République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieure
Et a Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire D'Alger

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de magistère en Sciences Vétérinaires
Option : Immunologie Animale

La leishmaniose canine à Bouira et Sétif : étude séro-épidemiologique et mise en évidence de la relation vecteur phlébotome-réservoir canin.

Réalisé par : MEDKOUR Hacène.

Soutenu publiquement le 04 -07- 2017 devant le jury composé de :

-Présidente	**Pr. Temim Soraya, ENSV.**
-Examinateur	**Dr. Lamara Ali, MCA, ENSV.**
-Examinateur	**Dr. Bitam Idir, MCA, ESSAIA.**
-Promotrice	**Pr. Ben-Mahdi Meriem-Hind, ESSAIA-ENSV.**

Année universitaire 2016/2017

DEDICACES

Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce du quel j'ai pu mener à son terme ce travail que je dédie

A ma famille

A mes amis

A mes collègues

À tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près…….

UN GRAND MERCI !!!

REMERCIEMENTS

A Madame Ben-Mahdi Meriem-Hind

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger et directrice de l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires d'Alger, qui m'a permis de réaliser ce travail, pour son encouragement, sa disponibilité ainsi que pour les efforts qu'elle a consenti pour la correction de mon mémoire. Veuillez trouver ici le témoignage de mon affection et de mon estime.

A Madame Temim Soraya

Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury, qu'il trouve ici l'expression de ma parfaite reconnaissance et mes vifs remerciements.

A Monsieur Lamara Ali

Maître de Conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, pour avoir bien voulu examiner mon travail. Sincères remerciements.

A Monsieur Bitam Idir

Maître de Conférences A à l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires d'Alger pour son encouragement, sa disponibilité et sa précieuse aide et qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury, et de juger mon travail. Tout mon respect et Sincères remerciements.

A Monsieur Lafri Ismail

Maître de Conférences B à l'institut des sciences vétérinaires de Blida pour son aide précieuse, pour sa disponibilité, d'avoir toujours répondu à mes questions infinies. Je lui suis infiniment reconnaissant.

A Monsieur Azzaz Mohamed

Vétérinaire praticien à Bouira pour son encouragement, sa disponibilité et sa précieuse aide dans la partie prélèvements. Hommages respectueux.

A Monsieur Laidoudi Younes

Etudiant en magistère à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour son encouragement et tout le temps dépensé dans la réalisation de ce travail. Merci beaucoup frère.

A l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE) [CNRS UMR 7278 IRD 198 INSERM U1095 Aix-Marseille Université] *qui a contribué à la réalisation de cette étude en me réalisant des analyses au sein de l'un de ses laboratoires, Merci beaucoup.*

A tous les vétérinaires *qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.*

RESUME

La leishmaniose est une maladie parasitaire largement répandue dans le monde. En l'absence de prophylaxie et de traitement adéquats le taux de létalité est souvent élevé. Ce dernier s'observe surtout dans les pays pauvres où la maitrise de la lutte anti vectorielle est précaire souvent couplée à un diagnostic tardif ou inexistant.

Les objectifs de l'étude séro-épidémio-clinique de la leishmaniose canine menée à Bouira et Sétif (Algérie) étaient d'estimer la séroprévalence et de décrire les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de la maladie. Pour ce faire, une étude sérologique transversale a été menée. Deux techniques sérologiques ont été utilisées, l'IFI et la RIM™ (kits Witness® *Leishmania*). Enfin une analyse de la composition du peuplement phlébotomien a été réalisée.

Les résultats ont montré une séroprévalence totale de 69.17 et 62.5 % par IFI et test rapide, respectivement. L'âge, la race et le sexe n'ont pas influencé le développement de l'infection, l'activité du chien non plus. Cependant, La séropositivité varie en fonction de l'origine géographique du chien, la présence des signes cliniques mais aussi en fonction de la présence d'autres maladies. L'étude clinique a fait ressortir des signes caractéristiques de la leishmaniose, les plus fréquemment observées étaient la dépilation, l'amaigrissement, l'onychogryphose et l'abattement. Le portage asymptomatique a été évalué à près de 32.5% des cas.

L'examen clinique s'est montré faible pour diagnostiquer la leishmaniose (Se=67%, Sp=16%) et son accord avec l'IFI n'est que moyen (K=0.49). Le test Witness® *Leishmania* semble avoir une très bonne spécificité (100%), une sensibilité de 90% et un excellent accord avec l'IFI (K=0.84).

L'inventaire de la faune phlébotomienne a permis d'identifier, sur 2004 spécimens capturés à Bougaa (Sétif) par des pièges lumineux, quatre espèces de phlébotomes. Une prédominance nette de *P. perniciosus* (90.37%) vecteur de la leishmaniose viscérale, suivi par *P. perfiliewi* (6.74%) puis *P. longicuspis* (1.95%) et en fin *P. ariasi* (0.95%) avec une sex-ratio de 1.67 en faveur des mâles. Toutes ces espèces peuvent être incriminées dans la transmission de la leishmaniose aux animaux et aux humains, par conséquent, un programme national de lutte contre la leishmaniose devrait être mis en place immédiatement dans ce foyer.

Mots clés : *Leishmaniose, chiens, séroprévalence, IFI, Witness® Leishmania, phlébotomes, Bouira, Sétif.*

ABSTARCT

Leishmaniasis is a widespread parasitic disease in the world. In the absence of adequate prophylaxis and treatment, the case fatality rate is often high. This last is mostly observed in poor countries where the control of the anti-vectorial struggle is precarious often coupled with late or absence of diagnosis.

the objectives of the canine leishmaniasis seroepidemio-clinical study carried out in Bouira and Sétif (Algeria), were to estimate the seroprevalence and to describe the epidemiological and clinical characteristics of the disease. To do this, a cross-sectional serological study was conducted. Two serological techniques were used, the IFI and the RIM ™ (Witness® *Leishmania* kits). Finally, an analysis of the Phlebotomine sand flies population composition was carried out.

The results showed a total seroprevalence of 69.17 and 62.5% by IFI and rapid test, respectively. Age, breed and sex would didn't influence the infection development, nor did the dog's activity. However, seropositivity varied according to the dog's geographical origin, the clinical signs presence but also to the presence of other diseases. The clinical study revealed characteristic signs of leishmaniasis, the most frequently observed being depilation, weight loss, onychogryphosis and abatement. Asymptomatic carriage was estimated nearly at 32.5% of the cases.

Clinical examination was weak to diagnose leishmaniasis (Se=67%, Sp=16%) and its accord with the IFI is only average (K = 0.49). The Witness® *Leishmania* test seems to have a very hight specificity (100%), a sensitivity of 90% and an excellent accord with the IFI (K = 0.84).

The Inventory of phlebotomine fauna makes it possible to identify, from 2004 specimens captured in Bougaa (Sétif) by light traps, four species of sand flies. A clear predominance of *P. perniciosus* (90.37%) vector of visceral leishmaniasis, followed by *P. perfiliewi* (6.74%), then *P. longicuspis* (1.95%) and late *P. ariasi* (0.95%) with a sex-ratio value 1.67 in favor of males. All these species can be implicated in the transmission of leishmaniasis to animals or humans, therefore a national control program against leishmaniasis should be implemented immediately in this focus.

Key words : *Leishmaniasis, dogs, seroprevalence, IFI, Witness® Leishmania, sandflies, Bouira, Setif.*

ملخص

داء الليشمانيوز هو مرض طفيلي واسع الإنتشار في العالم. في غياب الوقاية والعلاج المناسب معدل الوفيات يرتفع, يحدث هذا بشكل رئيسي في البلدان الفقيرة التي لا تستطيع مكافحة ناقلات المرض, إضافة في كثير من الأحيان إلى تأخر أو غياب التشخيص.

الأهداف من الدراسة الوبائية المصلية و السريرية لداء ليشمانيوز الكلاب التي أجريت في البويرة وسطيف (الجزائر)، تقدير مدى الانتشار ووصف الخصائص الوبائية والسريرية للمرض. لهذا، أجريت دراسة عبر مصلي حيث استخدمت اثنين من التقنيات المصلية IFI و (Kits Witness® *Leishmania*) RIM ™ . وفي الأخير، تم تحليل تكوين مجموعات ذبابة الرمل (Phlébotomes).

أظهرت النتائج وجود معدل انتشار 69.17٪ و 62.5 بواسطة IFIو التحليل السريع على التوالي. السن ,العرق والجنس لم يأثرو على تطور العدوى وانتشار المرض ، و لا نشاط الكلب سواء ولكن النسبة تختلف وفقا للمنشأ الجغرافي للكلب، وجود علامات سريرية و وجود أمراض أخرى. كشفت الدراسة السريرية علامات مميزة لداء الليشمانيوز، في معظم الأحيان لوحظ سقوط الشعر، فقدان الوزن، انعقاف الأظفار والكآبة. وقد قدرت نسبة حاملي الطفيلي من دون أعراض بحوالي 32.5٪ من الحالات.

وقد أظهر الفحص السريري مستوى ضعيف في تشخيص داء الليشمانيوز إذ SP=16٪, Se=67٪ وتوافق متوسط فقط مع IFI (K=0.49) . يبدو أن اختبار Witness® *Leishmania* يملك خصوصية جيدة جدا (100٪)، حساسية 90٪ واتفاقية ممتازة مع IFI (K=0.84) .

أثبتت دراسة 2004 عيرة التي تم جمعها في بوقاعة (سطيف) بواسطة الفخاخ الضوئية ،وجود أربعة أنواع من ذبابة الرمل مع انتشار واسع للنو *P. perniciosus* (90.37%) ناقل داء الليشمانيوز الحشوي. يليه *P. perfiliewi* (6.74%), ثم *P. longicuspis* (1.95%) و *P. ariasi* (0.95%) مع نسبة الجنس 1.67 لصالح الذكور. كل هذه الأنواع قد تكون متورطة في نقل الداء للحيوانات والبشر، وبالتالي يجب تطبيق برنامج وطني ضد داء الليشمانيوز فورا في هذه المنطقة.

الكلمات الأساسية : *داء الليشمانيوز,الكلاب ,الانتشار المصلي, IFI, Witness® Leishmania , ذبابة الرمل، البويرة، سطيف.*

LISTE DES ABREVIATIONS

- AMM : Autorisation mise sur le marché.
- ARNg : Acide Ribonucléique guide.
- ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique.
- CIE : Contre-immunoélectrophorèse.
- DAT : Teste d'Agglutination Directe.
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay.
- GN : Gendarmerie Nationale.
- HLA : Human Leucocyte Antigen.
- IFI : Immunofluorescence Indirecte.
- IFN-γ : Interféron gamma.
- Ig : Immunoglobuline.
- IL : Interleukine.
- IM : Intramusculaire.
- INSP : Institut National de Sante Publique.
- IPA : Institut Pasteur d'Algérie.
- JC : Jésus Christ.
- Kb : Kilo base.
- LC : leishmaniose canine.
- LDPKA : Leishmaniose Diffuse Post Kala Azar.
- MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight.
- MON : Zymodème.
- NK : Natural Killer.
- NNN : NICOLLE, MC NEAL, NOVY.
- O. I. E. : Office International des Épizooties.
- O. M. S. : Organisation Mondiale de la Santé.
- ONS : Office National des Statistiques.
- P. : Phlébotomus.
- pb : pair de bases.
- PBS : Phosphate Buffer Solution
- PCR-RFLP : Polymérase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism.
- pH : Potentiel Hydrogène.
- RIM™ : Rapid Immuno Migration.
- S.P.M. : système des phagocytes mononuclées.
- SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquis.
- Th1 et Th2 : Lymphocyte T helper 1 et 2.
- UV : Ultraviolet.
- VIH : Virus d'Immunodéficience Humain.
- µl : Microlitre.

LISTE DES FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Taxonomie de *Leishmania* 7
Figure 2 : Promastigote de *Leishmania* 9
Figure 3 : Forme amastigote de *Leishmania* à l'intérieur des macrophages 10
Figure 4 : Représentation schématique du parasite *Leishmania* 11
Figure 5 : Cycle évolutif de *Leishmania infantum* 13
Figure 6 : Cycle des leishmanioses cutanée et viscérale 15
Figure 7 : Morphologie générale d'un phlébotome adulte 17
Figure 8 : *Phlebotomus papatasi* (à gauche), et *Phlebotomus perniciosus* (à droite) 17
Figure 9 : Cycle évolutif du *Phlebotomus sp*. 21
Figure 10 : Le cycle évolutif de *Leishmania spp.* Avec les différentes formes cliniques chez l'homme 26
Figure 11 : Répartition de la leishmaniose canine en Europe 28
Figure 12 : Rôle des neutrophiles au niveau du site de transmission des *Leishmania* 39
Figure 13 : Mécanismes immunitaires simplifiés lors d'infestation par des leishmanies 43
Figure 14 : Macrophage activé 44
Figure 15 : Réactions enzymatiques au sein du macrophage et impact des cytokines Th1 et Th2 sur la survie ou la lyse des leishmanies 44
Figure 16 : Mécanismes d'échappement des leishmanies aux défenses de leur hôte 47
Figure 17 : Evolution possible suite à l'infection par *L. infantum* 49
Figure 18 : Alopécie généralisée et cachexie très marquée 51
Figure 19 : Emaciation des muscles faciaux 51
Figure 20 : Onychogryphose, œdème et infiltration interdigitée 51
Figure 21 : Squames au niveau de la pointe du pavillon auriculaire 52
Figure 22 : Technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) 60

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure 23 : situation et relief de la wilaya de Bouira 73
Figure 24: situation et relief de la wilaya de Sétif 74
Figure 25 : Communes échantillonnées dans la wilaya de Bouira 77
Figure 26 : Communes échantillonnées dans la wilaya de Sétif 77
Figure 27 : Mode opératoire technique du test Witness® Leishmania 83
Figure 28: Test Witness® Leishmania réalisé sur sang total, résultat positif 83
Figure 29 : Résultat de l'IFI ; **Positif** (+++) 85
Figure 30: Variations de la séroprévalence vis-à-vis de *Leishmania infantum* en fonction des titres en anticorps 88
Figure 31 : Prévalence en fonction de l'âge 92
Figure 32 : Prévalence en fonction du sexe 92
Figure 33 : Prévalence en fonction de race 92
Figure 34 : Prévalence en fonction de l'activité 92
Figure 35 : Prévalence pour chaque Wilaya 92
Figure 36 : Prévalence pour chaque commune 92
Figure 37 : Abattement « Aspect d'un vieux chien» 93
Figure 38 : Abattement et atteinte de l'état général 93
Figure 39 : Dépilation du pourtour de l'œil «signe de lunettes » 93
Figure 40 : Ulcération 93
Figure 41 : Dépilation 94
Figure 42 : Amaigrissement 94
Figure 43 : Squamosis 94
Figure 44 : dépilation, squamosis 94
Figure 45 : Onychogryphose 94
Figure 46 : Ulcération 95
Figure 47 : Ulcération au niveau de la tète 95
Figure 48 : Escarre articulaire 95
Figure 49 : Epistaxis 95
Figure 50 : Fréquence d'apparition des signes cliniques chez les chiens positifs et les chiens négatifs à l'IFI 96
Figure 51 : Fréquence des signes cliniques chez les chiens séropositifs 97

Figure 52 : Résultat de la sérologie pour les deux pathogènes 98
Figure 53 : Installation d'un piège CDC 120
Figure 54 : Eclaircissement des phlébotomes dans la solution de potasse 10% 121
Figure 55 : Incubation des phlébotomes dans la solution de Marc André 122
Figure 56: Dépôt des phlébotomes sur la lame et ajout de solution de gomme au chloral 122
Figure 57: Identification des phlébotomes sous microscope optique 123
Figure 58: Spematheque *P. perniciosus*, femelle 124
Figure 59 : Génitalia male*; P.perniciosus* 124
Figure 60 : Spermatheques *P. longicuspis*. femelle 124
Figure 61: Valves péniennes *P. perfliewi ;* mâle 125
Figure 62 : Valves péniennes *P. ariasi ;* mâle 125
Figure 63 : Proportion de chaque espèce de phlébotomes capturés 126
Figure 64 : Répartition des espèces de phlébotomes capturés selon le sexe 127

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1: Principaux complexes du genre *Leishmania* repartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique principale 6

Tableau 2 : Distribution géographique des espèces de *Leishmanies* infectant les chiens et leurs vecteurs 8

Tableau 3 : Liste des espèces de phlébotomes recensés en Algérie 20

Tableau 4 : Prévalences de la leishmaniose canine dans les pays européens méditerranéens 28

Tableau 5 : Prévalences de la leishmaniose canine en Tunisie et au Maroc 29

Tableau 6 : Prévalences de la leishmaniose canine en Algérie 31

Tableau 7 : Symptômes généraux, viscéraux et cutanéo-muqueux de la leishmaniose canine 50

Tableau 8: Dermatoses intervenant dans le diagnostic différentiel de la leishmaniose canine 65

Tableau 9 : Traitement de consensus de la leishmaniose canine 67

Tableau 10 : Produits insecticides commercialisés pour le chien avec une indication antiphlébotomes 69

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 11 : Taux théoriques de chiens à prélevés et nombre de chiens prélevés pour chaque commune rapportés au nombre d'habitant 79

Tableau 12 : Résultat de l'étude sérologique (IFI, Test Witness®) 86

Tableau 13: Séroprévalence vis-à-vis de *Leishmania* en fonction des titres en anticorps 87

Tableau 14 : Analyse des facteurs de risque influant sur la séroprévalence vis-à-vis *Leishmania infantum* dans la population canine étudiée 89

Tableau 15 : Fréquences des signes cliniques observés chez les chiens séropositifs 96

Tableau 16 : Résultat de la sérologie pour les deux pathogènes 97

Tableau 17 : Prévalences apparentes et réelles de la séroprévalence canine de *L. infantum* dans les wilayas de Bouira et de Sétif 98

Tableau 18 : Valeurs prédictives positive et négative 99

Tableau 19 : Tableau de contingence 99

Tableau 20 : Interprétation de la valeur Kappa 100

Tableau 21 : Résultats de l'étude de contingence comparant les résultats de l'examen clinique à ceux de l'IFI 101

Tableau 22 : Résultats de l'étude de contingence comparant les résultats du test Witness® Leishmania à ceux de l'IFI Tableau de contingence IFI 102

Tableau 23 : Performances des méthodes de diagnostic utilisées 103

Tableau 24 : Inventaire des phlébotomes capturés 123

Tableau 25: Liste systématiques des phlébotomes (*Psychodidae*) recensés dans la région de Bougaa 123

Tableau 26: Proportion de chaque espèce de phlébotomes capturés dans la région de Bougaa 125

Tableau 27 : Inventaire des phlébotomes capturés par espèce et par sexe 126

SOMMAIRE

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : RAPPELS SUR LES LEISHMANIOSES 3

1.1. Introduction 3

1.2. Historique 3

1.3. Etiologie 5

1.3.1. Le parasite 5

1.3.1.1. Taxonomie 5

1.3.1.2. Morphologie 9

1.3.1.3. Etude moléculaire de *Leishmania infantum* 11

1.3.1.4. Biologie 12

1.3.2. Le vecteur 16

1.3.2.1. Caractères généraux 16

1.3.2.2. Morphologie 16

1.3.2.3. Systématique 17

1.3.2.4. Bio-écologie des phlébotomes 20

1.3.3. Les réservoirs de parasites 23

1.3.3.1. Réservoirs zoonotiques 23

1.3.3.2. Réservoirs anthropiques 25

CHAPITRE 2 : EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES 27
2.1. Epidémiologie des leishmanioses canine et humain 27
2.1.1. Epidémiologie descriptive 27
2.1.1.1. Répartition Mondiale des leishmanioses 27
2.1.1.2. Prévalence mondiale de la leishmaniose canine 28
2.1.1.3. Incidence mondiale des leishmanioses humaines 30
2.1.1.4. Répartition géographique en Algérie 30
2.1.1.5. Prévalence de la leishmaniose canine en Algérie 31
2.1.1.6 Incidence des leishmanioses humaines en Algérie 31
2.1.2. Epidémiologie analytique 32
2.1.2.1. Espèces responsables des leishmanioses 32
2.1.2.2. Modes de transmission 32
2.1.2.3. Facteurs de risque 33
2.2. Changement climatique et évolution de la leishmaniose 35

CHAPITRE 3 : IMMUNOLOGIE ET PATHOGENESE 37
3.1. Réponse immunitaire au cours des leishmanioses 37
3.1.1. Les réactions immunitaires lors des leishmanioses : modèle général 37
3.1.1.1. Réponse cutanée initiale et dissémination viscérale 37
3.1.1.2. Immunité innée 40
3.1.1.3. Immunité spécifique 41
3.1.1.3.1. Mécanismes immunitaires spécifiques mis en jeu lors d'infestation par des leishmanies 41
3.1.1.3.2. Rôle central du macrophage dans le contrôle de l'infection par les leishmanies 43
3.1.2.3. Mécanismes d'échappement des défenses de l'hôte et persistance parasitaire. 45
3.2. Pathogénèse 48

CHAPITRE 4 : ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIC 50
4.1. Manifestations cliniques 50
4.1.1. Manifestations cutanéo-muqueuses 51
4.1.2. Manifestations oculaires 52
4.1.3. Manifestations viscérales (autres que rénales) 52

4.1.4. Manifestations rénales 53
4.2. Diagnostic 54
4.2.1. Diagnostic épidémio-clinique 54
4.2.2. Examens complémentaires 54
4.2.3. Diagnostic de laboratoire 55
4.2.3.1. Diagnostic direct 55
4.2.3.1.1. Examen microscopique 55
4.2.3.1.2. Histopathologie 56
4.2.3.1.3. Culture de leishmanies 56
4.2.3.1.4. Polymérase Chaine Réaction (PCR) 57
4.2.3.1.5. Inoculation à l'animal 58
4.2.3.1.6. Xénodiagnostic 58
4.2.3.2. Méthodes indirectes 58
4.2.3.2.1. Sérologie 58
4.2.3.2.2. Evaluation de la réponse immunitaire cellulaire 63
4.2.4. Diagnostic différentiel 64
4.3 Pronostic 65

CHAPITRE 5 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE 66
5.1. Traitement 66
5.1.1. Traitement symptomatique 66
5.1.2. Traitement spécifique 67
5.1.3. Suivi thérapeutique 68
5.2. Leishmaniose zoonose – rôle du chien – prévention 68
5.2.1. Précautions 68
5.3. Prophylaxie chez le chien 69
5.3.1. Protection vis-à-vis des piqûres de phlébotomes 69
5.3.2. Vaccination 70

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : ETUDE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE CANINE 71

1. Introduction 71
2. Matériel & Méthodes 72
2.1. Zone d'étude 72
2.2. Période d'étude 74
2.3. Définition du « cas » 75
2.4. Unité et Population d'étude 75
2.5. Echantillonnage 75
2.6. Mesure 79
2.6.1. Performances du test utilisé 79
2.6.1.1. Test rapide de diagnostic Witness® Leishmania 79
2.6.1.2. Immunofluorescence indirecte 80
2.7. Identification de l'animal et examen clinique 80
2.8. Prélèvement 81
2.9. Réalisation des tests de diagnostic 82
2.9.1. Les tests d'immunomigration rapide 82
2.9.2. L'Immunofluorescence indirecte 83
2.10. Analyses statistiques 85
3. Résultats 86
3.1. Séroprévalences 86
3.1.1. Séroprévalence globale 86
3.1.2. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps 87
3.2. Epidémiologie 88
3.3. Symptomatologie 92
3.4. Association avec d'autres pathologies 97
3.5. Séroprévalences et valeurs prédictives 98
3.6. Performances des examens de diagnostic utilisés 99
4. Discussion 104
4.1. Méthode d'échantillonnage 104
4.2. Examen clinique 105
4.3. Sérologie 108

4.3.1. Séroprévalence globale 108
4.3.2. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps 109
4.3.3. Prévalences et valeurs prédictives 111
4.3.4. Performances des méthodes de diagnostic utilisées 112
4.4. Séroprévalence selon l'âge, le sexe, la race et l'activité du chien 113
4.5. Séroprévalence selon l'origine géographique 115
4.6. Association avec d'autres pathologies 116
5. Conclusion 117

CHAPITRE 2 : ETUDE DU VECTEUR (PHLEBOTOMES) 119
1. Introduction 119
2. Matériel et méthodes 119
2.1. Station de capture des phlébotomes 119
2.2. Capture des phlébotomes par pièges lumineux 119
2.3. Conservation des phlébotomes 121
2.4. Manipulation, montage et identification des phlébotomes 121
3. Résultats 123
3.1. Inventaire systématique des phlébotomes recensés dans la région de Bougaa 123
3.2. Abondances relatives pour chaque espèce 125
3.3. Fréquence d'abondance des espèces selon le sexe 126
4. Discussion 127
4.1. Etude analytique 127
4.2. Sex-ratios 130
5. Conclusion 131
CONCLUSION GENERALE
RECOMMANDATIONS & PERSPECTIVES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

La leishmaniose canine est une maladie parasitaire due à la multiplication dans les cellules phagocytaires mononuclées d'un protozoaire flagellé, *Leishmania infantum* et transmise à leur hôte par un vecteur, le phlébotome. S'agissant d'une zoonose, l'homme peut être lui aussi parasité.

Avant tout problème de santé vétérinaire, elle constitue de par son caractère zoonotique également un problème de santé publique. Endémique en Algérie et dans le pourtour méditerranéen, la leishmaniose sévit aussi dans 88 pays du monde et l'on considère qu'elle menace 350 millions de personnes. D'après les estimations, 14 millions de personnes sont atteintes et quelques 2 millions de nouveaux cas sont recensés chaque année (OMS, 2007).

Si chez le chien, les manifestations cliniques sont générales et intéressent tout l'organisme, chez l'homme la maladie se manifeste par un tableau clinique généralement pur avec la plupart du temps une atteinte viscérale. Il s'agit d'une maladie grave voire mortelle en l'absence de traitement chez les deux espèces.

La leishmaniose canine est un sujet d'importance croissante et préoccupante car jusqu'ici circonscrite aux pays chauds, elle est endémique aujourd'hui au nord de l'Algérie. Cette dynamique serait imputable à de nombreux facteurs et notamment au changement climatique. En effet, en 1984, Belazzoug rapportait 37.5% de chiens séropositifs en Kabylie (Belazzoug, 1984). En 2006, Harrat enregistrait 42.8% d'animaux positifs dans la région de Dra El Mizan toujours en Kabylie (Harrat, 2006). Quant à Adel et *al* ; lors d'une étude menée au nord algérien en 2015, ils rapportèrent les prévalences de : 41%, 43%, 54%,45%, 62% et 44% dans les wilayas : Tlemcen, Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, Béjaia et Jijel, respectivement (Adel et *al*, 2015). Néanmoins, ces études ne concernent que quelques régions du pays et peu de données concernant la prévalence de la leishmaniose canine et de ses caractéristiques séro-épidémio-cliniques dans les wilayas de Bouira et Sétif sont disponibles à ce jour.

La gravité de cette maladie est amplifiée par la difficulté du diagnostic, liée à l'existence de porteurs asymptomatiques. L'examen clinique du vétérinaire est de loin moins spécifique du fait de son caractère protéiforme associant des troubles généraux à des symptômes extrêmement variés (Raquin, 2010). Les tests rapides d'immunomigration très utilisés au cabinet vétérinaire, faciles à mettre en œuvre, même chez le propriétaire de chien ; semblent donner des résultats satisfaisants (Rodríguez-Cortés et *al*, 2013). Néanmoins, leurs performances comparées à celle de la technique de référence en l'occurrence : l'immunofluorescence indirecte restent à déterminer.

Le complexe pathogène leishmanien (parasite-vecteur-réservoir) évolue dans une aire géographique définie par un ensemble de paramètres bioclimatiques. La clé voute du cycle parasitaire est le phlébotome, il constitue l'élément focalisateur (Harrat, 2006). Chaque espèce de phlébotome a son aire de distribution qui est loin de coïncider avec celles d'autres espèces ; pourtant dans certaines régions, il arrive souvent que ces aires se superposent (Dolmatova, 1971).

Par conséquent, la présente étude a eu pour objectifs : l'évaluation de la prévalence de la leishmaniose canine à Bouira et Sétif, d'en préciser certaines caractéristiques séro-épidémiologiques et cliniques et de déterminer les performances des méthodes du diagnostic utilisées sur le terrain.

Le présent manuscrit a été articulé en deux parties :

Une première partie bibliographique, consacrée à une mise au point synthétique sur la leishmaniose en général et la leishmaniose canine en particulier.

Une seconde partie expérimentale, qui a porté sur l'étude séro-épidémio-clinique de la leishnmaniose canine dans les régions de Bouira et Sétif et sur l'identification du vecteur incriminé. Le matériel utilisé et les méthodes adoptées lors de l'étude expérimentale y sont détaillés et les résultats obtenus présentés et discutés.

CHAPITRE 1 : RAPPELS SUR LES LEISHMANIOSES

1.1. Introduction

Les leishmanioses sont des protozooses infectieuses, inoculables, exceptionnellement contagieuses dues au développement et à la multiplication, dans les cellules du système des phagocytes mononuclés, d'un flagellé du genre *Leishmania* (Bourdoiseau, 2000) transmis par la piqûre infestante d'un insecte diptère hématophage (Marty et Rosenthal, 2002; Dedet, 2009) appartenant au genre *Phlébotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde. Ces parasitoses affectent l'Homme et l'animal, en particulier le chien (Osman et *al*, 2000).

Chez l'homme, on distingue une leishmaniose viscérale, une leishmaniose cutanée ainsi qu'une forme cutanéo-viscérale. La maladie humaine est également appelée « Kala-azar méditerranéen » ou « Kala-azar infantile », par analogie avec la leishmaniose viscérale indienne.

Chez le chien, la maladie est qualifiée de « générale » car elle associe la plupart du temps des lésions viscérales à des lésions cutanées (Euzéby, 1986; Bourdoiseau, 2002). C'est une maladie protéiforme chronique qui évolue sur plusieurs mois, associant des troubles généraux à des symptômes extrêmement variés. Le traitement est difficile, il engendre fréquemment des effets secondaires indésirables pour l'animal et souvent sujet à des rechutes d'où le pronostic réservé. Chez le chien non traité la mort est inéluctable. La gravité de la maladie est amplifiée par la difficulté du diagnostic, liée à l'existence de porteurs asymptomatiques, à une durée d'incubation parfois très longue ainsi qu'à une absence quasi présente de séroconversion (Raquin, 2010).

1.2. Historique

Les leishmanioses font partie des premières parasitoses à avoir été décrites, du moins dans leur forme cutanée. Une tablette d'argile, découverte dans le palais de Ninive, évoque une ulcération indolore de la face. Cette tablette est une transcription d'un récit akkadien au second ou au troisième millénaire avant Jésus Christ (Jarry, 1999).

La leishmaniose cutanée du vieux monde a une histoire documentée de longue date. Elle remonte probablement à 1500-2500 ans avant JC. Les premières descriptions du « bouton d'orient » ont été retrouvées sur des objets appartenant au roi Ashurbanipal au septième siècle avant JC. Au dixième siècle, blessure de « Balkh » était la description des médecins arabes en Afghanistan pour la leishmaniose, par la suite, ils ont trouvé une maladie semblable à Bagdad et Jéricho.

A travers l'histoire, différentes régions du monde dans lesquelles la maladie fut découverte ont donné leurs noms à celle-ci (Cox, 2002).

La leishmaniose cutanée et cutanéo-muqueuse du nouveau monde a été bien décrite par les missionnaires espagnoles du seizième siècle, ils décrivirent la manifestation de la maladie andine ou celle de la vallée en tant que blessures cutanées (Cox, 2002). La paléopathologie a mis en évidence et a confirmé la présence de lésions leishmaniennes mucocutanées antiques sur des crânes des populations autochtones anciennes (Costa et *al*, 2009).

James Homer Wright est considéré comme le premier observateur du parasite de leishmanies, cependant, d'autres auteurs avancent que c'est David Cunningham en 1885 et Peter Borovsky, un chirurgien russe qui auraient découvert le parasite. Borovsky avait même publié un article décrivant exactement le parasite en tant que protozoaire. Cependant, le travail de Borovsky écrit en russe n'a pas été mondialement reconnu (Cox, 2002).

La leishmaniose viscérale a été décrite beaucoup plus tard. Il n'y avait aucune documentation sur la maladie jusqu'en 1823, en dépit de la documentation claire sur d'autres maladies causant le même degré de sévérité, indiquant probablement qu'elle ne s'était pas manifestée avant cette date. Il a été noté qu'en 1824 une manifestation épidémique au Bengale d'une maladie causant la fièvre et la cachexie et ne répondant à la quinine (Cox, 2002). Cette maladie fut appelée « kala-azar ou fièvre noire » en raison du noircissement de la peau des patients indiens; la maladie fut également appelée « la fièvre de Dum Dum » en raison de son occurrence dans la région de Dum Dum, près de Calcutta.

William Boog Leishman et Charles Donovan ont été les premiers à découvrir l'agent causal du Kala Azar. Leishman a trouvé le parasite dans la rate d'un soldat qui était mort de la fièvre Dum Dum. Il a d'abord faussement classé le parasite comme étant un trypanosome en 1903. Dans le même temps, Donovan, a isolé le parasite de la rate d'un patient malade. Il s'était également rendu compte que c'était le même parasite isolé des malades atteints de bouton d'orient. En 1908, en Tunisie, Charles Nicolle retrouvera des leishmanies chez un enfant de kala azar méditerranéen et le désigna par *L. infantum*.

En 1908, Nicolle et Comte décèlent les mêmes protozoaires chez le chien à l'Institut Pasteur de Tunis et démontrent expérimentalement la transmission possible de l'homme au chien. Ils font de cette affection une maladie commune à l'homme et à d'autres mammifères ouvrant ainsi la voie aux recherches épidémiologiques (Dedet, 1999).

En Algérie, le premier cas de leishmaniose canine a été rapporté par les frères Edmond et Etienne Sergent en 1910 (Sergent et Sergent, 1910). Deux ans plus tard, ils rapportent la

présence de l'infection chez un chien et un chat vivant avec un enfant atteint de leishmaniose viscérale. Et le premier cas humain de leishmaniose viscérale fut découvert en 1911 par Lemaire (Lemaire et *al*, 1913).

La relation entre le vecteur (phlébotome) et les symptômes de la maladie a été décrite par l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) dirigée par les frères Sergent et leurs collaborateurs. Les preuves expérimentales de la transmission de la leishmaniose cutanée ont été apportées en 1921, lorsque les frères Sergent contaminèrent un sujet sain en le faisant piquer par des phlébotomes récoltés à Biskra. Presque parallèlement des observations faites en Palestine et en Syrie par Adler et Theodor (1941) confirmèrent celles de l'équipe de l'IPA (Dedet, 1999).

En 1946, le premier cas de Kala-azar infantile fut rapporté en Kabylie. (Sarrouy et *al,* 1946). A partir des années 1970, débute la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies. En 1990, Rioux et ses collaborateurs présentent une nouvelle classification des *Leishmania*, basée sur les caractères biochimiques et le profil isoenzymatique des souches des différents complexes (Harrat, 2006).

Papierok et *al,* Hugnet et *al* en 2002, ont démontré que l'administration d'antigènes d'excrétion-sécrétion de promastisgote induit une réaction immunitaire de type Th1 à l'encontre des leishmanies amastigotes intramacrophagiques (Brevet Institut de recherche pour le développement et laboratoire Bio Véto Test). Le groupe VIRBAC en 2011 commercialise en France ce même vaccin sous le nom de CaniLeish.

1.3. Etiologie

1.3.1. Le parasite

Les *leishmanies* sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinétoplastidés et à la famille des Trypanosomatidés.

1.3.1.1. Taxonomie

Depuis la description de la première espèce de *Leishmania* par Laveran et Mesnil en 1903, le nombre de taxons du genre *Leishmania* n'a cessé de croitre pour atteindre une trentaine dont environ 20 sont pathogènes pour l'homme (Dedet, 2009). L'identification des leishmanies a longtemps constitué un problème car leur morphologie et leur pouvoir pathogène ne permettaient pas de les classer. Initialement basée sur des critères écobiologiques puis immunologiques, la

classification des leishmanies utilise aujourd'hui des marqueurs d'ADN. Cependant, elle est encore arbitraire et discutée (Banuls et *al*, 2007).

La classification du genre *Leishmania* d'apres Levine et *al*; (1980) est la suivante :

- Règne *: Protista* Haeckel, 1866.
- Sous-Règne : *Protozoa* Goldfuss, 1817 Emend. Siebold, 1848.
- Embranchement : *Sarcomastigophora* Honigberg et Balamuth, 1963.
- Sous- Embranchement : *Mastigophora* Diesing, 1866.
- Classe : *Zoomastigophorea* Calkins, 1909.
- Ordre : *Kinetoplastida* Honigberg, 1963 Emend. Vickerman, 1976.
- Sous-Ordre : *Trypanosomatina* Kent, 1880.
- Famille : *Trypanosomatidae* Doflein, 1901 Emend. Grobben, 1905.
- Genre: *Leishmania* Ross, 1903.

Les espèces du genre *Leishmania* sont classées selon la portion intestinale de l'hôte intermédiaire (phlébotome) infestée par le parasite en deux sous-genres (Banuls et *al*, 2007) :

- Sous genre « *Leishmania* » avec *Leishmania infantum, L. donovani, L. tropica, L. major, L. mexicana* dont la réplication a lieu dans l'intestin moyen,
- Sous genre « *Viannia* » avec *Leishmania braziliensis* et *L. peruviana* qui se répliquent dans l'intestin distal.

Cependant, d'autres critères à savoir la distribution géographique et l'expression clinique principale ont été utilisés par Dedet pour donner une nouvelle classification avec deux sous-genres (Dedet, 2009). Le sous-genre : *Leishmania sensu stricto* présent à la fois dans l'ancien et le nouveau monde, et *Viannia*, sous-genre du nouveau monde. Au sein de ces sous-genres sont individualisés des complexes d'espèces de valeur taxonomique différente suivant le type de classification (Tableau 1).

Tableau 1: Principaux complexes du genre *Leishmania* repartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique principale

Sous-genre *Leishmania*			Sous-genre *Viannia*	
Ancien Monde	*L.donovani*	*L.tropica ; L.major* *L.aethiopica ;L.arabica*		
	L.infantum			
Nouveau Monde		*L.mexicana* *L.amazonensis* *L.venezuelansis*	*L.guyanensis* *L.panamensis* *L.shawi ; L.naiffi* *L.lainsoni ; L.peruviana*	*L.braziliensis*
Clinique	Leishmaniose viscérale	Leishmaniose cutanée		Leishmaniose cutanéomuqueuse

(Dedet, 2009)

Une classification récente des leishmanies est rappelée en figure 1.

Les méthodes de classification récentes basée sur les caractères intrinsèques des *Leishmania* font appel aussi bien à l'activité qu'aux structures du génome parasitaire (Rioux et *al*, 1990). Elles ont prouvé leur efficacité dans la classification des parasites. En effet, depuis les années 70, les leishmanies ont pu être identifiées avec assez de précision au moyen de l'analyse élécrophorétique des isoenzymes, formant ainsi une population homogène ou zymodème. L'identification isoenzymatique reste la méthode de référence même si des techniques plus résolutives tels que la PCR (Polymerase Chain Reaction), les RLFP (Restriction Fragmants Length Plymorphisms), la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ou les microsatellites permettent d'affiner la classification (Centre National de Référence des Leishmaniose, 2013). On définit par "zymodème" l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique. Plus de 200 zymodèmes sont à ce jour individualisés.

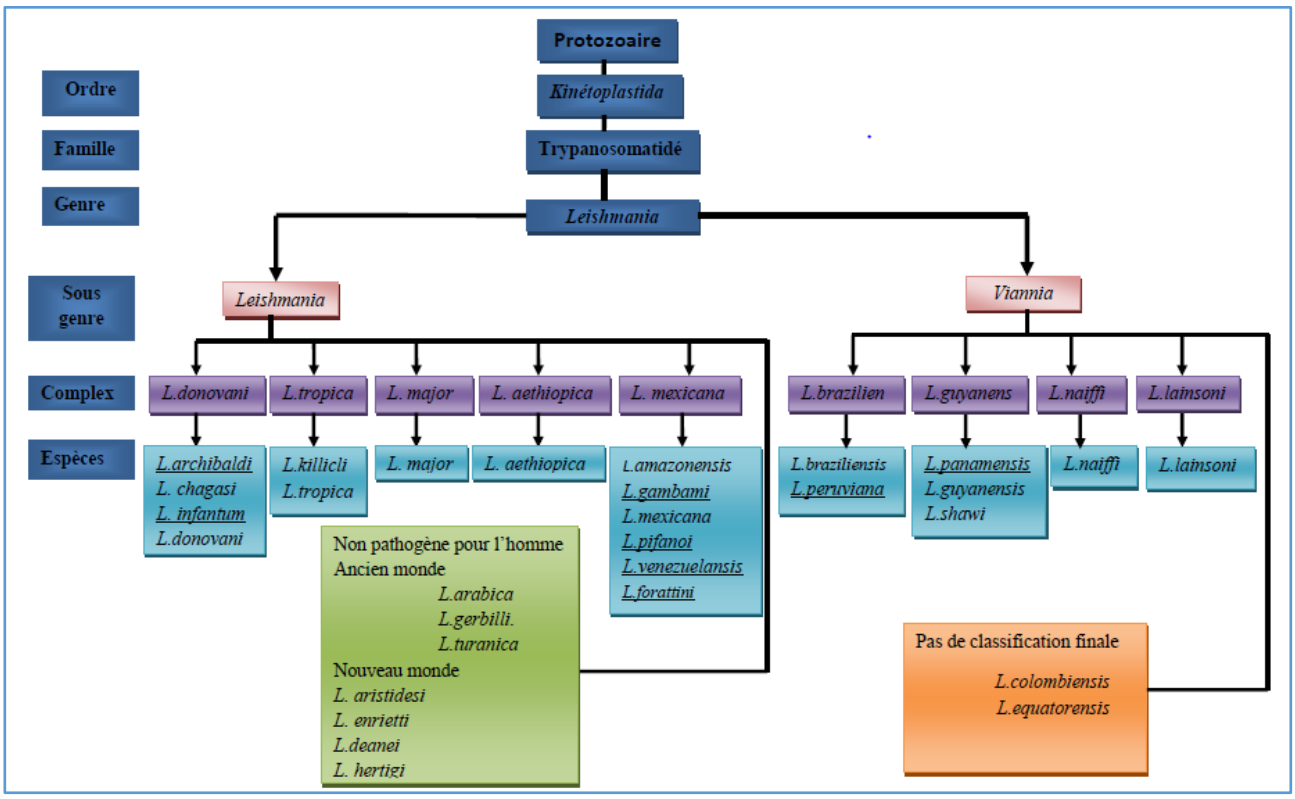


Figure 1 : Taxonomie de leishmania. Le classement des espèces soulignées est ou a été controversé (Banuls et *al*, 2007 *in* Tahir et *al*, 2014).

En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques de leishmaniose appartiennent à deux complexes distincts : le complexe *L. infantum* et le complexe *L. major* (Harrat et *al*, 1999). Dans le complexe *L. infantum*, les zymodèmes responsables de la forme viscérale sont les MON-1 ; MON-24 ; MON-33 ; MON-34 ; MON-78 ; et MON-80. Quant à la leishmaniose cutanée, on trouve les zymodèmes MON-1 ; MON-24 et MON-80. Les zymodèmes MON-1, MON-34 et MON-77 étant isolés du réservoir canin et le MON-1 et le MON-24 de chez le vecteur, toujours dans le complexe *L. infantum* (Harrat et *al*, 1999). Dans le complexe *L. major*, un seul

zymodème a été isolé chez l'homme, le rongeur et le vecteur : il s'agit du MON- 25. Ce dernier est, également, l'agent causal de la leishmaniose cutanée en Tunisie (Kallel et *al*, 2005). En 2009, Ait oudhia identifia chez le chien un nouveau zymodème, MON-281, qui appartient au complexe *L. infantum.* (Ait oudhia et *al*, 2009). Les espèces de leishmanies qui infectent le chien et leur distribution dans le monde sont listées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Distribution géographique des espèces de *Leishmanies* infectant les chiens et leurs vecteurs

Espèces de Leishmanies	Distribution géographique	Vecteurs prouvés	Vecteurs suspectés
L. infantum	Bassin Méditerranéen Moyen Orient Asie du Sud, Iran, Arménie, Afghanistan Asie centrale, Chine	*P. perniciosus,* *P. ariasi, P. perfiliewi,* *P. neglectus,* *P. langeroni,* *P. tobbi,* *P. kandelakii* *P. chinensis,* *P. alexandri*	*P. longicuspis,* *P. syriacus*, etc. *P. brevis,* *P. halepensis*, etc *P. smirnovi,* *P. transcaucasicus,* *P. Longiductus*
L. infantum *= L. chagasi*	Amérique centrale et du sud	*L. longipalpis,* *L. evansi, L. olmeca olmeca*	*L. antunesi,* *L. shannoni*
L. donovani	Afrique de l'est	*P. orientalis,* *P. martini*	*P. rodhaini*
L. tropica	Afrique du Nord	*P. sergenti,* *P. arabicus*	*P. chabaudi,* *P. saevus*
L. braziliensis	Amérique centrale et du sud	*L. wellcomei,* *L. spinicrassa,* *L. whitmani,* *L. yucumensis,* *L. carrerai carrerai,* *L. llanosmartinsi,* *L. ovallesi,* *L. intermedia,*	*L. amazonensis,* *L. migonei,* *L. panamensis,* *L. paraensis,* *L. complexus,* *L. pessoai, etc.*
L. peruviana	Andes péruviennes	*L. peruensis,* *L. verrucarum,* *L. ayacuchensis*	*L. noguchii,* *L. pescei*
L. panamensis	Amérique centrale	*L. trapidoi,* *L. ylephiletor,* *L. gomesi,* *L. panamensis,* *L. hartmanni*	*L. shannoni,* *L. ovallesi, etc*

L : *leishmania*
P : *phlébotomus*
L : *Lutzomyia*

(Solano-Gallego et *al*, 2009).

Toutes les espèces n'ont pas la même importance médicale : seule une vingtaine d'entre elles est considérée comme pathogènes pour l'homme et dix ont été isolées chez les chiens à savoir: *L. infantum* (ou *chagasi* dans le « nouveau monde »), *L. donovani, L. tropica, L. major, L. arabica, L. amazonensis, L. mexicana, L. braziliensis, L. peruviana et L. colombiensis* (Antinori et *al*, 2011). Les chiens sont donc infectés par plusieurs espèces de leishmanies, mais pour certaines d'entre elles, le chien ne représente pas un réservoir significatif pour l'homme. L'infection canine la plus largement répandue et la mieux caractérisée est celle causée par *L. infantum,* qui appartient au complexe de *L. donovani* et qui infecte à la fois les hommes et les chiens, principalement dans le bassin méditerranéen, au Portugal, en Afrique de l'Ouest, en Asie du Sud et en Amérique latine ainsi qu'aux Etats-Unis de manière plus récente. *L. infantum* est probablement issue de *L. donovani* qui a émergé en Afrique de l'Ouest (Banuls et *al*, 2007) alors que *L. chagasi*, espèce synonyme de *L. infantum*, aurait été introduite dans le nouveau monde après l'arrivée des colons européens (Mauricio et *al*, 2000).

1.3.1.2. Morphologie

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui se manifeste sous deux formes différentes (Killick-Kendrick, 1981) :

a. Les promastigotes : sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif du phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 µm de longueur et de 1 à 4 µm de largeur prolongée par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 µm de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur. Dans ces formes parasitaires, le kinétoplaste, une partie spécialisée du compartiment mitochondrial qui contient l'ADN de cet organite, est situé entre le noyau et la base du flagelle (Louis, 2009).

Figure 2 : Promastigote de *leishmania* (Centre National de Référence des Leishmaniose, 2013)

b. Les amastigotes : (étymologiquement = sans flagelle), se nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores. A ce stade, les leishmanies deviennent ovoïdes ou sphériques et mesurent 2 à 3 µm de diamètre (Samake; 2006). 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 kinétoplaste de ces formes est plus souvent juxtanucléaire (Mazelet, 2004).

Les leishmanies ont donc la propriété de résister et de se multiplier (par scissiparité) dans la vacuole parasitophore du macrophage qu'elles distendent. Les dernières finissent par éclater, libérant les parasites qui pénètrent aussitôt dans de nouvelles cellules (Marc *et al,* 2007).

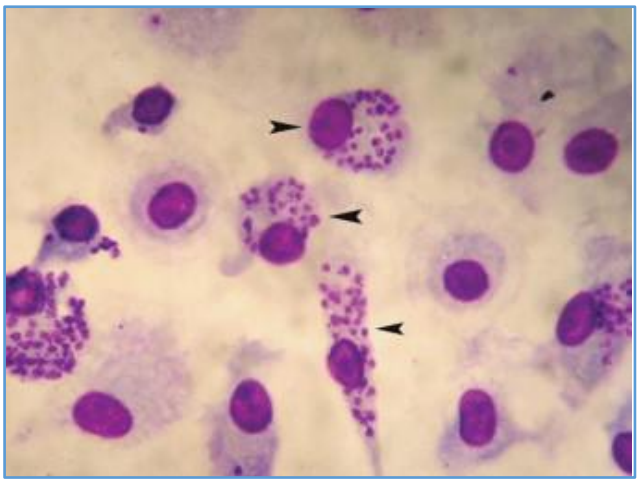


Figure 3 : Forme amastigote de *leishmania* à l'intérieur des macrophages (Banuls et *al,* 2007).

Un troisième type connu sous le terme de **paramastigote,** et dont la position dans le cycle biologique des *Leishmania* n'est pas encore claire, a été identifié principalement au niveau du pharynx, de l'intestin postérieur et rarement dans l'intestin médian des phlébotomes infectés. Ces stades sont ramassés, munis d'un flagelle court et montrent un kinétoplaste juxtanucléaire (Killick-Kendrick, 1985).

La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes. Le cytoplasme contient une kinase jouant un rôle dans la survie des leishmanies dans les cellules parasitées (Euzeby, 2008).

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 tels que la température, le pH, l'osmolarité du milieu, la pression en O_2 et en CO_2 dont l'influence sur la forme parasitaire a été prouvée (Dedet, 2009). Parmi ces paramètres, le pH et la

température semblent plus particulièrement importants et pourraient commander la mise en route de programme de différenciation (Antoine *et al*, 1999).

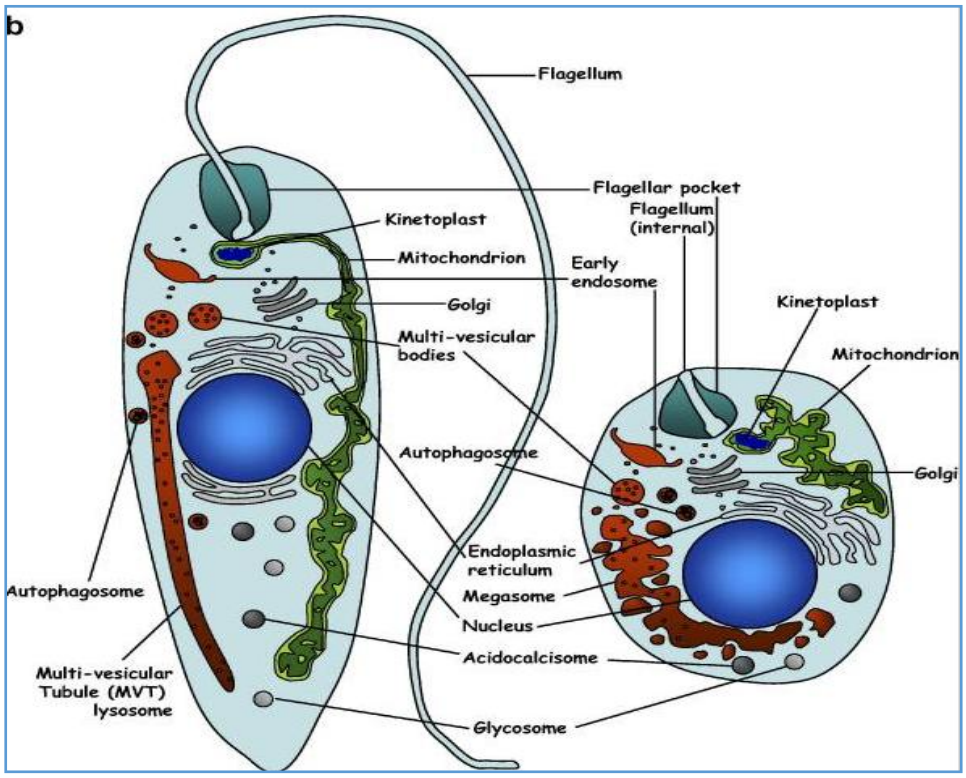


Figure 4 : Représentation schématique du parasite *Leishmania*.

Forme promastigote à gauche forme prolifération chez le vecteur et infectante chez les vertébrés, et l'amastigote à droite forme intraphagocytaire, selon (Besteiro et al, 2007).

1.3.1.3. Etude moléculaire de *Leishmania infantum*

Comme tous les Kinétoplastidés, les *leishmanies* possèdent un génome nucléaire et un génome kinétoplastique, qui ont tous deux des caractéristiques inhabituelles, en particulier dans les mécanismes de transcription (Ravel et *al*, 1999).

a. Le génome kinétoplastique

Le kinétoplaste est considéré comme un ADN mitochondrial modifié (Vickerman, 1976). C'est en effet une portion particulière de l'unique mitochondrie, il représente de 10 à 20 % de l'ADN total de la cellule. Il est constitué de deux types de molécule d'ADN circulaire : les maxi-cercles (environ 10 à 30 par cellule) et les mini-cercles (de 5 000 à 10 000 par cellule), entrelacés les uns dans les autres, constituant ainsi un réseau complexe et compact (Simpson, 1987).

Les maxi-cercles, d'une taille de 20 à 40 kb suivant les espèces, sont identiques dans un même réseau. Ils sont équivalents à l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. En effet, ils codent pour des gènes classiques de la mitochondrie tels que les gènes de l'ARN ribosomique (ARNr), les gènes de la chaine de transport des électrons (cytochrome oxydase, complexe NADH

déshydrogénase…..) mais également pour des gènes codant de petits ARN appelés ARN guides (ARNg) qui interviennent dans un processus très original de modification post transcriptionnelle de la séquence de l'ARN messager appelé ARN editing.

Les mini-cercles, d'une taille inférieure à 1 kb, codent aussi pour les ARNg. Mais, contrairement aux maxi-cercles, leur séquence est très variable non seulement d'une espèce à l'autre, mais également au sein d'une même espèce (Stuart, 1991).

b. Le génome nucléaire

Leishmania est essentiellement diploïde même si le cycle sexuel n'a pas été observé (Ivens et Blackwell, 1999). Le nombre de chromosomes est resté longtemps indéterminé en raison de l'absence de condensation au cours du cycle cellulaire (Raikov, 1982). Grace à la technique d'électrophorèse en champs pulsé on a pu visualiser les chromosomes de *Leishmania*. Son génome d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0.3 à 2.8 Mb. Certaines espèces n'ont que 34 à 35 chromosomes mais la complexité du génome est conservée (Britto et *al*, 1998). Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. De cette réunion est né le *Leishmania Genome Network*, un consortium de laboratoires impliqués dans la cartographie, le séquençage et l'annotation des génomes. Aujourd'hui, le génome de *Leishmania* est entièrement séquencé. On recense 8272 gènes codant des protéines, 911 gènes d'ARN et 39 pseudo-gènes (Ivens et *al*, 2005).

1.3.1.4. Biologie

a. Répartition dans l'organisme, nutrition et reproduction

Chez le chien, les leishmanies sont des parasites intracellulaires des cellules du système des phagocytes mononuclées (S.P.M.): macrophages de divers tissus, histiocytes dermiques, cellules de Küpffer du foie et monocytes sanguins. Dans ces cellules, elles sont rassemblées par dizaines dans une vacuole parasitophore (le phagosome) contrairement à ce qui est le cas pour d'autres parasites intracellulaires, les leishmanies n'empêchent pas la fusion phagosome-lysosome et elles résistent aux enzymes lysosomales. Les leishmanies sont très largement dispersées dans l'organisme, intéressant de nombreux organes et tissus : SPM, peau, tube digestif, appareil respiratoire, etc. Ce qui est à l'origine du caractère polymorphe de la maladie. Ces protozoaires utilisent les protéines des cellules-hôtes et leur ADN est synthétisé à partir des précurseurs de

l'ARN de ces cellules (notamment la purine qu'elles ne peuvent pas synthétiser et qui leur est fournie par leur hôte) (Bourdoiseau, 2000).

Leur multiplication se fait par scissiparité. Elle se produit aussi bien pour les formes promastigotes, en culture et chez le vecteur, que pour les formes amastigotes dans la vacuole parasitophore de la cellule qui les abrite. Ainsi, chez le chien, qui est un animal sensible, les leishmanies persistent dans le SPM et se multiplient dans les cellules comme les macrophages en utilisant des mécanismes d'échappement à l'action du système immunitaire. Lorsque la multiplication est devenue importante, la cellule parasitée est détruite et les leishmanies sont phagocytées par une cellule saine qui s'infecte à son tour. La reproduction sexuée n'est pas connue mais fortement suspectée.

b. Cycle de développement

Le cycle de vie des leishmanies est simple et implique deux stades sans véritable période de reproduction sexuée (à la différence des *Apicomplexa*). On distingue deux formes morphologiquement distinctes (figure 5), une forme promastigote et l'autre amastigote qui sont adaptées à la vie chez le vecteur phlébotome (vecteur biologique) et l'hôte vertébré respectivement, avec cependant une phase dite, phase de méta-cyclogenèse qui s'observe chez le vecteur, conduisant à la transformation des promastigotes procycliques qui ne sont pas encore infectants en une forme infectante pour les vertébrés dite promastigote métacyclique (l'équivalent des promastigotes de la phase stationnaire en culture).

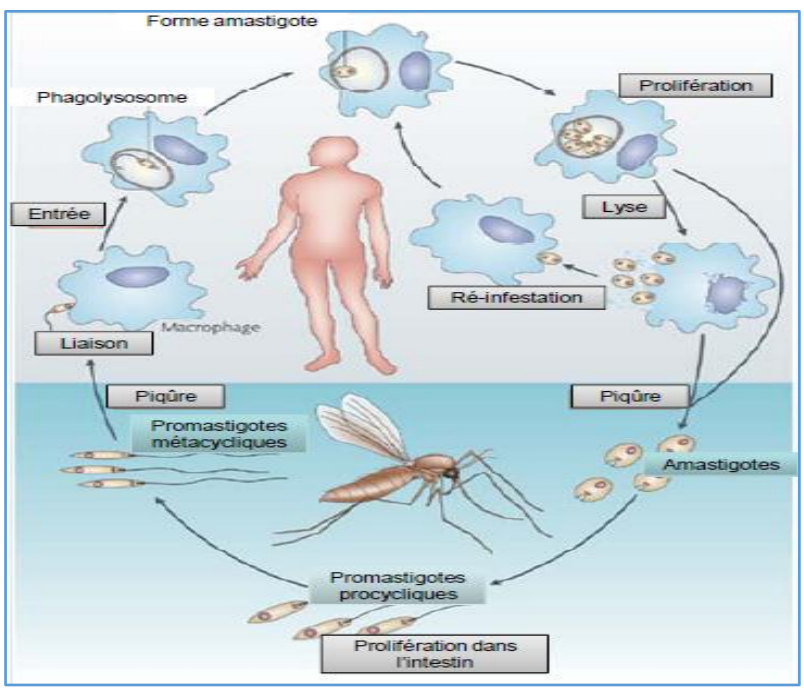


Figure 5 : Cycle évolutif de *Leishmania infantum* (Chappuis et *al*, 2007).

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. 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 des 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 leishmanies. Ce critère a permis la mise en place d'une classification des *Leishmania* en : ***Hypolaria*** (au niveau de l'intestin postérieur); ***Péripylaria*** (de part et d'autre du pylore) ; ***Suprapylaria*** (au niveau de l'intestin antérieur et moyen.). Les deux derniers types de leishmanies concernent des espèces de leishmanies de mammifères. Les leishmanies gagnent ensuite les pièces buccales. La durée du cycle chez le phlébotome est de 4 à 7 jours suivant la température. Le vecteur peut alors transmettre le parasite à un autre animal ou à l'Homme. Les promastigotes « injectés » seront transformés en amastigotes lors de leur passage en phagolysosome, dans lesquels ils se multiplieront entraînant la lyse cellulaire successive des macrophages du sang ou de la peau de l'hôte vertébré.

Les phlébotomes infectés ont des difficultés à prendre leur repas sanguin ce qui peut être un facteur de multiplication des piqûres et donc d'augmentation de transmission.

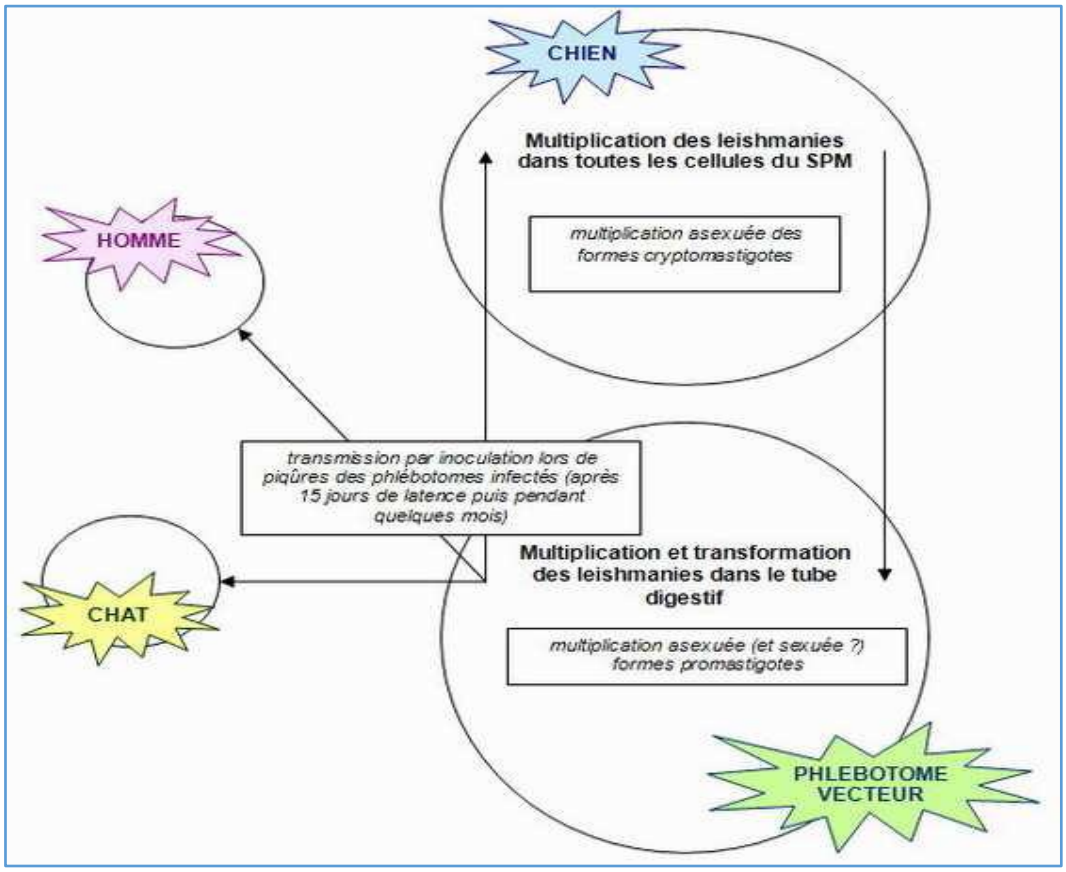


Figure 6 : Cycle des leishmanioses cutanée et viscérale (*d'après* Amara A et *al***,** 2003).

A ce cycle, s'ajouterait une autre hypothèse de transmission vénérienne de la leishmaniose selon une étude ayant porté sur douze chiennes indemnes, s'étant accouplées avec des chiens infectés par *Leishmania chagasi* (agent de la leishmaniose viscérale en Amérique du Sud). Les résultats d'amplification PCR ont montré que l'excrétion spermatique était intermittente. Trois chiennes ont présenté une séroconversion, six étaient positives en PCR, 165 jours après le dernier coït (Silva et *al*, 2009)

Les sites de transmission sont préférentiellement les zones peu poilues de la peau comme la tête (notamment la truffe chez le chien), l'arête du nez, les pavillons auriculaires, les régions inguinales et péri-anales.

1.3.2. Le vecteur

1.3.2.1. Caractères généraux

Les phlébotomes sont des diptères, hématophages et nématocères (antennes composées de 16 articles), reconnus comme étant les seuls vecteurs capables d'assurer l'évolution normale des leishmanies. Aucun autre arthropode hématophage ne peut se prévaloir de cette aptitude. Ce sont les seuls agents inoculateurs de la maladie, puisque la focalisation de ces infections dépend étroitement de la distribution de ces insectes (Boussaa, 2008).

Rencontrés sur tous les continents, ces insectes ne dépassent pas certaines latitudes. D'après Depaquit et collaborateurs (2002), les phlébotomes n'ont pas été signalés dans les pays Nordiques, très rares en Amérique du Nord, peu abondants en Australie, abondants dans les zones tropicales et équatoriales de l'Afrique, de l'Amérique orientale et de la Province Malaise. Ils sont également fréquents dans le bassin méditerranéen et en Afrique du Nord (Louis, 2009).

Les phlébotomes présentent un intérêt médical, ils transmettent en plus des leishmanioses, la bartonellose et plusieurs arboviroses (Boulouis et *al*, 2008). Plus de 20 arbovirus peuvent être transmis par les phlébotomes, qui jouent en même temps le rôle de réservoir et de vecteur. Les arboviroses évoluent dans les mêmes régions géographiques et sous les mêmes conditions climatiques que les leishmanioses. Les virus transmis se répartissent en trois genres appartenant à des familles différentes : *Phlebovirus* (famille des *Bunyaviridae*, présents dans l'ancien monde et le nouveau monde), *Orbivirus* (famille des *Reoviridae*, présents dans le nouveau monde) et *Vesiculovirus* (famille des *Rhabdoviridae*, dans l'ancien et le nouveau monde) (Izri et *al*, 2006).

1.3.2.2. Morphologie

Ils ont un corps grêle et allongé de petite taille, de 1 à 3 mm de long (Lewis, 1973). Trois caractéristiques les rendent faciles à reconnaître: au repos, ils tiennent leurs ailes surélevées au-dessus de l'abdomen en formant un angle caractéristique avec ce dernier (figure 7), ils sont velus et sautent généralement autour de l'hôte avant de commencer à piquer. Contrairement aux moustiques, leur vol est silencieux. Des études préliminaires ont montré que leur vitesse de vol maximale est un peu moins de 1 m/sec (Niang et *al*, 2000).

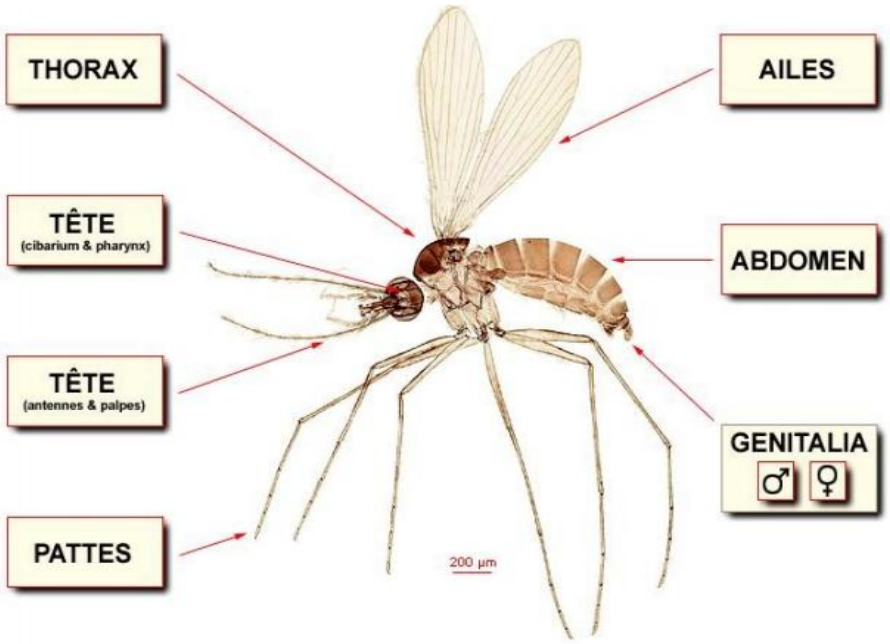


Figure 7 : Morphologie générale d'un phlébotome adulte (Niang et *al*, 2000).

Figure 8 : Phlébotomes (femelle). http://www.diptera.info/forum/viewforum.php

1.3.2.3. Systématique

Les phlébotomes sont des eucaryotes métazoaires, appartenant à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères (Mazelet, 2004). De nombreux travaux ont débuté au 18ème siècle par la description de *Phlebotomus papatasi*, notamment Scopoli en 1786. Et actuellement, près de 800 espèces sont décrites. (Bounamous, 2010).

- En 1943, Rondani établit une liste dans laquelle Walker (1851) a groupé les espèces de phlébotomes dans la famille des *Phlebotomidae* (Bounamous, 2010).
- Plus tard, Kertesz (1903) distingue et classe les sous-familles : *Psychodinae* et *Phlebotominae*, qu'il groupe dans la famille des *Psychodidae* (Bounamous, 2010).

- Franca et Parrot (1920) ont ensuite subdivisé le genre *Phlebotomus* en cinq sous-genres: *Phlebtomus, Paraphlebotomus, Brumptomyia, Lutzia* (*=Lutzomyia*) et *Sergentomyia.*

- Theodor (1948), en se basant sur la variabilité morphologique de l'armature buccale (cibarium), du pharynx et des spermathèques des femelles, a divisé la sous-famille des *Phlebotominae* en quatre genres, *Phlebotomus,* et *Sergentomyia* dans l'ancien monde; *Lutzomyia, Brumptomyia* et *Warileya* dans le nouveau monde.

- Perfiliew en 1966, regroupe tous les phlébotomes dans la famille des *Phlebotomidae* et crée la super-famille des *Psychodidae* et quelques années plus tard (1973), Lewis reconnait la famille des *Phlebotomidae.*

- En 1976, Abonnenc et Léger proposent ensuite une nouvelle classification dans laquelle la famille des *Phlebotomidae* (Walker, 1848) est divisée en trois sous-familles et 10 genres :

* la sous-famille des *Neophlebotomina*e qui compte 4 genres : *Grassomyia* (Theodor, 1958), *Parvidens* (Theodor et Mesghali, 1964), *Brumptomyia* (Franca et Parrot, 1921) et *Lutzomyia* (Franca, 1921) (Bounamous, 2010).

* la sous-famille des *Disphlebotominae* avec deux genres: *Warileya* (Hertig, 1948) et *Hertigia* (Fairchild, 1949) (Bounamous, 2010).

* la sous-famille des *Euphlebotominae* qui comprend 4 genres : *Spelaeophlebotomus* (Theodor, 1948), *Idiophlebotomus* (Quate et Fairchild, 1961), *Phlebotomus* (Rondani, 1843) et *Sergentomyia* (Franca et Parrot, 1921) (Bounamous, 2010).

Parmi ces derniers, seuls les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* sont présents dans la région méditerranéenne. Ils comportent chacun quatre sous-genres (Bounamous, 2010).

Le genre *Phlebotomus,* qui prédomine dans l'ancien monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) (Quitterie et *al,* 2005; Samake, 2006; Dedet, 2009; Estevez, 2009), se distingue par les caractéristiques morphologiques suivantes : soies des tergites abdominaux toutes dressées, armature cibariale absente ou rudimentaire, spermathèques complètement ou incomplètement segmentées et style des génitalia comportant 4 à 5 épines (Rondani, 1843 *in* Abonnenc, 1972).

Quant au genre *Sergentomyia,* qui prédomine dans le nouveau monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale) (Quitterie et *al,* 2005; Samake, 2006; Dedet, 2009; Estevez, 2009), se caractérise par des soies abdominales couchées dans la plupart des espèces (quelques unes sont dressées dans un sous-genre), armature cibariale bien développée, spermathèques tubulaires, capsuliformes ou segmentées, style des génilatia des mâles à quatre longues épines et une petite soie sur le côté interne (França et Parrot, 1921 *in* Abonnenc, 1972).

Comme pour beaucoup de groupes, la systématique des phlébotomes est typologique, sans argumentation phylogénétique jusqu'à la publication de nouvelles approches phylogénétiques qui ont complété les travaux de Rispail et Léger (1998a, 1998b), de Galati (1990), de Depaquit et *al.* (1998) et de Aransay et *al.* (2000). Il faut noter que les caractères habituellement utilisés pour les identifications (appareil génital, soies thoraciques, dents cibariales, dents du pharynx, nervation alaire, soies antennaires) sont d'utilisation difficile. Approche pour laquelle d'autres caractères doivent être privilégiés (thoraciques, céphaliques, abdominaux) ainsi que des caractères moléculaires dont le rythme de mutation est lent (Bounamous, 2010).

Outre l'approche morphologique et moléculaire, de nouveaux outils d'identification sont désormais utilisés telle la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Des travaux récents ont montré que cet outil, qui permet de caractériser un échantillon à partir du spectre de masse moléculaire des différentes protéines présentes, pouvait permettre d'identifier des spécimens d'arthropodes vecteurs au niveau de l'espèce voire infra-spécifique (C.N.E.V., 2014). Cet outil, présentant de nombreux avantages en termes de coût, de rapidité d'analyse, et ne nécessitant pas de compétences particulières en taxonomie. Il est cependant nécessaire de disposer d'une banque de spectres des espèces qui pourront ainsi être identifiées. A l'instar des tiques (Karger et *al*, 2012; Yssouf et *al*, 2013b *in* C.N.E.V, 2014), des cératopogonidés (Kaufmann et *al*, 2011 ; 2012a, 2012b; Steinmann et *al*, 2013 *in* C.N.E.V, 2014), des glossines (Hoppenheit et *al*, 2013 *in* C.N.E.V, 2014) et des moustiques (Steinmann et *al*, 2013; Müller et *al*, 2013; Yssouf et *al*, 2013a *in* C.N.E.V, 2014), l'efficacité du MALDI-TOF a pu être prouvée récemment sur les phlébotomes dont le profilage de protéine représente un premier pas vers l'établissement d'une base de données de spectres de protéines qui permettrait l'identification rapide et fiable des espèces de phlébotomes (Dvorak et *al*, 2014; Lafri et *al*, 2015).

En Algérie, la présence des phlébotomes a été rapportée pour la première fois en 1912 par Foley et Leduc et signalée plus tard par Parrot et Sergent dont les travaux ont été menés de 1917 à 1960 (Dedet et *al*, 1984). Aujourd'hui 23 espèces sont connues en Algérie, 13 du genre *Phlebotomus* et 10 du genre *Sergentomyia*, chaque espèce a sa propre distribution écologique, exceptée dans les montagnes du Sahara central où les deux espèces *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus papatasi* qui sont méditerranéennes mais qui appartiennent aussi au secteur zoogéographique éthiopien se produisent ensemble. *P. perniciosus* et *P. papatasi* sont les vecteurs prouvés de respectivement *L. infantum* (leishmaniose viscérale) et de *L. major* (leishmaniose cutanée) (Belazzoug, 1991; Bounamous, 2010).

Tableau 3 : Liste des espèces de phlébotomes recensés en Algérie

Sous-famille *Phlebotominae*	
Genre *Phlebotomus*	**Genre *Sergentomyia***
Phlebotomus (phlebotomus) papatasi (Scopoli, 1786)	*Sergentomyia (Sergentomyia) minuta parroti* (Adler et Theodor, 1927)
Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti (Parrot, 1934)(*)	*Sergentomyia (Sergentomyia) fallax* (Parrot, 1921)
Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti (Parrot, 1917)	*Sergentomyia (Sergentomyia) antennata* (Newstead, 1912)
Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri (Sinton, 1928)	*Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi* (Adler, Theodor et Parrot, 1929) (*)
Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970)	*Sergetomyia (Parrotomyia) africana* (Newstead, 1912)
Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni (Theodor et Mesghali, 1964) (**)	*Sergetomyia (Parrotomyia) eremitis* (Parrot et de Jolinière, 1945) (*)
Phlebotomus (Larroussius) ariasi (Tonnoir, 1921)	*Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi* (Parrot, 1933)
Phlebotomus (Larroussius) chadlii (Rioux, Juminer et Gibily 1966)	*Sergentomyia (Sintonius) clydei* (Sinton, 1928)
Phlebotomus (Larroussius) perniciosus (Newstead, 1911)	*Sergentomyia (Sintonius) christophersi* (Sinton, 1927)
Phlebotomus (Larroussius) longicuspis (Nitzulescu, 1911)	*Sergentomyia (Sintonius) hirta* (Parrot et de Jolinière, 1945) **(*)**
Phlebotomus (Larroussius) langeroni (Nitzulescu, 1930)	
Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi (Parrot, 1930)	

(*) Espèces exclusivement localisées au Sahara central.
(**) Un spécimen rapporté de Mila (Nord-est Algérien) par Berchi et *al* (1986).

1.3.2.4. Bio-écologie des phlébotomes

Les phlébotomes ont un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago. On peut rencontrer les phlébotomes sur tous les continents mais leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972). Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils sont en pause hivernale malgré une activité méditerranéenne démontrée récemment (Naucke et *al*, 2008). La pérennité de l'espèce est assurée par les larves hibernantes de stade IV.

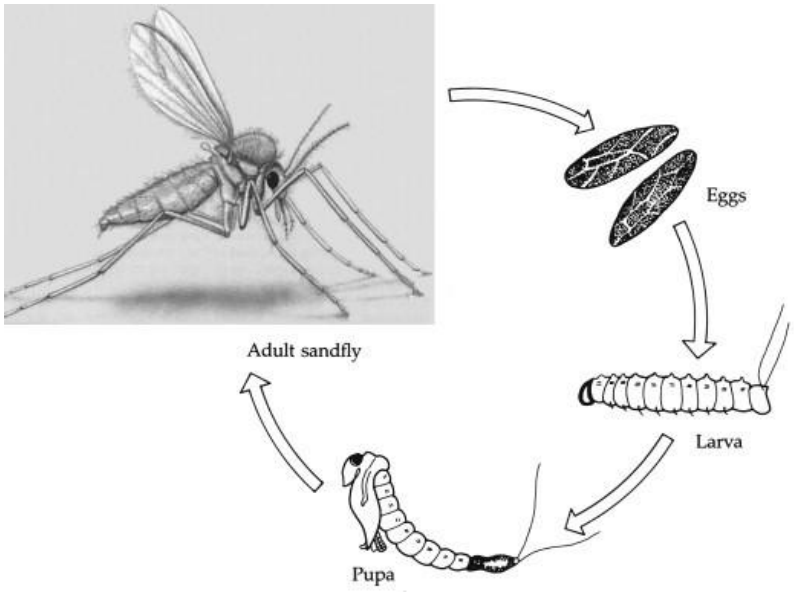


Figure 9: Cycle évolutif du *Phlebotomus sp*. (Bogitsh et *al*, 2013)

La femelle prend un repas sanguin pour se procurer les éléments nutritifs nécessaires à la maturation de ses œufs. Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs dépend de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante. Les femelles déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades pré-imaginaux. Ils sont pondus un à un dans des substrats de toutes sortes mais surtout dans des endroits humides qui constituent les gites larvaires (Dolmatova et Demina, 1971). En effet, la survie et le développement des œufs dépendent des conditions d'humidité et de température appropriées (26-30°). L'incubation des œufs qui est de l'ordre de quatre à dix-sept jours varie avec la température (Abonnenc, 1972).

Les larves sont terricoles, sédentaires, saprophages et phytophages, leurs gites varient selon les espèces et peuvent être les fissures du sol, les terriers de micromammifères, nids d'oiseaux, creux d'arbres, fentes des murs, sols des habitations et des étables. Leur développement exige une température relativement constante, une obscurité, un milieu nutritif formé de déchets organiques animal ou végétal, un calme absolu et un degré d'humidité voisin de la saturation (Abonnenc, 1972). Notons que la durée des 4 stades larvaires successifs est variable en fonction des données climatiques (en pays tempérés l'hibernation se fait au stade d'œuf ou de larve).

La nymphe, quant à elle, est fixée en position verticale par son extrémité postérieure et se rencontre au niveau des mêmes gites que ceux de la larve. Elle ne se nourrit pas et la durée du seul stade nymphal serait de six à quinze jours. Elle est plus grande que la larve et adaptée à un milieu aérien sec. Tout comme les œufs, elle a besoin de protection contre l'insolation et d'autres facteurs météorologiques agissant de manière brutale. La nymphe entre alors en état de vie ralentie pour subir enfin, la mue imaginale conduisant à l'adulte.

Les phlébotomes adultes sont caractérisés par le calme et la tranquillité du gite de repos, l'existence de gites de ponte propices à la vie des larves et la proximité d'hôtes vertébrés nécessaires au repas de sang de la femelle. Ils séjournent dans des endroits retirés sombres et relativement humides (terriers, étables, clapiers, niches et même dans les maisons). Les horaires de sortie et de rentrée varient suivant l'espèce et les conditions du milieu (étage bioclimatique, période de l'année). Très sensibles aux courants d'air, ils ne se déplacent que par temps absolument calmes, par des vols courts et silencieux avec des arrêts fréquents.

Le vol s'effectue par des bonds rapides sur des parois verticales de bas en haut lorsqu'ils sont dérangés, leur rayon maximum de déplacement est variable selon les espèces, soit à peu près un kilomètre. Ils ont une activité nocturne qui commence au crépuscule à condition que la température soit suffisante (19-20 C°) et qu'il n'y ait pas de vent (vitesse limite: 1m/sec.). Une température faible ou trop élevée constitue autant de facteurs limitant l'activité des phlébotomes (Killick-Kendrick, 1999; Wasserberg et *al*, 2003).

Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, alors que d'autres sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons, les étables..., par contre certaines sont exophiles (Leger et Depaquit, 2001). La femelle, seule hématophage, se nourrit de sang des vertébrés (oiseaux, reptiles, batraciens et mammifères dont l'Homme), à chaque cycle gonadotrophique en dehors desquels elle se nourrit de sucs végétaux et de jus sucres dont le male se nourrit exclusivement. Quelques espèces dites autogènes peuvent se passer d'un tel repas sanguin.

La durée de vie des adultes est fonction de la température (plus celle-ci est basse, plus la durée de vie est élevée) et de l'humidité (plus l'hygrométrie est élevée, plus la durée de vie est élevée). Les femelles vivent en moyenne deux semaines à deux mois et prennent généralement plusieurs repas sanguins (ce qui est indispensable à la transmission des leishmanies) alors que les males ont une durée de vie plus courte. Les pontes interviennent une semaine après le repas sanguin. L'attraction des phlébotomes pour l'être humain semble dépendre de la production de gaz carbonique (CO_2) mais également de son odeur (Pinto et *al*, 2001).

1.3.3. Les réservoirs de parasites

On peut faire entrer les leishmanioses dans deux grandes catégories en fonction de l'origine de l'infestation humaine : les leishmanioses zoonotiques pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques, et les leishmanioses anthroponosiques pour lesquelles le réservoir est constitué par l'Homme.

1.3.3.1. Réservoirs zoonotiques

Les hôtes réservoirs des leishmanioses zoonotiques sont des animaux sauvages et des animaux domestiques tels que :

a. Le chien *:* La leishmaniose est la première parasitose du chien. Les sources de parasites sont les chiens hébergeant des leishmanies dans le derme; les parasites peuvent être présents dans la peau même en l'absence de lésions cutanées (Bussiéras et Chermette, 1992). Le chien domestique est donc considéré comme le réservoir principal de *L. infantum* dans le bassin méditerranéen (Denerolle, 2003; Carre et *al*, 2010), en Chine et en Amérique en raison de :

- Sa forte réceptivité ;
- La forte prévalence d'infection des chiens par *L. infantum* (la plupart étant asymptomatiques) dans les zones d'endémie de leishmaniose humaine ;
- Un parasitisme cutané intense chez les chiens infectés augmentant le risque de transmission ;
- Une latence d'apparition des signes cliniques pouvant atteindre des années ;
- L'isolation du zymodème MON-1 de *L. infantum*, à partir de chiens, responsable de la plupart des formes de leishmaniose viscérale humaine autour du bassin méditerranéen.

Le chien est également le réservoir principal de *L. braziliensis*, qui est l'agent étiologique causant la leishmaniose cutanée en Amérique. Le rôle de réservoir du chien est probablement négligeable pour les autres espèces de *Leishmania* (Dantas-Torres, 2007).

b. Le chat *:* Bien que la leishmaniose féline (FL) soit considérée comme une constatation rare (Costa-Durão et *al*, 1994; Passos et *al*, 1996; Ozon et *al*, 1998), plusieurs cas de formes à la fois viscérale et cutanée ont été rapportés en Amérique, Europe, Afrique et en Asie (Simões-Mattos et *al*, 2004). Néanmoins, la sensibilité réelle des chats à l'infection par *Leishmania spp*. est mal comprise (Shawet *al*, 2001). D'après les travaux de Simões-Mattos et collaborateurs, les chats

domestiques ont toutes les propriétés nécessaires pour servir de réservoirs potentiels de *Leishmania*. D'autres études épidémiologiques sont nécessaires pour déterminer le rôle réel des chats dans la transmission de la leishmaniose dans les zones endémiques (Simões-Mattos et *al*, 2005).

En Algérie, le premier cas de FL rapporté dans la littérature date de 1912 à Alger (Leiva et *al*, 2005). Et selon l'enquête menée à la fourrière canine d'Alger par Djoudi et *al* en 2010, le chat serait un réservoir réel de la leishmaniose en Algérie (Djoudi et *al*, 2010).

c. Les canidés sauvages*:* tel que les chacals, renards, lycalopex sont révélés porteurs de *L. infantum* aussi bien dans l'ancien que dans le nouveau monde. On a avancé l'hypothèse que ces animaux pourraient servir de réservoirs mais cela n'a pas encore été entièrement prouvé (OMS, 2010).

d. Les rongeurs *:* ceux qui sont naturellement infestés appartiennent à des familles différentes : Gerbillidés (*Meriones, Gerbillus, Rhombomys*), Cricetidés (*Arvicanthis*) et Gliridés (Loirs et lérots). La grande gerbille, *Rhombomys opimus*, constitue l'hôte réservoir primaire de *L. major* dans les steppes de l'Asie centrale. *Psammomys obesus*, le principal réservoir de *L. major* en Asie de l'Ouest et en Afrique du Nord (OMS, 2010).

En Algérie, les hôtes réservoirs de *L. major*, agent étiologique de la leishmaniose cutanée, sont des rongeurs**.** *Psammomys obesus*, et *Meriones shawi* ont été reconnus comme réservoirs de *L. major* (Belazzoug, 1984; Izri et *al*, 1992).

M. shawi est granivore, tandis que *P. obesus* est strictement végétarien, il se nourrit de chénopodiacées, *M. shawi* quand à lui, a une activité nocturne, il a une grande aire vitale, il circule loin de son gîte à la recherche de graines. *P.obesus* a une activité diurne, il peuple les régions des chotts et sebkha, son régime alimentaire comporte essentiellement des plantes halophiles. La densité de peuplement étant en rapport avec la quantité des ressources disponibles pour nourrir les individus, ils doivent pouvoir vivre isolément, les uns loin des autres, d'où leur faible densité de peuplement en période de sécheresse (Petter, 1961).

e. Autres mammifères : tels que les Tapirs, les Hérissons (Wery, 1995). Seuls les mammifères ont été à ce jour trouvés porteurs de protozoaires *Leishmania* pathogènes pour l'homme.

1.3.3.2. Réservoirs anthropiques

L'homme malade joue le rôle de réservoir du parasite dans le cas de Kala-Azar indien et dans certains foyers de leishmaniose anthroponotique viscérale à *L. donovani* et également un réservoir pour *L. tropica* pour la forme cutanée (Wery, 1995). Il a également joué le rôle de réservoir dans certaines flambées dues à *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. panamensis*. Pour l'instant on ignore quel pourrait être le rôle des individus présentant une infestation asymptomatique dans le cycle de la transmission.

On sait que les sujets présentant une infection concomitante par le VIH sont très infectieux pour les phlébotomes et pourraient, dans certaines régions, jouer un rôle dans la transmission.

Parmi les formes de leishmaniose provoquées par *L. donovani*, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose dermique post-kala-azar (LDPKA) sont des sources d'infestation des phlébotomes de sorte que les cas doivent être activement recherchés et traités. Il en va de même des formes récidivantes de leishmaniose cutanée dues à *L. tropica*. En outre, il est possible que l'Homme joue le rôle de réservoir dans la leishmaniose due à *L. major* ainsi que dans un certain nombre de formes strictement cutanées due à *L. infantum*, par suite de l'évolution torpide des lésions (OMS, 2010).

Plusieurs espèces de leishmanies peuvent coexister à l'intérieur d'un même foyer, provoquant des formes cliniques apparemment identiques alors qu'elles relèvent de cycles épidémiologiques différents. Dans la Péninsule arabique, par exemple, *L. donovani* et *L. infantum* sont présentes à l'intérieur des mêmes foyers, la première uniquement chez l'Homme et la seconde à la fois chez l'Homme et le chien. Cela souligne l'importance d'une identification précise des parasites en cause (OMS, 2010).

Dans la figure ci-dessous, les auteurs synthétisent le cycle évolutif des l*eishmanies*, en mentionnant les deux formes du parasite (amastigote et promastigote), les deux genres de vecteurs (*Phlebotomus* et *Lutzomyia*), quelques hôtes réservoirs que nous avons présentés dans ce chapitre. Ainsi que les trois principales formes de leishmaniose humaine à savoir : la leishmaniose viscérale, cutanée et cutanéomuqueuse.

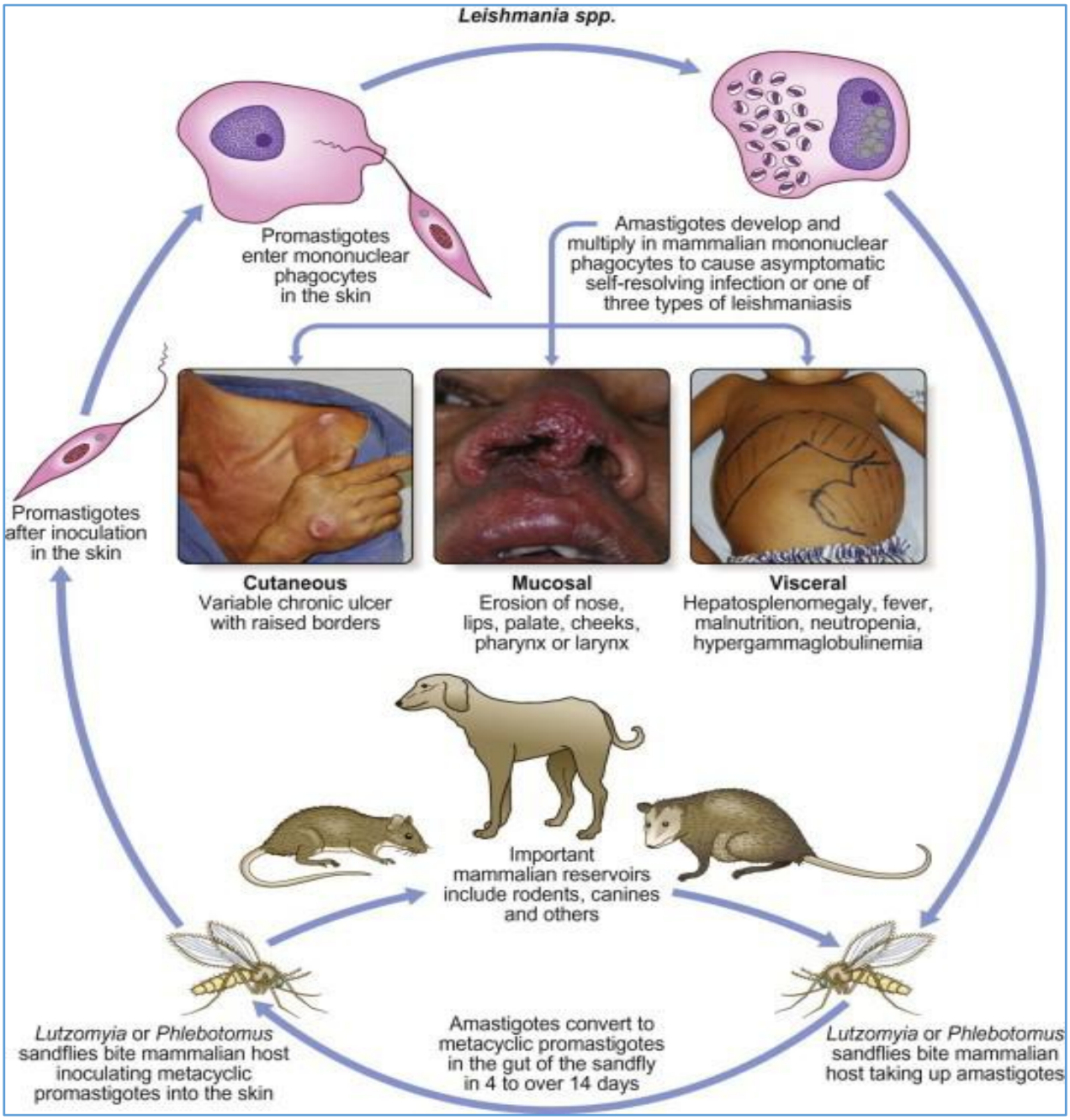


Figure 10: Le cycle évolutif de *Leishmania spp.* Avec les différentes formes cliniques chez l'homme (Jeronimo et *al*, 2011)

CHAPITRE 2 : EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES

2.1. Epidémiologie des leishmanioses canine et humaine

2.1.1. Epidémiologie descriptive

2.1.1.1. Répartition mondiale des leishmanioses

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que la leishmaniose est endémique dans 88 pays de régions tropicales et subtropicales, du sud d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie, et d'Amérique. Parmi ces pays, 72 sont en voie de développement. Elle estime actuellement que 350 millions de personnes sont situées dans des zones à risques (Desjeux, 2004; OMS, 2010). Rappelons que seules l'Amérique du Nord et l'Australie sont pour l'instant indemnes de leishmaniose. Les pays les plus durement touchés par la leishmaniose viscérale sont le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan. Quant à la leishmaniose cutanée, 90 % des nouveaux cas se situent en Afghanistan, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie (Carre et *al*; 2010). Au niveau mondial, les foyers principaux sont : l'Asie du Sud-est (Inde, Népal, Bangladesh) ; l'Afrique de l'Est (Éthiopie, Soudan); le Bassin méditerranéen (France, Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Égypte, Turquie); et l'Amérique du Sud (Brésil) (Carre et *al*, 2010).

Quant à la leishmaniose canine, elle est répandue dans environ 50 pays, survenant principalement dans la Région méditerranéenne et en Amérique du Sud (Baneh et *al*, 2008; Dantas-Torres, 2009; Solano-Gallego et *al,* 2009). La répartition géographique de la leishmaniose canine s'est élargie, ces dernières années, dans l'hémisphère ouest, où elle se produit maintenant du nord de l'Argentine (Cruz, 2010), jusqu'au nord des États-Unis, atteignant même certaines provinces du sud du Canada (Duprey et *al*, 2006). Il y a aussi une évidente propagation vers le nord de l'Europe, c'est le cas de l'Italie (Maroli et *al*, 2008; Baldelli et *al*, 2011)**.** C'est une maladie d'importance croissante, elle est observable dans de nombreux pays méditerranéens dans laquelle elle sévit sous forme endémique et stable.

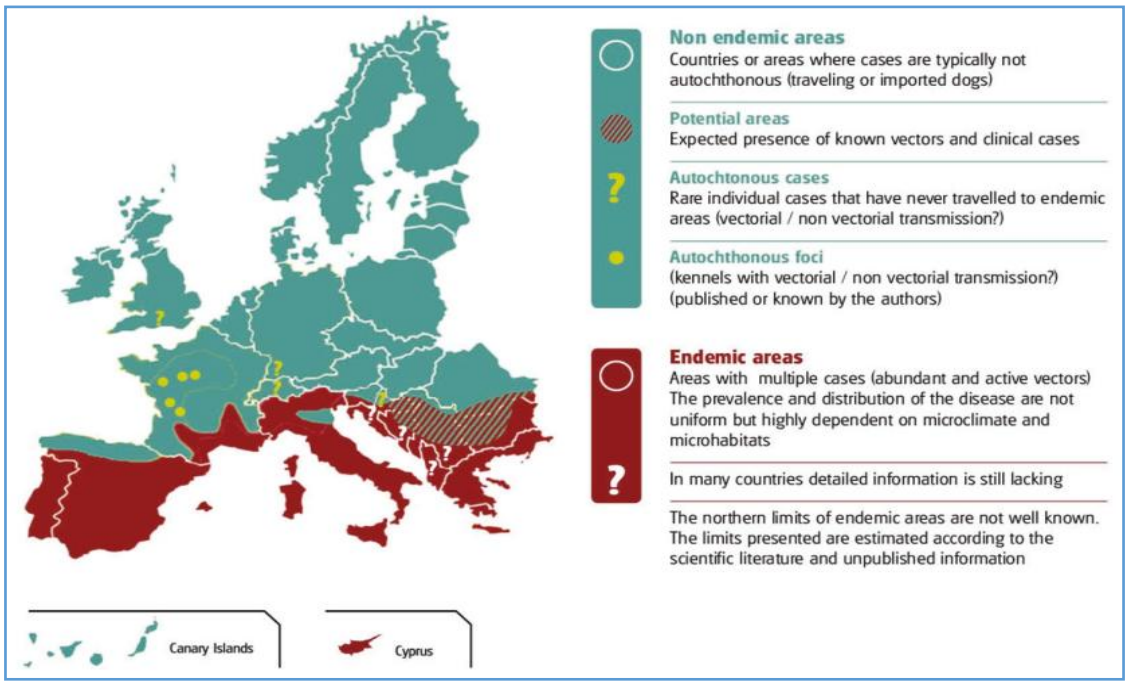


Figure 11 : Répartition de la leishmaniose canine en Europe (Solano-Gallego, 2011).

2.1.1.2. Prévalence mondiale de la leishmaniose canine

Concernant la leishmaniose canine, la séroprévalence à *L. infantum* est similaire dans tous les pays de la Méditerranée occidentale, avec des variations d'une région à une autre, selon les aspects écologiques (Alvar, 2001).

Tableau 4 : Prévalences de la leishmaniose canine dans les pays européens méditerranéens.

Pays	Province	Prévalence %	Années	Références
Portugal*	Lisbonne	8,5	/	Alvar, 2001
	dans 18 provinces	6,31	2009	CortesYolanda Vaz et *al*, 2012
	Nord-est	21.3	2008-2009	Sousaa et *al*, 2011
Espagne*	Madrid	8.1	2006-2007	Galvez et *al*, 2010
	Lleida	33.1	2009	Ballart et *al*, 2012
	Priorato	18	/	Alvar, 2001
Italie*	Turin, Casale, Ivrea	4.5, 3.9, 5.8 respectivement	2000-2001	Ferroglio et *al*, 2005
	Pouilles	14.5	/	Alvar, 2001
	Toscane	24	/	Alvar, 2001
France*	foyer des Cévennes	17.9 et 9.6	1999	Keck, N. et Dereure, 2003
	Alpes Maritimes	3 à 17	/	Alvar, 2001
Grèce	Plusieurs provinces	Entre 2.5 et 30.12	3 mois/an durant 14 ans	Athanasiou et *al*, 2012
Malte	Gozo	62	/	Headington et *al*, 2002
Turquie	Corum	de 0,0 à 28, 26	2002	Ertabaklar et *al*, 2005

Ces données sérologiques suggèrent que sur 15 millions de chiens dans ces pays, une estimation prudente serait de 2,5 millions de chiens infectés (16,7%).

Pour certains pays du Maghreb, les prévalences sont synthétisées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Prévalences de la leishmaniose canine en Tunisie et au Maroc

Pays	Province	Prévalence %	Années	Références
Tunisie	Kairouan	20,9 par PCR et 12 par IFI	2005	Chargui et *al*, 2009
	Sfax	6	/	Chargui et *al*, 2007
Maroc	Khémisset, Taza, Taounate	16,71 16,09 15,98	1996	Sahibi et *al*, 2001
	Fès	24,59 par IFI et 9,83 au test rapide	2009	Hajiba et *al*, 2014

Dans le Moyen-Orient et les pays entourant le bassin méditerranéen, la séroprévalence varie de 1% à 24% (Baneth et *al*, 1998 ; Abedelmajeed Nasereddin et *al*, 2005). Dans les pays du Moyen-Orient bordant le bassin méditerranéen, en 2005 au Palestine par exemple, on a enregistré une prévalence de 16.7%. Une hausse de séroprévalence a été signalée en Amérique du Sud:

- **73%** à São Vicente Férrer, Brésil (Silva et *al*, 2007)
- **40.3%** à Pernambuco, Brésil (Dantas-Torres et *al*, 2006)
- **33%** dans l'île de Margarita, au Venezuela (Zerpa, 2000).

Nous signalerons que l'incidence annuelle de la leishmaniose canine n'a été étudiée que dans quelques régions, par exemple, à Madrid, 30 sur 1000 chiens ont été trouvés infectés en une saison (Amela, 1995). L'incidence globale de l'infection par *Leishmania* dans la province de Jequié, au nord-est du Brésil, était de 6,55% par an, bien que l'incidence varie fortement entre les grappes de la ville (Paranhos-Silva, 1998). La séroprévalence réelle du nombre de chiens infectés dans les zones endémiques serait vraisemblablement sous-estimée (Dye, 1996). Comme le confirme les chiffres obtenus dans le dépistage, par PCR, des chiens séronégatifs, qui montrent des prévalences de 80% (24 sur 30) à Marseille, France (Berrahal, 1996), et 67% à Majorque, Espagne (Solano-Gallego, 2001).

2.2.1.3. Incidence mondiale des leishmanioses humaines

Selon l'OMS, 350 millions de personnes sont exposées au risque de contamination (6% de la population mondiale), 12 millions sont infectées. Le nombre de nouveaux cas par an diagnostiqués cliniquement s'élève à 2 millions (500 000 pour la LVH = leishmaniose viscérale humaine et 1500 000 pour la LCH = leishmaniose cutanée humaine). Selon les estimations, sur les 500 000 nouveaux cas (LVH) développés chaque année, 50 000 sont mortels. De grandes épidémies meurtrières sont survenues en Inde (300 000 cas entre 1977 et 1980), avec une mortalité de 3 % et au Soudan (100 000 morts entre 1989 et 1994) (OMS, 2010).

2.1.1.4. Répartition géographique en Algérie

Les leishmanioses sont signalées sur tout le territoire national. La leishmaniose viscérale infantile et la leishmaniose cutanée sporadique se répartissent sur toute la partie nord du pays et leur distribution géographique correspond à celle de la leishmaniose canine. Bien que leur fréquence varie d'une région à l'autre, il est cependant important de noter que le foyer de la Grande Kabylie regroupe à lui seul près de 50 % des cas recensés. Cette affection qui touche habituellement des enfants malnutris, vivants en zone rurale, affecte depuis quelques années de plus en plus de sujets n'ayant jamais quitté les grandes zones urbaines (Harrat et *al*, 2003). Ceci a été confirmé par Achour-Barciche et *al.* (2009) en Kabylie, région d'endémie de la leishmaniose viscérale.

Les leishmanioses cutanées sporadiques du nord moins fréquentes et bénignes avec 485 cas en 2004–2005 (source INSP), présentes toute l'année à l'état endémique dans le Nord du pays, ont augmenté timidement annuellement et ont touché tout le littoral et le tell algérien (Tizi-Ouzou, Bouira, Bordj-Menail et Alger) (Achour Barchiche et *al*, 2009).

Quant à la leishmaniose cutanée, Benikhlef et *al.* (2004) ont rapporté qu'il existait deux formes endémiques : la leishmaniose cutanée du nord à *L. infantum* et la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*, répandue dans les régions steppiques et sahariennes. La leishmaniose cutanée du nord se déclare volontiers sous forme de cas sporadiques le long du littoral algérien. Elle est due dans la majorité des cas à *L. infantum* zymodème MON-24 **(**Benikhlef et *al*, 2004).

2.1.1.5. Prévalence de la leishmaniose canine en Algérie

En comparant les résultats obtenus lors des enquêtes antérieures dans la même région, on note une recrudescence alarmante de l'enzootie canine. Les fluctuations annuelles de la leishmaniose canine varient d'une saison à l'autre avec cependant, une augmentation croissante du nombre de cas de la maladie au cours des dernières années (Harrat et *al*, 2003).

Tableau 6 : Prévalences de la leishmaniose canine en Algérie.

Région d'étude	Prévalence (%)	Année d'étude	Référence
Alger	37	1990-1997	Harrat et *al*, 2003
Alger	CN errant (11.7) CN de la GN (9.7) CN de ferme (5.9)	2004-2005	Adel et *al*, 2010
Alger	25.1	2005-2008	Ait oudhia et *al*, 2009
Tizi-Ouzou	10 à 67	2007-2010	Mouloua, 2014
Alger (Fourrière canine)	40	2010	Djoudi et *al*, 2010

CN : Chien
GN : Gendarmerie Nationale

2.1.1.6. Incidence des leishmanioses humaines en Algérie

Les leishmanioses constituent un véritable problème de santé publique en Algérie avec près de 40 000 cas par an (Harrat, 2006 *in* Izri et *al*, 2007).

a. Leishmaniose viscérale

Selon les données de l'INSP, de 2000 à 2010, le nombre de cas de leishmanioses viscérales recensé au niveau national a connu de grandes fluctuations, il est passé de 220 en 2000 à 127 cas en 2001 et de 80 en 2008 à 129 cas en 2010. Il en est de même pour l'incidence annuelle qui pour 105 habitants a enregistré aussi des variations. Elle est passée de 0,42 en 2001 à 0,28 en 2006 pour augmenter à 0,31 en 2007 et à 0,33 en 2010.

b. Leishmaniose cutanée

L'Algérie a connu une recrudescence alarmante de la leishmaniose cutanée à la fin des années 1990. De 2000 à 2004, 45 363 cas ont été notifies par l'INSP (Zait et *al*, 2009).

2.1.2. Epidémiologie analytique

2.1.2.1. Espèces responsables des leishmanioses

Les espèces responsables de la leishmaniose canine sont nombreuses. On rapporte au moins 12 espèces de *Leishmania* isolées de chiens infectés, cependant *L. infantum* reste de loin l'agent étiologique le plus fréquemment incriminé (syn. *L. chagasi*) (Chappuis, 2007).

Pour la leishmaniose viscérale, il existe 3 espèces qui sont incriminées (Carre et *al*, 2010) :

- *L. infantum* (bassin méditerranéen, Afrique sub-saharienne, Amérique du Sud, Asie centrale, Chine) ;
- *L. donovani* (sous continent indien, Chine et Afrique de l'Est) ;
- *L. chagasi* dans le nouveau monde.

Pour la leishmaniose cutanée, les espèces rencontrées dans l'ancien monde :

- *L. major* : largement répandue au Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie), il s'agit d'un foyer homogène (*L. major* MON-25) ;
- *L. tropica* : a une répartition plus limitée, constituée de nombreux petits foyers du quart Nort-Est du bassin méditerranéen, et surtout du moyen Orient ;
- *L. aethiopica*, ne circule qu'en Afrique de l'Est et peut donner aussi bien une leishmaniose cutanée localisée qu'une leishmaniose cutanée diffuse (Buffet, 2008).

Quant aux *e*spèces incriminées dans le nouveau monde, on peut citer : *L. braziliensis* responsable de la leishmaniose cutanéomuqueuse (Ashford, 2000).

***NB** : Les espèces réservoirs et les vecteurs des leishmanies ont été traitées dans le chapitre 1.*

2.1.2.2. Modes de transmission

La transmission de leishmanies se fait fondamentalement par piqûre infectante de phlébotomes, tant pour le chien, que pour l'homme ; aucun autre arthropode n'a, dans les conditions naturelles, été impliqué dans cette transmission. La transmission par contact direct avec les sécrétions nasales et oculaires du chien ou avec les lésions de rongeurs serait également possible. (Bourdoiseau et *al*, 2008; Carre et *al*, 2010). L'OMS reconnait deux modes de transmission (OMS, 2007) :

- **Anthroponotique** : le vecteur s'infecte en se nourrissant sur une personne infectée, puis transmet l'infection en se nourrissant sur une personne non infectée, il y a donc un effet de groupe.

- **Zoonotique** : le vecteur se nourrit sur un autre hôte réservoir potentiel, éventuellement l'homme après s'être nourrit sur un animal infecté.

D'autres modes de contamination peuvent exister mais sont beaucoup moins fréquents comme : L'inoculation parentérale accidentelle et le partage de seringues contaminées (Carre et *al*, 2010). La transmission congénitale de la mère à l'enfant ou bien lors de la transfusion sanguine est très rare. En fin, la transmission sexuelle serait possible mais elle resterait vraiment très exceptionnelle (Silva et *al*, 2009).

2.1.2.3. Facteurs de risque

2.1.2.3.1. Pour l'animal (chien)

2.1.2.3.1.1. Facteurs intrinsèques

a. Age : De nombreuses études ont révélé que les chiens adultes sont plus particulièrement touchés par la maladie. En 2009, une étude a montré que les chiens âgés de plus de 2 ans ont maintenu un risque plus élevé de séropositivité (OR = 5,39, IC 95% de 2,63 à 11,05) alors que ceux de moins de deux ans étaient moins souvent infectés, cependant le groupe d'âge le plus infecté était de 5 à 8 ans (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012). Galvez et *al.* en 2010, ont observé que la séroprévalence suit une répartition bimodale par rapport à l'âge, avec un pic apparaissant chez les jeunes chiens (1-2 ans) et le deuxième plus évident chez les chiens les plus âgés (7-8 ans) (Galvez et *al*, 2010). Les animaux plus âgés présentaient un risque de séropositivité deux fois plus élevé que les jeunes chiens (Cardoso et *al*, 2004).

b. Sexe : Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative dans la prévalence entre les mâles et les femelles (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012).

***c. Race* :** En théorie, toutes les races de chiens sont sensibles à l'infection par *Leishmania* bien que certaines races, dans des zones d'endémie, comme les « Ibiza Hound » et les « chiens de races croisées» ont développé un certain niveau de résistance (Solano-Gallego et *al*, 2000). Denerolle, a montré une incidence chez le Boxer plus importante par rapport à la population de référence (Denerolle, 2003). Alors que Cortes *et al.* ont montré des différences significatives dans le risque d'infection entre les classes de race : le fait d'être de race croisée pourrait être un facteur de protection (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012).

d. Pelage : Une augmentation du risque chez les animaux dont la fourrure est de type « court » ou « moyen » a été constatée (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012)**,** dans la mesure où les phlébotomes préfèrent se nourrir sur des zones peu envahies par les poils (Killick-Kendrick, 1999).

2.1.2.3.1.2. Facteurs extrinsèques

a. Mode de vie : Le risque augmente avec l'augmentation du niveau d'exposition à l'environnement extérieur. Vivre principalement ou exclusivement à l'extérieur est associée à un risque accru de contracter la leishmaniose (P <0,001), OR = 2,53 (IC 95% 1,80 à 3,55), comparativement à vivre à l'intérieur. (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012). C'est le cas des chiens errants, d'une part, du fait de leur errance qui augmenterait le temps d'exposition aux piqûres de phlébotomes infectés et d'autre part, à leurs conditions physiques précaires qui font d'eux des cibles faciles à l'infection et aux piqûres de phlébotomes (Adel et *al*, 2010).

b. Utilisation d'insecticides : les chiens non protégés par des insecticides efficaces ont présenté une prévalence plus élevée (7,08%) que ceux utilisant d'autres insecticides (5,05%). Néanmoins, ce dernier facteur reste moins important (CortesYolanda Vaz et *al*, 2012).

c. L'abondance des vecteurs : Les phlébotomes sont particulièrement actifs dans des zones protégées du vent, au crépuscule, près du sol.

d. La saison : les phlébotomes adultes sont actifs l'été en période nocturne

e. L'environnement : pendant la journée, les phlébotomes se réfugient dans les interstices des vieux murs, du sol et dans les terriers. La larve a besoin d'humus, de déchets organiques et d'eau. Le sol humide des caves, les tas d'ordures constituent les gîtes larvaires les plus fréquents (Catheland, 2005).

2.1.2.3.2. Pour l'homme

Il existe plusieurs facteurs susceptibles d'augmenter le risque de développer la maladie, on note :

- La susceptibilité génétique de l'hôte (HLA, gènes de cytokines impliqués…) et sa réponse immune (Carre et *al*, 2010).

- Les mouvements de population, à titre d'exemple, un séjour en Kabylie évoque une infection à *L. infantum* alors qu'un séjour dans une ville plus méridionale d'Algérie est plus évocateur d'une infection à *L. major* (Buffet, 2008) ;
- L'habitude de tenir les chiens et autres animaux domestiques à l'intérieur de l'habitation peut constituer un facteur de risque, puisque les chiens sont les hôtes réservoirs de *L. infantum* et qu'ils attirent les phlébotomes ;
- La présence de poulaillers à proximité du logement car ils constituent l'un des principaux lieux où le phlébotome se nourrit et se repose, ce qui accroît le risque de contact des phlébotomes avec les chiens et les humains (OMS, 2010) ;
- La dénutrition, quant à elle, participe à l'affaiblissement du système immunitaire, ce qui favorise l'infection, la morbidité et la mortalité. Les résultats d'une étude en 2005 réalisée sur des souris déficientes en fer, zinc et protéines, ont montré que ces carences pouvaient limiter l'efficacité de la barrière lymphatique et ainsi accélérer l'atteinte des viscères (Desjeux et *al*, 2003; Alvar et *al*, 2006) ;
- Enfin, les transformations écologiques peuvent avoir pour conséquence soit une augmentation, soit une diminution de l'incidence de la maladie (OMS, 2010).

2.2. Changement climatique et évolution de la leishmaniose

Selon l'OMS, la leishmaniose est une maladie influencée par le climat ; elle occupe un «espace climatique» caractéristique qui dépend fortement des changements des facteurs climatiques comme le degré de précipitation, la température et le taux d'humidité. La conjugaison du réchauffement mondial et de la dégradation des terres va vraisemblablement modifier l'épidémiologie de la leishmaniose par un certain nombre de mécanismes : En premier lieu, les changements affectant la température, la pluviométrie et le degré d'humidité peuvent avoir de puissants effets sur l'écologie des vecteurs et des hôtes réservoirs en modifiant leur distribution et en influant sur leur survie et la taille de leurs populations. En second lieu, de petites variations de température peuvent avoir une profonde influence sur le cycle de développement des promastigotes chez le phlébotome et permettre éventuellement la transmission du parasite dans des régions où la maladie n'était pas jusqu'ici endémique. Enfin, en troisième lieu, la sécheresse, la famine et les inondations consécutives au changement des conditions climatiques pourraient entraîner des déplacements et des migrations de grande ampleur vers des zones de transmission de la leishmaniose. Selon les prévisions, un changement climatique à long terme devrait étendre la zone où sévissent actuellement les leishmanioses et leurs phlébotomes vecteurs à des régions qui sont actuellement exemptes des unes et des autres (OMS, 2010). Des nuits plus chaudes et

des températures plus élevées ont pour conséquence, dans les zones que les vecteurs occupent déjà, plus de risques de transmission pendant des périodes plus longues (Epstein, 2000).

CHAPITRE 3 : IMMUNOLOGIE ET PATHOGENESE

3.1. Réponse immunitaire au cours des leishmanioses

3.1.1. Les réactions immunitaires lors des leishmanioses : modèle général

La réponse immunologique commence par la présentation aux cellules immunocompétentes des antigènes leishmaniens. Les antigènes majeurs du parasite sont la gp63 et le LPG ou lipophosphoglycane de surface. La gp63, glycoprotéine majeure de surface de la leishmanie, est un antigène essentiel impliqué dans le processus d'échappement au système de défense et dans sa capacité à le coloniser. En outre, la gp63 est l'un des antigènes susceptibles d'induire une réaction immunitaire favorable. Elle est l'un des antigènes majeurs présentés par les CPA (cellules présentatrices d'antigènes) au système immunitaire compétent (Bourdoiseau, 2000).

3.1.1.1. Réponse cutanée initiale et dissémination viscérale

Au niveau de la peau, les leishmanies interagissent en premier lieu avec les cellules résidentes, c'est-à-dire les kératinocytes, les macrophages dermiques et les cellules dendritiques, ainsi qu'avec de nombreux facteurs solubles.

En réponse à *Leishmania*, les kératinocytes ont notamment été associés à la production de médiateurs immuno-modulateurs comme l'IL-12, l'IL-1b, l'ostéopontine, l'IL-4 et l'IL-6, participant ainsi à l'initiation d'une immunité protectrice (Ehrchen et *al*, 2010).

L'activation des protéines du complément par la voie classique entraîne la fixation de C3 sur la membrane plasmique des parasites et son clivage en C3b, capable de se fixer au LPG ou à la protéine gp63 et de déclencher la formation du complexe lytique C5b-9 aboutissant à la lyse parasitaire (Pearson et Steigbigel, 1980). Les promastigotes qui échappent à l'action délétère du complément infectent leurs cellules cibles capables de phagocytose.

Après infection par *Leishmania*, Les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques s'immobilisent en réponse aux PAMP (Pathogen associated molecular patterns) et phagocytent rapidement un grand nombre de leishmanies. Des travaux ont démontré que ce sont ces cellules dendritiques dermiques Langerhans qui migrent vers les ganglions lymphatiques et participent à la mise en place d'une immunité protectrice contre *L. major* (Ritter et *al*, 2004; Brewig et *al*, 2009). L'implication des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermiques dans l'initiation d'une réponse immune spécifique contre les leishmanies viscérotropes n'est pas documentée.

Les macrophages dermiques phagocytent également les promastigotes par un mécanisme dépendant du CR3 (Locksley et *al*, 1988). Néanmoins, les cibles principales des leishmanies ne sont pas les macrophages résidents, mais les macrophages migrants en provenance de la circulation sanguine. Les promastigotes de *Leishmania* sont notamment capables d'induire la production de CXCL1 agissant comme un chimio-attractant pour les monocytes et neutrophiles (Racoosin et Beverley, 1997).

Les polynucléaires neutrophiles, l'un des premiers types cellulaires à migrer vers le site de l'infection sont capables de phagocyter les leishmanies (Chang, 1981). Une fois ingérées, les leishmanies peuvent être détruites par des enzymes protéolytiques ainsi que par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les neutrophiles ayant phagocyté des leishmanies sécrètent de l'IL-8, dans le but d'attirer d'autres neutrophiles au site de l'infection (Laufs et *al*, 2002). Les neutrophiles sont des cellules à demi-vie courte, du fait d'un mécanisme apoptotique déclenché après 6 à 10 heures (Squier et *al*, 1995). Cependant, les leishmanies peuvent prolonger la vie des neutrophiles de 2 à 3 jours (Aga et *al*, 2002). L'intérêt pour les leishmanies est de laisser le temps aux neutrophiles notamment, de recruter des monocytes/macrophages par la sécrétion de chimiokines (Scapini et *al*, 2000).

Une fois les macrophages au contact des neutrophiles infectés, ceux-ci entrent en apoptose et sont alors phagocytés (Fadok et *al*, 1992). L'ingestion de cellules apoptotiques n'active pas la machinerie microbicide des macrophages (Meagher et *al*, 1992) et serait donc pour les leishmanies une manière idéale d'entrer silencieusement dans leurs cellules hôtes préférentielles (Laskay et *al*, 2003; Gueirard et *al*, 2008). Les neutrophiles infectés phagocytés par les cellules dendritiques seraient également capables de réprimer les propriétés fonctionnelles de ces dernières (Ribeiro-Gomes et *al*, 2012) (Figure 12).

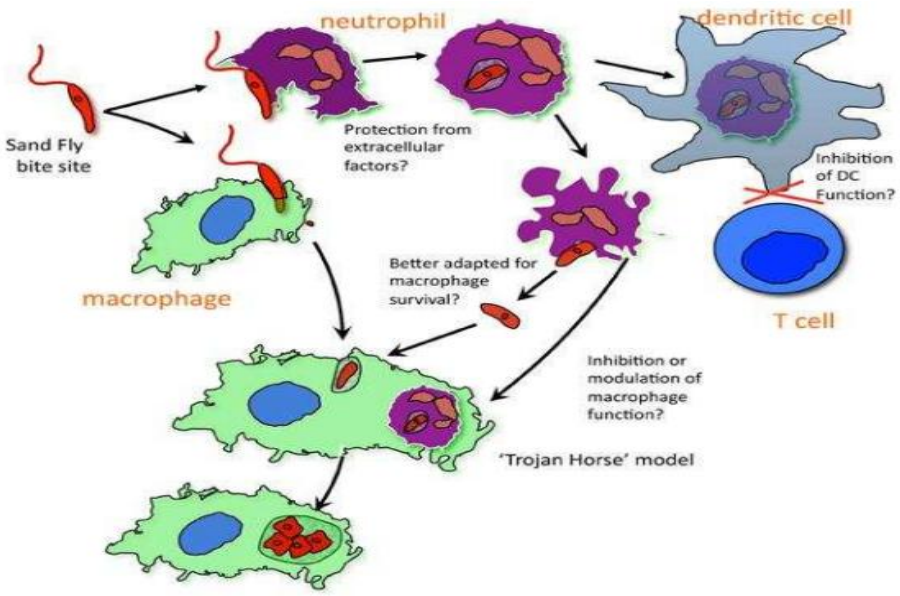


Figure 12 : Rôle des neutrophiles au niveau du site de transmission des *Leishmania*. D'après Ribeiro-Gomes et *al*, 2012.

En outre, les promastigotes de *L. donovani* sont capables d'induire la sécrétion par les neutrophiles d'un piège extracellulaire, constitué de structures filamenteuses, capables de les piéger et les tuer (Guimaraes-Costa et *al*, 2009). Ce mécanisme permettrait de contenir l'infection au niveau du site de l'inoculation, mais pourrait également être un moyen d'immobiliser les promastigotes afin de faciliter leur phagocytose par les phagocytes mononucléés recrutés au niveau du site infectieux (Gabriel et *al*, 2010).

La femelle phlébotome inocule, lors de son repas sanguin, certains éléments salivaires capables d'influencer les défenses innées de l'hôte au niveau de la peau. Des extraits de glande salivaire de *L. longipalpis* ont été notamment démontrés comme inducteurs de la sécrétion de CCL2, attirant ainsi les monocytes au niveau du site de la piqûre (Teixeira et *al*, 2005). Le maxadilan produit par *L. longipalpis* présente quant à lui un effet vasodilatateur (Lerner et Shoemaker, 1992), et pourrait donc favoriser l'infiltrat des neutrophiles et monocytes, cellules cibles des leishmanies assurant leur colonisation des viscères.

Ainsi, ces différents acteurs moléculaires et cellulaires permettent l'organisation d'une réponse locale, avec le recrutement en premier lieu des polynucléaires neutrophiles entre 1 et 24 heures après infection. L'infiltrat devient ensuite principalement mononucléaire avec l'afflux majoritaire après 48 heures de monocytes, qui s'organisent en nodules afin de circonscrire les parasites. Des granulomes bien organisés sont observés et corrèlent avec la disparition des leishmanies, comme observé après 45 jours chez le hamster syrien infecté par *L. donovani* (Laurenti et *al*, 1990). Cependant, cette réponse spécifique et efficace s'organise en un temps relativement long

permettant la dissémination des leishmanies viscérotropes avant la clairance parasitaire cutanée. Chez l'immunodéprimé, les leishmanies sont aussi disséminées via la circulation sanguine dans des tissus moins typiques tels que la peau, l'estomac et les intestins, les poumons ou les cavités pleurale ou péritonéale (Rosenthal *et al*, 2000).

3.1.1.2. Immunité innée

a. Rôle des macrophages

Le premier moyen de défense de l'hôte est une réponse immunitaire non spécifique. Suite à l'infection, les macrophages tissulaires ou sanguins constituent la première ligne de défense, car ils ont pour fonction de phagocyter les leishmanies et de présenter leurs antigènes aux lymphocytes, initiant ainsi une réponse plus ou moins spécifique de ces cellules. Le macrophage joue le rôle de CPA aux lymphocytes, en particulier LTh qu'il stimule grâce à l'IL-1 (Mossalayi et Appriou, 1999; Bourdoiseau, 2000). La survie des parasites à l'intérieur des macrophages montre qu'ils ont résisté à l'action lytique exercée par l'environnement intra-cytoplasmique (pH acide : 4,5-5,0, enzymes lysosomales, hydrolases…etc). En effet, plusieurs mécanismes permettent aux leishmanies d'y échapper. Mais une réponse immunitaire spécifique, cellulaire et humorale, se met également en place (Mossalayi et Appriou, 1999; Baneth, 2004).

b. Rôle des cellules de Langerhans

On considère généralement que la présentation des antigènes est également effectuée par les cellules de Langerhans, mais cette conception est mise en doute par certains auteurs ayant étudié le processus chez des souris soumises à l'infection par *L. major* (Moreno, 2007). La réponse initiale à l'infection serait le fait des cellules dendritiques dermiques, tandis que les cellules épidermiques de Langerhans seraient responsables des phénomènes d'évasion immunitaire des parasites : les promastigotes qui ont pénétré dans les cellules de Langerhans échapperaient aux réactions immunitaires. Cette hypothèse rendrait compte de l'incapacité des cellules de Langerhans activées par les antigènes leishmaniens de conférer l'immunité.

c. Rôle des cellules NK

Les cellules dendritiques élaborent de l'IL-12, qui active les cellules NK, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Les NK sécrètent de l'IFN-γ qui active les macrophages, puis lysent

les macrophages parasités ; les polynucléaires activés par l'IFN-γ, détruisent les leishmanies par action oxydative (monoxyde d'azote : NO) (Euzéby, 2008). Les lymphocytes NK sont l'un des premiers types cellulaires recrutés au niveau du site infectieux. Plusieurs études ont montré que des promastigotes vivants de *Leishmania* sont capables de stimuler les cellules NK qui sécrètent précocement l'IFN-γ influençant positivement les défenses de l'hôte (Nylen et *al*, 2003).

3.1.1.3. Immunité spécifique

Lorsque l'agent ne peut être éliminé par l'activité antimicrobienne non spécifique, une réponse spécifique peut être établie, dirigée en partie par les cytokines et les anticorps dérivés des lymphocytes reconnaissant de manière spécifique les antigènes parasitaires exprimés sur les macrophages (Mossalayi et Appriou, 1999).

L. infantum semble induire une réponse mixte Th1 et Th2. C'est l'équilibre atteint entre ces deux types d'activités suite à la détection des leishmanies, qui va conditionner le devenir de l'animal : élimination du parasite, portage asymptomatique ou expression de la maladie. Des chercheurs se sont attachés à établir un lien entre les profils cliniques et biochimiques des chiens infectés, et la réaction immunitaire mise en place. Il est apparu que les individus résistants ou asymptomatiques développaient une forte réaction immunitaire à médiation cellulaire, alors que chez les individus sensibles, la réaction cellulaire diminuait au profit d'une réaction humorale non protectrice. Nous verrons d'ailleurs qu'il existe une corrélation positive entre le taux d'anticorps plasmatiques anti-*leishmania,* l'expression des signes cliniques et la charge parasitaire. L'orientation vers un type de réaction immunitaire chez un individu dépend de nombreux facteurs, dont : la génétique, les chiens de race Ibizan hound présentent une résistance accrue à la maladie clinique, due à la prédominance d'une réaction immunitaire de type cellulaire (Solano-Gallego, 2000); L'environnement en cytokines; le parasite lui-même : sa virulence, ses moyens d'échappement, la charge parasitaire; la présence d'infections concomitantes ou d'états d'immunodépression ou d'autres facteurs dépresseurs comme la sous-alimentation seraient favorisants. Il n'existe donc pas de réponse immunitaire « type », mais son orientation correcte est primordiale pour instaurer une résistance.

3.1.1.3.1. Mécanismes immunitaires spécifiques lors d'infestation par des leishmanies

Les promastigotes infectants sont internalisés par le macrophage et se multiplient dans une vacuole parasitophore par détournement du mécanisme de phagocytose. Le macrophage joue

alors le rôle de CPA. Il présente les antigènes du parasite par le CMH de classe II à des récepteurs antigéniques CD4 de LTh naïfs situés à proximité. Cette présentation d'antigène, associée à une production d'IL-1 et IL-12 par le macrophage, entraîne la prolifération et la différentiation du LTh. A ce niveau-là, deux orientations sont possibles (**figure 13**) :

a. L'orientation vers un profil Th1 :

Dans un environnement riche en IL-12, le LTh se différencie en LTh1. Ce dernier produit des cytokines telles que l'IFNγ, l'IL-2 et le TNFα. Ces cytokines jouent un rôle crucial dans l'activation des mécanismes à médiation cellulaire et l'inhibition de la réponse humorale. Il a été montré que l'expression de l'IFNγ dans les nœuds lymphatiques est corrélée à une charge parasitaire faible et à une protection contre la leishmaniose clinique. Cet interféron a plusieurs rôles :

- Il favorise l'activité leishmanicide des macrophages infectés ;
- Il participe à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) ;
- Il entraîne la production des IgG2, qui ont la propriété d'inhiber *in vitro* la prolifération et de diminuer la viabilité des amastigotes et promastigotes de *L. infantum ;*
- Il inhibe la réaction immunitaire de type Th2 (Freyburger, 2012).

b. L'orientation vers un profil de type Th2 :

Dans un environnement riche en IL-4, le LTh se différencie en LTh2. Ce dernier produit des cytokines dont les principales sont l'IL-4, l'IL-10, l'IL-5 et l'IL-6. Elles entraînent une synthèse d'immunoglobulines de types IgG1. L'IL-4 et l'IL-10 inhibent la réponse immunitaire Th1. Enfin, l'IL-10 favorise la dissémination parasitaire par son action antagoniste à celle de l'IFNγ au niveau du macrophage.

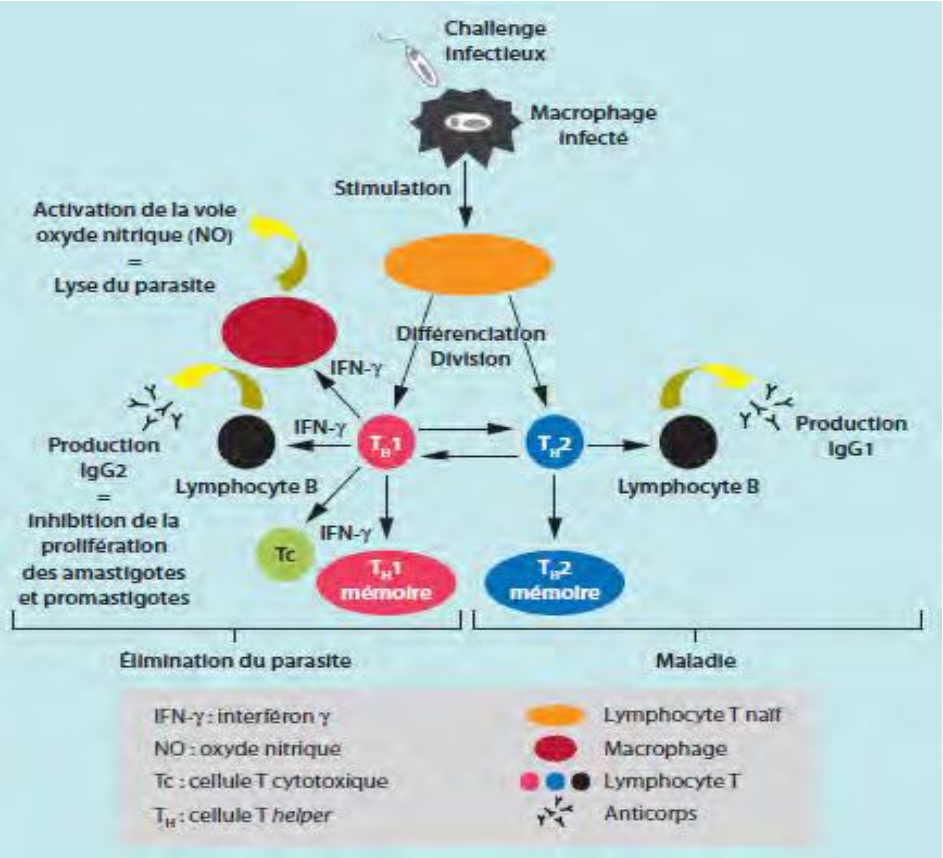


Figure 13 : Mécanismes immunitaires simplifiés lors d'infestation par des leishmanies (Freyburger, 2012, d'après VIRBAC).

3.1.1.3.2. Rôle central du macrophage dans le contrôle de l'infection par les leishmanies

Le macrophage est une cellule-clé **(figure 14).** Son premier rôle est de présenter les antigènes parasitaires aux lymphocytes naïfs, grâce aux molécules du CMH-II situés à sa surface. Il est aussi capable d'induire la mort des parasites intra et extracellulaires, par un mécanisme cytotoxique indépendant de l'oxygène (la production d'intermédiaires réactionnels de l'oxygène ne semble pas avoir de rôle très important dans les macrophages canins). Ce mécanisme repose sur une réaction enzymatique dont le substrat est la L-arginine.

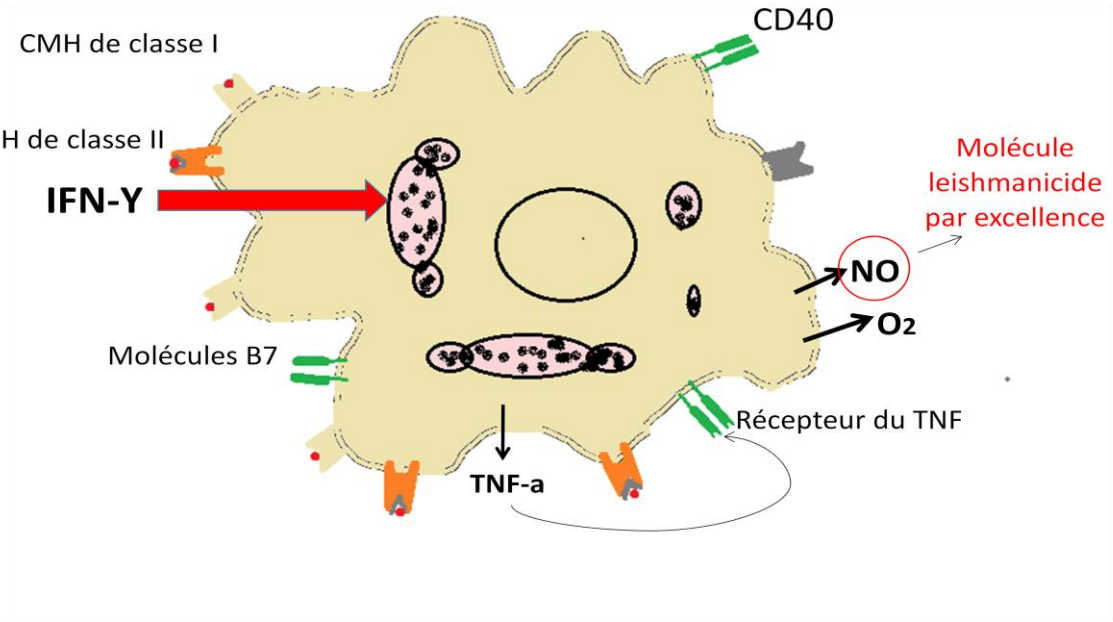


Figure 14 : Macrophage activé (Synthèse personnelle).

Lorsque le profil immunitaire est de type Th1, l'IFNγ et le TNFα induisent l'activation de l'enzyme NO synthase (appelée iNOS), qui synthétise de l'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine. Ce NO est cytotoxique pour les amastigotes intracellulaires, dont il entraîne l'apoptose. Au contraire, un environnement de type Th2 (présence d'IL-10) active une autre enzyme, une arginase, qui synthétise des polyamides à partir de la L-arginine. Ces polyamides constituent des nutriments pour les leishmanies, permettant ainsi leur multiplication **(figure 15).** Chez les individus sensibles, la production de NO est donc déficiente, le parasite peut se multiplier dans les macrophages, se différencier en amastigotes et se libérer pour aller infecter les cellules voisines.

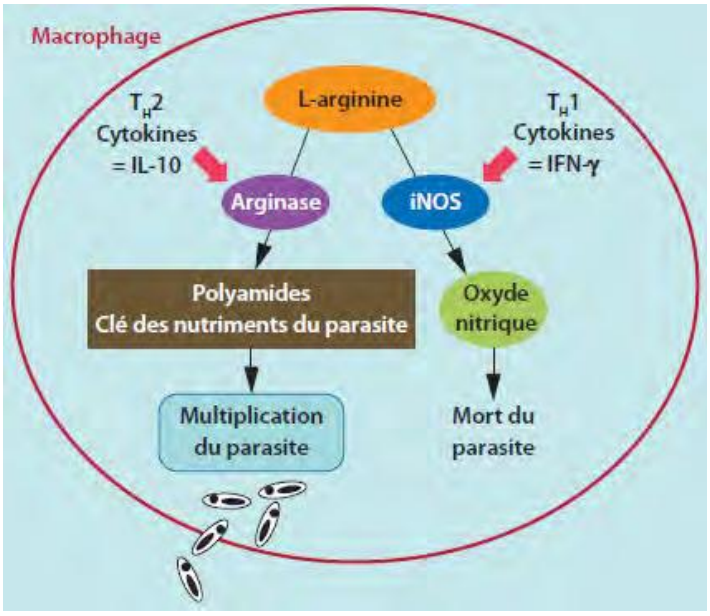


Figure 15 : Réactions enzymatiques au sein du macrophage et impact des cytokines Th1 et Th2 sur la survie ou la lyse des leishmanies (Freyburger, 2012, d'après VIRBAC).

3.1.2. Mécanismes d'échappement des défenses de l'hôte et persistance parasitaire

3.1.2.1. Échappement au complément

Les promastigotes procycliques ne peuvent pas résister à l'action du complément alors que les formes métacycliques infestantes peuvent y échapper (Puentes et *al*, 1989). La gp63 abondamment exprimée au stade de promastigotes métacycliques, favorise la protéolyse de C3b et sa conversion en molécule inactive C3bi, favorisant ainsi l'opsonisation et l'internalisation du parasite (Puentes et *al*, 1988; Brittingham et *al*, 1999). Les promastigotes de *L. major* déficients en gp63 dérivés de cultures *in vitro* de phlébotomes présentent une sensibilité accrue à la lyse induite par le complément. A l'inverse, des mutants sur-exprimant la gp63 sont significativement plus résistants à la lyse (Joshi et *al*, 2002).

Chez certaines espèces de leishmanies, la résistance au complément serait liée à l'élongation du LPG qui survient lors de la métacyclogénèse. Il forme alors un glycocalix de 10 nm d'épaisseur dont l'encombrement stérique semble empêcher l'accès des complexes d'attaque C5b-9 à la membrane plasmique (Sacks, 1992). Ainsi, la perte du LPG induit une susceptibilité à la lyse par le complément chez l'Homme, en dépit de l'abondance de gp63 (Spath et *al*, 2003).

Enfin, les promastigotes possèdent sur la face externe de leur membrane plasmique des protéines kinases capables d'inactiver C3 et C3b par phosphorylation (Hermoso et *al*, 1991) (Figure 16 A).

3.1.2.2. Résistance à la lyse intracellulaire

Les leishmanies ont développé un mécanisme de lutte contre la fusion phago-lysosomale une fois phagocytées, notamment en inhibant la fusion des phagosomes avec les organelles endocytiques enrichies en hydrolases. Ce mécanisme dépend du LPG à la surface des promastigotes qui prévient la formation ou la perturbation de micro-domaines lipidiques dans la membrane du phagosome (Desjardins et *al*, 1997; Arshad et *al*, 2011). En outre, des leishmanies observées dans le cytosol dans différentes études (Desjardins et *al*, 1997; Dermine et *al*, 2005; Arshad et *al*, 2011) suggèrent l'existence d'un autre mécanisme d'échappement à la lyse phago-lysosomales, probablement dépendant d'une cytolysine, la leishporine, décrite dans différentes espèces leishmaniennes (Almeida-Campos et Horta, 2000; Noronha et *al*, 2000).

Les promastigotes et amastigotes de différentes espèces sont également capables de résister partiellement aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Holzmuller et *al*, 2005; 2006; Giudice et *al*, 2007; Mukbel et *al*, 2007). Ceci peut s'expliquer par l'action du LPG et de la gp63 sur la protéine kinase C et ses substrats, par la possible séquestration des espèces réactives de

l'oxygène par les phosphoglycanes (Turco, 1999; Spath et *al*, 2003) et l'expression de la superoxyde dismutase, de la catalase et/ou des péroxiredoxines associées à la survie des leishmanies dans les macrophages (Barr et Gedamu, 2003; Adak et Datta, 2005), (Figure 16 B).

3.1.2.3. Répression de la présentation antigénique

La mise en place d'une réponse efficace acquise requiert la présentation d'antigènes leishmaniens aux lymphocytes. Les leishmanies de différentes espèces sont capables de réprimer cette étape de présentation antigénique au niveau des cellules dendritiques et de macrophages infectés (Meier et *al*, 2003; Chakraborty et *al*, 2005). Cette répression est liée à la séquestration intracellulaire des antigènes parasitaire apprêtés (Kima et *al*, 1996), à l'internalisation et la dégradation des molécules du CMH de classe II (Courret et *al*, 2001) et l'augmentation de la fluidité membranaire et la perturbation conséquente des radeaux lipidiques des macrophages (Chakraborty et *al*, 2005).

Dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes, l'infection par *L. donovani* induit la répression de l'expression de CD1a, CD1b et CD1c et prévient l'activation restreinte au CD1 des lymphocytes T (Amprey et *al*, 2004), alors que l'infection par *L. amazonensis* altère surtout l'expression de CD80 et CD1a dans les co-cultures de cellules dendritiques et lymphocytes T (Favali et *al*, 2007). La persistance des amastigotes leishmaniens dans les cellules semble donc partiellement facilitée par les effets inhibiteurs des fonctions de présentation antigénique induits par les leishmanies (Figure 16C).

3.1.2.4. Régulation de l'infiltrat cellulaire

Les promastigotes peuvent induire un effet chimiotactique sélectif sur les polynucléaires neutrophiles via un facteur chimiotactique leishmanien, le LCF. Les contacts des neutrophiles avec les promastigotes de *L. major* influencent la capacité des neutrophiles à sécréter des chimiokines. Ils sont en particulier capables d'induire la sécrétion d'IL-8 favorisant ainsi le recrutement et la survie des neutrophiles, et de réprimer la production de CXCL10, chimiokine notamment associée au recrutement et à l'activation protectrice des NK et à la résistance contre *Leishmania* (van Zandbergen et *al*, 2002) (Figure 16D).

3.1.2.5. Modulation de la réponse cytokinique

L'IL-10 est une cytokine clé au cours des leishmanioses jouant un rôle critique pour la survie et la persistance à long terme des leishmanies. Les leishmanies sont capables d'activer les macrophages pour la production d'IL-10, en particulier s'ils sont opsonisés à l'aide d'anticorps ou du complément (Thomas et Buxbaum, 2008). En outre, le monoxyde d'azote permettant la leishmanicidie constitue un signal de différenciation pour les lymphocytes T régulateurs (Niedbala et *al*, 2007). Ainsi, l'hypothèse a été émise que l'expression de l'iNOS au cours de la leishmaniose pourrait contribuer à la coexistence hôte-pathogène, en contenant l'infection parasitaire, tout en prévenant son éradication complète, en induisant la différenciation des lymphocytes T régulateurs producteurs d'IL-10 et capables de désactiver les propriétés macrophagiques (Bogdan et *al*, 2000). Enfin, la fonction immunosuppressive de l'IL- 10 est contre balancée par l'IL-12. Or, les macrophages infectés par les leishmanies ne produisent que peu ou pas d'IL-12, contribuant ainsi également à la persistance parasitaire (Belkaid et *al*, 1998). La susceptibilité à la maladie est liée à l'immunosupression induite par l'IL-10, mais également à une polarisation Th2 de la réponse immune. Un antigène leishmanien, LACK pour "Leishmania homolog of receptors for activated C kinase" induit l'activation précoce des lymphocytes T CD4+ et joue un rôle pivot dans l'orientation Th2 délétère de la réponse, caractérisée par la production d'IL-4 et d'IL-5. Ceci induit notamment la production d'anticorps inefficaces au détriment d'une réponse cellulaire Th1 protectrice (Julia et *al*, 1996) (Figure 16D).

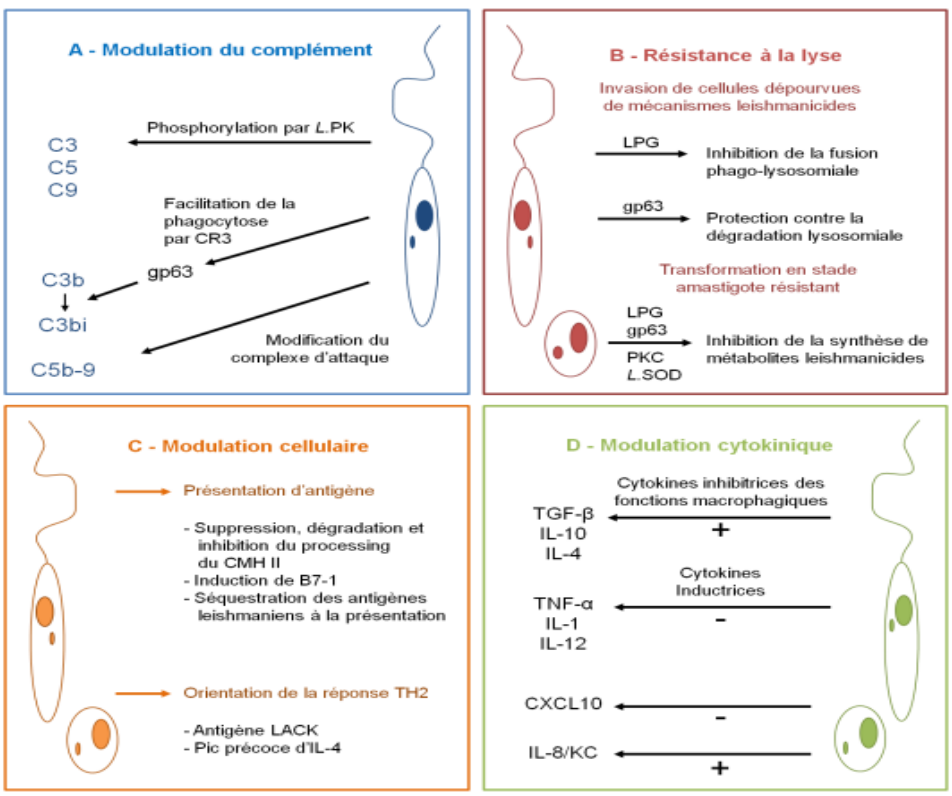


Figure 16 : Mécanismes d'échappement des leishmanies aux défenses de l'hôte (Octavie et *al*, 2013).

3.2. Pathogénèse

De nombreux organes ou tissus sont impliqués lors de leishmaniose via l'inflammation granulomateuse et/ou les mécanismes à médiation immunitaire. Chaque signe clinique ou anomalie de laboratoire (hématologique, biochimique…) peut être le reflet d'un ou de plusieurs organes atteint(s) avec un mécanisme physiopathologique sous-jacent plus ou moins complexe.

Certains chiens présentent un ou quelques signes, ils sont dits oligo symptomatiques et d'autres davantage de signes, ils sont dits poly-symptomatiques. Ce polymorphisme clinique est d'une part le reflet du stade d'évolution de la maladie mais il reflète également la différence de sensibilité de chaque hôte compte tenu de la corrélation positive entre la densité parasitaire et la sévérité des signes cliniques d'une part et entre la concentration en anticorps spécifiques anti-leishmanies et la sévérité clinique d'autre part. La figure 17 résume de manière schématique l'évolution possible de l'infection.

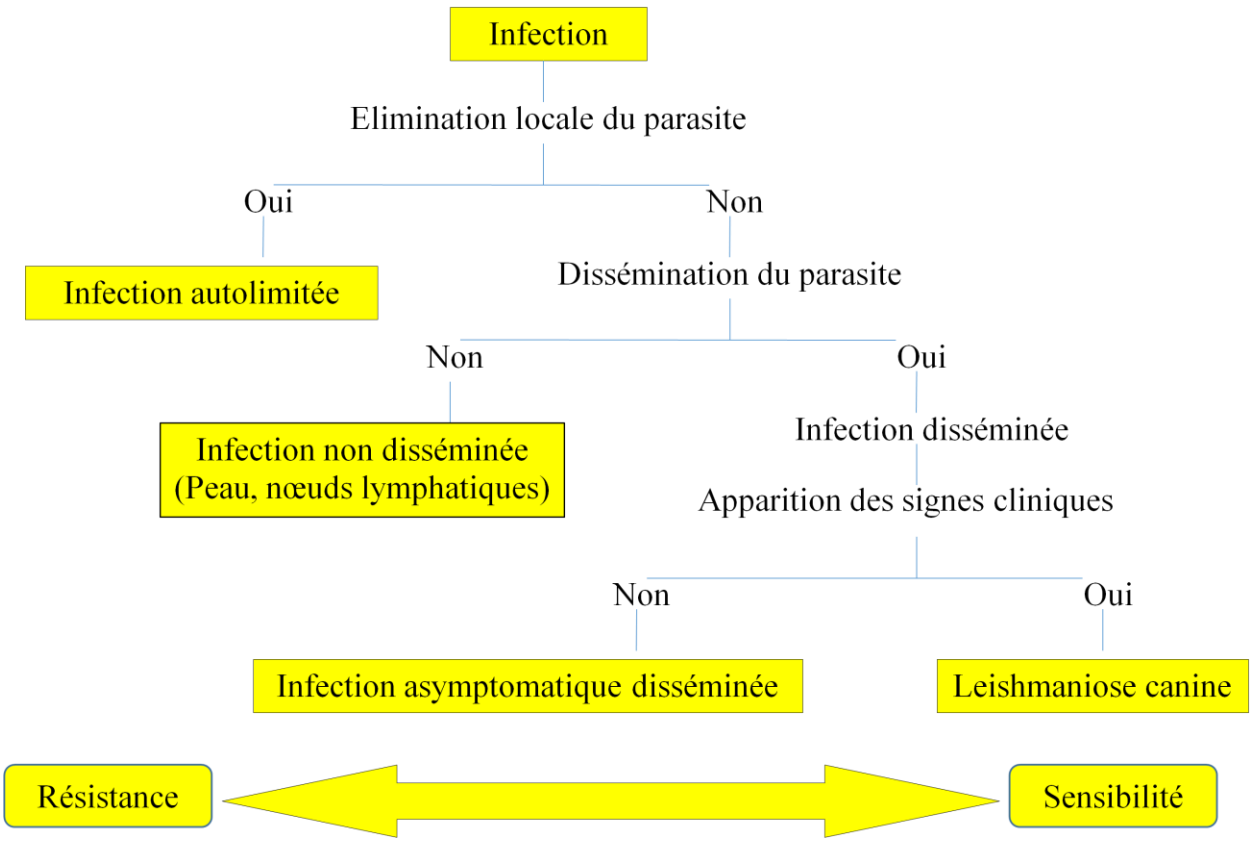


Figure 17 : Evolution possible suite à l'infection par *L. infantum.*

(D'après Saridomichelakis, 2009)

L'inflammation granulomateuse caractérisée par l'infiltration et/ou la prolifération des macrophages, des histiocytes, de lymphocytes voire plasmocytes et parfois de neutrophiles et d'éosinophiles semble particulièrement marquée au niveau des nœuds lymphatiques, de la

moelle osseuse, de la rate, du foie, des intestins, des os, des organes génitaux mâles et des muqueuses. Parallèlement, les mécanismes à médiation immunitaire semblent également avoir un rôle pivot en ce qui concerne l'atteinte rénale. Enfin, les deux mécanismes présenteraient une importance égale en ce qui concerne les lésions de la peau, des muscles, des articulations et des yeux. Aussi, certaines manifestations cliniques ou anomalies de laboratoire sont complexes et certaines d'entre elles restent obscures. La perte de poids par exemple, peut être la conséquence de l'anorexie, de la compétition entre le parasite et l'hôte pour les nutriments essentiels comme le tryptophane, de la réduction de l'absorption intestinale, ou encore de l'atteinte rénale (Baneth et *al*, 2008).

CHAPITRE 4 : ETUDE CLINIQUE ET DIAGNOSTIC

4.1. Manifestations cliniques

Il est classique de distinguer deux formes évolutives : aiguë et chronique. Toutefois, il est vraisemblable que la plupart des formes chroniques débutent par un épisode aigu et que certaines formes aiguës ne deviennent jamais chroniques. De plus nous savons que l'évolution des formes chroniques est souvent émaillée de poussées de fièvre, d'anémie et d'inappétence.

L'incubation de la leishmaniose est longue, de l'ordre de plusieurs mois à plusieurs années. Ceci entraîne deux conséquences : Tout d'abord pour le clinicien : un séjour, même bref et ancien, en zone d'endémie, peut être à l'origine de l'infestation de l'animal; encore faut-il poser la question au propriétaire. Ensuite pour l'homme de laboratoire pour lequel cette incubation constitue un handicap important à l'étude de la maladie expérimentale chez le chien.

Tableau 7 : Symptômes généraux, viscéraux et cutanéo-muqueux de la leishmaniose canine

Général	Viscéral	Cutanéo-muqueux	
		Lésions cutanées	**Lésions muqueuses**
.Fièvre .Amaigrissement .Anémie	.Hépato-splénomégalie .Polyadénopathie .Signes nerveux (troubles de la sensibilité)	.Dépilation .Dermite furfuracée .Epaississement de la peau .Erythème .Ulcérations .Hypertrophie des ongles (onychogriffose)	.Erosions et ulcérations de la cavité buccale .Ulcération de la muqueuse nasale (épistaxis) .Lésions conjonctivales .Kératine

(*in* Tahir et *al*, 2014)

Il est possible d'observer, dans une majorité de cas, une lésion cutanée ressemblant à celle de la leishmaniose cutanée humaine, assez homogène dans son expression et appelée chancre d'inoculation. Ce chancre siège souvent au niveau du chanfrein ou de l'oreille (Bourdoiseau et Franc, 2008). Deux symptômes sont fréquents et caractéristiques de la leishmaniose et peuvent constituer le motif de consultation: **l'abattement** et **l'amaigrissement** (Sassot , 2008).

Figure 18 : Alopécie généralisée et cachexie très marquée (Solano-Gallego et *al*, 2011).

Figure 19 : Emaciation des muscles faciaux (Dedet, 1999).

4.1.1. Manifestations cutanéo-muqueuses

Les symptômes cutanéo-muqueux sont parmi les plus importants à retenir car ils sont très fréquemment rencontrés et relativement caractéristiques de la leishmaniose. Ils intéressent la peau et les différents phanères. On peut observer principalement : des aires de calvescence évoluant vers l'alopécie, des lésions cutanées, des ulcères cutanés, de l'épitaxis, des ongles de « fakir »: allongement des ongles qui se recourbent à leurs extrémités et peuvent gêner la marche. Cette croissance anormale des ongles s'accompagne parfois d'œdème et d'infiltration interdigitée.

Figure 20 : Onychogryphose, œdème et infiltration interdigitée (Solano-Gallego et *al*, 2011).

* Les lésions cutanées sont la conséquence de troubles de la kératogénèse ; elles consistent en une hyperkératose à l'origine de lésions pseudocroûteuses du chanfrein, des coussinets et de la truffe qui paraît fendillée et craquelée. Il y est associé une parakératose, c'est à dire un squamosis à l'origine de squames abondantes, brillantes, amiantacées, psoriasiformes : c'est le furfur

leishmanien ; ces squames peuvent intéresser tout le corps ou une région particulière et constituent souvent un motif de consultation.

Figure 21 : Squames au niveau de la pointe du pavillon auriculaire (Pin D. ENVL).

* Des ulcères cutanés apparaissent en tout endroit du corps mais fréquemment dans les zones de saillies osseuses, les régions interdigitées et la truffe. Ces ulcères sont torpides, saignent facilement, ne cicatrisent pas et laissent ainsi une lymphe souillée de leishmanies. Ces lésions cutanées ne sont pas prurigineuses : aucune lésion de grattage n'est observée, l'animal au cours de sa consultation ne se lèche pas, ni ne se mordille.

** Le processus pathogénique concourant à la formation des ulcères cutanés est à l'origine des même lésions au niveau des muqueuses (buccale, digestive...) et surtout de la muqueuse pituitaire d'où une épistaxis fréquente.*

4.1.2. Manifestations oculaires

On peut observer : Une conjonctivite bilatérale**,** une hyperhémie (rougeur intense, vasodilatation)**,** un chemosis (la conjonctive peut faire saillie sous la paupière)**,** une conjonctivite granulomateuse assez caractéristique**,** une kératite : l'inflammation de la cornée est rarement isolée et une kérato-uvéite.

4.1.3. Manifestations viscérales (autres que rénales)

Elles sont la conséquence directe de l'atteinte du système lymphomacrophagique :

- Il y a atteinte des nœuds lymphatiques qui sont hypertrophiés, indolores, mobiles et non adhérents surtout les préscapulaires et les poplités qui seront décelables lors de la consultation ;
- Une splénomégalie inconstante et souvent modérée ;

- Le tissu conjonctif sous-cutané : formation de granulomes volumineux, indolores, palpables, déformant l'aspect de l'animal et conduisant à l'exérèse chirurgicale ;
- Le tube digestif : une entérite diarrhéique plus ou moins hémorragique et une colite chronique (augmentation notable de la défécation, présence de mucus et de sang) peuvent être observées ;
- Signes nerveux : ils apparaissent en fin d'évolution et se traduisent par des tremblements et des troubles moteurs allant de la simple boiterie à la paralysie (Franc, 1995).

4.1.4. Manifestations rénales

L'insuffisance rénale n'est ni une forme rare, ni une complication terminale de la leishmaniose; elle constitue l'un des symptômes d'appel. Elle est aiguë et isolée, s'installe en 2 ou 3 jours, parfois 24 heures seulement, chez des animaux jeunes rendant toute cause sénile improbable. Les signes avant-coureurs sont peu évocateurs : anorexie, intense prostration ; une conjonctivite et/ou une rhinite bilatérale purulente viennent parfois compléter ce tableau. Les troubles digestifs, s'ils existent, sont représentés par quelques vomissements, rarement de la diarrhée. L'hyperthermie est toujours modérée. En zone d'endémie ou après un séjour dans une telle zone, la leishmaniose sera intégrée dans le diagnostic différentiel de toute néphropathie aiguë. Plusieurs examens sont réalisés : dosage urée-créatinine pour apprécier la fonction rénale. On recherche l'origine de l'insuffisance rénale en recherchant une protéinurie.

- ***Leishmaniose avec complications rénales :*** lorsque le diagnostic de leishmaniose est posé, il est nécessaire de vérifier l'intégrité de reins. Dans les cas précoces, seules une protéinurie et une cylindrurie sont décelables. Cette surveillance sera régulièrement effectuée, l'atteinte rénale pouvant survenir plusieurs mois ou années après l'apparition des premiers symptômes.

- ***Insuffisance rénale iatrogène :*** Contrairement à l'idée reçue, le glucantime® n'est pas lui-même néphrotoxique, néanmoins certains chiens présentent une intolérance au sel antimoine qui se traduit par une insuffisance rénale modérée, réversible dès l'arrêt des injections. Il convient d'insister sur le caractère exceptionnel d'une telle situation (2 cas sur 379 en 1987). Quoi qu'il en soit, la mise en œuvre du traitement doit tenir compte de l'état de la fonction rénale.

4.2. Diagnostic

Parler de diagnostic, c'est différentier deux problématiques :

La problématique du clinicien : Face à un animal malade il doit établir un diagnostic précis et doit déterminer si les symptômes sont imputables à l'action délétère du parasite. Il faut également qu'il puisse détecter précocement les chiens infectés et ceux qui vont développer la maladie.

La problématique de l'épidémiologiste : Il dépiste les chiens hébergeant des parasites, ce qui inclut les malades (porteurs symptomatiques) et les chiens sains (porteurs asymptomatiques).
Les techniques de diagnostic doivent avoir deux qualités : être sensibles, le technicien ne doit pas passer à côté d'un cas de leishmaniose et être spécifiques, un chien non atteint de leishmaniose ne doit pas avoir un test positif (Naskidachvili, 1986; Gourion, 1990).

4.2.1. Diagnostic épidémio-clinique

Le diagnostic peut être établi à partir des éléments épidémiologiques, ainsi que des symptômes observés. Il reste toutefois compromis par la durée d'incubation, ainsi que par le caractère protéiforme de la maladie. En matière de leishmaniose, toute combinaison de symptômes est possible : un unique symptôme peut amener à suspecter la maladie, comme toute combinaison de symptômes généraux et spécifiques des différents appareils cités ci-dessus.

Est suspect, tout chien ayant résidé en zone d'endémie même quelques jours quel que soit le temps qui s'est écoulé entre l'apparition des symptômes et le moment de résidence dans cette zone (Bourdoiseau, 2000).

4.2.2. Examens complémentaires

Suite à l'examen physique, les examens complémentaires de base comprennent :

- **Un hémogramme complet** qui peut révéler la présence d'une anémie très peu régénérative à non régénérative, parfois régénérative s'il s' agit d'une anémie hémolytique à médiation immunitaire ou bien une leucocytose monocytaire ou neutrophilique associée à une lymphopénie et une éosinopénie ou bien encore une leucopénie. Enfin, on peut également noter une thrombocytopénie.

- **Une électrophorèse des protéines** suggérant une hypo-albuminémie, une augmentation de la concentration des alpha2-globulines et une gammopathie poly ou oligo-clonale.
- **Une biochimie complète** dont les anomalies possibles sont une hyperprotéinémie, une hypo-albuminémie, une hyperglobulinémie (et donc un ratio albumine/globuline anormal), une azotémie. Une hyper-fibrinogénémie et une augmentation potentielle du temps de prothrombine ainsi que du temps de thromboplastine activée peuvent être observées.
- **Une analyse d'urine** : on peut noter une isosthénurie ou des urines diluées ainsi qu'une protéinurie plus ou moins importante.

Lors de la leishmaniose, ces tests permettent donc de détecter un ou plusieurs changements compatibles avec la maladie et en fonction des résultats, d'autres examens complémentaires peuvent être envisagés dans un deuxième temps à savoir : un profil de coagulation complet, un myélogramme, des tests de la fonction hépatique, des examens d'imagerie médicale, la détection des anticorps anti-érythrocytaires, un dosage des protéines sériques de la phase aigue de l'inflammation et une cytologie ou histologie des tissus ou des liquides biologiques.

4.2.3. Diagnostic de laboratoire

4.2.3.1. Diagnostic direct

4.2.3.1.1. Examen microscopique

Les parasites intra-monocytaires sont recherchés après fixation à l'alcool et coloration par la technique de May-Grümwald-Giemsa de calques cutanés, d'adénogrammes ou de myélogrammes. Ils sont de forme ronde ou ovale et mesurent de 1.5 à 3 µm sur 2.5 à 5 µm (Blaise, 2007). Les amastigotes sont libres ou intracellulaires dans les monocytes, les macrophages et les neutrophiles. Leur cytoplasme apparaît en bleu pâle, avec un noyau relativement grand qui se colore en rouge. Au même plan que le noyau, mais à angle droit par rapport à ce dernier, on aperçoit un corps épais en forme de tige, rouge ou violet, c'est le kinétoplaste (Alvar et *al*, 2004).

Cette méthode est réalisable au cabinet par le vétérinaire praticien et permet de confirmer rapidement le diagnostic. Malheureusement sa sensibilité est faible (60%) (Papierok, 2002). Cependant, dans l'étude de Rosypal et ***al.,*** les amastigotes ont été observées dans 93% des échantillons de moelle osseuse et du suc ganglionnaire des chiens naturellement infectés par *L. infantum* (Rosypal et *al*, 2007). La probabilité d'observer les leishmanies est plus importante

au début de la maladie, la charge parasitaire est, en effet, plus élevée car la multiplication est plus intense, elle est ensuite limitée du fait de la réponse immunitaire (Hubert, 2006).

4.2.3.1.2. Histopathologie

La coloration des organes infectés par l'hématoxyline et l'éosine a également été utilisée pour détecter la forme amastigote (Marques et *al*, 2006). Bien que la sensibilité de cette technique soit faible, Moreira *et al.* ont constaté que des échantillons de ganglion poplité étaient plus efficaces pour détecter le parasite (respectivement 43,9%, 40,0% et 39,13% des chiens en symptomatique, oligosymptomatique et asymptomatique), sachant que ces résultats ont été obtenus à partir d'échantillons prélevés en *post-mortem* (Moreira et *al*, 2007).

4.2.3.1.3. Culture de leishmanies

C'est la méthode de référence, mais elle nécessite quelques semaines d'incubation. Elle n'est réalisée que par les laboratoires de recherche (Papierok, 2002). Le milieu le plus utilisé est le milieu Novy-Mac Neal- Nicolle (N.N.N.). C'est un milieu diphasique, une phase solide et une phase liquide. D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI qui donnent d'excellents résultats avec un minimum de risque de contamination. Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques et exceptionnellement d'antifongiques, la 5-fluorocytosine (Bachi, 2001). Le parasite est cultivé dans l'un de ces milieux à partir d'un prélèvement, puis mis en incubation à une température comprise entre 22 et 26 C° (OIE, 2008). Après une à quatre semaines d'incubation et repiquage tous les 7 jours sur un nouveau milieu, les leishmanies sont recherchées dans une goutte de la phase liquide. L'examen réalisé entre lame et lamelle, au microscope au grossissement moyen (objectif X 25 X 40), à fond claire ou à contraste de phase (Izri et Belazzoug, 2007). En général, une culture est considérée comme négative, après quatre subcultures successives négatives.

La culture des leishmanies permet aussi la caractérisation des isoenzymes, encore appelée MLEE (*multi-locus enzyme electrophoresis*) est la méthode de référence pour l'identification des espèces (Mathis et Deplazes, 1995), bien qu'elle exige la culture d'un grand nombre de parasites (5×10^9 - 1×10^{10}). Au moins 12 enzymes seront examinées, les organismes présentant un zymogramme identique sont classés dans les zymodèmes d'une espèce donnée (OIE, 2008).

4.2.3.1.4. Polymérase Chaine Réaction (PCR)

La plupart des auteurs s'accordent à dire que le diagnostic moléculaire dont la PCR est de loin le plus sensible, 97% (Chargui et *al*, 2005; Bensoussan et *al*, 2006; Marques et *al*, 2006). Par contre, la spécificité varie de manière significative en fonction du type de prélèvement étudié ainsi que du type d'amorce employée. Le prélèvement de choix est la moelle osseuse (ponction ganglionnaire en second lieu) (Lamothe et *al*, 2004). La PCR permet de rechercher l'ADN leishmanien dans un large éventail de prélèvements (peau, moelle osseuse, nœud lymphatique, sang) (Andrade et *al*, 2002; Ferreira et *al*, 2008).

Essentiellement, les techniques développées soit pour détecter les organismes à partir de biopsies fraiches, congelées ou fixées au formol et incluses dans la paraffine, soit pour identifier des isolats établis de *Leishmania* comprennent :

- La digestion du matériel avec de la protéine K et l'extraction de l'ADN ;
- L'amplification par la PCR standard utilisant des séquences d'oligonucléotides (amorces) sélectionnées à partir de petites sous-unités du gène ARNr (Mathis et Deplazes, 1995), ou des mini-cercles d'ADN du kinétoplaste (Maarten et *al*, 1992), ou d'autres séquences d'ADN génomique hautement répétitives (Bulle et *al*, 2002).
- L'analyse des produits d'amplification par gel d'agarose à 1-2 %. Pour augmenter la sensibilité, une PCR nichée ou semi-nichée utilisant des amorces internes à partir des séquences ci-dessus peut être réalisée.

Dans la leishmaniose canine, l'efficacité de la PCR comparée à la sérologie dépend du cours naturel de la maladie, la sensibilité étant la plus élevée juste après infection (88 %), déclinant par la suite (50 %) (Quinnell et *al*, 2001).

Diverses techniques ont été décrites qui améliorent aussi bien la sensibilité que la spécificité de l'épreuve, telle que la PCR-RFLP au cours de laquelle les produits amplifiés par PCR sont digérés par les enzymes appropriées et le profil des fragments résultant de la restriction est analysé pour l'identification de l'espèce ou de la souche (Volpini et *al*, 2004). Des techniques de PCR en temps réel permettant le suivi permanent des produits obtenus au cours de l'amplification par la PCR ont été décrites et sont disponibles dans le commerce. Elles peuvent être plus sensibles que la PCR classique et sont surtout destinées à l'étude des cinétiques d'infection et le suivi de la réponse au traitement (Borja-cabrera et *al*, 2002). En outre, la PCR en temps réel a été signalée comme étant utile pour le dépistage des infections dans des prélèvements peu envahis comme le sang (Francino et *al*, 2006). L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne fait pas la différence entre les leishmanies vivantes et l'ADN

leishmanien résiduel. Il est préférable de l'utiliser pour confirmer le diagnostic et non dans le cadre d'un suivi thérapeutique (Hubert, 2006).

4.2.3.1.5. Inoculation à l'animal

L'inoculation n'est réalisée que par des rares laboratoires spécialisés. En effet, cette technique exige une animalerie et une compétence particulière. L'animal de choix est le hamster doré syrien. Elle consiste à injecter en intra-péritonéal quelques gouttes à 0,5 ml de moelle osseuse diluée dans de l'eau physiologique stérile. Les animaux développent en quelques semaines à plusieurs mois une véritable leishmaniose même lorsque l'inoculum est pauvre en parasites. Cette technique est sensible, contrairement aux cultures sur milieux spéciaux qui sont trop souvent contaminés et permet sans risque d'isoler la souche de leishmanies. Pour ces raisons, elle reste une technique de choix (Alvar et *al*, 2004).

4.2.3.1.6. Xénodiagnostic

Il s'agit d'une technique permettant de détecter et d'isoler un pathogène en utilisant son vecteur arthropode naturel. En ce qui concerne la leishmaniose, ceci consiste, en condition de laboratoire, à laisser des phlébotomes se nourrir sur des chiens anesthésiés, en cage, qu'on suspecte d'être infectés. Par la suite, les insectes sont examinés une fois leur repas sanguin digéré afin de rechercher des promastigotes dans leurs intestins.

Le xéno-diagnostic est probablement la méthode la plus adaptée pour étudier le potentiel infectieux des hôtes canins pour les phlébotomes. En général, 3% à 100% des insectes s'infectent et 16% à 88 % des chiens infectés sont capables de transmettre le protozoaire. De plus, il a été montré que parmi les chiens séropositifs, le pourcentage d'insectes infectés est plus faible lorsqu'ils se sont gorgés sur des chiens asymptomatiques voire oligosymptomatiques que pour ceux qui se sont gorgés sur des chiens polysymptomatiques (Saridomichelakis, 2009).

4.2.3.2. Méthodes indirectes

4.2.3.2.1. Sérologie

Elle est largement et fréquemment utilisée. Bien que la réponse humorale lors de leishmaniose canine clinique soit en général très intense, la sérologie sous-estime le taux d'infection pour les

chiens vivants en région endémique. Même si la production d'anticorps est faible lors des phases initiales et finales de la maladie ou chez les animaux asymptomatiques, le titre en anticorps est souvent élevé chez les chiens chez lesquels le parasite s'est largement disséminé. En effet, la très grande majorité des chiens symptomatiques, excepté ceux présentant des altérations hématologiques ou protéiques, développent une réponse humorale forte. Cependant, la présence d'anticorps anti-leishmanies seule ne permet pas de conclure à la maladie. C'est pourquoi il est préférable de répéter le test afin d'obtenir un diagnostic, par exemple 3 mois plus tard.

Les tests sérologiques présentent des limites intrinsèques à savoir : la persistance des anticorps spécifiques après la guérison ou les réactions croisées avec des anticorps produits contre d'autres pathogènes comme *Trypanosoma cruzi* notamment en Amérique latine, *Ehrlichia canis* ou encore d'autres espèces de leishmanies, notamment lorsque les tests utilisent des antigènes « grossiers » de *Leishmania*. Une forte sensibilité et une forte spécificité sont nécessaires pour éviter les faux négatifs chez les populations de chiens en zone endémique mais aussi pour écarter les faux positifs qui peuvent conduire à des traitements voire des euthanasies de chiens non infectés réellement. De plus, pour l'interprétation des résultats, il est important de considérer que la séroconversion peut avoir lieu plusieurs mois après l'infection. L'intervalle pour celle-ci varie en effet de un à vingt deux mois avec une moyenne de cinq mois lors d'infections naturelles alors qu'il ne varie que d'un à six mois avec une moyenne de trois mois en conditions expérimentales (Moreno et Alvar, 2002).

a. Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'immunofluorescence indirecte, ou IFI, est la méthode quantitative de référence agréée par l'OIE (Gradoni et Gramiccia, 2008). Ce test est utile dans les études épidémiologiques, en pratique clinique, ainsi que dans le suivi du traitement (Alvar et *al*, 2004). Cependant, son application nécessite un haut niveau de compétence et d'expérience et des installations de laboratoire fort onéreux. Une autre facette de ses limites est le fait que des dilutions successives de sérum sont nécessaires à sa réalisation, ce qui rend le test laborieux et pas pratique pour le dépistage d'un grand nombre d'échantillons (Maia et Campino, 2008). C'est une méthode considérée comme sensible et spécifique. La spécificité est de 98 % (OIE, 2008), la sensibilité varie entre 92 et 99 % (Papierok, 2002; Keck, 2004). Les anticorps dirigés contre *Trypanosoma cruzi* ont longtemps été reconnus comme la principale cause de réaction croisée à l'IFI lors du diagnostic de l'infection leishmanienne dans les régions où les deux infections sont endémiques, c'est à dire l'Amérique latine et le Sud des États-Unis (Petersen, 2009).

Principe de la technique IFI : selon Rosset, in Harrat (2006) : Cette technique sérologique est basée sur la réaction Antigène-Anticorps révélée par un réactif sous la lumière UV. La fixation des anticorps spécifiques sur l'antigène figuré est révélée par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à l'isothionate de fluorescéine (Figure 22).

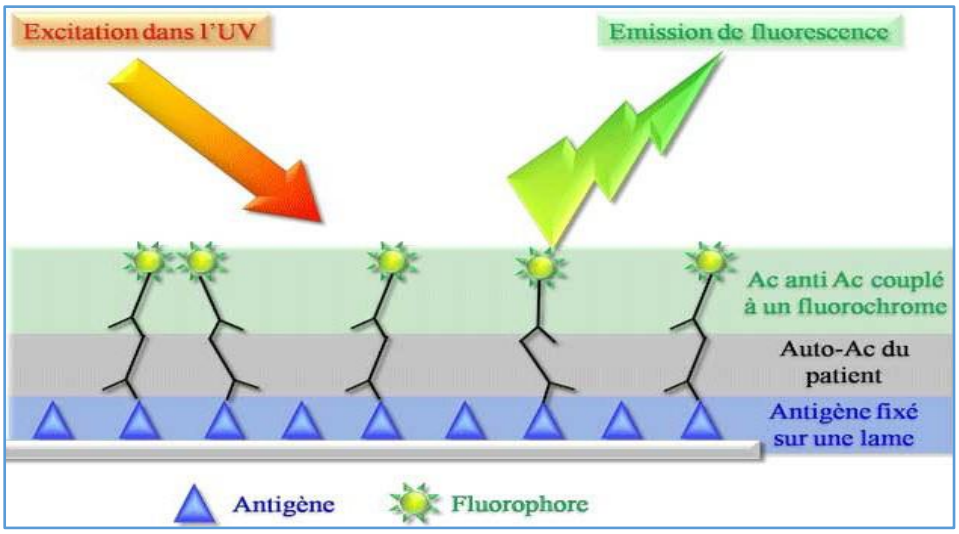


Figure 22 : Technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) (www.memobio.fr)

b. Méthode immuno-enzymatique

La technique ELISA est une méthode quantitative qui peut être exécutée sur sérum ou sur sang. Cette épreuve peut être utilisée pour des enquêtes séro-épidémiologiques dans les conditions du terrain (Papierok, 2002; OIE, 2008). L'ELISA est utile pour le diagnostic des leishmanioses du vieux et du nouveau monde. Il y a peu ou pas de réactions croisées avec d'autres maladies et, selon les souches de *Leishmania* utilisées, la sensibilité peut varier de 86 % à 99 % (OIE, 2008), tandis que sa spécificité était comparable avec celle de l'épreuve d'IFI (97%) (Mancianti et *al*, 1995).

c. Test rapide d'immuno-chromatographie

C'est un test facile à mettre en œuvre et qui semble donner des résultats satisfaisants. Les kits usuels présentent une bonne spécificité, de 61% à 100% mais leur performance n'est pas encore optimale à ce jour du fait de leur sensibilité variable de 30% à 70%. Leur performance diagnostique reste inférieure à celle de l'IFI ou de l'ELISA. Le problème le plus important est donc les faux-négatifs, c'est pourquoi en cas de forte suspicion clinique mais de résultat

sérologique négatif avec cette technique, d'autres méthodes sérologiques plus sensibles doivent être mises en œuvre. Par ailleurs, avec cette technique, le titre en anticorps n'est pas mesuré.

Un test immuno-chromatographique utilisant les antigènes rK39 recombinant est également disponible commercialement sous la forme de bandelette de papier de nitrocellulose imprégnée d'antigènes et adapté à l'utilisation dans des conditions de terrain. Cependant, certains auteurs désapprouvent ce kit du fait de la nécessité d'un stockage au froid des tampons ouverts, de l'impossibilité de garder les bandelettes à température élevée et de l'impossibilité de réaliser ces tests avec de sang total. Pour d'autres, l'inconvénient majeur des ces bandelettes est leur très faible spécificité, variant de 61% à 75%, responsable d'une grande proportion de faux positifs (Maia et Campino, 2008).

Par ailleurs, les tests basés sur l'utilisation de l'antigène rK26 sont moins sensibles que ceux utilisant l'antigène rK39. Les deux antigènes se complètent donc et leur utilisation combinée augmenterait la sensibilité du test sans perte de spécificité. Les kits sont donc très attractifs du fait de leur format simple, leur facilité d'emploi et la rapidité pour obtenir une réponse permettant une intervention immédiate des vétérinaires mais les interrogations sur la fiabilité de ces tests persistent.

d. Contre-immunoélectrophorèse (CIE)

Il s'agit d'une méthode qualitative pour détecter les anticorps spécifiques anti leishmanies. Elle est basée sur la visualisation d'un arc précipité bleu sur une bande de Cellogel® consécutive à l'interaction entre les antigènes de leishmanies et les anticorps présents dans le sérum soumis à l'électrophorèse. La sensibilité est de 85.5% tandis que la spécificité est 94.7% (Maia et *al*, 2007). La CIE peut être utilisée pour analyser des sérums de différents types d'hôtes simultanément puisqu'elle ne requiert pas d'immunoglobulines spécifiques. Ses avantages sont une rapidité de mise en œuvre, l'obtention de résultats en quelques heures, les faibles frais engagés et la simplicité de l'équipement nécessaire, faisant de la CIE un test de choix lors des études épidémiologiques. Toutefois, cette méthode est rarement utilisée à cause des réactions croisées observées avec d'autres germes (De Le Ray et *al*, 1973).

e. Test d'agglutination directe

L'épreuve d'agglutination directe (DAT) a été décrite pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose canine. Après le développement de l'épreuve, le DAT a été validé comme un test sensible et spécifique pour les investigations de terrain (OIE, 2008; Maia et Campino, 2008). Mohebali *et al*. ont montré, dans leur étude menées sur des chiens en zone endémique, que la sensibilité et la spécificité du DAT était respectivement de 70.6% et de 84.9% (Mohebali et *al*, 2004). Silva *et al.* ont estimé dans leur étude une sensibilité proche de 100% alors que la spécificité était de 100% (Silva et *al*, 2006).

Une de ses limites est le temps d'incubation relativement long de 18 heures et le fait que plusieurs dilutions de sang ou de sérum doivent être réalisées. Néanmoins, le développement d'antigènes séchés puis congelés rend le DAT approprié à son utilisation dans des conditions difficiles de terrain puisqu'ils restent stables à des températures élevées (Maia et Campino, 2008).

f. Test d'immuno-diffusion (IDA)

Cette technique consiste en une double immuno-diffusion sur un gel d'agarose 1% contenant 3 % de polyéthylène glycol et elle utilise des échantillons de sang et des antigènes solubles de leishmanies. La formation de bandes est notée après vingt quatre heures à l'aide de coloration avec du bleu de Coomassie. Elle est facile à réaliser, elle ne requiert pas d'équipements sophistiqués et permet l'analyse de plusieurs échantillons en même temps.

La spécificité de cette technique est de 98% chez des chiens venant de zones endémiques et de 100% pour ceux de zones non-endémiques et la sensibilité varie de 69% à 100% chez des chiens symptomatiques (Maia et Campino, 2008).

g. Western Blot

C'est une méthode qualitative, très sensible et très spécifique mais peu utilisable en routine dans la mesure où elle requiert des compétences techniques, du temps pour sa mise en œuvre et qu'il s'agit d'une méthode laborieuse et coûteuse. Elle est donc limitée à la recherche. Il n'existe pas encore de consensus relatif au pattern de bandes associé à l'infection ou la maladie. Certains auteurs mettent en évidence des bandes à 26, 34-35.4 kDa lors de phase aigue respectivement chez des chiens naturellement et expérimentalement infectés. Les chiens dont le traitement a été

efficace affichent une faible immuno-réactivité au niveau de la bande 67kDa soulignant le rôle de cette protéine comme marqueur pronostic (Maia et Campino, 2008).

En 2007, Iniesta utilise le Western Blot pour analyser l'expression des isotypes d'Ig G1 et G2 chez des chiens naturellement infectés et conclut que l'infection par *L. infantum* est caractérisée par la reconnaissance de fractions polypeptidiques de 14, 16, 18 kDa par les Ig G1 et les fractions 14 et 16 kDa par les Ig G2 (Iniesta et *al*, 2007). Une étude par Western Blot sur l'urine de chiens sains et malades a montré la présence de plusieurs bandes chez les chiens malades (Zaragoza et *al*, 2003).

h. Cytométrie de flux

La cytométrie devient un outil utile de plus en plus employé dans la santé et la recherche où il s'agit d'une méthode rapide, précise, et reproductible (Maia et Campino, 2008).
Une étude menée par Andrad *et al.* chez des chiens infectés ou vaccinés dans le but d'évaluer les performances de cette méthode en détectant les lymphocytes B portant à leur surface des anticorps antipromastigotes de *L. chagasi* (Ig G1 et G2), a montré qu'il s'agissait d'une méthode utile pour différencier ces derniers, avec une spécificité de 100% pour les deux isotypes d'Ig et une sensibilité de 97% pour les Ig G1 et 93% pour les Ig G2 (Andrad et *al*, 2007).

4.2.3.2.2. Evaluation de la réponse immunitaire cellulaire

Le caractère résistant ou sensible d'un chien dépend de l'efficacité de sa réponse immunitaire cellulaire. La détermination précise de la réponse cellulaire spécifique est un indicateur crucial du phénotype Th1 qui est associé à un contrôle efficace de l'infection et de la survie de l'hôte, même si la réponse cellulaire spécifique peut être détectée chez des chiens séropositifs ou négatifs (Cardoso et *al*, 2007). L'évaluation de cette dernière est donc largement étudiée en recherche.

a. Test Monténégro ou Test cutané à la leishmanine

Ce test met en évidence une hypersensibilité de type retardée vis-à-vis d'antigènes de leishmanies. Il consiste en l'inoculation intradermique d'une suspension de promastigotes inactivés, dilués dans du phénol ou une solution saline de merthiolate. Un diluant est injecté en

tant que contrôle au niveau d'un site cutané voisin. L'observation d'une induration d'au moins 5 mm de diamètre, 48 à 72 heures après correspond à une réponse positive.

En général, lors de maladie active, ce test est négatif alors qu'il sera positif lors d'infection sub-clinique ou de stade précoce de leishmaniose viscérale ou à la suite d'un traitement efficace. Il existe une corrélation significative entre le résultat d'un test Monténégro et le statut clinique d'un animal infecté. Ce test est simple, peu coûteux, ce qui le rend adéquat avec des conditions de terrain impliquant un grand nombre de chiens. L'inconvénient réside cependant en la nécessité d'un suivi 48 à 72 heures après et la possibilité de produire une réaction positive de manière iatrogénique conduisant à de faux positifs, d'où sa non-utilisation.

b. Effet cytopathique de l'interféron-gamma (INF-gamma) et Bio-test d'inhibition

Il consiste à détecter l'INF-gamma produit par des lymphocytes circulants dans des surnageants de culture. Les lymphocytes sont incubés avec ou sans LSA pendant 72 heures. Le surnageant est récupéré et incubé avec des cellules rénales canines Madin-Derby pendant 16 heures. Le surnageant est alors éliminé et les cellules sont infectées avec le virus de la stomatite vésiculeuse puis incubées pendant 24 heures. La production d'INF-gamma est exprimée comme le ratio de la réciproque de la dilution maximum qui protège 50% des cellules en monocouche stimulées sur celles non stimulées. Des valeurs supérieures à 2 sont considérées comme positives. Ce test permet de quantifier la production de cytokines de la réponse cellulaire. Bien entendu, étant donné qu'il s'agit d'un test laborieux, nécessitant la manipulation d'un virus appartenant à la liste A de l'OIE, son utilisation est très limitée (Maia et Campino, 2008).

4.2.4. Diagnostic différentiel

De nombreuses maladies interviennent dans le diagnostic différentiel de la leishmaniose canine. En effet, l'amaigrissement et/ou l'abattement, qui accompagnent la leishmaniose chez le chien, sont présents dans de nombreux processus pathologiques parfois fort différents à savoir (Anonyme 1) :

***Des dermatoses** (Tableau 8) : gale sarcoptique, démodécie, teigne, et surtout les dermatoses auto-immunes, cliniquement très proches de la leishmaniose.

***Des maladies générales** : évolutions cancéreuses, pyodermites, erhlichiose (abattement et épistaxis), lupus érythémateux disséminé (dont le tableau clinique global est presque identique à celui de la leishmaniose).

Tableau 8: Dermatoses intervenant dans le diagnostic différentiel de la leishmaniose canine.

Teignes	Démodécie	Gale sarcoptique	Maladies auto-immunes
- Aires alopéciques à contour généralement géométrique, extensives, - Elles sont contagieuses, et zoonotiques, - Elles ne sont pas accompagnées d'atteinte de l'état général ; - L'examen direct et la mise en culture permettent de lever le doute.	- Aires de calvescence intéressant préférentiellement la face, l'encolure et la face proximale des membres antérieurs, - La démodécie n'est pas contagieuse ni zoonotique, - les raclages cutanés ne mettant pas en évidence de nombreux stades immatures de *Demodex* donc ne permettent pas d'éliminer la démodécie	-Elle est fortement prurigineuse, contagieuse, zoonotique.	- les lésions peu ou non prurigineuses, croûteuses et ulcératives, intéressent très souvent la face symétrique, concernant la peau et les muqueuses et sont quelquefois associées à une dégradation importante de l'état général, à une polyadénomégalie et une glomérulonéphrite. - La biopsie est souvent indispensable et permet à coup sûr de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse.

4.3. Pronostic

Il reste difficile à établir et les études consacrées à cette question sont limitées. Bien entendu, le pronostic varie en fonction du statut clinique et para-clinique initial de l'animal. Le clinicien doit prendre en compte à la fois (Bourdoiseau et Franc, 2008) :

- Du caractère zoonotique de la maladie, le chien étant réservoir de parasites, même après traitement spécifique ; l'animal présent dans un foyer où vit un sujet immunodéprimé peut alors constituer un danger ;
- De certains éléments biologiques signes d'une insuffisance rénale grave (protéinurie, créatininémie et urémie élevées) ou d'une anémie arégénérative, qui vont assombrir le pronostic.

Du fait de son caractère généralisé, la leishmaniose canine doit toujours faire l'objet d'un pronostic réservé. C'est une maladie grave, dont le traitement, long et coûteux, ne permet souvent qu'une rémission transitoire, les rechutes sont fréquentes (Bourdoiseau, 2007).

CHAPITRE 5 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

5.1. Traitement

Bien que des avancées récentes en matière de diagnostic ou de prévention soient importantes, les progrès en matière de traitement sont moindres. En effet, le traitement médical de la leishmaniose chez le chien reste à ce jour problématique pour les praticiens puisque comme expliqué précédemment, compte tenu de sa pathogenèse complexe, l'infection peut se manifester par des signes cliniques très variables, allant de signes très vagues et non spécifiques à une altération sévère de multiples organes. La réponse immunitaire joue non seulement un rôle dans l'issue de l'infection mais aussi dans la réponse au traitement (Solano-Gallego et *al*, 2009).

En fait, tous les traitements utilisés chez le chien ont été découverts et développés dans le but de traiter la leishmaniose humaine. La plupart des protocoles thérapeutiques sont dérivés de protocoles de médecine humaine. Chez le chien, les objectifs du traitement sont :

- d'induire une réduction générale de la charge parasitaire, enjeu essentiel dans la mesure où les chiens traités restent infectés et donc potentiellement infectieux pour les vecteurs ;
- de traiter les altérations des organes causés aussi bien de manière directe par le parasite que par des mécanismes à médiation immunitaire et de restaurer une réponse immunitaire efficace ;
- de stabiliser l'amélioration clinique induite par les médicaments et de retarder le plus possibles les rechutes et de traiter les rechutes cliniques.

La thérapeutique de la leishmaniose canine comprend deux aspects : l'un symptomatique, l'autre spécifique.

5.1.1. Traitement symptomatique

Il vise à dépister et corriger l'insuffisance rénale préalablement détectée dans la mesure où la thérapeutique spécifique peut présenter des effets secondaires néphrotoxiques potentiellement mortels. Dans l'hypothèse d'une insuffisance rénale confirmée, celle-ci doit être corrigée par perfusion et par administration de corticoïdes (prednisone, de 1 à 2 mg/kg/ j, *per os*, durant une semaine) afin de freiner la formation des complexes immuns responsables de la glomérulonéphrite. Cette thérapeutique doit induire une amélioration clinique et biologique significative autorisant la thérapeutique spécifique; dans le cas contraire, les lésions rénales sont

irréversibles et incompatibles avec la survie de l'animal. De la même façon, l'uvéite doit être considérée comme relevant de l'administration locale de corticoïdes (injection sous-conjonctivale) (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000; Bourdoiseau et Franc, 2008).

5.1.2. Traitement spécifique

Il repose sur l'association de l'antimoniate de méglumine et de l'allopurinol (Tableau 10), celui-ci pouvant être prescrit dès le premier jour du diagnostic, y compris lors d'insuffisance rénale confirmée. Ce protocole doit être rigoureusement suivi quant aux doses utilisées, à la durée de prescription et aux voies d'administration choisies : toute modification de ce protocole entraîne des risques d'apparition de chimiorésistance, une diminution d'efficacité et/ou une augmentation de la toxicité. Il remplace les anciens protocoles fondés sur des quantités d'antimoniate administrées plus élevées, plus toxiques et dont l'efficacité n'est pas meilleure (Bourdoiseau et Franc, 2008).

Tableau 9 : Traitement de consensus de la leishmaniose canine

Molécules	**Nom commercial**	**Posologie**
Antimoniate de méglumine	Glucantime®	100 mg/kg/jr tous les jours, pendant 21 jours, voie sous-cutanées
Allopurinol	Zyloric®	30 mg/kg/jr tous les jours, voie orale

(Bourdoiseau et Franc, 2008).

Toutefois l'association de l'antimoniate de méglumine avec l'allopurinol, si elle diminue les risques de rechute, ne stérilise pas l'animal sur le plan parasitaire à long terme. La rémission clinique s'accompagne d'une diminution du nombre de parasites dans la peau et les nœuds lymphatiques, mais même au terme d'une longue période d'administration d'allopurinol seul, les leishmanies persistent dans les tissus (Manna et *al*, 2008). D'autres molécules sont ou ont été utilisées mais présentent des inconvénients majeurs (Noli et Auxilia, 2005).

- L'amphotéricine B (Fungizone®), très efficace mais néphrotoxique, difficile d'administration (voie intraveineuse stricte) ;
- La miltéfosine, efficace et facile d'administration (voie orale), peu toxique (sauf tératogénicité) ;
- La paromomycine, efficace mais néphrotoxique. Ces molécules doivent être réservées à un usage hospitalier strict : « l'usage vétérinaire de l'amphotéricine B liposomale et des autres molécules antileishmaniennes nouvelles (miltéfosine, paromomycine) doit être évité afin d'empêcher le développement de chimiorésistance » (Manna et *al*, 2008).

Les autres molécules citées dans la littérature ne sont pas efficaces ou nécessitent des études complémentaires (quinolones, métronidazole, etc.) (Bourdoiseau et Franc, 2008).

5.1.3. Suivi thérapeutique

D'après Bourdoiseau et Franc (2008), l'animal traité doit être suivi régulièrement par :

- Un examen clinique rigoureux afin de détecter aussi précocement que possible toute rechute ; le propriétaire doit être informé du fait que l'animal reste source de parasites même après traitement et doit connaître les signes cliniques évocateurs (amaigrissement, abattement, etc.); l'administration continue d'allopurinol diminue significativement les risques de rechute ;
- Un examen biologique complet (numération et formule, protéinémie et électrophorèse, urémie, créatinémie, densité urinaire) pour suivre l'évolution de l'anémie (a)régénérative et de l'insuffisance rénale ;
- Un examen sérologique (IFI par exemple) quantitatif, l'augmentation significative du titre (au moins de deux dilutions) étant préalable ou synchrone d'une rechute; c'est l'augmentation du titre qui est significative et non le maintien du titre à un niveau élevé, la séronégativation n'étant pas une finalité.

5.2. Leishmaniose zoonose – rôle du chien – prévention

5.2.1. Précautions

La contamination humaine est essentiellement vectorielle assurée par la piqûre de phlébotomes infectants, eux-mêmes infectés lors de repas chez le chien parasité, en état asymptomatique ou malade. D'autres espèces animales dont le chat, peuvent jouer un rôle de réservoir secondaire de *L. infantum*. Aucun autre arthropode n'est impliqué dans la transmission du parasite. La manipulation de l'animal infecté, notamment lors des soins de toilettage ou de l'utilisation de shampooing, doivent être effectués selon les règles élémentaires d'hygiène; le port de gants jetables en cas de plaies ou d'ulcères cutanés est recommandé; la non-confirmation de la transmission directe (ou indirecte et passive par d'autres vecteurs) ne signifie pas qu'elle n'existe pas.

5.3. Prophylaxie chez le chien

Deux mesures prophylactiques sont utilisables chez le chien en vue de diminuer les risques d'infection du chien concerné, et donc indirectement de ses congénères et de l'homme.

5.3.1. Protection vis-à-vis des piqûres de phlébotomes

À l'heure actuelle, seuls des insecticides de la classe des pyréthrinoïdes ont démontré une efficacité répulsive antigorgement et/ou insecticide contre les phlébotomes avec une commercialisation dans cette indication pour le chien. Deux pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine), sous diverses formes galéniques (collier, spot-on, spray) et diverses présentations (association ou non à d'autres molécules) sont disponibles avec AMM (Tableau 11).

Tableau 10 : Produits insecticides commercialisés pour le chien avec une indication anti-phlébotomes.

Molécule	Nom commercial	Forme galénique	Durée d'efficacité	Observation (latence)
Deltaméthrine	Scalibor®	Collier	5 mois	Appliquer 7 jours avant le risque de piqûre de phlébotomes
Perméthrine	Pulvex®	Spot-on	8 jours	
Perméthrine + imidaclopride	Advantix®	Spot-on	3 semaines	2 jours
Perméthrine + dinotéfurane pyriproxyfène	Vectra®3D	Spot-on	1 mois	Quelques heures
Perméthrine + fipronil	Frontline® Tri-Act Effitix®	Spot-on Spot-on	3 semaines 4 semaines	Quelques heures

(Bourdoiseau et René, 2015)

Le choix est conditionné par le temps de latence avant la mise en place de l'efficacité et la rémanence du produit : telle ou telle présentation sera ainsi choisie selon le délai de protection nécessaire et la durée séparant le départ de l'animal d'une zone *a priori* saine et son arrivée en zone d'endémie. Ces médicaments ne doivent pas être utilisés chez le chat car très toxiques pour cette espèce. En Italie, Maroli et *al.* (2005) ont démontré que l'utilisation prolongée de colliers insecticides chez une fraction importante de la population canine entraîne une diminution du nombre de sujets séropositifs (Maroli et *al*, 2001).

5.3.2. Vaccination

Divers essais de vaccination ont été menés contre la leishmaniose canine tant en Amérique du Sud, notamment au Brésil, qu'en Europe, et plusieurs vaccins sont aujourd'hui commercialisés. En France, elle est disponible depuis 2011 à l'aide d'une préparation vaccinale constituée de protéines excrétées-secrétées de *L. infantum* associées à un adjuvant (CaniLeish®) (Lemesre et *al*, 2007; Bourdoiseau et *al*, 2009).

Cette vaccination (3 injections à 3 semaines d'intervalle) nécessite des conditions pour sa réalisation : le chien doit être en bonne santé, âgé d'au moins 6 mois et être indemne de toute infection leishmanienne (détection sérologique préalable effectuée par un test rapide différenciant les anticorps anti-kinésines issus d'une infection active de ceux induits par une vaccination). L'immunité s'installe à partir de la 4^{e} semaine qui suit la 3^{e} injection de la primo vaccination et persiste un an. Cette vaccination ne dispense pas de l'utilisation de pyréthrinoïdes en protection contre les piqûres de phlébotomes. Elle diminue de façon significative le risque d'infection et de maladie (Bourdoiseau et René, 2015).

CHAPITRE 1 : ETUDE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE CANINE

1. Introduction

Dans le bassin méditerranéen ainsi que dans une grande partie du monde les leishmanioses humaines viscérale et cutanée sont principalement causées par *Leishmania infantum*. Cette dernière est aussi responsable de la leishmaniose canine, un syndrome cutanéo- viscéral chronique.

En Algérie, les leishmanioses sont un problème majeur de santé publique. Elles occupent la première place dans les maladies parasitaires et représentent 35 % des maladies à déclaration obligatoire (Achour Barchiche et *al*, 2009). Par ailleurs, la leishmaniose canine est une maladie d'importance croissante, elle est répandue dans environ 50 pays, et sévit sous forme enzootique dans de nombreux pays méditerranéens dont l'Algérie. Le chien est reconnu comme le seul réservoir domestique de *Leishmania infantum.*

Des études épidémiologiques effectuées au Brésil (Oliveira et *al*, 2001) et en Algérie (Mouloua et *al*, 2014) ont montré qu'il y avait une association fortement significative entre les leishmanioses humaines et la leishmaniose canine (LC): l'incidence des cas humains augmente dans les zones où les taux de prévalence de la leishmaniose canine sont élevés.

La leishmaniose viscérale humaine est une maladie grave ré-émergente dans tout le bassin méditerranéen d'où l'importance d'estimer sa prévalence chez le chien afin de déterminer le risque pour l'homme et pour la santé animale. Par conséquent, la présente étude a eu pour objectifs de :

1. Evaluer la prévalence de la leishmaniose canine dans les wilayas de Bouira, qui fait partie du foyer historique de la Kabylie et de Sétif, suspectée d'être un nouveau foyer ;

2. Décrire les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose canine dans ces deux régions ;

3. Comparer la pertinence des résultats obtenus par différentes méthodes de diagnostic clinique et sérologiques.

2. Matériel & Méthodes

2.1. Zone d'étude

Le choix s'est porté sur la wilaya de Bouira, foyer historique de la LC en Kabylie qui se caractérise par une prévalence très élevée de la maladie et celle de Sétif récemment suspectée comme un foyer de la LC. La collaboration des vétérinaires exerçant dans ces régions a également constitué une raison supplémentaire à cette sélection.

2.1.1. Bouira

Elle occupe une superficie de 4 439 km^2 et comprend 12 Daïras et 45 Communes, elle est bordée par les chaînes montagneuses du Djurdjura et des Bibans, elle est délimitée :

- au nord par les deux wilayas de Boumerdès et de Tizi Ouzou ;
- à l'est par les deux wilayas de Béjaïa et de Bordj Bou Arréridj ;
- au sud par la wilaya de M'Sila ;
- à l'ouest par les deux wilayas de Blida et de Médéa.

-Relief : Il est contrasté et comporte cinq grands ensembles physiques :

- La dépression centrale (plaines des Aribes, plateau d'El Asnam, la vallée de Ouadhous et Oued Sahel) ;
- La terminaison orientale de l'Atlas blidéen ;
- Le versant sud du Djurdjura (Nord de la wilaya);
- La chaîne des Bibans et les hauts reliefs du sud;
- La dépression sud des Bibans.

La zone boisée représente 25 % du territoire avec 111 490 ha de massif forestier composé de pin d'Alep, le chêne vert ainsi que le chêne-liège et le cèdre de l'atlas (sud Djurdjura)

-Climat : Le climat est chaud et sec en été, froid et pluvieux en hiver.
La pluviométrie moyenne est de 660 mm/an au nord et de 400 mm/an dans la partie sud. Les températures varient entre 20 et 40 °C de mai à septembre et de 2 à 12 °C de janvier à mars.

Figure 23 : Situation et relief de la wilaya de Bouira

2.1.2. Sétif

La wilaya de Sétif occupe une superficie de 6 504 km^2 et comprend 20 Daïras et 60 Communes. Elle est située au nord-est de l'Algérie, limitée :

- Au Nord par les wilayas de Béjaia et Jijel ;
- A l'Est par la wilaya de Mila ;
- Au Sud par les wilayas de Batna et M'Sila ;
- A l'Ouest par la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

-Relief : Sétif est une wilaya de hautes terres où 3 zones se distinguent :

- La zone montagneuse : au Nord représentée par la chaîne des Babors qui s'étend sur une centaine de kilomètres couvrant pratiquement le Nord de la wilaya où on rencontre des cimes élevés dont la montagne de Babor avec 2004 m.
- Les hautes plaines : occupent la région centrale de la wilaya dont l'altitude varie entre 800 et 1 300 m. Au niveau de cette zone émerge des mamelons et quelques bourrelets montagneux.

- La frange semi aride : une lisière au Sud renfermant des cuvettes où dorment les chotts.

-Climat : Le climat est continental avec des étés chauds et secs et des hivers rudes. Le mois le plus pluvieux est avril et le plus sec est juillet. Les pluies sont insuffisantes et irrégulières à la fois dans le temps et dans l'espace ; si les monts de Babor sont les plus arrosés en recevant 700 mm par an, la quantité diminue sensiblement pour atteindre 400 mm en moyenne par an sur les hautes plaines par contre la zone Sud –Sud- Est est la moins arrosée, les précipitations ne dépassent pas les 300 mm.

Figure 24: Situation et relief de la wilaya de Sétif,

2. 2. Période d'étude

L'enquête sérologique transversale s'est déroulée de début mars jusqu'à début septembre 2016 soit sur période totale de 6 mois.

2. 3. Définition du « cas »

Toute étude épidémiologique descriptive doit comprendre une définition préalable du cas, car elle vise à fournir une information qui correspond effectivement à ce que l'on cherche et à garantir la standardisation des conditions d'observation. Dans notre enquête, on entend par cas : « chien leishmanien », lorsque l'animal fournit une réponse positive au test rapide Witness® Leishmania et/ou à l'Immunofluorescence Indirecte (IFI) à un seuil de positivité de 1/100.

2. 4. Unité et Population d'étude

L'unité « animal » a été retenue comme unité démographique et non pas un groupe d'animaux dans la mesure où il s'agit de chiens généralement non regroupés et c'est l'animal qui constitue l'unité de base.

Un critère d'exclusion (âge) a été introduit : les jeunes chiens âgés de moins de six mois ont été exclus, puisque la durée d'incubation de la maladie est assez longue, de l'ordre de plusieurs mois à plusieurs années. Un délai minimal de six mois est indispensable pour l'apparition des anticorps sériques (Bourdoiseau et Franc, 2008). Sinon la population mère a été constituée des chiens présents dans la région d'étude.

2.5. Echantillonnage

La population canine n'étant pas recensée, une méthode d'échantillonnage ne nécessitant pas de recensement exhaustif des individus a été appliquée. Un sondage stratifié puis à deux degrés a été retenu :

2.5.1. Sondage stratifié

Le principe de la stratification est de définir des « sous-ensembles » dans lesquels les individus sont plus homogènes entre eux que dans la population générale (Toma et *al*, 2001). Dans la présente enquête il a été supposé qu'il y avait une hétérogénéité dans la répartition de la leishmaniose canine, d'où une variabilité de prévalence dans la région d'étude.

Ces différences de localisation semblent être en rapport avec la répartition des phlébotomes vecteurs (Izri et *al*, 1992). En effet, la répartition et la densité du vecteur (phlébotome) est en relation étroite avec certains biotopes comme la végétation, la température, l'humidité, le vent, l'altitude et la nourriture.... L'avantage de la stratification est de pouvoir mettre en évidence les disparités écologiques de chaque milieu et leur effet sur la distribution spatiale de la maladie (Lanotte et *al*, 1979). Pour cela, nous avons divisé la région d'étude en deux strates écologiques : **Strate de Bouira** et **Strate de Sétif**.

2.5.2. Sondage à deux degrés

2.5.2.1. Premier degré : Echantillonnage aléatoire simple

Les communes ont été retenues comme unité d'échantillonnage. Une base de sondage regroupant toutes les communes (45 communes pour Bouira et 60 pour Sétif) de la zone d'étude a été constituée à partir d'un document administratif. Un taux de sondage de 10% a été choisi pour estimer le nombre de communes à inclure dans chacune des deux strates, ce qui ramène le nombre de communes à 4 ou 5 pour Bouira et 6 pour Sétif. La sélection des communes a été réalisée par tirage au sort.

La situation géographique des communes ainsi échantillonnées est présentée dans la figure ci-dessous.

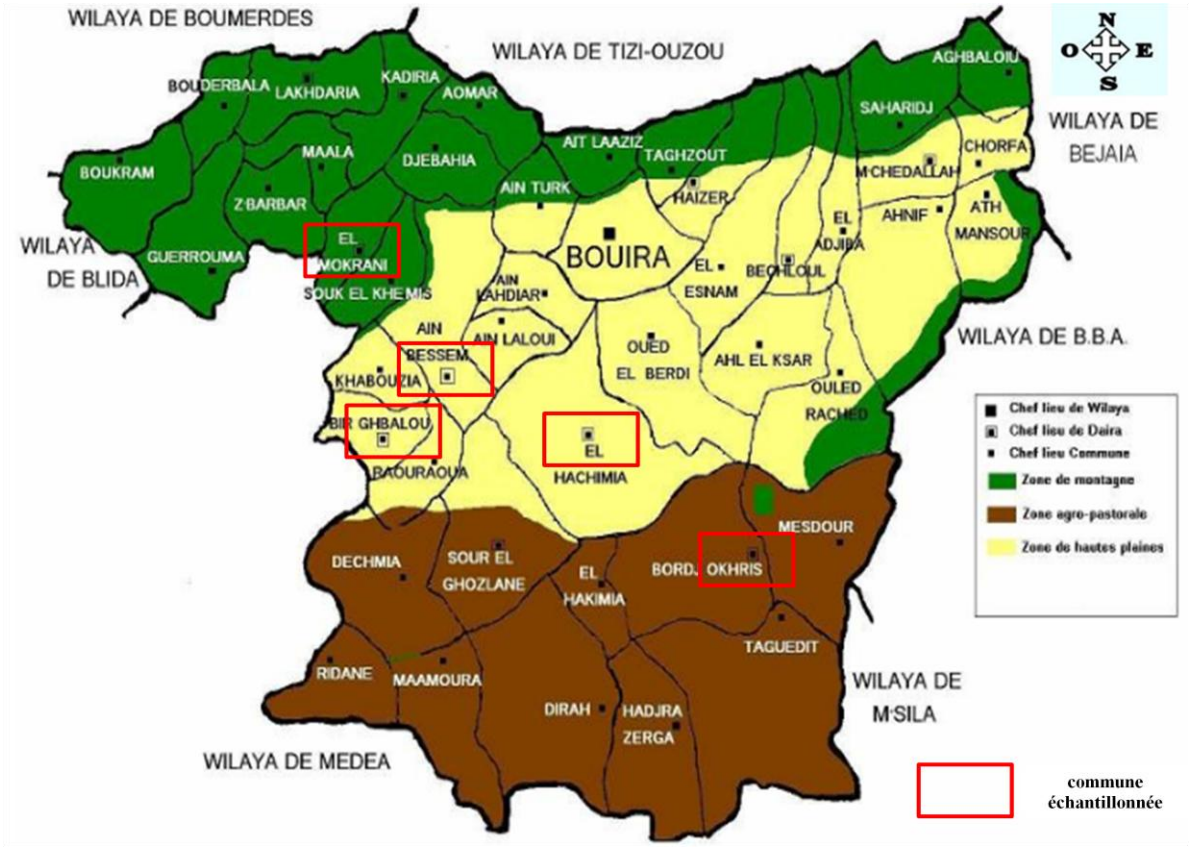


Figure 25 : Communes échantillonnées dans la wilaya de Bouira

Figure 26 : Communes échantillonnées dans la wilaya de Sétif

2.5.2.2. Second degré : Echantillonnage aléatoire simple

A notre connaissance, aucune étude n'a été menée afin d'estimer la taille précise de la population canine dans la zone d'étude et ce malgré le fait que le chien soit considéré comme le réservoir principal de la rage, l'hydatidose et la leishmaniose.

En l'absence de données expérimentales nous ne pouvons que nous remettre à des modèles théoriques notamment en nous inspirant des études réalisées par l'OMS (dans le cadre de la promotion de compagnes de vaccination des chiens contre la rage) qui montrent que les ratios appliqués sur les populations ne varient que très peu en fonction des régions du monde, en particulier le rapport chien/homme dans les pays américains et européens (Bogel, 1990).

Les études de Matter (1987) et d'Artois (1986), citées par Seghaier et *al.* (2010) portant sur les aspects socio-écologiques de la population canine en Tunisie peuvent constituer par extrapolation une assise intéressante pour l'estimation de la population canine et ses caractéristiques. Selon ces études la densité des chiens (compris les chiens errants) varie avec le type d'habitat, le niveau culturel et socio-economique de la population humaine :

- En zone rurale, plus de 80% des ménages possèdent au moins un chien. La densité est d'un chien pour 3 à 6,8 habitants ;
- En zone urbaine, la densité est de l'ordre d'un chien pour 16 habitants ;
- En zone semi-urbaine, elle serait d'un chien pour 46 habitants (Seghaier et *al*, 2010).

En général, toutes les localités prospectées peuvent être considérées comme des zones semi-urbaines aussi l'estimation d'un chien pour 46 habitants a été retenue (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Taux théoriques de chiens à prélever et nombre de chiens prélevés pour chaque commune rapporté au nombre d'habitants

Strate	Commune	Nombre d'habitants	Nombre de chiens estimé	Nombre de chiens prélevés	Taux de sondage (%)
Sétif	Bougaa	30987	674	18	2,67
	AinRoua	15000	326	7	2,15
	TalaIfacene	21 280	463	10	2,16
	Hammam Guergour	15853	345	9	2,61
	Maoklane	15715	342	28	8,20
	Ain Abessa	16770	365	8	2,19
	S/Total	**115605**	**2513**	**80**	**3,18**
Bouira	Ain Bessem	42635	927	12	1,29
	Bir Ghbalou	11016	239	9	3,76
	El Mokrani	3961	86	5	5,81
	El Hachimia	17322	377	7	1,86
	Borj Okhris	10467	228	7	3,08
	S/Total	**85401**	**4370**	**40**	**0,92**
Total Région d'étude		**201006**	**6883**	**120**	**1,74**

Au total 120 prélèvements ont été aléatoirement effectués dont 80 à Sétif et 40 à Bouira avec un taux de sondage de 1.74%.

2.6. Mesure

2.6.1. Performances des tests utilisés

2.6.1.1. Test rapide de diagnostic Witness® Leishmania

La technique sérologique utilisée est l'immunomigration rapide (*Rapid Immuno Migration*, RIM™). Ce sont des tests **qualitatifs**, faciles à mettre en œuvre et qui donnent des résultats satisfaisants. Les kits utilisés sont : Witness® Leishmania (Zoetis, Lyon) qui présentent une

bonne spécificité variant de 82% à 100%. Néanmoins, leur performance n'est pas encore optimale, leur sensibilité variant fortement de 38% à 75%. Leur performance diagnostique reste inférieure à celle de l'IFI ou de l'ELISA (Binachi, 2001 ; Maia et Campino, 2008 ; Rodríguez-Cortés et *al*, 2013).

2.6.1.2. Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte (IFI), est la méthode **quantitative** de référence selon l'Office International des Épizooties (OIE, 2008). Ce test est utile dans les études épidémiologiques, en pratique clinique, ainsi que dans le suivi du traitement (Alvar et *al*, 2004).

C'est une méthode réputée pour être sensible et spécifique. La sensibilité varie entre 92 et 99% (Papierok, 2002; Keck, 2004). La spécificité est de 98 %. De cette façon l'IFI est considérée comme le «gold standard» pour la surveillance active et le diagnostic de la leishmaniose canine (OIE, 2008).

2.7. Identification de l'animal et examen clinique

L'identification a porté sur :

- La race de l'animal;
- Le sexe ;
- L'âge;
- L'origine géographique ;
- L'activité.

Un examen clinique a été systématiquement entrepris afin de signaler tout symptôme évocateur de la leishmaniose canine (amaigrissement, lésions cutanées, adénopathies, chute de poils…) (Appendice I). Les résultats de cet examen étaient systématiquement communiqués aux propriétaires dont les coordonnés : noms, prénoms, adresses et numéros de téléphones ont également été compilés.

2.8. Prélèvement

2.8.1. Matériel

Voir appendice II

- Muselière
- Alcool chirurgical 70°
- Coton hydrophile
- Garrot
- Tubes secs et EDTA
- Aiguilles 0,8 x 25 mm
- Adaptateur
- Glacière
- Fiche de renseignement.

2.8.2.Technique de prélèvement

Le prélèvement sanguin a été réalisé sur une veine périphérique de calibre moyen (veine radiale ou saphène) après rasage et désinfection du site de ponction.

Deux prélèvements sanguins ont été effectués : un sur tube sec pour la sérologie et un autre sur tube EDTA. Ces derniers ont été réalisés selon la technique décrite par Medaille et *al* (2005).

Chaque échantillon a été identifié en notant avec précision le numéro et la date du prélèvement.

2.8.3. Conservation et acheminement

Les prélèvements sanguins ont été déposés dans une glacière (+ 4 °C), gardés au réfrigérateur et centrifugés le soir ou le lendemain. Une fois centrifugé à une vitesse de 2 500 à 3 000 tours/mn pendant 10 mn, les sérums ont été prélevés et mis dans des tubes Eppendorfs identifiés. Ces derniers ont été stockés à -20°C, pour être analysés ultérieurement.

2.9. Réalisation des tests de diagnostic

2.9.1. Les tests d'immunomigration rapide

Principe du test : Le test Witness® Leishmania (Zoetis, Lyon) est un test de réalisation simple, fondé sur une technique d'immunomigration rapide (*Rapid Immuno Migration*, RIM™). L'échantillon à tester contenant les anticorps anti-Leishmania (sang total, sérum ou plasma) est mis en contact avec des particules d'or colloïdal sensibilisées. Le complexe ainsi formé migre sur une membrane avant d'être capturé sur une zone réactive, au niveau de laquelle sa concentration provoque la formation d'une bande de couleur rose clairement visible. Une bande de contrôle, située à l'extrémité de la membrane, permet de s'assurer que le test a été réalisé correctement (Zoetis, 2010).

➢ **Echantillons** Le test a été réalisé sur du sang total directement après prélèvement ou bien sur du sérum après récupération de ce dernier. Les échantillons sont toujours prélevés avec une seringue et une aiguille stériles. Pour les analyses repoussées (jusqu'à 2 jours), les échantillons étaient conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C.

➢ **Réalisation du test et résultats (Figure 28)** Une goutte d'échantillon (10 ul) et 4 gouttes solution tampon (40 µl) sur la membrane dans le puits échantillon, fenêtre (1). On observe au bout de 10 minutes, la présence ou non de bandes de couleur rose dans les fenêtres (2) et (3). Le test est validé si une bande est présente dans la fenêtre de lecture au niveau du repère correspondant (3). La présence d'une bande de couleur rose au niveau du repère 2 et l'apparition d'une bande au niveau du repère 3 signifie que le test est positif, donc la présence d'anticorps anti-Leishmania (figure 28).

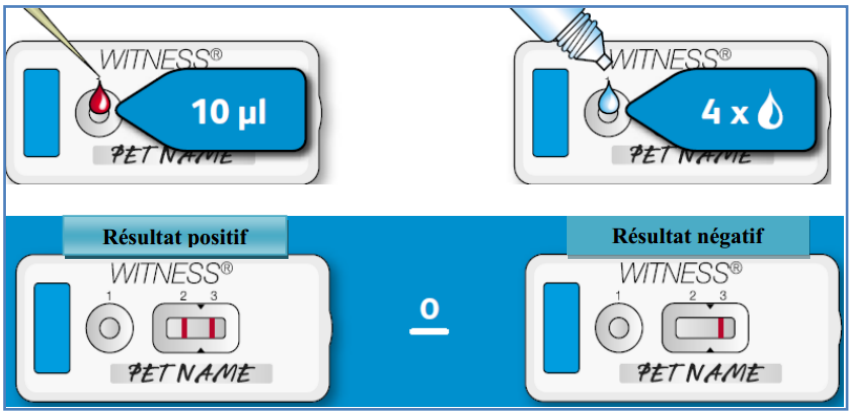


Figure 27 : Mode opératoire technique du test Witness® Leishmania (Zoetis, 2010).

Figure 28: Test Witness® Leishmania réalisé sur sang total, résultat **Positif** (photo. Personnelle).

2.9.2. L'Immunofluorescence indirecte

Les échantillons de sérum ont été analysés au laboratoire de l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes (URMITE) [CNRS UMR 7278 IRD 198 INSERM U1095 Aix-Marseille Université]. Suivant le même protocole opératoire décrit par Lanotte (1975), la lecture du test de dépistage a toujours été validée par une personne chevronnée.

➢ **Principe du test :** Cette technique sérologique est basée sur la fixation des anticorps spécifiques sur l'antigène figuré qui est révélée par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à l'isothionate de fluorescéine.

➢ **Réalisation du test et résultats:**

Les dilutions de sérums sont mises en contact avec des promastigotes fixés dans les puits d'une lame. La réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) est mise en évidence par l'addition d'antiglobuline conjuguée à une substance fluorescente, et une contre-coloration au bleu d'Evans. Les sérums sont décongelés au réfrigérateur à +4₀C, puis le protocole suivant est mis en œuvre :

- Préparation de lames : on dépose à l'aide d'une pipette une quantité de 10µl d'Ag *Leishmania* (forme promastigote) [5× 106] dans chaque puits, on laisse les lames pendant 30 min sous PSM2 pour le séchage.
- Fixation à l'éthanol pendant 15 min.

- Réalisation des dilutions (1/25), (1/50), (1/100), (1/200), (1/400), (1/800) en PBS pour chaque sérum y compris les deux témoins utilisés, l'un positif et l'autre négatif.
- Dépôt de 25µl de chaque dilution de sérums sur les puits, les deux premiers puits sont réservés pour les sérums témoins.
- Les lames sont remises dans une chambre humide à l'étuve à 37°C pendant 30 min.
- Rinçage des lames avec l'eau du robinet afin de procéder au lavage.
- Lavage : 2 fois dans un bain qui contient du PBS tween 80 pendant 10 min, et une fois dans un bain avec l'eau distillée pendant 10 min, puis séchage à l'étude à 37°C pendant 30 min.
- Dans chaque puits, on rajoute 25µl de conjugué (IgG,anti-Dog / Immuno Research) dilué au 1/100e mélangé avec le Bleu d'Evans et placé dans une chambre humide, on les laisse à l'étuve 37°C pendant 30 min.
- Un deuxième lavage et séchage de la même manière que citer précédemment.
- Dépôt de quelques gouttes de Fluoprep sur les lames, puis on les couvre avec une lamelle.
- Lecture qui s'effectue au microscope à fluorescence en lumière UV, avec un grossissement X 40.

Les parasites incubés avec des sérums positifs apparaissent colorés en vert (présence de fluorescence) (figure 29), ceux négatifs sont colorés en rouge (absence de fluorescence). L'interprétation se fait comme suit :

1. Absence de fluorescence = NEGATIF

2. Présence de fluorescence = deux cas de figure (selon le seuil de positivité) :

a) Présence de fluorescence à des dilutions élevées (1/25, 1/50) = NEGATIF ;
b) Présence de fluorescence à des dilutions basses (1/100 et moins) = POSITIF.

Différents degrés de fluorescence ont été notés : +++, ++, +, +/- et – pour Absence de fluorescence.

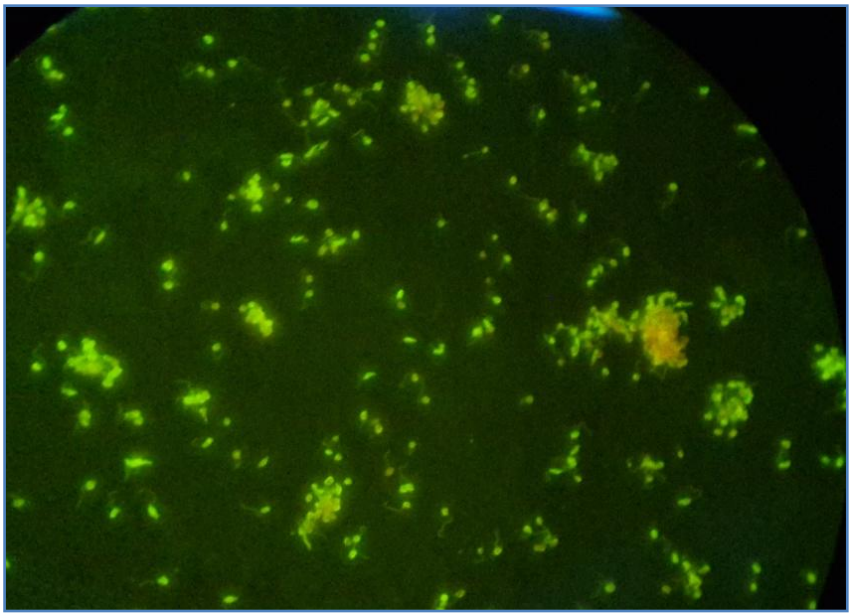


Figure 29 : Résultat de l'IFI ; **Positif** (+++) (Photo personnelle)

2.10. Analyses statistiques

Les données collectées et les résultats des analyses ont été saisis au fur et à mesure de l'étude, à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2007. Les prévalences calculées ont été estimées à un intervalle de confiance de 95% (IC 95%).

Une analyse univariée a été effectuée pour chaque facteur de risque en utilisant le test Z, Chi2, ou dans certains cas le test de Fisher exact sur le logiciel XLSTAT, version 2015. Les différences observées ont été considérées comme significatives pour une valeur de *p* inférieure à 0,05.

3. Résultats

Le nombre de prélèvements testés pour chaque commune ainsi que les résultats de l'analyse sérologique par les deux techniques IFI et Test Witness®, sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12 : Résultat de l'étude sérologique (IFI, Test Witness®)

Wilaya	Commune	Nombre de chiens testés	IFI	Test Witness®
			Positifs (Pa%)	Positifs (Pa%)
Sétif	Bougaa	18	14(77.87)	14(77.87)
	AinRoua	7	4(57.14)	4(57.14)
	TalaIfacene	10	6(60)	3(30)
	Hammam Guergour	9	7(77.78)	7(77.78)
	Maoklane	28	22(78.57)	21(75)
	Ain Abessa	8	7(87.5)	7(87.5)
	Total	**80**	**60(75)**	**54(70)**
Bouira	Ain Bessem	12	7(58.33)	6(50)
	Bir Ghbalou	9	6(66.67)	5(55.56)
	El Mokrani	5	3(60)	2(40)
	El Hachimia	7	4(57.14)	3(42.86)
	Borj Okhris	7	3(42.86)	3(42.86)
	Total	**40**	**23(57.5)**	**19(47.5)**
Total général		**120**	**83(69.17)**	**75(62.5)**

(Pa%) : ***Prévalence apparente***

3.1. Séroprévalences

3.1.1. Séroprévalence globale

Sur les 120 chiens analysés, 83 se sont montrés positifs en IFI au titre 1/100 soit une séroprévalence globale de 69.17 % avec un IC95% [60.9% et 77.4%] et 75 chiens par le test Witness® ce qui correspond à une séroprévalence de 62.5% avec IC95 % [53.8% et 71.2%]. La différence observée entre ces deux prévalences est statistiquement non significative, *p= 0,24.*

3.1.2. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps

Les sérums ont été testés à des dilutions allant de 1/25 à 1/800. Les résultats de la distribution des fréquences des titres en anticorps pour les 120 échantillons analysée par la technique de l'IFI, sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Séroprévalence vis-à-vis de *Leishmania* en fonction des titres en anticorps

Titres en anticorps	Nombre de positifs	Séroprévalence [IC95%]
1/25	91	75,83 [68.2% et 83.5%]
1/50	88	73,33 [65.4% et 81.2%]
1/100	83	69,17 [60.9% et 77.4%]
1/200	72	60 [51.2% et 68.8%]
1/400	29	24,17 [16.5% et 31.8%]
1/800	9	7,5 [2.8% et 12.2%]

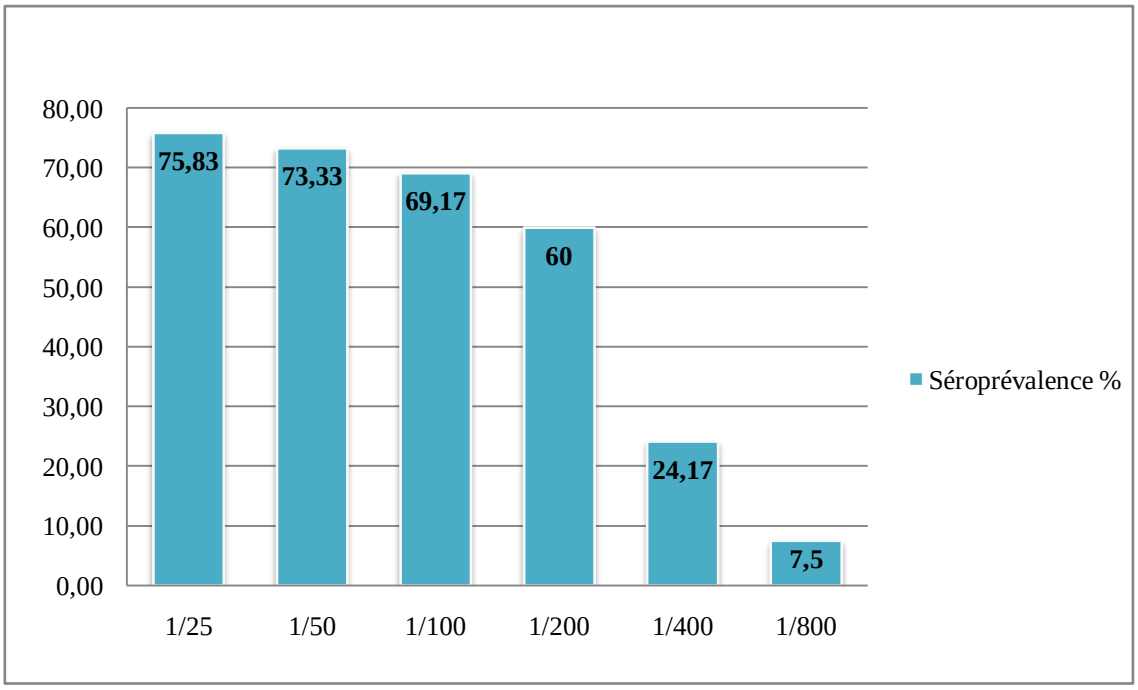


Figure 30: Variations de la séroprévalence vis-à-vis de *Leishmania infantum* en fonction des titres en anticorps.

Quatre-vingt-onze sérums se sont révélés positifs en IFI au titre 1/25 soit une séroprévalence de 75.83% ; 88 étaient positifs à 1/50 et 83 positifs à 1/100 soit des prévalences de 73.33% et 69.17% respectivement. Soixante douze, 29 et 9 sérums étaient positifs aux titres 1/200, 1/400 et 1/800, respectivement.

L'analyse statistique par le test de Khi2 indique que les différences observées sont significatives (p < 0,0001), la procédure de Marascuilo a permis de dégager 03 groupes comme suit :

Dilutions	**Proportions**	**Groupes**		
1/800	0,075	A		
1/400	0,242		B	
1/200	0,600			C
1/100	0,692			C
1/50	0,733			C
1/25	0,758			C

Le groupe A représenté par la dilution 1/800 et la prévalence à cette dilution était de 7.5%. La dilution 1/400 représente le groupe B et la prévalence était de 24.2%.
Le groupe C est représenté par les dilutions 1/200, 1/100, 1/50 et 1/25, les prévalences observées à ces dilutions sont 60%, 69.2%, 73.3% et 75.8%, respectivement.

Les différences observées entre ces groupes sont significatives.

3.2. Epidémiologie

Les résultats de l'étude de l'influence des différents facteurs de risque (âge, race, sexe, activité et origines (wilaya, commune)) sur la séroprévalence de la LC sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Analyse des facteurs de risque influant sur la séroprévalence vis-à-vis *Leishmania infantum* dans la population canine étudiée

			Nombre de positifs		Prévalence % [IC95%]		Valeur de *p*		Signification	
		Total	Wit	IFI	Wit	IFI	Wit	IFI	Wit	IFI
Age	≤ 1 an	4	2	2	50 [1% et 99%]	50 [1% et 99%]	0,5881	0,8374	NS	NS
	> 1 à 4 ans	73	49	51	67,12 [56.3% et 77.9%]	69,86 [59.3% et 80.4%]				
	> 4 à 8 ans	28	15	19	53,57 [35.1% et 72%]	67,86 [50.6% et 85.2%]				
	> 8 ans	15	9	11	60 [35.2% et 84.8%]	73,33 [50.9% et 95.7%]				
Sexe	Males	80	54	58	67,5 [57.2% et 77.8%]	72,5 [62.7% et 82.3%]	0,1659	0,2449	NS	NS
	Femelles	40	21	25	52,5 [37% et 68%]	62,5 [47.5% et 77.5%]				
Race	Commune	52	32	36	61,54 [48.3% et 74.8%]	69,23 [56.7% et 81.8%]	0,5158	0,7311	NS	NS
	Berger allemand	20	11	13	55 [33.2% et 76.8%]	65 [44.1% et 85.9%]				
	Berger belge	4	2	2	50 [1% et 99%]	50 [1% et 99%]				
	Berger malinois	2	2	2	100 [100%]	100 [100%]				
	Berger croisé	7	4	4	57,14 [20.5% et 93.8%]	57,14 [20.5% et 93.8%]				
	Beagle	3	3	3	100 [100%]	100[100%]				
	Rotweiller	2	2	2	100 [100%]	100 [100%]				
	Setter Irlandais	2	0	0	0	0				
	Basset	2	1	1	50 [-19.3% et 119.3%]	50 [-19.3% et 119.3%]				
	Braque	8	5	6	62,5 [29% et 96%]	75 [45% et 105%]				
	Sloughi	5	4	5	80 [44.9% et 115.1%]	100 [100%]				
	Staff	2	2	2	100 [100%]	100 [100%]				
	Chien loup	2	1	1	50 [-19.3% et 119.3%]	50 [-19.3% et 119.3%]				
	Français blanc et orange	4	4	4	100 [100%]	100 [100%]				
	Le grand Anglo-français	2	1	1	50 [-19.3% et 119.3%]	50 [-19.3% et 119.3%]				

	Autres races	3	1	1	33,33 [-20% et 86.7%]	33,33 [-20% et 86.7%]				
Activité	Garde	52	30	31	57,69 [44.3% et 71.1%]	59,62 [46.3% et 73%]	0,6866	0,1791	NS	NS
	Berger	26	18	19	69,23 [51.5% et 87%]	73,08 [56% et 90.1%]				
	Chasse	34	21	25	61,76 [45.4% et 78.1%]	73,53 [58.7% et 88.4%]				
	Compagnie	2	1	2	50 [-19.3% et 119.3%]	100 [100%]				
	Errant	6	5	6	83,33 [53.5% et 113.2%]	100 [100%]				
Signes cliniques	Présence de signes	87	49	56	56,32 [45.9% et 66.7%]	64,37 [54.3% et 74.4%]	0,0137	0,0456	S	S
	Absence de signes	33	26	27	78,79 [64.8% et 92.7%]	81,82 [68.7% et 95%]				
Strate	Wilaya de Sétif	80	56	**60**	70 [60% et 80%]	75 [65.5% et 84.5%]	0,0284	0,0392	S	S
	Wilaya de Bouira	40	19	**23**	47,5 [32% et 63%]	57,5 [42.2% et 72.8%]				
Commune	Bougaa	18	14	14	77,78 [58.6% et 97%]	77,78 [58.6% et 97%]	0,1536	0,6167	NS	NS
	AinRoua	7	4	4	57,14 [20.5% et 93.8%]	57,14 [20.5% et 93.8%]				
	TalaIfacene	10	3	6	30 [1.6% et 58.4%]	60 [29.6% et 90.4%]				
	Hammam Guergour	9	7	7	77,78 [50.6% et 104.9%]	77,78 [50.6% et 104.9%]				
	Maoklane	28	21	22	75 [59% et 91%]	78,57 [63.4% et 93.8%]				
	Ain Abessa	8	7	7	87,5 [64.6% et 110.4%]	87,5 [64.6% et 110.4%]				
	Ain Bessem	12	6	7	50 [21.7% et 78.3%]	58,33 [30.4% et 86.2%]				
	Bir Ghbalou	9	5	6	55,56 [23.1% et 88%]	66,67 [35.9% et 97.5%]				
	El Mokrani	5	2	3	40 [-2.9% et 82.9%]	60 [17.1% et 102.9%]				
	El Hachimia	7	3	4	42,86 [5.9% et 79.2%]	57,14 [20.5% et 93.8%]				
	Borj Okhris	7	3	3	42,86 [5.9% et 79.2%]	42,86 [5.9% et 79.2%]				

L'analyse des résultats obtenus par les deux tests de diagnostic (Witness et IFI) montre que l'âge, le sexe, la race et l'activité du chien n'ont pas d'influence significative sur la séropositivité vis-à-vis de *Leishmania infantum* ($p > 0,05$).

En revanche, l'origine du chien influe significativement sur la séroprévalence (p = 0.039). En effet, au niveau de la wilaya de Sétif, 80 des chiens (75%), sont séropositifs alors que seulement 40 des chiens de la wilaya de Bouira (57.5%) présentent des anticorps anti *Leishmania infantum.* Au niveau des communes, la différence entre les prévalences communales est statistiquement non significative (p = 0.61).

En ce qui concerne la séropositivité et la présence des signes cliniques, la séroprévalence est de 64,37% IC95% [54.3% et 74.4%] chez les chiens ayant au moins un signe et de 81,82% IC95% [68.7% et 95%] chez les chiens asymptomatiques. Par conséquent la maladie serait beaucoup plus présente chez les animaux apparemment sains (p = 0,045).

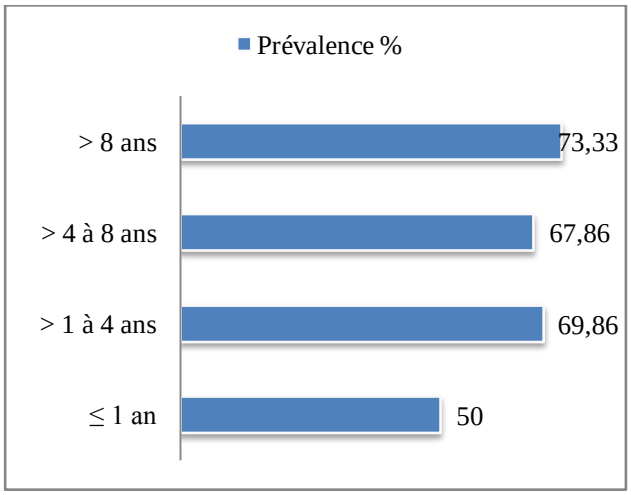


Figure 31 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* en fonction de l'âge.

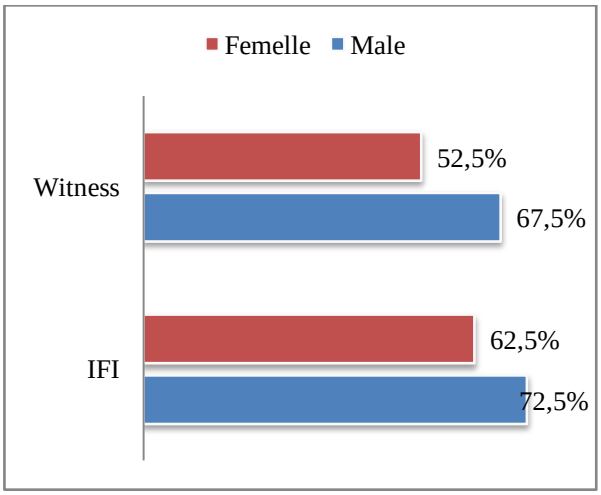


Figure 32 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* en fonction du sexe.

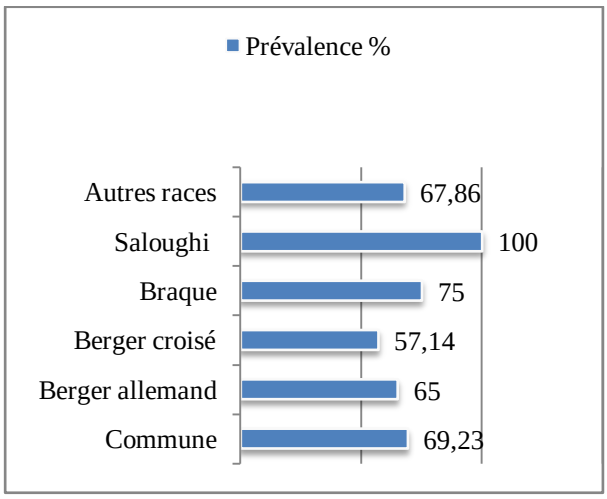


Figure 33 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* en fonction de race.

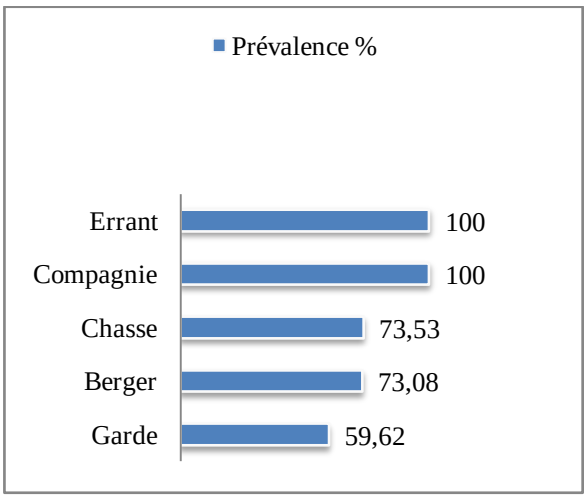


Figure 34 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* en fonction de l'activité du chien.

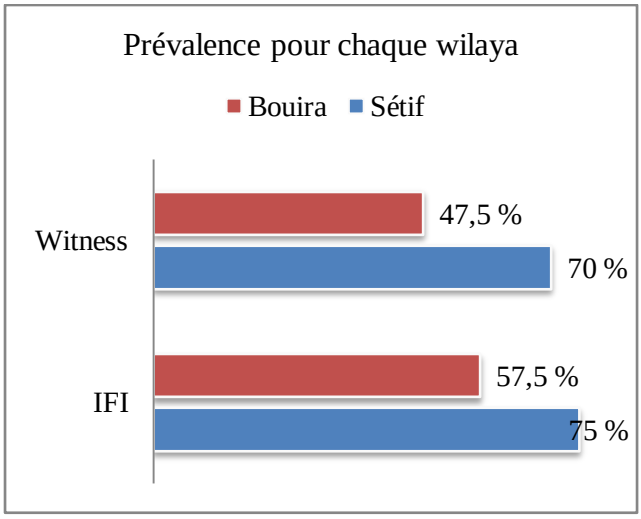


Figure 35 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* par wilaya.

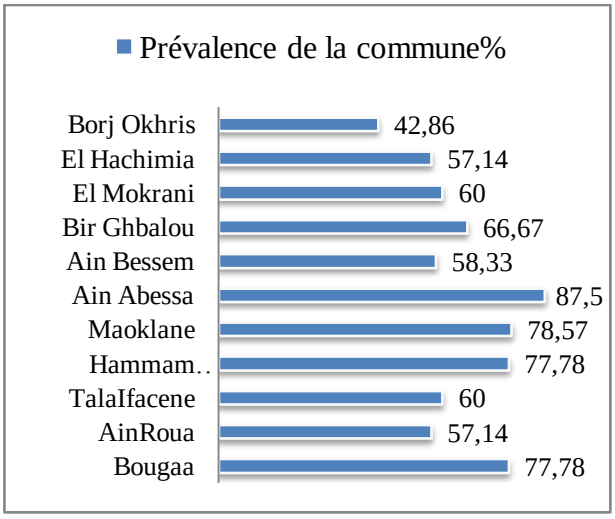


Figure 36 : Séroprévalence vis-à-vis *L. infantum* par commune

3.3. Symptomatologie

Les lésions évocatrices de la leishmaniose canine retenues ont été l'amaigrissement, l'ulcération, la dépilation, l'adénopathie, l'abattement (asthénie), l'onychogryphose, le squamosis, la splénonomégalie et l'atteinte rénale. Les autres lésions, ont été classées dans la catégorie « autre signe clinique ».

Figure 37: Abattement « Aspect de vieux chien» (photo personnelle).

Figure 38 : Abattement et atteinte de l'état général (photo personnelle).

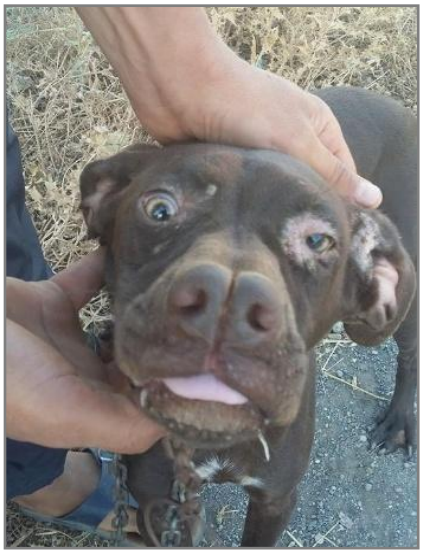


Figure 39 : Dépilation du pourtour de l'œil «signe de lunettes » (photo personnelle).

Figure 40 : Ulcération (photo personnelle).

Figure 41 : Dépilation (photo personnelle). **Figure 42 :** Amaigrissement (photo personnelle).

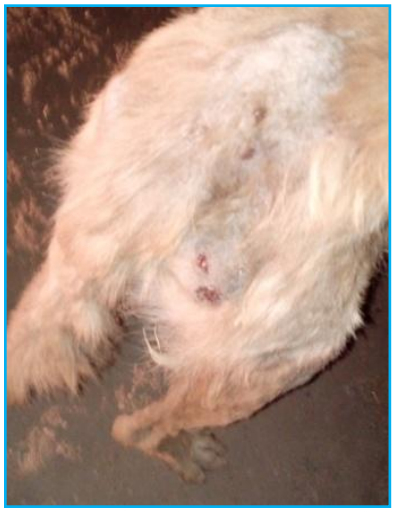


Figure 43 : Squamosis (photo personnelle).

Figure 44 : dépilation, squamosis (photo personnelle).

Figure 45 : Onychogryphose (photo personnelle).

Figure 46 : Ulcération (photo personnelle).

Figure 47 : Ulcération au niveau de la tête (photo personnelle).

Figure 48 : Escarre articulaire (photo personnelle).

Figure 49 : Epistaxis (photo personnelle).

Un chien a été considéré leishmanien, s'il présente au moins un signe clinique de la leishmaniose générale canine décrit ci-dessus. Quatre-vingt-sept chiens ont présenté au moins un signe, soit une prévalence de 72.5%. Cinquante six d'entre eux se sont montrés positifs à l'IFI et 31 autres étaient négatifs (Figure 47). La fréquence d'apparition de chaque signe chez les chiens positifs à l'IFI est représentée dans le tableau 15.

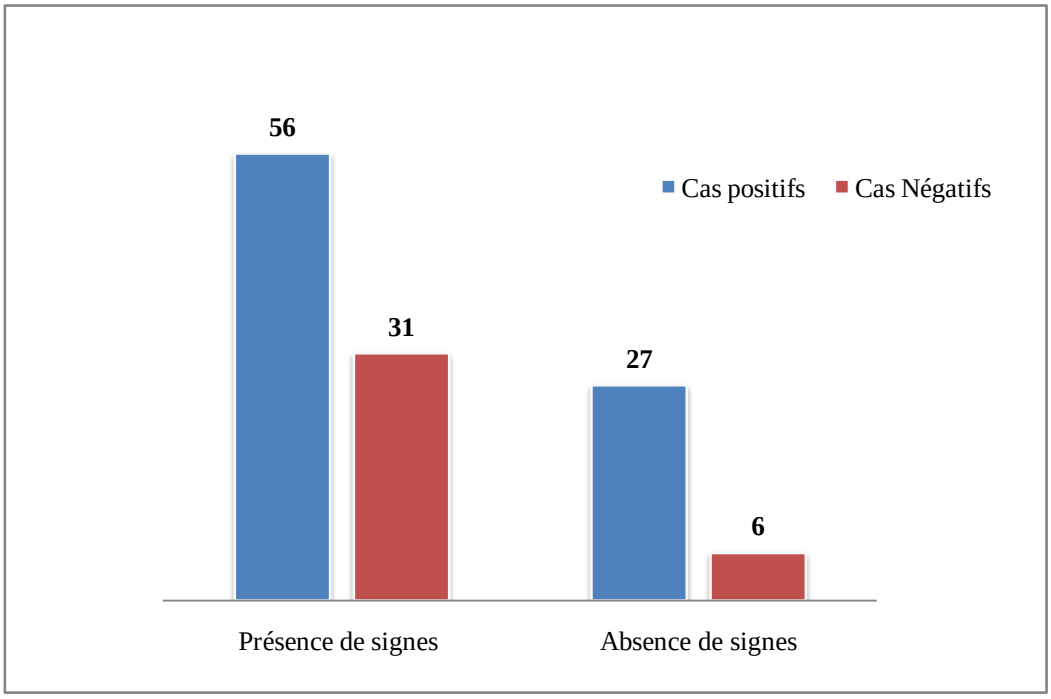


Figure 50 : Fréquence d'apparition des signes cliniques chez les chiens positifs et les chiens négatifs à l''IFI.

Tableau 15 : Fréquences des signes cliniques observés chez les chiens séropositifs

Signes cliniques	Nombre de chien exprimant le signe clinique	Fréquence %
Amaigrissement	24	28,92
Abattement (asthénie)	23	27,71
Dépilation	32	38,55
Adénomégalie	14	16,87
Ulcérations	15	18,07
Onychogryphose	24	28,92
Squamosis	16	19,28
Para/Hyperkératose	17	20,48
Atteinte rénale	3	3,61
Splénomégalie	8	9,64
Autre signes	24	28,92
Aucun signe clinique	27	32,53

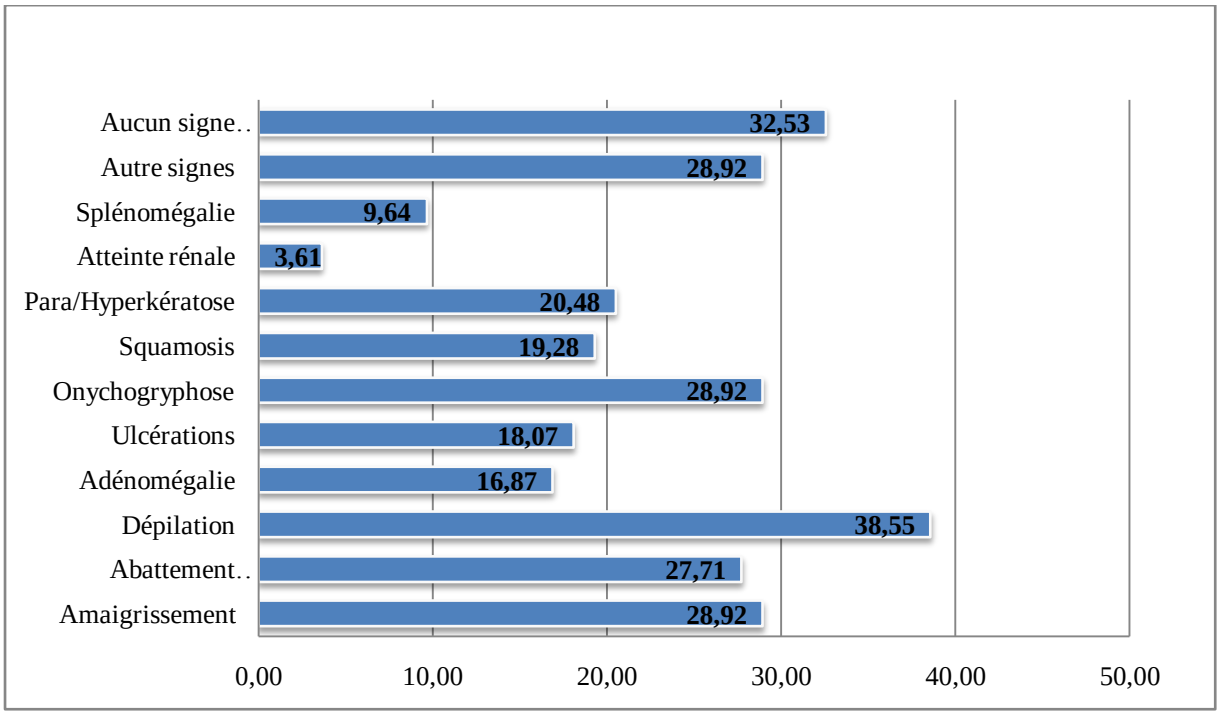


Figure 51 : Fréquence des signes cliniques chez les chiens séropositifs.

3.4. Association avec d'autres pathologies

Une partie de nos échantillons a fait l'objet d'une étude parallèle sur la dirofilariose canine : 66 de nos sérums ont été analysés par un test Elisa (kit DirOCHEK®, Zoetis, Lyon, France) permettant la détection des antigènes de *Dirofilaria immitis* adultes. C'est un test très spécifique et sensible. L'objectif de cette étude préliminaire était de déterminer si une co-infection comme par exemple à *D. immitis* influençait l'infection à *L. infantum*.

La dirofilariose cardiopulmonaire des chiens, parfois appelée "maladie du ver du cœur", est une helminthose se traduisant par la découverte dans l'artère pulmonaire et le cœur droit du nématode *Dirofilaria immitis*. Elle est transmise par les moustiques de la famille des Culicidés, et affecte principalement les Canidés. C'est une maladie à répartition mondiale, fréquente et pouvant être mortelle. Cliniquement, cette affection se caractérise par une hypertension pulmonaire compliquée d'une insuffisance cardiaque droite et de l'abattement. Des formes atypiques existent également. C'est une zoonose mineure (Catherine et *al*, 2002).

Tableau 16 : Résultats de la sérologie pour les deux pathogènes.

	DiroCHEK+ *D. immitis* (%)	DiroCHEK - *D. immitis* (%)	**Total** (%)
IFI+, *L. infantum* (%)	41(62.21)	4(6.06)	45(68.18)
IFI-, *L. infantum* (%)	17(25.75)	4(6.06)	21(31.81)
Total (%)	58(87.87)	8(12.12)	66(100)

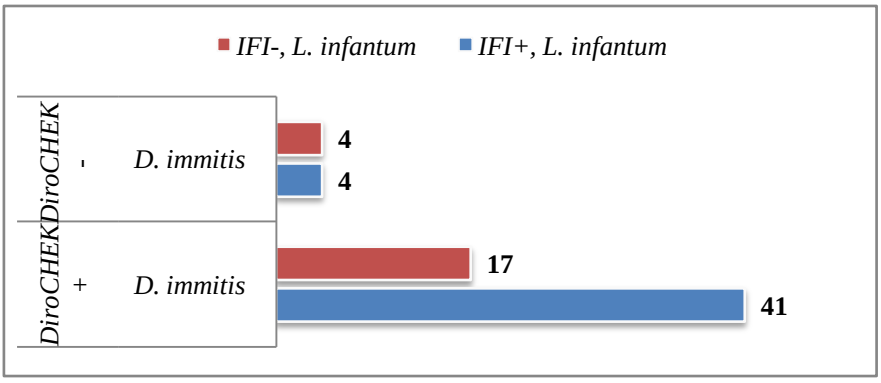


Figure 52: Résultat de la sérologie pour les deux pathogènes.

Parmi les 66 chiens analysés, 45 ont présenté des anticorps de *L. infantum* et 58 des antigènes de *D. immitis.* L'association a été observée dans 62.21% des cas (41/66) et seulement 4 chiens avaient une mono infection à *Leishmania infantum* soit 6.06 %.

3.5. Séroprévalences et valeurs prédictives

Pour estimer la prévalence apparente, la prévalence réelle, et l'intervalle de confiance les formules suivantes ont été appliquées:

- **Pa** = $\frac{\text{nombre de cas observ és}}{\text{N échantillon}}$

- **Pr** = $\frac{Pa + (Sp - 1)}{Se + (Sp - 1)}$; Se et Sp : Sensibilité et Spécificité du test sérologique utilisé (dans ce cas c'est l'IFI) ; Se= 92% et Sp= 98%.

- IC à 95% est : Pa± 2δ (δ : écart type), sachant que l'écart-type est égal à la racine carrée de la variance.

Tableau 17 : Prévalences apparentes et réelles de la séroprévalence canine de *L. infantum* dans les wilayas de Bouira et de Sétif.

	Prévalence			
Wilaya	Apparente	Réelle	Ecart type	IC 95%
Sétif	0,750	0,811	0,048	[0.655 et 0.845]
Bouira	0,575	0,617	0,078	[0.422 et 0.722]
Total	**0,692**	**0,746**	**0,042**	**[0.609 et 0.774]**

Les valeurs prédictive positive (**VPP**), et négative (**VPN**), ont été calculées selon les formules suivantes :

- VPP = $\frac{Se \text{ x } Pr}{Se \text{ x } Pr + (1-Sp)(1-Pr)}$ - VPN = $\frac{Se \text{ x} (1-Pr)}{Sp\,(1-Pr) + (1-Sp)Pr}$;

Tableau 18 : Valeurs prédictives positive et négative.

	VPP	VPN
Sétif	0,995	0,740
Bouira	0,987	0,884
Total	0,993	0,806

3.6. Performances des examens de diagnostic utilisés

De nombreux paramètres permettent de quantifier l'efficacité d'une méthode diagnostic par rapport à une autre.

Les plus utilisés sont : la spécificité, la sensibilité, la VPP, la VPN, l'exactitude relative, l'indice de Youden et le coefficient Kappa de Cohen.

Dans tous les cas, il s'agit de vérifier si la méthode alternative de diagnostic utilisée donne d'aussi bons résultats que la méthode de référence (Gold standard). Dans le cas présent, il s'agissait de comparer les performances de l'examen clinique et du test Witness® Leishmania à celles du test de référence : l'IFI. D'après. Pour ce faire, le tableau de contingence ci-dessous a été réalisé (Toma et *al*, 2010) :

Tableau 19 : Tableau de contingence.

		Test de référence		
		Positif (chien Infecté)	Négatif (chien indemne)	Total
Résultats du test du dépistage	Positif	**VP**	**FP**	**Pa : VP+FP**
	Négatif	**FN**	**VN**	**FN+VN**
	Total	**Pr : VP+FN**	**FP+VN**	**N**

VP : Vrai positif ; VN : Vrai négatif ; FP : Faux positif ; FN : Faux négatif.

Pa : prévalence apparente ; Pr : Prévalence réelle ; N : Effectif total.

De ce fait, on a :

- Se= $\frac{VP}{VP+FN}$ Et Sp= $\frac{VN}{VN+FP}$
- VPP= $\frac{VP}{VP+FP}$ Et VPN= $\frac{VN}{VN+FN}$.
- Exactitude relative : **ER**= $\frac{VP+VN}{N}$
- Indice de Youden **(J)** : Mesure la qualité du test et sa précision, Basé sur la Se et la Sp. **J**= Se + Sp-1 ; J maximal = 1, il est entre -1 et 1.

  Lorsque la Se et la Sp sont nulles, la valeur de cet indice = -1 ; Lorsque le test est parfait (Se et Sp= 1), cet indice est égal à 1.
- Le Coefficient de Kappa **(K) :** Mesure l'accord entre les deux tests en excluant le hasard, il permet de comparer deux tests dont l'un est nouveau.

*$\mathbf{K}$= $\frac{\text{Concordance réelle} - \text{concordance aléatoire}}{1 - \text{concordance aléatoire}}$

*Concordance réelle = exactitude relative

*Concordance aléatoire $= \left(\left(\frac{(VP+FN)(VP+FP)}{N2} \right) \left(\frac{(FP+VN)(FN+VN)}{N2} \right) \right)$

Tableau 20 : Interprétation de la valeur Kappa.

Kappa	Concordance
1 à 0.81	Excellente
0.8 à 0.61	Bonne
0.6 à 0.41	Moyenne
0.4 à 0.21	Faible
0.2 à 0.01	Négligeable
<0	Mauvaise

Mise en applications

Tableau 21 : Résultats de l'étude de contingence comparant les résultats de l'examen clinique à ceux de l'IFI

		Test de référence IFI		
		Positif (chien infecté)	Négatif (chien indemne)	Total
Examen clinique	Présence des signes	**56**	**31**	**87**
	Absence des signes	**27**	**6**	**33**
	Total	**83**	**37**	**120**

- Donc, On a : **Se**= 56/83 = **0.67** **Sp**= 6/37 = **0.16**

VPP= 56/87= **0.64** **VPN**= 6/33= **0.18.**

- La prévalence réelle **Pr** Selon l'examen clinique est :

Pr $= \frac{Pa - (1-Sp)}{(Se+Sp-1)} = \frac{VP+FN}{N}$ = **69.17%,** IC95% [60.9% et 77.4%].

- **ER=** (56+6)/120= **0.51**.
- **J**= 0.67 + 0.16-1 = **- 0.17.**
- Concordance réelle = **ER=**0.51.
- Concordance aléatoire= ((83x87) + (37x33))/120^2 = **0.04** ; et donc :
- **K**= (0,51-0,04)/ (1-0,04) = **0.49**

Tableau 22 : Résultats de l'étude de contingence comparant les résultats du test Witness® Leishmania à ceux de l'IFI Tableau de contingence IFI

		Test de référence IFI		
		Positif (chien infecté)	Négatif (chien indemne)	Total
Test Witness® Leishmania	Positif	**75**	**0**	**75**
	Négatif	**8**	**37**	**45**
	Total	**83**	**37**	**120**

- Donc, On a : **Se**= 75/83 = **0.9** **Sp**= 37/37 = **1**

  VPP= 75/75= **1** **VPN**= 37/45= **0.82.**

- La prévalence réelle **Pr** obtenue par le test Witness® :

Pr $= \frac{Pa - (1-Sp)}{(Se+Sp-1)} = \frac{VP+FN}{N}$ = **69.17%,** IC95% [60.9% et 77.4%].

- **ER=** 75+37/120= **0.93**.
- **J**= 0.9 + 1-1 = **0.9.**
- Concordance réelle = **ER=**0.93.
- Concordance aléatoire= ((83x75) + (45x37))/120^2 = **0.54** ; et donc :
- **K**= (0,93-0,54)/ (1-0,54) = **0.84**

Dans le tableau ci-dessous, les performances de chacun des examens utilisés dans notre étude sont représentées :

Tableau 23 : Performances des méthodes de diagnostic utilisées.

	Examen clinique	**Witness®**	**IFI**
Pa	72,50%	62,50%	69,17%
Se	67%	90%	92%
Sp	16%	100%	98%
VPP	0,64	1	0,99
VPN	0,18	0,82	0,8
ER	0,51	0,93	-
J	-0.17	0,9	0.9
K	0,49	0,84	-

La différence entre les prévalences observées par les 03 méthodes de diagnostic était non significative. L'examen clinique avait une sensibilité de 67% par rapport à 90% et 92% pour le test rapide et l'IFI, respectivement. Quant à sa spécificité, elle était très faible (16%), par contre le test rapide avait une spécificité excellente mieux que celle de l'IFI (100%).

Les VPP, VPN pour le test rapide et l'IFI étaient très proches et beaucoup mieux que celles fournies par l'examen clinique, 0.64 et que 0.18 pour la VPP et la VPN, respectivement. En fin, l'indice de Youden pour l'examen clinique était faible -0.17 et son accord avec l'IFI n'était que moyen (K=0.49) tandis que le test rapide s'est montré bon et sa concordance avec le test de référence est excellente (K=0.84).

4. Discussion

La leishmaniose canine est endémique dans de nombreux pays y compris l'Algérie. Sa séroprévalence semble varier d'une région à une autre. C'est une maladie grave vue la difficulté du traitement et du diagnostic. Un échantillon de 120 chiens a fait l'objet d'une étude séro-épidémiologique et clinique à Bouira et Sétif. Un examen clinique puis une analyse sérologique par Witness® et IFI ont été réalisés. Le but étant d'estimer la séroprévalence de la LC dans ces deux wilaya, de décrire ses caractéristiques épidémio-cliniques et de comparer la pertinence des résultats obtenus par les différentes méthodes de diagnostic utilisées.

4.1. Méthode d'échantillonnage

La population canine dans les régions étudiées n'étant pas connue avec précision, une méthode d'échantillonnage ne nécessitant pas de recensement exhaustif des individus a été adoptée. Un sondage stratifié puis à deux degrés a été retenu : le premier degré a correspondu à la commune et le second à l'animal (le chien). En effet, la stratification de la région d'étude s'est effectuée selon la wilaya en fonction de trois critères : le critère géographique, le critère météorologique et le critère historique de la région (Bouira est un foyer historique de la leishmaniose, Sétif est une région qui n'a jamais été étudiée), puis le tirage au sort des communes a été réalisé avec un taux de sondage de 10% par strate. Enfin, le recrutement des chiens (après estimation théorique de la population canine par rapport à la population humaine) a été effectué aléatoirement avec un taux de sondage global de 1.7 %, ce dernier était différent d'une commune à une autre.

Néanmoins, quelques biais qualifiés «obligatoires » doivent être signalés comme dans le cas de recrutement des chiens qui n'était pas exhaustif, et puis la taille de l'échantillon analysé qui était relativement petit (120 chiens) et qui a été limité par les moyens d'analyses sérologiques disponibles.

4.2. Examen clinique

L'infection à *L. infantum* débute par un chancre d'inoculation transitoire, qui passe souvent inaperçu. Plusieurs formes clinques peuvent être rencontrées: la forme « classique » multiviscérale ou «oligosymptomatique»; la forme atypique très variée ainsi qu'un état de portage asymptomatique (Bourdoiseau et Franc, 2008).

L'examen clinique des 120 chiens analysés a fait ressortir des lésions assez «caractéristiques » de la leishmaniose chez les sujets séropositifs. Cinquante six chiens soit 67.46% parmi les 83 chiens séropositifs, ont présentés des signes notamment de la dépilation (38.55%), de l'amaigrissement et de l'onychogryphose (29%) et de l'abattement (27.71%). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Mouloua et *al*.(2014) dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Néanmoins, les résultats de fréquence de ces symptômes sont inferieurs à ceux rapportés par Koutinas et *al.* (1999)., Baneth et *al.* (2008)., qui rapportent une dépilation dans 81 à 89 % des cas et de l'amaigrissement chez 10 à 48 % des chiens. Par ailleurs, les valeurs obtenues sont nettement supérieures à ceux obtenus par Tahir et *al.*(2014) lors d'une étude menée dans la wilaya de Béjaia où les prévalences de dépilation, amaigrissement, onychogryphose, abattement étaient 11.76%, 12.6%, 6.72%, 12.60 % respectivement.

Bien que selon certains auteurs, l'adénomégalie faisant suite à la migration des macrophages infectés vers les nœuds lymphatiques et à l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+, serait le signe le plus évocateur de la leishmaniose canine (Coulibaly et *al,* 2004; Bouratbine et *al,* 2005; Meunier, 2007), les résultats obtenus lors de la présent étude rapportent seulement un pourcentage de 16.87% des chiens séropositifs ayant présenté une adénomégalie modérée à très importante décelable à la palpation. Cette différente pourrait être imputée à une insuffisance de l'examen clinique qui n'est pas assez minutieux lors de certaines conditions de contention difficile mais également chez des chiens à des stades avancés de la maladie présentant une insuffisance rénale ou chez qui les nœuds lymphatiques périphériques sont devenus normaux voire même hypoplasiques, dans un contexte de perte de poids généralisée.

Lors de la présente étude, les signes cutanés étaient fréquemment observés; en plus de la dépilation (38.55%), 18% des chiens séropositifs présentaient des ulcères cutanés parfois recouverts de croûtes. Ces ulcères siègent particulièrement sur la face et dans les pavillons auriculaires, mais aussi au niveau du train postérieur, des coussinets plantaires, des articulations, des muqueuses buccales et pituitaires. Ces résultats sont proches de ceux de

Tahir et *al.*(2014) où la fréquence des ulcérations était 26.78%. Le squamosis et l'hyperkératose étaient aussi très fréquents (19.28 et 20.48% respectivement). Celle-ci siégeait notamment au niveau des coussinets, des articulations, de la face (autour de la truffe et des yeux), ainsi qu'au niveau de la peau qui prenait un aspect plissé et grisâtre. Ces deux symptômes n'ont été observés par Tahir et *al.*(2014) que chez 4 et 6% des cas.

Cette symptomatologie peut traduire une réponse immunitaire locale efficace du fait de l'activation des cellules de Langerhans, à la surexpression des molécules du CMH-II des kératinocytes, de l'infiltration du derme par les lymphocytes T CD8+ et dans une moindre mesure des T CD4+, la présence de LB CD21+ et une charge parasitaire relativement faible.

Signalée chez 8 chiens, la splénomégalie figurait parmi les lésions viscérales les plus fréquentes (9.64%), le résultat était presque similaire à celui obtenu par Mouloua *et al.* (2014) (8.7%). En effet, la rate représente un organe essentiel à la survie des espèces de leishmanies à tropisme viscéral du fait de l'inefficacité de la réponse immunitaire dans cet organe. Trois chiens seulement (3.61%) ont présenté des signes de l'atteinte rénale. Ces fréquences sont sans doute sous estimées du fait de la difficulté de leur mise en évidence par examen clinique.

D'autres signes cliniques associés à la leishmaniose ont été enregistrés mais avec des fréquences moins importantes par rapport à ceux cités ci-dessus. L'épistaxis, rare et intermittente caractérise la forme hémorragique atypique de la leishmaniose chez le chien. Elle est uni ou bilatérale, récidivante et rebelle à la thérapeutique antihémorragique. Dans notre étude, seul un chien a présenté une épistaxis unilatérale. Ce dernier n'a pas répondu au traitement antihémorragique et l'issue a été fatale. Les lésions ulcératives ou inflammatoires de la muqueuse nasale et les vascularites liées au dépôt d'immuns-complexes seraient la cause de ces saignements. Les signes ophtalmologiques sont rapportés dans la littérature avec des proportions différentes variant de 20 à 40% des cas (Greene et *al*, 2006). Nos résultats montrent que parmi les 83 chiens séropositifs, 4 d'entre eux (4.81%) ont présenté une atteinte oculaire de type conjonctivite, Mouloua et *al.* (2014) ont rapporté une fréquence de 13%. Le larmoiement, l'hyperthermie ont aussi été observés avec des fréquences variables et faibles.

Globalement les principaux symptômes rencontrés et mis en évidence lors de la présente étude sont les mêmes décrits par des enquêtes antérieures de même type. Par ailleurs, les différences rencontrées peuvent s'expliquer : par l'objectivité de l'examen clinique, qui

diffère d'un clinicien à un autre et leur degré d'expérience clinique. De plus, l'expression clinique de leishmaniose était différente selon la zone étudiée et en fonction des souches parasitaires circulantes dans les différentes localités (Martinetti et Jacquiet, 2013).

Trente et un chiens étaient séronégatifs bien qu'ils présentaient un tableau clinique évoquant fortement la leishmaniose. Ce résultat pourrait être attribué au phénomène de résistance à la leishmaniose canine qui est associé à une faible réponse humorale (titre bas en anticorps anti-leishmanies non décelable lors de la sérologie), ou expliquée par des affections ou des modes de vie sévères de ces animaux (manque de nourriture, maladies fréquentes).

Enfin, 27 chiens soit 32,53% des chiens séropositifs, n'ont exprimé aucun signe clinique de leishmaniose. Ce résultat vient confirmer que le portage asymptomatique est très important au sein des foyers endémiques. Il est de 58.8% selon l'étude de Ait-Oudhia et *al.* (2011) dans la région d'Alger et de 60% d'après l'étude de Mouloua (2014) dans la wilaya de Tizi-Ouzou, de 39.28% selon Tahir et *al.* (2014) à Bejaïa et de 50% selon l'étude de Berrahal et *al.* (1996) à Marseille, (France). D'après Solano-Gallego et *al*. (2009), 90% à 95% des animaux sont cliniquement sains dans les régions endémiques et peuvent être divisés en deux catégories : Ceux qui ne sont pas infectés, soit environ un tiers d'entre eux et ceux qui sont infectés, soit deux tiers d'entre eux. De ce fait, plusieurs questions se posent : ces chiens peuvent-ils devenir malades ou bien vont-ils rester définitivement asymptomatiques? Et si oui, sous l'influence de quels facteurs ? Constituent-ils un réservoir de parasites ?

Il est admis qu'une infection peut ne pas rester sub-clinique de manière permanente et que de nombreux facteurs tels qu'une immunosuppression, des maladies concomitantes… peuvent rompre l'équilibre précaire entre hôte et parasite et conduire au développement de signes cliniques et la déclaration de la maladie. Les causes permettant à un chien de rester cliniquement sain bien qu'infecté ne sont pas établies de manière précise à ce jour.

Toutefois, on a montré que des chiens asymptomatiques naturellement infestés pouvaient facilement infester des phlébotomes dans des conditions expérimentales (xénodiagnostic). Il ne faut donc pas sous-estimer le rôle éventuel de ces animaux dans le cycle de transmission, étant donné que plus de 50 % des chiens parasités sont des porteurs asymptomatiques (OMS, 2010). D'après Molina et *al.* (1994); Soares et *al.* (2011), un certain pourcentage de ces chiens porteurs asymptomatiques est infestant pour le phlébotome et même si les taux d'infectivité du phlébotome sont faibles, ils représentent un réel enjeu pour la dissémination de la leishmaniose. En effet, ces chiens sont nombreux, ne sont pas identifiés car pas malades, et

sont infestants pour le phlébotome. Ils constituent donc un vrai réservoir de la leishmaniose (Alvar et *al*, 2004; Molina et *al*, 1994). Il existerait une certaine transmission intercanine directe, sans l'intervention du phlébotome, reste à savoir quelle en est l'importance (OMS, 2010).

Le portage asymptomatique de *Leishmania infantum* chez le chien (et chez l'homme) constitue donc une réalité à ne pas négliger du fait des risques de santé publique que cela occasionne (Otranto et Dantas-Torres, 2013). Il est donc nécessaire d'avoir une action synergique entre les médecins, les vétérinaires, les services de santé publique et les responsables politiques concernant les individus porteurs asymptomatiques.

4.3. Sérologie

4.3.1. Séroprévalence globale

Depuis la notification du premier cas de la leishmaniose canine en Algérie par les frères Sergent (1910), plusieurs études sérologiques ont été menées dans le but d'apprécier la fréquence et l'évolution de la maladie dans le temps. Les résultats se sont avérés différents selon la période et l'échantillon des chiens analysés.

En 1970, une étude menée dans la Grande Kabylie a montré que 11.4% des animaux étaient séropositifs (Dedet et *al*, 1977). En 1985, Belazzoug rapporte une prévalence de 37.5% de positifs et Harrat, en 2006, présente une prévalence 42.8% lors de ses études menées dans des régions différentes de Kabylie (Harrat, 2006). Des prévalences de 9.7% et de 40 % ont été respectivement décrites à Bejaïa (Tahir et *al*, 2014) et à Alger (Djoudi et *al*, 2010). En 2015, les prévalences : 41%, 43%, 54%,45%, 62% et 44% ont été rapportées dans les wilayas de : Tlemcen, Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, Béjaia et Jijel, respectivement (Adel et *al*, 2015). Au Maroc, en 2014, une prévalence de 9.83% avec le test rapide et 24.59% par l'IFI a été observée (Hajiba et *al*, 2014). Récemment dans les îles Éoliennes en Italie, une prévalence de 41.8% a été enregistrée (Domenico Otranto et *al*, 2017). Ces résultats sont nettement inferieurs aux prévalences obtenues lors de la présente étude qui sont de l'ordre de 69.17% par IFI et 62.5% par le test rapide. Ils indiquent que *Leishmania infantum* est largement distribuée dans la région étudiée. Des résultats presque similaires (62%) ont été enregistrés à Malte (Headington et *al*, 2002), d'autres beaucoup plus supérieurs (73%), ont été décrits au Brésil (Silva et *al*, 2007). En Espagne, 98/118 chiens, tous suspectés cliniquement pour la

leishmaniose, avaient des anticorps anti-*leishmania* soit une prévalence de 83% (Tabar et *al*, 2013).

En effet, 1023 souches de *L. infantum*, isolées de chiens vivant dans le bassin méditerranéen, ont été caractérisées par le MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis). Un total de 12 zymodèmes a été identifié. En Algérie, des études rapportent l'isolement et l'identification de 97 souches de *L.infantum* chez le chien, appartiennent toutes aux 06 differents zymodèmes : MON-1, MON-24, MON-34, MON-77, MON-80 et MON-281. *L. infantum* MON-1 est le zymodème le plus fréquent et largement distribué (86% des souches identifiées en Algérie (Ait-Oudhia et *al*, 2011). La distribution géographique de ce dernier en Algérie couvre, non seulement, les zones humides et subhumides au nord du pays (Harrat et *al*, 1996), mais aussi les régions arides et semi-arides dans le sud (Belazzoug, 1986). Ce zymodème est aussi le plus commun de la LC dans tous les autres pays du pourtour méditerranéen. Il varie entre 98.4% à Chypre (Pratlong et *al*, 2004 ; Mazeris et *al*, 2010), 87.5 en Italie (Gramiccia et *al*, 1992) et 75-94.33% en Espagne (Fisa et *al*, 1999; Chicharro et *al*, 2002). De ce fait, *L. infantum* MON-1 serait vraisemblablement impliqué dans les cas observés dans notre étude vu la similarité du climat de notre région avec ceux des régions où ce zymodème a été identifié.

4.3.2. Séroprévalence en fonction des titres en anticorps

D'après les résultats obtenus, 7.5% des sérums se sont restés positifs jusqu' à la dilution 1/800 et 24.17% jusqu'à celle de 1/400. Ces taux d'anticorps élevés indiquent que ces chiens présentent une dissémination du parasite dans leur organisme et que l'infection est bien installée et par conséquent que la chance d'isoler le parasite en cause par culture serait élevée.

Pour les autres chiens ayant présenté des IFI à des dilutions de 1/100 ou à 1/200, il s'agit de chiens qui étaient soit dans la phase initiale ou finale de la maladie, ou bien carrément des chiens résistants développant une réponse immunitaire de type cellulaire et une réponse humorale faible. Les chiens résistants sont généralement asymptomatiques, la réponse cellulaire protège contre le développement de la maladie (Saridomichelakis, 2009).

Dans notre étude, 17 chiens parmi les chiens qui avaient une IFI positive à la dilution de 1/100 ou 1/200, étaient asymptomatiques. Nous pensons que la réponse humorale était faible chez ces chiens.

Mais, parmi les 9 chiens ayant présenté une IFI positive jusqu'à 1/800, 3 chiens étaient asymptomatiques. L'infection qui était probablement à un stade précoce avait induit une réponse immunitaire avant l'expression des signes cliniques.

Enfin, 8 chiens qui ont montré des titres sérologiques bas, (IFI positives qu'aux dilutions 1/25 et 1/50) ont été classés comme négatifs (le seuil de positivité est 1/100). L'examen clinique a révélé, pour 7 d'entre eux, au moins un symptôme de la leishmaniose canine. Ces animaux sont soit, indemnes de *Leishmania infantum* (vrais négatifs) et les symptômes observés sont reliés à d'autres infections. Soit, ils sont infectés donc ce sont des faux négatifs. Chez cette catégorie de chiens, la présence ou l'absence du parasite devra être confirmée à l'aide de méthodes directes c'est-à-dire un résultat positif ou négatif à l'analyse microscopique, à la culture ou à la PCR.

Au cours de la présente étude, la recherche des anticorps spécifiques de *Leishmania infantum* a été réalisée par le test rapide d'immunomigration : Witness® Leishmania et les résultats obtenus confirmés par la technique de l'immunofluorescence indirecte (IFI).

Actuellement, l'IFI est considérée comme la méthode de référence « gold standard » pour le dépistage de la leishmaniose canine. Cette technique présente l'avantage d'être quantitative, cependant, elle n'est réalisée que dans des laboratoires spécialisés et son coût reste élevé. Par ailleurs, les variations du titre en anticorps sériques représentent une bonne indication pour le clinicien qui peut ainsi suspecter le passage d'un état asymptomatique à un début de maladie. Par contre, lors d'une sérologie ponctuelle (cas des enquêtes de prévalence), le titre obtenu n'est pas toujours en relation avec l'état clinique du chien (Rodriguez-Cortes, 2010). Ainsi, un chien sain peut avoir une IFI positive à 1/2560, alors qu'un chien malade sera positif au 1/160 (Maia, 2010). Dans notre étude, 3 chiens cliniquement sains avaient une IFI positive à 1/800 alors que 23 de chiens exprimant des signes cliniques de leishmaniose n'étaient pas positif pour l'IFI même à 1/25. Un autre facteur plus limitant de cette technique reste la subjectivité de la lecture. Chaque lecteur peut interpréter personnellement la fluorescence et les résultats peuvent être discordants. Ainsi, les cas douteux devront être soumis à une lecture en double voire en triple aveugle et les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de

prudence et de rigueur. Cela devrait amener à réviser le statut de l'IFI comme technique de référence pour le diagnostic de la leishmaniose.

Le second test sérologique est un test rapide (kit commerciale) basé sur l'immunochromatographie ou l'ELISA. Le test qualitatif que nous avons pu utiliser (Wittness® Leishmania – Zoetis) possède une très grande spécificité (100%) et une moins bonne sensibilité (38%-75%) (Rodríguez-Cortés, 2013).

4.3.3. Prévalences et valeurs prédictives

La valeur prédictive positive (VPP) obtenue était de 0,993 (elle varie de 0,995 à Sétif, à 0,987 dans la Wilaya de Bouira). Lorsque des tests de sensibilité et de spécificités voisines sont utilisés, le poids respectif de vrais positifs et de faux positifs dépend uniquement de la fréquence de la maladie dans la population étudiée. Il en découle que si la maladie est très fréquente, les faux positifs sont largement minoritaires par rapport aux vrais positifs. Au contraire, si la maladie est très rare, le nombre de vrais positif devient très faible (Toma et *al*; 2001). Par conséquent dans la présente étude, la probabilité de classer les animaux comme positifs, alors qu'ils ne le sont pas (faux positifs) est très minime (0,007). Cette proportion pourrait être expliquée par le fait qu'il y ait des réactions croisées avec *Sarcocystis cruzi* l'agent causal de la sarcosporidiose ou avec d'autres agents pour lesquels, le chien est l'hôte définitif (Adel et *al*, 2010).

Quant à la valeur prédictive négative (VPN), elle est de l'ordre de 0,806 dans la région d'étude. Cela sous entend que la probabilité de classer les animaux comme indemnes alors qu'ils sont infectés peut aller jusqu'à 0,194, il s'agit de faux négatifs. Cette erreur prédictive négative pourrait être en rapport avec une altération de la réponse immunitaire qui s'observe à un stade avancé de la maladie (Bouratbine et *al*, 2005). Trente et un (31) chiens de la population d'étude avaient une symptomatologie relative à la leishmaniose avec un état général plus au moins altéré, mais ont été rapportés séronégatifs. Pour ces chiens, l'examen direct (coloration par May Grunwald-Giemsa) permettra de confirmer l'infection. D'autres auteurs ont rapporté que la résistance à la leishmaniose canine est associée à une faible réponse humorale (titre bas en anticorps anti-leishmanies) (Barbieri, 2006 ; Cardoso et *al*, 2007). Ce qui explique que des chiens infectés mais résistants peuvent échapper au dépistage sérologique en donnant des réponses négatives d'où l'augmentation de l'erreur prédictive

négative. Si on diminue le seuil positivité (dilution à 1/50, 1/25), ces chiens seront dépistable. Ainsi, 91 chiens étaient positifs à la dilution 1/25 par rapport à la dilution 1/100 ou seuls 83 chiens étaient positifs.

4.3.4. Performances des méthodes de diagnostic utilisées

Le présent travail a eu également pour objectif de déterminer l'efficacité de l'examen clinique et du test rapide de diagnostic comparée à celle de l'IFI.

L'examen clinique a montré une mauvaise spécificité (16%) et une sensibilité moyenne (67%). Un animal a été considéré comme positif s'il présentait au moins un signe clinique associé à la leishmaniose. La prévalence observée est de 72.5% (87/120). Les différences observées par rapport au test de référence IFI (Pa=69.17%) n'étaient pas significatives (p=0.52). La VPP estimée est de 0.64, de ce fait, la probabilité de classer les animaux comme positifs en se basant sur l'examen clinique alors qu'ils ne l'étaient pas était de 0.36 et 31 chiens parmi les chiens symptomatiques avaient une sérologie négative. La VPN a été estimée à 0.18 et 27/33 chiens sont classés comme indemnes alors qu'ils pouvaient être infectés (faux négatifs). Autrement dit 82% (27/33) des chiens asymptomatiques pouvaient avoir une sérologie positive. Cela confirme le portage asymptomatique de *L. infantum*. Les facteurs influençant sont encore mal connus.

L'adéquation entre les réponses positives et négatives fournies par l'examen clinique et l'analyse sérologique étaient moyenne (Coefficient de Kappa est de 0.49). La valeur calculée de l'indice de Youden (J=-0.17) montre que l'efficacité de l'examen clinique est faible pour établir un diagnostic de la leishmaniose canine. Cela est surement du au caractère général de la maladie vu que les manifestations cliniques sont générales et intéressent tout l'organisme, ce qui prête à confusion avec un grand nombre de pathologies comme la gale, la teigne et surtout les dermatoses auto-immunes.

Dans la présente étude, le test Witness® Leishmania, a montré une très bonne spécificité (100%) et une sensibilité de 90%. Ce qui rejoint en partie les résultats de Rodríguez-Cortés et *al.* (2013), qui rapportent une très bonne spécificité (100%) et une moins bonne sensibilité de 58% du test Witness® Leishmania. Tandis que, Hajiba et *al.* (2014) *;* au Maroc, ont montré une bonne spécificité de 97.87% et une très faible sensibilité de 33.33 % pour ce test rapide.

La valeur de la prévalence réelle était de 69.17% en utilisant ce test. Les différences observées par rapport à l'IFI n'étaient pas significatives (*p=0.24*). La VPP estimée est de 1 donc, la probabilité de classer les animaux comme positifs alors qu'ils ne l'étaient pas était nulle. Autrement dit, tous les animaux ayant une réponse positive au test Witness® étaient infectés. Il y avait une chance de 0.18 de classer les animaux comme indemnes alors qu'ils étaient infectés (faux négatifs). Cela est aussi du aux altérations de la réponse immune observées à un stade avancé de la maladie. Des tests plus sensibles doivent être mis en œuvre pour diagnostiquer ces faux négatifs. Dans notre étude, 8 chiens ont été montrés négatifs par le Witness® alors qu'ils se sont avérés positifs par l'IFI, 3 parmi eux étaient positifs jusqu'à la dilution de 1/200.

Le coefficient de Kappa calculé, pour évaluer le degré d'accord entre les réponses positives et négatives fournies par les deux tests sérologiques, indique un excellent accord entre ces derniers (K=0.84). L'indice de Youden trouvé (J=0.9) montre que le test rapide est un outil de diagnostic précis et efficace.

Enfin, vu sa sensibilité et sa spécificité satisfaisante et dans la mesure où les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative en termes de performance par rapport à l'IFI, le test Witness® utilisé dans le présent travail constitue un bon outil de diagnostic, facile à mettre en œuvre, au cabinet vétérinaire ou même chez le propriétaire de chien. Néanmoins, l'IFI reste la technique du choix, de part de sa très bonne sensibilité très bonne et son caractère quantitatif.

4.4. Séroprévalence selon l'âge, le sexe, la race et l'activité du chien

La population canine étudiée a été subdivisées en différentes tranches d'âges : Les chiots de plus de 6 mois à un an, les jeunes chiens de plus de 1 an jusqu'à 4 ans, les adultes de plus de 4 à 8 ans puis les chien âgés plus de 8 ans. Plusieurs études ont rapportés que l'infection par *Leishmania infantum* est beaucoup moins fréquente chez les jeunes chiens que chez les adultes (Rami et *al*. 2003, Mirõ et *al*. 2007 ; Martín-Sánchez et *al*. 2009 ; Tahir et *al*. 2014**).** De plus, les animaux plus âgés présenteraient un risque de séropositivité deux fois plus élevé que les jeunes chiens (Médaille et *al*, 2005). Il a été constaté dans la présente étude, une prévalence de 50% pour les chiots, 67.86% pour les adultes, les jeunes chiens et les vieux de plus de 8 ans ont présenté les prévalences: 69.86 et 73.33 % respectivement. Néanmoins,

l'analyse statistique montre que les différences observées entre les prévalences était non significatives avec un taux d'erreur de 5% et que la sensibilité à la maladie est la même quelque soit l'âge de l'animal. La petite taille des échantillons (4 chiots et que 15 vieux chiens) pourrait expliquer cette discordance avec d'autres études.

Concernant l'influence du sexe des chiens aucune différence significative dans la prévalence n'a été observée entre mâles et femelles. Plusieurs études (Bourdoiseau, 2000; Bouratbine et *al*, 2005; Cortes et *al*, 2012; Tahir et *al*, 2014), ont montré que le risque d'être infecté est identique quelle que soit le sexe. Cependant, une étude, en France, a rapporté une nette prédominance des mâles touchés par la leishmaniose (67%) (Denerolle, 2003).

En ce qui concerne la prédisposition raciale, la plupart des auteurs rejettent l'implication de la race dans la prédisposition à développer la maladie. L'analyse statistique par le test de Fisher a montré que le risque d'être infecté est identique quelle que soit la race de l'animal et aucune différence significative n'a été mise en évidence (p = 0,73). Néanmoins, des études menées en Espagne ont montré que certaines races autochtones étaient probablement plus résistantes à l'infection (Bouratbine et *al*, 2005). Denerolle a aussi montré une incidence chez le Boxer plus importante par rapport à la population de référence (Denerolle, 2003).

Quant au lien entre la séropositivité et l'activité du chien, les résultats obtenus montrent qu'il n y avait pas de relation, statistiquement significative, entre ces deux variables (p = 0,17). En effet, les 6 chiens errants et les 2 chiens de compagnie analysés étaient tous positifs. Les séroprévalences positives étaient de 73% chez les chiens Berger et les chiens de chasse tandis ce chez les chiens de garde 59.62%. Ces différences de séropositivités ne sont pas significatives (sans doute en raison de la petite taille des échantillons étudiés) bien que la plupart des études mettent en évidence des différences de la prévalence selon l'activité de chien. Milhau (1987) indique dans son étude que les chiens de chasse étaient les plus exposés, contrairement à Keck et *al.* (2003) qui estiment que les chiens de garde sont plus touchés par la leishmaniose. Adel et *al.* (2010) relèvent une fréquence d'infection plus élevée chez les chiens errants par rapport aux autres. Enfin, toutes les études rapportent que les chiens de compagnies sont les moins touchés par la maladie.

4.5. Séroprévalence selon l'origine géographique

Dans la présente étude, il a été supposé l'existence d'une hétérogénéité dans la distribution spatiale de la leishmaniose canine. Les prévalences de 75% et de 57.5%, ont été rapportées pour les wilayas de Sétif et de Bouira. L'analyse statistique par le test Z (comparaison de deux proportions / Test bilatéral) a montré une différence significative entre les deux strates (p **= 0,039**) traduisant une distribution plus ou moins hétérogène de la leishmaniose entre les deux wilayas d'étude. Par ailleurs, les valeurs de la prévalence communale étaient plus élevées dans les communes de Sétif par rapport a celles de Bouira variant de 42.86% à Borj Okhris (Bouira) jusqu'à 87.5% à Ain Abassa (Sétif). Néanmoins ces différences restent non significatives statistiquement.

Une question particulièrement préoccupante concerne la façon dont le climat et les changements climatiques affecteront la propagation des maladies transmises par les insectes comme la leishmaniose, la dengue, le paludisme, la maladie de Lyme, le virus du Nil occidental, la fièvre de la vallée du Rift, le chikungunya et la fièvre jaune. Toutes se propagent par la piqûre de vecteurs tels que les moustiques, les phlébotomes, les tiques et les mouches (Priya Shetty, 2009).

Les paramètres dits abiotiques (notamment la température et l'humidité) sont connus comme étant déterminants pour la dynamique des maladies infectieuses dont un stade de développement se réalise en dehors de l'hôte définitif. De nombreux parasites, virus ou bactéries ne se multiplient plus en dessous d'un certain seuil de température et, au-dessus de ce seuil, la cinétique est étroitement corrélée avec ce facteur (Reiter, P, 2001).

En conséquence, pour un pathogène transmis par un arthropode vecteur, lorsque la durée de développement dépasse la durée de vie du vecteur, la transmission biologique ne peut être assurée. Les facteurs abiotiques affectent les dynamiques de populations des insectes vecteurs et donc leur abondance. Un accroissement de la température ambiante augmente la prolificité, le taux de survie journalier, le nombre de générations annuelles et réduit les durées larvaires et nymphales. Il augmente également l'activité et la fréquence des repas sanguins, facilitant alors la transmission des maladies vectorielles (Rogers, 1988). Il faut noter que les seuils de températures létaux varient selon l'humidité, en relation avec les capacités de thermorégulation et les réserves lipidiques de l'insecte (Nash Tam, 1937).

Enfin, il a été montré que l'augmentation de la température accélérait la multiplication de certains pathogènes à l'intérieur des arthropodes vecteurs et pouvait même augmenter la capacité vectorielle d'espèces jusqu'alors décrites comme inoffensives (Wittmann et *al*, 2002).

La compétence vectorielle, c'est-à-dire la capacité du vecteur à acquérir, multiplier et transmettre le pathogène, peut également être favorisée par des températures plus élevées (Wittmann et *al*, 2001).

Pour ce qui est des leishmanioses, les vecteurs sont directement dépendants des variations climatiques, les réservoirs de certaines d'entre elles en sont à l'abri. C'est le cas du chien avec *L. infantum* : domestiqué par l'Homme, le chien s'est installé avec lui sous tous les climats et de l'Homme avec *L. tropica* et *L. donovani*. Aujourd'hui, il n'intervient donc plus dans les processus de focalisation : pour ces formes de leishmanioses dites à « précellence vectorielle », la focalisation de la maladie dépend du vecteur, élément très sensible aux variations pluvio-thermiques (Rioux et De la roque, S., 2003).

En effet, les deux wilayas d'étude ont un climat de type Csa selon la classification de Köppen. C' est un climat tempéré chaud avec été sec (méditerranéen) qui se caractérise par : une température moyenne du mois le plus froid comprise entre 0 °C et 18 °C, température moyenne du mois le plus chaud > 22 °C, les saisons été et hiver sont bien définies (André, 2001). On pense que ce climat est favorable à la diffusion de la LC plus particulièrement dans la wilaya de Sétif et il influence les prévalences observées dans les deux wilayas. Une étude climatique devrait permettre de démontrer l'influence du climat sur la prévalence de la LC et d'en préciser les principaux facteurs.

4.6. Association avec d'autres pathologies

L'association de *L. infantum* avec d'autres agents pathogènes est très connue, souvent en raison du caractère immunosuppresseur de la maladie. Soixante six sérums ont été simultanément analysés pour la leishmaniose et la dirofilariose canine. La prévalence de la leishmaniose était de 68.18%, celui de la dirofilaiose était 87.87%. L'association des deux pathogènes a été décrite dans 62.12% des cas et seuls 6.06 % (4/66) des cas étaient uniquement positifs pour *L. infantum.* L'analyse statistique par le test Z a montré une différence significative ($p<0.0001$) entre les proportions de co-infection par *L. infantum et*

D. immitis et celle de la mono-infection leishmanienne seule. Les coinfections par ces deux agents pathogènes à transmission vectorielle sont relativement fréquentes chez les chiens vivant dans les zones géographiques où les vecteurs compétents sont présents. En effet, une étude menée en Espagne sur 118 chiens a montré que 98 chiens étaient infectés par Leishmania, 49 infectés par les filaires et 29 coinfectés par les deux (Taba et *al*, 2013**)**. La fréquence élevée de ces coinfections est souvent à l'origine de tableaux cliniques inhabituels ou atypiques qui compliquent davantage le diagnostic, le traitement et le pronostic.

Néanmoins, une étude menée en 2011-2014 par Maia et *al*. (2015) au Portugal, n'a pas montré de coinfections à *L.infantum* et *D. immitis.*

5. Conclusion

La leishmaniose canine est une maladie grave, souvent mortelle pour le chien, caractérisée par un tableau clinique protéiforme intéressant en particulier la peau, les muqueuses et le système lymphatique. L'étude séro-épidémiologique et clinique menée sur un échantillon de 120 chiens dans les wilayas de Sétif et de Bouira en utilisant deux techniques sérologiques du diagnostic, l'IFI et l'immunomigration rapide, a rapporté une sensibilité à la leishmaniose identique quelque soit l'âge de l'animal. La race et le sexe n'interférent pas dans le développement de l'infection, l'activité du chien non plus. L'origine géographique et la présence d'autres pathologies se sont avérées des facteurs de prédisposition à l'infection par *L.infantum.*

Une concordance moyenne a été observée entre l'examen clinique et l'IFI (K=0.49). Le portage asymptomatique a été retrouvé dans 32.5% des cas. Une investigation plus approfondie de cette catégorie de sujets positifs devrait être menée afin de mieux comprendre son rôle dans l'épidémiologie des leishmanioses.

L'IFI a permis d'identifier 83 chiens positifs soit une prévalence de 69.17% IC 95% [60.9% et 77.4%], avec différents niveaux; 60 cas dans la wilaya de Sétif, c'est-à-dire une séroprévalence de 75% IC95% [65.5% et 84.5%] et 23 cas à Bouira, soit une séroprévalence de 57.5% IC95% [42.2% et 72.8%].

L'analyse des prélèvements sanguins par le test Witness® Leishmania, a rapporté une prévalence totale de 62.5% IC95% [53.8% et 71.2%] avec des prévalences 70% IC95% [60% et 80%] et 47.5% IC95% [32% et 63%] à Sétif et Bouira, respectivement.

A la lumière de cette étude, il ressort que *Leishmania infantum* est largement distribuée dans la région d'étude, avec une répartition spatiale hétérogène, la wilaya de Sétif étant la plus touchée. La performance de l'examen clinique reste faible pour l'établissement du diagnostic de la leishmaniose. Les résultats obtenus montrent que le test rapide Witness® Leishmania aurait une sensibilité et une spécificité satisfaisante et pourrait être considéré comme un bon outil de diagnostic et dépistage de la leishmaniose canine sur terrain.

CHAPITRE 2 : ETUDE DU VECTEUR (PHLEBOTOMES)

1. Introduction

Le réservoir et le vecteur sont les deux éléments essentiels dont dépend la pérennité d'une zoonose transmissible à l'intérieur d'un foyer endémique. Il est évident qu'on ne peut comprendre correctement le fonctionnement d'un foyer sans une analyse approfondie de tous les maillons du cycle épidémiologique. Dans les leishmanioses, la clé voûte du cycle parasitaire est le phlébotome, il en constitue l'élément focal.

Le but de ce travail est de contribuer à analyser la composition du peuplement phlébotomien à partir de quelques biotopes (sites de piégeages des phlébotomes) naturels choisis dans la wilaya de Sétif.

2. Matériel & Méthodes

2.1. Station de capture des phlébotomes

Nous entendons par station, la partie du milieu prospecté dans laquelle sont situés les sites de piégeages qui sont les biotopes piégés ou les points précis de captures des phlébotomes. Trois nuits de capture à Sétif dans la station de Bougaa, région où la prévalence de la leishmaniose était plus élevée dans notre étude (77.78%), ont été réalisées.

2.2. Capture des phlébotomes par pièges lumineux

Cette méthode est adaptée à la capture des espèces photophiles. A l'inverse d'autres insectes, les phlébotomes sont rarement attirés par la lumière vive et semblent même la fuir à partir d'une certaine intensité. En revanche, certaines espèces sont attirées par les lumières de faible intensité, ce qui est en accord avec leur activité crépusculaire et nocturne, ainsi que par les lumières UV. Ce qui a justifié l'utilisation des pièges lumineux CDC et des pièges UV.

Le piège lumineux de type CDC (miniature light trap1) comporte (**figure** 50) :

- Un moteur assurant le fonctionnement d'un petit ventilateur destiné à entretenir une aspiration continue de faible intensité. Au dessus du ventilateur se trouve une petite ampoule de 0,3 ampère. Le tout est alimenté par quatre

piles rondes de 1,5 volt (ou bien une de 6 volt) qui sont suffisantes pour assurer un fonctionnement efficace pendant la totalité de la nuit et prévenir ainsi la fuite des phlébotomes capturés en maintenant la ventilation.

L'ensemble moteur ventilateur lampe se trouve à l'intérieur d'un cylindre transparent en matière plastique dont la partie supérieure est couverte d'un grillage métallique évitant la pénétration des insectes de grande taille et dont la partie inférieure est creusée d'une gorge destinée à l'ajustement de la cage de recueil.

Une cage recouverte d'un tissu à mailles très serrées dont la partie supérieure vient s'adapter à l'aide d'un élastique à la partie inférieure du cylindre.
Un couvercle métallique très aplati qui couvre le tout et protège l'appareil de la pluie et des projections.

Les pièges UV utilisent des lampes à UV.

Durant notre travail, six pièges ont été mis utilisés. Les pièges sont déposés avant le coucher du soleil et restent fonctionnels toute la nuit jusqu'au lendemain matin, la cage est détachée et soigneusement fermée alors que le moteur fonctionne toujours. En prenant soin d'éviter la fuite des insectes piégés, la partie supérieure est refermée et mise au réfrigérateur pendant une vingtaine de minutes afin d'immobiliser les phlébotomes. Immédiatement après la sortie du réfrigérateur, la cage est ouverte et les phlébotomes sont prélevés à l'aide d'une pince entomologique.

Figure 53 : Installation d'un piège CDC (photo personnelle)**.**

2.3. Conservation des phlébotomes

Une fois capturés, les phlébotomes recueillis sont conservés dans des eppendorfs et congelés à -20°C jusqu'à leur identification.

2.4. Manipulation, montage et identification des phlébotomes

Le protocole suivant a été suivi pour l'identification des phlébotomes :

- Les phlébotomes sont mis à éclaircir dans une boite de pétri contenant de la solution de potasse à 10% pendant deux heures.

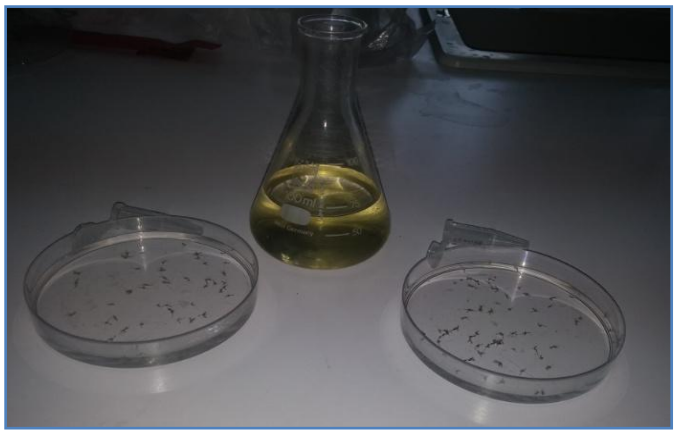


Figure 54 : Eclaircissement des phlébotomes dans la solution de potasse 10% (Photo Personnelle).

- Les phlébotomes sont rincés à l'eau distillée pour quelques minutes.
- Ils sont ensuite incubés dans une solution de Marc André pendant une heure.

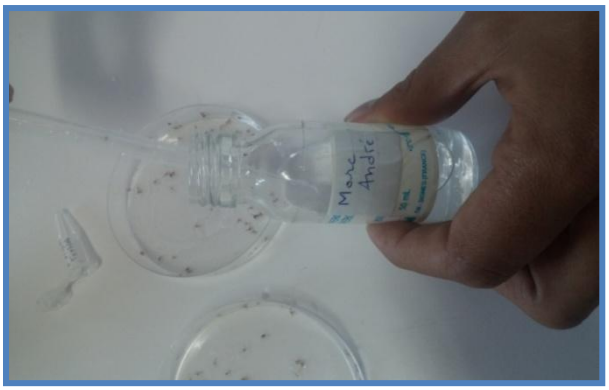


Figure 55 : Incubation des phlébotomes dans la solution de Marc André (Photo Personnelle).

• Les phlébotomes sont montés soigneusement dans une goutte de gomme au chloral, entre lame et lamelle, la tête en position dorsoventrale.

Figure 56: Dépôt des phlébotomes sur la lame et ajout de solution de gomme au chloral (Photo Personnelle).

Figure 57: Identification des phlébotomes sous microscope optique (Photo Personnelle).

3. Résultats

3.1. Inventaire systématique des phlébotomes recensés dans la région de Bougaa

Les pièges CDC et UV ont été déposés à l'intérieur des habitations humaines et dans les abris d'animaux domestiques (chiens, ovins, caprins, lapins et poules). Durant les 03 nuits de capture, 2004 phlébotomes ont été capturés dans les différents sites de piégeage (Tableau24). La densité moyenne des phlébotomes était relativement élevée soit 111,33 phlébotomes/nuit/piège. Quatre espèces ont été recensées, comme présenté dans le tableau 25.

Tableau 24 : Inventaire des phlébotomes capturés.

Genre	Sous genre	Espèce	Male (n)	Femelle (n)	Total	Male (%)	Femelle (%)	Total (%)
Phlebotomus	***Larroussius***	*P. perniciosus*	1233	578	1811	61,53	28,84	90,37
		P. perfiliewi	58	77	135	2,89	3,84	6,74
		P. longicuspis	19	20	39	0,95	1,00	1,95
		P. ariasi	19	0	19	0,95	0,00	0,95
		Total	1329	675	2004	66,32	33,68	100

Tableau 25: Liste systématique des phlébotomes (*Psychodidae*) recensés dans la région de Bougaa.

Genre	Sous genre	Espèces
Phlebotomus	*Larroussius* Nitzulescu, 1931	*P. perniciosus* Newstead 1911
		P. ariasi Tonnoir, 1921
		P. Perfiliewi Parrot, 1930
		P. longicuspis, Newzulescu 1930

Les quatre espèces identifiées appartiennent au sous genre *Larroussius*, genre *Phlebotomus*, aucun phlébotome du genre *Sergentomyia* n'a été dentifié.

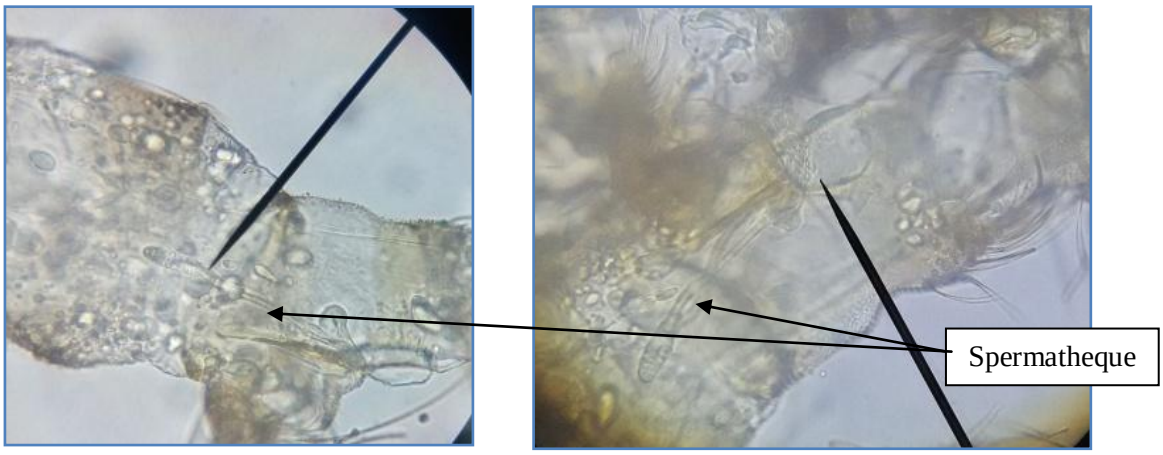


Figure 58: Spermathèque; *P. perniciosus,* femelle 10X40.

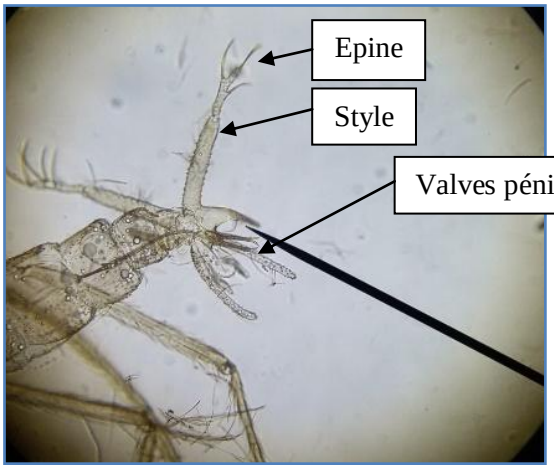


Figure 59 : Génitalia male; *P.perniciosus* 10X10.

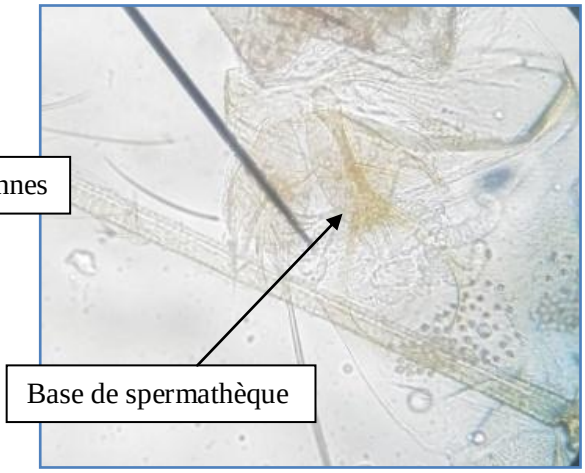
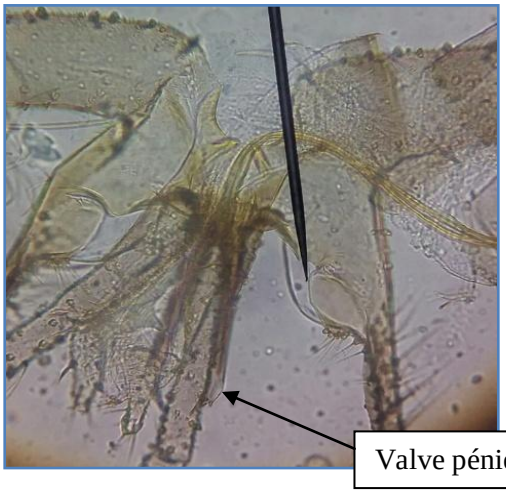
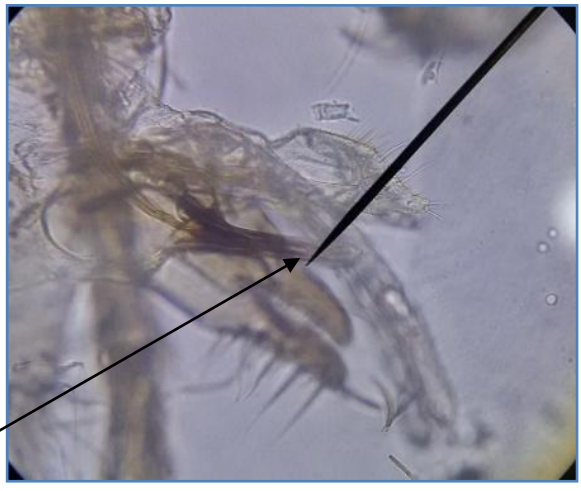


Figure 60 : Spermathèques; *P. longicuspis*. femelle 10X40.



Figures 61: Valves péniennes *P. perfliewi ;* mâle 10X40.



Figures 62 : Valves péniennes *P. ariasi ;* mâle 10X40.

3.2. Abondances relatives de chaque espèce

La proportion de chacune des espèces capturées est rapportée dans le tableau suivant :

Tableau 26: proportion de chaque espèce de phlébotomes capturés dans la région de Bougaa.

Espèce	Nombre	Pourcentage (%)
P. perniciosus	1811	90,36
P. perfiliewi	135	6,74
P. longicuspis	39	1,95
P. ariasi	19	0,95
Total	2004	100

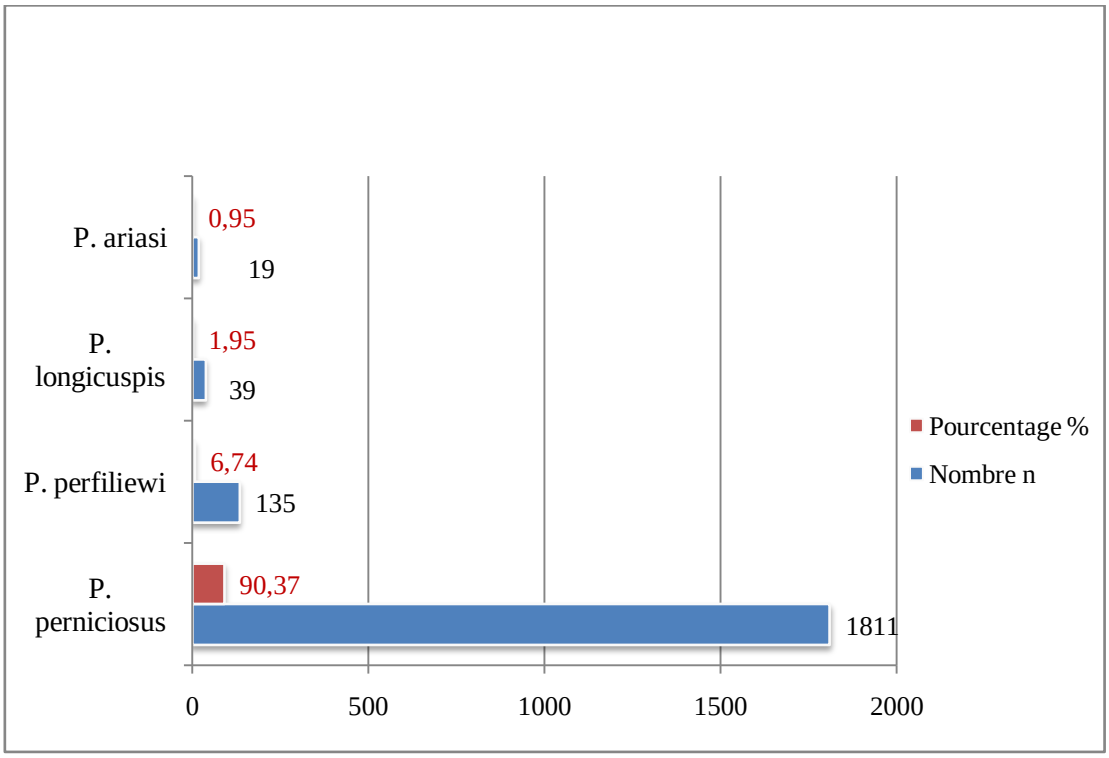


Figure 63 : Proportion de chaque espèce de phlébotomes capturés.

L'espèce dominante est *Phlebotomus perniciosus* avec un pourcentage de 90.36% suivie par *Phlebotomus perfiliewi* avec une fréquence de 6.74%. *Phlebotomus longicuspis* et *Phlebotomus ariasi* avec 1,95 et 0.95 % respectivement.

3.3. Fréquence d'abondance des espèces selon le sexe

L'inventaire des spécimens capturés par espèce et par sexe est représenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 27 : Inventaire des phlébotomes capturés par espèce et par sexe.

Espèce	Males (%)	Femelle (%)	Sex-ratios
P. perniciosus	1233(68,08)	578(31,92)	2.13
P. perfiliewi	58(42,96)	77(57,04)	0.75
P. longicuspis	19(48,72)	20(51,28)	0.95
P. ariasi	19(100)	0(0)	-
Total	1329(66,32)	675(33,68)	1.67

4.Discussion

4.1. Etude analytique

Signalés pour la première fois ici en Algérie en 1912 (Foley et Leduc, 1912), les phlébotomes ont fait l'objet de nombreux travaux menés à l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction de Parrot et des frères Sergent. Des découvertes capitales concernant tant leur systématique ainsi que leur pouvoir pathogène y ont été réalisées (Dedet et *al*, 1984).

Sur les deux milles quatre spécimens de phlébotomes récoltés au cours de la présente étude, 4 espèces appartenant toutes au genre *Phlebotumus* ont été identifiés. Aucun spécimen du genre *Sergentomyia* n'a été identifié.

Tahir et *al.* (2014); dans leur étude menée à Béjaia (région frontalière de notre région d'étude) ont pu identifier deux espèces appartenant à deux genres *Phlébotomus* et *Sergentomyia* avec une abondance de 95.86% et 4.30% respectivement, tandis que Mouloua (2014) a rapporté la présence de 7 espèces sur 8750 spécimens récoltés dans la région de Tizi Ouzou, réparties en 2 genres : le genre *Phlebotumus* représentant 85% du total de capture et le genre *Sergentomyia* représentant 15% (Mouloua, 2014). Harrat a dénombré, en 2006, dix espèces dans la région de Draa El Mizan et Boghni, et le genre *Sergentomyia a* représenté 35% de ses captures ; Belazzoug a recensé en 1991 ; vingt deux espèces de phlébotomes en Algérie dont 12 *Phlébotomus* et 10 *Sergentomyia. (*Belazzoug, 1991).

Parmi les 04 espèces que nous avons capturées et identifiées, *P*. (*Larroussius*) *perniciosus* est la plus représentée dans la région (90.36%). Cette espèce est très répandue en Algérie où elle a été signalée la première fois par Sergent en 1914 (Dedet et *al*, 1984).

Sa répartition géographique est essentiellement tellienne, elle est particulièrement constante dans la région de Bougaa (Sétif), région subhumide, puisque elle est retrouvée dans l'ensemble de sites de piégeage. Elle est constante aussi dans la Grande Kabylie d'après l'étude de Mouloua (2014) ainsi que dans le Constantinois. Ces deux régions correspondent aux étages bioclimatiques humides et subhumides et sont aussi deux régions endémiques pour la leishmaniose viscérale (Moulehem et *al*, 1998).

En dehors du tell, l'aire de distribution de *P. perniciosus* s'étend au sud vers les Aurès et la steppe présaharienne, plus rarement dans les bioclimats arides, voire saharien, sa présence fut signalé au M'zab dans le sahara algérien en 2011 (Boukraa et *al*, 2011).

Sur le plan écologique cette espèce peut être capturée aussi bien en pleine campagne qu'au voisinage immédiat des habitations et dans une grande ville comme Alger (Harrat et *al*, 1993). Les femelles se nourrissent indifféremment sur l'homme ou sur les animaux mais marquent une préférence pour le chien (Parrot, 1930). Sa prévalence est significativement plus élevée dans les sites domestiques que dans les sites de repos sauvages. Ce qui confirme les résultats obtenus du fait que nous avons piégés dans des élevages et aux alentours des habitations.

Des arguments épidémiologiques indirects tel que la concordance de l'air de distribution de *P. perniciosus* et celle de la maladie humaine et animale concourent à renforcer la conviction que cette espèce est bien le vecteur principal de la leishmaniose viscérale en Afrique du nord (Addadi et Dedet, 1976). Cela a été confirmé par nos résultats en ce qui concerne l'abondance de cette espèce (90.36%) et la prévalence élevée de la leishmaniose à Bougaa (77.78%).

Ces résultats contredisent les résultats de Mouloua, à Tizi-Ouzou, qui a montré que *P. perniciosus* ne représentait que 51.42% de la totalité des captures (Mouloua, 2014), ceux de Moulahem, à Constantine, de Kabbout, à Oum EL Bouaghi et de Bouleknafet, à Skikda, qui rapportent des pourcentages respectifs de 23,3%, 39,2 % 18,8%. *P. perniciosus* identifiés (Moulahem et *al*, 1998; Kabbout et *al*, 2007; Boulakenafet, 2006)

La différence avec les résultats obtenus par les auteurs sus cités peut être expliquée par la proximité des sites de captures situées aux alentours des élevages et habitations (gites préférés de *P.pernicosus).*

La deuxième espèce en termes d'abondance est *Phlebotomus perfieliwi,* avec un pourcentage de 6.74%. Elle a été décrite pour la première fois par Parrot en 1930.elle est répandue dans la partie Est du Maghreb et de l'Europe orientale (Zhioua et *al*, 2007). La présence de *P. perfiliewi* est limitée à la zone bioclimatique semi-aride (Ghrab et *al*, 2006).

En Algérie, *P.perfiliewi* est limitée dans les zones bioclimatiques humides, sub- humides et semi-arides et absente dans la zone bioclimatique aride (Pinto et *al*, 2002). Cette espèce est présente aussi bien dans les habitations humaines que dans les abris d'animaux domestiques. Elle est impliquée dans la transmission de la leishmaniose cutanée du nord. Des femelles de cette espèce ont été trouvées naturellement infectées par *Leishmania infantum* MON-24

(agent responsable de la leishmaniose cutanée du nord*)* à Ténès, localité située à 200 Km à l'ouest d'Alger (Izri et Belazzoug, 1993).

Différentes études effectuées au nord Algérien ont rapporté des résultats similaires à ceux de la présente étude. En effet Messai à Mila et Manseur à Kherrata (Béjaia), ont présenté des pourcentages de 4,9 % et 5,53% respectivement (Messai, 2006; Manseur, 2015) et Boulaknafet a avancé un taux identique à Skikda, soit un pourcentage 6,7% (Boulakenafet, 2006).

D'autres auteurs ont décrits des pourcentages supérieurs à nos résultats :

- Mouloua, montre que cette espèce vient après *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie avec un pourcentage de 28.66% (taux un élevé en comparant avec nos résultats) (Mouloua, 2014).
- Moulahem, montre que cette espèce est très abondante à l'intérieur (endophile). En effet, dans ses captures effectuées dans un appartement urbain à Constantine *Phlebotomus perfiliewi* présente un pourcentage de 75,5% de l'ensemble des captures (Moulahem et *al*, 1998).
- Bencherif, lors de son étude à Biskra et Batna n'a capturé aucun spécimen (Bencherif, 2010). Tahir aussi n'a capturé aucun spécimen à Béjaia région ou *P. perfiliewi* est sensée être présente (Tahir et *al*, 2014). Ceci peut être liée à la période de piégeage (inadéquate, de durée courte) ou à la pulvérisation d'insecticides avant la pose des pièges dans la région d'étude.

Phlebotomus longicuspis vient en troisième place avec un pourcentage de 1,95%. C'est une espèce endémique en Algérie, elle semble plus abondante dans les hauts plateaux, elle prolifère dans les régions subhumides à aride, elle peut être capturée aussi bien en zone rurale que dans les zones urbaines comme la ville d'Alger. La femelle se gorge fréquemment sur le chien (Harrat et *al*, 1993). Son rôle vecteur de *leishmaia infantum* en Algérie, a été suspecté depuis les années quarante (Parrot et Picheyre, 1941) puis confirmé après avoir été trouvée infestée naturellement par *Leishmania* dans un chenil *à* Alger par Parrot et *al.* (1954) (Moulahem et *al*, 1998).

Les résultats de nos captures sur cette espèces sont proches de ceux rapportés par :

- Kabbout, à Oum-EL-Bouaghi qui a noté un pourcentage de 3.33% (Messai, 2006) ; Boulaknafet, à Skikda, qui a rapporté un pourcentage de 4%. (Boulakenafet, 2006) ;
- Mouloua et Manseur qui ont enregistré, respectivement, les pourcentages : 2.66% et 2.8% des captures totales (Mouloua, 2014 ; Manseur, 2015)

Quant à *Phlebotomus ariasi*, nous avons récolté 19 spécimens soit un pourcentage de 0, 95%. Cette espèce a été signalée pour la première fois en Algérie dans le massif des Aurès par Parrot, (Parrot, 1936), sa répartition est essentiellement tellienne. C'est une espèce anthropo-zoophile, elle pique de préférence le chien et elle est reconnue comme vecteur de leishmaniose viscérale en France (Izri et *al*, 1992). Cette espèce est très rare en Algérie:

- Bounamous, a capturé uniquement 5 spécimens en septembre 2007 dans l'enclave aride des Aurès (Bounamous, 2010). Des captures réalisées sur plusieurs années dans des stations avoisinantes n'ont pas révélé sa présence ;
- Mouloua, n'a capturé que 10 spécimens sur 8750 phlébotomes récoltés (Mouloua, 2014) ;
- Manseur a enregistré un pourcentage de 0.95% (Manseur, 2015).

La richesse spécifique globale de notre station d'étude est de 4 espèces. En comparant les résultats obtenus dans notre région d'études avec d'autres études réalisées dans d'autres régions : Constantine et Mila 4 espèces ont été signalées (Moulahem et *al*, 1998; Messai, 2006); Oum- EL Bouaghi et Skikda 5 espèces ont été rapportées (Kabbout et *al*, 2007; Boulakenafet, 2006); Batna et Biskra, 8 espèces, Tizi-Ouzou 7 espèces et Kharrata à Béjaia 9 espèces ont été identifiées (Bencherif, 2010; Mouloua, 2014; Manseur, 2015))

4.2. Sex-ratios

L'étude des valeurs du sex-ratio des populations de phlébotomes recensés dans la région d'étude a montré qu'il y avait une prédominance des mâles avec 1329 mâles contre 675 femelles soit une sex-ratio égale à 1,67.

Nos résultats sont proche à ceux obtenus par :

- Manseur à Kharrata (Béjaia) qui a montré une légère prédominance des mâles par rapport aux femelles soit une sex-ratio égale à 1, 31 (Manseur, 2015) ;
- Mouloua, à Tizi-Ouzou, qui a récolté à l'aide de pièges adhésifs, 4664 mâles contre 1747 femelles soit une valeur de sex-ratio égale à 2,67 (Mouloua, 2014) ;
- Bencherif, a rapporté une valeur de sex-ratio égale à 1,43 (Bencherif, 2010) ;

- Boulaknefet, a montré que la valeur de sex-ratio est en faveur des mâles pour les captures avec les pièges adhésifs et les femelles sont plus abondantes lors d'utilisation de pièges lumineux (Boulakenafet, 2006).

Le fait que le sex-ratio est en faveur des mâles peut être expliqué par le fait que les premières générations de phlébotomes sont constituées plus de mâles que des femelles. Ces observations ont été vérifiées par l'élevage du phlébotome en insectarium. (Volf et Volfova, 2011)

Les valeurs des sex-ratios est en faveur des mâles pour *P.perniciosus* (2.13) et *P.ariasi* (19 males contre 0 femelles). Tandis que pour *P. longicuspis,* nous avons remarqué une légère prédominance des femelles par rapport aux mâles avec une valeur de sex-ratio égale à 0,95. Manseur a rapporté une valeur de 0.42 pour cette espèce (Manseur, 2015). Les mêmes résultats ont été rapportés par Mouloua, qui a rapporté 81 femelles contre 31 mâles (Mouloua, 2014). Cela peut être expliqué du fait que l'espèce *P.longicuspis* est l'espèce jumelle de *P. perniciosus,* Le mâle peut être confondu avec le mâle de *P. perniciosus.*

Quant à *P. perfiliewi*, la valeur du sex-ratio est en faveur des femelles (0.75) ; Notre résultat pour cette espèce s'oppose à la plupart des autres études. Les femelles de *P. perfiliewi* seraient plus attirées par la lumière des pièges que les males.

5. Conclusion

L'inventaire de la faune phlébotomienne a été réalisé dans la localité de la Daïra de Bougaa (Wilaya de Sétif) région endémique de la leishmaniose canine lors de l'étude séro-épidémiologique. Le but de cette étude était d'identifier les espèces potentiellement vectrices de leishmanioses dans ce vaste foyer.

Un total de 2004 phlébotomes a été collecté et identifié jusqu'à l'espèce. Leur identification a montré la présence de 04 espèces appartenant toutes au genre *Phlebotomus,* sous genres *Larroussius*. Aucun spécimen du genre *Sergentomyia* n'a été identifié.

Pour l'ensemble du peuplement, il existe une nette différence de proportion globale entre les quatre espèces. Une prédominance nette de *P. perniciosus* (90.37%) vecteur de la leishmaniose viscérale, suivi par *P. perfiliewi* (6.74%) vecteur de leishmaniose cutanée

sporadique, puis *P. longicuspis* (1.95%) considérée comme vecteur possible de la leishmaniose viscérale et enfin *P. ariasi* (0.95%) vecteur de la leishmaniose viscérale.

L'analyse de la diversité montre que la région est peu diversifiée et non équilibrée et une seule espèce de phlébotome domine en l'occurrence *P. perniciosus.*

Enfin, la valeur globale de sex-ratio des phlébotomes recensés est en faveur des mâles (1.67), elle est de même pour les espèces *P.perniciosus* (2.13) et *P.ariasi* (que des mâles). Cette valeur est en faveur des femelles pour *P. perfiliewi* et *P. longicuspis* avec les ratios 0.75 et 0.95 respectivement.

CONCLUSION GENERALE

La leishmaniose canine est une maladie grave souvent mortelle pour le chien, d'importance croissante. Par ailleurs, elle est plus préoccupante sur le plan santé publique puisque de nombreuses études épidémiologiques démontrent une étroite relation entre l'incidence des cas de la leishmaniose viscérale humaine et la prévalence (clinique et sérologique) observée chez le chien.

Ce travail a contribué à la réalisation d'un état de lieux de cette anthropozoonose. Une séroprévalence de 69.17% a été déterminée avec une répartition spatiale hétérogène de la leishmaniose canine. En effet, la séroprévalence dans la Wilaya de Sétif était nettement supérieure à celle de Bouira. La séropositivité varie en fonction de l'origine géographique du chien mais aussi en fonction de la présence d'autres maladies. Par contre, la race, le sexe, l'âge et l'activité du chien semblent n'avoir aucun lien avec l'infection.

Par ailleurs, le portage asymptomatique observé était très important (près de 32.5%). Cette catégorie de chien constitue un danger réel étant susceptible de transmettre la maladie aux autres chiens et à l'homme via les phlébotomes.

L'examen clinique s'est montré faible pour diagnostiquer la leishmaniose (sensibilité= 67%, spécificité=16%) et sa concordance avec l'IFI reste moyenne. Le Witness® Leishmania semble avoir une très bonne spécificité (100%), une sensibilité de 90% et une excellente adéquation avec l'IFI.

Enfin, l'étude de vecteurs dans la région de Bougaa (Sétif), a permis de capturer et d'identifier 04 espèces toutes vectrices de la leishmaniose. La densité élevée des phlébotomes constatée expliquerait sans doute la hausse de prévalence dans la région (75% à Sétif) et alerte sur le risque d'exposition des populations humaine et canine. La mise en place d'un plan de lutte intégrant la lutte contre les espèces vectrices devient urgent et obligatoire.

RECOMMANDATIONS & PERSPECTIVES

L'OMS et l'OIE ont émis des recommandations concernant les leishmanioses humaine et canine et qui devraient constituer l'ultime feuille de route dans la lutte ainsi que la prévention des leishmanioses. A l'issue de cette modeste contribution, les recommandations suivantes semblent s'imposer :

- La réalisation d'enquêtes descriptives évaluant la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les zones d'enzootie ;
- L'évaluation objective des programmes de lutte mis en place par les autorités compétentes;
- La mise en place des programmes de lutte et de surveillance des leishmanioses doit être réalisée en collaboration avec des intervenants dans le domaine de la santé humaine et animale.

Il serait judicieux de :

- Poursuivre et cibler la lutte anti-vectorielle et évaluer l'impact des campagnes de désinsectisation ;
- Implanter des fourrières canines dans chaque wilaya et assurer le ramassage des chiens errants;
- Réaliser d'études sur les autres réservoirs (chats, chacals, renards) et déterminer leur rôle dans la pérennité des leishmanioses ;
- Introduire et évaluer l'impact de l'utilisation des colliers antiparasitaires dans la prévention de la leishmaniose canine ;
- Rechercher d'autres traitements plus efficaces et qui pallient les inconvénients des anciennes molécules.
- Etudier la pertinence de la production de vaccins à bases de souches algériennes ;
- Surveiller activement l'émergence des souches résistantes.

- **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abedelmajeed Nasereddin, A., Baneth, G., Schonian, BG., Kanaan, M., et Jaffe, C.L. "Molecular Fingerprinting of *Leishmania infantum* Strains following an Outbreak of Visceral Leishmaniasis in Central Israel" Journal of clinical microbiology, Vol. 43, n°12, (2005), 6054–6059.
- Abonnenc, E., Les phlébotomes de la région Ethiopienne *(Diptera, Psychodidae)*. Ed. Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.), Paris, (1972), p 285.
- Achour Barchiche, N., et Madiou, M., « Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou » Pathologie Biologie 57, (2009), 65–70.
- Adak S, Datta AK. Leishmania major encodes an unusual peroxidase that is a close homologue of plant ascorbate peroxidase: a novel role of the transmembrane domain. Biochem J 390, (2005), 465-474.
- Adel A., Abatih E., Speybroeck N., Soukehal A., Bouguedour R., Boughalem K., et al. Estimation of Canine Leishmania Infection Prevalence in Six Cities of the Algerian Littoral Zone Using a Bayesian Approach. PLoS ONE 10(3): (2015), e0117313. doi:10.1371/journal.pone.0117313
- Adel, A., Saegermanb, C., Speybroeckc, N., Praetc, N., Victorc, B., De Dekenc, R., Soukehald, A., Berkvensc, D., "Canine leishmaniasis in Algeria: True prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type". Veterinary Parasitology 172, (2010), 204–213.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major. J Immunol 169, (2002) ,898-905.
- Ait Oudhia, K., Lami, P., Lesceu, S., Harrat, Z., Hamrioui, B., Dedet, J.P. & Pratlong, F. "Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake". Annals of Tropical edicine & Parasitology, Vol. 103, No. 8, (2009), p679–692.
- Aït-Oudhia K., Harrat Z., Benikhlef R., Dedet J.P., Pratlong F.,. Canine Leishmania infantum enzymatic polymorphism: A review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. Acta Tropica 118, (2011), 80–86.
- Almeida-Campos FR, Horta MF. Proteolytic activation of leishporin: evidence that Leishmania amazonensis and Leishmania guyanensis have distinct inactive forms. Mol Biochem Parasitol 111, (2000), p363-375.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. "Leishmaniasis and poverty". Trends Parasitol: vol. 22. (2006).
- Alvar, J. « *Las Leishmaniasis: De la Biología al Control »*, Laboratorios Intervet S.A. Salamanca. (2001).
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., "Canine leishmaniasis". Adv. Parasitol. 57, (2004), 1–88.
- Amara, A., Abdallah, H., Jemli, M.H., Rejeb, A., Les manifestations oculaires chez les chiens leishmaniens. *Point Vét*, (2003), p50-55.
- Amela, C., "Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain". *Eur. J. Epidemiol.* 11, (1995), p157–16.
- Amprey, JL., Spath, GF., Porcelli, SA., Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with Leishmania donovani. Infect Immun 72, (2004), p589-592.

- Andrade, H., Toledo, V., Marques, M., Silva, J., Tafuri, W., Mayrink, W., Genaro, O., « *Leishmania chagasi* is not vertically transmitted in dogs". Vet. Parasitol. 103, (2002), p71–81.
- Andrade, R., Reis, A., Gontijo, C., Braga, L., Rocha, R., Arau´jo, M., Vianna, L., Martins-Filho, O. "Clinical value of anti-Leishmania (*Leishmania*) *chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs". Vet. Immunol. Immunopathol. 116, (2007), p85–97.
- André Hufty., Introduction à la climatologie: Le rayonnement et la température, l'atmosphère, l'eau, le climat et l'activité humaine, Presses Université Laval, (2001), p 12,
- Anonyme., La leishmaniose générale du chien à *Leishmania infantum.* http://www.dermavet.com/modules/atlasparasito/htm/leish/leish.htm
- Antoine, J.C., Lang, T., Prina, E., Courret, N., Hellio, R. 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, (1999), p2559-2570.
- Antoniou, M., Doulgerakis C., Pratlong F., Dedet J.P., Tselentis Y. "Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains oh the parasite *Leishmaniainfantum"*. Am. J. Trop. Med. Hyg., V.71, n°1, (2004), p71–72.
- Aransay A.M., Scoulica E., Tselentis Y., Ready P.D. Phylogenitic relationships of phlebotominesandfies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, 9, (2000), p157-168.
- Arshad, MI., Rauch, M., L'Helgoualc'h, A., Julia, V., Leite-de-Moraes, MC., Lucas-Clerc, C., PiquetPellorce, C., Samson, M., NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. Eur J Immunol 41, (2011), p2341-2348.
- Ashford, R.W. "The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses". International Journal for Parasitology 30, (2000), p1269-1281.
- Athanasiou, L.V., Kontos, V.I., Saridomichelakis, M.N., Rallis, T.S., Diakou, A. A. "cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland". Acta Tropica 122, (2012), p291– 295.
- Bachi, F. "Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en Algerie". Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger (2001).
- Baldelli, R. et al. "Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel". Vet. Parasitol. 179, (2011), p57–61.
- Ballart, C., Alcovera, M., Picadoc, A., Nietod, J., Castillejo, S., Portúsa, M., Gállego.M. "First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study Preventive Veterinary Medicine" (2012). http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.003.
- Baneth, G., Dank, G., Keren-kornblatt, E. Emergence of visceral leishmaniasis in Central Israel. Am J Trop Med Hyg 59 (5), (1998), p722–5
- Baneth, G., Koutinas, A F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. "Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one". Trends in Parasitology V. 24, n°7, (2008), p324–330.
- Bañuls A.L., Senghor M., Prudhomme J. Phlébotomes et leishmanioses. Institut de Recherche pour le Développement. Université Montpellier 2, (2013).
- Banuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F. "Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans". Adv. Parasitol., 64, (2007), p6-8.
- Barbieri, C.L. "Immunology of canine leishmaniasis". *Parasite Immunol.*, 28, (2006), 329-337.

- Barr, SD., Gedamu, L. Role of peroxidoxins in Leishmania chagasi survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. J Biol Chem 278, (2003), p10816-10823.
- Belazzoug, S. "Isolation of Leishmania major Yakimoff, Schokhor, 1914 from Psammomys obesus Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria Trans". R. Soc. Trop. Med. Hyg.77 (1983) p876.
- Belazzoug, S. "The sandflies of Alegria". Parasilologia 33 (Suppl 1), (1991), p85- 87.
- Belazzoug, S. Les leishmanioses en Algérie; a propos de l'identification enzymatique de 32 souches d'origine humaine et animale. Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. In: Application éco-épidémiologique (Coll. Int. CNRS. INSERM, 1984), IMEEE, Montpellier, (1986), p. 397–400.
- Belkaid, Y., Butcher, B, Sacks, DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmaniainfected cells. Eur J Immunol 28, (1998), p1389-1400.
- Bencherif, F. ''Contribution à l'étude des insectes d'intérêt médical dans les régions de Batna et de Biskra : Cas particulier des phlébotomes (*Diptera : Psychodidae*)'' Mémoire de Magister en Sciences Biologiques, Option: Biologie Cellulaire et Physiologie Animale, Université Hadj Lakhdar – Batna, (2010), 140p
- Benikhlef, R., Harrat, Z., Toudjine, M., Djerbouh, A., Bendali-Braham, S., Belkaid. M. « Présence de leishmania infantum mon-24 chez le chien ». *Med Trop*; 64, (2004), p381-383.
- Bensoussan, E., Naserdin, A., Jonas, F., Schur, L.F., Carles, L.J. "comparaison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis". J. Cli. Microbiol. 44, (2006), p1435-1439.
- Berenguer, J., Gomez-campdera, F., Padilla, B., Rodriguezferrro, M., Anaya, F., Moreno, S., Valderrabano, F., Visceral leshmaniasis (kala-Azar) in transplant recipients : case report and review, Transplant, V.65, n°10, (1998), p1401-1404
- Berrahal, F. "Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, (1996), p273–277.
- Besteiro, S., Williams, R.A., Morrison, L.S., Coombs, G.H., Mottram, J.C. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of Leishmania major. J BiolChem 281, (2006), p11384-11396.
- Blaise, H. "Comment diagnostiquer la leishmaniose canine". *Le Point Vétérinaire.*, Vol. 270, n° 37, (2007), p54-59.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr Opin Immunol 12, (2000), p64-76.
- Bogitsh, B.J., Carter Clint, E., et Oeltmann, T. N. Arthropods as Vectors. Chapter 18 Human. Parasitology (Fourth Edition), (2013), p349–379.
- Borja-cabrera, G.P., Correia Pontes, N.N., Silva, V.O., Paraguai de souza, E., Santos W.R., Gomes, E.M., Luz, K.G., Palatnik, M. & Palatnik de sousa, C.B. "Long lasting protection against canine kala azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN)". *Vaccine*, 20, (2002), p3277-3284.
- Boulakenafet, F., ''Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciationde la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda'' Mémoire Magister en Entomologie option : application agronomique et médicale, Université Mentouri Constantine, (2006), 190p
- Boulouis H.J., Marignac G., Haddad N., Maillard R., Chomel B. Les animaux réservoirs et victimes des Bartonella. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, Tome 161, (2008), p211-219.
- Bounamous, A. Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'Est algérien. Thèse de Doctorat. Université de Constantine, (2010), p304.

- Bouratbine, A., Aoun, K., Gharbi, M., Haouas, N.J., Zaroui, J., Harrat, Z., Baba, H., et Darghouth, M.A. «Données épidémiologiques, cliniques et parasitologique sur la leishmaniose générale canine en Tunisie » . *Bull Soc Pathol Exot*, 98, 5, (2005), 359-362. 219.
- Bourdeau, P. Elements pratiques du diagnostic de la leishmaniose canine. *Point Vét*, n°15, (1983), p43-50.
- Bourdoiseau, G. "Actualités : la leishmaniose canine à Leishmania infantum, points de confirmation et d'interrogation". Nouv. Prat. vét. 32, (2007), p49-54.
- Bourdoiseau, G. Chapitre 13 : Maladies parasitaires disséminées, la leishmaniose. In : Parasitologie clinique du chien, Ed.NEVA, Créteil, (2000), p325-362.
- Bourdoiseau, G., Dénerolle, P. "Traitement de la leishmaniose canine : actualités". *Revue Méd. Vét*., 151, (2000), p395-400.
- Bourdoiseau, G., Franc, M., "Leishmaniose canine et féline". EMC – Vétérinaire, [Article 1350], (2008), p1-10.
- Bourdoiseau, G., Franc, M., "Leishmaniose canine", Encyclopédie vétérinaire - Parasitologie. Elsevier, Paris, (2002).
- Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Bras Gonçalves, R., et al. Effective humoral and cellular immunosuppressive responses in *Li*ESAp-MDP vaccinated dogs. Vet Immunol Immunopathol 128, (2009), p71-8.
- Bourdoiseau, G., René, Chermette. La leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: données actuelles sur une zoonose négligée. Revue Francophone des laboratoires - N°477// décembre, (2015), p32-33.
- Boussaa, S. Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc Effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg I, France, (2008), p181.
- Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostbock, S., Ritter, U. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. J Immunol 182, (2009), p774-783.
- Brittingham, A., Chen, G., McGwire, BS., Chang, KP., Mosser, DM. Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. Infect Immun 67, (1999), p4477-4484.
- Britto, C., Ravel, C., Bastein, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, JP., et al. Conserved linckage groups associated with largescale chromosomal rearrangement between Old World and New World Leishmania genomes. Genes 222, (1998), p107-117.
- Buffet, P., Leishmaniose cutanée. EMC, Dermatologie, 98-395-A-15, (2008).
- Bulle, B., Millon, L., Bart, J.M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandezbarredo, S., Alunda, J.M. & Piarroux, R. "Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis". *J. Clin. Microbiol.* 40, (2002), p3391-3397.
- Bussiéras, J., Chermette, R. *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie.* Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie, (1992), p186.
- Cardoso L., Schallig H.D.F.H., Cordeiro-Da-Silva A., Cabral M., Alunda J.M., Rodrigues M. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology 117, (2007), p35–41.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Neto, F., Kroon, N., Rodrigues, M. "Serological survey of Leishmania infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST)". Acta Trop. 91, (2004), p95–100.

- Carre, N., Collot, M., Guillard, P., Horellou, M., Gangneux. J-P., « La leishmaniose viscérale : Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie ». Journal de Pharmacie Clinique. Volume 29, Numéro 3, (juillet-août-septembre 2010), p121-48,
- Catheland, S. « Leishmaniose : une zoonose en pleine extension ». La dépêche vétérinaire, n°865. (2005).
- Centre National de Référence des Leishmaniose : www.parasitologie.univ montp1.fr/leish2. htm consulté le 13/01/2013.
- Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K.K., Das, P., Roy, S. Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. J Immunol 175, (2005), p3214-3224.
- Chang, K.P. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in Leishmania donovani-human phagocyte interactions in vitro. Am J Trop Med Hyg 30, (1981), p334-339.
- Chappuis, F. "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat. Rev. Microbiol. 5, (2007), p873–882.
- Chargui, N., Bastien, P., Kallel, K., Haouas, N., Akrout, F.M., Massoudi, A., Zili, J., Chaker, E., Othman, A.D., Azaiez, R., Crobu, L., Mezhoud, H., Bada, H., "Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. V. 99, n° 10, (2005), p762-768.
- Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Akrout Messaidi, F., Zribi, M. & Babba, H. "Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia". Parasite, 14, (2007), p247-251.
- Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Lahmar, S., Guesmi, M., Ben Abdelhafidh, A., Mezhoud, H., et Babba, H. "Use of PCR, ITAT and in vitro culture in the detection of leishmania infantum infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia" Parasite,16, (2009), p65-69.
- Chicharro, C., Morales, M.A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J.,. Molecular epidemiology of Leishmania infantum on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96 (Suppl. 1), (2002), S93–99.
- CortesYolanda Vaz, S., Neves, R., Maiaa, C., Cardosoe, F.L., Campino, L., "Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region". Veterinary Parasitology 189, (2012), p189– 196.
- Costa, M. A., Matheson, C., Iachetta, L., Llagostera, A., &Appenzeller, O. Ancient leishmaniasis in a highland desert of northern Chile. PLoS One, 4(9), e6983 (2009).
- Costa-Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., Simões G. "Primeirocaso de leishmaniose emgatodoméstico (*Feliscatusdomesticus*) detectadoem Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminary". RPCV 89, (1994), p140–144.
- Coulibaly, E., Heinis, V., Campos, C., Ozon, C., Bourdoiseau, G., Haas, P., Marty, P. (2004). Enquête descriptive sur la leishmaniose canine dans le Sud de la France en 2000. Prat. Méd. Chir. Anim. Cie, **39**, 35-40.
- Courret, N., Frehel, C., Prina, E., Lang, T., Antoine, JC. Kinetics of the intracellular differentiation of Leishmania amazonensis and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. Parasitology 122, (2001), p263-279.
- Cox, F. E. History of human parasitology. Clinical microbiology reviews 15(4), (2002), p595-612.
- Cruz, I. "A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis" Posadas (Misiones, Argentina). BMC Infect. Dis. 10, 342, (2010).
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavat, C., Desjeux, P., Alvar,J., Leshmania/HIV coinfection in the second decade. Indian J. Med. Res, 123, (2006), p357-388.
- Dantas-Torres F. "The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmaniainfantum and Leishmaniabraziliensis". Vet.Parasit 149, (2007), p139-146.

- Dantas-Torres, F. "Canine leishmaniosis in South America". Parasite Vectors 2 (Suppl. 1), S1. (2009).
- Dantas-Torres, F., Felinto de Brito, M.E., Brandao-Filho, S.P., "Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil". Veterinary Parasitology 140, (2006), p54–60.
- Dedet, J.P. "Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique", EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8- 506-A-10, (2009).
- Dedet, J.P. Addadi K. Belazzoug S. « Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie». Cah. ORSTOM. Sér. Ent. Méd. Parasitol .vol XXII, n° 2, (1984), p99-127.
- Dedet, J.P. Les Leishmanioses. Paris, *Ellipses*, (1999), p253.
- Denerolle, P. « La leishmaniose : données actuelles en France ». Point vét 236, (2003), p46-48.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J.A., Svobodova, M. Volf P. ITS2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (*Diptera, Psychodidae*): Possible consequences in theirability to transmit *Leishmania tropica*. *Int. J. Parasitol* 32, (2002), p1123-1131.
- Depaquit, J., Léger, N., Killick-Kendrick, R. Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi*n. sp. (*Diptera: Psychodidae*) d'Afrique de Nord. Parasite 5, (1998), p151-158.
- Dermine, JF., Goyette, G., Houde, M., Turco, SJ., Desjardins, M. Leishmania donovani lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. Cell Microbiol 7, (2005), p1263-1270.
- Desjeux, P. « Leishmaniasis : curent situation and new perspectives ». Comp Immun Microbiol Infect Dis. 27, (2004), p305- 310.
- Desjeux, P. et Alvar, J. "*Leishmania* / HIV co-infections: epidemiology in Europe" *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 97, n° 1, (2003), S3– S15.
- Desjeux, P., la lute contre les maladies tropicales : la leishmaniose, Revue de l'OMS, Genève, (1993), p53.
- Djoudi, M., Triki-Yamani, R. et Kaidi, R. « la leishmaniose féline dans la région d'Alger ». 3ème Journées d'Epidemiologie Animale. Université Saad Dahlab de Blida, (2010), p32-37.
- Domenico Otranto., Ettore Napoli., Maria Stefania Latrofa., Giada Annoscia et *al*; « Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment ». *Vet Para*, (2017).
- Dumon H., Zoonoses. *Monographie du laboratoire Bayer, N°3, Leishmaniose viscérale méditerranéenne*, (1999).
- Duprey, Z.H. et al. "Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003". Emerg. Infect. Dis. 12, (2006), p440–446.
- Dvorak V., Halada P., Hlavackova K., Dokianakis E., Antoniou M., Volf P. Identification of *phlebotominae* sand flies (*Diptera: Psychodidae*) by matrix-assisted laserdesorption / ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & Vectors*7, (2014), P21 http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/21.
- Dye, C. "The logic of visceral leishmaniasis control". *Am. J. Trop. Med. Hyg* 55, (1996), p125–130.
- Ehrchen, JM., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., von Stebut, E., Weiss, J.M., Munck, N.A., Viemann, D., Varga, G., Muller-Tidow, C., Schuberth, H.J., Roth, J., Sunderkotter, C. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. PLoS Pathog 6:e1000871, (2010).
- Epstein, P. « Oui, le réchauffement de la planète est dangereux ». *Pour la science*, n°276, (2000), p80-88.

- Ertabaklar, H., Toz, S.O., Ozkan, A.T., Rastgeldid, S., Balcioglue, I.C, Ozbelb,Y. "Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province" Acta Tropica 93, (2005), p239–246.
- Estevez, Y. Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure activité. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III, (2009).
- Euzeby, J. « *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire* ». Paris: Lavoisier, (2008), p818.

- Euzéby, J., Protozoologie médicale comparée, Vol. I : Généralités sarcomastigophores (Flagellés, Rhizopodes) – Ciliés, 212-313., Ed.coll.M.Merieux, Lyon, (1986), p463.

- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., Henson, P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. J Immunol 149, (1992), p4029- 4035.
- Favali, C., Tavares, N., Clarencio, J., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. J Leukoc Biol 82, (2007), p1401-1406.
- Ferreira, A., Ituassu, L., Melo, M., Andrade, A., "Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil". Vet. Parasitol. 152, (2008), p257–263.
- Ferroglio, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W., and Rossi, L. "Canine. Leishmaniasis, Italy. Emerging Infectious Diseases", Vol. 11, n°10, (October 2005).
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J., Portus, M. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. Veterinary Parasitology 83, (1999), 87–97.
- Franc M. Leishmaniose canine. *Encyclopédie vétérinaire*, Paris, Parsitologie, (1995).
- França-Silva, J., Costa, R., Siqueira, A., Machado-Coelho, G., Costa, C., Mayrink, W., Vieira, E., Costa, J., Genaro, O., Nascimento, E., "Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State. Brazil". Vet. Parasitol. 111, (2003), p161–173.
- Francino, O., Altet L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A. & Roura, X. "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis". *Vet. Parasitol.*, 137 (3-4), (2006), p214-221.
- Freyburger, L., Chabanne, L., Bourdoiseau, G. Vaccination anti-parasitaire contre la babésiose et la leishmaniose chez le chien, *Le Point Vétérinaire*, n°325, (2012), p28-33.
- Gabriel, C., McMaster, W.R., Girard, D., Descoteaux, A. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. J Immunol 185, (2010), p4319-4327.
- Galati, E.A.B. Sistematica dos *Phlebotominae* (*Diptera, Psychodidae*) das Americas Sao Paulo PhD Thesis. Faculdade de SaudePublica/USP, V.1, (1990), p210.
- Galvez, R., Miro, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martın, O., Cubero, E., Molina, R., " Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region". Veterinary Parasitology 169, (2010), p327– 334.
- Ghrab, J. Rhim, A., Bach-HambaD., Chahed, M.K., Aoun, K., Nouira, S. et Bouratbine, A., ''Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) of Human leishmaniasis sites'' in *Tunisia.Parasite*, (2006),13. 23-33.
- Giudice, A., Camada, I., Leopoldo, P.T., Pereira, J.M., Riley, L.W., Wilson, M.E., Ho, J.L., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., Almeida, R.P. Resistance of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide

correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect Dis 7, (2007), p7.

- Gourion, V. Contribution à l'étude de la leishmaniose canine dans le sud-est de la France. *Doctorat d'Université de la Méditerranée Aix-Marseille II*, (1990).
- Gradoni, L., Gramiccia, M. "Leishmaniosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)", vol. 1, 6th ed. Office International des Epizooties, Paris, (2008), p240–250.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Troiani, M. HIV-Leishmania coinfection in Italy. Isoenzyme characterization of Leishmania causing visceral leishmaniasis in HIV patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 86, (1992), 161–163.
- Greene, C. E., Sykes, J. E. Eds. "Infectious Diseases of Dog and Cat". (2006).
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., Desjardins, M. Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. Cell Microbiol 10, (2008), p100-111.
- Guimaraes-Costa, AB., Nascimento, M.T., Froment, G.S., Soares, R.P., Morgado, F.N., Conceicao-Silva, F., Saraiva, E.M. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci U S A 106, (2009), p6748-6753.
- Hamarsheh, O. "Serological and molecular survey of Leishmania parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine" Parasites & Vectors: 5, (2012), p183.
- Harrat, Z., & Belkaid, M., « Les leishmanioses dans l'Algérois : Données épidémiologiques » *Bull Soc Pathol Exot, V.* 96, n° 3, (2003), p212-214.
- Harrat, Z., A partir de la thèse du Mouloua, (2006).
- Harrat, Z., Izerouel, S., Belkaid, M. et Tabet-Derrraz, O. ''Fluctuations saisinnieres des phlebotomes de la region d'Alger et sa banlieu''. Arch. Inst. Past.Alger, (1993), 59,245-255.
- Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J.M., Deniau, Rioux, J.A., Belkaid, M. and Dedet, J.P. "*Leishmaniainfantum*and *Leishmania major* in Algeria". *Trans R Soc Trop Med Hyg*V.90, n°6, (1996), p625-629.
- Headington, C. E., Barbara, C. H., Lambson, B. E., Hart, D. T. and Barker, D. C. "Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction". Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96, supplements1/195-S1/197, (2002).
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, SI., Hirschberg, K., Jaffe, C.L. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. EMBO J 10, (1991), p4061-4067.
- Holzmuller, P., Hide, M., Sereno, D., Lemesre, J.L. Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. Infect Genet Evol 6, (2006), p187-197.
- Holzmuller, P., Sereno, D., Lemesre, J.L. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimonyresistant amastigotes of Leishmania infantum. Antimicrob Agents Chemother 49, (2005), p4406-4409.
- Hubert, B. "Comment diagnostiquer la leishmaniose canine". *Le Point Vétérinaire.* (Novembre 2006), p70-73.
- Iniesta, L., Gallego, M., Portus, M. "Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 103, (2007), p77–81.
- Ivens, AC. et Blackwell, J.M. The Leishmania genome Comes of Age. Parasitologie aujourd'hui Persona ed. Vol. 15. Num. 6. Ed. Elsevier Ltd, (1999), p 225-231.

- Ivens, AC., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science 309, (2005), p436-442.
- Izri, M.A. et Belazzoug, S. « diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. Revue Francophone des Laboratoires, N° 396, (2007).
- Izri, M.A., Belazzoug, S., Pratlong, F., Rioux, J.A., "Isolation of Leishmania major in Phlebotomus papatasi in Biskra (Algeria)". The end of an ecoepidemiological saga, Ann.Parasitol. Hum. Comp. 67, (1992), p31-32.
- Izri, M.A., Marty, P., Rahal, A., Lelievre, A., Ozon, C., Baldelli, G., Presiozo J., Haas, P. et Le Fichoux, Y., ''*Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturellement infeste par des promastigotes dans la région de Nice (France)''.Bul. Soc. Path. Exot, (1992), 85, 385-387.
- Izri, M-A., Belazzoug, S., ''*Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* naturally infected with dermotropic *Leishmania infantum* at Tenes. Algeria''. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (1993), 87,399.
- Janvier, F., Morillon, M., Olliaro, P. « Leishmaniose viscérale : efficacité clinique et résistance aux différentes molécules ». MédecineTropicale; 68, (2008), p89-101.
- Jarry, D.M. Historique des leishmanioses et leurs complexes pathogènes. In Dedet, J.P. Les leishmanioses. Edition Ellipses, (1999), p253.
- Jeronimo, S.M.B., Anastacio de Queiroz, Sousa., Richard, D. Pearson. Leishmaniasis Chapter 100 Tropical InfectiousDiseases (Third Edition), (2011), p696–706.
- Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., McMaster, W.R. Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. Mol Biochem Parasitol 120, (2002), p33-40.
- Kabbout, N., Berchi S. et Merzoug, D., ''étude des leishmanioses dans le foyer d'Oum El-Bouaghi : aspect entomologique'', deuxième journées nationales sur la biodiversité, l'environnement natural et la qualité de vie dans la région des Aurès. Université de Batna, Département de Biologie, (2007).
- Kallel, K., Pratlong, F., Belhadj, S., Cherif, F., Hammadi, M., Dedet, J.P., Chaker, E. "Cutaneous leishmaniasis in Tinisia: results of the iso-enzymatic characterization of 71 strains". *Ann Trop Med Parasitol*, V.99, n°1, (2005), p11-19.
- Keck, N. "Diagnostic de laboratoire de la leishmaniose canine. *Leishmaniose canine: Surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie". Résumés*. Lyon : Société Française de Parasitologie, (2004).
- Keck, N. et Dereure, J. "Epidemiology of canine leishmaniasis by crosssectional study in the French focus of Cévennes". Revue Méd. Vét., V. 154, n°10, (2003), 599-604.
- Killick-Kendrick, R. "The biology and control of Phlebotomine sand flies". Clinics in Dermatology, Volume 17, Issue 3, (May–June 1999), p279–289
- Killick-Kendrick, R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: *Review. Med. Vet. Entomol.*, 4, (1990), p1-24.
- Killick-Kendrick, R. Some epidemiological consequences of the evoltionary fit between *Leishmania*and their *Phlebotominae*vectors. *Bull. Soc. Path. Exot.*78, (1985), p747-755.
- Killick-Kendrick, R. Ward R.D. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology.* 82, (1981), p143-152.
- Kima, P.E., Soong, L., Chicharro, C., Ruddle, N.H., McMahon-Pratt, D. Leishmania-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. Eur J Immunol 26, (1996), p3163-3169.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou Z.S., Saridomichelakis M.N., Argyriadis D., Fytianou A., Pievraki K.G. "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)". J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 35, (1999), 376 383.

- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C-L., et al. Identification of Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors by MALDI-TOF MS. PLoS Negl Trop Dis 10(1): e0004351, (2016). doi:10.1371/journal.pntd.0004351
- Lamothe, J., Gaudray, C. et Zarka, P. "Diagnostic de la leishmaniose canine". *Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie.* Vol. 39, (2004), p41-46.
- Lanotte, G., Rioux, J.A, Croset, H. Et Volhardt, Y. "Dépistage de la leishmaniose canine: Stratégie d'enquête utilisée dans le foyer des Cévennes méridionales". Colloques internationaux du CNRS N°239 – Ecologie des leishmanioses, (1979), p126-188.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? Trends Microbiol 11, (2003), p210-214.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, JC., Solbach, W., Laskay, T. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. Infect Immun 70, (2002), p826-835.
- Laurenti, MD., Sotto, MN., Corbett, CE., da Matta, V.L., Duarte, M.I. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. Int J Exp Pathol 71, (1990), p791-797.
- Léger, N., Depaquit, J. Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanisoes. *Rev. Fr. Labo n°* 338, (2001), p41-48.
- Leiva, M., Lloret, A., Pena, T., Roura, X., « Therapy of ocular and visceral in a cat » Vet. Ophtalmol., V. 8, n°1, (2005), p71-75.
- Lemahieu, J.C. Le système immunitaire : organes, cellules et molécules. *In : Cours d'immunologie PCEM 2* [en-ligne], (mise à jour le 13 janvier 2004).
- Lemaire, G., Sergent, E. et L'Héritier, A. « Recherches sur la leishmaniose du chien d'Alger ». *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 6, (1913), p579-581.
- Lemesre, J.L, Holzmuller, P., Bras Gonçalves, R., et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the *Li* ESAp-MDP vaccine in endemic areas of France : double-blind randomised efficacy field trial. Vaccine; 25, (2007), p4223-4234.
- Lerner, EA., Shoemaker, C.B. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. J Biol Chem 267, (1992), p1062-1066.
- Lewis, D. J. *Phlebotomidae* and *Psychodidae* (sand-flies and moth-flies in insects and other arthropods of medical importance. *Edited by Kenneth G. V. Smith, London*, (1973), p155-179.
- Lewis, D.J. A taxomonic review of genus *Phlebotomus (Diptera: Psychodidae*). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Ent.*), 45, (1982), p121-209.
- Locksley, R.M., Heinzel, FP., Fankhauser, J.E., Nelson, C.S., Sadick, M.D. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. Infect Immun 56, (1988), p336-342.
- Louis, C. La leishmaniose canine : ce que doit savoir le pharmacien d'officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Nancy I, (2009), p108.
- Maarten, H.L., De Brujin, M.H.L. et Barker, D.C. "Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA". *Acta Trop*., 52, (1992), p45-58.
- Maia, C., Campino, L., "Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection" Veterinary Parasitology 158, (2008), p274–287.
- Maia, C., Mónica, C., Cláudia, R., José Manuel, Cristóvão., Luís, Cardoso. and Lenea, Campino. Serological investigation of Leishmania infantum, Dirofilaria immitis and Angiostrongylus vasorum indogs from southern Portugal. Parasites & Vectors, (2015), 8:152.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J., Campino, L. Diagnosis of canine leishmaniasis : conventional and molecular techniques using different tissues. Vet J. (2007), 08.009.

- Malé, P. Etude éco-épidémiologique d'un foyer de leishmaniose à Terascon Sur Ariège. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Lyon I, (2001), p121.
- Mancianti, F., Falcone, M.L., Giannelli, C. et Poli, A. "Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis". *Vet. Parasitol*., 59, (1995), p13-21.
- Manna, l., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M., Gravino A.E. "Realtime PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol". *Vet. J.*, 177, (2008), p279-282.
- Manseur, H., « Etude entomologique des phlébotomes dans une région endémique de la leishmaniose viscérale wilaya de Bejaia, Daira de Kherrata », Mémoire Magister option : Epidémiologie animale. Institut des sciences vétérinaires .Université Blida 1, (2015).
- Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 2.1.8. Leishmaniose. (2008)
- Marc, F., Saihi M., Teyssandier, M. Maladies transmissibles et insectes piqueurs sur le territoire métropolitain. Atelier Santé Environnement. E.N.S.P. -IGS 2006-2007.
- Maroli, M. et al. "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors". Trop. Med. Int. Health 13, (2008), p256–264
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin impregnated dog collars in southern Italy. Med Vet Entomol 15, (2001), p358-363.
- Marques, M.J., Volpini, A.C., Machado-Coelho, G.L., Machado-Pinto, J., Mayrink, W., Genaro, O., Romanha, A.J. "comparaison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR". Diagn. Microbiol. Infect. Dis. V. 54, n° 1, (2006), p37-43.
- Martinetti, L., Jacquiet, P., « Dépistage, traitement et prévention de la leishmaniose canine en Corse : enquête auprès des vétérinaires praticiens de l'île». Thèse du Docteur vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, (2013).
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Diaz, V., Morillas-Márquez, F., «Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain ». Emerging Infectious Diseases 15, (2009), 795-798.
- Marty, P., Rosenthal, E., "Treatment of visceral leishmaniasis", Expert Opin. Pharmacother, V. 3, n° 8 (2002), p1101-1108.
- Mathis, A. et Deplazes, P. "PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs". *J. Clin. Microbiol.*, 33, (1995), p1145-1149.
- Mazelet, L. La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français. Mémoire de Métrise en Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France. (2004), p31.
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J.,Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M.,. Leishmaniases and the Cyprus paradox. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 82 (3), (2010), 441–448.
- Meagher, L.C., Savill, J.S., Baker, A., Fuller, R.W., Haslett, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. J Leukoc Biol 52, (1992), p269-273.
- Médaille, C., Briend-Marchal, A. et Braun, J.P. "Blood sampling". EMCVétérinaire 2, (2005), p1–13.
- Meier, C.L., Svensson, M., Kaye, P.M. Leishmania-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. J Immunol 171, (2003), p6706-6713.

- Messai, N., ‘‘Contribution à l’étude de la biodiversité des espèces Culicidienne (*Diptera-Culicidae*) et inventaire des Phlébotomes (*DipteraPsychodidae*) dans la région de Mila’’, Mémoire de Magister en entomologie, Université de Constantine, (2006) ,179p.
- Meunier, A. “Etude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l’influence des facteurs environnementaux (en France depuis 1965, dans le sud-ouest en 2006) ”. Thèse de Docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Lyon, (2007).
- Milhau, S. « Étude épidémiologique de la leishmaniose dans le département de l’Hérault. Méthodes de lutte, perspectives d’avenir ». Thèse de Doctorat Vétérinaire, Toulouse, France, (1987), 103 pp.
- Mirõ, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., Garcia, S., Caballero, M.J., Molina, R. “A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006)”. Parasitology Research 101, (2007), 253-257.
- Mohebali, M., Taran, M., Zarei, Z., “Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination”. Vet. Parasitol. 121, (2004), p239– 245.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., and Alvar, J. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, (1994), 491–493.
- Molina, R., Lohse, J.M., Pulido, F., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Alvar, J. Infection of sand flies by humans coinfected with leishmaniainfantum and human immunodeficiency virus. Am. J. Trop. Med. Hyg., V.60, n°1, (1999), p51-53.
- Moreira, M., Luvizotto, M., Garcia, J., Corbett, C., Laurenti, M., “Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs”. Vet. Parasitol. 145, (2007), p245–252.
- Moreno, J. Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, 23, (2007), p86-88.
- Moreno, J., Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol; 18, (2002), p399–405.
- Mossolayi, M.D., Appriou, M. Intérêt du monoxyde d’azote dans la défense antiparasitaire des macrophages humains. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 138, (1999), p7-17.
- Moulahem, T., Fendri, A.H., Z. Harrat Z., Benmezdad, A., Aissaoui, K., Ahraou, S et Addadi, K., ‘‘Contribution à l’étude des phlébotomes de Constantine : espèces capturées dans un appartement urbain’’. Entomologie médicale, (1998), p2.
- Mouloua, A., « Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie » Thèse de doctorat en sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ; (Février 2014).
- Mukbel, R.M., Patten, C., Jr., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., Jones, D.E. Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. Am J Trop Med Hyg 76, (2007), p669-675.
- Nash Tam, F. Climate, the vital factor in the ecology of *Glossina*. *Bull ent , Res*, 28, (1937). 75-127.
- Naskidachvili L. L’insuffisance rénale chez le chien leishmanien. *Société de pathologie humaine et animale comparée*, Lyon, Edition Fondation Marcel Mérieux, (1986).
- Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. Proc Natl Acad Sci U S A 104, (2007), p15478-15483.
- Noli, C., Auxilia, S.T. “Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review”. *Vet. Dermatol.* 16, (2005), p213-232.

- Noronha FS, Cruz JS, Beirao PS, Horta MF. Macrophage damage by Leishmania amazonensis cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. Infect Immun 68, (2000), p4578-4584.
- Nylen, S., Maasho, K., Soderstrom, K., Ilg, T., Akuffo, H. Live Leishmania promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin Exp Immunol 131, (2003), p457-467.
- OMS. Leishmaniose et les co-infections Leishmania / HIV. Aide mémoire N°116, (2000).
- OMS. Profil épidémiologique des maladies transmissibles : Leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse. Avenue Appia 20. 1211, Genève 27, Suisse. (2007).
- Organisation Mondiale de la Santé, « la lutte contre les leishmanioses. Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, OMS Série de rapports techniques n° 949. Genève (2010).
- Organisation Mondiale de la Santé. 60ème assemblée mondiale de la santé. Rapport de lutte contre la leishmaniose. OMS, (mars 2007).
- Osman, O.F., Kager, P.A., etOskam, L., "Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects", *Trop Med International Health*, V5, n°8,(2000), p553-562.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Levièvre, A., Haas, P., "Disseminated feline leishmaniasis due to Leishmania infection in southern France". Vet. Parasitol., 75 (1998), p273–277.
- Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Fondati A., Lubas G., Gradoni L., CASTAGNARO M., Crotti A., Matoli M., Oliva G., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2010) Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. JAVMA, Vol 236, No. 11.
- Papierok, G-M. "Diagnostic biologique de la leishmaniose canine et perspectives". *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*. (Janvier-Mars 2002), p65- 68.
- Paranhos-Silva, M. "Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis". Implications for the disease control. *Acta Trop.* 69, (1998), p75–83
- Parrot, L., ''Notes sur les phlébotomes IV- *Phlebotomus perfiliewi* n.sp''. Archh. Inst. Past. Alger, (1930), 8, 383-385.
- Parrot, L., ''Notes sur les phlébotomes'', Sur Phlebotomus langeroni var.longicuspis Nitzulescu, 1930''. Arch. Inst.Past Alger, (1936),14,137-143.
- Parrot, L., Picheyre, R. ''Notes sur les Phlébotomes. Phlébotomes du Hogar'' .Arch. Inst.Past. Algérie, (1941), 4, 441-442.
- Passos, V.M.A., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Degrave W. "Natural infection of a domestic cat (*Felisdomesticus*) with *Leishmania*(*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais". Braz. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91 (1996), p19–20.
- Pearson, RD., Steigbigel, R.T. Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani. J Immunol 125, (1980), p2195-2201.
- Petersen, C.A., "Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States". Top. Companion Anim. Med. 24, (2009), p182– 188.
- Petter, F. Répartition géographique et écologique des Rongeurs désertiques de la région paléarctique (Doctoral dissertation), (1961).
- Pin, D. Dermatologie ENVL, *site Ecole Nationale Vétérinaire Lyon*.
- Pinelli, E., Rutten, VPMG., Ruitenberg, EJ. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. *In : Canine leishmaniasis : an update.* Barcelona, Spain, Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, (1999), p60-64.

- Pinto, M.C., Campbell-Lendrum, D.H., Lozovei, A.L., Teodoro, U. et Davies C.R., ‘‘Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field’’. Medical and Veterinary Entomology, (2002), 132-139.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P. Isoenzymatic analysis of 712 strains of Leishmania infantum in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. Journal of Clinical Microbiology 42 , (2004), 4077–4082.
- Priya, Shetty. Changements climatiques et maladies transmises par les insectes : Faits et chiffres. (2009).
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., Joiner, K.A. Binding and release of C3 from Leishmania donovani promastigotes during incubation in normal human serum. J Immunol 143, (1989), p3743- 3749.
- Puentes, S.M., Sacks, D.L., da Silva R.P., Joiner, K.A. Complement binding by two developmental stages of Leishmania major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. J Exp Med 167, (1988), p887-902.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A. & Dye, C. “ Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs”. *Parasitology*, 122, (2001), p253.261.
- Quitterie, N., Odette, L., Nadau, C. Etude préliminaire de l’utilisation de la protéine LACK dans le Test d’intra-dermo-réaction de la leishmaniose Canine. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier, Toulouse. 116, (2005), p12-51.
- Racoosin, E.L., Beverley, S.M. Leishmania major: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. Exp Parasitol 85, (1997), p283-295.
- Raikov. The protozoan nucleus. Morphologiy and evolution. Spring-verlaged. wein 9, (1982), p467.
- Rami, M., Atarhouche, T., Sabri, M., Cadi Soussi, M., Benazzou, M., Dakkak, A,. “Canine leishmaniasis in the Rif Mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey”. Parasite 10, (2003), 79-85.
- Raquin, E., “Etude rétrospective de cas de leishmaniose canine à l’ENVA de 2000 à 2009”. Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, thèse de Doctorat vétérinaire, (2010)
- Ravel, C. Wincker P. & Blaineau C. Biologie moléculaire de Leishmania. In « Les leishmanioses » Dedet JP ed. EllipSES. 249, (1999) , p59-62.
- Reiter, P. Climate Change and Mosquito-Borne Disease. *Environmental Health Perspectives*. (2001). 109, S141-S161.
- Reithinger, R., Dujardin, J-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., et Brooker, S. « Cutaneous leishmaniasis ». The Lancent Infectious Diseases, V. 7, issue 9, (September 2007), p581- 596.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Peters, N.C., Debrabant, A., Sacks, D.L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. PLoS Pathog 8, (2012), e1002536.
- Rioux, J. A. et De la roque, S. Climat, leishmanioses et trypanomosomes. *In* : Rodhain, F (Ed), Changement Climatique, maladies infectieuses et allergiques. Annales de l’Institut Pasteur, Changement climatique, maladies infectieuses et allergiques, (2003). 41-62.
- Rispail, P., Léger, N. Numerical Taxonomy of Old World *Phlebotominae* (*Diptera, Psychodidae*).1. Considerations of Morphological Characters in the Genus *Phlebotomus* Rondani&Berte 1840. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*, 93, (1998a), p773-785.
- Rispail, P., Léger, N. Numerical Taxonomy of Old World *Phlebotominae* (*Diptera, Psychodidae*). Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters Rondani & Berte 1840. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz., Rio de Janeiro*. 93, (1998b), p787-793.

- Ritter, U., Meissner, A., Scheidig, C., Korner, H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. Eur J Immunol 34, (2004), p1542-1550.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Francino, O., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Alberola, J. Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold standard". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, (2010), 82:251-6.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F., Alberola, J. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs Veterinary Parasitology, (2013), 191:363-6.
- Rogers, D. J. A. general model for African Trypanosomiasi *Parasitology*, 10, (1988). 193-212.
- Rosenthal, E., Marty, P., le Fichoux, Y., Cassuto, J.P. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis associated with HIV infection: a retrospective study of 91 French cases. Ann Trop Med Parasitol 94, (2000), p37-42.
- Rosypal, A., Troy, G., Duncan, R., Zajac, A., Lindsay, D. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of Leishmania infantum infantum. J. Vet. Inter. Med. 19, (2005), p802–809.
- Sacks, D.L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of Leishmania promastigotes. Infect Agents Dis 1, (1992), p200-206.
- Sahibi, H., Natami, A., Moufaid, A., Lasri, S. & Rhalem, A. "Clinical and seroepidemiological study of Leishmaniasis in Northern Morocco". Actes Inst. Agron. Vet. Vol. 21 n°4, (2001), p227-232
- Samake, S. Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (Cercle de Baroueli). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Mali, (2006), p120.
- Saridomichelakis, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. Veterinary Dermatology, 20, (2009), p471–489.
- Sarrouy, et *al*. A partir de la thèse du Mouloua, (1946).
- Sassot, O. La leishmaniose n'est plus cantonnée au sud ! *article* sur *www.portailveterinaire.com*, (2008).
- Scapini, P., Lapinet-Vera, JA., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. Immunol Rev 177, (2000), p195-203.
- Sergent, E., Sergent, E. "Kala-azar. Existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger", Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 3, (1910), p510–511.
- Shaw, S.E., Birtles, R.J., Day M.J., "Arthropod-transmitted infectious diseases of cats". J. Feline Med. Surg., 3 (2001), p193–209.
- Silva, E., Van der Meide, W., Schoone, G., Gontijo, C., Schallig, H., Brazil, R. "Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays". Vet. Res. Commun. 30, (2006), p637–643.
- Silva, F.L., Oliera, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L. « Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis ». Vet. Parasitol., 160, (2009), p55-59.
- Silva, O. A. Silva, P. B. Silva, O. V. Braga, G. M. Albuquerque-Júnior, A. « canine dans le Nord-est du Brésil : aspects épidémiologiques ». *Bull Soc Pathol Exot*,V. 100, n°1, (2007), p49-50.
- Simões-Mattos, L., Bevilaqua, C.M.L., Mattos, M.R.F., Pompeu. M.M.L., "Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?" RPCV, 99 (2004), p79–87.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua, C.M.L., Prata-Júnior, R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coêlho, Z.C.B., Coêlho, I.C.B., Barral, A., Pompeu, M.M.L., "The susceptibility of domestic cats

(*Feliscatus*) to experimental infection with *Leishmaniabraziliensis*". Veterinary Parasitology. Volume 127, Issues 3–4, (February 2005), p199–208.

- Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetplastidprotozoa : genomic organisation, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol 41, (1987), p363-382.
- Soares, M.R.A., de Mendonça, I.L., do Bonfim, J.M., Rodrigues, J.A., Werneck, G.L., and Costa, C.H.N. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. Acta Trop. 117, (2011), 6–9.
- Solano-Gallego, L. "Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology". *J. Clin. Microbiol.* 39, (2001), p560–563.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva G., Baneth, G. "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis". Vet Parasitology 165, (2009). p1-18.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. Vet. Parasitol. 90, (2000), p37–45.
- Sousaa, S., Patricia, Lopesc, A., Cardosoa, L., Silvestre A, R., Schallig, H., Reede, S.G., Anabela Cordeiro da Silva, A., "Seroepidemiological survey of Leishmania infantum infection in dogs from northeastern Portugal". Acta Tropica 120, (2011), p82– 87.
- Spath, GF., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. Proc Natl Acad Sci U S A 100, (2003), p9536-9541.
- Squier, M.K., Sehnert, A.J., Cohen, J.J. Apoptosis in leukocytes. J Leukoc Biol 57, (1995), p2-10.
- Stuart, K. RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. Trends BiochemSci 16, (1991), p68-72.
- Tahir, D., Benachour-Oumouna, K. Harrat, Z., Epidémiologie de la leishmaniose chez le chien et l'homme à Bejaia. Mémoire du magistère en sciences vétérinaires ; Institut des Sciences Vétérinaires; Univ de Blida I, (2014).
- Teixeira, CR., Teixeira, M.J., Gomes, R.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., Raffaele-Netto I., Silva, JS., Guglielmotti, A., Miranda, J.C., Barral, A., Brodskyn, C., Barral-Netto, M. Saliva from Lutzomyia longipalpis induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. J Immunol 175, (2005), p8346-8353.
- Thomas, B.N., Buxbaum, L.U. FcgammaRIII mediates immunoglobulin G-induced interleukin- 10 and is required for chronic Leishmania mexicana lesions. Infect Immun 76, (2008), p623-631.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J.J., Shaw, A., Moutou, F., Louzã, A. "Chapitre I: Notions de base en épidémiologie in Epidémiologie Appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures". (2001), p686.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J.J., Shaw, A., Moutou, F. "Chapitre I: Notions de base en épidémiologie in Epidémiologie Appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures" ; troisième édition, (2010).
- Van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W., Laskay, T. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. Infect Immun 70, (2002), p4177-4184.
- Vickerman, K. P. T. Comparative cell biology of the Kinetoplastid flagellates. Biology of the kinetoplastida. Ed. WCA Lumsden? DA Evans. New York: Academic Press 1, (1976), p35-130.
- Volf, P., Volfova, V.''Establishment and maintenance of sandfiles colonies'', J Vect Ecol, (2011), 36.supp 1

- Volpini, A.C., Passos, V.M., Oliveira, G.C. & Romanha, A.J. "PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L*. (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis". *Acta Trop*., 90, (2004), p31-37.
- Wery, M. Protozoologie médicale. De Boeck, (1995).
- Wittmann, E. J. & Mellor, P. S. & Baylis, M. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (*Diptera: Ceratopogonidae*) in Europe. *Rev sci tech Off int Epiz*, 20, (2001). 731-740.
- Wittmann, E. J., Mellor, P. S. & Baylis, M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med Vet Entomol*, 16, (2002). 147-156.
- Zait, H., et Hamrioui, B. « Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiques au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007 » revue francophone des laboratoires, N°412 (Mai 2009).
- Zaragoza, C., Barrera, R., Centeno, F., Tapia, J., Duran, E., Gonzalez, M., Mané, M., "SDS-Page and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis". Vet. Res. 34, (2003), p137 151.
- Zerpa, O., « Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island » (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. R. Soc. Trop. Med.Hyg.* 94, (2000), p484–487.
- Zhioua, E., Kaabi, I. et Chelbi, ''Entomological investigations following the spread of visceral leishmaniasis'' in Tunisia.Journal of Vector Ecology, Vol. 32, N°2, (2007) 1-4.

Appendice I

Fiche des renseignements

- **Date :** **N° du chien :** **Test Witness *Leishmania* :**
- Commune : Village :
- Nom et Prénom du propriétaire :
- Mobile :
- Nom du vétérinaire :
- Identification du chien :

Race	Sexe	Age	Origine	Activité

- Symptômes :

Symptômes	Fréquence			
	Absent 0	Rare +	Importante ++	Très importante +++
Au niveau de l'état général				
Amaigrissement				
Anorexie				
Abattement				
Anémie				
Hyperthermie				
Au niveau dermatologique				
Alopécie localisée				
Squamosis				

Appendice I

Hyperkératose				
Onychogriffose				
Ulcérations				
Au niveau ophtalmologique				
Dépilation en lunettes				
Conjonctivite muco-purulente				
Au niveau buccal				
Erosions buccales				
Au niveau squelettique				
Arthrites, synovites				
Douleurs diffuses du train postérieur				
Divers				
Adénopathie				
Splénomégalie				
Epistaxis				
Troubles rénaux				
Diarrhée chronique				
Autre (bien préciser)				

-Portage de collier antiparasitaire :

-Présence des ectoparasites :

Appendice II

Matériel des prélèvements :

Prélèvements :