



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4968](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4968)

To cite this version :

BRIFFOD, Cécile. *Revue actuelle en matière de leishmaniose canine* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 101 f.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

REVUE ACTUELLE EN MATIÈRE DE LEISHMANIOSE CANINE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BRIFFOD Cécile

Née, le 16 décembre 1986 à EPINAL (88)

Directeur de thèse : M. Philippe JACQUIET

JURY

PRESIDENT :

M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Philippe JACQUIET

M. Michel FRANÇ

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Alexis Valentin

Professeur des Universités à la Faculté de pharmacie de Toulouse UPS
Praticien hospitalier
Zoologie - Parasitologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,
Hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Philippe Jacquet

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Parasitologie et Maladies parasitaires

Pour avoir encadré cette thèse, pour ses conseils, sa disponibilité ainsi que sa
gentillesse.

A Monsieur le Professeur Michel Franc

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires

Pour avoir accepté de participer à mon jury,
Sincères remerciements.

A mon père, indispensable, sans qui je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui.
Merci pour ton amour, ton soutien dans tous mes choix et ta patience dans les moments difficiles, surtout les derniers.

A ma Kiki, pour toute l'affection qu'elle me donne.
Merci de me donner l'élan pour faire les choses.

A mes deux frères, Fabien et Sylvain que j'adore.

A toute ma famille,

A ma petite Noémie, pour ta présence depuis le début de notre rencontre, pour tous les mots gentils lors des périodes difficiles et ta présence irremplaçable.

A Perle, Amandine et Magali, mes petites pépettes, pour votre amitié et les très bons moments passés ensemble.

A tous mes amis.

SOMMAIRE

Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Introduction	10
I-Une épidémiologie complexe	11
a. Un parasite bien connu depuis longtemps.....	11
1- Généralités et Taxonomie	11
2- Cycle de vie des leishmanies.....	13
b. Epidémiologie.....	15
1- Importance et distribution de la maladie	15
2- Concepts épidémiologiques	17
3- Prévalence de l'infection versus prévalence de la maladie	17
c. Un ou plusieurs modes de transmission	19
1- Une transmission vectorielle bien confirmée.....	19
i. Généralités et taxonomie des phlébotomes	19
ii. Aspects biologiques des vecteurs de <i>Leishmania</i> :	20
iii. Rôle du vecteur dans le cycle parasitaire	21
2- D'autres modes de transmission suspectés.....	23
II-Immunologie	25
a. Généralités	25
b. Importance de la réponse immunitaire.....	26
c. Quel est le rôle du fond génétique de l'hôte ?	27
d. Rôle clé des macrophages et importance relative des autres cellules	28
e. L'immunité à médiation cellulaire est protectrice au cours de l'infection	30
f. Le rôle de l'immunité humorale	31
g. Quelles sont les cibles des anticorps ?.....	32
h. Quel profil de cytokines ?.....	33
i. Rôle de la virulence du parasite.....	34
j. Rôle des infections intercurrentes.....	35
III-Pathogenèse	37
a. Dans les nœuds lymphatiques.....	38
b. Dans la peau	38
c. Dans la moelle osseuse	39
d. Dans la rate	39
e. Atteinte hépatique	40
f. Atteinte rénale	40
g. Atteinte oculaire	40
h. Dans les muscles.....	41

i. Autres	41
j. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents à certains signes cliniques ou para-cliniques ..	42
IV- Un polymorphisme clinique bien connu	44
1- Signes généraux	44
2- Signes cutanés	46
i. Manifestations cliniques	46
ii. Histologie	47
3- Atteinte rénale	47
4- Atteinte oculaire	48
i. Signes cliniques	48
ii. Histologie	48
5- Atteinte des nœuds lymphatiques	48
6- Formes atypiques	49
7- Anomalies para-cliniques	49
V- La leishmaniose canine : un diagnostic toujours délicat	50
a. Considérations générales	50
i. Signalement et anamnèse	50
ii. Examen physique	51
iii. Examens complémentaires	51
b. Diagnostic étiologique	52
1- Méthodes directes	52
i. Cytologie	53
ii. Histologie	54
iii. Immuno-histochimie	55
iv. Culture du parasite	56
v. PCR : Polymerase Chain Reaction	57
1- Considérations générales	57
2- Plusieurs techniques PCR disponibles	58
vi. Xénodiagnostics (pour information)	59
vii. Isolement du parasite après inoculation à des animaux de laboratoire	60
2. Méthodes indirectes	60
i. Sérologie	60
1- Généralités	60
2- IFAT : Indirect immunofluorescent antibody test	61
3- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay	62
4- Test rapide d'immuno-chromatographie	64
5- CIE : Contre-immunoelectrophorèse	65
6- Test d'immuno-diffusion (IDA)	65

7- Direct agglutination test (DAT).....	65
8- Western Blot	66
9- Cytométrie de flux.....	66
ii. Evaluation de la réponse immunitaire cellulaire	67
1- Test Monténégro ou Test cutané à la leishmanine.....	68
2- Test de prolifération des lymphocytes	68
3- Effet cytopathique de l'interféron-gamma (INF-gamma) et biotest d'inhibition	68
c. Quelle est la démarche diagnostique à adopter ?	69
1. Si l'animal est symptomatique	69
2. Si l'animal est asymptomatique	70
d. Classification clinique des chiens	71
1. Stade A : les chiens exposés.....	71
2. Stade B : les chiens infectés.....	71
3. Stade C : les chiens malades (avec une leishmaniose clinique évidente	71
4. Stade D : les chiens sévèrement malades	72
VI- De très timides avancées en matière de traitement	73
a. Généralités	73
b. Aspects pharmacologiques et thérapeutiques des principaux traitements.....	74
1- Les composés antimoniaux	74
2- L'allopurinol.....	75
3- La combinaison d'antimoniate de méglumine et d'allopurinol	75
4- L'amisonisidine	76
5- L'amphotéricine B	76
6- La miltéfosine.....	77
7- La pentamidine	77
8- La combinaison de spiramycine et de métronidazole.....	78
9- La marbofloxacin	78
10- L'enrofloxacin.....	78
11- La dompéridone	79
c. Protocoles de traitement recommandés	79
d. Guide traitement en fonction du stade clinique.....	81
1- Stade A	81
2- Stade B	82
3- Stade C	82
4- Stade D.....	82
5- Stade E _a	82
6- Stade E _b	82
e. Conclusion.....	82
VII- Suivi et Pronostic	84
a. Pour les chiens malades	84

b. Suivi des porteurs sains	85
c. Encore des interrogations	86
VIII- Prévention	87
a. Mesures de contrôle des vecteurs de leishmanies	87
1- Traitement insecticide de l'environnement	88
i. Les sprays à effet résiduel	88
ii. Traitements topiques insecticides	88
A- Aspects pharmacologiques des insecticides pour application dermique chez les chiens	88
B- Les différentes formulations	89
a. Les colliers	89
b. Les formulations « spot-on »	90
c. Les formulations en spray	90
b. Enjeux pour la production d'un vaccin efficace contre <i>Leishmania</i>	91
Conclusion	94
Bibliographie	95
Sites internet	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie de Promastigote (laboratoire de parasitologie – ENVL).....	14
Figure 2 : Photographie d'Amastigote (laboratoire de parasitologie – ENVL).....	14
Figure 3 : Cycle biologique de <i>Leishmania</i> spp (Centers for Disease Control and Prevention-Leishmaniasis).....	15
Figure 4 : Cartographie du risque de leishmaniose canine dans le sud de la France (Chamaillé et al, 2010).....	16
Figure 5 : Représentation schématique de la distribution de la leishmaniose au sein d'un foyer endémique canin (Baneth et al, 2008).....	18
Figure 6 : Photographie de <i>Phlebotomus perniciosus</i> (issue du site diptera.info).....	20
Figure 7 : Photographie de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (issue du site diptera.info).....	20
Figure 8 : Illustration de l'interaction entre les deux types de réponse Th1 et Th2 (Baneth et al, 2008).....	27
Figure 9 : Evolution possible suite à l'infection par <i>L. infantum</i> (Saridomichelakis, 2009).....	37
Figure 10 : Photographies de diverses manifestations cliniques chez des chiens symptomatiques (Baneth et al, 2008).....	44
Figure 11 : Vue dorsale d'une patte avant gauche d'un chien atteint de leishmaniose présentant de l'onychogryphose, une dermatite exfoliative ainsi qu'une pyodermite profonde secondaire. (Koutinas et al, 2009).....	46
Figure 12 : Cytologie obtenue sur un chien atteint de leishmaniose cutanée. (Freeman, 2010).....	54
Figure 13 : Cytologie issue de l'aspiration d'un nœud lymphatique poplité d'un chien atteint de leishmaniose viscérale. (Moreira et al, 2010).....	55
Figure 14 : Algorithme utilisable dans le cadre du diagnostic de la leishmaniose. (Solano-Gallego et al, 2009).....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution géographique des espèces de Leishmania infectant les chiens et leurs vecteurs (Solano-Gallego et al, 2009).....	12
Tableau 2 : Signes cliniques potentiellement observables lors de l'examen physique de chiens leishmaniens. (Issu de Paltrinieri et al, 2010).....	45
Tableau 3 : Prévalence de certains signes cliniques lors de leishmaniose canine cliniquement déclarée. (Issu de Baneth et al, 2008).....	45
Tableau 4 : Sensibilité et spécificité de techniques ELISA utilisant des antigènes recombinés pour le diagnostic de leishmaniose viscérale canine. (Maia et Campino, 2008).....	63
Tableau 5 : Différents protocoles envisageables lors de leishmaniose canine (Issu de Solano-Gallego et al, 2009).....	79
Tableau 6 : Les différents stades cliniques utilisés pour le traitement des chiens atteints de leishmaniose. (Oliva et al, 2010).....	81

Introduction

La leishmaniose est une maladie infectieuse zoonotique majeure due au développement et à la multiplication, principalement dans les cellules du système des phagocytes mononuclés, d'un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Cette parasitose transmise par des Psychodidés du genre *Phlebotomus* (Bourdoiseau, 2000) affecte donc l'Homme et l'animal et plus particulièrement nos chiens domestiques considérés comme le réservoir principal pour l'Homme.

L'infection par *Leishmania infantum* a été décrite pour la première fois en 1908 par Nicolle et Comte en Tunisie. Depuis, les connaissances à propos de celle-ci sont en évolution constante aussi bien en termes de mécanismes physio-pathogéniques et immunologiques que de moyens thérapeutiques ou préventifs. De récentes recherches ont par ailleurs souligné de nouveaux concepts relatifs à l'épidémiologie. Ces derniers représentent une source d'informations nécessaires et devant être pris en compte pour la mise en œuvre des programmes de traitement et de contrôle.

D'autre part, la leishmaniose canine est une maladie dont le spectre de manifestations cliniques est très étendu et qui est mortelle chez le chien non traité. Même si la transmission à l'Homme reste rare, la leishmaniose canine est une zoonose majeure, et le rôle de réservoir du chien continue de poser des problèmes de gestion du risque en santé publique. Ces constats, associés aux enjeux thérapeutiques et préventifs, justifient l'intérêt continu et croissant à l'égard de cette protozoose.

De nouvelles techniques diagnostiques plus sensibles et spécifiques ont été développées récemment afin de permettre une meilleure appréciation de la prévalence de l'infection. Malheureusement, malgré les progrès réalisés ou envisagés, il n'existe pas encore de consensus en ce qui concerne la gestion de cette maladie.

Dans le travail qui suit, il sera surtout question de *Leishmania infantum* compte tenu de son implication majeure chez le chien. Ce travail a pour but de faire le point sur les connaissances acquises et sur les questions qui subsistent en matière de leishmaniose canine.

I- Une épidémiologie complexe :

a. Un parasite bien connu depuis longtemps :

En Europe du sud, la leishmaniose est le plus souvent causée par *Leishmania infantum*, un protozoaire transmis par la morsure des phlébotomes. Cette espèce a été identifiée très tôt au cours du XXème siècle dans les pays du bassin méditerranéen, puis au Moyen-Orient, en Asie Centrale et en Chine.

En Amérique, principalement au Brésil, l'agent impliqué est *L. chagasi*, aujourd'hui considérée comme synonyme de *L. infantum* puisqu'indissociable de cette dernière.

1- Généralités et Taxonomie :

Les leishmanies appartiennent à l'ordre des Kinetoplastida et à la famille des Trypanosomatidés. Elles sont caractérisées par la présence d'ADN mitochondrial regroupé en une masse unique appelée le kinétoplaste. Il s'agit d'un parasite intracellulaire obligatoire lorsqu'il est présent chez l'hôte vertébré.

Ces parasites sont adaptés à des environnements variés et hétérogènes en termes :

- de température : de 37°C chez l'hôte mammifère à température ambiante chez les phlébotomes et *in vitro*.
- de pH : neutre à très acide dans l'estomac des vecteurs ainsi que dans les phagolysosomes des macrophages.
- d'environnements nutritionnels et en oxygène
- d'attaque par le système immunitaire : complément, anticorps, lymphocytes T...etc.

Le genre *Leishmania* comprend une trentaine espèces d'importance médicale et vétérinaire. Selon la localisation de leur cycle de développement dans les intestins des phlébotomes, ils sont classés en deux sous-genres :

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

Les espèces de leishmanies qui infectent le chien et leur distribution dans le monde sont listées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Distribution géographique des espèces de *Leishmania* infectant les chiens et leurs vecteurs (Solano-Gallego et al, 2009)

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

Toutes les espèces n'ont pas la même importance médicale : seule une vingtaine d'entre elles sont considérées 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).

2- Cycle de vie des leishmanies :

Le cycle de vie des leishmanies est simple et implique deux stades sans véritable période de reproduction sexuée (à la différence des Apicomplexa). Toutefois, des échanges de matériel génétique sont suspectés et pourraient se produire entre promastigotes dans l'intestin des phlébotomes. La leishmanie est un parasite dixène, dont le cycle nécessite deux hôtes, un phlébotome, le vecteur biologique, qui abrite dans son tractus digestif la forme allongée, flagellée, mobile et extracellulaire du parasite encore appelée promastigote (voir figure 1), et un mammifère, qui héberge la forme ovoïde non mobile et intracellulaire du protozoaire ou amastigote (voir figure 2).

Le vecteur inocule la forme finale ou infectante du promastigote, le promastigote métacyclique, au niveau du derme de l'hôte. Seules les femelles hématophages sont capables de transmettre le parasite pendant un repas de sang.

Peu de temps après, le parasite est phagocyté par les macrophages. Il se forme alors un phagolysosome, et le macrophage tente d'éliminer le protozoaire à l'aide de divers mécanismes impliquant notamment l'oxyde nitrique ou la libération d'hydrolases lysosomiales. Les leishmanies échappent à ces mécanismes non spécifiques, survivent et se multiplient à l'intérieur du macrophage (Alvar et al, 2004).

C'est dans le macrophage que se produit la transformation du promastigote en amastigote, environ douze à vingt quatre heures après l'inoculation. Les parasites qui se multiplient finissent par détruire les macrophages, relâchant ainsi les amastigotes qui vont pouvoir infecter les autres cellules. Ce stade de l'infection est chronique et peut durer des mois à des années voire même toute la vie de l'individu sans signes cliniques notables, ceci en fonction de la sensibilité de l'hôte et de son statut immunitaire. La progression de l'infection dépend donc de l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte. Les macrophages infectés peuvent rester localisés dans la peau ou bien se disséminer à d'autres organes.



Figure 1 : Photographie de Promastigote
(Laboratoire de parasitologie – ENVL)

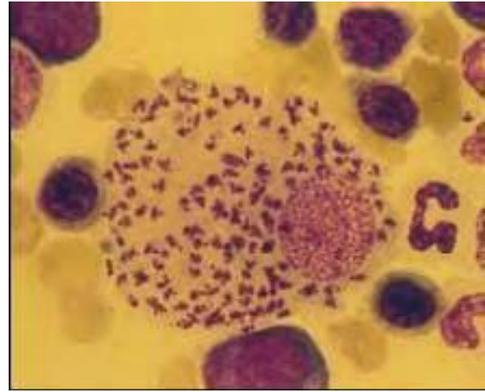


Figure 2 : Photographie d'Amastigote
(Laboratoire de parasitologie – ENVL)

La possibilité de transmission de l'infection d'un hôte infecté à un nouvel hôte de la même espèce ou d'une espèce différente est fonction de l'existence de vecteurs phlébotomes. Ces derniers pénètrent la peau de l'hôte sur deux à trois millimètres, déchirent le derme avec leurs pièces buccales pour créer un lac sanguin (télémphagie). Les amastigotes peuvent alors être prélevés par les insectes, la transformation d'amastigote en promastigote commence dès les premières heures après l'ingestion et est complète en vingt quatre à quarante huit heures (Sharma et Singh, 2008) Les promastigotes se multiplient ensuite par division binaire. Après la digestion du repas sanguin, le parasite migre à rebours et la forme promastigote devient mature ou métacyclique infectieuse et s'accumule dans les intestins moyen et proximal. Cette forme ne possède plus de capacité de réplication. Le cycle du parasite peut ainsi être résumé par la figure 3.

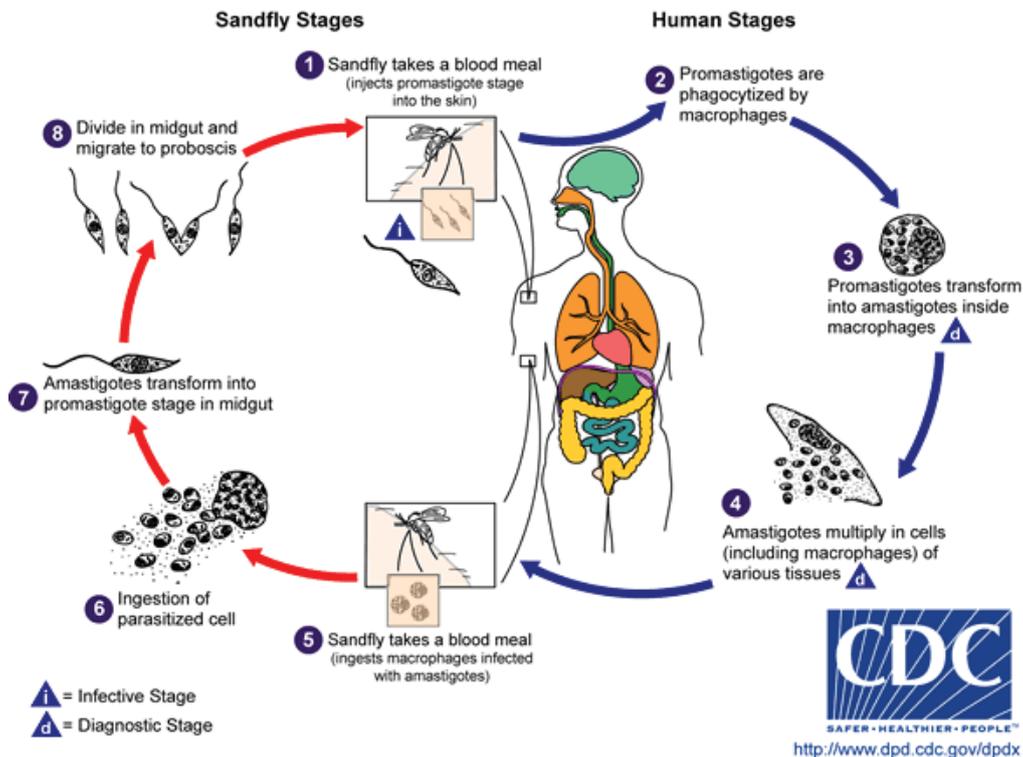


Figure 3 : Cycle biologique de *Leishmania* spp (Centers for Disease Control and Prevention- Leishmaniasis)

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.

b. Epidémiologie :

1- Importance et distribution de la maladie :

Compte tenu de la diversité des vecteurs, ainsi que de la complexité et de la variabilité de son agent, la leishmaniose a une écologie et une épidémiologie complexe.

L'infection de l'homme par la leishmaniose représente la troisième maladie vectorielle après la malaria et les filarioses lymphatiques. Elle représente la deuxième cause de mortalité à cause d'un parasite (après la malaria).

Elle est endémique dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales de l'Ancien comme du Nouveau Monde. La leishmaniose est endémique dans quatre-vingt-huit pays, avec plus de trois cent cinquante millions de personnes à risques et douze millions de personnes infectées. L'incidence est estimée à deux millions de nouveaux cas par an. Parmi ces quatre vingt huit pays, vingt deux appartiennent au « Nouveau monde » et soixante six à « l'Ancien monde » avec une estimation de un

million et demi de cas de la forme cutanée et cinq cent mille cas de leishmaniose viscérale. Malgré la distribution géographique étendue, la leishmaniose humaine est souvent très localisée dans une zone endémique conduisant à des zones sensibles de transmission. Il s'agit d'une infection majeure affectant plus particulièrement les populations vivant dans des conditions précaires en milieu rural ou suburbain.

L'infection par *Leishmania infantum* chez le chien est endémique dans cinquante pays à travers l'Europe, l'Afrique, l'Asie et l'Amérique. Lors des dix dernières années, plusieurs constats ont été faits en matière d'épidémiologie de la leishmaniose canine, à savoir une augmentation de l'incidence de l'infection en région endémique, l'expansion des foyers vers le nord en Europe y compris dans les régions jusque là non endémiques et l'émergence de la maladie en Amérique du nord (Freeman, 2010 et Petersen, 2009). En effet, des estimations révèlent que deux millions et demi de chiens sont infectés dans le sud ouest de l'Europe et que la maladie a tendance à se propager vers le nord notamment au pied des Alpes et des Pyrénées (Dereure et al, 2009).

En ce qui concerne la France, une étude rétrospective menée sur la période entre 1965 et 2007 a permis d'établir une cartographie du risque leishmanien chez le chien dans le sud de la France (voir figure 4). La même tendance est donc observée à savoir l'extension au nord et surtout à l'ouest de nouveaux foyers par rapport aux foyers originaux de la maladie dans le sud-est (Chamaillé et al, 2010).

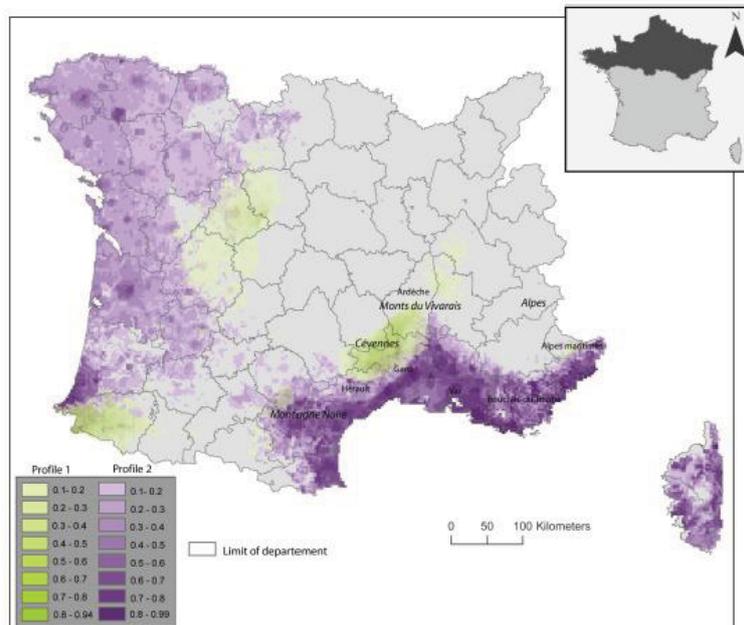


Figure 4 : Cartographie du risque de leishmaniose canine dans le sud de la France.

En vert : foyer associé à *P. ariasi* et en violet : foyer associé à *P. perniciosus*

(Chamaillé et al, 2010)

Le nombre de chiens infectés en Amérique du sud est également estimé en millions et le taux d'infection serait très élevé au Venezuela ainsi qu'au Brésil, où la forte prévalence de l'infection canine est associée à un risque d'infection particulièrement élevé pour l'homme (Baneth et al, 2008)

L'un des enjeux actuels en termes d'épidémiologie est le diagnostic de la maladie en zone non endémique. Le nombre croissant de chiens ayant voyagé en Europe du sud ou étant importé de régions endémiques soulève des implications graves vis-à-vis de l'introduction de la maladie dans ces zones indemnes à l'origine.

2- Concepts épidémiologiques :

Il existe deux concepts épidémiologiques majeurs en matière de leishmaniose canine.

Le premier concept, connu et établi grâce à des techniques de diagnostic moléculaire, est que l'infection des chiens dans les zones endémiques est très fréquente, mais que tous les chiens infectés ne développent pas la maladie. Ce principe repose sur l'existence d'un large spectre de réponses immunitaires possibles chez le chien (décrit par la suite) (Baneth et al, 2008). Deux grands modèles de progression de l'infection, sont bien documentés à ce jour :

- Certains chiens vont développer des signes cliniques sévères de la maladie suite à l'infection du fait de leur incapacité à mettre en place une réponse à médiation cellulaire efficace associée à une réponse à médiation humorale forte mais inefficace.
- L'autre catégorie est constituée par les chiens restant infectés pendant une longue période, des années voire toute leur vie, sans déclarer de signes cliniques ou de lésions consécutives à leur infection. Cependant il est important de se rappeler que tout changement de leur statut de santé (comme par exemple l'administration d'un traitement immunosuppresseur pour une autre affection ou une autre maladie immunosuppressive) peut conduire à l'activation de cette infection latente et au développement de signes cliniques.

Le second concept établit que lors de conditions optimales pour la transmission de la maladie, c'est-à-dire lors de densité vectorielle élevée, la propagation de l'infection est très rapide et étendue parmi la population canine.

Ainsi, une enquête menée dans la région de Naples en Italie (Oliva et al, 2006) a montré que 97.3% d'une cohorte de chiens dits « naïfs » au début de l'étude présentaient un résultat positif à un examen en PCR nichée sur prélèvement de moelle osseuse à la suite de trois saisons de transmission consécutives. De plus, 75.7% des chiens étaient séropositifs.

3- Prévalence de l'infection versus prévalence de la maladie :

Le point essentiel concernant la leishmaniose canine est qu'infection ne signifie pas maladie clinique. Le nombre d'infections sub-cliniques est très élevé et certains chiens peuvent présenter une atteinte de plusieurs organes sans manifestations

cliniques évidentes. De nouvelles classifications ont donc été mises en place afin d'améliorer la gestion des animaux atteints (décrites dans une autre partie). On définit les animaux atteints de leishmaniose clinique comme ceux qui présentent des signes cliniques et/ou des anomalies para-cliniques et dont l'infection par *Leishmania infantum* a été prouvée.

Les animaux qui présentent une infection asymptomatique, qu'on qualifie encore de cliniquement sains, sont ceux qui ne présentent ni signes cliniques à l'examen physique, ni anomalies des paramètres hématologiques, biochimiques ou urinaires usuels mais dont on a prouvé l'infection par *Leishmania infantum*.

La majorité des chiens infectés par les leishmanies ne vont pas développer de signes cliniques ou d'anomalies para-cliniques. La fréquence de la maladie est souvent inférieure à 10% de la totalité des chiens infectés dans les zones endémiques. Des études reposant sur des tests PCR ont montré que la prévalence de l'infection en région endémique était considérablement plus élevée, de l'ordre de 63% à 80% de la population par rapport à la prévalence de la maladie, de l'ordre de 1% à 29% ou la séroprévalence, variant de 5% à 30% (Solano-Gallego et al, 2009). Ces propos peuvent être illustrés par la figure 5 qui présente de manière schématique la distribution de la leishmaniose parmi une population de chiens dans un foyer endémique. Le haut de la pyramide correspond à un très petit nombre de chiens présentant des signes cliniques. Les chiens séropositifs, sans signes cliniques apparents représentent le deuxième étage de la pyramide. Le troisième étage, plus volumineux correspond aux chiens séronégatifs mais dont le résultat PCR est positif et le dernier représente les chiens séronégatifs et non porteurs du parasite.

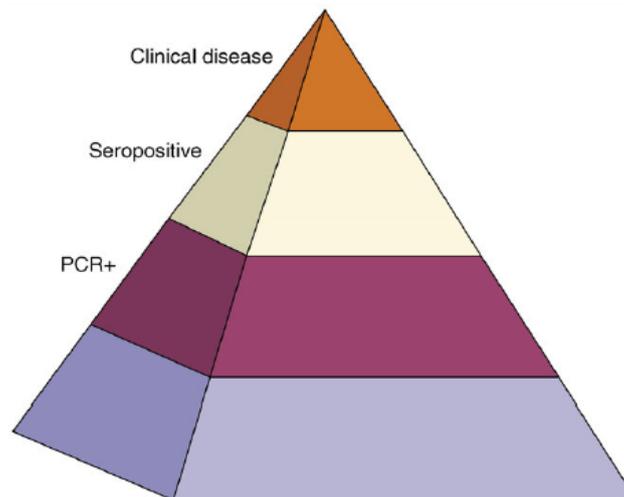


Figure 5 : Représentation schématique de la distribution de la leishmaniose au sein d'un foyer endémique canin (Baneth et al, 2008)

Les études récentes ont donc apporté des éléments nouveaux concernant la prévalence et la propagation de l'infection. Ces changements épidémiologiques présentent des conséquences concernant la gestion de la maladie aussi bien canine qu'humaine, ainsi que de ses vecteurs.

c. Un ou plusieurs modes de transmission ?

Il est largement acquis aujourd'hui que le cycle naturel de vie des leishmanies implique un vecteur biologique, le phlébotome, au sein duquel les promastigotes se multiplient à partir de la forme amastigote prélevée lors d'un repas sanguin. En effet, le parasite est transmis entre chiens ainsi qu'entre chiens et êtres humains par la morsure de femelles phlébotomes hématophages infectées.

D'autres modes de transmission qualifiés d'alternatifs sont de plus en plus suspectés mais ils seraient néanmoins de moindre importance épidémiologique, au moins dans les zones où les vecteurs de la maladie sont présents.

1- Une transmission vectorielle bien confirmée :

i. Généralités et taxonomie des phlébotomes :

Les seuls vecteurs de leishmaniose établis avec certitude sont les phlébotomes. Ils appartiennent à la Classe des Insectes, l'Ordre des Diptères et la Famille des Psychodidés. Il existe plus d'une quarantaine d'espèces du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et environ une trentaine du genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde. Ces deux genres sont très proches morphologiquement l'un de l'autre. Parmi les espèces de phlébotomes, seules quelques unes sont de véritables vecteurs de la maladie. En effet, environ quinze espèces du genre *Phlebotomus* et *Lutzomyia* sont considérés comme vecteurs prouvés ou potentiels de la maladie. En l'absence de ces vecteurs, les foyers importants et stables de leishmaniose n'existeraient probablement pas.

Dans le bassin méditerranéen, région endémique, les vecteurs principaux de *Leishmania infantum* appartiennent au sous-genre *Larroussius*. Il s'agit des espèces *Phlebotomus perniciosus* (voir figure 6), *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus* et *Phlebotomus tobbi* (Amora et al, 2009 et Paltrinieri et al, 2010). Ils sont caractérisés par une activité crépusculaire et/ou nocturne qui s'étend de la fin du printemps à la fin de l'automne. Le principal vecteur dans le Nouveau Monde est *Lutzomyia longipalpis* (voir figure 7), qui lui est actif toute l'année. Détecté dans les états du nord-est, *Lutzomyia shannoni* est le vecteur suspecté aux Etats-Unis.



Figure 6 : Photographie de *Phlebotomus perniciosus* (Issue du site diptera.info)



Figure 7 : Photographie de *Lutzomyia longipalpis* (Issue du site diptera.info)

ii. Aspects biologiques des vecteurs de *Leishmania* :

Les phlébotomes sont présents dans les pays tropicaux où ils sont actifs une grande partie de l'année voire toute l'année, et dans les zones tempérées où ils ne sont actifs que pendant les mois chauds. L'intervalle de température pour lequel les adultes sont actifs varie de 15 à 28 °C, et est presque toujours associé à une humidité relative élevée ainsi qu'à l'absence de vent.

Voir le tableau 1 pour la distribution géographique des différents vecteurs.

Les niches écologiques des phlébotomes sont variables, allant de forêts tropicales humides au désert, de villes situées au niveau de la mer à des villages de hautes montagnes. En règle générale, ceux de l'Ancien Monde vivent dans le désert ou dans des écosystèmes semi-arides et ceux du Nouveau Monde plutôt dans les forêts ou à proximité de celles-ci.

Certaines des espèces de l'Ancien Monde se reproduisent en situation péri-domestique et entrent dans les habitations humaines (comme *P. perniciosus*) alors que la transmission de la maladie dans le Nouveau Monde est associée aux conditions de vie ou au travail à proximité des forêts (Sharma et Singh, 2008).

Malgré cette diversité, tous les phlébotomes partagent certaines caractéristiques.

Il s'agit de petits insectes, d'environ deux à trois millimètres de longueur, dont le corps ainsi que les ailes sont très poilus. Leurs ailes sont portées en V lorsque l'insecte est posé sur un support ou un hôte. Leur vol est très silencieux et ce sont de mauvais volants. En effet, leur vol est lent et ils peuvent voler sur des distances de deux cent mètres à deux kilomètres et demi, ce qui explique qu'ils ne s'écartent guère de leur zone d'émergence. De plus ils sont incapables de voler en présence de vent. Ils peuvent entrer dans les maisons la nuit du fait de leur phototropisme.

Les femelles adultes prennent un repas à chaque cycle gonotrophique et jusqu'à cinq repas sanguins pendant leur deux à six semaines de vie à l'état adulte.

Ils se reposent pendant le jour dans des micro-habitats et peuvent s'insérer dans des espaces confinés afin de s'abriter des conditions climatiques défavorables (fort vent...)

Ils se reproduisent dans les déchets organiques tels que les fèces, le fumier, les terriers de rongeurs, les feuilles mortes, ou encore les fissures dans les murs, c'est-à-dire dans des endroits où la température et l'humidité sont élevées. La femelle peut déposer environ quinze à quatre-vingt œufs minuscules, dans les terriers, dans l'écorce de certains arbres, dans les ruines, dans les abris de certains animaux c'est-à-dire finalement dans n'importe quel environnement favorable au développement de la larve.

Le stade larvaire des phlébotomes est présent dans les sols alluviaux ou alcalins ainsi que dans les recoins sombres et humides comme par exemple les crevasses dans les murs. Les larves ne peuvent pas survivre dans un environnement sec et se nourrissent de déchets organiques. Par la suite elles se transforment en puce.

Les phlébotomes peuvent effectuer des repas sanguins sur une grande gamme d'hôtes et devraient être considérés comme des insectes opportunistes pour l'homme plutôt que des insectes anthropophiles.

Du fait de la grande variété d'hôte, de leur petite taille et de leur vol silencieux, les personnes des régions endémiques de leishmaniose doivent être conscientes de la présence des insectes ou au moins de leur rôle dans l'épidémiologie de la maladie. Les sites terrestres de production larvaire sont généralement difficiles à identifier c'est pourquoi les mesures de contrôle dirigées contre les stades immatures sont difficiles voire impossibles à mettre en œuvre (Maroli et al, 2010).

iii. Rôle du vecteur dans le cycle parasitaire :

Après s'être posés sur un chien, les phlébotomes migrent dans un premier temps vers leurs sites d'alimentation préférentiels que sont le museau ou le chanfrein, les paupières ou encore le pavillon auriculaire. Par la suite, leurs pièces buccales pénètrent l'épiderme puis dans le derme et forment un lac sanguin. Dans ce cas, si la femelle a été infectée quatre à vingt-cinq jours avant, elle est capable de régurgiter des promastigotes métacycliques provenant de l'intestin antérieur et de les injecter dans le derme superficiel de l'hôte. Ce dernier stade de développement des leishmanies, à savoir les promastigotes métacycliques ne peut être atteint que dans le segment antérieur de l'intestin de ces insectes. Et il existe une étroite association entre l'espèce de leishmanie et le vecteur, du fait de l'existence d'activités enzymatiques spécifiques et de ligands présents dans l'intestin. Par conséquent, la transmission naturelle a lieu seulement dans les régions où les espèces vectorielles compétentes sont présentes.

En région endémique et dans des conditions environnementales favorables, un chien peut recevoir plus de cent morsures par heure pendant la nuit et parallèlement, la proportion de phlébotomes infectés peut être aussi élevée que 10.5%, même si en moyenne elle est d'environ 1% (Saridomichelakis, 2009). Sur la base de ces estimations, il a été proposé qu'un chien peut recevoir une morsure infectieuse par heure et ceci nuit après nuit, pendant quelques mois voire même quelques années.

Le nombre de promastigotes métacycliques inoculés dans le derme de l'hôte lors de chaque morsure infectieuse varie de cent à mille mais la quantité minimale nécessaire pour initier une infection reste inconnue (Moreno et Alvar, 2002). Malgré

tout, il est évident que les chiens vivant en zones endémiques, surtout ceux passant la nuit dehors, sont continuellement exposés au parasite. L'intensité de l'exposition est parfois tellement élevée que la prévalence des infections généralisées et asymptomatiques ne diffèrent pas entre les jeunes chiens ayant vécu une seule période d'activité des phlébotomes et les chiens plus âgés.

Il existe quelques preuves indirectes de la contribution de l'exposition répétée non seulement en termes d'établissement de l'infection mais aussi de développement de la séropositivité ou de la leishmaniose clinique, expliquant de manière partielle la longue période d'incubation de la maladie. Il s'agit :

- de résultats d'études *in vitro* soulignant la réduction marquée de la prolifération des cellules T et de l'expression des molécules B7 (molécule de co-stimulation des lymphocytes T) à la surface des macrophages lors de charge parasitaire plus élevée.
- De l'influence majeure de la dose d'inoculation sur la déclaration de la maladie en conditions expérimentales, aussi bien chez les chiens que les animaux de laboratoires.
- Des études épidémiologiques montrant un pic de l'incidence de la séropositivité et de la maladie clinique à l'âge de deux à cinq ans lorsque les chiens ont vécu plusieurs périodes de transmission.
- De la diminution de l'incidence de la séroconversion et de la leishmaniose clinique avec l'utilisation de répulsifs qui réduisent mais n'éliminent pas les morsures par les phlébotomes.

Par ailleurs et indépendamment de la quantité de promastigotes, la salive des phlébotomes est aussi injectée dans le derme de l'hôte et ses composants possèdent des propriétés immuno-modulatoires et pharmacologiques puissantes (Paranhos et al, 2003). Certes, la salive des vecteurs favorise l'infection des animaux de laboratoire, cependant, cela n'a pas été confirmé en ce qui concerne le chien, du moins pour *L. longipalpis*. Par ailleurs, des recherches suggèrent que des extraits de glandes salivaires pourraient raccourcir la période nécessaire pour l'installation de la réponse immunitaire cellulaire ainsi que la période d'incubation de la maladie clinique après inoculation intradermique expérimentale. Il est important d'analyser ces résultats avec beaucoup de précautions car les extraits de glande utilisés lors des infections expérimentales auraient plus d'effets que lors de transmission naturelle et la composition de la salive n'est pas la même. Par conséquent l'activité biologique de cette dernière différerait selon l'espèce de phlébotomes voire même au sein de la même espèce. Enfin, la réponse immunitaire humorale développée par l'hôte contre la salive peut neutraliser ses effets immuno-modulateurs.

Il est important de noter que les chiens symptomatiques aussi bien qu'asymptomatiques représentent des sources d'infection pour les phlébotomes. Il existe une relation inversement proportionnelle entre le nombre de cellules T CD4+ chez les chiens naturellement infectés et leur infectiosité pour les phlébotomes (Soares et al, 2011) (voir la partie sur l'immunologie).

Enfin, aucune transmission trans-ovarienne n'a été démontrée à ce jour chez le phlébotome.

2- D'autres modes de transmission suspectés :

Un constat épidémiologique récent et relativement inquiétant est l'augmentation du nombre de cas de leishmaniose viscérale canine diagnostiqués dans des régions non endémiques où la transmission classique de l'infection ne peut avoir lieu.

D'une part, cette évolution est principalement attribuable à l'augmentation des voyages des chiens dans des zones à risque. Par exemple, une étude en Hollande a montré qu'environ 58 000 chiens sont emmenés chaque année en Europe du Sud, les exposants à un risque de contracter l'infection de l'ordre de 0.027% à 0.23%. L'importation et la relocalisation de chiens vivant initialement en zone endémique participe également à cette tendance comme c'est le cas en Allemagne ou au Royaume-Uni.

Le risque de transmission dite « autochtone » dans de telles régions en l'absence des vecteurs biologiques reste probablement faible même s'il existe toutefois des cas d'infections décrits en l'absence d'historique de voyage.

La question de nouveaux modes de transmission représente actuellement un important champ de recherche.

Aux Etats-Unis notamment, la leishmaniose viscérale canine était rarement rapportée avant les années 2000 mais un sondage sérologique récent a montré que l'infection chez des chiens tout venants était présente dans dix-huit états ainsi que dans deux provinces canadiennes. Par ailleurs, aucun cas autochtone de leishmaniose humaine n'a été rapporté à ce jour et la question de la transmission de l'infection en l'absence de vecteur aux Etats-Unis reste ouverte et représente un enjeu considérable compte tenu de ses implications en termes de santé publique.

Bien que les phlébotomes soient les seuls vecteurs biologiques adaptés aux leishmanies connus à ce jour, le rôle potentiel d'autres ectoparasites hématophages comme les tiques ou les puces dans la transmission de ce protozoaire a été proposé et est encore à l'état d'hypothèse (Dantas-Torres et al, 2010 et Ferreira et al, 2009), notamment en ce qui concerne *Rhipicephalus sanguineus* ou *Ctenocephalides felis*.

La transmission congénitale de la leishmaniose d'une mère à sa descendance a été rapportée chez l'homme et a été étudiée de manière expérimentale chez la souris. L'infection canine verticale a été démontrée également de manière expérimentale chez des chiots nés de femelle et mâle beagle infectés. La transmission serait trans-placentaire. Cependant, des études réalisées chez des chiens infectés naturellement ont donné lieu à des résultats contradictoires (Silva et al, 2009). Cette modalité de transmission serait très rare.

Par ailleurs, la transmission de l'infection par des produits sanguins infectés a été documentée (Freitas et al, 2006) et il s'agit d'enjeux majeurs dans les régions où des donneurs sanguins pourraient être porteurs asymptomatiques de l'infection.

La transmission directe de chiens à chiens a également été suggérée afin d'expliquer la propagation de la maladie dans les chenils de chiens courants aux Etats-Unis en l'absence objectivée de vecteurs et d'infection humaine. Il n'y a toutefois pas de preuve expérimentale à l'appui.

Enfin, récemment une transmission vénérienne a été mise en évidence (Silva et al, 2009).

Cependant, les transmissions indépendantes des vecteurs biologiques semblent avoir un rôle marginal en termes d'épidémiologie de la maladie. De plus, ces modalités de transmission doivent encore faire l'objet d'études mais elles représentent toutefois un enjeu majeur compte tenu de leur implication en termes de risque d'infection pour l'Homme.

La leishmaniose canine est une maladie dont l'enjeu en santé publique est considérable puisque les chiens représenteraient le réservoir péri-domestique le plus important à ce jour. Toutefois, il est nécessaire de garder à l'esprit que la présence d'un chien infecté dans un foyer ne semble pas augmenter sévèrement le risque d'infection pour l'entourage même si la transmission existe dans cette région. Par ailleurs, la stratégie qui consiste à éliminer les chiens séropositifs, comme cela a été le cas dans certains états du Brésil, afin de réduire l'infection humaine, s'est soldée par un échec (Nunes et al, 2010).

II- Immunologie :

a. Généralités :

Dans les régions endémiques, 5% à 10% des animaux sont malades et 90% à 95% sont cliniquement sains. Ces derniers peuvent être divisés en deux catégories (Solano-Gallego et al, 2009) :

- Ceux qui ne sont pas infectés, soit environ un tiers d'entre eux.
- Ceux qui sont infectés, soit deux tiers d'entre eux.

22% des chiens infectés sont susceptibles de développer des signes cliniques consécutifs à une réponse immunitaire à médiation cellulaire déprimée et une réponse humorale forte (Solano-Gallego et al, 2009).

Il est important de noter 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.

Les causes permettant à un chien de rester cliniquement sain bien qu'infecté ne sont pas établies de manière certaine à ce jour. La manière dont interviennent des facteurs tels que l'âge, le sexe, l'alimentation, la génétique de l'hôte, les co-infections ou les maladies intercurrentes, les conditions immunosuppressives, le profil de cytokines, la charge parasitaire lors de l'infection ou encore la virulence de la souche de leishmanie, les infections antérieures ou le mode de transmission dans les manifestations cliniques de l'infection reste à élucider.

Certaines races comme les Boxers, les Cocker Spaniel, les Rottweilers et les Bergers allemands semblent être plus sensibles au développement de la maladie alors que d'autres comme les « Ibiza hound » développent rarement des signes cliniques (Saridomichelakis, 2009 et Baneth et al, 2008).

L'âge semble être un facteur important, la prévalence de la maladie présente deux pics : le premier a lieu chez les jeunes chiens de moins de trois ans et le deuxième chez des chiens de plus de huit ans.

L'influence du genre est controversée dans la mesure où certaines études montrent une prédisposition chez les mâles alors que d'autres non (Miro et al, 2008 et Zivcinkjak et al, 2005).

Enfin, la voie de transmission ainsi que le stade de développement du parasite au cours de celle-ci jouerait également un rôle important dans la variabilité de présentation clinique de la maladie (Moreno et Alvar, 2002).

b. Importance de la réponse immunitaire :

Les leishmanies présentent trois caractéristiques générales :

- Leur cible : les macrophages qui voient leur activité antimicrobienne inhibée et deviennent le site de réplication du parasite.
- L'établissement de l'infection et l'évolution de la maladie sont dépendantes de la réponse immunitaire de l'hôte
- Une fois établie, l'infection est généralement persistante dans les tissus. Celle-ci a tendance à être localisée dans tous les tissus dans lesquels les cellules appartenant à la famille des monocytes/macrophages sont nombreuses.

Comme mentionné précédemment, l'infection chez le chien peut se manifester de manière complètement sub-clinique, ou sous la forme d'une maladie limitée ou non, voire même sévère. Chez le chien, les deux extrêmes de ce spectre clinique sont caractérisées sur le plan immunologique par :

- Une immunité protectrice dépendante des lymphocytes T CD4+, induite par la libération de cytokines telles que l'interféron-gamma (INF-gamma), l'interleukine-2 (IL-2) et le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF-alpha), responsables de l'activité anti-leishmanies des macrophages. Autrement dit, chez les porteurs sains, il existe une polarisation de la réponse immunitaire adaptative, et celle-ci est essentiellement de type Th1.
- Une réponse humorale marquée, non protectrice associée à une réponse à médiation cellulaire réduite avec des cytokines de type Th1 et Th2. Autrement dit, les chiens sévèrement malades sont caractérisés par une réponse exagérée de type Th2. (Solano-Gallego, 2009).

Entre ces deux extrêmes, il existe un large spectre de manifestations cliniques allant de la dermatite papuleuse légère, associée à une réponse à médiation cellulaire spécifique et une faible réponse humorale, à une maladie sévère caractérisée par une réponse humorale massive et une charge parasitaire importante avec des dommages rénaux du fait d'une glomérulonéphrite consécutive aux dépôts de complexes immuns.

La réponse immunitaire joue donc un rôle pivot dans le basculement du statut infecté et asymptomatique à infecté et malade, notamment par l'intervention des lymphocytes T helper CD4+ qui permettent l'orientation du système immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire de type Th1 ou vers une réponse humorale de type Th2.

Par ailleurs, dans cette dernière situation, la stimulation antigénique continue, combinée à la production excessive d'anticorps entraîne une hypergammaglobulinémie, la formation puis le dépôt de complexes immuns potentiellement responsables de glomérulonéphrites, de vascularites, de polyarthrites, d'uvéites et de méningites en plus des auto-anticorps produits contre les plaquettes et les globules rouges.

De plus les animaux malades ou infectés sub-cliniques ayant une réponse humorale prononcée présentent une dissémination du parasite dans leur organisme, leur nombre de lymphocytes T helper CD4+ est moindre et on observe également une immunosuppression à la différence des animaux résistants.

La figure 8 est une illustration de l'interaction complexe entre les deux types de réponse immunitaire.

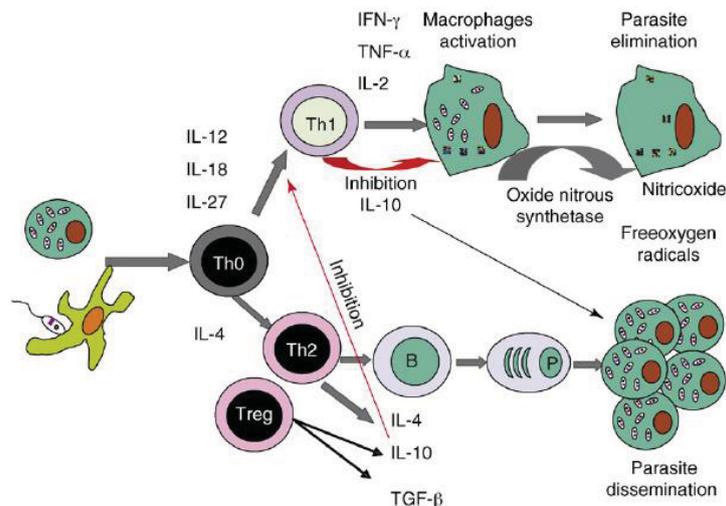


Figure 8 : Illustration de l'interaction entre les deux types de réponse Th1 et Th2

(Baneth et al, 2008)

c. Quel est le rôle du fond génétique de l'hôte ?

Les preuves du rôle crucial de la génétique de l'hôte dans la sensibilité au développement de la maladie clinique ont diverses origines. Les premières études ont été menées chez l'homme et ont mis en évidence l'existence de gènes impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la maladie (Saridomichelakis, 2009 et Sanchez-Robert et al, 2008). Les bases génétiques sont toutefois relativement complexes et mettent en jeu un certain nombre de mécanismes et de gènes dont ceux de l'interleukine-4 (IL-4) et de l'interféron-gamma (INF-gamma).

Il est nécessaire de comprendre que la résistance à la leishmaniose clinique est sous le contrôle d'un très grand nombre de gènes mais qu'elle dépend également de facteurs environnementaux tels que le statut nutritionnel, les infections concomitantes, le parasitisme, la virulence de la souche de leishmanies et les expositions précédentes au protozoaire.

Le fond génétique des chiens influence profondément la résistance ou la sensibilité à la leishmaniose clinique. La sélection naturelle favorise les génotypes résistants. Ceci est illustré par le fait que les races vivant en zone endémique déclarent la

maladie clinique avec une fréquence plus faible que des races de zones indemnes en raison de leur plus grande capacité à mettre en place une réponse immunitaire protectrice. De manière similaire, les chiens brésiliens, qui sont nés et ont été élevés dans les zones endémiques, présentent moins fréquemment des signes cliniques de la maladie ou développent une moindre quantité d'anticorps spécifiques anti-leishmanies à la différence de chiens nés en zone non-endémique et qui déménagent dans des régions endémiques à un jeune âge (Quinnel et al, 2003).

La sensibilité liée à la race permet aussi d'expliquer des différences de fréquences d'apparition de cas cliniques alors que les séroprévalences sont identiques : il existe des races notamment le Boxer, le Berger allemand ou le Rottweiler avec une prédisposition nette au développement de la maladie, parfois à un très jeune âge comme c'est le cas pour les Boxers.

Basés sur les informations acquises lors des recherches sur les animaux de laboratoires ainsi que chez l'Homme, il apparait que le rôle de la génétique en termes de résistance ou de sensibilité à la maladie soit très complexe.

Chez la souris, plus de vingt gènes seraient impliqués (Saridomichelakis, 2009). Des études épidémiologiques ont été menées chez certaines populations de chiens afin de mettre en évidence l'existence d'une base génétique à la résistance à la maladie. Chez le chien, le polymorphisme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe deux ou CMH-2 a été associé à la variation de sensibilité chez une cohorte de chiens croisés brésiliens. Plus précisément, l'allèle DLA-DRB1*01502 serait corrélé positivement au risque d'infection et au titre élevé d'anticorps anti-leishmanies, autrement dit à la sensibilité à la maladie (Quinnell et al, 2003). Cependant il n'y a aucune certitude quant à l'importance de l'effet de cet allèle sur le caractère résistant ou sensible à la leishmaniose compte tenu du nombre important d'autres allèles potentiellement impliqués.

Ainsi, en Europe, notamment en Espagne, le polymorphisme du gène Slc11a1 ou NRAMP 1, impliqué dans la fonctionnalité des macrophages, jouerait un rôle dans la sensibilité ou la résistance contre différents pathogènes intracellulaires, notamment les leishmanies chez le Boxer (Sanchez-Robert et al, 2005). Cependant, encore une fois, des différences ont été mises en évidence entre races : les haplotypes TAG-8-141 et TAG-9-145 ont été associés à la sensibilité chez les Boxers mais pas chez d'autres races de chiens (Sanchez-Robert et al, 2005).

d. Rôle clé des macrophages et importance relative des autres cellules :

Les leishmanies peuvent infecter une grande diversité de cellules, à savoir :

- Les cellules du système des phagocytes mononucléés
- les cellules dendritiques,
- les fibroblastes,
- les cellules endothéliales,
- les hépatocytes,

- les neutrophiles et les éosinophiles
- voire même des cellules néoplasiques.

Par conséquent, le parasite peut envahir presque tous les tissus ou organes du corps, y compris le système nerveux central. En revanche, même si l'infection de cellules non-phagocytaires permet la survie du parasite sur le long terme, ces cellules ne permettent pas une multiplication active du parasite. C'est pourquoi les phagocytes mononucléés, en particulier les macrophages, sont considérés comme les hôtes principaux du protozoaire.

Il est largement reconnu que les macrophages ont un rôle clé, central dans le contrôle de l'infection lors de leishmaniose. Les cytokines telles que l'interféron-gamma, l'interleukine-2 (IL-2) et le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF-alpha), sécrétées par les lymphocytes T activés sont responsables de l'induction de l'activité anti-leishmanies des macrophages. L'oxyde nitrique (NO) est par ailleurs la principale molécule effectrice de cette activité puisqu'elle entraîne la mort des amastigotes intracellulaires associée à l'apoptose des cellules hôtes.

Après leur inoculation dans le derme, les leishmanies doivent échapper à la lyse via le complément, puis adhérer à la surface des macrophages, afin d'être phagocytées et de se retrouver à l'intérieur de ces cellules au sein d'un phagolysosome. Puis les macrophages transportent les parasites vers les nœuds lymphatiques régionaux dans un premier temps puis potentiellement au reste du corps. Lors d'infection naturelle, la vitesse de propagation des leishmanies à partir du site d'inoculation reste inconnue. Cependant, en conditions expérimentales chez des chiens, quatre vingt seize heures après l'inoculation intradermique de promastigotes de *Leishmania donovani*, ces derniers étaient déjà retrouvés dans les nœuds lymphatiques drainant la région d'inoculation ainsi que dans la rate. Il semblerait que chez les hôtes sensibles, le parasite se dissémine en quelques heures alors que chez les hôtes résistants les leishmanies resteraient localisées à la peau ou aux nœuds lymphatiques régionaux (Banuls et al, 2007)

L'autre rôle essentiel des macrophages est la présentation des antigènes parasitaires aux lymphocytes T, grâce aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH. Au final, la destruction du parasite intracellulaire ou l'apoptose, dépend de la production d'oxyde nitrique par une enzyme inductible : l'oxyde nitrique synthétase qui requiert l'expression en quantité suffisante de molécules B7 à la surface du macrophage et une concentration en cytokines favorables dans le microenvironnement, en particulier de l'interféron-gamma. L'autre mécanisme d'élimination du parasite reposant sur la production de molécules oxygénées réactives ne semble pas particulièrement important pour les macrophages canins (Saridomichelakis, 2009).

Chez les individus sensibles, l'expression de la molécule B7, la production d'oxyde nitrique et par conséquent la destruction intracellulaire des parasites sont déficientes. Le parasite peut donc se multiplier de manière incontrôlée entraînant alors la rupture des cellules infectées et la libération des amastigotes qui peuvent par la suite infecter les cellules voisines.

Le rôle des autres cellules possédant un potentiel de phagocytose telles que les neutrophiles ou les éosinophiles est à ce jour encore peu clair. Certaines études menées sur des animaux de laboratoires ont montré que les neutrophiles sont les

cellules prédominantes recrutées sur le site d'inoculation lors des premiers jours suivant l'inoculation et que les éosinophiles sont capables de phagocyter et de détruire les amastigotes à l'aide de substances oxygénées réactives. Chez les chiens sensibles, les capacités de phagocytose des neutrophiles sont augmentées mais leur capacité de destruction intracellulaire est moindre, permettant au parasite d'échapper aux mécanismes de destructions dans les premières heures ou premiers jours suite à l'inoculation.

Les cellules dendritiques cutanées peuvent aussi être infectées. En effet, étant donné que le parasite est inoculé dans le derme, il se retrouve à proximité de celles-ci. Chez des souris infectées par *Leishmania major*, l'infection des cellules de Langherans au niveau de l'épiderme peut également se produire soit lorsque les amastigotes voyagent à travers l'épiderme soit lors de la migration de ces cellules du sang vers la peau. Comme les macrophages, ces cellules transportent les amastigotes aux nœuds lymphatiques régionaux afin de présenter les antigènes aux cellules T via les molécules du CMH. Chez les chiens résistants, elles sont considérées comme des cellules effectrices majeures de l'immunité à médiation cellulaire, du fait de leur nombre important et de leur activation observés à la suite de tests cutanés positifs à l'aide de leishmanine (il s'agit d'une suspension de promastigotes inactivés).

e. L'immunité à médiation cellulaire est protectrice au cours de l'infection :

Un autre concept largement accepté et reconnu est celui relatif au rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans le développement de la résistance à la maladie. En effet, il est admis que l'immunité protectrice contre les leishmanies est assurée par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4⁺ helper (autrement dit l'immunité de type Th1).

Chez les chiens naturellement infectés, les taux d'expression d'interféron-gamma dans la moelle osseuse ou la rate sont similaires que les chiens soient symptomatiques ou asymptomatiques alors qu'une induction prédominante d'interféron-gamma et d'IL-4 ont été détectées dans le sang périphérique de chiens stimulés par des antigènes de leishmanies (Baneth et al, 2008).

Des cellules de rate issues de chiens infectés ont montré l'expression prédominante d'IL-10, corrélée de manière positive avec la charge parasitaire et la sévérité du statut clinique. L'IL-10 est considérée comme un régulateur de l'activité de type Th1 en maintenant la balance entre les réponses de type Th1/Th2 et en inhibant l'activité microbicide des macrophages infectés (Lage et al, 2007).

L'immunité à médiation cellulaire est d'une importance capitale pour la défense de l'organisme contre les pathogènes intracellulaires et par conséquent contre les leishmanies. Cette immunité a été étudiée à l'aide de tests cutanés utilisant de la leishmanine ainsi que des tests de prolifération des lymphocytes en réponse à la présence d'antigènes parasitaires.

Le premier test est un test in vivo qui consiste en la mise en évidence d'une hypersensibilité de type retardée (ou hypersensibilité de type IV). Les résultats sont

souvent positifs chez les chiens résistants et négatifs ou très faiblement positifs chez les chiens sensibles (Saridomichelakis, 2009).

Le second test montre la prolifération des lymphocytes *in vitro* en réponse à des antigènes parasitaires et de la même manière que pour le précédent, le test est positif pour les chiens résistants alors qu'on n'observe peu voire pas de réponse du tout chez les chiens sensibles. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la différence de résistance entre les chiens dépend fortement de la réponse spécifique à médiation cellulaire aussi bien à l'initiation de l'infection que pendant son évolution.

Les lymphocytes T et leurs sous-populations jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire. Une association nette entre la leishmaniose clinique et le nombre total de lymphocytes T dans le sang n'est pas évidente du fait des résultats contradictoires obtenus par différentes études (Saridomichelakis, 2009).

Indépendamment du nombre de lymphocytes en circulation, les zones « T » des organes lymphoïdes sont réduites chez les chiens sensibles et on observe une absence de réponse des cellules T spécifiques du parasite. Dans la majorité des études, les lymphocytes T CD4+ helper dans le sang périphérique sont en quantité réduite chez les chiens sensibles et leur nombre est inversement corrélé à la sévérité des signes cliniques. Cette observation est à la base de l'hypothèse selon laquelle l'immunité à médiation cellulaire est compromise par une déficience des cellules Th.

Les lymphocytes T CD8+ sont considérés comme essentiels à la protection de l'hôte dans la mesure où ils interviennent dans la lyse des macrophages infectés par l'intermédiaire des molécules du CMH-1. Ces cellules sont liées au degré de résistance ainsi qu'à la charge parasitaire. Cependant, le manque d'activation des cellules CD8+ en présence d'antigènes de leishmanies a été remis en question puisque leur rôle et leur nombre dans le sang ainsi que dans les nœuds lymphatiques des chiens sensibles pourraient être augmentés. De la même manière, l'interprétation du ratio CD4+/CD8+, reflétant les changements de populations lymphocytaires, est aussi controversée. De ce fait, d'autres études sont nécessaires afin d'obtenir une réponse claire.

f. Le rôle de l'immunité humorale :

La leishmaniose canine cliniquement déclarée est fréquemment associée à une réponse à médiation humorale intense mais non protectrice.

Chez les chiens sensibles, le nombre de lymphocytes B dans le sang périphérique peut être normal, augmenté voire même diminué du fait de leur migration massive vers la peau ou d'autres organes. Néanmoins, la déficience de l'immunité cellulaire résulte en la multiplication incontrôlée du parasite et en l'activation polyclonale voire mono ou oligoclonale de lymphocytes B associée à une surproduction d'immunoglobulines (Cardoso et al, 2007).

Les anticorps ne sont pas protecteurs pour l'hôte. Certes ils améliorent la phagocytose mais ils n'affectent pas la destruction intracellulaire des amastigotes. En général, les anticorps anti-leishmanies sont détectables avant même l'apparition des

signes cliniques et leur concentration serait corrélée positivement à la présence et à la sévérité des signes cliniques. Les chiens résistants produiraient également des anticorps de toutes classes mais avec une fréquence et une concentration beaucoup plus faibles. En effet, les taux d'immunoglobulines spécifiques anti-leishmanies détectés chez des chiens symptomatiques sont supérieurs à ceux mesurés chez les chiens asymptomatiques. Une relation étroite a été décrite entre ces taux, le statut clinique et la densité parasitaire tissulaire.

Parmi les classes d'immunoglobulines, les immunoglobulines G prédominent alors que les immunoglobulines M, E, et A sont produites à une moindre fréquence et concentration. Les taux des sous-classes d'immunoglobulines G (Ig G), à savoir Ig G1 et Ig G2 ont été étudiés dans le but d'établir une corrélation entre la concentration de chacune des sous-classes, le type de réponse immunologique et l'évolution de l'infection. Chez le chien, l'association entre les titres en anticorps et le type de réponse Th reste du domaine de la spéculation. Chez la souris, les immunoglobulines spécifiques de classe G sont nettement liées au type de réponse, la réponse de type Th1 donc la résistance étant associée avec les immunoglobulines G2a et la réponse de type Th2 donc la sensibilité aux immunoglobulines G1 lors d'infection par des leishmanies dermatropes.

Dans le but d'étudier l'existence d'une association similaire lors d'infection canine, naturelle ou expérimentale, de nombreuses études ont été menées. Par exemple, lorsque les sous classes d'Immunoglobulines G sont mesurées dans le sérum de chiens infectés en utilisant des anticorps monoclonaux, une réponse non polarisée est mise en évidence avec une augmentation de la concentration en Ig G1, 2, 3, 4, qui sont généralement corrélées à la sévérité de la maladie.

Aucune utilisation pratique de la mesure de ces taux n'est envisageable pour le moment.

g. Quelles sont les cibles des anticorps ?

Les chiens sensibles produisent des anticorps contre une grande variété d'antigènes parasitaires tels que l'antigène K39, des protéines de choc thermique HSP-70, des histones H-2A, H-2B, H-3, H-4, des cystéine-protéinases CPA et CPB, les protéines gp63 et gp70, l'acide sialique O-acétylé et les protéines ribosomales P0, P2a et P2b. Le rôle pathogène de chacun des anticorps spécifiques de ces antigènes n'est pas bien connu même si la séropositivité aux antigènes K39 et à la protéine gp63 a été reliée à la manifestation de signes cliniques.

Parallèlement, d'autres anticorps à savoir les cryoglobulines et les auto-anticorps dirigés contre les cellules sanguines, musculaires ou des composants nucléaires sont également produits et participent dans une certaine mesure au développement de signes cliniques. De plus, le rôle délétère de l'activation des lymphocytes B et la surproduction d'immunoglobulines sont illustrés par la formation de complexes immuns aussi bien à partir d'Ig G, M ou A. Ces derniers diminuent l'activité phagocytaire des macrophages mais aggravent également l'inflammation par l'activation du complément et ont par conséquent un rôle direct dans l'immunopathologie de plusieurs tissus ou organes. Enfin, dans une moindre mesure,

l'activation des lymphocytes B est aussi responsable de dépôts d'amyloïde dans certains tissus.

Du fait de la déficience de leur immunité à médiation cellulaire, les chiens présentant une leishmaniose clinique ont une charge parasitaire plus élevée dans pratiquement tous les tissus à la différence des chiens asymptomatiques. Ceci a été montré indépendamment de la méthode utilisée, c'est-à-dire aussi bien à l'aide d'une cytologie, de méthodes d'immuno-histochimie ou d'immunofluorescence directe ou encore des méthodes moléculaires quantitatives. Par ailleurs, selon certaines études, la densité parasitaire serait plus élevée chez des chiens poly-symptomatiques par rapport à des chiens dits oligo-symptomatiques, et donc ce paramètre serait positivement corrélé avec les manifestations cliniques (Saridomichelakis, 2009). Comme la sensibilité de la cytologie dépend de divers facteurs comme les compétences de l'observateur, le temps dédié à l'examen et de la densité parasitaire du tissu, il n'est pas surprenant d'obtenir plus de diagnostics positifs à la cytologie de nœuds lymphatiques, de moelle osseuse ou de rate de chiens infectés symptomatiques par rapport à des mêmes analyses réalisées sur des chiens asymptomatiques. En effet, par exemple, dans une étude lors de laquelle mille champs de frottis réalisés à partir d'aspiration de nœuds lymphatiques et de moelle osseuse ont été observés au fort grossissement avec de l'huile à immersion, 95% des chiens avec des signes cliniques ont été diagnostiqués avec certitude alors que la sensibilité de la même méthode n'était que de 28 % chez des chiens asymptomatiques (Saridomichelakis, 2009).

Le titre en immunoglobulines G spécifiques anti-leishmanies est positivement corrélé avec la densité parasitaire tissulaire et par conséquent probablement avec la sévérité des signes cliniques. Ce titre se trouve être généralement plus faible chez des chiens asymptomatiques. Lorsque le diagnostic est réalisé à l'aide d'une PCR, 78 à 93% des chiens infectés sont en fait séronégatifs, mais ceci dépend fortement de la méthode sérologique mise en œuvre ainsi que des seuils employés. A l'inverse, la plupart des chiens cliniquement atteints présentent un résultat positif à la sérologie (IFAT, ELISA ou DAT).

C'est pourquoi d'un point de vue épidémiologique, la séroprévalence est considérée comme une valeur intermédiaire entre la prévalence réelle de l'infection et la prévalence de la maladie. Un exemple illustrant ce concept est la prévalence de l'infection canine dans le bassin méditerranéen qui est estimée entre 50 à 80% par PCR alors que la séroprévalence est d'environ 10 à 30% et la prévalence de la maladie n'est que d'environ 2 à 5 % (Saridomichelakis, 2009).

h. Quel profil de cytokines ?

Les données sur le rôle des réponses Th1 versus Th2 sont confuses. Même si l'association nette entre l'activation de la réponse de type Th1 et la résistance de l'hôte et inversement de la réponse de type Th2 et la sensibilité ont été prouvées chez des animaux de laboratoires lors d'infection par des leishmanies dermatropes, une réponse immune nettement polarisée n'a pas été démontrée chez l'homme ou le chien.

En se basant sur le profil de cytokines, il semblerait que les deux types de réponses soient présents, la réponse de type Th1 étant prédominante chez les chiens résistants. Les concentrations de diverses cytokines ou l'expression d'ARN messenger suite à des stimulations antigéniques d'intensité variable, ont été étudiées dans plusieurs organes ou tissus lors d'infections naturelles ou expérimentales.

En ce qui concerne les cytokines de type Th1, l'IL-2 et l'INF-gamma ont été associées avec la résistance de l'hôte, le rôle protecteur de l'interféron restant à être prouvé du fait de résultats controversés dans différentes études. Le facteur de nécrose tissulaire ou TNF a également été associé ou non à la résistance, nécessitant d'autres études. L'IL-12 quant à elle augmente la production d'interféron-gamma et protège de la maladie ou au moins retarde son installation. Le rôle, s'il existe de l'IL-18 est incertain, certaines études l'associent à la résistance alors que d'autres à la sensibilité (Carillo et Moreno, 2009).

En ce qui concerne les cytokines de type Th2, les rôles de l'IL-4 et de l'IL-6 nécessitent encore d'être étudiés. Par contre, contrairement au cas de l'homme lors de leishmaniose viscérale, l'IL-10 ne semble pas associée à la sensibilité à la maladie chez le chien et ne semble pas s'accumuler dans les tissus, au moins lors d'infections expérimentales. Le rôle de l'IL-13, dont l'ARNm a été détecté dans la peau mais pas dans la moelle osseuse de chiens en phase clinique ainsi que le rôle du facteur de croissance beta ou TGF-beta restent inconnus.

Pour conclure, il est évident que la connaissance d'un profil précis de cytokines et son association avec la résistance ou la sensibilité à la maladie reste encore à établir et représente un enjeu considérable.

i. Rôle de la virulence du parasite :

Après l'entrée dans le macrophage, il se produit une transformation de la forme promastigote en forme amastigote. Préalablement, le parasite a acquis chez le phlébotome les déterminants moléculaires essentiels lui permettant de s'attacher, d'entrer, de survivre, et de se multiplier dans les macrophages. Il présente donc le potentiel pour développer la maladie. Ces mécanismes diffèrent en fonction de l'espèce de leishmanies voire de la souche ce qui pourrait expliquer une part du polymorphisme clinique, aussi bien humain qu'animal.

Chez l'homme, la capacité à induire une maladie cutanée ou viscérale varie grandement en fonction de l'espèce ou de la souche de leishmanie. Ainsi, l'infection par *Leishmania braziliensis* est responsable d'affections cutanées et muco-cutanées alors que *L. infantum* est plutôt responsable d'affections généralisées. A l'échelle de la sous-espèce, les données sont encore limitées à ce jour.

Chez le chien, au moins onze zymodèmes de *L. infantum* ont été isolés et des infections simultanées par deux de ces zymodèmes ont été rapportées. Un zymodème pouvant être défini comme un ensemble des souches présentant le même profil enzymatique. Une diversité antigénique de degré variable existe parmi

ces différentes souches. Néanmoins l'impact de ces constats sur l'épidémiologie et la pathogénie de l'infection ou de ses manifestations cliniques demandent davantage d'investigations. Toutefois, il semblerait que certains zymodèmes soient plutôt responsables d'affections cutanées alors que d'autres entraînent plutôt des formes viscérales.

Les aspects cliniques varient entre les chiens des pays du bassin Méditerranéen et ceux du Brésil. Mais il est essentiel de garder à l'esprit qu'en plus des différences de pathogénicité, il existe d'autres facteurs déterminants dans le panel de phénotypes cliniques.

j. Rôle des affections intercurrentes :

La liste des maladies qui ont été décrites comme co-existantes avec la leishmaniose canine et influençant ses manifestations cliniques ou para-cliniques sont nombreuses et en constante augmentation. Il peut s'agir :

- D'infections diverses
- D'autres parasitoses : ehrlichiose monocyttaire, babesiose, anaplasiose, bartonellose, hepatozoonose, dirofilariose, spirocerose, démodécies, gale sarcoptique
- D'affections à médiation immunitaire : pemphigus foliacé, lupus érythémateux disséminé,
- D'endocrinopathies : hypothyroïdie
- De néoplasies variées : hémangiosarcome, lymphome, myélome, histiocytome, tumeur vénérienne transmissible.

Cela n'est pas surprenant puisque dans les zones endémiques, la leishmaniose canine est l'un des diagnostics les plus fréquents et il est logique qu'elle coexiste de manière sporadique avec d'autres affections. De plus ces affections sont plus fréquentes ou bien on met plus fréquemment en évidence une séropositivité vis-à-vis de certains des agents infectieux ou parasitaires lorsqu'ils sont associés à la leishmaniose. Ceci est d'autant plus vrai chez des chiens âgés. Ce constat peut être expliqué par les conditions de vie, la gestion globale de ces chiens, l'immunosuppression associée à la leishmaniose clinique ou l'influence des maladies concomitantes sur le système immunitaire des chiens.

Une séropositivité suite à l'infection par *Leishmania infantum* est plus fréquemment notée chez des chiens vivant dehors et/ou en milieu rural. Si d'autres infections ou parasitoses sont également endémiques dans les mêmes régions, des co-infections fréquentes sont attendues.

Par ailleurs, le manque d'assiduité dans l'application de répulsifs par les propriétaires représente également un facteur de risque non seulement en termes de leishmaniose canine mais aussi vis-à-vis d'autres maladies vectorielles. La dépression sévère de l'immunité à médiation cellulaire lors de leishmaniose peut entraîner une sensibilité plus élevée aux parasites ou aux pathogènes latents tels que *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* et *Demodex canis*. Bien sûr la réciproque est possible. Par exemple, c'est le cas chez l'homme où les personnes infectées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine peuvent développer des formes cliniques gravissimes de leishmaniose viscérale alors qu'elle était latente avant le déclenchement du SIDA. Enfin les traitements mis en place lors de certaines affections à médiation immunitaire pourraient augmenter la sensibilité à la leishmaniose canine.

Pour toutes ces raisons, il est primordial de suivre régulièrement les chiens atteints de leishmaniose canine afin de détecter les affections infectieuses ou parasitaires voire néoplasiques possiblement associées. Les résultats peuvent être particulièrement intéressants chez les vieux chiens et dans les cas de présentation clinique ou para-clinique atypiques dans la mesure où le traitement de ces affections (lorsqu'il est possible) améliorera le traitement anti-leishmanies.

III- Pathogenèse :

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 patho-physiologique 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 9 résume de manière schématique l'évolution possible de l'infection.

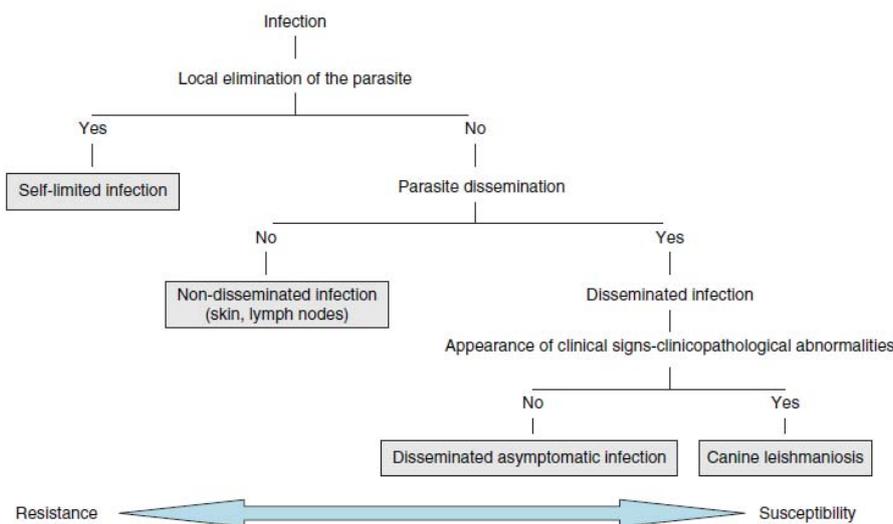


Figure 9 : Evolution possible suite à l'infection par *L. infantum*

(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.

a. Dans les nœuds lymphatiques :

Au niveau des nœuds lymphatiques, on observe une hypertrophie des régions corticales et médullaires avec la présence de macrophages infectés principalement localisés au sein des corticales. L'infection des macrophages peut avoir eu lieu dans le derme avant leur migration vers les nœuds lymphatiques ou bien dans les nœuds lymphatiques après leur arrivée. On note une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+ avec en parallèle une diminution du nombre de lymphocytes T CD21+, probablement du fait de leur transformation en plasmocytes.

La conséquence de ces mécanismes résulte en une hypertrophie des nœuds lymphatiques périphériques, un des signes les plus typiques lors de leishmaniose clinique. Cependant, lors de stades avancés, notamment chez les chiens présentant une insuffisance rénale, les nœuds lymphatiques périphériques peuvent devenir normaux voire même hypoplasiques, dans un contexte de perte de poids généralisée.

b. Dans la peau :

Les lésions cutanées sont très fréquentes puisque présentes dans environ 80% à 90% des cas cliniques. En fait, l'atteinte cutanée serait même encore plus fréquente dans la mesure où les lésions microscopiques secondaires à la dissémination du parasite lors de biopsies de peau macroscopiquement saine sont similaires à celles de peau de chiens symptomatiques.

On observe généralement une dermatite exfoliative localisée, multifocale ou diffuse, dont la distribution est en général symétrique. Ces lésions sont retrouvées chez 53% à 73% des chiens symptomatiques et se traduisent cliniquement par des squames, de la sécheresse cutanée, plus ou moins de l'hypo-trichose ou de l'alopecie, de l'érythème et de l'hyperpigmentation.

A l'analyse histologique, on note une inflammation granulomateuse à pyogranulomateuse de localisation variable. Elle peut être péri-vasculaire, interstitielle, nodulaire, associée aux glandes annexes voire panniculaire (Solano-Gallego et al, 2009).

L'hyperkératose orthokératosique de l'épiderme et des follicules pileux est fréquente de la même manière que l'adénite sébacée contribuant aux lésions macroscopiques.

Cette clinique est associée à une réponse immunitaire locale efficace du fait de l'activation des cellules de Langerhans, à la surexpression des molécules du CMH-2 des kératinocytes, de l'infiltration du derme par les lymphocytes T CD8+ et dans une moindre mesure des T CD4+, la présence de lymphocytes B CD21+ et une charge parasitaire relativement faible. En revanche, lors d'atteinte des glandes sébacées, on note davantage de lymphocytes CD4+ par rapport aux CD8+ contrairement à l'atteinte dermique, les lymphocytes CD21+ sont en moindre quantité et on note l'absence d'amastigotes visibles à l'immuno-histochimie.

Les ulcères cutanés observés dans 15% à 40% des cas sont plutôt localisés au niveau des pavillons auriculaires, des points de pression, des extrémités ou des

jonctions muco-cutanées et sont attribuées à un trauma local ou à des dommages vasculaires.

Les lésions nodulaires, observées dans 2% à 9% des cas, sont généralement caractérisées par une faible expression des molécules du CMH-2, un petit nombre de lymphocytes T au niveau de l'infiltrat dermique et une charge parasitaire élevée indiquant une sensibilité plus importante de l'hôte, même si des observations strictement opposées ont aussi été décrites. Une des hypothèses expliquant cette contradiction est que les nodules, plus particulièrement ceux localisés au niveau de la tête, représentent le site d'inoculation et ne sont donc pas synonymes de « forme nodulaire » de la maladie. Ces lésions au niveau du site d'inoculation peuvent apparaître après la fin de la période de transmission et les parasites y sont en nombre limité à absent lorsqu'une réaction inflammatoire granulomateuse est associée.

La dermatite papuleuse peut aussi correspondre à des sites d'inoculation multiple du parasite. Elle a été associée à la résistance à l'infection chez certains chiens sur la base de l'observation d'une faible charge parasitaire et de test cutané positif à l'aide de leishmanine, un faible titre en anticorps et une réponse adéquate au traitement (Solano-Gallego, 2009).

c. Dans la moelle osseuse :

L'inflammation granulomateuse de la moelle osseuse peut être accompagnée par une augmentation du nombre de lymphocytes et de plasmocytes, une hypoplasie ou une dysplasie des lignées érythrocytaire et/ou mégacaryocytaire, une augmentation du ratio lignée myéloïde/lignée érythrocytaire et une érythrophagocytose. La plupart de ces changements sont positivement corrélés avec la charge parasitaire locale et peuvent expliquer en partie l'anémie et la thrombocytopenie.

d. Dans la rate :

La splénomégalie, manifestation fréquente lors de leishmaniose canine, parfois très subtile voire non détectable à la palpation abdominale, est la conséquence de l'infiltration de l'organe par des cellules du système immunitaire, notamment monocytes et macrophages ainsi que de l'hyperplasie de la pulpe rouge et blanche et des changements de la structure micro-vasculaire de l'organe, avec une abondance de veines et de veinules au sein de la pulpe et une augmentation des fibres réticulaires. La charge parasitaire est également étroitement associée avec le nombre de macrophages qui expriment les récepteurs du complément.

La rate représenterait un organe essentiel pour la survie du parasite du fait de l'inefficacité de la réponse immunitaire, comme cela a été montré expérimentalement chez des souris infectées par des espèces de leishmanies à tropisme viscéral.

e. Atteinte hépatique :

L'implication hépatique est également très fréquente dans la mesure où des lésions microscopiques sont présentes dans presque tous les échantillons observés. Les macrophages infiltrant mais aussi les cellules de Kupffer voire les hépatocytes peuvent être infectés.

Une inflammation granulomateuse chronique d'intensité variable est dans un premier temps restreinte aux espaces sinusoides puis se propage aux espaces porte, à la capsule voire diffuse plus largement. Les chiens sensibles présentent des granulomes peu organisés et inefficaces pour éliminer le parasite à la différence de ceux des chiens résistants. L'analyse histologique montre aussi une hypertrophie ou hyperplasie des cellules de Kupffer, une dégénérescence vacuolaire et une nécrose des hépatocytes, de la fibrose et plus rarement de l'amyloïdose.

L'hépatomégalie est plus souvent une trouvaille d'autopsie qu'une anomalie relevée lors de l'examen physique et elle représente donc la conséquence de l'infiltration par des cellules inflammatoires, de l'hyperplasie ou l'hypertrophie des cellules résidentes et potentiellement de la congestion passive. L'atteinte hépatique participe à diverses anomalies para-cliniques lors des analyses sanguines comme par exemple une augmentation des enzymes hépatiques ou une hypo-albuminémie... Mais, elle aboutit rarement à une insuffisance hépatique.

f. Atteinte rénale :

L'analyse histo-pathologique des reins révèle très souvent une glomérulonéphrite, généralement membrano-proliférative ou mésangio-proliférative ou/et une néphrite tubulo-interstitielle, et plus rarement de l'amyloïdose.

Le dépôt de complexes immuns au niveau des glomérules cause la glomérulonéphrite alors que les lésions tubulo-interstitielles semblent davantage le résultat des lésions glomérulaires et de l'inflammation secondaire au dépôt des complexes immuns dans l'interstitium rénal et sur les membranes basales. Dans les deux cas les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle central.

Ces atteintes expliquent la protéinurie, peuvent être responsables du développement d'hypertension et de la mise en place d'un cercle vicieux avec comme stade final un syndrome néphrotique et/ou une insuffisance rénale chronique, cause la plus fréquente de décès lors de leishmaniose clinique.

g. Atteinte oculaire :

Pratiquement toutes les structures oculaires ou presque peuvent être affectées et les manifestations cliniques les plus fréquentes comprennent blépharite, conjonctivite, kérato-conjonctivite sèche, uvéite et parfois décollement de rétine.

En fonction de la lésion, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents peuvent être :

- Une inflammation granulomateuse secondaire à la présence du parasite pour les blépharites, les conjonctivites primaires et l'inflammation des glandes lacrymales.
- Le dépôt de complexes immuns lors d'uvéite.
- La lésions d'autres structures oculaires : conjonctivites secondaires à l'atteinte des paupières ou de l'appareil lacrymal, kératite secondaire à une conjonctivite, kérato-conjonctivite sèche du fait de l'inflammation de l'appareil lacrymal ou encore conjonctivite induite par une obstruction du conduit lacrymal.
- La manifestation d'une leishmaniose systémique pour les décollements de rétine consécutive à l'hypertension systémique par exemple.

h. Dans les muscles :

Les inflammations des muscles squelettiques, notamment masticateurs, sont très fréquentes lors de leishmaniose clinique et se manifestent en général par une atrophie des muscles atteints, le plus souvent très prononcée en ce qui concerne les muscles masticateurs.

Cette atteinte est accompagnée par des anomalies électro-myographiques et parfois par une augmentation de l'activité de la créatinine-phosphokinase et de la lactate-déhydrogénase.

La polymyosite est attribuée comme les autres lésions à une inflammation granulomateuse consécutive à la présence d'amastigotes de leishmanies dans les macrophages et les myo-fibres, à une vascularite neutrophilique ainsi qu'au dépôt de complexes immuns dans les muscles doublé de l'existence d'anticorps anti-myofibres dans le sérum. Cette polymyosite chronique est associée à l'atrophie musculaire observée.

i. Autres :

Les lésions intestinales sont elles aussi le résultat d'une inflammation granulomateuse voire pyogranulomateuse ainsi qu'à la présence du parasite. Elles peuvent conduire à une diarrhée chronique du petit et/ou du gros intestin ou rester sub-cliniques.

L'implication osseuse est sous-estimée cliniquement et consiste en une ostéomyélite granulomateuse secondaire à la dissémination hématologique du parasite. Des lésions aussi bien prolifératives au sein du périoste que lytiques impliquant la corticale et/ou la médullaire peuvent être observées sur les radiographies.

Les lésions histologiques de l'appareil génital mâle comprennent une orchite interstitielle lymphocytaire parfois compliquée d'une dégénérescence testiculaire

secondaire, une épидidymite histio-lymphocytaire, une inflammation granulomateuse du pénis, et une balanoposthite. Ces lésions sont associées à la présence locale du parasite. Leur fréquence est plus élevée et/ou plus sévère chez les chiens symptomatiques.

L'atteinte des muqueuses est plus rare mais peut se manifester par des lésions ulcératives ou/et nodulaires. Indépendamment de l'apparence macroscopique, il s'agit d'une inflammation granulomateuse à pyogranulomateuse associée à la présence d'amastigotes et à la migration de macrophages infectés consécutives à un trauma local mineur ou dans le cas de lésions orales, à l'ingestion accidentelle de phlébotomes infectés (Saridomichelakis, 2009).

Les lésions articulaires, fréquentes, sont une polyarthrite érosive ou non, bilatérale, associée à la présence d'amastigotes détectés dans le liquide synovial, ainsi qu'une boiterie. Les mécanismes proposés comprennent une inflammation granulomateuse secondaire à l'infection synoviale et une inflammation neutrophilique du fait du dépôt de complexes immuns.

La polyarthrite peut être la cause d'une boiterie mais cette dernière peut aussi résulter d'autres atteintes telles qu'une lésion des coussinets, une polymyosite ou avoir une cause osseuse voire neurologique.

j. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents à certains signes cliniques ou para-cliniques :

Comme mentionné plus tôt, les causes physiopathologiques sous-jacentes à 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.

L'épistaxis, parfois profuse, observée peut être secondaire à la thrombocytopénie, à une thrombocytopathie, à l'hyperviscosité sanguine secondaire à l'hyperglobulinémie, à l'ulcération nasale, à une rhinite pyo-granulomateuse ou à une vascularite secondaire au dépôt des complexes immuns. Cette épistaxis peut constituer également le seul signe clinique présenté par l'animal et même être la cause de la mort de l'animal en cas de pertes sanguines incontrôlable (Baneth et al, 2008).

De la même manière, l'hématurie ou la diarrhée hémorragique sont consécutives à l'ulcération tissulaire ainsi qu'à l'altération de la coagulation primaire et/ou secondaire.

La pneumonie, plus rare, est attribuée aux dépôts de complexes immuns et aux infections secondaires à l'immunosuppression.

Des lésions myocardiques peuvent apparaître du fait de l'inflammation granulomateuse, du dépôt de complexes immuns ou de l'hypertension systémique.

Le système nerveux central est atteint de manière plus anecdotique, et ces atteintes expliqueraient des changements de comportement, des convulsions ou des signes cliniques suggestifs d'une méningite ou des lésions compressives ou encore des hémorragies de la moelle. Les mécanismes sous-jacents sont les mêmes que décrits précédemment à savoir inflammation granulomateuse ou dépôts de complexes immuns associés à une vascularite.

L'anémie est l'anomalie para-clinique la plus fréquente. Elle peut être la conséquence :

- de pertes sanguines liées à de l'épistaxis par exemple,
- d'un processus d'hémolyse auto-immune ou du fait de la diminution de la fluidité sanguine,
- d'une diminution de l'érythropoïèse lors d'inflammation chronique, de déficience en fer, d'insuffisance rénale chronique, ou de dysplasie érythrocytaire.
- de maladies intercurrentes comme par exemple lors d'ehrlichiose monocyttaire.

Mais le rôle potentiel de l'hémolyse à médiation immunitaire et de l'inflammation chronique sur le développement de l'anémie ont été remis en question du fait du manque de réponse suite au traitement par des glucocorticoïdes à dose immunosuppressive, et sur les résultats normaux des dosages en fer, de la saturation de la transferrine et des stocks d'hémosidérine de la moelle osseuse (Saridomichelakis, 2009).

Les mêmes mécanismes ont été proposés pour expliquer la thrombocytopénie, fréquente mais généralement rarement assez marquée pour provoquer des saignements importants.

Une autre anomalie para-clinique fréquente lors de leishmaniose consiste en une hyperglobulinémie et une hypo-albuminémie. La première résulte notamment de l'augmentation des gammaglobulines et parfois des alpha2 et beta-globulines alors que la seconde peut être une conséquence de l'inflammation chronique ou/et de l'atteinte rénale, hépatique ou encore intestinale. Ces modifications sont responsables d'une diminution du ratio albumine/globuline ainsi que d'une hyperprotéinémie totale.

IV- Un polymorphisme clinique bien connu :

Le tableau clinique de la maladie est très varié selon les individus compte tenu de la complexité des mécanismes physio-pathogéniques et immunologiques sous-jacents ainsi que de la diversité des organes atteints.

La période d'incubation avant l'apparition des signes cliniques de la maladie chez le chien est très variable et peut durer de trois mois à sept ans même si comme mentionné précédemment la majorité des chiens infectés restent des porteurs asymptomatiques toute leur vie.

L'image histo-pathologique des tissus infectés est une réaction inflammatoire granulomateuse, associée à la présence d'amastigotes de leishmanies dans les macrophages.

La leishmaniose canine viscérale est donc une maladie systémique aux signes cliniques très variables pouvant impliquer n'importe quel organe ou tissu, comme le montre la figure 10.



Figure 10 : Photographies de diverses manifestations cliniques chez des chiens symptomatiques

(Baneth et al, 2008)

1- Signes généraux :

La majorité des chiens qui sont présentés en consultation ont des signes généraux non spécifiques. Voir le tableau 2.

Ils sont en mauvaise condition générale. Ils présentent un mauvais état corporel (atrophie musculaire importante voire cachexie), de la léthargie ainsi que parfois une intolérance à l'exercice et de la fièvre.

Les signes cliniques classiques observables sont des lésions cutanées (voir photographie b de la figure 10), une lymphadénomégalie généralisée légère à modérée, des muqueuses pâles, une hépato-splénomégalie, une polyurie associée à

une polydipsie, des lésions oculaires, de l'épistaxis, une boiterie plus ou moins associée à un gonflement articulaire, des vomissements et de la diarrhée. Voir le tableau 3 qui présente la prévalence de différents signes cliniques.

Tableau 2 : Signes cliniques potentiellement observables lors de l'examen physique de chiens leishmaniens. (Issu de Paltrinieri et al, 2010)

Localisation corporelle	Signes cliniques
Générale	Mauvais état corporel, cachexie-Atrophie musculaire Léthargie - Muqueuses pâles Hypertrophie des nœuds lymphatiques Epistaxis-Hépto-splénomégalie Boiterie et articulations enflées - fièvre
Cutanée et muco-cutanée	Dermatite exfoliative- Dermatite ulcérate Dermatite papuleuse-Dermatite nodulaire Lésions nasales ressemblant à un lupus ou un pemphigus - Onychogryphose Hyperkératose naso-digitée - Dermatite pustuleuse
Oculaire	Lésions palpébrales Lésions conjonctivales diffuses ou nodulaires Lésions cornéennes Kératite nodulaire et kérato-conjonctivite sèche Lésions scléales Lésions de l'uvée antérieure ou postérieure, granulomateuse ou diffuse Complications des affections de l'uvée : glaucome,... Lésions orbitales granulomateuses ou myosites des muscles extrinsèques
Autres	Affections neurologiques ou gastro-intestinales

Le diagnostic différentiel est donc complexe et difficile. Les signes les plus fréquents ainsi que les nouvelles manifestations sont décrites par la suite.

Tableau 3 : Prévalence de certains signes cliniques lors de leishmaniose canine cliniquement déclarée. (Issu de Baneth et al, 2008)

Signes cliniques	Prévalence chez les chiens symptomatiques
Affections cutanées	81 à 89 %
Hypertrophie des nœuds lymphatiques	62 à 90 %
Affections oculaires	16 à 81 %
Pâleur des muqueuses	58 %
Splénomégalie	10 à 53 %
Cachexie	10 à 48 %
Fièvre	4 à 36 %
Epistaxis	6 à 10 %
Onychogryphose	20 31 %

2- Signes cutanés :

i. Manifestations cliniques:

Les lésions cutanées sont les plus fréquentes lors de leishmaniose clinique. Elles peuvent être détectées seules, associées à d'autres types de lésions mais elles peuvent être aussi parfois inexistantes. Différentes entités ont été décrites :

- Dermatite exfoliative non prurigineuse avec ou sans alopecie, généralisée ou localisée à la face le plus fréquemment autour des yeux, aux oreilles ou aux membres.
- Dermatite ulcérate au niveau des proéminences osseuses, des jonctions muco-cutanées, des pattes, des pavillons auriculaires.
- Dermatite nodulaire focale ou multifocale
- Dermatite proliférative muco-cutanée
- Dermatite papuleuse ou pustuleuse stérile.

L'onychogryphose (voir la figure 11 et la photographie d de la figure 10) associée à une dermatite mononucléaire lichénoïde et les lésions hémorragiques associées à une vasculite sont d'autres lésions cutanées moins fréquentes ou moins bien caractérisées, retrouvées chez certains chiens symptomatiques.



Figure 11 : Vue dorsale d'une patte avant gauche d'un chien atteint de leishmaniose présentant de l'onychogryphose, une dermatite exfoliative ainsi qu'une pyodermite profonde secondaire.

(Koutinas et al, 2009)

Des manifestations cutanées atypiques existent, il peut s'agir : de dépigmentation, surtout nasale, de panniculite, d'hyperkératose nasale et/ou digitée, d'éruption papuleuse, de lésions mimant un syndrome d'*alopecia areata* ou un pemphigus foliacé, d'un érythème multiforme. Ces manifestations sont toutefois plus rares.

Les pyodermites à staphylocoques superficielles aussi bien que profondes sont des complications fréquentes. On observe également une augmentation des populations de *Malassezia pachydermatis* (voir photographie e de la figure 10).

ii. Histologie :

L'analyse de la matrice extracellulaire de la peau de chiens symptomatiques montre une diminution de la quantité de collagène de type I et une augmentation de celle de collagène de type III et ceci de manière proportionnelle à la sévérité des lésions cutanées et de la destruction tissulaire (Baneth et al, 2008). Il est possible que les lésions au sein du derme ne soient pas nécessairement consécutives à la réponse inflammatoire du fait de la présence du parasite.

D'un point de vue histo-pathologique, on observe le plus souvent une dermatite granulomateuse ou pyo-granulomateuse, nodulaire à diffuse, parfois au niveau des glandes annexes de la peau, associée à une hyperkératose orthokératosique à parakératosique, des acanthocytes, des croûtes et ulcérations (Solano-Gallego et al, 2009).

D'autres types histologiques tels que : dermatite pustuleuse sous-cornéenne, dermatite lichénoïde, vascularite et panniculite ont été décrits.

3- Atteinte rénale :

La leishmaniose canine est souvent associée à une affection rénale chronique. Parfois il peut même s'agir du seul signe clinique exprimé par l'animal et cette atteinte peut progresser d'une protéinurie légère, asymptomatique à un syndrome néphrotique sévère, stade final de la maladie rénale.

L'insuffisance rénale chronique est la principale cause de décès lors de leishmaniose clinique.

Des études ont montré la présence de lésions histologiques au niveau du rein chez 100% des chiens infectés naturellement et manifestant des signes cliniques. En revanche l'azotémie observée typiquement lors de défaillance rénale, à savoir une augmentation de l'urée et de la créatinine, est peu fréquente et n'est notée que très tardivement, lorsque la majorité des néphrons sont dysfonctionnels. Glomérulonéphrite et néphrite tubulo-interstitielle sont les lésions histologiques les plus fréquemment rencontrées contrairement à l'amyloïdose rénale, plus rare.

Les glomérulonéphrites sont souvent consécutives au dépôt d'immuns complexes, et sont donc le plus souvent de type membrano-proliférative et/ou mésangio-proliférative. Cette dernière est plus fréquemment retrouvée chez des chiens cliniquement sains alors que la première se retrouve chez des chiens présentant des signes cliniques d'insuffisance rénale chronique.

4- Atteinte oculaire :

i. Signes cliniques :

La prévalence des lésions oculaires et péri-oculaires lors de leishmaniose canine varie de 16% à 80%. Les lésions oculaires peuvent être le seul signe clinique présenté par l'animal comme cela a été le cas pour 15 % des animaux lors d'une étude (Solano-Gallego et al, 2009 et Baneth et al, 2008)

Les manifestations oculaires les plus fréquentes sont :

- Conjonctivites diffuses ou nodulaires
- Blépharites exfoliatives, ulcératives ou nodulaires (voir photographie a de la figure 10)
- Lésions sclérales : sclérite nodulaire ou diffuse, épisclérite
- Uvéites antérieures ou postérieures, granulomateuses ou diffuses, ainsi que leurs complications telles que glaucome ou panophtalmie.
- Kérato-conjonctivites, simples ou sèches, du fait de l'infiltration inflammatoire autour des canaux lacrymaux responsable d'une rétention des sécrétions et d'une diminution de la production de larmes.
- Lésions granulomateuses ou myosites des muscles extrinsèques.
- Ou une combinaison de ces affections

Les autres signes oculaires sont ceux consécutifs à l'hypertension artérielle à savoir décollement de rétine, hémorragie rétinienne, hyphema... Ces signes sont moins fréquents, observés chez seulement 5.7% des chiens hypertensifs leishmaniens (Solano-Gallego, 2009).

ii. Histologie :

L'analyse histo-pathologique oculaire montre une inflammation lympho-plasmocytaire à granulomateuse avec un pattern nodulaire à diffus, péri-vasculaire, associée à la présence du parasite au niveau de la conjonctive, du limbe ou des corps ciliaires.

5- Atteinte des nœuds lymphatiques :

L'hypertrophie des nœuds lymphatiques est causée par l'augmentation en taille et en nombre des follicules lymphoïdes et l'hyperplasie marquée des macrophages médullaires. La charge parasitaire au niveau des nœuds lymphatiques n'est dans la plupart des cas pas corrélée au type ou à la sévérité des lésions au niveau des autres organes.

6- Formes atypiques :

Les formes cliniques non usuelles sont les suivantes :

- Lésions des muqueuses : cavité orale, langue ou organes génitaux
- Gonflement articulaire associé à une polyarthrite érosive ou non
- Lésions osseuses prolifératives ou lytiques,
- Hépatite chronique
- Colite chronique
- Atteinte nerveuse : méningite,
- Atteinte musculaire : myosite atrophique des masséters, poly-myosite
- Désordres auto-immuns
- Atteinte cardio-vasculaire : péricardite, vasculite systémique, thrombo-embolie, syndrome d'hyperviscosité sanguine

7- Anomalies para-cliniques :

Lors d'analyses de laboratoire, un clinicien peut ou doit suspecter la leishmaniose en cas de :

- protéinurie rénale persistante avec un rapport protéine sur créatinine urinaire (RPCU) supérieur à 0.5.

- une azotémie anormale cf. classification stade IRIS de l'insuffisance rénale,

- une anémie non régénérative, soit consécutive à la maladie chronique qui ralentit l'érythropoïèse ou/et à l'insuffisance rénale chronique. Cette anémie peut être aggravée par les pertes sanguines citées ci-dessus ou la destruction à médiation immunitaire des globules rouges.

- une leucocytose ou leucopénie

- une hyper-protéïnémie sérique

- une hyperglobulinémie poly-clonale gamma et parfois beta

- une hypo-albuminémie

- une diminution du rapport albumine/globuline

- une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques

On peut observer également :

- une hyperviscosité sanguine

- une thrombocytopathie, avec une agrégation plaquettaire anormale conduisant à un dysfonctionnement des plaquettes

- une thrombocytopénie

- des troubles de l'hémostase secondaire, avec une diminution de la quantité de certains facteurs de coagulation et une fibrinolyse anormale.

V- La leishmaniose canine : un diagnostic toujours délicat.

a. Considérations générales :

Le diagnostic de la leishmaniose est mené avec deux objectifs majeurs :

- confirmer la « maladie » c'est-à-dire établir si un chien présentant des signes cliniques ou des anomalies para-cliniques compatibles avec la leishmaniose est effectivement malade à cause de l'infection par ce parasite.
- étudier la prévalence de l'infection des chiens cliniquement sains lors d'études épidémiologiques spécialement dans des zones endémiques, afin de prévenir la transmission à partir de chiens asymptomatiques par transfusion sanguine, éviter l'importation de chiens infectés dans des régions non-endémiques ou encore pour suivre la réponse au traitement mis en place.

Ces deux buts soulignent d'une part l'importance de mettre en œuvre des techniques diagnostiques différentes et adaptées à chaque situation et d'autre part confirme qu'il est essentiel de dissocier maladie et infection.

Etant donné les nombreux signes communs de la leishmaniose avec diverses affections canines et le manque de manifestations pathognomoniques, le diagnostic de cette protozoose est souvent un véritable challenge. Comme mentionné précédemment, le diagnostic précis de la leishmaniose canine est d'autant plus difficile que tous les animaux infectés ne développent pas de signes cliniques. Or l'existence de ces porteurs sains, potentiellement infectieux pour les phlébotomes ne doit pas être négligée ni méconnue dans la mesure où elle participe à la transmission de la maladie bien que dans une moindre mesure. C'est pourquoi la détection précoce de l'infection, particulièrement avant l'apparition des symptômes représente un point essentiel dans le contrôle de la propagation de la maladie aussi bien animale qu'humaine.

Le diagnostic de cette maladie nécessite donc une approche intégrée et les méthodes et moyens sont en évolution constante.

Toute suspicion doit débuter par une prise d'anamnèse et de commémoratifs exhaustive, un examen physique complet et rigoureux et des examens complémentaires de routine ainsi que des tests détectant le parasite ou la réponse immunitaire de l'hôte.

i. Signalement et anamnèse :

Toutes les races de chien peuvent être infectées bien que, comme mentionné dans les parties précédentes, certaines races semblent être prédisposées à déclarer la maladie clinique, telles que le Berger allemand ou le Boxer. Par ailleurs, une prédisposition de sexe semble exister chez les hommes et les hamsters syriens à

savoir que les mâles présenteraient un risque plus élevé que les femelles vis-à-vis de l'infection. Cette prédisposition reste à démontrer chez le chien.

Les chiens peuvent être infectés à n'importe quel âge, toutefois, la prévalence de l'infection présente une distribution bimodale avec un premier pic s'exprimant chez les chiens de moins de trois ans et un second chez les chiens âgés de huit à dix ans.

Etant donné que la distribution de la maladie varie d'une zone géographique à une autre, savoir si un chien a voyagé dans une zone connue pour être endémique ou a vécu dans une de ces zones est une étape essentielle pour le diagnostic.

Il est également nécessaire de savoir si l'animal a reçu ou reçoit un traitement préventif efficace contre les vecteurs ou si des traitements interférant avec l'efficacité du système immunitaire ont été administrés.

Enfin, il est également important d'interroger le propriétaire sur l'existence de signes remarquables et compatibles avec une infection par la leishmaniose tels que perte de poids, signes cutanés, polyurie-polydipsie ou épistaxis.

ii. Examen physique :

Il vise à détecter les signes décrits dans la partie précédente.

iii. Examens complémentaires :

Suite à l'examen physique, les examens de laboratoires 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. On peut noter également 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 **biochimie complète** dont les anomalies possibles sont une hyperprotéïnémie, une hypo-albuminémie, une hyperglobulinémie (et donc un ratio albumine/globuline anormal), une azotémie. A cette biochimie peut se rajouter un profil de coagulation de base pouvant mettre en évidence une hyper-fibrinogénémie et une augmentation potentielle du temps de prothrombine ainsi que du temps de thromboplastine activée.
- une **électrophorèse des protéines** suggérant une hypo-albuminémie, une augmentation de la concentration des alpha2-globulines et une gammopathie poly ou oligo-clonale.
- une **analyse d'urine** : on peut noter une isosthénurie ou des urines diluées ainsi qu'une protéinurie plus ou moins importante.

Lors de leishmaniose, ces tests permettent donc de détecter un ou plusieurs changements compatibles avec la maladie.

En fonction des résultats, d'autres examens complémentaires peuvent être envisagés dans un deuxième temps à savoir :

- Profil de coagulation complet
- Myélogramme
- Des tests de fonction hépatique
- Des examens d'imagerie médicale : radiographie et/ou échographie abdominale
- La détection des anticorps anti-érythrocytaires
- Un dosage des protéines sériques de la phase aigüe de l'inflammation.
- Cytologie ou histologie de tissus ou de liquides biologiques.

b. Diagnostic étiologique :

Dès lors que le clinicien présente une forte suspicion de leishmaniose, des tests plus spécifiques peuvent être mis en œuvre dans le but d'obtenir un diagnostic étiologique, en gardant à l'esprit une approche intégrée. En effet, trouver des leishmanies dans les tissus cibles tels que la moelle osseuse ou les nœuds lymphatiques n'est pas forcément indicateur d'une infection établie et ne permet pas de conclure à une relation de causalité entre les signes cliniques observés et l'infection par le parasite *L. infantum*. Cependant, la présence du protozoaire dans des tissus présentant des lésions compatibles avec la maladie est une preuve relativement fiable. La plupart des tests de diagnostic étiologique nécessitent l'envoi des échantillons à des laboratoires de référence à l'exception de certains tests tels que l'évaluation microscopique d'un étalement d'une ponction de nœud lymphatique ou d'une autre lésion.

Avoir à disposition des tests diagnostiques fiables, ayant une sensibilité et une spécificité élevées, afin de détecter l'infection aussi bien chez des animaux symptomatiques que porteurs sains est essentiel. Selon l'objectif poursuivi (études épidémiologiques, confirmation d'une infection par *Leishmania infantum*, suivi thérapeutique), le choix des tests sera variable dans la mesure où leur sensibilité, spécificité et coût diffèrent. Chacun des tests présente des avantages et des inconvénients qu'il est important de connaître afin d'interpréter les résultats de manière adéquate.

On peut séparer les méthodes diagnostiques en deux catégories :

1- Méthodes directes :

Les méthodes de diagnostic direct permettent de révéler la présence du protozoaire ou de son ADN quelques semaines après l'infection. Une proportion des chiens infectés peuvent présenter un résultat négatif peu de temps après un premier diagnostic direct positif même en l'absence de traitement. On ne sait pas si ces chiens ont éliminé l'infection, ou bien si celle-ci est devenue indétectable ou encore si le parasite se trouve localisé dans des tissus différents de ceux examinés lors du diagnostic initial (Paltrinieri, 2010).

i. Cytologie :

Un diagnostic de certitude peut être établi par l'observation directe d'amastigotes de leishmanies sur des étalements d'échantillons de tissus infectés colorés au Giemsa ou par une coloration spécifique.

Les prélèvements réalisés sont des aspirations à l'aiguille fine de tissus ou de lésions papuleuses, nodulaires ou ulcératives, cutanées, de la moelle osseuse ou des nœuds lymphatiques, ou encore de liquides biologiques tels que du sang, du liquide synovial, du liquide céphalo-rachidien, etc.... en fonction des anomalies révélées par l'examen physique ou les examens complémentaires. La majorité des échantillons sont obtenus par des méthodes relativement invasives, inutiles chez les chiens asymptomatiques.

Le matériel prélevé peut être stocké et envoyé à un laboratoire de référence si les résultats sont négatifs afin de procéder à des tests moléculaires comme par exemple une PCR.

La cytologie permet la détection au microscope d'amastigotes dans les macrophages des tissus infectés voire dans les monocytes ou les neutrophiles ou bien de manière extracellulaire du fait de la destruction cellulaire lors de la préparation des frottis des cellules très fortement infectées. Il s'agit de corps ronds à ovales, mesurant de deux à quatre micromètres de diamètre. Voir la figure 12. Leur cytoplasme apparaît bleu pâle, avec un noyau relativement grand et coloré en rouge. Dans le même plan que le noyau, mais perpendiculaire à celui-ci on peut observer un corps en forme de tige, rouge foncé à violet, le kinétoplaste.

En 1989, Cenini a développé une technique grâce à laquelle la viabilité des amastigotes peut être évaluée. Après avoir coloré les éventuels amastigotes avec du di-acétate de fluorescéine et du bromide d'éthidium, les échantillons sont placés sous lumière bleue et les parasites vivants présentent une fluorescence verte alors que les morts apparaissent oranges. La principale limite de cette méthode est que comme la précédente, elle nécessite un microscope à fluorescence relativement coûteux, mais elle se révélerait très utile pour le suivi de l'efficacité du traitement.

En 2001, une méthode de fluorescence directe et rapide sur le buffy-coat a été décrite par Liarte. Sa sensibilité est élevée pour détecter des amastigotes dans le sang périphérique de chiens infectés. Cette méthode consiste à séparer les globules blancs par centrifugation à l'aide d'un tube à micro-hématocrite recouvert de colorant pour l'ADN à savoir de l'acridine orange associé à de l'oxalate de potassium. Les amastigotes sont visualisés par la suite du fait de leur fluorescence. Mais il reste à évaluer la spécificité de cette méthode en condition non expérimentale.

La densité parasitaire sur la préparation peut être estimée en comptant le nombre d'amastigotes par rapport au nombre de globules blancs. Une échelle logarithmique de 0 à +6 peut être appliquée. Il s'agit d'une technique relativement laborieuse, qui ne permet qu'une appréciation semi-quantitative et qui indique l'intensité de la multiplication. En prenant en compte le fait que le nombre d'organismes de chaque échantillon est très variable, augmenter le temps d'observation et le nombre de champs observés permet d'améliorer la sensibilité de la méthode. (Maia et Campino, 2008)

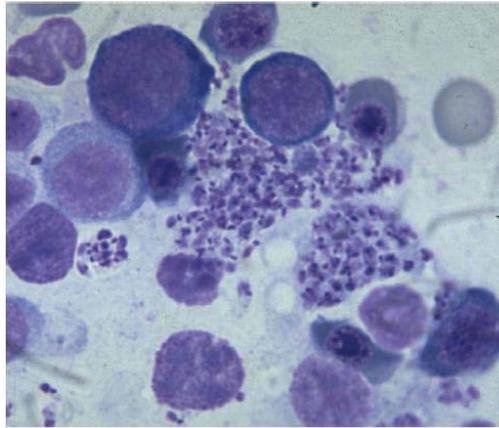


Figure 12 : cytologie obtenue sur un chien atteint de leishmaniose cutanée. On observe de nombreux amastigotes dans le cytoplasme des macrophages.

(Freeman, 2010)

Par ailleurs, l'évaluation cytologique permet également de mettre en évidence des changements consécutifs à l'infection tels qu'une inflammation lympho-plasmocytaire ou granulomateuse voire pyo-granulomateuse, une hyperplasie réactionnelle des nœuds lymphatiques, une hyperplasie myéloïde et une hypoplasie de la lignée érythrocytaire.

En l'absence de signes cliniques pouvant être attribués ou impliquant un organe en particulier, des échantillons devraient être obtenus des tissus les plus susceptibles d'être atteints. Dans l'ordre décroissant de sensibilité il s'agit de la moelle osseuse, des nœuds lymphatiques, de la rate et du buffy-coat.

En effet, l'évaluation microscopique de frottis de moelle osseuse et de nœud lymphatique a une sensibilité de 60% à 75% pour le premier et de 30% à 50% pour le second. Cependant des études plus récentes ont montré que des amastigotes étaient observés dans 93% des échantillons de moelle osseuse et de nœuds lymphatiques prélevés chez des chiens naturellement infectés par *Leishmania infantum*. Une autre étude, menée cette fois sur des chiens infectés expérimentalement, a montré qu'il était plus probable d'observer des amastigotes sur des frottis de moelle osseuse que de nœuds lymphatiques (Maia et Campino, 2008).

ii. Histologie :

Le parasite peut être détecté sur des préparations de sections de tissus colorés à l'hémalum-éosine classique mais leur détection est plus difficile que lors de cytologies. Une recherche longue et laborieuse est souvent nécessaire pour voir les amastigotes, étant donné la difficulté pour reconnaître le parasite. Les changements morphologiques consécutifs à la présence du parasite peuvent être également mis en évidence.

Dans la mesure où l'examen histologique révèle des modifications tissulaires mais qu'aucun parasite n'a été mis en évidence, une coloration immuno-histochimique peut être réalisée en utilisant des anticorps anti-leishmanies. Cette méthode présente

la limite de donner des faux positifs compte tenu des réactions croisées potentielles. De même que pour la cytologie, en cas de résultats négatifs, des tests moléculaires peuvent être faits.

Bien que la faible sensibilité de cette technique soit reconnue, il a été montré que l'observation d'aspiration du nœud lymphatique poplité était plus sensible que l'observation d'aspirations de rate ou de moelle osseuse. Voir la figure 13. Dans cette étude, les prélèvements ont été réalisés post-mortem, mais des biopsies sur des chiens vivants sont envisageables en clinique et présentent une sensibilité légèrement inférieure (Maia et Campino, 2008).

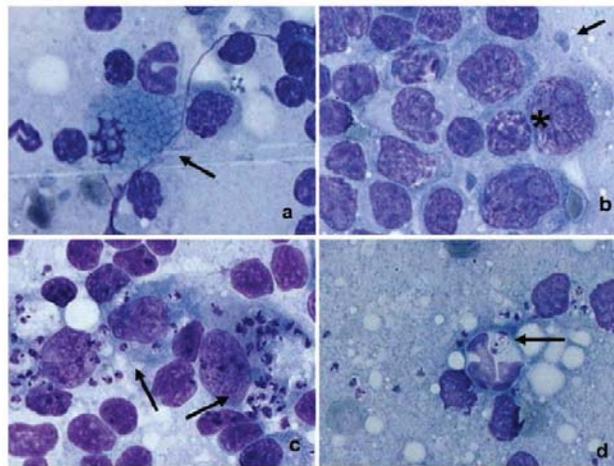


Figure 13 : Cytologie issue de l'aspiration d'un nœud lymphatique poplité d'un chien atteint de leishmaniose viscérale

(Moreira et al, 2010)

iii. Immuno-histochimie :

Ces techniques peuvent être employées comme outil complémentaire pour confirmer le diagnostic fait à partir d'analyse histologique avec des colorations hémalum-éosine, en particulier pour les organes connus pour avoir une faible densité parasitaire.

Ces méthodes reposent sur l'utilisation de tissus fixés dans de la formaline puis enrobés dans de la paraffine pour être mis en présence avec un système dit « biotine/streptavidine-peroxidase » et un sérum canin hyper-immun utilisé comme anticorps primaire, des anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-leishmanies peuvent aussi être utilisés.

Cette technique appliquée à des prélèvements de biopsie cutanée présente une sensibilité supérieure aux méthodes histologiques classiques (62.1% et 44.8% respectivement). Il a été obtenu avec ces techniques d'immunofluorescence une spécificité de 100% pour des prélèvements de nœud lymphatique poplité et une sensibilité de 92.68% chez des chiens symptomatiques, 60% pour les oligo-symptomatiques et 73.91% chez les asymptomatiques. Une autre étude a montré que des leishmanies peuvent être visualisées dans 70% à 100 % des cas par des méthodes d'immuno-histochimie ou d'immunofluorescence appliquée au derme du

museau ou du chanfrein, site préférentiel de piqûre des phlébotomes. (Maia et Campino, 2008)

Cette méthode est donc un supplément intéressant pour confirmer un diagnostic lorsque les parasites ne sont pas clairement identifiables au microscope mais que le pattern histologique est en faveur de la maladie.

Il est important de prendre en considération que les trois techniques décrites ci-dessus sont très dépendantes de l'observateur et requièrent une bonne technicité et de l'entraînement. Ces méthodes peuvent donner lieu à des faux négatifs car la sensibilité dépend de la charge parasitaire ou des faux positifs car des artefacts peuvent être considérés accidentellement comme des amastigotes.

iv. Culture du parasite :

La culture *in vitro* de différents prélèvements de tissus permet d'améliorer la sensibilité de la détection du parasite. Toutes les souches de leishmanies ne poussent pas à la même vitesse et tous les tissus ou organes issus du même chien ne possèdent pas la même charge parasitaire initiale. L'inoculation répétée de plusieurs tubes permet alors d'améliorer la sensibilité de cette méthode diagnostique.

Les milieux de culture utilisés peuvent être soit « monophasiques » tels que le milieu Schneider, le M199, le RPMI, le milieu de Grace, soit « diphasiques » tels que le milieu Novy-McNeal-Nicolle ou Brain-Heart-Infusion. Une ou deux gouttes d'aspiration ou de fragments d'organes homogénéisés sont inoculées à ces milieux puis ceux-ci sont mis à incuber à une température de 22°C à 26°C. Les cultures sont par la suite examinées toutes les semaines afin de détecter la présence de promastigotes.

Les résultats peuvent être très variables à savoir que la visualisation de parasites est possible dès la première semaine ou bien nécessiter plusieurs réensemencements, notamment la réalisation de sous-cultures pendant au minimum trois semaines. En général, une culture est considérée négative à la suite de quatre sous-cultures négatives successives.

En 2006 et 2007, Madeira et al et Maia et al ont montré que des échantillons de rate, de nœud lymphatique ou de moelle osseuse constituent les matériaux biologiques avec le meilleur pourcentage de culture positive, la rate étant l'organe de choix selon certains auteurs.

Cependant, le prélèvement du matériel biologique nécessaire met en œuvre des techniques invasives voire dangereuses notamment pour la ponction splénique en cas de thrombocytopenie, il faut alors préférer une aspiration du nœud lymphatique poplité.

Bien qu'il s'agisse du test le plus spécifique, la spécificité étant de 100%, les techniques de culture sont moins utilisées de nos jours du fait de leurs inconvénients. En effet, le milieu nécessaire au développement du parasite n'est pas disponible dans le commerce et donc ces cultures ne sont réalisées qu'en laboratoire spécialisé pour le moment. Il s'agit d'une méthode longue et laborieuse dans la mesure où il

faut au moins une trentaine de jours pour obtenir des résultats, le risque de contamination microbiologique est également important.

v. PCR : Polymerase Chain Reaction

L'utilisation de la PCR pour la détection de la leishmaniose a grandement amélioré la sensibilité du diagnostic parasitaire. En effet, les méthodes basées sur la PCR appliquées à la détection de leishmanies permettent de déterminer la présence des parasites aussi bien lors de maladie « évolutive » que dans les formes asymptomatiques mais aussi pour suivre l'évolution du statut parasitaire après un traitement médical.

Comme mentionné précédemment, il est conseillé de réaliser une PCR quand les résultats de la cytologie ou de l'histologie sont négatifs malgré une forte suspicion du fait de signes cliniques en faveur de l'infection.

1. Considérations générales :

La PCR consiste en l'amplification de séquences spécifiques du génome de leishmanies. Les PCR ciblant certaines régions spécifiques du matériel génétique du parasite qui ont montré la meilleure sensibilité sont celles ciblant l'ADN kinétoplastique (ADNk), la région ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) de l'ARN ribosomal (ARNr) de *Leishmania infantum* issus d'échantillons de rate ou de nœuds lymphatiques de chiens séropositifs ou encore l'ADN de parasites présents dans des tampons conjonctivaux (Leite et al, 2010). Ceci s'explique par le nombre de copies des différents gènes présents dans le génome de *Leishmania infantum* : quarante à deux cents copies pour le gène de l'ARNr et plus de dix milles copies pour le gène de l'ADN kinétoplastique circulaire. Il est ainsi possible de détecter de très faible quantité de parasites dans les matériels biologiques.

La PCR basée sur l'ADNk est à ce jour la méthode PCR la plus sensible.

Le matériel de choix consiste en des échantillons frais, congelés ou fixés dans de l'alcool éthylique à 95%.

Un avantage de cette technique est la possibilité d'utiliser plusieurs types tissulaires pour détecter le parasite. Les plus utilisés par ordre de sensibilité décroissante sont les échantillons de moelle osseuse ou de nœuds lymphatiques, peau, de conjonctive, du buffy-coat (couche de cellules blanches concentrées issus du sang centrifugé) et de sang total. En effet, selon Maia et al en 2007, la PCR sur nœud lymphatique est la technique de premier choix pour le diagnostic ou le suivi post-chimio-thérapeutique, suivi par une PCR sur moelle osseuse pour les chiens n'ayant pas de nœud lymphatique poplité détectable. En ce qui concerne les tampons conjonctivaux, leur utilisation pour le diagnostic et le suivi post-traitement est très intéressante dans la mesure où ils présentent une bonne sensibilité et spécificité pour la détection de *Leishmania infantum* chez des chiens symptomatiques puisque l'ADN du parasite est détecté dans 91,7% des cas. De très bons résultats ont également été obtenus en utilisant cette méthode chez des chiens asymptomatiques puisque des sensibilités de 90% et de 83% ont été obtenus (Maia et Campino, 2008).

De plus, le fait que leur prélèvement soit non invasif constitue également un avantage considérable

Par ailleurs, une PCR menée sur du sang total périphérique est plus simple à réaliser et donc plus acceptable pour les propriétaires que d'autres méthodes beaucoup plus invasives notamment les biopsies de moelle osseuse ou de nœud lymphatique. De plus, le sang total prélevé puis filtré en vue de la réalisation de PCR peut également être utilisé pour les études épidémiologiques en complément des résultats de sérologie. Mais, il est important de garder à l'esprit qu'en ce qui concerne le sang total, la durée, la stabilité et l'intensité de la parasitémie chez les hôtes canins sont toujours des données mal connues, et sont associées à de nombreux faux-négatifs surtout lorsque les chiens sont asymptomatiques. D'un autre côté, pendant la saison de transmission, les faux-positifs peuvent être plus fréquents du fait de la contamination naturelle ou des infections transitoires.

L'ADN de leishmanies est également retrouvé dans d'autres tissus : foie, poumons, organes génitaux, sperme, reins, intestin, lait ou encore urine (Maia et Campino, 2008).

2. Plusieurs techniques PCR disponibles :

A ce jour, trois techniques de PCR sont valables :

- La PCR dite conventionnelle ou classique
- La PCR dite nichée
- La PCR dite quantitative en temps réel.

La PCR nichée est plus sensible mais moins spécifique que la première car les étapes supplémentaires du processus augmentent le risque de contamination.

La PCR quantitative en temps réel permet un suivi continu de l'amplification de séquences d'ADN spécifiques pendant que les réactions ont lieu. Ceci permet la quantification précise du matériel génétique présent initialement et donc une estimation de la charge parasitaire dans les différents échantillons, une donnée importante non seulement pour le diagnostic mais aussi et surtout pour le suivi des patients traités permettant ainsi la prédiction des rechutes associées à la charge de parasites résiduelle après traitement.

La PCR quantitative en temps réel repose notamment sur l'utilisation de sondes fluorescentes. Par exemple, SYBR Green technology est un système de détection non spécifique basé sur un intercalant fluorescent de l'ADN, utilisable pour toutes les cibles potentielles. La technologie Taq-man est plus spécifique puisqu'elle permet l'évaluation directe de la quantité d'ADN amplifié en utilisant une sonde fluorescente spécifique pour la séquence cible bordée par l'amorce. Cette technique aussi sensible que la PCR nichée est moins sujette aux faux-positifs. Les autres avantages de la PCR quantitative temps réel par rapport aux techniques de PCR classique sont la réduction du temps expérimental et la meilleure sensibilité. En effet, elle permet de détecter de très faibles quantités de parasites. Une étude récente sur des chiens naturellement infectés a montré que la PCR quantitative en temps réel sur de l'ADN kinétoplastique isolé de prélèvement de sang ou de moelle osseuse est beaucoup plus sensible que la technique conventionnelle (Miro et al, 2008). En effet, cette

dernière détecte les chiens avec une charge parasitaire supérieure à trente parasites par millilitre alors que la PCR temps réel réalisée sur les mêmes prélèvements détecte des charges inférieures à un parasite par millilitre.

Il s'agit de la technique diagnostique de premier choix lorsqu'elle est à disposition du praticien.

Une partie de la variabilité de la sensibilité observée entre les différentes études peut être expliquée par la distribution hétérogène du parasite dans chaque tissu ou par le lien existant entre le type d'organe et la charge parasitaire, associé au tropisme de la souche de leishmanies ainsi qu'à la réponse immunitaire locale.

L'efficacité des techniques de PCR est dépendante de facteurs tels que les amorces utilisées, le nombre de copies de la cible, la méthode d'extraction de l'ADN, et le protocole ainsi que le matériel utilisés.

Toutefois, un résultat PCR négatif chez un chien cliniquement suspect n'est pas suffisant pour écarter une infection par *Leishmania infantum*. Et il est nécessaire de ne pas dissocier les résultats obtenus par ces techniques des données obtenues à l'examen clinique et avec les autres examens complémentaires. Le traitement de chien cliniquement sain mais positif à la PCR n'est pas recommandé à ce jour (Solano-Gallego et al, 2009).

vi. Xénodiagnostic (pour information)

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.

L'infectiosité des chiens infectés pour les phlébotomes a été évaluée dans le bassin méditerranéen en utilisant des vecteurs très compétents à savoir *Phlebotomus perniciosus* et *P. ariasi*, alors qu'en Amérique du sud la plupart des études sont menées avec le vecteur naturel *Lutzomyia longipalpis*. Différents taux d'infection ont été obtenus variant de 21.9% à 92% pour les vecteurs du genre *Phlebotomus* et de 13% à 29% pour ceux du genre *Lutzomyia*. Cette divergence pourrait être expliquée par le fait que le seuil du nombre de parasites nécessaires pour infecter *P. perniciosus* est plus faible que celui nécessaire pour infecter *L. longipalpis*.

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 (Saridomichelakis, 2009). 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 oligo-symptomatiques que pour ceux qui se sont gorgés sur des chiens polysymptomatiques.

Mais même si le xéno-diagnostic a été utilisé pour résoudre des problématiques épidémiologiques importantes à propos de l'importance du statut clinique et du traitement médical sur l'infectiosité des chiens et bien que cette méthode soit très sensible et spécifique, il est évident qu'elle est rarement employée en routine pour le diagnostic de la leishmaniose canine dans la mesure où les colonies de phlébotomes ne sont disponibles que dans des conditions de laboratoire spécialisé.

vii. Isolement du parasite après inoculation à des animaux de laboratoire :

La présence du parasite peut être démontrée après inoculation à des hamsters dorés. Après inoculation, ces animaux sont examinés chaque semaine à la recherche de signes d'infection comme par exemple une hépato-splénomégalie. Les amastigotes peuvent être récoltés au niveau de la rate ou du foie.

Cette méthode n'est pas utilisée comme test diagnostique en clinique compte tenu de la complexité de sa réalisation, du délai pour obtenir un résultat et du développement des techniques moléculaires

2- Méthodes indirectes :

i. Sérologie :

1- Généralités :

Le diagnostic sérologique est largement et fréquemment utilisé. Bien que la réponse humorale lors de leishmaniose canine clinique soit en général très intense (avec un titre en immunoglobulines spécifiques élevé), la sérologie sous-estime le taux d'infection par ce parasite pour les chiens vivants en région endémique (voir plus haut). 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 sérologique afin d'obtenir un diagnostic, par exemple trois mois plus tard.

Par ailleurs, la détermination des sous-classes d'immunoglobulines G n'est en général pas utilisée pour le diagnostic. Le taux des sous-classes d'immunoglobulines G spécifiques chez les chiens a été évalué en tant que marqueur de sensibilité ou de résistance et par conséquent pour définir le statut des animaux infectés. La plupart des études traitant de la production des immunoglobulines ont mis l'accent sur la réponse en immunoglobulines G₁ et G₂ afin de faire le lien entre le titre de ces sous-classes, et le type de réponse Th1 ou Th2 mais les résultats obtenus chez le chien sont contradictoires.

En 2005, Iniesta a montré que les immunoglobulines E étaient seulement exprimées par les animaux développant l'infection, mettant en avant l'utilisation potentielle de cet isotype comme marqueur de la maladie active. Ces résultats ont été renforcés par Reis en 2006 qui a montré une forte corrélation entre le titre en immunoglobulines E et la symptomatologie.

Les immunoglobulines A ont également été détectées et compte tenu de leur rôle dans l'immunité mucoale, cet isotype peut potentiellement représenter un marqueur de dissémination de l'infection.

De nombreux tests sérologiques ont été et sont employés à des fins de diagnostic individuel, pour des études épidémiologiques ou pour la recherche. Des parasites entiers ou des extraits solubles sont utilisés en tant qu'antigène pour ces techniques et la variété d'antigènes utilisés, associée à la diversité des procédures et la sélection de seuils de dilution différents ont conduit à des résultats parfois contradictoires et ont rendu leur comparaison difficile entre plusieurs études. Selon certains (Gomes et al, 2008), il semblerait que les méthodes utilisant des corps entiers de parasite permettent d'obtenir des résultats plus reproductibles et plus fiables tandis que pour d'autres (Ferreira et al, 2007), les réactions croisées sont moins fréquentes avec des tests utilisant des polypeptides recombinants contenant des épitopes spécifiques comme rA2, rK9, rK26 et rK39. Certaines techniques, bien que présentant une sensibilité et une spécificité remarquable comme le western blot, ne sont pas utilisées à ce jour du fait d'un manque de standardisation de la méthode ou du coût de celle-ci. Les techniques les plus employées à ce jour sont l'Immunofluorescence indirecte (IFAT), l'ELISA, et le test rapide d'immunochromatographie.

Enfin, 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 qui sous-estiment le niveau d'infection par *Leishmania* 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).

2- IFAT : Indirect immunofluorescent antibody test

Il s'agit de placer plusieurs dilutions successives d'un même sérum sur des lames recouvertes de promastigotes de leishmanies. Les anticorps spécifiques contenus dans le sérum se lient à ces derniers et le titre en anticorps est révélé par des

anticorps anti-anticorps marqués à la fluorescéine. Les échantillons pour lesquels on observe une fluorescence verte homogène à de fortes dilutions sont considérés comme positifs tandis que ceux présentant une coloration rouge mate sont considérés comme négatifs.

Bien que le titre en anticorps ne soit pas toujours corrélé avec la sévérité des signes cliniques, ce dernier est toutefois utile pour distinguer les chiens infectés sub-cliniques ayant généralement un faible taux d'anticorps de ceux présentant la maladie, dont le parasite s'est disséminé et dont le titre en anticorps est généralement élevé (Paltrinieri, 2010).

Une attention doit être apportée à l'analyse des taux d'anticorps car en fonction des laboratoires, la limite de référence n'est pas toujours identique.

La spécificité de cette méthode peut être affectée par des réactions croisées liées à d'autres infections ou plus rarement du fait de désordres métaboliques. Les anticorps contre *Trypanosoma cruzi* sont reconnus depuis longtemps comme la principale cause de réaction croisée lors d'IFAT dans les régions endémiques pour les deux maladies c'est-à-dire en Amérique centrale et du sud et dans certaines régions du sud des Etats-Unis (Paltrinieri, 2010)

La sensibilité de l'IFAT pour détecter des chiens infectés varie de 21.6% à 100% en fonction des études. Une étude de 2007 menée par Maia chez des chiens symptomatiques et asymptomatiques a montré que la sensibilité était de 85.5% et la spécificité de 94.7%. L'IFAT, utilisant des antigènes entiers de promastigotes est très spécifique et sensible pour la détection de leishmaniose clinique mais manque de sensibilité pour détecter l'infection de chiens cliniquement sains. Mais, l'utilisation d'amastigotes comme antigène plutôt que de promastigotes permettrait d'améliorer la sensibilité pour détecter les anticorps spécifiques chez les chiens ayant de faible titre et ceci sans perdre de spécificité.

L'évaluation de l'intensité de la fluorescence est subjective, représentant une limite à ce test. Mais étant donné qu'il s'agit d'une technique très sensible et spécifique dans de nombreuses régions endémiques, l'IFAT est recommandée par l'Office International des Epizooties et est considérée comme GOLD STANDARD pour le diagnostic sérologique. Il est donc très utile pour les études épidémiologiques, en pratique clinique et pour le suivi de l'efficacité des traitements mis en place.

Cependant, comme tout test, l'IFAT présente quelques limites. En effet, sa mise en œuvre nécessite un haut niveau de compétence et d'expérience et des structures de laboratoires coûteuses. Un autre inconvénient de cette technique est le fait qu'elle requiert plusieurs dilutions du sérum récolté, rendant ce test un peu laborieux lors du screening de nombreux échantillons.

Mais quelques kits commerciaux d'IFAT sont maintenant disponibles.

3- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Des sérums dilués sont placés dans des micro-cupules recouvertes d'antigènes de leishmanies. Lorsque l'animal est séropositif, une réaction colorimétrique se produit et peut être quantifiée par spectrophotométrie, n'impliquant ainsi pas d'évaluation

subjective. Cette technique est utile pour les analyses de laboratoires ainsi que pour les applications sur le terrain puisqu'elle permet de tester un grand nombre d'échantillons en peu de temps.

La sensibilité (29 à 65%) et la spécificité (96 à 100%) des tests ELISA dépendent de l'antigène utilisé. Voir le tableau 4.

Généralement, il s'agit d'extraits d'amastigotes, de cytoplasmes entiers, d'antigènes purifiés, de peptides synthétiques définis ou encore de protéines recombinées. Les techniques employant des extraits de parasites entiers sont sensibles pour la détection d'infections cliniques ou sub-cliniques mais elles présentent une faible spécificité. Les technologies utilisant des protéines recombinées ont permis de développer des méthodes séro-diagnostiques plus spécifiques. En effet, la technique ELISA utilisant des peptides recombinés est très spécifique mais manque de sensibilité pour la détection des porteurs sains, en fonction de l'antigène employé. Il a été montré que les tests ELISA basés sur les antigènes recombinés suivants : K9, K26, K39 ont une sensibilité et une spécificité importantes.

Tableau 4 : Sensibilité et spécificité de techniques ELISA utilisant des antigènes recombinés pour le diagnostic de leishmaniose viscérale canine. (Maia et Campino, 2008)

Antigen	Reference	Sensitivity (%)	Specificity (%)
rLdA2	Carvalho et al. (2002)	87.00	100
Hsp70	Andrade et al. (1992)	75.00	–
rLiP0	Soto et al. (1995b)	78.00	–
rLiP2a, rLiP2b	Soto et al. (1995a)	80.00	100.00
rHSp83	Angel et al. (1996)	88.00	–
rHSp70 (FAST)	Quijada et al. (1996)	100.00	–
rLiH3 (FAST)	Soto et al. (1996)	81.00	100.00
LI gp63	Morales et al. (1997)	100.00	–
LiP2a-rLiP2b-rLiP0-rH2A (FAST)	Soto et al. (1998)	79.00–93.00	96.00–100.00
Hsp70, KMP-11	Nieto et al. (1999)	100.00	–
rLiH2A, rLiH2B, rLiH3, rLiH4 (FAST)	Soto et al. (1999)	44.00–72.00	–
rPSA	Boceta et al. (2000)	100.00	–
rk-9	Rosati et al. (2003)	95.00	100.00
rK-26	Rosário et al. (2005) and Rosati et al. (2003)	99.10–100	96.00–100.00
rK-39	Rosário et al. (2005)	95.0–98.10	100.00
rK-40	Mettler et al. (2005)	52.90–64.70	96.00–100
rK9-rK26-rK39	Boarino et al. (2005)	96.00	99.00

Seuls les rK39 et les antigènes multiples chimériques rLiP2a-rLiP2b-rLiP0-rH2A sont commercialisés.

La sensibilité de l'ELISA varie en fonction des études de 94.1% à 100% chez des chiens asymptomatiques à 100% chez des chiens symptomatiques lorsque des promastigotes ou des amastigotes solubles sont utilisés comme antigène alors que la sensibilité et la spécificité étaient de 100% dans une étude utilisant un dot-ELISA basé sur l'emploi d'une protéine-A-peroxydase (Solano-Gallego et al, 2003) L'avantage d'utiliser la protéine A marqué d'une peroxydase au lieu d'un anticorps secondaire anti-anticorps est la possibilité d'utiliser ce test pour des sérums d'humains ou d'autres hôtes potentiels. Par ailleurs, un ELISA avec la protéine A peroxydase a été employé sur de l'urine de chiens. Etant donné que des résultats positifs n'ont été trouvés que chez des chiens protéinuriques, la détection des

anticorps dans l'urine est une méthode plus spécifique et plus fiable, peu invasive pour le diagnostic de la leishmaniose chez des chiens présentant une glomérulopathie (Solano-Gallego et al, 2003).

Par contre un point essentiel est que l'espèce de leishmanies utilisée comme antigène influence grandement le résultat des tests. Les préparations à base de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* au lieu de *L. chagasi* résulte en une diminution de l'activité des anticorps mesurée par ELISA pour la détection de la leishmaniose canine.

Plusieurs tests ELISA réalisable en peu de temps ont été développés pour la détection de la leishmaniose canine. Un dot-ELISA sur membrane de nitrocellulose réalisable en 30 minutes et un test rapide commercial (Snap® CLATK) présentent une sensibilité et une spécificité élevées associées à une grande facilité d'emploi. Le Snap® CLATK a aussi l'avantage d'être réalisé avec du sang total. Bien que ces quelques kits commerciaux soient disponibles, des informations plus précises sur leur performance diagnostique sont nécessaires afin de développer leur emploi en routine.

4- Test rapide d'immuno-chromatographie :

Les tests d'immuno-chromatographie sont faciles à mettre en œuvre et semblent 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'IFAT ou de l'ELISA.

Le problème le plus important est donc le nombre de 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. En revanche, cette méthode permet, en Amérique latine, de différencier les animaux infectés par la leishmaniose de ceux infectés par *Trypanosoma cruzi* grâce à l'utilisation d'antigènes recombinés spécifiques de leishmanies.

Un test immuno-chromatographique utilisant les antigènes rK39 recombinant est également disponible commercialement sous la forme de bande de papier de nitrocellulose imprégnée d'antigènes et adapté à l'utilisation dans des conditions de terrains. L'apparition de deux lignes indique une réponse positive. N'importe quel résultat est considéré comme non interprétable si le contrôle n'apparaît pas. 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 bandes à température élevée et de l'impossibilité de réaliser ces tests avec des échantillons de sang total. Pour d'autres, l'inconvénient majeur des ces bandes 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.

5- CIE : Contre-immunoélectrophorèse :

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.

Il a été montré que la sensibilité de cette technique était de 85.5% et la spécificité de 94.7% dans une étude réalisée chez cent quarante trois chiens dans une zone endémique (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, notamment en France.

6- 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.

Cette méthode est facile à réaliser, elle ne requiert pas d'équipements sophistiqués et a un débit élevé facilitant grandement 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).

7- Direct Agglutination Test : DAT

Ce test utilise des promastigotes entiers, colorés, en suspension ou sous forme sèche congelée. C'est un test simple et peu coûteux, utilisable pour les études de terrain comme en laboratoire. Du sérum ou du plasma peuvent être analysés.

Dans plusieurs études menées sur des chiens en zone endémique, la sensibilité du DAT était de 70.6% dans une étude (Mohebbali et al, 2004) et de 100% dans une autre (Silva et al, 2006) alors que la spécificité était de 84.9% et de 100% respectivement.

Une des limites de cette méthode est le temps d'incubation relativement long de dix huit heures et le fait que plusieurs dilutions du sang ou du sérum doivent être réalisées. Néanmoins, le développement d'antigènes séchés puis congelés rend le DAT approprié à son utilisation dans des conditions difficiles sur le terrain puisqu'ils restent stables à des températures élevées.

Le Fast Agglutination Screening Test ou FAST combine une concentration parasitaire élevée avec un petit volume testé, ne requiert qu'une simple dilution de sérum et les résultats sont lisibles après trois heures seulement. La sensibilité de cette technique a été évaluée entre 93.6% et 97.7% et la spécificité entre 89.0% et 93.0% (Maia et Campino, 2008)

En 2003, un DAT modifié, l'Easy DAT a été développé par Gomez-Ochoa et présente l'avantage d'avoir des coûts réduits et de diminuer le temps d'élaboration des antigènes.

8- Western Blot :

Cette méthode n'est pas 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 infectés naturellement et expérimentalement. Les chiens dont le traitement a été efficace affichent une faible immuno-réactivité au niveau de la bande 67kDa soulignant le rôle potentiel de cette protéine comme marqueur pronostic (Maia et Campino, 2008).

En 2007, Iniesta utilise le Western Blot pour analyser l'expression des isotypes d'immunoglobulines G1 et G2 chez des chiens naturellement infectés et conclut que l'infection par *Leishmania 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.

Une étude par Western Blot sur l'urine de chiens sains et malades, menée par Zaragoza en 2003 a montré la présence de plusieurs bandes chez les chiens malades.

9- Cytométrie de flux :

Il s'agit d'une technique qui permet de compter, examiner, trier les particules microscopiques en suspension dans un flot de fluide. Elle permet l'analyse de multiples paramètres simultanément, notamment les caractéristiques physiques et/ou chimiques de cellules qui passent simplement à travers un appareil de détection optique ou électronique. La cytométrie devient un outil utile de plus en plus employé dans la santé et la recherche dans la mesure où il s'agit d'une méthode rapide, précise, et reproductible. Plusieurs milliers de particules peuvent être analysées

chaque seconde et les particules ayant des propriétés particulières peuvent même être isolées.

Une étude de 2007 menée par Andrade afin d'évaluer la performance de cette méthode pour détecter les lymphocytes B portant à leur surface des anticorps anti-promastigotes de *L. chagasi*, aussi bien les immunoglobulines G1 que G2, chez des chiens infectés ou vaccinés, a montré qu'il s'agissait d'une méthode utile pour différencier ces derniers et ceci avec une spécificité de 100% pour les deux isotypes d'immunoglobulines et une sensibilité de 97% pour les Ig G1 et 93% pour les Ig G2.

Dans une autre étude, le potentiel de la cytométrie pour le diagnostic de la leishmaniose canine a été estimé en utilisant des antigènes solubles dérivés de promastigotes de *L. infantum* avec le sérum de cohortes de chiens infectés naturellement ou expérimentalement. Cette technique a permis la détection de séropositivité chez des chiens infectés expérimentalement moins d'une semaine après l'inoculation. Cependant, des études futures doivent être envisagées afin d'augmenter la spécificité de la technique car des réactions croisées ont été mises en évidence dans le sérum de chiens affectés par d'autres maladies y compris pour ceux vivant en zone non endémique (Maia et Campino, 2008).

Malgré ses performances, la cytométrie n'est actuellement pas employée pour le diagnostic de la leishmaniose canine mais elle a permis d'améliorer la connaissance à propos de la réponse immunitaire contre l'infection notamment l'étude des sous-classes d'immunoglobulines.

ii. 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.

Cependant, les tests sont moins standardisés que les techniques sérologiques et certains outils utilisés ne sont pas disponibles pour leur emploi en routine, c'est pourquoi ils ne sont pas employés comme méthode diagnostique. Néanmoins, des informations sur la réponse cellulaire peuvent être obtenues grâce à des tests plus facilement réalisables. Il s'agit notamment de l'injection intradermique d'antigènes de leishmaniose ou leishmanines *in vivo*, du test de stimulation *in vitro* des lymphocytes avec des antigènes issus de leishmanies et de la détection d'interféron-gamma. Tous trois évaluent la réponse cellulaire contre les leishmanies et ils pourraient être utilisés pour prédire la susceptibilité ou la résistance des chiens à l'infection. Pour l'instant ces tests ne sont utilisés qu'en recherche. Le développement d'un test pratique et standardisé pour évaluer cette réponse représente un enjeu important pour le suivi de l'évolution de l'infection, la réponse au traitement et pour établir un pronostic.

1- Test Monténégro ou Test cutané à la leishmanine :

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 h après correspond à une réponse positive. Ce test met donc en évidence une hypersensibilité de type retardée (type IV) vis-à-vis d'antigènes de leishmanies.

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 h après et la possibilité de produire une réaction positive de manière iatrogénique conduisant à de faux positifs, d'où sa non-utilisation.

2- Test de prolifération des lymphocytes :

Pour ce test, les cellules mononucléaires sont séparées du sang total, puis stimulées avec des antigènes solubles de *Leishmania* (LSA) ou un mitogène. Des cellules non stimulées sont également mises en incubation en tant que contrôle négatif. La prolifération cellulaire est généralement exprimée à l'aide d'un index de stimulation. Un index de stimulation supérieur à 2, 2.5 ou 3 est considéré comme positif ou selon d'autres études un résultat n'est positif qu'avec un index supérieur à 5 compte tenu de la faible spécificité de la réponse cellulaire contre les antigènes de leishmanies.

Les chiens résistants ou asymptomatiques présentent une forte prolifération *in vitro* à la différence des chiens sensibles car la prolifération des cellules mononucléées des chiens exprimant cliniquement l'infection est abolie.

Par ailleurs, un rétablissement de la prolifération des lymphocytes est noté chez des chiens guéris cliniquement lors de chimiothérapie avec les antimoniate, l'allopurinol ou l'amphotéricine B.

Enfin, il est important de souligner que la réponse de prolifération lymphocytaire est non seulement étroitement liée à la sévérité de la maladie mais aussi au patrimoine génétique et immunologique de l'hôte.

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

Ce test consiste à détecter l'interféron-gamma produit par des lymphocytes circulants dans des surnageants de culture. Les lymphocytes sont incubés avec ou sans LSA pendant soixante douze heures. Le surnageant est récupéré et incubé avec des cellules rénales canine Madin-Derby pendant seize heures. Le surnageant est alors éliminé et les cellules sont infectées avec le virus de la stomatite vésiculeuse puis mises en incubation pendant vingt quatre 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 deux sont considérées comme positives. Ce test permet de quantifier la production de cytokines qui contribuent à 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).

Cette méthode ainsi que la première représente pour certains auteurs la meilleure évaluation de l'immunité cellulaire lors d'infection par la leishmaniose alors que d'autres revendiquent l'emploi de la deuxième en plus de celles-ci.

c. Quelle est la démarche diagnostique à adopter ?

Il s'agit d'une approche diagnostique intégrée pouvant être résumée par la figure 14.

1- Si l'animal est symptomatique :

En règle générale, la leishmaniose canine peut être confirmée rapidement et efficacement par des analyses cytologiques, sérologiques voire des PCR chez des chiens présentant des signes cliniques avérés ou des altérations sévères de leurs paramètres de laboratoire. Des techniques sérologiques quantitatives peuvent être employées puisque la plupart de ces chiens ont un titre en anticorps élevé. Une PCR pourra être réalisée en plus de la sérologie et sera utile lorsque le titre en anticorps n'est pas conclusif ou dans les régions où une sérologie positive pourrait être attribuée à une réaction croisée avec des trypanosomes (Amérique latine essentiellement).

Quand les tissus infectés, y compris la moelle osseuse lors d'anémie, montrent une infection évidente par des leishmanies, les chiens doivent être considérés comme infectés, indépendamment de leur résultat sérologique. Il est important toutefois de souligner que ces chiens présentent habituellement un titre en anticorps élevé, sauf cas sporadiques de lésions très localisées ou des rares cas d'infections précoces pour lesquelles la manifestation clinique précède la réponse humorale.

Quand les tissus ne montrent pas d'infection par des leishmanies, la sérologie devient cruciale pour décider si un chien est malade de leishmaniose ou non. Un titre élevé en anticorps confirmera l'étiologie leishmanienne alors qu'un faible titre en anticorps en général ne plaide pas en faveur de cette étiologie. Chez ces chiens, d'autres procédures diagnostiques, basés sur les signes cliniques initiaux devraient être envisagés.

En ce qui concerne les lésions cutanées évocatrices d'une leishmaniose, des biopsies cutanées sont recommandées en vue de la recherche de leishmanies et d'une analyse histo-pathologique. Par la suite, des tests immuno-histo-chimiques peuvent être entrepris si des altérations histologiques sont montrées sans mise en évidence du parasite par les colorations de routine. Lorsque ces tests se révèlent eux aussi négatifs, une PCR pour détecter l'ADN de leishmanies dans les échantillons de peau devrait être réalisés afin de confirmer les résultats.

Lorsque des lésions autres que cutanées mais fortement suggestives de leishmaniose existent, une PCR devrait être mise en œuvre pour les tissus tels que la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques. Lorsque ces tests moléculaires donnent des résultats négatifs, les chiens ayant également des analyses cytologiques négatives et un titre en anticorps faible peuvent être considérés comme atteints par une autre affection.

Cependant, les chiens vivant en zones endémiques subissant des visites périodiques présentent souvent des signes très vagues et peu spécifiques et le principal problème est de démontrer la relation de causalité entre les altérations observées et le résultat des tests directs ou indirects.

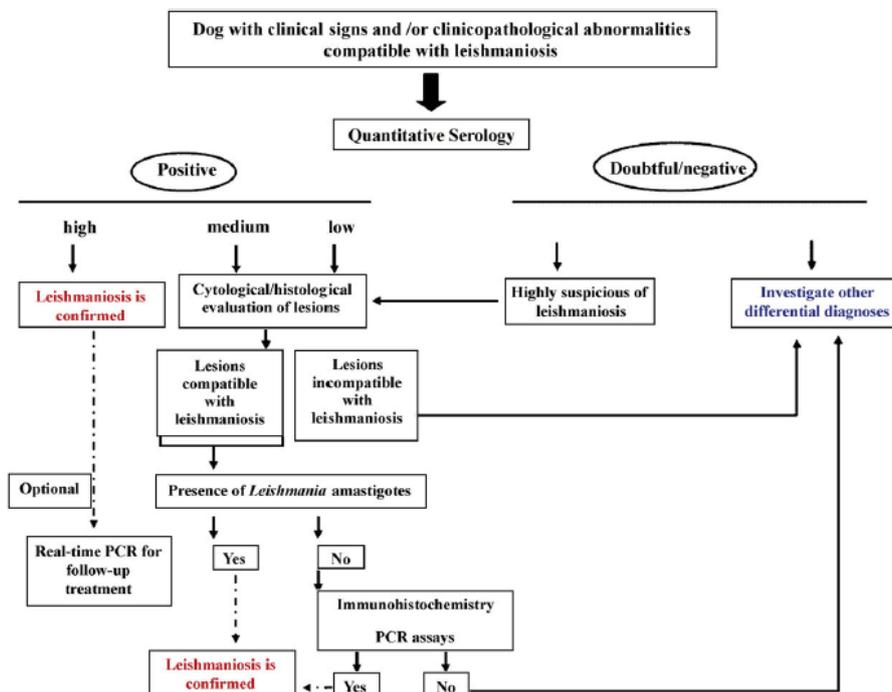


Figure 14 : Algorithme utilisable dans le cadre du diagnostic de la leishmaniose (Solano-Gallego et al, 2009)

2- Si l'animal est asymptomatique :

La recherche de l'infection, lors d'études épidémiologiques par exemple, devrait être menée différemment dans la mesure où les chiens asymptomatiques sont souvent séronégatifs et ont une charge parasitaire faible, qui peut ne pas être détectée par les techniques PCR les moins sensibles comme celle utilisant l'ADN génomique, dont le seuil est de deux à cinq parasites par millilitre de sang.

Il est donc recommandé de réaliser une PCR utilisant l'ADN kinétoplastique sur des prélèvements de nœud lymphatique, de moelle osseuse ou de rate avec en plus une sérologie quantitative.

La déclaration d'un statut négatif doit être confirmée par la répétition des tests après trois mois.

d. Classification clinique des chiens :

Une infection par *Leishmania infantum* peut se développer sur une période de plusieurs semaines à mois avec des manifestations cliniques très variables, et il est donc parfois peu évident de classer les chiens en catégorie spécifique.

Néanmoins, lorsque la leishmaniose est diagnostiquée, les vétérinaires doivent être en mesure d'attribuer un stade clinique à chaque chien dépisté leishmanien afin de mettre en place un traitement adéquat et d'envisager la progression possible de la maladie vers des stades plus sévères. Dans cette optique, le CLWG ou Canine Leishmaniasis Working Group propose une classification des chiens présentant des résultats positifs aux tests sérologiques ou chez qui le parasite a été identifié par des méthodes directes. Bien sûr, cette classification ne doit pas être comprise comme un système rigide et exclusif compte tenu de la complexité de la maladie mais plutôt comme un outil utile pour la gestion des chiens affectés.

1- Stade A : Les chiens exposés.

Il s'agit de ceux ayant des résultats négatifs à la cytologie, l'histologie, la recherche de parasites ainsi que les tests moléculaires ou/et qui ont également un faible titre en anticorps anti-leishmanies.

Les chiens sont cliniquement sains ou peuvent présenter des signes associés à une autre affection. En général les chiens exposés à *Leishmania infantum* sont ceux vivant ou ayant vécu pendant au moins une saison de transmission dans une région géographique dans laquelle la présence de vecteurs de leishmanies a été montrée.

2- Stade B : Les chiens infectés.

Cette catégorie comprend les chiens chez lesquels la présence du parasite a été confirmée à l'aide de méthodes directes c'est-à-dire un résultat positif à l'analyse microscopique, à la culture ou à la PCR. Ces chiens ont également un faible titre en anticorps.

De tels chiens peuvent être sains ou présenter des anomalies à l'examen clinique ou aux analyses de laboratoires, potentiellement associés à d'autres affections.

En région endémique, un résultat positif de PCR réalisée sur des prélèvements cutanés ou de sang en l'absence de lésions et obtenu durant la période de transmission de l'infection ne peut être considéré suffisant pour considérer un chien comme infecté.

3- Stade C : Les chiens malades (avec une leishmaniose clinique évidente).

Il s'agit de chiens avec une cytologie positive indépendamment du résultat des tests sérologiques et des chiens avec des titres élevés en anticorps.

Un ou plusieurs signes cliniques fréquents lors de leishmaniose peuvent être présents. Etant donné les multiples facettes de la maladie, seuls quelques-uns des signes cliniques listés précédemment peuvent être présents.

En l'absence de signes détectables à l'examen clinique, ces chiens sont considérés malades lorsqu'ils présentent des altérations de leurs paramètres hématologiques et/ou biochimiques et/ou urinaires, suggestives de leishmaniose.

4- Stade D : Les chiens sévèrement malades.

Les chiens ayant une condition clinique sévère sont inclus dans cette catégorie s'ils présentent un ou plusieurs critères parmi les suivants :

- Présence d'une néphropathie avec protéinurie ou d'une insuffisance rénale chronique.
- Des problèmes concomitants tels qu'une atteinte oculaire, responsables d'une perte de fonction visuelle ou une atteinte sévère articulaire gênant la mobilité, liés ou non à la maladie et qui requièrent un traitement immunosuppresseur.
- Présence de conditions concomitantes telles que des infections diverses, néoplasies, affections endocriniennes ou métaboliques.

Le diagnostic de la leishmaniose canine représente toujours un challenge malgré les progrès faits en matière de techniques moléculaires, sérologiques ou de détection du parasite. Une méthode standard doit avoir une forte sensibilité et spécificité, doit être reproductible, facile à réaliser, et adaptée à son utilisation en laboratoire sans équipements trop sophistiqués. Elle doit également détecter tous les chiens infectés à un stade assez précoce en utilisant des procédures de prélèvements les moins invasives possibles. Enfin, les coûts doivent être pris en compte afin de choisir la méthode diagnostique appropriée. D'autres recherches doivent donc être mises en œuvre afin d'atteindre tous ces objectifs.

VI- De très timides avancées en matière de traitement :

a. Généralités :

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).

Toutes les substances anti-leishmanies utilisées chez le chien peuvent conduire à une rémission temporaire ou permanente des signes cliniques, mais aucun des protocoles établis à ce jour n'est assez efficace pour éliminer l'infection. Même si les protocoles et le monitoring ont évolué et se sont améliorés, les médicaments utilisés dans les protocoles thérapeutiques restent les mêmes depuis fort longtemps malgré les efforts entrepris. De nouvelles molécules ont été ou sont évaluées mais se sont révélées être plutôt des traitements additionnels à ceux déjà connus. Il s'agirait plutôt de traitements de seconde ligne chez les patients ne répondant pas au traitement de première intention.

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,
- de restaurer une réponse immunitaire efficace,
- de stabiliser l'amélioration clinique induite par les médicaments et de retarder le plus possibles les rechutes
- de traiter les rechutes cliniques.

Afin de choisir le traitement le plus approprié, la classification en stades décrite précédemment peut être utilisée.

Parmi les médicaments possibles, les plus fréquemment utilisés par ordre de décroissance sont : les composés antimoniaux, l'allopurinol, l'aminosidine (ou paromomycine), l'amphotéricine B, la miltéfosine, la pentamidine, la spiramycine associée au métronidazole, la marbofloxacin, l'enrofloxacin et la dompéridone.

b. Aspects pharmacologiques et thérapeutiques des principaux traitements :

1- Les composés antimoniaux :

L'antimoniote de méglumine (ou antimoniote de N-méthyl-glucamine) est le composé le plus utilisé en médecine humaine et vétérinaire pour traiter la leishmaniose.

Les composés antimoniaux agissent en inhibant de manière sélective la glycolyse et l'oxydation des acides gras des leishmanies.

L'antimoniote de méglumine a un temps de demi-vie très court chez les chiens puisqu'il est de vingt et une minutes lors d'administration intraveineuse, de quarante deux minutes lors d'administration intramusculaire et cent vingt deux minutes lors d'administration sous-cutanée. Environ six à neuf heures après administration, 80 à 95% du produit a été éliminé par les reins. Toutefois, la pharmacocinétique des antimoniaux varie de manière significative entre les chiens atteints de leishmaniose clinique et la défaillance rénale pourrait augmenter le temps de demi-vie de ces molécules comme cela a été montré chez le hamster (Solano-Gallego, 2009).

Les composés antimoniaux ont une bonne efficacité clinique. Ils induisent une réduction de la charge parasitaire associée à une restauration de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Une réduction du titre en anticorps peut aussi être observée. En général, l'amélioration des signes cliniques ainsi que des altérations hématologiques et biochimiques est observée après une période de une à plusieurs semaines. Cependant la restauration d'un profil normal d'électrophorèse des protéines sériques peut prendre plus de temps.

En revanche, ce traitement ne permet pas l'élimination complète des parasites chez les chiens infectés puisque quelques mois après le traitement, des leishmanies peuvent toujours être détectées dans certains tissus chez des chiens « guéris » cliniquement. Classiquement, les rechutes cliniques arrivent de quelques mois à un à deux ans après le traitement et leur fréquence augmente lorsque la période de traitement initial était inférieure à quatre semaines (Oliva et al, 2010).

Les effets indésirables les plus fréquents sont une douleur et un gonflement au niveau du site d'injection. Par ailleurs, on peut également observer de la fièvre, de la diarrhée ou une perte d'appétit. Une élévation de l'activité des alanine-amino-transférases (ALAT) et de l'amylase sériques a été rapportée. En revanche, aucune preuve relative à des altérations rénales consécutives au traitement n'existe à ce jour.

En ce qui concerne la posologie, la dose la plus fréquemment utilisée est 100mg/kg par voie sous-cutanée, une fois par jour, pendant quatre semaines, mais compte tenu de la pharmacocinétique de ces composés, cette dose est souvent divisée en deux doses quotidiennes de 50mg/kg.

La mise en place d'un traitement à base d'antimoniote de méglumine au début de la maladie associée à une bonne gestion des rechutes permet d'obtenir une moyenne de survie de quatre ans pour 75% des chiens traités (Oliva et al, 2010).

La question de la résistance à ces composés potentiellement observée est un enjeu considérable en termes de santé animale et humaine et a notamment déjà été démontrée chez l'homme en France et en Italie, c'est pourquoi les antimonies ne sont plus les traitements de première ligne chez l'homme dans ces deux pays. C'est pourquoi des formulations utilisant des liposomes ont été testées et présenteraient une bonne efficacité mais elles sont réservées au secteur hospitalier et ne sont pas disponibles sur le marché pour le moment.

2- L'allopurinol :

Il s'agit d'un analogue structural de l'hypoxanthine. Il inhibe l'activité de la xanthine oxydase, l'enzyme catalysant la production de xanthine à partir de l'hypoxanthine ainsi que celle de l'acide urique à partir de la xanthine. Son activité anti-leishmanie est attribuable à l'incapacité du parasite à synthétiser des purines *ex novo*, ce dernier doit donc être approvisionné par l'hôte. Une fois incorporé par les amastigotes intracellulaires, l'allopurinol est transformé en composé toxique, le 4-amino-pyrazole-pyrimidine, qui tue le parasite.

Chez l'homme en cas de leishmaniose, l'allopurinol a peu d'efficacité lorsqu'il est utilisé en monothérapie, probablement du fait de sa transformation insuffisante en oxypurinol, composé chimique à l'origine du composé toxique mentionné précédemment. Et la combinaison de l'allopurinol avec l'antimoniate de méglumine chez l'homme permet de diminuer les doses de ce dernier.

En revanche, chez le chien, lorsque l'allopurinol est administré seul sur une période de deux à trois mois, on observe une amélioration clinique modérée ainsi qu'une restauration partielle des anomalies biochimiques comme par exemple les protéines de la phase aigüe de l'inflammation. De la même manière que pour les composés précédents, l'allopurinol ne permet pas l'élimination complète du parasite et des rechutes peuvent se produire en cas d'interruption du traitement. C'est pourquoi l'allopurinol est généralement administré pendant plusieurs mois.

L'allopurinol est responsable de peu d'effets indésirables, la tolérance à ce médicament est en effet excellente. Il semblerait même qu'il ralentisse la détérioration de la fonction rénale chez les chiens présentant une protéinurie en l'absence d'insuffisance rénale.

En général, la posologie recommandée varie de 5 à 20 mg/kg, par voie orale toutes les douze heures pendant une période variant de deux mois à deux ans.

3- La combinaison d'antimoniate de méglumine et d'allopurinol :

Il s'agit du traitement le plus fréquent en cas de leishmaniose canine. Il ne permet pas non plus la guérison parasitaire complète. Les chiens recevant ce traitement ont une période de rémission clinique plus longue que ceux traités par une seule des deux substances.

Le protocole classique consiste en l'administration sous-cutanée de 100mg/kg d'antimoniote de meglumine, une fois par jour pendant un à deux mois, associée à l'administration par voie orale de 10mg/kg d'allopurinol toutes les 12 heures pendant plusieurs mois.

Les effets indésirables de ce protocole sont les mêmes que ceux décrits lors de l'administration seule d'un des deux composés.

4- L'aminosidine :

L'aminosidine, encore appelée paromomycine, appartient à la classe des aminoglycosides et possède une activité antimicrobienne et anti-protozoaire. Cette substance a été découverte dans les années 60 mais son utilisation a été négligée jusque dans les années 80, lorsque des formulations topiques et systémiques se sont révélées efficaces pour le traitement de la leishmaniose humaine.

Son mode d'action consiste à empêcher l'association des sous-unités ribosomales de *Leishmania donovani* et à induire une dysfonction du système respiratoire des promastigotes.

Cette substance a été utilisée chez le chien, seule ou associée avec l'antimoniote de méglumine. La combinaison des deux substances permet de meilleurs résultats d'un point de vue clinique et en ce qui concerne la diminution de la charge parasitaire.

Le protocole le plus fréquemment utilisé est l'administration sous-cutanée de 5 mg/kg d'aminoside, une fois par jour pendant trois semaines associée à l'administration de 60 mg/kg d'antimoniote de méglumine par voie intramusculaire toutes les 12 heures pendant quatre semaines.

En revanche les effets indésirables de l'aminosidine sont responsables de la limitation de son utilisation puisqu'elle présente des effets toxiques rénaux et vestibulaires. Son utilisation en première intention n'est pas recommandée.

5- L'amphotéricine B :

Il s'agit d'un polyène qui interagit avec le stérol de la membrane de champignons, particulièrement l'ergostérol. Elle est responsable d'une altération de la perméabilité de ces organismes. En ce qui concerne les leishmanies, leur membrane contient un stérol particulier basé sur l'ergostane, ce qui explique l'efficacité de l'amphotéricine B.

L'inconvénient de cette substance bien que très efficace est sa toxicité rénale importante. En effet, les effets indésirables sont relativement sévères et consistent en une altération de la fonction rénale, un état fébrile, des vomissements et de l'anorexie. Elle est donc d'autant plus dangereuse si elle est utilisée chez des chiens dont les reins sont déjà endommagés. De plus cette substance nécessite une administration intraveineuse et une préparation laborieuse.

Chez le chien, l'amphotéricine B est administrée par voie intraveineuse après avoir été diluée dans une solution saline de chlorure de sodium 0.9% et émulsifiée avec

de l'huile de soja. Cette préparation étant complexe, l'amphotéricine B est par conséquent peu employée par les praticiens malgré son efficacité clinique.

Par ailleurs, il existe une formulation liposomiale dont l'efficacité a été prouvée chez l'homme, présentant moins d'effets indésirables mais dont le coût est beaucoup plus élevé. Son utilisation chez le chien permet une guérison clinique rapide mais généralement suivie de rechutes. Cependant, afin d'éviter le développement de résistance à ce traitement, l'Organisation Mondiale de la Santé n'encourage pas son utilisation chez les chiens atteints de leishmaniose.

6- La miltéfosine :

Il s'agit d'une alkyl-phosphocholine développée chez l'homme en tant qu'agent anticancéreux dans un premier temps, puis utilisée comme traitement de la leishmaniose.

Depuis peu, une formulation par voie orale a été acceptée dans certains pays d'Europe pour le traitement de chiens atteints de leishmaniose mais à ce jour il y a peu d'études rapportant l'efficacité de cette substance pour le traitement de la protozoonose. (Miro et al, 2009 et Woerly et al, 2009)

Son mode d'action consiste à détériorer les voies de signalisation de la synthèse des membranes cellulaires, conduisant à la mort du parasite.

La miltéfosine peut être administrée seule à la dose de 2mg/kg par voie orale une fois par jour pendant vingt huit jours ou bien à la même dose mais associée avec 10mg/kg d'allopurinol deux fois par jour pendant plusieurs mois (Oliva et al, 2010)

Comme les autres traitements précédemment décrits, la miltéfosine ne permet pas une élimination parasitaire complète même si une réduction considérable de la charge parasitaire au sein des nœuds lymphatiques a été montrée à l'aide de PCR quantitative en temps réel. Les rechutes cliniques lors de l'arrêt du traitement avec la miltéfosine seule sont plus fréquentes que lorsqu'elle est associée avec l'allopurinol. Son efficacité est également augmentée en combinaison puisqu'elle équivaut à celle de la combinaison de l'antimoniote de méglumine et d'allopurinol. Elle constitue donc une bonne alternative à l'utilisation des composés antimoniaux (Manna et al, 2009).

Les effets indésirables de cette substance sont mineurs puisqu'ils consistent en de légers vomissements ou de la diarrhée.

En ce qui concerne le risque de développement de résistance vis-à-vis de ce traitement chez le chien, il reste à étudier.

7- La pentamidine :

Il s'agit d'une diamidine aromatisée utilisée comme traitement de seconde intention chez l'homme lors de leishmaniose notamment en Inde (contre *L. donovani*) lorsque des résistances vis-à-vis du traitement de première intention sont observées. Mais le coût du traitement, le risque élevé de développer un diabète sucré insulino-dépendant et la faible efficacité de cette substance ont limité son utilisation.

Par ailleurs, son mode d'action précis reste peu connu. Elle agirait sur la biosynthèse des polyamines ainsi que sur le potentiel des membranes mitochondriales.

Les effets indésirables chez le chien sont sévères à savoir des vomissements, de la diarrhée, de l'hyper-salivation, une hypotension systémique voire même un choc anaphylactique. Par conséquent malgré les bénéfices observés, cette molécule est peu employée chez les chiens.

8- La combinaison de spiramycine et de métronidazole :

Une étude (Pennisi et al, 2005) sur quatre vingt dix jours a comparé l'efficacité de la combinaison de 150 000 U/kg de spiramycine, par voie orale une fois par jour et de 25mg/kg de métronidazole par voie orale une fois par jour avec celle d'antimoniote de méglumine et d'allopurinol. Aucune différence significative n'a été notée entre les deux protocoles suggérant que la combinaison spiramycine-métronidazole pouvait être proposée comme alternative pour le traitement.

9- La marbofloxacin :

Il s'agit d'une fluoroquinolone synthétique de troisième génération développée pour usage vétérinaire. Elle possède une activité puissante contre plusieurs espèces de bactéries, c'est pourquoi elle est fréquemment administrée pour traiter une large variété d'infections à bactéries Gram négative ou positive.

Comme pour les autres quinolones, son mode d'action consiste en l'inhibition de l'enzyme ADN-gyrase. Or les Trypanosomidés comme *Leishmania infantum* possèdent une structure génomique ayant des caractéristiques communes avec les bactéries. Il a été montré que l'activité leishmanicide de la marbofloxacin impliquerait le TNF-alpha et l'oxyde nitrique.

Une étude a été menée sur un petit nombre de chiens afin d'évaluer l'efficacité de ce traitement à la posologie de 2mg/kg de marbofloxacin par voie orale une fois par jour pendant vingt huit jours. Une amélioration clinique a été constatée chez ces chiens (Oliva et al, 2010).

10- L'enrofloxacin :

Il s'agit aussi d'une fluoroquinolone qui améliore la capacité d'élimination des leishmanies par les macrophages via la production d'oxyde nitrique. Les études menées pour connaître l'efficacité de l'enrofloxacin seule ou associée avec le métronidazole ont montré une amélioration clinique partielle associée à une courte durée d'action (Oliva et al, 2010).

11-La dompéridone :

Il s'agit d'un antagoniste des récepteurs dopamine D2 qui possède un effet gastrique prokinétique et une action antiémétique.

Les effets anti-dopaminergiques entraînent la libération de sérotonine, qui stimule la production de prolactine, cette dernière étant considérée comme une cytokine pro-inflammatoire dérivée des lymphocytes. En revanche son mode d'action en termes d'activité leishmanicide reste inconnu.

Le traitement de chiens naturellement infectés avec 1 mg/kg toutes les 12 heures pendant un mois a montré une amélioration des signes cliniques ainsi qu'une diminution du titre en anticorps chez la plupart des chiens (Oliva et al, 2010).

Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence lors de cette étude.

c. Protocoles de traitement recommandés :

Les différents protocoles sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Différents protocoles envisageables lors de leishmaniose canine (Issu de Solano-Gallego et al, 2009)

Protocoles	Médicaments et posologie	Effets indésirables principaux
1^{ère} intention	Antimoniote de N-méthylglucamine 75 à 100 mg/kg SID SC pendant 4 à 8 semaines	Néphrotoxicité potentielle Abscesses et/ou cellulite cutanés
	Allopurinol 10 mg/kg BID PO pendant au moins 6 à 12 mois	Urolithiases de xanthine
2^{ème} intention	Miltéfosine 2mg/kg SID pendant 4 semaines PO	Vomissements Diarrhée
	Allopurinol 10mg/kg BID pendant au moins 6 à 12 mois	Urolithiases de xanthine
3^{ème} intention	Amphotéricine B 0.5 à 0.8 mg/kg IV SID deux fois par semaine pendant 2 mois	Néphrotoxicité
	ou Amphotéricine B sous forme liposomiale 3 mg/kg SID IV pendant 5 jours consécutifs	Néphrotoxicité transitoire
	ou Métronidazole 25 mg/kg SID associé à spiramycine 150 000 U SID PO pendant 3 mois	Non décrit
	ou Marbofloxacin 2 mg/kg SID PO pendant 1 mois	Non décrit

Le protocole le plus utilisé et considéré comme le plus efficace chez le chien est la combinaison d'antimoniote de méglumine et d'allopurinol. Cette combinaison ainsi que la miltéfosine sont les seules drogues autorisées pour le traitement spécifique de la leishmaniose canine en Europe.

Ce traitement peut être administré aux chiens des catégories B, C et D décrits précédemment. La posologie est donc la suivante :

- Antimoniote de méglumine : 100mg/kg, par voie sous-cutanée une fois par jour pendant quatre semaines, voire huit semaines. Cette dose peut être répartie en deux doses journalières de 50mg/kg.
- Allopurinol : 10mg/kg par voie orale toutes les 12 heures pendant au moins six mois.

Pour les chiens des catégories B et C, ce traitement devrait entraîner une guérison clinique stable pendant au moins un an, à condition d'avoir été correctement administré. De plus, on doit également observer une réduction de la charge parasitaire pendant plusieurs mois.

Pour ceux de la catégorie D, ce traitement peut améliorer leur condition clinique. Un point essentiel est la mise en place d'un traitement symptomatique, surtout lorsqu'une insuffisance rénale est présente. Le pronostic est influencé par le statut clinique initial.

L'utilisation d'un protocole alternatif est possible lors :

- d'absence de réponse au traitement recommandé,
- d'occurrence de rechutes peu de temps après la fin du traitement,
- du développement d'effets indésirables sévères,
- de la faible complaisance du propriétaire ou
- de l'indisponibilité des médicaments.

Le choix des médicaments doit être établi en fonction des essais cliniques publiés, des effets indésirables et de la complaisance du propriétaire. Peu de protocoles remplissent ces conditions à savoir :

- l'allopurinol seul : 10mg/kg, par voie orale, toutes les 12 heures pendant au moins six mois
- la combinaison d'allopurinol à la même posologie que ci-dessus avec la miltéfosine à la dose de 2mg/kg par voie orale une fois par jour pendant vingt huit jours

Les autres substances utilisables ont l'inconvénient d'entraîner de sévères effets indésirables.

d. Guide de traitement en fonction du stade clinique :

Les options thérapeutiques sont donc peu nombreuses et le choix d'un protocole doit être fait en tenant compte de la forme clinique de la maladie. Il s'agit d'une des raisons du développement de la classification clinique précédemment décrite. A cette dernière, dans une optique thérapeutique, deux stades supplémentaires peuvent être ajoutés à savoir :

- Le stade E_a : il s'agit des chiens ne répondant pas au traitement recommandé.
- Le stade E_b : il s'agit des chiens présentant une rechute suite à l'arrêt du traitement recommandé.

Le tableau 6 rappelle ces différents stades cliniques.

Tableau 6 : Les différents stades cliniques utilisés pour le traitement des chiens atteints de leishmaniose. (Oliva et al, 2010)

Stage of leishmaniasis	Features
A: Exposed	Includes dogs with negative cytologic, histologic, parasitological, and molecular findings and low-titer ^a antibodies against <i>Leishmania</i> spp. Dogs are clinically normal or have signs associated with other diseases. Usually, dogs in this category are those living or that have lived during 1 or more transmission seasons in a geographic region in which the presence of <i>Leishmania</i> vectors (sand flies) has been confirmed.
B: Infected	Includes dogs in which parasites have been detected through direct diagnostic methods (eg, microscopic evaluation, organism culture, or PCR assay) and with low-titer ^a antibodies against <i>Leishmania</i> spp. Dogs are clinically normal or have signs associated with other diseases. In endemic areas, detection of <i>Leishmania</i> DNA via PCR assay in skin or peripherally obtained blood samples collected during the infection transmission period, in the absence of evident lesions, may not be sufficient to consider a dog infected.
C: Sick (clinically evident disease)	Includes dogs with positive cytologic results regardless of serologic results, dogs with high antibody titers ^a against <i>Leishmania</i> spp, and rarely, infected dogs. One or more clinical signs common to leishmaniasis are present. ^b Given the varied clinical manifestations of the disease, observed signs suggestive of disease can differ from the common clinical signs, as long as they can be clearly associated with ongoing infection. When physical examination does not reveal clinical signs, dogs in this category should still be defined as sick when hematologic, biochemical, and urinary alterations common to leishmaniasis ^b are detected. Laboratory changes other than those considered common can also be indicative of disease, provided that they are associated with the infection.
D: Severely sick	Includes sick dogs with severe clinical illness, as indicated by 1 of the following: evidence of proteinuric nephropathy or chronic renal failure; presence of concurrent problems (eg, ocular disease causing functional loss or joint disease impairing mobility) related or unrelated to leishmaniasis that require immunosuppressive treatment; severe concomitant conditions including various coinfections or neoplastic, endocrine, or metabolic diseases; and clinical unresponsiveness to repeated courses of anti- <i>Leishmania</i> drugs.
E-a: Sick-unresponsive	Includes sick dogs unresponsive to recommended anti- <i>Leishmania</i> treatment.
E-b: Sick-early relapse	Includes sick dogs treated in accordance with the recommended anti- <i>Leishmania</i> protocol but that relapse soon after treatment ceases.

1- Stade A :

Les chiens à ce stade ne nécessitent aucun traitement. En revanche ils devraient être suivis en sérologie pendant les deux à quatre mois après la découverte initiale du faible titre en anticorps. Dans le cas de développement d'anomalies cliniques, des examens complémentaires devront être mis en œuvre dont un test direct de détection du parasite.

2- Stade B :

Ces chiens n'ont besoin d'un traitement que si la détection du parasite par des méthodes directes est associée à une élévation du titre en anticorps quelques semaines après le premier diagnostic sérologique. Si les chiens infectés ne présentent pas de séroconversion, le traitement n'est pas indiqué, en revanche, ils doivent être suivis par des sérologies tous les deux à trois mois.

3- Stade C :

Ces chiens nécessitent la mise en place d'un traitement approprié. Un bilan para-clinique complet devrait être fait afin d'associer un traitement symptomatique au traitement spécifique.

4- Stade D :

Ces chiens requièrent un traitement spécifique et symptomatique en fonction des altérations observées.

5- Stade E_a :

Afin d'adopter la meilleure stratégie, plusieurs facteurs doivent être pris en compte à savoir :

- S'assurer de l'observance du traitement.
- Réévaluer les doses administrées, leur fréquence et la durée du traitement.
- Les résultats de l'examen clinique et des examens de laboratoires doivent être révisés afin de savoir si les anomalies observées peuvent être consécutives à une autre maladie concomitante, partageant les mêmes signes que la leishmaniose.
- Si le diagnostic n'est basé que sur une sérologie, cette dernière devrait être répétée et une PCR devrait être proposée.

Si tous ces points confirment la maladie et que le traitement a été effectivement bien administré, alors un protocole alternatif doit être mis en œuvre.

5- Stade E_b :

L'existence d'une pathologie intercurrente doit être recherchée comme dans le cas précédent. Si la leishmaniose est confirmée et que le traitement a été correctement administré, ces chiens, comme ceux du stade E_a, doivent recevoir un traitement de seconde intention.

e. Conclusion :

Des résistances aux traitements anti-leishmanies sont d'ores et déjà connues chez l'homme, mais les informations concernant l'espèce canine sont encore floues et limitées. Une moindre sensibilité de *Leishmania infantum* aux composés antimoniaux chez des chiens après plusieurs cures a été rapportée alors que d'autres études n'ont pas mis en évidence cette diminution (Solano-Gallego et al, 2009). Il n'y a à ce

jour pas de confirmation de résistance de *L. infantum* aux autres molécules utilisées chez le chien. Ainsi le potentiel zoonotique de la leishmaniose, le manque de guérison parasitaire, et l'occurrence des résistances au traitement actuel et l'impossibilité de prédire l'évolution de l'infection souligne que le traitement des chiens leishmaniens reste une problématique majeure. La détermination correcte du statut clinique est essentielle à la détermination du protocole thérapeutique. Une attention particulière doit par ailleurs être donnée au traitement symptomatique (non décrit ici).

VII- Suivi et pronostic :

a. Pour les chiens malades :

L'amélioration clinique suite au traitement est très variable et dépend notamment du stade clinique et des résultats des analyses para-cliniques du patient. Par exemple, les chiens présentant une insuffisance rénale ont un taux de rémission clinique plus faible. La plupart des chiens présentent une amélioration clinique significative durant le premier mois de traitement même si pour certains, une période plus longue est nécessaire avant d'observer un début de réponse au traitement. Les titres en anticorps et les altérations protéiques sanguines nécessitent plus de temps avant de revenir à la normale. Certains chiens présentent des effets secondaires à la chimiothérapie, effets qui doivent être distingués d'une éventuelle détérioration clinique liée à la progression de la maladie.

Les recommandations suivantes peuvent être suivies :

- les chiens des stades B et C, compte tenu des résultats de leurs examens cliniques et para-cliniques, ne requièrent pas de traitement symptomatique. En revanche, un examen clinique complet, un hémogramme, une biochimie et une analyse d'urine comprenant un rapport protéine-créatine urinaire ou RPCU chez les chiens connus pour être protéinuriques doivent être réalisés après la fin du traitement avec l'antimoniote de méglumine ou après un mois de traitement avec l'allopurinol. Si les résultats ne démontrent pas d'anomalies, les chiens peuvent continuer à recevoir l'allopurinol pour cinq mois de plus. Les chiens de ces catégories devraient être réévalués tous les trois à quatre mois pendant le traitement puis tous les six mois après la fin du traitement, à l'aide de tests sérologiques. Le moment choisi pour mettre fin au traitement à l'allopurinol est mal défini et se base généralement sur les résultats para-cliniques, sérologiques et parasitaires. Cependant certains auteurs ont défini les critères suivants à savoir un examen clinique et des analyses de laboratoires normales, un an au moins après la mise en place du traitement à base d'allopurinol et une diminution marquée du titre d'anticorps. Le traitement à l'allopurinol doit être poursuivi à vie chez certains chiens (Paradies et al, 2010).
- Lorsqu'une rechute clinique se produit, un traitement devrait être ré-initié aussitôt avec les mêmes médicaments. Si ce traitement n'est pas suivi d'une amélioration clinique ou si une rechute a de nouveau lieu peu de temps après l'arrêt du traitement, ces chiens devraient être considérés comme appartenant à la catégorie E_a ou E_b.
- pour les chiens du stade D : l'importance du suivi est fonction du statut clinique des chiens. De manière générale, un suivi clinique et para-clinique est nécessaire pendant le traitement, en particulier lors d'altérations de la fonction rénale. Une fois le traitement terminé, un suivi devrait être effectué tous les un à deux mois, en insistant sur l'évaluation des organes affectés.
- l'utilisation du titre d'anticorps pour estimer l'amélioration clinique est controversée. Il a été montré qu'une diminution lente et progressive du

taux d'immunoglobulines G et A était associée à une amélioration clinique alors que d'autres études ont montré le contraire (Solano-Gallego, 2009). Il est recommandé toutefois de réaliser un test sérologique quantitatif dans le même laboratoire six mois après la mise en place du traitement compte tenu de la longue demi-vie des immunoglobulines G et de la présence fréquente d'anticorps en grande quantité chez les chiens malades. Par ailleurs, une augmentation du titre anticorps peut être interprétée comme un marqueur de rechute, notamment chez les chiens dont le traitement est terminé.

- Pour des raisons épidémiologiques, les chiens infectés et vivant en zones non endémiques où il existe des vecteurs compétents doivent être traités dès le début de la période d'activité des phlébotomes. Toutefois, le traitement est également conseillé même en l'absence de vecteurs, compte tenu des autres modes de transmission potentiels.

Le pronostic en matière de leishmaniose canine reste difficile à établir, 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. Les systèmes de classification clinique définis dans les parties précédentes ont pour but de définir des catégories d'animaux afin d'établir un pronostic adapté.

b. Suivi des porteurs sains :

Les chiens cliniquement sains doivent-ils être suivis régulièrement par sérologie ? La question reste controversée. Il est conseillé de titrer les anticorps lors de diverses situations :

- lorsque les chiens sont importés,
- amenés à voyager en régions non endémiques,
- amenés, à être des donneurs de sang,
- ou encore employés pour des études épidémiologiques ou pour la recherche
- ou si leurs propriétaires souhaitent les faire suivre afin de détecter précocement l'infection, ce qui serait bénéfique pour le patient et permettrait un contrôle du développement de la maladie clinique.

Il peut être recommandé de suivre les chiens vivant en zone endémique au moins une à deux fois par an pour la mise en œuvre de mesures thérapeutiques et préventives efficaces.

En ce qui concerne le suivi par PCR en règle général, il est recommandé de tester les chiens sains par PCR uniquement s'ils doivent être exportés en zone non endémique, s'ils doivent devenir des donneurs de sang, s'ils sont destinés à être des animaux de compagnie de personnes immunologiquement déprimées ou encore intégrés dans des études épidémiologiques ou des projets de recherche. Il est préférable d'éviter de tester par PCR les chiens sains en dehors de ces contextes.

Les chiens porteurs sains mais séropositifs doivent être gérés en fonction de leur titre en anticorps. Ceux présentant un titre élevé devraient être traités de la même manière que des chiens malades aussi bien en termes de médication, de dosage que de suivi. Ceux présentant un titre faible en anticorps devraient être suivis régulièrement et subissent un examen clinique, des examens complémentaires de routine et des tests sérologiques sur une base régulière de trois à six mois pour évaluer la progression éventuelle de la maladie. Si on observe une augmentation significative du titre en anticorps, sans tenir compte des signes cliniques ou des anomalies para-cliniques, ces chiens doivent être traités comme des chiens malades. Par ailleurs, il a été montré que les porteurs sains sont une source d'infection pour les phlébotomes, c'est pourquoi ils devraient également être protégés avec des insecticides topiques répulsifs pour minimiser la transmission de l'infection pendant la période d'activité du vecteur.

Les chiens porteurs sains, séronégatifs mais PCR positifs devraient être suivis cliniquement et par sérologie, tous les six mois à un an afin de surveiller une éventuelle séroconversion. En revanche le traitement de ces chiens n'est pas recommandé mais ils doivent faire l'objet d'une protection insecticide pour éviter toute transmission.

c. Encore des interrogations :

Un point reste encore indéterminé et concerne la possibilité pour certains chiens infectés mais cliniquement sains de pouvoir se débarrasser du parasite de manière spontanée. Il s'agirait d'un événement exceptionnel. Il semblerait plutôt que ces chiens porteurs sains hébergeraient le parasite en très petit nombre dans le sang, le foie, la rate, les nœuds lymphatiques ou la peau. Une étude a montré que ces animaux sont positifs à la PCR réalisée sur des prélèvements de moelle osseuse, et deviendraient négatifs avec le temps. Mais cette étude présente la limite d'avoir utilisé une PCR conventionnelle et l'échantillonnage d'un seul type tissulaire (Solano-Gallego et al, 2009). Des études futures sont donc nécessaires pour élucider cette question.

Une autre question également en suspens est la possibilité de réinfection de chiens infectés. Certes, il est légitime de penser qu'une exposition passée pourrait conférer un certain degré de résistance chez les chiens. De plus, aucune donnée n'existe relative à des réinfections en condition naturelle mais certains auteurs affirment qu'une réinfection chez des chiens vivant en zone endémique reste possible et qu'elle est très vraisemblable. Les chiens peuvent être infectés par une souche dans un premier temps et pourraient être infectés par une souche différente plus virulente plus tard.

VIII- Prévention :

Les chiens sont le seul réservoir domestique confirmé de leishmaniose viscérale humaine. Comme mentionné précédemment, des études montrent une évolution de l'épidémiologie de la maladie à savoir la détection de nouveaux foyers dans de nouvelles régions, comme par exemple dans le sud de la France, le nord de l'Italie et même aux Etats-Unis. Un peu négligées par la recherche ces dix dernières années, les stratégies de contrôle de la leishmaniose connaissent aujourd'hui des avancées, à la lumière des connaissances épidémiologiques et des méthodes diagnostiques.

Au sens large, on emploie le terme de prévention pour toutes les mesures mises en œuvre afin d'éviter l'infection par des pathogènes ou bien la déclaration de symptômes consécutivement à une infection. En cela, la vaccination est un moyen important de prévention. Pour la leishmaniose à *L. infantum*, la plupart des efforts de contrôle de la zoonose sont focalisés sur la prévention de l'infection des chiens. Il s'avère que la prévention des morsures de phlébotomes est un outil efficace dans la protection des chiens contre la leishmaniose et par conséquent pour réduire le risque d'infections humaines, même si des modes - exceptionnels - de transmission non vectoriels sont suspectés voire confirmés de manière expérimentale (voir plus haut).

a. Mesures de contrôle des vecteurs de leishmanies :

Une prévention efficace contre les phlébotomes peut être obtenue en prenant les mesures suivantes :

- Garder les chiens à l'intérieur pendant la période d'activité des phlébotomes du crépuscule à l'aurore.
- Réduire les micro-habitats favorables au développement des vecteurs au voisinage des maisons ou des lieux de vie des chiens.
- Utiliser des traitements insecticides de l'environnement, au niveau des portes d'entrée, des fenêtres.....
- Utiliser des traitements insecticides topiques ayant une efficacité prouvée contre les phlébotomes.

Les vecteurs pourraient être contrôlés théoriquement à l'aide de moyens génétiques et/ou biologiques, mais à ce jour seuls les moyens chimiques ont montré une réelle efficacité. De telles mesures de contrôle visent à réduire la population de phlébotomes ainsi que leur contact avec les populations humaines. Il s'agit de l'utilisation d'insecticides à pulvériser dans les maisons et les abris pour animaux, de la mise en place de filets traités par des insecticides au niveau des issues des maisons, ou encore et surtout de l'application cutanée de répulsifs ou d'insecticides chez les chiens et les hommes.

1- Traitement insecticide de l'environnement :

i. Les sprays à effet résiduel :

Il s'agit de la pulvérisation d'insecticides à longue action sur les murs, les toits des maisons ainsi que dans les abris des animaux. Leur utilisation a notamment été un succès pour le contrôle de la malaria depuis les années quarante. Il s'agit également d'un moyen important dans le contrôle de la leishmaniose.

Les insecticides les plus utilisés pour le contrôle des vecteurs de leishmanies sont :

- Les organophosphorés tels que le méthyl-chlorpyrifos qui inhibent l'acétylcholinestérase.
- Les carbamates comme par exemple le propoxur. Ces substances bloquent la production et l'action de la choline-estérase, paralysant ainsi le fonctionnement du système nerveux des insectes.
- Les pyréthroïdes tels que l'alpha-cyperméthrine, la cyperméthrine, la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine.
- Le gold standard est le DEET ou N,N-diethyl-3-methylbenzamide, très efficace contre les insectes hématophages, qui a été très employé et dont l'efficacité contre les vecteurs de leishmanies a été montrée (Maroli et al, 2010) Ces dernières années, un autre composé pipéridine, l'icaridine (ou acide 1-piperidinecarboxylique, 2-(2-hydroxyethyl)-1-methylpropylester (KBR 3023)) a été développé et son efficacité contre *Phlebotomus duboscqui* a été établie (Maroli et al, 2010).

L'efficacité de ces produits dépend du degré d'adaptation des phlébotomes à l'environnement ainsi que de la surface totale traitée. Cette mesure de contrôle est plus efficace au sein d'environnements urbains dans lesquels chaque maison ou abri peut être traité plutôt qu'en régions rurales, où les foyers sont beaucoup plus dispersés.

ii. Traitements topiques insecticides :

A- Aspects pharmacologiques des insecticides pour application dermique chez les chiens :

De nombreux composants chimiques ont montré un effet répulsif voire insecticide sur les phlébotomes avec un degré d'efficacité variable, dépendant de facteurs tels que le mode d'action du produit, sa capacité de dissémination et de maintien sur la peau et la sensibilité pour le principe actif des phlébotomes impliqués dans la transmission de la leishmaniose. Plusieurs études ont été menées sur les pyréthroïdes synthétiques afin de les employer en tant qu'agents topiques et ils sont à ce jour les produits les plus utilisés du fait de leur efficacité reconnue et de leur faible toxicité pour l'hôte canin. Ils appartiennent aux « ecto-parasitocides ».

Le mode d'action des pyréthroïdes synthétiques impliquent deux aspects pharmacologiques :

- après s'être posés sur les chiens traités, les phlébotomes peuvent rester sur la peau pendant une période suffisante pour absorber une dose létale d'insecticide
- ou bien le contact peut être suffisant pour causer une désorientation et de l'irritation, entraînant une réduction du repas sanguin.

Les pyréthoïdes synthétiques utilisés chez le chien combinent plusieurs propriétés intéressantes à savoir des effets toxiques faibles à modérés pour les hôtes mammifères, ils sont peu volatiles et ils possèdent une activité anti-gorgement importante.

Leurs modes d'administration sont divers : des supports à libération progressive, des formulations spot-on ou encore des sprays.

Il existe peu de réactions cutanées suite à leur application. Il peut s'agir d'érythème ou de démangeaisons au niveau du site d'application et ces effets sont plus fréquents chez les petites races à peau fragile.

Les effets de la deltaméthrine et de la perméthrine, utilisées seules ou en combinaison, ont été évalués de manière expérimentale sur cinq vecteurs compétents à savoir, *Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi*, *Lutzomyia longipalpis*, *L. migonei* et *L. intermedia*. L'effet anti-gorgement a été évalué comme étant le pourcentage des femelles hématophages incapable d'ingérer un repas sanguin lorsqu'elles étaient en contact avec un chien traité. L'effet toxique a été évalué comme le taux de mortalité observé pendant vingt-quatre heures suite à l'exposition des phlébotomes.

En règle générale, l'effet sur la prise d'un repas sanguin est assez intense dans la mesure où 84% à 96% des phlébotomes ne se gorgent pas chez les chiens traités. Le taux de mortalité chez les femelles hématophages varie d'environ 98.8% à 100%.

Limiter l'infection chez le chien est essentiel dans la perspective du contrôle de la leishmaniose humaine à *L. infantum*. En effet, le traitement de masse des chiens infectés interrompt le cycle de transmission dans la mesure où la majorité des phlébotomes s'étant nourris sur un chien traité meurt avant la transmission du parasite à l'hôte suivant.

B- Les différentes formulations :

a. Les colliers :

Du fait de la libération lente du principe actif à partir du support et qui se distribue progressivement dans le tissu adipeux sous-cutané, l'activité protectrice complète n'est acquise qu'une semaine environ après la mise en place du collier. L'utilisation de collier imprégné de deltaméthrine résulte en une réduction de la prise de repas sanguin efficace contre *P. perniciosus* et en la mort de plus de 60% des insectes dans les deux heures suivant l'exposition au produit. Les chiens portant un collier seraient mordus par *P. papatasi* environ 80% de moins que ceux n'en portant pas. Les colliers ont aussi un effet de diminution de l'alimentation sur *Lutzomyia longipalpis* et *L. migonei*. Dans une étude menée pour comparer les effets d'un collier imprégné de deltaméthrine avec un autre imprégné de diazinon, un organo-thiophosphate pyrimidine, il a été montré que le collier à la deltaméthrine était plus

efficace avec plus de 90% de protection et durant plus longtemps, plus de sept mois environ, par rapport au second (Alvar et al, 2004). Ceci a permis d'établir, qu'au moins dans les régions tempérées, le collier imprégné de deltaméthrine permet une protection des chiens contre la plupart des morsures de phlébotomes et garde un effet protecteur et destructeur pendant une saison complète de transmission. Compte tenu de la longue action des colliers, environ 34 semaines, les appliquer à la majorité des chiens dans un foyer connu de *Leishmania infantum* permettrait de réduire suffisamment le contact entre les vecteurs et les réservoirs pour réduire le risque d'infection canine mais aussi humaine.

b. Les formulations « spot on » :

L'activité protectrice complète de ces formulations n'est acquise qu'environ vingt quatre à quarante huit heures après son application compte tenu du temps nécessaire à l'insecticide pour se répandre sur tout le corps. En effet, ces formulations topiques nécessitent plusieurs jours avant que le principe actif ne diffuse à travers le *stratum corneum* à l'inverse des poudres à effet immédiat mais dont la durée d'action est plus courte.

Les formulations « spot-on » offrent aussi un haut niveau de protection mais de plus courte durée par rapport au collier, de l'ordre de trois semaines. Une combinaison d'imidaclopride 10%, un insecticide nicotinoïde, avec de la perméthrine 50% a été développée sous la forme d'un spot-on topique dermique, en tant que traitement et agent préventif contre les tiques, les puces, les moustiques ainsi que les phlébotomes. L'activité anti-insecticide et la capacité de réduction de la prise alimentaire des phlébotomes de cette formulation ont été déterminées de manière expérimentale pour *Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi* et *Lutzomyia longipalpis*. La protection était de 92.7% à 97.7% pendant trois à quatre semaines confirmant que cette combinaison est efficace dans la protection des chiens contre les vecteurs (Otranto et al, 2007).

D'autres formulations spot-on ont été développées, comme celle utilisant une solution de perméthrine à 65%, efficace contre *P. perniciosus* pendant quatre semaines et contre *L. migonei* pendant huit semaines. Les autres formulations à base de pyriprole, de fipronil, de metaflumizone ou d'amitraz présentent une efficacité limitée en termes de protection et de réduction de la prise de repas sanguins de phlébotomes et ne doivent pas être recommandées dans la prévention de la leishmaniose canine.

c. Les formulations en spray :

Elles présentent l'avantage d'être efficaces dès leur application. En effet l'utilisation topique de sprays à base de pyréthroïdes est également efficace contre les vecteurs mais l'inconvénient de ces produits réside dans leur durée d'action plus courte que les colliers. Une étude menée sur l'efficacité de l'association en spray de perméthrine avec du pyriproxifène, un régulateur de croissance, a montré une protection de 87% à 94% contre les piqûres de phlébotomes avec une efficacité rapide, dès 24h après application, mais de courte durée d'action, de l'ordre de trois à quatre semaines (Maroli et al, 2010). D'autres études de terrain sont par ailleurs nécessaires.

La protection à l'aide d'insecticides topiques est donc un outil fiable (Maroli et al, 2001 chez des chiens à Naples) et valable qui doit être intégré dans les programmes de lutte contre la leishmaniose, en plus de la vaccination.

Pour les chiens voyageant de zone non-endémiques vers des zones endémiques, il est recommandé de mettre en place un collier deux semaines avant le départ et de le changer tous les cinq mois. Une alternative est l'utilisation de pyréthroïdes en spot on ou en spray deux jours avant le départ puis répétée toutes les deux à trois semaines en fonction du type de produit. Des conseils doivent également être donnés relatifs au suivi clinique et para-clinique au retour de l'animal.

b. Enjeux pour la production d'un vaccin efficace contre *Leishmania* :

Le contrôle de l'infection par *Leishmania infantum* chez les chiens est essentiel pour stopper la propagation de la leishmaniose viscérale zoonotique. Des progrès considérables ont vu le jour ces dernières années à propos des connaissances sur la réponse immunitaire protectrice chez le chien. Cela permet d'envisager le développement d'un vaccin efficace dans un avenir proche.

Un vaccin « idéal » contre la leishmaniose devrait initier une réponse immunitaire à médiation cellulaire de longue durée et ceci chez tous les individus vaccinés. Plusieurs études menées rapportent le potentiel de différents vaccins (Miro et al, 2008).

La première étape de l'étude d'un vaccin candidat consiste à évaluer son antigénicité. Il s'agit de savoir si le contenu du vaccin peut être reconnu par des lymphocytes T *in vitro* notamment à un stade précoce de l'infection. Il est également important de connaître son immunogénicité, c'est-à-dire sa capacité à produire une réponse immunitaire à médiation cellulaire après immunisation chez un modèle animal. Puis le vaccin candidat subit différentes épreuves sur des modèles animaux pour confirmer son efficacité protectrice, ainsi que sa tolérance et sa sécurité (Reis et al, 2010).

Des progrès en matière de vaccination ont déjà été faits dans la mesure où deux vaccins de seconde génération (c'est-à-dire composés de sous produits du pathogène, antigènes ou toxines) sont déjà disponibles commercialement au Brésil : Leishmune® et Leishtec®. (Palatnik et al, 2009). D'autres essais sont mis en œuvre pour évaluer l'immunité protectrice d'autres vaccins candidats contre l'infection à *L. infantum*, composés de parasites vivants ou morts, d'antigènes purifiés ou de bactéries vivantes recombinées exprimant des antigènes de leishmanies ou des ADN plasmidiques codant pour des antigènes.

Les mécanismes immunologiques spécifiques favorisés par ces vaccins ne sont toujours pas élucidés. Une caractéristique importante pour la conception et la mise en application des vaccins est la différence marquée entre la réponse des hôtes canins et murins aux antigènes de leishmanies. Bien que le modèle souris soit une

étape essentielle pour obtenir des preuves expérimentales des capacités protectrices du vaccin candidat, des évaluations chez les chiens sont ensuite indispensables.

Il est également nécessaire de souligner que la protection consécutive à la vaccination est fortement liée à l'espèce de leishmanies employée. En général, les espèces du genre *Leishmania* partagent des caractéristiques moléculaires et biologiques spécifiques, et l'infection avec une de ces espèces peut conférer une protection croisée contre d'autres espèces de *Leishmania*. C'est cette caractéristique qui a permis l'utilisation de vaccins tués avec *L. braziliensis* ou *L. major* pour induire une protection hétérologue contre la leishmaniose canine. Cependant la variabilité des réponses immunitaires observées pour différentes espèces complique l'élaboration d'un vaccin de seconde génération pour toutes les leishmanies.

Enfin, le choix de l'adjuvant est également crucial dans la mesure où celui-ci augmente l'efficacité d'un vaccin en potentialisant l'immunogénicité des antigènes, en stimulant la réponse immunitaire appropriée, et en réduisant la dose de vaccin nécessaire. Les adjuvants influencent également les isotypes ainsi que l'avidité des anticorps produits.

Parmi les maladies parasitaires, la leishmaniose est considérée comme pouvant être contrôlée par la vaccination puisque les infections successives chez l'homme résultent en l'acquisition d'un certain degré de résistance (Maroli et al, 2010). Cependant, le développement de vaccins est difficile étant donné la complexité antigénique et la variabilité de ce protozoaire.

Ces dernières années, plusieurs vaccins ont été ou sont développés contre *Leishmania infantum*. Quatre classes de vaccins ont été évaluées à ce jour chez le chien et certains présentent des résultats prometteurs :

- Les vaccins à base de leishmanies tuées sont constitués de promastigotes inactivés. Celui à base de *Leishmania braziliensis* associé au bacille de Calmette-Guérin comme adjuvant a montré une bonne protection contre une inoculation intraveineuse de *L. infantum*. Celui à base de *Leishmania major* précipité, autoclavé et adjuvé avec le BCG a été testé sur des chiens suivis sérologiquement pendant seize mois et a montré une réduction de 69% en terme de taux de séroconversion (Miro et al, 2008).
- Les vaccins à base de fractions purifiées de leishmanies semblent les plus efficaces. Ils sont composés de parasites entiers issus de culture ou de leur macromolécules d'excrétion-sécrétion. L'antigène le plus représentatif de ce groupe est la fraction enrichie en glycoprotéine GP-63 aussi connue sous le nom de « ligand mannose-fucose » (FML) de *Leishmania donovani*. Le vaccin est autorisé au Brésil. Il s'agit du premier vaccin commercialisé contre la leishmaniose canine, sous le nom de Leishmune®. Ce vaccin a également été proposé pour le traitement immunologique des chiens infectés malades et comme vaccin bloquant la transmission. Il est donc immunogénique, immunoprophylactique et immunothérapeutique et ceci a été démontré chez la souris, les hamsters et les chiens. L'efficacité du vaccin dans les différents essais a été évaluée entre 76% et 80% environ. Son efficacité est associée à une diminution de l'incidence de la maladie chez l'homme dans la même région, conséquence probable du blocage de la transmission des leishmanies (Palatnik et al, 2009). Cependant la capacité de différencier les individus

vaccinés des individus infectés reste difficile. Un second vaccin à base de fractions de parasites purifiées (à savoir le LiESAp-MDP) a été étudié en France et a montré une bonne protection contre l'infection par *L. infantum*.

- Le troisième type de vaccin est constitué par des antigènes recombinants de leishmanies.
- Enfin, le dernier type de vaccins regroupe les vaccins à base d'ADN de leishmanies.

Malgré les progrès réalisés en matière de vaccination pendant cette dernière décennie, le challenge pour obtenir un vaccin optimal contre cette maladie reste un enjeu majeur à ce jour et les recherches se poursuivent pour identifier des candidats vaccins associés à un adjuvant le plus efficace possible.

Le contrôle futur de la leishmaniose passe par une approche intégrée de prévention dans laquelle est incluse une vaccination efficace, l'utilisation de collier à base de deltaméthrine ou un autre insecticide topique efficace. Ces derniers permettent d'empêcher les nouvelles infections et de réduire la prise des repas des vecteurs sur des chiens déjà infectés alors que la première permet de prévenir l'établissement de l'infection. Enfin, des efforts doivent être mis en œuvre afin d'éviter l'introduction de la maladie dans des zones connues pour être encore indemnes à ce jour à l'aide de tests lors de l'introduction d'animaux sur ces territoires et de contrôle rigoureux de la circulation des animaux, notamment ceux en provenance des zones à risque.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'établir une revue à propos de la leishmaniose canine. De manière réaliste, elle ne se veut pas et ne peut pas être exhaustive, et ne demande qu'à être amélioré et surtout complété avec le temps.

Cette thèse a permis de montrer que même si la leishmaniose canine est connue depuis longtemps, il reste encore quelques points noirs en termes de connaissances, justifiant l'intérêt continu pour cette parasitose.

En effet, l'épidémiologie de la maladie telle que connue au départ est en constante évolution, voire même remise en question puisque de nouveaux foyers de la protozoose sont constatés à travers le monde, particulièrement en des lieux où les vecteurs semblent absents. Les fondements complexes de la réponse immunitaire restent parfois flous malgré les études mises en œuvre mais leur compréhension est indispensable afin de pouvoir développer des moyens thérapeutiques et préventifs efficaces. A ce propos, les progrès faits en matière de lutte contre les phlébotomes contrastent avec la faible avancée réalisée en matière de vaccination efficace contre la maladie. En revanche, en ce qui concerne les méthodes diagnostiques, ces dernières sont de plus en plus fiables et faciles à mettre en œuvre même si elle nécessite d'être adaptées compte tenu du polymorphisme clinique de la maladie.

En termes d'enjeux, ils restent considérables en matière de santé animale et humaine, à la lumière des nouvelles données épidémiologiques et il semble primordial de continuer la recherche, particulièrement dans le domaine de l'immunologie à propos de cette protozoose en vue de la production d'un vaccin efficace contre l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

ALVAR J, CANAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **57**, 1–88.

AMORA S. S A, BEVILAQUA C. M L, FEIJO F. M C, ALVES N D, MACIEL M. V. (2009) Control of Phlebotomine (Diptera : Psychodidae) Leishmaniasis Vectors. *Neotropical Entomology* **38(3)** 303-310

ANDRADE R, REIS A, GONTIJO C, BRAGA L, ROCHA R, ARAUJO M, VIANNA L, MARTINS-FILHO O. (2007). Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **116**, 85–97.

ANTINORI S, SCHIFANELLA L, CORBELLINO M. (2011). Leishmaniasis : new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* DOI 10.1007/s10096-011-1276-0.

BANETH G., KOUTINAS A F., SOLANO-GALLEGO L., BOURDEAU P., FERRER L. (2008) Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* **Vol.24** No.7.

BANULS AL, HIDE M, PRUGNOLLE F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniases : a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*; **64** : 1-109.

CARDOSO L., SCHALLIG H.D.F.H., CORDEIRO-DA-SILVA A., CABRAL M., ALUNDA J.M., RODRIGUES M. (2007) Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **117** 35–41.

CARILLO E, MORENO J (2009) Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **128** 67–70

CENINI P, REEVE A, NEAL R. (1989). Two techniques for quantitative determination of *Leishmania* amastigotes, *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**, 194-195.

CHAMAILLE L., TRAN A., MEUNIER A., BOURDOISEAU G., READY P., DEDET J.P. (2010) Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France *Parasites & Vectors* 2010, **3** : 31

DANTAS-TORRES F, LORUSSO V, TESTINI G, PAIVA-CAVALCANTI M, FIGUEREDO L A, STANNECK D, MENCKE N, BRANDAO-FILHO S, ALVES L C, OTRANTO D. (2010) Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res* **106**:857–860

DEREURE J., VANWAMBEKE S.O., MALE P., MARTINEZ S., PRATLONG F., BALARD Y. and DEDET J.P. (2009) The Potential Effects of Global Warming on

Changes in Canine Leishmaniasis in a Focus outside the Classical Area of the Disease in Southern France. Vector-borne and zoonotic diseases, **Vol 9**, n°6.

FERREIRA A P GM, FATTORI R K, SOUZA F, MARC V, LIMA F. (2009) Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Veterinary Parasitology* **165** 150–154

FERREIRA E, LANA M, CARNEIRO M, REIS A, PAES D, SILVA E, SCHALLIG H, GONTIJO C. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* **146**, 235–241

FREEMAN K. (2010) Update on the Diagnosis and Management of *Leishmania* spp Infections in Dogs in the United States. *Topics in Companion Animal Medicine* **Vol 25**, No 3.

FREITAS E., MELO M N., COSTA-VAL A P., MICHALICK M S M. (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology* **137** 159–167

GOMES Y, CAVALCANTI M, LIRA R, ABATH F, ALVES L. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* **175**, 45–52.

GRAMICCIA M., GRADONI L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* **35** 1169–1180.

INIESTA L, GALLEGU M, PORTU'S M. (2005). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **103**, 77–81.

INIESTA L, GALLEGU M, PORTU'S M. (2007). Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **103**, 77–81.

KOUTINAS A.F., CARLOTTI D. N, KOUTINAS C, PAPADOGIANNAKIS E I, SPANAKOS G K and SARIDOMICHELAKIS M N. (2009) Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Veterinary Dermatology*, **21**, 572–577

LAGE R.S, OLIVEIRA G.C, BUSEK S.U, GUERRA L.L, GIUNCHETTI R.C, CORREA-OLIVEIRA R, REIS A.B. (2007) Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **115** 135–145

LEITE R. S, FERREIRA S A, ITUASSU L T, MELO M N, ANDRADE A S R. (2010) PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology* **170** 201–206.

- LIARTE D, MENDONCA I, LUZ F, ABREU E, MELLO G, FARIAS T, FERREIRA A, MILLINGTON M, COSTA C. (2001). QBC® for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis : preliminary data. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **34** 577-581.
- MADEIRA M, SCHUBACH A, SCHUBACH T, PEREIRA S, FIGUEIREDO F, BAPTISTA C, LEAL C, MELO C, CONFORT E, MARZOCHI M. (2006). *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol.* **138** 366-370.
- MAIA C., CAMPINO L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitology* **158** 274-287.
- MAIA C, RAMADA J, CRISTOVAO J, CAMPINO L. (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis : conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2007.08.009.
- MANNA L, VITALE F, REALE S, PICILLO E, NEGLIA G, VESCIO F, GRAVINO A. E. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Journal* **182** 441–445.
- MAROLI M., GRADONI L., OLIVA G., CASTAGNARO M., CROTTI A., LUBAS G., PALTRINIERI S., ROURA X., ZINI E., ZATELLI A. (2010) Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, **Vol 236**, No. 11.
- MAURICIO IL, STOTHARD JR, MILES MA. (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 2000; **16**: 188-9.
- MIRO G., OLIVA G., CRUZ I., CANAVATE C., MORTARINOS M., VISCHER C., BIANCIARDI P. (2009) Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology*, **20**, 397–404.
- MIRO G., CARDOSO L., PENNISI M. G., OLIVA G., BANETH G. (2008) Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* **Vol.24** No.8
- MOHEBALI M, TARAN M, ZAREI Z. (2004). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol.* **121**, 239–245.
- MOREIRA P. R. R., VIEIRA L. M., ANDRADE M. M. C., BANDARRA M. B., MACHADO G. F., MUNAR D. P., OLIVEIRA VASCONCELOS R. (2010). Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* **107** 605–613
- MORENO J, ALVAR J. (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*; **18**:399–405.

NUNES C. M, PIRES M. M, SILVA K. M, ASSIS F, FILHO JGA Filho, VENTUROLI PERRI S. H. (2010) Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Veterinary Parasitology* **170** 131–133

OLIVA G., ROURA X., CROTTI A., MAROLI M., CASTAGNARO M., GRADONI L., LUBAS G., PALTRINIERI S., ZATELI A., ZINI E. (2010) Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, **Vol 236**, No. 11.

OLIVA G., SCALONE A., FOGLIA MANZILLO V., GRAMICCIA M., PAGANO A., DI MUCCIO T. and GRADONI L. (2006) Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naïve Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, **Vol. 44**, No. 4 p. 1318–1322

OTRANTO D., PARADIES P., LIA R.P., LATROFA M S., TESTINI G., CANTACESSI C., MENCKE N., GALLI G., CAPELLI G., STANNECK D. (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology* **144** 270–278

PALATNIK-DE-SOUSA C, SILVA-ANTUNES I, AGUIAR MORGADO A, MENZ I., PALATNIK M., LAVOR C. (2009) Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. *Vaccine* **27** 505–3512

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.

PARADIES P., SASANELLI M., CAPRARIIS D., TESTINI G., TRAVERSA D., LIA R P., DANTAS-TORRES F., OTRANTO D. (2010) Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal* **186** 370–373

PARANHOS-SILVA M, OLIVEIRA GG, REIS EA, MENEZES R.M.C., FERNANDES O, SHERLOCK Í, GOMES R.B.B, PONTES DE CARVALHO L.C, SANTOS W.L.C. (2003). A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology*. **114**: 97–111.

PENNISI MG, DE MAJOM, MASUCCI M, et al. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec* ;**156**:346–349.

PETERSEN C. A. (2009) Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. *Topics in Companion Animal Medicine* **Vol 24**, No 4.

QUINNEL R J, KENNEDY LJ, BARNES A, COURTENAY O, DYE C, GARCEZ L M, SHAW M A, CARTER S D, THOMSON W, OLLIER W E R. (2003) Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* **55**: 23–28

REIS A, TEIXEIRA-CARVALHO A, VALE A, MARQUES M, GIUNCHETTI R, MAYRINK W, GUERRA L, ANDRADE R, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO O. (2006). Isotype patterns of immunoglobulins : hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **112**, 102–116.

REIS A. B., GIUNCHETTI R. C., CARRILLO E., MARTINS-FILHO O. A., MORENO J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology* **Vol.26** No.7

SANCHEZ-ROBERT E, ALTET L, SANCHEZ A et al. (2005) Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case control study. *Journal of Heredity.* **96**: 755–8.

SANCHEZ-ROBERT E., ALTET L, UTZET-SADURNI M., GIGERS U, SANCHEZ A., FRANCINO O. (2008) *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 39:36

SARIDOMICHELAKIS M. N. (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, **20**, 471–489.

SHARMA U., SINGH S., (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control *J Vector borne Dis* **45**, 255-272

SILVA E, VAN DER MEIDE W, SCHOONE G, GONTIJO C, SCHALLIG H. (2006) 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**, 637–643.

SILVA S. M., RIBEIRO V. M., RIBEIRO R. R., TAFURI W. L., MELO M. N., MARQUES MICHALICK M. S. (2009) First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology* **166** 159–162

SILVA F.L., RAQUEL G.O., SILVA T.M.A., XAVIER M.N., NASCIMENTO E.F., SANTOS R.L. (2009). Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet.parasit.*, **160**, 55-59.

SOLANO-GALLEGO L., KOUTINAS A., MIRO G., CARDOSO L., PENNISI M.G., FERRER L., BOURDEAU P., OLIVA G., BANETH G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitology* **165**, 1-18

SOLANO-GALLEGO L, RODRIGUEZ A, INIESTA L, ARBOIX M, PORTU'S M, ALBEROLA J. (2003). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 849–855.

SOARES M R A Soares, MENDONC I L., BONFIM J M., RODRIGUES J A., WERNECK G L., COSTA C H N. (2011) Canine visceral leishmaniasis in Teresina,

Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Tropica* **117** 6–9

WOERLY V., MAYNARD L., SANQUER A., EUN H.M. (2009). Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol. Res.*, **105** (2), 463-469.

ZARAGOZA C, BARRERA R, CENTENO F, TAPIA J, DURAN E, GONZALEZ M, MANE M. (2003). SDS-Page and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Res.* **34**, 137–151.

ZIVICNJAK T, MARTINKOVIC F, MARINCULIC A, MRLJAK V, KUCER N, MATIJATKO V, MIHALJEVIC Z, BARIC-RAFAJ R.(2005) A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology* **131** 35–43

SITES INTERNET

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites-Leishmaniasis. Adresse URL : <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>

Diptera-info. Diptera Gallery Adresse URL : <http://www.diptera.info/photogallery.php>