENV.
Promoteur : Dr. AIT OUDHIA. Kh, Maître Assistante à l'ENV.
Examineur 1: Dr. ADEL, Chargé de cours à l'ENV.
Examineur 2: Dr. CHORFI, Maître Assistante à l'ENV.**

Année Universitaire 2005 - 2006

Remerciements

- ❖ On remercie notre bon Dieu.
- ❖ On remercie nos chers parents, grands parents, frères et sœurs.
 - ❖ On remercie 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 :
 - ❖ Dr *TOUDJINE Malik* qui nous a ouvert les portes de son cabinet.
 - ❖ Dr *BENDEDOUCHE*, Dr *GOUCEM* et Dr *HAMDI*
 - ❖ Dr *BENMEHDI*, Dr *ADEL* et Dr *CHERFI* pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.
- ❖ On remercie la famille *TALLOUT* de nous avoir ouvert les portes de leur Institut « *IEF* » particulièrement *Naouel*.
- ❖ On remercie également tout le personnel de
L'École Nationale Vétérinaire.

Dédicaces

Ce travail de longue haleine est dédié à tous ceux qui ont contribué à son élaboration par leur encouragements particulièrement à :

✚ Mes très chers parents et grands parents, mes tantes et mes oncles.

✚ A ma sœur : Fatma Zohra

✚ A mes frères : Mohamed et Hamza.

✚ A mon binôme Liassou nouveau frère et Kawther.

✚ A ma chère promotrice AIT OUDHIA Khatima et Dr TOUDJINE Malik.

✚ A tous mes amis : Naouel, Hadjoubi, Luiza, Samah, Achraf, Samah, Nouz et Sana, Rym, Assia, Cami, Smail, Salim et Ismahane, Ziouane, Bouriche, Farid, Dina, Faiza.

✚ A ma très chère Hadjer.

✚ A tous le personnel de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

M. DADDI ADDOUN

Dédicaces

Ce travail de longue haleine est dédié à tous ceux qui ont contribué à son élaboration par leur encouragements particulièrement à :

- ✚ Mes très chères parents : Bouamra et Dalila
- ✚ Mon unique frère : Riadh
- ✚ A toutes la famille RAHMANI et MOKRANI.
- ✚ A ma chère promotrice AIT OUDHIA Khatima
- ✚ A Dr TOUDJINE Malik, Dr BENDEDDOUCHE, Dr GOUCEM, Dr HAMDI.
- ✚ A mon cher binôme Mehdi.
- ✚ A mes amis : Bedro, Mohamed, Smail, Elhadi, Kamel, Abdelferadj, et l'équipe du Domino.
- ✚ A mes amies : Naouel, Camy, Amel, Assia, Nadia, Haeva, Zaza, Rym, Faiza, Ismahane, Nouzha, Sana, Soumeya, Asma, Dina.
- ✚ A ma très chère Kawther.

E.RAHMANI

Résumé

La leishmaniose canine est une parasitose systémique grave dont l'issue est souvent fatal.

Le chien en est le principal facteur de propagation faisant de cette maladie un vrai problème de santé publique.

Grâce à de nouvelles données biologiques en particulier la PCR, les techniques diagnostiques et le suivi de cette parasitose, sont désormais facilement réalisables en routine par le vétérinaire.

TABLE DES MATIERES

Introduction

Chapitre I LEISHMANIOSE CANINE

I.	Pathogénie.....	2
II.	Symptômes.....	3
II.1.	Formes Aigues.....	3
II.2.	Formes Chroniques.....	3
II.2.1.	Incubation.....	3
II.2.2.	Symptômes généraux.....	4
II.2.3.	Symptômes Locaux.....	4
III.	Lésions.....	5
III.1.	Macroscopiques.....	5
III.2.	Microscopiques.....	6
IV.	Etude de l'agent étiologique.....	6
IV.1.	Historique.....	6
IV.2.	Cycle de vie et morphologie.....	8
V.	Réservoir.....	10
VI.	Vecteur.....	11
VII.	Transmission.....	13

Chapitre II METHODES DE DIAGNOSTIC

I.	Arguments d'orientation.....	14
----	------------------------------	----

I.1.	Origine géographique.....	14
I.2.	Arguments cliniques.....	16
II.	Arguments de suspicions.....	17
II.1.	Modifications hématologiques.....	17
II.2.	Modifications biochimiques.....	17
III.	Arguments immunologiques.....	17
III.1.	Immunofluorescence indirecte.....	18
III.2.	Elisa.....	18
III.3.	Test d'agglutination direct.....	19
III.4.	Test d'agglutination indirect.....	19
III.5.	Hémagglutination	19
III.6.	Fixation du complément.....	19
III.7.	Western Blot.....	20
IV.	Argument parasitologiques.....	20

Chapitre III

PCR

I.	ADN leishmanien.....	20
II.	Description de la technique PCR.....	22
II.1.	Historique	22
II.2.	Principe de la PCR.....	23
II.3.	Les composants de la réactions PCR.....	24
II.4.	Technique PCR.....	25
II.5.	Avantage et inconvénients	27
III.	Optimisation de la PCR.....	30
IV.	Limites et principaux problèmes rencontrés.....	31

IV.1.	Les limites de la PCR.....	31
IV.2.	Principaux problèmes rencontrés.....	31
V.	PCR dans le programme de dépistage et de suivi thérapeutique.....	35
	Observation.....	39
	Conclusion.....	41

Liste des figures

Figure 01	Forme Promastigote.....	9
Figure 02	Forme amastigote.....	9
Figure 03	Phlébotome Adulte.....	12
Figure 04	Répartition géographique des leishmanioses.....	14
Figure 05	Chien leishmanien.....	15
Figure 06	Aspect générale de la molécule ADN.....	20
Figure 07	Organisation du kinetoplaste.....	21
Figure 08	Organisation du minicercle.....	22
Figure 09	Technique d'amplification de l'ADN.....	26
Figure 10	Amplification de l'ADN leishmanien.....	27
Figure 11	Amplification de l'ADN kinétoplastique de <i>Leishmania</i> , extrait de sang de chiens asymptomatique.....	40

Liste des tableaux

Tableau 01	Tableau clinique de la leishmaniose générale du chien.....	16
Tableau 02	Examens complémentaires réalisable face à une suspicion de leishmaniose canine.....	22
Tableau 03	Avantages et inconvénients de la technique PCR.....	29

Introduction :

La leishmaniose est une maladie parasitaire due à des protozoaires flagellés appartenant au genre leishmania. Ces derniers, sont transmis par piqûre d'un insecte vecteur, le phlébotome.

Les leishmaniose sont retrouvés dans toutes la surface terrestre mais plus répondeues sur les zones tempérées.

La leishmaniose canine est une parasitose grave associant des lésions cutanéomuqueuses et de lésions viscérales.

Le chien joue un rôle majeur dans la propagation de cette maladie puisqu'il constitue le réservoir principal des agents infectieux, et très rarement en tant qu'agent contaminant.

La gravité de la maladie et le rôle fondamental du chien dans l'épidémiologie de cette infection, nécessite le diagnostic expérimental de la leishmaniose.

La parasitémie étant toujours faible lorsqu'il s'agit des formes asymptomatiques, bénignes et certaines formes chroniques de leishmaniose, et plusieurs techniques de diagnostic sont limitées, d'où l'importance d'utiliser des méthodes fiables, précises et rapides telle que la PCR qui est une méthode sensible et spécifique qui nécessite de prélever un matériel judicieux.

Le but de cette étude est de préciser l'apport de la PCR dans le diagnostic des leishmanioses canines, c'est une technique qui améliore la qualité du diagnostic avec une haute sensibilité et précocité.

La leishmaniose est une atteinte du système réticulo-endothélial dû à un parasite appartenant au genre *leishmania*, responsable des différentes formes cliniques : cutanée, muco-cutanée et viscérale.

La leishmaniose canine est une zoonose parasitaire causée par l'espèce *leishmania infantum* surtout (la plus connue), cette pathologie débute par l'apparition d'un chancre d'inoculation évoluant au point de piqûre, causée par un insecte vecteur, le phlébotome femelle (diptère) (DEREURE et al., 1998).

I. Pathogénie :

Après inoculation des parasites par le vecteur lors de son repas sanguin sans la peau, une réaction inflammatoire se produit, selon la sensibilité du chien, la dissémination de la maladie est un élément à partir de la peau, un animal dit sensible, l'infection gagne en quelques heures les nœuds lymphatiques, la rate, la moelle osseuse, par contre chez les sujets résistants, reste au niveau de la peau grâce à la production d'interférons qui stoppent la dissémination (FERRER, 2002).

Cela est dû, à un gène dit NRAMP (Natural Résistance Associated Macrophage Protéine) qui code une protéine transporteuse d'ions impliquée dans la réplication du parasite dans le phagocyte et l'activation du macrophage, ce qui explique, que certains chiens échappent à la pathologie et d'autres lignées n'échappent pas dans une zone endémique (DENEROLLE, 2003).

Cependant les lésions et les signes cliniques des sujets sensibles à la maladie varient de quelques mois voir des années après l'infection. Au cours de la maladie, le parasite peut se retrouver dans différents organe ; ganglion, rate,

moelle osseuse, foie, pancréas, poumon, yeux, articulations et même les testicules, ce phénomène s'explique par une réaction granulomateuse contenant un nombre variable d'amastigotes (FERRER, 2002).

II. Symptômes :

En général toutes les études ont montré que l'infestation par le parasite débute par un chancre d'inoculation qui se localise le plus souvent au niveau de la truffe, du chanfrein ou de la face interne de l'oreille (ALDER & THRODOR, 1932), les lésions peuvent être uniques ou multiple (VIDOR et al., 1991) évoluant souvent vers la cicatrisation au bout de trois à neuf mois.

La leishmaniose générale du chien se manifeste cliniquement par une symptomatologie très protéiforme, avec une association de lésions cutanéomuqueuses et de lésions viscérales.

Les formes peuvent être :

II.1. Forme aigue:

Très rare survient chez les chiens jeunes âgés de moins de dix huit mois avec hyperthermie allant à 41°C, tremblements et la mort en quelques jours, (AUDEBERT F, 2004).

II.2 Forme chronique :

II.2.1. Incubation

L'incubation a une durée très variable, après piqûre par des phlébotome infectés de promastigotes, l'incubation est de l'ordre de 15 mois. Cette incubation correspond à la forme pré-clinique de la maladie, au cours de laquelle

les chiens sont de faibles réservoirs de parasites ; cependant dès cette phase ils ont une sérologie positive (DEDET, 2001).

La période patente de la maladie s'exprime pas des symptômes variables et diversement associées

II.2.2. symptômes généraux

- Amaigrissement dû à l'asthénie et de faiblesse (l'appétit est conservé)
- Amyotrophie remarquée au niveau de la face « Tête de vieux »
- Anémie, leucopénie.

II.2. 3. Symptômes locaux :

➤ Symptôme cutanéomuqueux :

- Dépilation surtout au niveau de la tête s'observent sur le pourtour des yeux, oreilles, coudes, queue et voir même tout le corps.
- Hyperkératoses : se localise sur le chanfrein, truffe bords des oreilles, coudes, ischions et jarrets.
- Onychoglyphose : allongement excessif des griffes, ce symptôme a une grande valeur de diagnostique.
- Plaies ulcéreuses, riches en parasites

➤ Symptômes oculaires

- Kératite interstitielle, souvent bilatérale, c'est un Symptôme fréquent mais pas constant.
- Conjonctivite, uvéite, chorioretinite, et blépharite, beaucoup plus rare (MCLONNELLE et al., 1970).

➤ **Symptômes Nerveux**

Sont assez caractéristiques de la leishmaniose du chien, cependant inconstants :

- Phénomènes moteurs : parésie du train postérieur, paralysie des nerfs périphériques
- Phénomènes sensitifs : hypoesthésie ou au contraire l'hyperesthésie.

➤ **Symptômes Viscéraux**

Sont caractérisés par une modification des organes du S.P.M

- les adénopathies en sont la marque la plus caractéristique, elles sont quasi constantes et souvent importantes, facilement détectable.
- Modifications hématologiques : outre l'anémie, on observe une leucopénie générale avec modification de la formule leucocytaire
- Symptômes hépato-néphriques et parfois des entérites hémorragiques

Cependant, la mort des individus n'a pas été liée directement aux signes précédemment décrits, du fait que certains individus ne présentent pas ces symptômes après confirmation de présence d'un chancre d'inoculation (DUARTE et al., 1986).

III. Lésions :

Peuvent être uniques ou multiples, surviennent après l'activité du phlébotomes (un à six mois après).

III.1. Lésions macroscopiques :

Les lésions peuvent être sévères ou minimales :

- *Sévère* : Chines cachectiques, avec ganglions hypertrophiés déformés, différents organes atteints, hypertrophie (rate, foie, rein)
- *Minimes* : Lésion cutané: alopecie sur la tête, l'encoulure, trains postérieur et les ailles (FERRER, 2002).

III.2. Lésion microscopiques :

- Réaction inflammatoire granulomateuse, hyperplasie des cellules du SPM.
- Lésion d'hyperplasie ganglionnaire, rate et différents organes.
- Uvéite et vasculite.

Au niveau cutané les lésions sont variées : formation de nodules périvésiculaires, apparition de foyers de nécrose (DEDET, 2001).

IV. Etude de l'agent étiologique :

IV.1 Historique :

Les leishmanioses, sont des protozooses causées par un protozoaire du genre *leishmania*, il fut découvert en 1903 à l'hôpital de Madras par DONOVANI.

En Juillet de la même année, il fut nommé *Piroplasma Donovanii* par Laven et Meswil, depuis plusieurs types de classification se sont succédées et complétés et ce de 1916 à 1987 (RIOUX et al.; 1990).

Règne : Protiste	Haeckel, 1866
Sous règne : Protozoa	Goldfuss, 1817, Siebold, 1848
Embranchement : Sarcomastigophora	Horigberg et Balmath, 1963
Sous/Embranchement : Mastogiphora	Dieshing, 1866
Classe : Zoomastigophora	Calkins, 1909
Ordre : Kinétoplastida	Honigberg, 1963 Vickerman, 1976
Sous-ordre : Trypanosomastina	Kent, 1880
Famille : Trypanosomiase	Doflein, 1903 Grobden, 1905
Genre : Leishmania	Ross, 1903

Dans le domaine des leishmanies, la taxonomie est basée sur les caractères enzymatiques, l'unité biologique est une protéine enzymatique codée par des gènes, et identifiée par l'analyse iso-enzymatique du parasite (Delet J.P, 1999)

- 1- Complexe phylogénétique L- donovani
- 2- Complexe phylogénétique L- infantum
- 3- Complexe phylogénétique L- tropica
- 4- Complexe phylogénétique L- killicki
- 5- Complexe phylogénétique L- aethiopica
- 6- Complexe phylogénétique L- major
- 7- Complexe phylogénétique L- turanica
- 8- Complexe phylogénétique L- gerbili

- 9- Complexe phylogénétique L- larabica
- 10- Complexe phylogénétique L- mexicana
- 11- Complexe phylogénétique L- amazonensis
- 12- Complexe phylogénétique L- enrieti
- 13- Complexe phylogénétique L- hertig

- Différentes souches de leishmania d'origine canine en Algérie ont été mise en évidence par Harrat.Z et Belkaide.M au niveau de gouvernorat du grand Alger, de 1990-1997, Cinq souches différentes de *leishmania* ont été identifiées :

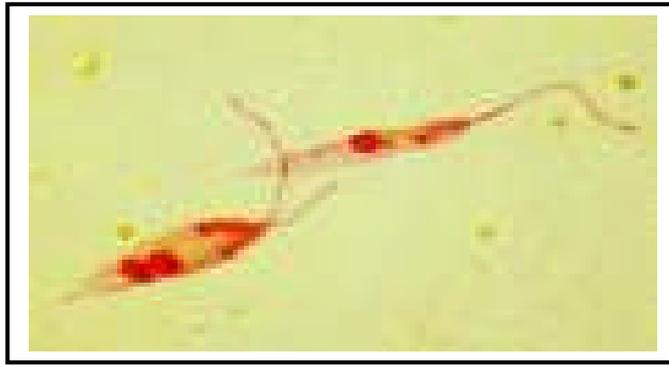
- 1- MCAN/DZ/90/LIPA 250
- 2- MCAN/DZ/96/LIPA 463
- 3- MCAN/DZ/97/LIPA 731
- 4- MCAN/DZ/97/LIPA 732
- 5- MCAN/DZ/97/LIPA 733

Ces souches, s'apparentent à leishmania infantum, zymodème Mon-1 (HARRAT Z et BELKAID M., 2002).

IV.2. Cycle de vie et morphologie :

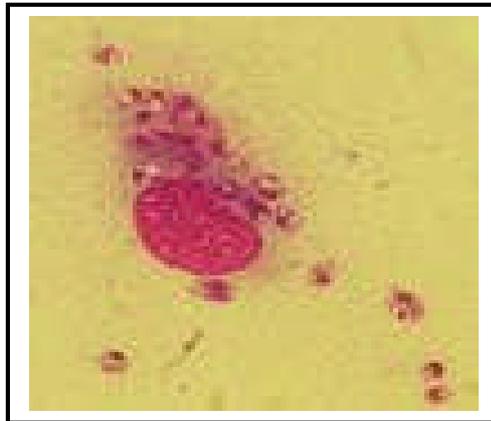
Le cycle du parasite *leishmania* est dimorphique c'est-à-dire nécessite deux hôtes : le phlébotomes (vecteur) et un mammifères (réservoir).

Lorsqu'une femelle phlébotome infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, elle salive au site de piquûre et régurgite par la même occasion le parasite sous sa forme promastigote (Fig n° 1).



**Fig n°1 : La forme promastigote de *leishmania*
(www.parasitologie Univ.Montp1.p.fr)**

Ce dernier qui est de forme allongé, flagellé et très mobile, sera ingéré par un phagocyte (surtout monocyte et macrophage) du système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote (Fig n° 2).



**Fig n°2 : La forme amastigote de *leishmahia*
(www.parasitologieUniv.Montp 1.p)**

Devient ovoïde de 2,5 à 5 µm de diamètre avec flagelle plus court et non motile, puis se multiplie par fission binaire dans le phagocyte qui se lyse, les parasites libres seront phagocytés par les cellules avoisinantes ou le processus se poursuit (ALEXANDER et al., 1999).

Lorsque une femelle phlébotome prend un repas sanguin au site d'infection, il y aura aspiration des phagocytes contenant *leishmania* (DEREURE, 1993) au niveau du tube digestif de l'anthropode (vecteur).

Les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils se divisent activement au stade procyclique, mais sont pas infectieux, après 4 jours apparition des nectomonades (promastigotes plus allongés et motile) qui s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian, puis migrent au 7^{ème} jour vers la partie antérieure de l'intestin jusqu'à ce qu'ils atteignent la valve du stomodaeum ou ils se transforment en heptomonades (plus petits et plus arrondies) et en promastigotes métacyclique, (plus mince avec un long flagelle et très motiles) qui migrent vers l'oesophage et le pharynx d'où la forme infestent lors de repas sanguin sur mammifère (SACK & KAMHAWI, 2001).

V. Réservoir:

Les leishmanioses sévissent dans les foyers endé-unique, en fonction de l'hôte, ils sont qualifiés d'anthroponoses ou des zoonoses (selon que l'humain soit l'hôte direct ou l'hôte accidentel du vecteur), certains vecteurs ont une attirance toute particulière pour l'homme.

Ce pendant la majorité ont plutôt tendance à infecter d'autres mammifères selon l'habitat (RIOUX et LANOTTE, &993) les réservoirs présents dans le nouveau monde sont les paresseux, les rongeurs, les primates et les chauves-souris (PINTO et al.,2001) dans l'ancien monde ,ce sont surtout les petits rongeurs (muridae) et les chiens (THOMAZ-SOCCOL et al.; 1993)

VI. Vecteur:

Se sont des petits insectes dit diptères nématocères de la famille des psycodidae et la sous famille de phlébotominae de 2 mm de long, de couleur pale jaunâtre, avec de gros yeux noirs, des ailes lancéolées, frangées de longs poils (relevés au repos), ayant l'aspect d'un petit moustique velu (DEDET, 1999)(Figure 03).

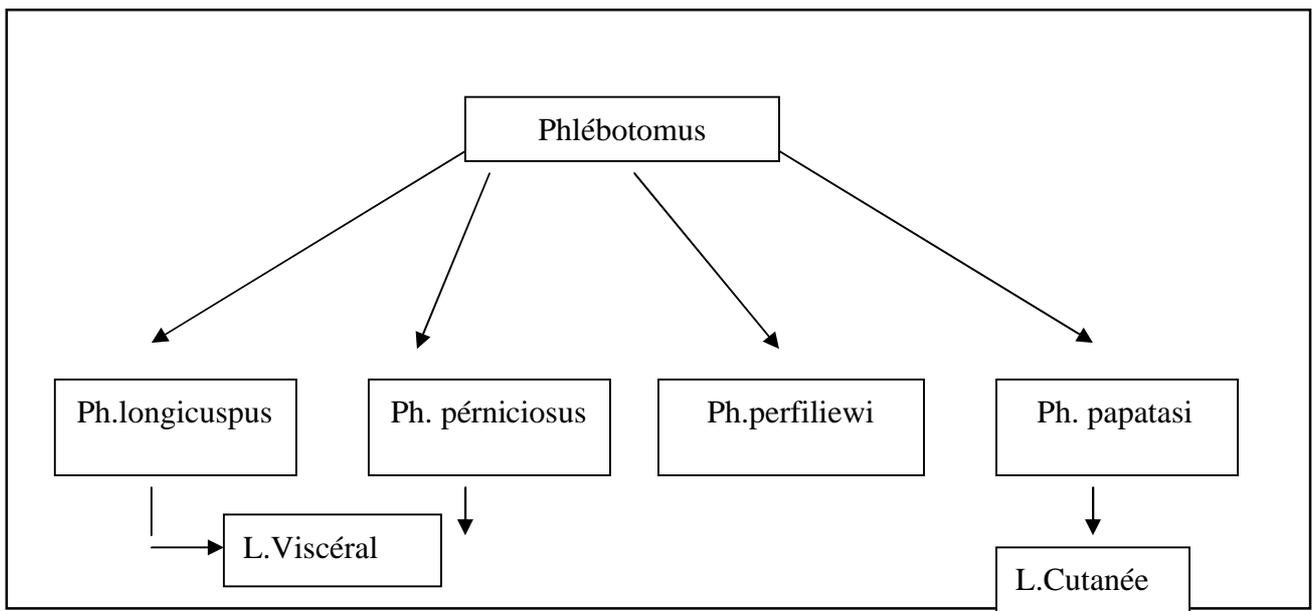
Seules les femelles sont hématophages, et les males quant à eux se nourrissent de végétaux et de jus sucrés (LEGER N et DEPAQUIT J, 1999). Plus actives la nuit au printemps et à l'automne, attaquent surtout les zones globus (chaufrein, oreilles).

Ce qui explique que les chiens à poils longs ne sont pas particulièrement protégés, ils ne survivent que dans des zones ou l'altitudes est inférieures à 800 mètres, milieu chaud et humide avec moins de vent , se trouvent dans les creux de rochers,murets de jardins et surtout à proximité de points d'eau des quartiers voisins de quelque centaines de mètres peuvent être les uns atteints et les autres indemnes, selon que le biopope est favorable ou non à l'insecte (KILLICK-KENDRICK,2002).



Fig n°3 : Adulte phlébotome
(www.parasitologie.univ-montp1.fr)

Les principales espèces des phlébotomes vecteurs de la leishmaniose en Algérie (HARRAT Z et BELKAID M, 2003)



De nombreuses espèces de phlébotomes ne sont pas vétrices de la leishmaniose (LARVIERE et al ; 1987).

VII. Transmission :

La transmission a été suspecté pour la première fois en 1905 et soumis expérimentalement par Sergent, Parrot, Donation et Begnet en 1921 (ABONNENC. E., 1972).

L'homme peut être infecter lors d'un repas sanguin précédent, sur un hôte porteur de leishmaniose, des transfusion sanguine, ou par partage de seringues infectées chez les toxicomanes (KILLICK-KENDRIK, 2002).

En plus, la transmission directe est presque impossible du faite que les leishmanies ne résiste pas dans le milieu extérieur (DENEROLLE, 2003).

Il existe trois mécanismes de transmission par le phlébotome infecté :

- La régurgitation de parasites infectieux (promostigotes métacycliques) qui détruisent la paroi digestive l'insecte
- Dépôt de prostigotes métacycliques sur la peau par la trompe lors de repas sanguins
- inoculation de promostigotes métacycliques à partir des glandes salivaires

Ce pendant les deux dernières hypothèses, du mécanisme de transmission se contredisent du fait que les parasites n'envahissent les pièces buccales que très longtemps après le repas sanguins (KILLICK-KENDRIK., 2002).

I. Argument d'orientation:

I.1. Origine géographique:

La leishmaniose canine requiert une répartition géographique intéressante dans toutes les régions du globe et particulièrement le bassin méditerranéen.

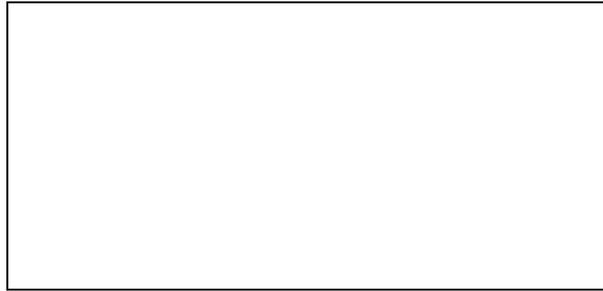


Fig1 :pages

L'Algérie compte parmi les pays les plus exposés, et concernée par trois formes cliniques sévissant à l'état endémique : leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS) et la leishmaniose cutanée zoonotique (BACHI ;2001).

La présence des chiens, en région d'endémie doit orienter le diagnostic en faveur de la leishmaniose (MONTIER B, 1976).



Fig1 :pages

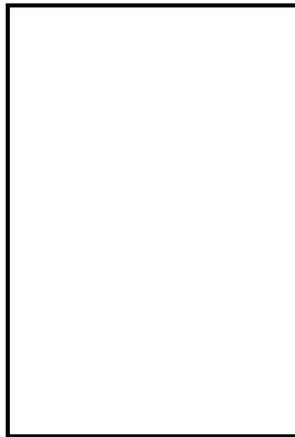
I.2. Arguments cliniques:

Fréquemment, les chiens atteints de leishmaniose à *leishmania infantum* présentent une altération de l'état général, une poly adénopathie et une insuffisance rénale, les symptômes cutanés sont également très fréquentes et il se manifestent par des lésions kératoséborrhéiques des ulcérés et des nodules (DENORELLE, 2003).

Des manifestations oculaires peuvent être associées aux lésions précédentes (FRANÇOIS et al ; 1982).

Tableau 01 : tableau clinique de la leishmaniose générale du chien (GUETTA F, 2000)

Organes touchés	Principaux symptômes observés
Comportement, état général	<ul style="list-style-type: none">- Modification du caractère- Abattement- Amaigrissement important
Organes de S.P.M	<ul style="list-style-type: none">- Hypertrophie des ganglions lymphatiques- Anémie- Trouble de coagulation- Splénomégalie.
Rein	<ul style="list-style-type: none">- Insuffisance rénale- Syndrome néphrétique.
Yeux	<ul style="list-style-type: none">- Conjonctivite- Uvéite.
Appareil digestif	<ul style="list-style-type: none">- Vomissements- Diarrhée, méléna.
Système neuro-téo-musculaire	<ul style="list-style-type: none">- Parésie, paraplégie- Arthrite- Atrophie musculaire.
Appareil respiratoire	<ul style="list-style-type: none">- Toux- Eternuements.



(DELET., 1999)

Fig1 :pag1nes

II. Arguments de suspicion :

II.1. Modification hématologique :

- Marquer par une modification de la vitesse de sédimentation elle augmente régulièrement avant l'apparition des premiers symptômes cliniques.
- Une anémie et une leucopénie dans environ 37% des cas.
- Une formule leucocytaire modifiée avec tendance à l'inversion par l'augmentation des lymphocytes et diminution des polynucléaires.
- Une protidémie souvent élevée et modification de l'équilibre protidique du sérum avec hyperglobulinémie.
- Ces variations peuvent être mises en évidence par différentes réactions sérologiques.

II.2. Modification biochimique :

- Tout chien leishmanien est un insuffisant rénal potentiel. L'élévation du taux de créatinine est tardive par rapport au taux d'urée, ce phénomène serait lié à la fonte musculaire.
- L'augmentation des transaminases, de la bilirubine et des lipides totaux principalement due à l'élévation des triglycérides et du cholestérol, peuvent orienter vers un diagnostic de leishmaniose.
- Le dosage des protéines sériques révèle une hyperprotéïnémie lors de leishmaniose, qui s'explique par l'augmentation des globulines couplée à une diminution de l'albuminémie. L'électrophorèse des protéines permet d'affiner l'approche de l'hyperprotéïnémie.

III. Arguments immunologiques :

Les tests sérologiques sont les premiers tests spécifiques à réaliser pour confirmer l'infection. L'interprétation du titre sérique doit être établie en tenant compte de la technique utilisée, de la date présumée d'infection et des valeurs usuelles du laboratoire.

La sérologie permet de mettre en évidence les anticorps dirigés contre les antigènes leishmaniens. Les premiers anticorps immunoglobulines G apparaissent à partir de la troisième semaine post-infection (BOURDEAU & GROULADE, 1998).

Les techniques mises en œuvre couramment par les laboratoires sont :

III.1. Immunofluorescence indirect (I.F.I):

La technique met en contact un antigène figuré marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine avec des sérums à tester (diluée), la fixation des anticorps spécifiques sur l'antigène figuré va former le complexe antigène anticorps (Ag-Ac) par addition d'anti-immunoglobuline marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Cette technique est la plus utilisée dans les laboratoires, du fait que cette réaction présente l'avantage d'être sensible, facile à réaliser, nécessitant peu de matériel, peu de sérums. Le seuil de positivité est de 1/80 à 1/160 mais ne faut pas négliger les dilutions inférieures à 1/80 en zone d'endémie (QUILICI et al., 1968).

III.2. Elisa:

Cette technique permet de mettre en évidence des IgG anti-leishmania, elle utilise un antigène soluble mis en contact de dilutions successives de immunoglobuline marquée par une enzyme telle que la peroxydase (la plus utilisée) la quantité d'anticorps est déterminée par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie (OKONG'O-ODERA et al., 1993).

III.3. Test d'agglutination direct (D.A.T):

Consiste à mettre en contact de sérums dilués avec des formes promastigotes de *leishmania* trypsinées et colorées au bleu d'Evans. La réaction positive se traduit par un tapis d'agglutination (MEREDITH S et al., 1995).

III.4. Test d'agglutination au latex :

C'est la mise en contact de sérum à dépister avec des billes de latex sensibilisées par l'antigène leishmanien et l'agglutination traduit la positivité de la réponse (DERREURE et al. ,1998)

III.5. Hemagglutination :

Consiste à détecter les anticorps dirigés contre les antigènes des globules rouges. Elle met en contact des dilutions de sérums et des globules rouges sensibilisés par l'antigène leishmanien, et la formation d'un sédiment prouve la négativité de la réponse mais cette technique est peu utilisée du fait de son défaut de sensibilité et de spécificité (Le FICHOUX et al.; 1999).

III.6. La fixation du complément:

C'est la réaction de fixation du complément détectée la présence d'anticorps mettre en contact le sérum diluée avec l'antigène leishmanien puis l'ajout du complément si il y a présence d'anticorps ,il y aura formation du complexe immum (Ac-Ag) qui vont fixés le complément qui est consommé), ensuite o, ajoute des cellules indicatrices (érythrocytes) recouvertes d'anticorps subagglutinant anti-érythrocytes, ces derniers seront lysées s'il reste du complément ,d'où la réponse est négative lors de lysent des cellules.

III.7. Western blot (Immuno empreinte):

Consiste a mettre évidence les anticorps qui sont détectée par l'addition du substrat spécifique de l'enzyme.

Les protéines incubées avec les sérums à tester pour révéler le complexe immum par l'adjonction d'une anti-immunoglobulines marquée à la phosphatase alcaline (ROLLAND et al.; 1992).

IV. Arguments parasitologiques:

L'objectif de la recherche est de mettre en évidence directement le parasite au microscope après étalement sue lame du spécimen. Seuls les examens directs confirment avec certitude une leishmaniose, car ils sont tous caractérisés par une spécificité absolue lorsqu'ils sont bien réalisés (GUETTA F, 2001).

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 (SCOTT et al.; 1991).

On préfère donc une recherche sur ponctions ou biopsies d'organes ou SPM, tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate, ou à partir de matériel provenant de lésions cutanées tels que des biopsies, des calques ou des sérosités dermiques (BUSSIERAS J et CHERMETTE R, 1992).

Il existe d'autres examens directs plus sensibles, comme la culture ou les tests d'inoculation au hamster (CHANG K et HENDRICKS L, 1985).

En résumé, face à une suspicion de leishmaniose deux types d'examen peuvent être effectués, des examens directs et des examens indirects (Tableau 02).

Cependant que ce soit des critères épidémiologiques, cliniques, biochimiques, parasitologiques ou même immunologiques, seule la mise en évidence du parasite permet de poser un diagnostic de certitude. La spécificité de tous ces examens est généralement excellente, c'est leur sensibilité qui diffère.

D'où l'intérêt d'utiliser des techniques beaucoup plus performantes dont la sensibilité est très élevée est faisant appel à un matériel biologique bien spécifique du parasite qui est l'**ADN**.

Parmi les outils de biologie moléculaire, mis au point pour le diagnostic des parasitoses animales, la **PCR (Polymerase Chain Reaction)** sont de loin la plus utilisée ces dernières années.

Examens indirects	Spécimens	Critères diagnostiques
- Biochimie classique	- Sérum ou plasma	- Urémie et créatinémie augmentées ; - Activité des enzymes hépatiques augmentée ; - Hyperprotéïnémie.
	- Urine	- Protéïnurie ; - Hématurie ;
- Électrophorèse	- Sérum	- Hypergammaglobulinémie : gammopathie polyclonale (rarement monoclonale) avec parfois une augmentation des B2 et bioc By ; - Hypoalbuminémie

- Numération et formule sanguine	- Sang EDTA	- Anémie hypo à arégénérative ; - Thrombocytopénie ; - Leucopénie ou leucocytose avec déviation à gauche de la courbe d'Armeth ; - Lymphopénie - Monocytose
- Sérologie	- Sérum ou plasma	- Titre en anticorps supérieur à 1/80 ^e par immunofluorescence ou supérieur à 50 par ELISA (selon le laboratoire).
Examens directs	Spécimens	Diagnostic de certitude
- Examen microscopique après coloration	- Ponction ganglionnaire - Ponction de moelle osseuse - Calque cutanés, sérosités dermiques.	- Visualisation des leishmanies (formes amastigotes) ;
- Histologie	- Biopsie ou pièces d'exérèse, intéressant les organes du SPM et la peau.	- Lésions caractéristiques et visualisation des leishmanies (formes amastigotes).
- PCR (Polymérase Chain Réaction) sur mini-tube EDTA ou	- Ponction ganglionnaire. - Ponction de	- Visualisation de fragments d'ADN ou d'ARN spécifiques de <i>Leishmania</i> sp.

frottis sur lame.	moelle osseuse. - Calques cutanés, sérosités dermiques, -Frottis conjonctivaux (cytobrosse) -Biopsies ou pièces d'exérèse cutanées et du SPM	Amplifiés après migration électrophorétique.
-------------------	---	---

I. ADN leishmanien :

La mise au point d'un diagnostic basé sur les techniques de biologie moléculaire commence par le choix de l'ADN cible.

L'ADN se présente sous la forme d'une molécule hélicoïdale, composé de l'enchaînement de nucléotides formés d'une base et de désoxyribose 5' phosphate, reliés entre eux par des liaisons phosphadiseter.

L'ADN est composé de quatre base : Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C), et Thymines (T), s'associent entre elles de façon complémentaire en formant des couples A-T et G-C par l'intermédiaire de deux liaisons entre A et T et trois liaisons entre C et G (liaisons hydrogènes de faible énergie).

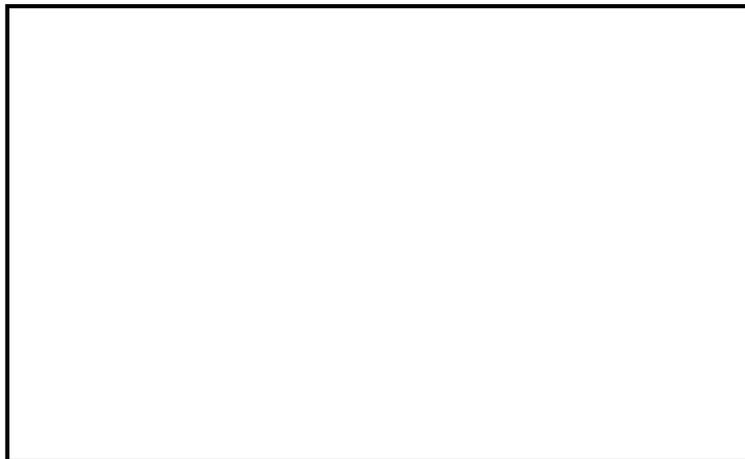


Figure (5) :de l'ADN

La structure d'ADN fut élucidée en 1953 par Watson, Crick et Wilkins. Chaque brin est orienté dans le sens 5' (extrémité phosphate) -3' (extrémité hydroxyle libre), avec une orientation opposée.

Comme tous les kinétoplastidés, les *Leishmania* ont un génome nucléaire et un génome kinétoplastique, qui ont tous deux des caractéristiques inhabituelles, en particulier dans les mécanismes de transcription.

Les séquences répétées du génome kinétoplastique sont des cibles privilégiées, du fait de la présence de molécules d'ADN entrelacées et organisées en réseau : les maxicercles et les minicercles (SIMPSON, 1987).

Le kinetoplaste contient 10 à 30 maxicercles identiques, d'une taille de 20 à 40 kb selon les espèces et environ 1000 à 10 000 minicercles, avec une taille inférieure à 2kb (READ et al ., 1993).

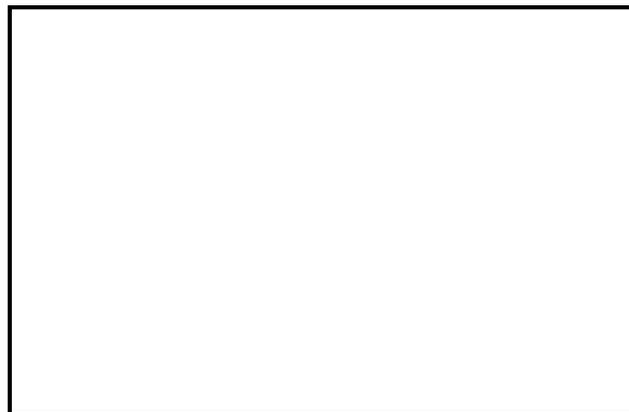


Figure (6) : Organisation du kinetoplaste

Chaque minicercle présente une région variable d'environ 600 pb (paires de base) et une région constante d'environ 200 pb, conservée parmi les différentes espèces de leishmanies.

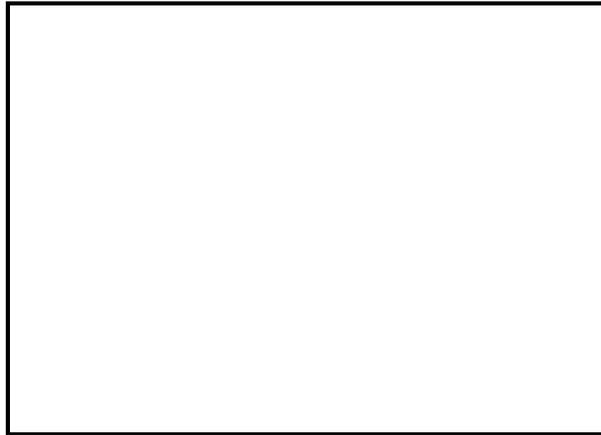


Figure (7): Organisation d'un minicercle

Ces séquences conservées représentent les cibles idéales pour les amorces de la PCR, pouvant amplifier toutes les classes connues de minicercles des différentes espèces de *Leishmania* (RODGERS et al., 1990).

II. Description de la technique PCR :

II.1. Historique :

Cette méthode de biologie moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui avait obtenu pour ces travaux le prix Nobel de chimie en 1993.

Aujourd'hui ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistant permet d'obtenir, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN.

Cette technique mise au point par K. Mullis de l'équipe de H. Erlich (Cetus corporation) est certainement celle qui a connu le développement le plus spectaculaire et le plus rapide dans l'histoire de la biologie.

Derrière une très grande simplicité à la fois dans le principe et dans la réalisation se cachent de nombreux pièges susceptibles d'entacher la valeur des résultats obtenus. Son utilisation impose une organisation particulière des laboratoires et une grande expérience.

Chaque résultat doit être analysé avant d'être validé, ce principal écueil étant la contamination par les produits des amplifications précédentes (Kaplan, 1993).

II.2 Principe de la PCR :

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique (ADN ou ARN), afin de le visualiser ensuite par d'autres techniques : migration électrophorétique après coloration au bromure d'éthidium ou par d'autres méthodes colorimétriques et luminescentes (GUETTA F, 2001).

Il s'agit d'un outil extrêmement performant, puisqu'il permet l'amplification de millions de copies d'un fragment d'ADN à partir d'une très faible quantité de spécimens biologiques.

Le principe du diagnostic par PCR est donc de détecter la présence de parasite dans un spécimen prélevé via une partie infime de son matériel génétique (MCPHERSON, 2000).

II.3. Les composants de la réactions PCR

Les résultats d'une amplification PCR sont largement fonction du milieu réactionnel et de la concentration de chacun des composants.

L'ADN doit être parfaitement extrait et purifié, en utilisant des techniques d'extraction bien adaptées pour chaque prélèvement (PHENOL - CLOROFORM, PROTEINASE k, KITS...). Dans le cas de la leishmaniose, l'ADN kinétoplastique est le plus souvent utilisé pour une PCR standard.

La *Taq* polymérase qui est une enzyme extraite d'une bactérie, vivant dans des sources chaudes (80-90°C) : *Thermus aquaticus*, est nécessaire pour chaque cycle, permettant le transport des désoxynucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) précurseurs des nucléotides, des nucléotides et leurs fixation au site de prédilection (MCPHERSON, 2000).

Le choix des amorces est une étape très importante lors de la mise au point d'une PCR (KAPLAN, 1993), car chaque pair d'amorce est spécifique au parasite étudié, plusieurs critères doivent être pris en compte :

- La séquence des amorces ne doit pas permettre la formation d'hybride entre les amorces.
- Il est préférable que la composition en bases soit équilibrée (et éviter les longues répétitions de CG)
- Les Tm des amorces ne doit pas être trop différentes l'une de l'autre.
- Les séquences choisies ne doivent pas correspondre à des séquences génomiques répétées.

Les amorces choisies pour l'amplification de l'ADN kinétoplastique du genre *Leishmania* d'après une étude faite par Aransay et al., 2000 sont :

- LKF : 5' AAGGTTGGTCTAAAAAACCC 3'
- LKR : 5' TTTGAACGGAATTTCTG 3'

Autres composants de la PCR (Kaplan, 1993):

- la concentration en ions magnésium, la Mg^{++} est nécessaire à la fois pour stabiliser les nucléotides et pour la réaction.
- Le PH doit rester constant et correspond au PH optimal de l'enzyme utilisée, ce qui nécessite l'addition d'un tampon Tris-HCl.
- DMSO : diméthylsulfoxyde, lorsque les séquences d'ADN sont riches en CG, ils se forment des structures secondaires lorsque l'ADN refroidi après sa dénaturation. L'addition du DMSO empêche ces structures de se former.

II.4. Technique PCR :

➤ *Conditions de réaction :*

Les conditions optimales de concentration, de durée d'incubation et de température doivent être recherchées et respectées pour chaque réaction.

L'ADN contenant le segment à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa T_m (90-94°C) en présence des composants nécessaires à la réplication. Cette température est maintenue entre 30 secondes et 1 minute.

Elle est ensuite abaissée à une valeur inférieure à la T_m de l'amorce, afin que les amorces puissent s'hybrider avec l'ADN dénaturé. Cette température est comprise entre 40 et 70°C, elle est maintenue entre 30 secondes et 1 minute.

On augmente ensuite la température à 72°C afin de permettre à l'ADN polymérase de répliquer l'ADN dans des conditions optimales (KAPLAN, 1993).



Figure (8) : Technique d'amplification

➤ *Détection des produits d'amplification :*

Plusieurs modalités sont utilisables. Classiquement, on réalise une électrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction.

Les produits d'amplification peuvent être identifiés après coloration du gel par le bromure d'éthidium par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaire.

Le poids moléculaire de l'ADN kinétoplastique des leishmanies est de 750 à 800 pb selon les espèces *Leishmania*.

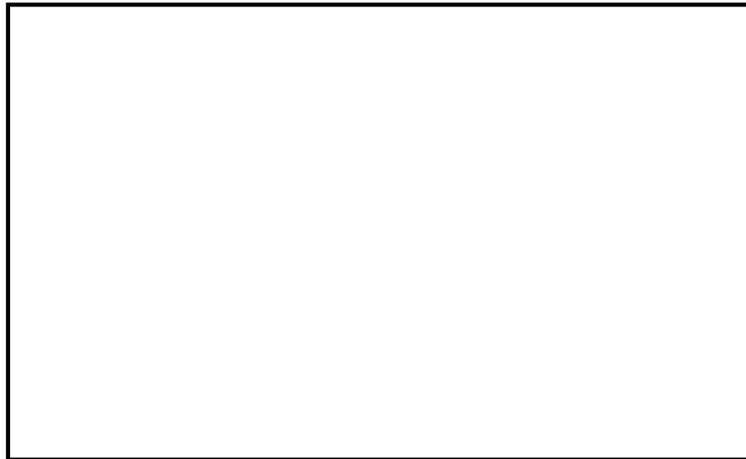


Figure (9) : Amplification de l'ADN leishmanien kinetoplastique extrait de sang de chiens asymptomatiques

II.5. Avantage et inconvénients :

La PCR est une réaction très sensible, rapide qui permet d'amplifier des séquences courtes d'ADN, donc de travailler même à partir de matériel partiellement dégradé et sans purification préalable de l'ADN.

L'amplification ne pose pas de problèmes pour des séquences de l'ordre de 1 à 1,5 Kilo bases (1Kilobase = 1 000 paires de bases). Au-delà de cette taille, l'amplification est plus délicate et demande des conditions expérimentales particulières à définir par tâtonnements.

L'amplification de séquences de taille supérieure à 3 Kilobases est impossible en routine. De nombreux appareils du commerce permettent d'automatiser la phase dénaturation-hybridation-élongation de la PCR, assurant ainsi une bonne reproductibilité des résultats.

De grandes précautions de manipulation sont à respecter pour assurer une bonne spécificité de la réaction.

Cette spécificité dépend de la stabilité de l'hybridation entre l'amorce et la matrice elle-même sous l'influence de nombreux facteurs dont la longueur des amorces, la température de l'étape d'hybridation et la concentration des réactifs, notamment des ions Mg^{++} nécessaires au fonctionnement de la Taq polymérase.

Un excès de $MgCl_2$ entraîne l'accumulation de produits de synthèse non spécifiques. Une concentration insuffisante diminue fortement le rendement de la réaction.

Enfin il faut éviter la présence de séquences d'ADN contaminant qui seraient amplifiées de façon non spécifique, et conduiraient à de faux résultats positifs (tube dénué d'ADN-cible révélant une amplification).

Ces contaminations proviennent souvent de produits d'amplification précédente (KAPLAN, 1993).

Dans la pratique, ces contaminations peuvent être évitées en réalisant l'amplification et l'analyse des produits d'amplification dans deux laboratoires nettement séparés, le matériel utilisé étant propre à chacun des laboratoires.

Tableau 03 : Avantages et Inconvénients des techniques PCR (GUETTA, 2001)

Avantages	Inconvénients
Sensibilité et spécificité excellentes.	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 qualité et expérimenté
Indépendante de la réponse immunitaire	
Résultat rapide (48h en moyenne)	
Suivi thérapeutique	

III. Optimisation de la PCR :

Les réactions PCR ne sont pas efficaces à 100% même si l'on utilisait des amorces et des ADN clonés de séquences définies. Habituellement les conditions de la réaction doivent être variées pour améliorer l'efficacité.

Les paramètres habituels à varier incluent la température de l'anneau et la concentration en Mg^{2+} . Si elle est trop faible, la température de l'anneau favorise le mésappariement.

La concentration optimale en Mg^{2+} varie avec chaque nouvelle séquence mais est souvent comprise entre 1-4 $m\mu$. La spécificité de la réaction peut être améliorée en effectuant une PCR nichée où au cours d'un second tour de la PCR un nouvel ensemble d'amorces est utilisé ; des amorces qui s'annellent à l'intérieur du fragment amplifié par la première paire, donnant ainsi un court produit de la PCR.

Si au cours du premier tour de la PCR, certains produits non spécifiques ont été produits, provenant de frottis ou un nombre de bandes, l'utilisation d'une PCR nichée assurerait qu'uniquement le produit désiré est amplifié de ce mélange car elle devrait être la seule séquence présente contenant les deux groupes de sites se fixant aux amorces.

La PCR peut être utilisée pour former des sondes marquées pour dépister les banques ou effectuer des expérimentations de buvardage en ajoutant des nucléotides modifiés ou radioactifs aux phases finales de la réaction PCR ou en marquant le produit de PCR généré (MCPHERSON, 2000).

IV. Limites et principaux problèmes rencontrés :

IV.1. Les limites de la PCR :

La première limite de la réaction PCR est la taille de la séquence que l'on souhaite amplifier, il est quasiment impossible d'amplifier des séquences dont la longueur de la séquence est supérieure à 3 kb.

La seconde limite est celle du nombre de copies de la cible, lorsque le nombre de copies de départ est faible comme c'est le cas des leishmanies, il est préférable d'effectuer deux PCR successives.

La troisième limite est l'inefficacité de l'augmentation du nombre de cycle, c'est une limite intrinsèque de la technique PCR.

IV.2. Principaux problèmes rencontrés :

Parmi les différents problèmes qu'il est possible de rencontrer en utilisant la technique PCR, il en est un qui revêt une importance particulière, surtout lors d'une utilisation en diagnostic (le résultat étant souvent le facteur décisif dans le choix de l'acte qui peut être par exemple un avortement.

Il s'agit du problème de la contamination. Si le produit d'amplification doit être sous-cloné, le problème majeur est celui de la faible fidélité de la Taq polymérase. Enfin il apparaît souvent des amplifications parasites dont il n'est pas toujours possible de se débarrasser.

➤ **La contamination :**

C'est le principal problème majeur rencontré, particulièrement difficile à maîtriser lors des premières utilisations de la PCR.

Il est possible de s'affranchir complètement du problème de la contamination, certaines précautions permettent de minimiser considérablement le risque.

En pratique, la source majeure de contamination est l'ADN amplifié au cours des manipulations précédentes comme exemple : Un tube où a été réalisée une amplification contient des quantités énormes de la cible, à haute concentration, et lors de l'ouverture du tube, les turbulences engendrées projettent dans la pièce des vapeurs d'eau (dans laquelle l'ADN amplifié est solubilisé).

Par ce simple geste plusieurs milliers de copies peuvent à chaque fois contaminer l'atmosphère de la pièce (KAPLAN, 1993).

Lors des pipetages après amplification, la dépression engendrée par la pipette automatique, crée des micros aérosols qui vont tapisser de séquence amplifiée les parois de la pipette.

Ainsi dans une pièce où sont ouverts des tubes contenant un produit amplifié, l'air, les murs, le matériel,...etc. Sont contaminés par la séquence cible.

La principale et la plus efficace des mesures à prendre pour lutter contre ce type de contamination consiste à réaliser les incubations dans un laboratoire

différent et le plus éloigné possible de celui ou sera analysé le produit amplifié (il est par exemple préférable qu'il soit situé à un autre étage, voire voir dans un autre bâtiment).

Le matériel utilisé pour réaliser les incubations (pipette automatiques, etc.). Ne doit pas être utilisé pour une autre activité et ne doit jamais quitter le laboratoire correspondant. Bien que le risque de contamination par de l'ADN non amplifié soit infime, quelques précautions supplémentaires peuvent être prises à titre préventif (MCPHERSON, 2000):

- Utilisation de cônes de prélèvement munis de coton protecteur, ou mieux de piston.
- Le corps de la pipette ne peut jamais être en contact avec l'échantillon ;
- Irradiation des amorces avec des rayonnements ultra-violet ;
- Aliquotage en petits volumes de tous les composants des incubations (amorces, nucléotides, ...) et ce dès leur réception ;
- Distribution du DNA en dernier, lors de la réalisation des incubations.

➤ **Le manque de fidélité de la *Taq* polymérase**

La *Taq* polymérase est une enzyme qui ne possède pas d'activité de correction des épreuves. Le taux d'erreurs introduites par cette enzyme est donc particulièrement élevé.

En revanche, lorsque la séquence du produit amplifié joue un rôle dans l'analyse, la présence d'erreurs de réplication peut fausser complètement les résultats obtenus.

Il n'existe pas de moyen pour supprimer ces erreurs ; on peut tout au plus les minimiser.

L'interprétation des résultats devra tenir compte de la possibilité d'erreurs dues à la polymérase, et les contrôles devront être suffisants et appropriés.

Enfin il sera toujours préférable de pratiquer des déterminations directes de séquences (ou les erreurs ne sont pas détectables car aléatoires et diluées) plutôt que de séquencer après sous-clonage, même si les résultats sont les plus souvent moins bons et plus difficiles à interpréter.

➤ **Les amplifications parasites :**

Les amorces utilisées sont toujours courtes, et la possibilité qu'elles s'hybrident ailleurs qu'au niveau de leur cible n'est pas négligeable. On estime en fait que seulement 1 p.100 des amorces s'hybrident à leur place normale, les 99p.100 restants s'hybridant n'importe où de manière non spécifique (KAPLAN et DELPECH, 1993).

Normalement les amplifications parasites qui en résultent ne sont pas détectables car elles sont linéaires et non exponentielles. La quantité obtenue à la fin des cycles est trop faible pour être révélée par simple coloration.

Pour que le contaminant soit détectable il faut que deux amorces aient pu s'hybrider en regard et à une distance suffisamment faible pour que l'amplification puisse s'effectuer.

Les amplifications parasites ne sont pas prévisibles et dépendent de la séquence des amorces utilisées le moyen le plus efficace est d'augmenter la

stringence, le plus souvent en augmentant la température. Cette augmentation est effectuée progressivement jusqu'à ce que les bandes contaminantes disparaissent (bien sûr dans la limite de ce que permettent les amorces choisies).

Cette technique, appelée PCR « nichée » (NESTED PCR) consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces.

Ainsi, si la bande correspondant à la première amplification est artéfactuelle, lors de la deuxième PCR les amorces du deuxième couple ne pourront pas s'hybrider et il n'y aura pas d'amplification (Kaplan, 2000).

V. PCR dans le programme de dépistage et de suivi thérapeutique :

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 présider 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 la 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 autres concluent ainsi à l'intérêt de la PCR comme aide au diagnostic de la leishmaniose viscérale, en particulier chez certains patients immunodéprimés ou la sérologie n'est pas suffisante.

OSMANE 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 ganglionnaire ou médullaire.

En 1995, deux études indépendantes (MATHIS et al ; ASHFORD et al) réalisées sur des chiens leishmanies 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. 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 la référence au lieu de la culture ou du test d'inoculation au hamster.

Le PCR est donc une méthode extrêmement sensible et spécifique pour diagnostiquer de l'ADN à partir des prélèvements et des amorces d'amplification choisies en fonction de la région à amplifier (Observation en page 32).

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.

La PCR peut aussi être utile dans le choix et le suivi thérapeutique. En détectant et en suivant l'élimination des leishmanies, d'évaluer l'efficacité des différentes molécules antileishmaniennes, et de préciser la durée de traitement.

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 pas assez sensibles. Ce qui fait que 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 limite de détection, aussi faible soit elle, un tel résultat ne permet jamais de conclure à l'absence totale de parasites dans le prélèvement analysé.

Observations :

Après avoir effectués des Prélèvements de sang (20) dans des tubes citratés, dans les régions de Chéraga et de Dely Ibrahim, les tubes sont centrifugés, les sérums sont recueillis pour la sérologie, et la couche leucocytaire pour la PCR.

- Du point de vue clinique les chiens ne présentés aucun symptômes
- L'immunofluorescence indirecte négative
- L'ELISA négative
- PCR positive (Figure ?, ?, ?, ?)

Conclusion

Toutes les techniques de diagnostics qu'elles soient sérologiques, parasitologiques, biochimiques ou moléculaires se complètent que ce soit dans le diagnostic ou dans l'identification des différentes souches.

La sérologie, insuffisante pour un diagnostic de certitude, a le mérite en cas de positivité d'encourager et de justifier la poursuite d'investigations plus invasives.

La recherche microscopique garde tout son intérêt pour une mise en évidence rapide du parasite, lorsque le chien est fortement symptomatique.

La culture, plus sensible mais beaucoup plus longue, ouvre la voie à l'identification précise des différentes souches existantes.

La PCR quant à elle, débouche sur un gain de sensibilité, de spécificité, de rapidité et de notion de portage asymptomatique qu'elle induit, ce qui risque d'entraîner un bouleversement très important sur la compréhension des rouages de l'épidémiologie.

REFERENCES

1. ABONNEC E., 1972. les phlebotomes de région éthiopienne : diptera, psychodidae. Memoire ORSTOM, n° 55, 289 pages.
2. ADINI I., JACOBSON M., KASAP Y., JAFFEL, 1998. Leishmania kinetoplast DNA. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92: 35-37.
3. ALDER S., et THEODOR O., 1932 : investigation on mediterranéan Kala-azar. VI Canine visceral leishmaniasis. Proceeding of the royal society, 110 : 420-421.
4. ALEXANDER J., SATOSKAR, RUSSELL D.G., 1999. leishmania species: models of intracellular parasitism. Journal of cell science, 112: 2993-3002.
5. Anonymus, 2003. la leishmaniose canine dans le nouveau monde. www.caducée.com.
6. CABASSU J.P., GERVAIS P., SEGURET N., and BROUSSET-ROUVIERE B., 1988. manifestations clinique de la leishmaniose canine in : anonymus pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie.
7. CHANG K.P., HENDUCKS L.D., 1985. Laboratory cultivation and maintenance of leishmania. Elsevier Amsterdam. 211-243.
8. DEDET J.P., 2001. Leishmanies, leishmanioses, Biologie clinique et thérapeutique. Encycl. Med. Chir., maladies infectieuses. P : 1-9.
9. DEDET J.P., 2003. la leishmaniose : données actuelles en France, Le Point Vétérinaire N° 236 : 46-48.
10. DERERE J., 1993. la place du chien dans les complexes pathogènes leishmaniens dans les pays du porture méditerranéen et du moyen orient. Thèse : 179.
11. DEREURE J., 1998. leishmaniose canine a leishmania infantum et ineret du texte au latex.
12. DUARTE, 1986. Canine interstitiel pneumonitis in new endemic area of visceral leishmania in western Brazil, 80: 992-993.
13. EUZEBY J., 2003. les dermatoses parasitaires d'origine zoonosique. Ed. Med. Internationale 204 : 139-169.
14. FERRER L., 2002. la leishmaniose canine. Actualité de la leishmaniose canine. Ed. spéciale 19 : 4 -5.
15. GUETTA D. 2001. Diagnostic et suivi de la leishmaniose canine. Action vétérinaire. N° 1570. P : 23-27.

16. HARRAT Z., 2002. technique de bases d'entomologie médicale les phlébotomes, Institut Pasteur d'Algérie, 44 pages.
17. HARRAT Z., BELKAID M., 2003. les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. Bull soc Pathol. Exot., 96, 3 : 214-216.
18. KILLICK-KENDRICK R., 2002. transmission du vecteur au chien. Actualité de la leishmaniose canine. Ed. spéciale 19 : 2-3.
19. Mc CONNEL E.E., 1970. visceral leishmaniasis with ocular involvement in dog, 156 : 197-203.
20. Mc PHERSON M.J., QUIRQ P., TAYLOR D.J., 2000. PCR a practical approach. Oxford University.
21. MEREDITH S.E.O., KROON N.C.M., SANDROP E., SEAMAN J., GORIS M.G.A., VANINGEN C.W., OSKAM L., 1995. Leish-kit a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for new diagnostic of visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 33: 1742-1745.
22. PIERRE-CHARLES LEFEVRE, JEAN BLANCOU, RENÉ CHERNETTE, 2003. les principales maladies parasitaires et virales chez les bovins, Tome 1 : 217-218-219.
23. PINTO, 2001. phlebotomie sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. Medical and veterinary entomology, 15: 132-139.
24. RANVIER C., 2002. l'actualité de la leishmaniose canine, edition spéciale leishmaniose.
25. READ L.K., FISH W.R., MUSHIANA A.M., STUART K., 1993. Maxiceule DNA and edited mRNA sequenced f closely related trypanosoma sp. Nucleic. Acids. Res. 21: 40-73-78.
26. RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLMG F., BASTIEN P., PERIERES J., 1990. Taxonomy of leishmania use of isoenzyme. Suggestion for a new classification. Annals Parasitol. Hum. Comp., 65: 111-125.
27. RIPERT C., 1996. épidémiologie des maladies parasitaires, technique et documentation, 365.
28. ROLLAND L., ZILBERFARB V., FURTADO A., GENTILINI M., 1994. Identification of a 94-kilodalton antigen on leishmania promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. Parasitol. Immunol. 16: 599-608.
29. ROUDGERS M.G., RAPPERS S.J., WIRTH D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as tool in the detection and diagnosis of leishmania. Exp. Parasitol. 71:267-75.

30. SACKS D., KAMHAWI, 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual reviews in Microbiology*, 55: 453-483.
31. SCOTT J.M., SHREFFLER W.G., GHALIB H.W., ELASAD A., SIDDIG M., BADARO R., REED S.G., 1991. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 272-277.
32. SELLAMI M., 2003. etude du vecteur de la leishmaniose –mémoire de fin d'études, ENV –Alger.
33. SIMPSON L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa genomic organization. *Ann. Rev. Microbial.* 41: 363-82.
34. THOMAZ-SOCCOL V., LANOTTE G., RIOUX J.A., PRATLONG F., MARTINI-DUMAS A., 1993. Phylogenies taxonomy of new world leishmania. *Annals Parasitol. Hum. Comp.*, 68: 104-106.

Résumé :

La leishmaniose canine est une parasitose systémique grave dont l'issue est souvent fatal.

Le chien en est le principal facteur de propagation faisant de cette maladie un vrai problème de santé publique.

Grâce à de nouvelles données biologiques en particulier la PCR, les techniques diagnostiques et le suivi de cette parasitose, sont désormais facilement réalisables en routine par le vétérinaire.

Abstract:

Canine leishmaniasis is a parasitic disease with absolute death of animal. The dog in the main factor in the propagation of this zoonosis, wich cause the very acute health problem in the world.

With a new biological data, and new methods of molecular biology, the technics of diagnosis and survey were now easely realised by veterinary.

ملخص:

تعتبر اللشمنياوز الكلبية، وباء استيطاني طفيلي متفاوت الخطورة و يترتب عليه نتائج وخيمة. يعتبر الكلب العامل الأساسي في الانتقال المرضي ما ينتج عنه خطر حقيقي على صحة الإنسان. بفضل المعطيات الجديدة المحققة في مجال البيولوجيا و خاصة طريقة تكثيف الحمض النووي، أصبحت التقنيات و عملية التشخيص و المتابعة لهذا المرض الطفيلي من الممكن و من السهل على البيطري أن يستفيد منها.