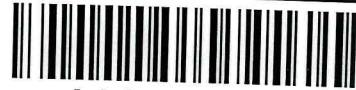


1112



1112THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université BLIDA 1

Institut des Sciences Vétérinaires

PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
"DOCTEUR VETERINAIRE"

Thème :

La leishmaniose canine à Tizi-ouzou : A propos d'un essai thérapeutique

Réalisé par

Amel Mohand kaci

Devant le Jury composé de :

Président	:	OUCHENE.	N.	M.C.B	ISV BLIDA	1
Examineur	:	KAABOUB.	E.	M.A.	ISV BLIDA	1
Promoteur	:	Dr SADI Madjid.		M.A.	ISV BLIDA	1

Promotion 2015

Dédicaces

A mes parents,

A qui je dois tous. En témoignage de ma profonde reconnaissance pour l'amour et les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi.

A mon aimé toufik pour son aide indispensable dans la réalisation de mon travail, mais surtout pour ton amour, ta patience et ta présence a mes cotés ainsi que tous les moments de bonheur que tu m'apport et m'apporteras encore.

A mes sœurs,

Nadia et tiziri

A mes frères

Yacine ,lotfi et belaid .

A mes belle sœur

Hanane et son prochain bébé et sonia

A mon oncle abd allah sa femme zaina et leurs chere enfants fifi chafik et fares, merci pour les 5 ans que j' ai passé chez vous

A tous ceux que j ai malheureusement pu oublier de citer, MERCI.

Sommaire

CHAPITRE 1 : Rappels parasitologique, épidémiologique, clinique et diagnostique sur la leishmaniose canine

1- Définition.....	1
2-Historique.....	1
3-Importance	2
3-1-Médicale.....	2
3-2- Economique	2
3-3 sanitaire	2
4- Le parasite	2
4-1 la morphologie	3
4-2 taxonomies	3
5 -VECTEUR.....	4
5-1- classification et morphologies	5
5-2- biologie	5
a- nutrition	5
b- habitat	5
6_ épidémiologie	6
6-1 épidémiologies descriptives	6
6-2 épidémiologies analytiques	6
a- espèce est réservoir	6
b- transmission	6
C – facteurs de risque	6
7- Etude clinique	7
a- La leishmaniose canine	7

7-1 - pathogénies	8
7-2 symptomatologies	8
7.2.1 Incubation :	8
7.2.2 Symptômes généraux	8
7.2.3 lésions cutanéomuqueuse	9
7.2.4. Lésions intéressant le système des phagocytes mononuclée	9
7.2.5 Lésions oculaires	9
7.2.6 Symptômes urinaire	9
7.2.7 Symptômes digestifs	9
b- la leishmaniose humaine	10
1- Formes cutanées	11
2. Forme viscérale	11
3. symptômes Généraux	12
4.- Diagnostic de confirmation	13
5. Traitement	13
8- diagnostic	13
8-1-Diagnostic biologique	14
8-1-1- Méthodes non spécifiques	14
8.1.2. Formoleuco-gélification	15
8.1.3- Méthodes spécifiques	15
8-1-4- PCR	16
8-1-5 Techniques d'immunomarquage	16
8-2-1 Méthodes sérologiques	17
8-2-2-ELISA	19
8-2-3-Techniques d'agglutination	20
8-2-4 -Western Blot	20

CHAPITRE 2 : Réponse immunitaire du chien atteint

9-Réponse immunitaire	22
9-1. Rappels d'immunologie	22
9.1.1. Les réactions immunitaires lors de leishmaniose.....	24
9-1-2- Immunité innée	24
9-1-3-Immunité acquise	25
9-2-Les réactions immunitaires du chien infecté par <i>Leishmania infantum</i>	26

Chapitre 3 :traitement et prophylaxie

10- Traitement de la leishmaniose canine	28
a) protocole classique	28
10-1 – Traitement symptomatique	31
a) Thérapeutique de soutien rénal	31
b) Traitement oculaire.....	31
10-2 – Suivi de l'animal	31
10-3. Prophylaxie sanitaire	32
10-4. Prophylaxie médicale	32

Partie experimental :

1 Introduction	33
2 Protocole de l'étude.....	33
2.1. Recrutement des chiens malades	33
2.2. Traitement.....	33
2.3Suivi vétérinaire	34
2.4 Analyses des prélèvements.....	34

2.5 Tests rapides de diagnostic.....	35
2.6 Technique de biologie moléculaire. (cette partie de travail a été réalisé par un étudiant à l'université de limoge en France)	36
3. Déroulement de l'enquête	37
3.1. Echantillonnage	37
Resultat	
Première partie :	
Essai thérapeutique	40
1. Caractéristiques cliniques des chiens mis sous traitement.....	41
2. lutionEvo des symptômes cliniques	43
3. Résultats des analyses de laboratoire	47
4. Evaluation du traitement.....	48
Deuxième partie :	
Enquête de prévalence.....	48
1. Résultats des tests diagnostics (Annexe 5)	48
2. Influence de l'âge.....	49
3. Influence du sexe.....	50
4. Influence du mode de vie	50
5. Symptômes observés.....	50
Discusion	
1. A propos des moyens de diagnostic.....	52
2. A propos du traitement.....	53
3. A propos de l'enquête de prévalence	54
Conclusion	55

Liste des figures

- Figure n° 01 : la répartition de leishmaniose canine dans le monde.....1
- Figure n° 02 : la forme promastigote.....3
- Figure n° 03 : forme amastigote dans un macrophage.....3
- Figure n° 04 :Cycle évolutif des Leishmanies cutanées et viscérales4
- Figure n° 05 : aspect général d'un phlébotome.....5
- Figure n° 06 : aspect général d'un phlébotome.....5
- Figure n° 07 : la leishmaniose cutané.....11
- Figure n° 08 : : la leishmaniose viscérale.....12
- Figure n° 09 : Cycle anthroponotique chez l'homme (L. tropica)[36]12
- Figure n° 10 : Diagnostic parasitologique de confirmation [37].....13
- Figure n° 11 : Figure , 11 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien (Lubas.....15
- Figure n° 12 : technique IFI [42].....18
- Figure n° 13 : Principe du test IFI [42].19

Liste des tableau :

Tableau 1 : taxonomie du parasite de la leishmaniose.

Tableau 2 : les symptômes de la leishmaniose canine.

Tableau 3 : Traitement de la leishmaniose canine : association Glucantime et ZylODOISEAU ric

Tableau 4 : Répartition des 90 chiens dépistés dans la wilayas de tizi-ouzou

Tableau 5 : Liste des chiens mis sous traitement.

Tableau 6 : Description symptomatologique de chaque chien, à l'état initia

Tableau 7 : Evolution des scores relatifs à l'état clinique des chiens sous traitement.

Tableau 8 : Evaluation des résultats par la PCR.

Tableau 9 : Résultats positifs obtenus par la sérologie et la PCR [* chiens symptomatiques

Tableau 10 : Répartition des chiens positifs (PCR et/ou sérologie) en fonction de l'âge

Abréviation ;

GPI : glycosylphosphatidylinositol

Ha : Hectare

IFI : Immuno Fluorescence Indirecte

Ig: Immunoglobuline

IL: Inter leukine

INF α : Interféron α

IPA: Institut Pasteur d'Algérie

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

Kb : kilobase (mille paires de bases d'ADN bicaténaire)

KDa: Kilo Dalton

LB: Lymphocyte B

LC : Leishmaniose cutanée

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LNI: Larba Nath Irathen

LPG : lipophosphoglycane

LT : Leishmaniose tégumentaire

LV : Leishmaniose viscérale

MATET : Ministère du Tourisme et de l'Aménagement du Territoire

Mb : Million de paires de bases

MON : Désignation du laboratoire de l'Université 1 de Montpellier

NADH déshydrogénase : nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase.

NK : Natural Killer

NNN: NICOLLE, MC NEAL, NOVY

NO : Monoxyde d'Azote

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BA : Berger Allemand

CNA : Chien Algérien

DOX : Doxycycline

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

ELISA : Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

IFI : Immunofluorescence Indirecte

HCQ : Hydroxychloroquine

LC: Leishmaniose Cutanée

LCV : Leishmaniose Cutané-Viscérale

LV : Leishmaniose Viscérale

MON : Désignation du laboratoire de référence de l'université de Montpellier

mg/kg : Milligramme/Kilogramme

mm : Millimètre

m/sec : Mètre/ Seconde

NEG : Négatif

NNN : Novy-MacNeal-Nicolle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

POS : Positif

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RT : Real Time

SC : Score Cutané SC : Score Cutané

SG : Score Général

URMITE : Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes

Résumé

La leishmaniose canine est une maladie parasitaire zoonotique dont le traitement reste encore un défi à résoudre malgré l'arsenal thérapeutique disponible. L'association doxycycline/hydroxychloroquine pourrait être une alternative efficace pour traiter cette maladie car elle est active sur des agents bactériens intracellulaires or les leishmanies ont un cycle qui comprend une phase intracellulaire. L'objectif du travail était d'évaluer l'efficacité de cette association dans le traitement de la leishmaniose cutané-viscérale du chien et d'effectuer une enquête de prévalence dans une région d'Algérie, où la leishmaniose canine est enzootique : la Kabylie.

L'étude de terrain, a été principalement réalisée en Kabylie. Onze chiens, cliniquement leishmaniens et confirmés par un test de diagnostic rapide, ont été mis sous traitement. Cent autres chiens ont été dépistés pour effectuer une enquête de prévalence. Tous ces chiens ont fait l'objet d'une étude de laboratoire en sérologie (immunochromatographie) et en PCR quantitative en temps réel pour déterminer le taux de **parasitémie**.

Pour les cas cliniques graves l'efficacité du traitement a été partielle voire décevante. Par contre, un chien peu atteint a guéri. L'enquête de prévalence a montré que la Kabylie reste toujours un foyer actif de la leishmaniose canine. Ainsi, 27% (27/100) des chiens testés (avec ou sans symptômes) sont positifs à la sérologie et/ou à la PCR. Parmi les chiens asymptomatiques, la prévalence est de 22,3% (21/94).

Notre travail n'est donc qu'un apport modeste à la connaissance des moyens de maîtrise de la grave zoonose qu'est la leishmaniose canine, mais il permet d'identifier des points d'améliorations qu'il conviendrait de prendre en compte lors d'autres études.

Mots-clés : Leishmaniose canine, Prévalence, Kabylie, Traitement, Doxycycline, Hydroxychloroquine,

Abstract

Canine leishmaniasis is a zoonotic parasitic disease whose treatment remains a challenge to be met in spite of the therapeutic arsenal available. The doxycycline / hydroxychloroquine combination could be an effective alternative to manage this disease because it acts on intracellular bacterial agents, and the leishmania cycle includes an intracellular phase.

The objective of the work was to estimate the efficiency of this combination in the treatment of cutaneo-visceral leishmaniasis in dogs and to make a prevalence survey in a region of Algeria where canine leishmaniasis is enzootic: Kabylie.

Methodology: The field study was mainly performed in Kabylie. Eleven clinically leishmanic dogs, confirmed by a rapid diagnostic test, were treated. One hundred other dogs were screened to conduct a prevalence survey. All these dogs underwent laboratory studies (immunochromatography) and real time quantitative PCR to determine their parasitemia.

Results: For the serious clinical cases, the efficiency of the treatment was only partial, even disappointing. On the other hand, one slightly affected dog was cured. The prevalence survey showed that Kabylie is still an active center for canine leishmaniasis. Indeed, 27% (27/100) of the tested dogs (with or without symptom) were positive as proved by the blood tests and/or qPCR. Among the asymptomatic dogs, prevalence was 22.3% (21/94).

In conclusion: Our work is therefore only a modest contribution to the knowledge of canine leishmaniasis control, but it allows to identify points of improvement which should be taken into account during other studies.

Keywords: Canine leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Treatment, Doxycycline,

1- INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des protozooses infectieuses touchant un grand nombre d'animaux vertébrés dont l'Homme et le chien. Elles sont dues à la multiplication, au sein des cellules du système des phagocytes mononucléés, de parasites appartenant au genre *Leishmania*. Ces protozoaires sont transmis à l'hôte vertébré par l'intermédiaire de diptères psychodidés du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde[1]

Chez l'Homme, les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays du monde et l'on considère qu'elles menacent 350 millions de personnes. En Algérie, les leishmanioses sont de deux types : la leishmaniose viscérale dont le réservoir animal est le chien et la leishmaniose cutanée zoonotique. Il y a eu trois recensements de la forme viscérale : entre 1965 et 1975, 497 cas, entre 1975 et 1984, 700 cas et enfin entre 1985 et 1990, plus de 1200 cas [2]

La Grande Kabylie la leishmaniose s'immerge depuis longtemps. Elle est considérée comme étant le foyer le plus actif de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée sporadique, [3]. Il représente 50% des cas leishmanioses viscérales recensées [4].

En médecine vétérinaire, la leishmaniose canine à *Leishmania infantum* occupe une place particulière parce qu'elle présente, dans de nombreux pays du pourtour méditerranéen, une grande importance. En 1977, DEDET rapportait que 11.4% des chiens de Grande Kabylie, présentaient des anticorps spécifiques [2] ; en 1984, BELAZZOUG trouva 37.5% de chiens séropositifs dans la région d'Azazga en Kabylie [6] et enfin en 2006, HARRAT enregistra 42.8% d'animaux positifs dans la région de Dra El Mizan toujours en Kabylie [2]

La leishmaniose canine est une maladie redoutable aux multiples facettes, chronique, difficile à traiter, fréquemment sujette à des rechutes et donc de pronostic est toujours réservé. Les méthodes de lutte contre la leishmaniose canine sont curatives ou préventives. Peu de traitements ont fait la preuve de leur efficacité et de leur innocuité. De plus, en raison des risques de chimiorésistance, il semble aujourd'hui nécessaire de recourir à une thérapeutique consensuelle, alliant efficacité optimale, diminution des risques de rechute, faible toxicité et respect d'une santé publique de qualité. La recherche de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques pour le chien se heurte au caractère zoonotique de la maladie qui empêche l'utilisation de molécules (pourtant efficaces) réservées à un usage hospitalier, et dans notre travail on a utilisé deux molécules pour traiter un nombre de chiens au niveau de la région de Tizi Ouzou.

Comme objectif on va essayer de répondre à certaines questions ;

C'est quoi la leishmaniose, comment elle se manifeste ?

Quelle est la réaction immunitaire lors des différentes formes des leishmanioses ?

Quelles sont les molécules utilisées pour traiter ces chiens, et comment était la réponse de chaque chien ?

Chapitre I : rappels
parasitologique ,
épidémiologique,
clinique sur la
leishmaniose

1- Définition

La leishmaniose est une protozoose infectieuse, inoculable à un grand nombre d'animaux vertébrés dont l'homme et le chien. Elle est due au développement et à la multiplication au sein des cellules du système des phagocytes mononucléés des parasites appartenant au genre *leishmania*. Ces protozoaires sont transmis par la pique d'un psychodidé, insecte diptère nématocère, appartenant au genre phlébotomes [8]

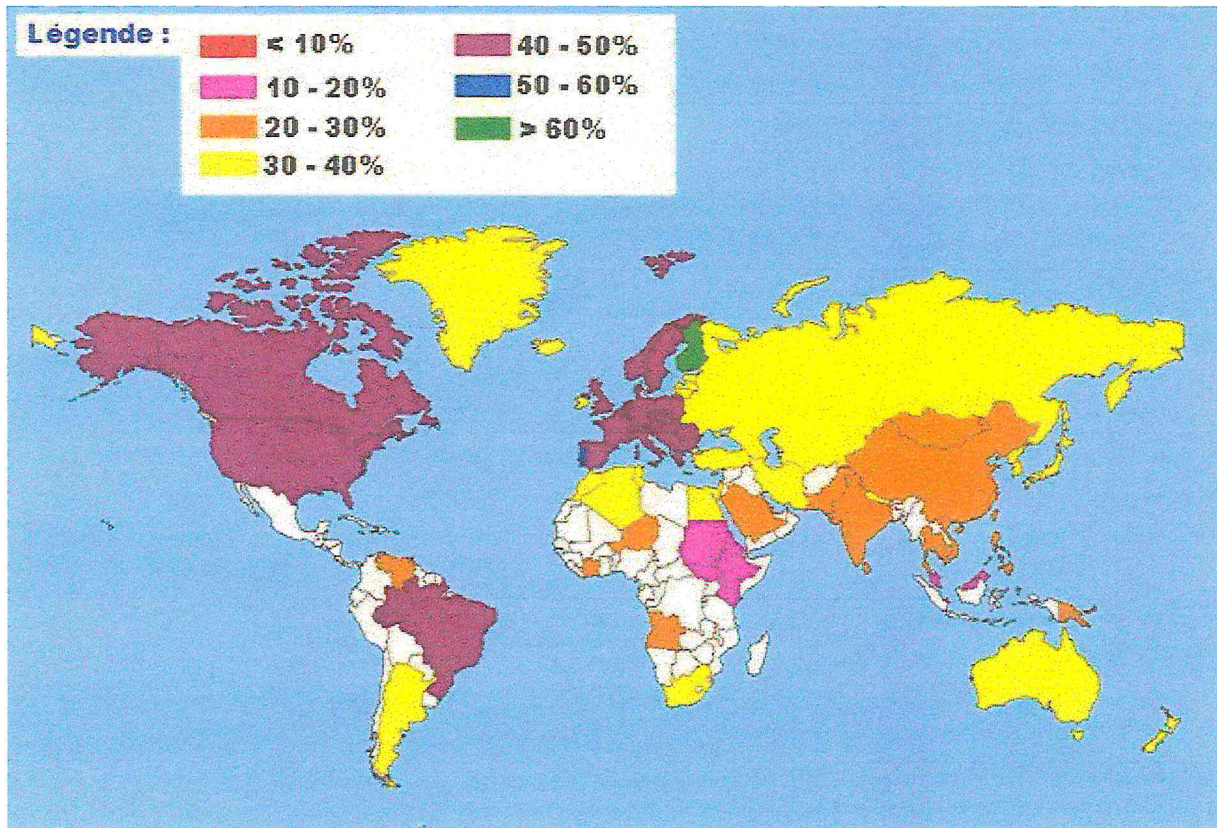


Figure 01 : la répartition de leishmaniose canine dans le monde

2-Historique

Leishmaniose est la première parasitose décrite au moins dans sa forme cutanée, qui remonte à l'antiquité, reconnue par des médecins persans et indiens comme l'en témoigne par le nom donné à la maladie (*kala Azar*), et selon Dedet au 10^{ème} siècle El Boukhari décrit cette affection cutanée, et Avicenne l'attribuait à une pique de moustiques. L'individualisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pas pu se faire qu'au 19^{ème} siècle.

La première description clinique moderne est celle de MC Naugh en 1882. le parasite découvert par Cunighan en 1885 dans les prélèvements de bouton d'orient. [9]

En 1885 Cunningham a réalisé la première observation des leishmanies .Elles sont redécouvert par la suite en 1891 par Firth, mais elles ne sont pas attribué comme étant responsable de la leishmaniose qu'en 1903 de façon simultanée par Leishman et Donovan

En 1908, Nicolle et Comte à l'institut Pasteur de Tunis décèlent le même protozoaire chez le chien et démontrant expérimentalement la transmission possible de l'homme au chien. C'est en 1921 que le vecteur phlébotome est découvert par les frères Sargent, et en 1941 qu'Adler et Ber ont décrit la transmission des leishmanies par la pique d'un phlébotome. [10].

En Algérie, le premier cas de la leishmaniose canine a été rapporté par les frères SERGENT en 1910 [11].

3-Importance :

L'importance de la leishmaniose canine n'est pas négligeable puisque l'incidence en zone d'endémie est relativement élevée.

3-1- Médicale :

La leishmaniose est une maladie fréquente dans le bassin méditerranéen, et l'Algérie parmi les pays les plus touchés dans le monde avec 54 145 cas. Cette maladie occupe la première place dans les maladies parasitaires en Algérie et représente 35% des maladies à déclaration obligatoire. La situation est alarmante, car l'extension de la maladie peut également aggraver la situation épidémiologique de la tuberculose et de VIH/sida du fait de la co-infection, les auteurs se portent une série de 213 cas de la leishmaniose cutanée recensés dans la wilaya de TIZI-OUZOU [12].

3-2- Economique :

L'importance économique de la leishmaniose est liée au coût engendrés par la recherche du diagnostic (consultations, examens complémentaires) mais aussi par le traitement qui est souvent à vie et onéreux. Dans les meilleurs des cas la guérison n'est que clinique : l'animal n'est jamais stérile de ces parasites et restera porteur à vie [13].

3-3 sanitaire :

L'importance sanitaire est due au caractère zoonotique de la maladie, qui, bien que rarement exprimée, reste non négligeable. [14]. La leishmaniose viscérale méditerranéenne n'est plus comme le passé une maladie infantile elle a été observée aussi bien chez les sujets adultes immunodéprimés de façon iatrogène (traitements immunodépresseurs pour les greffes, corticoïdes, anticancéreux [15] ou de façon pathologique (co-infection par le virus de l'immunodéficience acquise VIH [16]. Le chien représente le principal réservoir,, mais l'homme co-infecté a été en mesure d'infecter le phlébotome [17].

4- Le parasite :

Les leishmanioses sont des protozoaires flagellés de l'ordre des Kinétoplastidés, de la famille des trypanomatidae et du genre Leishmania. Dans le genre Leishmania, on distingue

deux sous genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur (phlébotome). Le sous genre *Leishmania* est caractérisé par un développement suprapylorique et le sous genre *Viannia* par un développement péri-pylorique. Grâce à la technique d'électrophorèse des enzymes, une vingtaine d'espèces ont été identifiées et regroupées dans six complexes distincts : *infantum*, *donovani*, *tropica*, *aethiopica* et *major* dans l'ancien monde, *mexicana*, *mexicana*, *braziliensis* et *guyarensis* dans le nouveau monde. [18]

4-1 la morphologie :

On retrouve le parasite sous deux formes :

-Une forme promastigote, observée uniquement chez le vecteur et en culture :

Il s'agit d'un élément allongé, de 15-20 µm, avec un flagelle libre ;



Figure 02 : la forme promastigote.

- une forme amastigote, observée dans les cellules du système des phagocytes mononucléés du chien, élément globuleux de 2 à 4 µm de diamètre, possédant un flagelle intracytoplasmique (non visible en microscope optique), un noyau volumineux et un kinétoplaste [19]

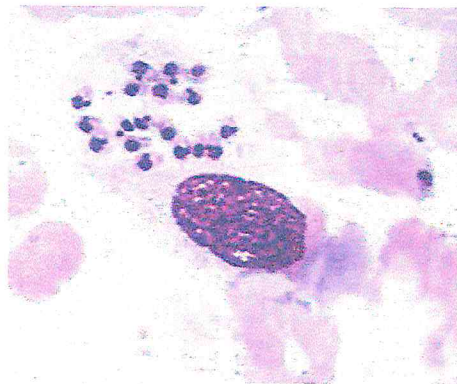


Figure 03 : forme amastigote dans un macrophage.

4-2 taxonomies :

Les leishmanies sont des parasites endocellulaires du système cellulaire phagocytaire mononucléé des vertébrés [20]

Classification :

Règne	Protista
Embranchement	Protozoa
Classe	Flagellé
Ordre	Zoomastigophorea
Famille	Trypanosomatidae
Genre	Leishmania
Espèce	-Leishmania -Vaiannia

Tableau 1 : taxonomie du parasite de la leishmaniose.

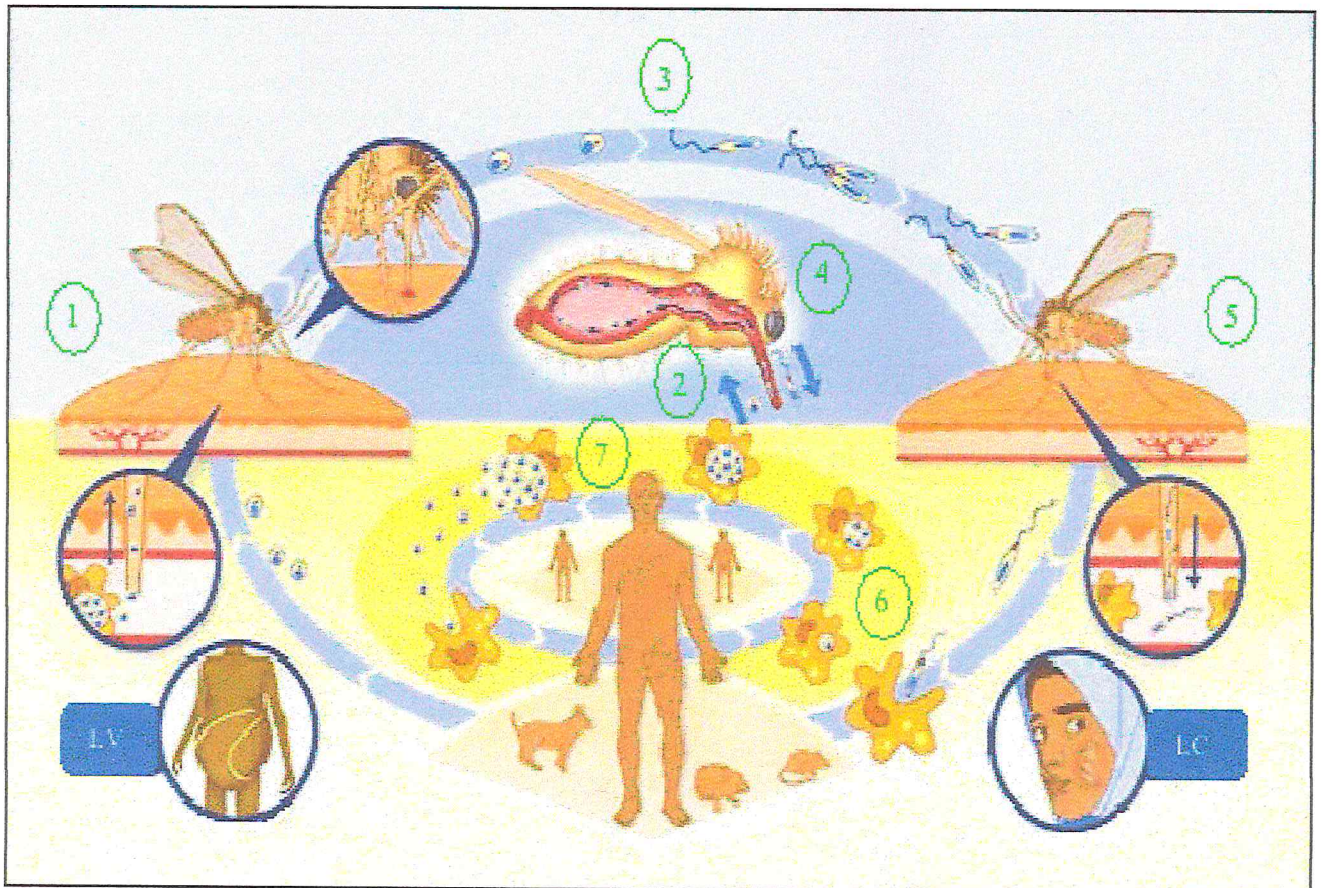


Figure 4 : Cycle évolutif des Leishmanies cutanées et viscérales (UNICEF)

5 - VECTEUR:

5-1- classification et morphologies :

Le Phlébotome est un diptère Nématocère psychodidé, de couleur gris jaunâtre. Il est de petite taille (2-3mm)et son corps est grêle . Il possède une paire d'ailes lancéolées velues, dressées en U au repos, son thorax bombé lui donne un aspect bossu [21]

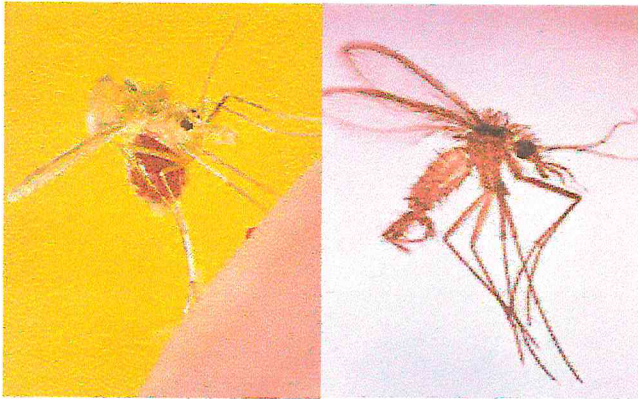


Figure 5,6 : aspect général d'un phlébotome.

5-2- a biologie :

-Nutrition :

La femelle phlébotome est telmophage : elle se nourrit d'un mélange de sang et de lymphes formés à la suite d'une pique assurée par des pièces buccales de fort calibre . Ce repas s'effectue de manière interrompue ,à la suite de plusieurs piques, sur le même individu ou non.

Le repas est composé aussi de l'absorption de sucres obtenus en particulier à partir de sève végétale. Cet apport se révèle d'ailleurs indispensable à la transformation et à la multiplication des leishmanies dans le tube digestif des phlébotomes [22]

-Habitat :

L'activité des phlébotomes est crépusculaire ou nocturne, bien que quelques espèces piquent pendant la journée. Les adultes vivent dans des recoins obscurs qui sont relativement frais humide et comprennent les maisons ; latrines ; étables, grottes, fissures dans les murs, les roches ou le sol ; végétation dense ; trous d'arbre et contreforts ; terriers de rongeurs et d'autres mammifères ; nid de oiseaux et termitières .Les femelles de la plupart des espèces sont principalement exophages (elles piquent à l'extérieur) et exophiles (elles restent à l'extérieur au cours de la maturation des œufs) et ne peuvent pas être efficacement contrôlées par les pulvérisations d'insecticides. En revanche, les espèces qui sont endophiles (elles restent à l'intérieur des maisons) peuvent être attaquées de cette façon [23].

Le développement pré-imaginal (œufs, quatre stade larvaires et nymphes) se déroule dans la terre humide. Mais les biotopes de la reproduction sont connus pour peu d'espèces, ce qui constitue une limite très sérieuse à l'établissement des programmes de lutte. Il faut noter que les conditions de température et d'altitude définies pour chaque espèce [24].

6- épidémiologie :

6-1 épidémiologies descriptives :

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle due à des protozoaires flagellés du genre leishmania. Ce parasite affecte de nombreuses espèces de mammifères dont l'homme et carnivores aux quelles ils sont transmis par la pique d'un insecte vecteur qui est le phlébotome largement répandues à la surface du globe. Les leishmanioses connaissent une aire géographique intertropicale, mais débordant largement sur les zones tempérées du sud de l'Europe, de l'Afrique du nord, Asie et d'Amérique. Elles sont présentes sur quatre continents elles sont endémiques dans 98 pays du monde ou territoire [24].

6-2 épidémiologies analytiques :

a- espèce est réservoir :

Les sources de parasites sont les chiens hébergent des leishmanies dans le derme, les parasites peuvent être présents dans la peau même en absence de lésions cutanées. Au contraire chez les humains, on ne trouve pratiquement jamais de leishmanies dans le derme (sauf chez les immunodéficients) si bien que l'homme n'est pas la source habituelle d'infection pour le phlébotome.

Les chiens ; en raison de cette abondance de parasite dans le derme et la fréquence de leur infection, constituent le véritable réservoir habituels de la maladie humaine.

Cependant, leishmaniose infantum affecte également le chat, rongeurs et carnivores sauvages mais le rôle de ces animaux en tant que réservoir de la maladie humaine est inconnue [25]

b- transmission :

La transmission du parasite s'effectue par piqûre de phlébotome lors de leur repas sanguin, en particulier dans les zones glabres du corps de l'animal : chanfrein, conques auriculaires.

La contagion directe est possible mais extrêmement rare, nécessitant l'existence de lésions ouvertes (ulcères) permettant le passage de leishmanies dans les larmes, le jetage, la salive, ou à la surface de la peau.

Enfin, la transmission in utero est également possible mais probablement exceptionnelle [36]. De même, une transmission vénérienne n'est pas exclue car les leishmanies sont présentes dans le sperme et des chiens ont été infectés par cette voie.

C – facteurs de risque :

1 -pour l'homme :

Il existe plusieurs facteurs interviennent dans l'augmentation du risque de développement de la maladie

- La susceptibilité génétique de l'hôte (HLA, gènes de cytokine impliqués ...) et sa réponse immune, ce qui explique que les enfants, les personnes dénutries et immunodéprimées soient les plus touchées [24]
- Les mouvements de population augmentent le risque d'exposition aux phlébotomes (tourisme et les pèlerinages à destination de régions d'endémie [OMS, 2010])
- Les opérations militaires et les conflits armés peuvent également accroître l'incidence de la maladie. Des milliers de cas de la leishmaniose ont été observés parmi les soldats du Royaume-Uni et des États-Unis qui servaient à l'Iraq et en Afghanistan [1].
- La transmission à l'Homme est favorisée par l'habitude de dormir dehors, sans utiliser de moustiquaire, pendant la saison de transmission (chaude)[1]
- L'habitude de tenir les chiens et autres animaux domestiques à l'intérieur de l'habitation est considérée comme de nature à faciliter l'infestation, puisque les chiens sont les hôtes réservoirs de la présence de *L. infantum* et qu'ils attirent les phlébotomes, spécialement *L. longipalpis* [1].
- Facteurs socio-économique, dont la pauvreté : de mauvaises conditions de logement et d'hygiène périodestique (déchets).

7- Etude clinique :

a- La leishmaniose canine :

7-1 - pathogénies :

A la suite de l'incubation de promastigote le phlébotome les leishmanies sont phagocytées et se transforment en amastigotes dans la vacuole parasitophore du macrophage dermique ou cellule de langerhans. Sa résistance au sein de la vacuole lysosomale parasitophore ainsi que sa multiplication (le parasite) provoque la lyse de la cellule et entraînant la libération de se dernier, puis sa phagocytose par un autre macrophage assurant la propagation de la leishmanie dans l'organisme.

Les leishmanies développent des stratégies de survie dans se milieu hostile. Elles utilisent pour leur pénétration la fixation aux récepteurs du complément et évitent aussi l'induction d'une réaction oxydative. Elles possèdent en outre des enzymes, comme le superoxyde dismutase, qui les protègent contre l'action des ions superoxydes, et un revêtement de lypophosphoglycanes qui piègent les métabolismes de l'oxygène et assurent une protection contre l'action des enzymes. La glycoprotéine p63 inhibe l'action des enzymes lysosomales des macrophages [26].

La leishmania persiste dans l'organisme et s'y multiplie en utilisant des mécanismes d'échappement a l'action du système immunitaire :

- inhibition de l'action des macrophages :
- résistance à l'action lytique exercée par l'environnement intracytoplasmique [34 djamel]
- prédominance des lymphocytes Th2 qui stimulent les lymphocytes B donc la synthèse d'anticorps

7-2 symptomatologies :

7.2.1 Incubation :

L'incubation est assez longue, de l'ordre de plusieurs mois à plusieurs années, de sorte que la consultation doit intégrer dans l'anamnèse. Plusieurs formes cliniques peuvent être rencontrées :

- ✓ forme classique ; multiviscérale ou oligosymptomatique.
- ✓ Forme atypique très variées état de portage asymptomatique

7.2.2 Symptômes généraux :

On observe fréquemment :

- Un amaigrissement intéressant plus particulièrement les muscles temporaux, et pouvant aller jusqu'à la cachexie.

- Un abattement, qui peut aller en fin d'évolution jusqu'à la prostration, qui peut aussi être accompagné par :
- Une hyperthermie, mais celle-ci est transitoire et modérée (39° à 39.5°).
- Une anémie, pouvant être régénérative (due à l'envahissement de la moelle osseuse par les leishmanioses) et étant à l'origine de l'abattement. [27].[28].

7.2.3 lésions cutanéomuqueuse :

On peut observer :

- Une dépilation pouvant aller jusqu'à l'alopecie, au niveau des faces latérales de la tête du tronc
- Une hypo pigmentation au niveau de la truffe.
- Un chancre d'inoculation, inconstant et fugace, siégeant au niveau de la face ou sur la face interne des pavillons auriculaires.
- Des modifications de l'épiderme : hyper kératose (au niveau du chanfrein, de la truffe des coussinets plantaires), parakératose à l'origine du furfur leishmanien (squames de grande taille, sur la totalité ou une partie du corps de l'animal).
- Une onychogryphose (hypertrophie irrégulière des griffes).
- Des ulcères, soit cutanée localisée sur tout le corps mais préférentiellement en regard des articulations et de la truffe, ils sont non prurigineux et non douloureux mais cicatrisent mal ; soit muqueux, à l'origine d'épistaxis et d'hémorragies digestives.[27].[28]

7.2.4. Lésions intéressant le système des phagocytes mononuclée :

- une adenomégalie souvent multiple, intéressant essentiellement les nœuds lymphatiques superficiels, qui sont indolores et non adhérents au plan profond.
- une splénomégalie modérée.
- Un envahissement de la moelle osseuse par des parasites.

7.2.5 Lésions oculaires :

Les symptômes oculaires pouvant être observés sont :

- Une uvéite souvent antérieure et non granulomateuses.
- Une conjonctivite bilatérale, avec une hyperhémie, peuvent être mucopurulente, parfois chémosis ou des granulomes localisée au bord libre des paupières.
- Kératite superficielle rarement isolée, s'associant à une uvéite (kérato-uvéite) [29].

7.2.6 Symptômes urinaire :

- Syndrome polyurie –polydipsie.
- Insuffisance rénale causée par une glomérulonéphrite.[30]

7.2.7 Symptômes digestifs :

- Entérite diarrhéique plus ou moins hémorragique (en fonction du nombre et de la localisation des ulcères digestifs)
- Colite chronique [31].

Donc les symptômes de la leishmaniose se résume en :

Localisation	Symptômes et lésions
Etat général	Abattement, prostration, anorexie. Amaigrissement. Hyperthermie irrégulière, fugace et modérée (39°C à 39,5°C).
Peau et phanères	Calvescence, alopecie. Chancre d'inoculation, inconstant et fugace. Hyperkératose, parakératose Onychogryphose. Ulcères cutanéomuqueux. Granulomes, nodules non adhérents.
Système des phagocytes Mononuclées	Adénomégalie indolore, symétrique (concerne essentiellement les noeuds lymphatiques superficiels). Splénomégalie, modérée et inconstante. Envahissement de la moelle osseuse.
Œil	Uvéite antérieure non granulomateuse avec photophobie. Conjonctivite et leishmaniomes. Kératite banale ou stromale.
Appareil urinaire	Insuffisance rénale (glomérulonéphrite).
Système sanguin	Hyperprotéinémie avec hypoalbuminémie et Hypergammaglobulinémie (pic électrophorétique oligoclonal des gammaglobulines en « pain de sucre »). Anémie normochrome, leucocytose puis leucopénie, monocytose.
Squelette	Ostéolyse et ostéoprolifération des diaphyses. Sclérose. Polyarthrite, synovite.
Muscles	Amyotrophie. Granulomes.
Système nerveux	Dégénérescence neuronale, amyloïdose de l'encéphale et du cervelet. Rupture de la barrière hémato-méningée.
Appareil respiratoire	Rhinite, pneumonie. Inflammation des muqueuses, épistaxis.
Appareil digestif	Entérite. Colite chronique. Ulcères et granulomes.

Tableau 2 : les symptômes de la leishmaniose canine.[32]

b- la leishmaniose humaine :

Classiquement, les enfants les plus jeunes sont considérés comme les plus sensibles pour la forme viscérale, en particulier lorsqu'ils souffrent de malnutrition. Chez l'homme, l'expression clinique de la maladie n'est pas la règle. Parmi les leishmanioses cliniques à *Leishmania infantum*, on distingue classiquement une forme cutanée et une forme viscérale. L'orientation de la maladie vers l'une ou l'autre des deux formes cliniques dépend principalement du terrain immunitaire de l'hôte infecté et du variant enzymatique du parasite [33].

1- Formes cutanées

C'est la forme bénigne de l'infection. Elle est caractérisée par des lésions cutanées localisées, sans extension muqueuses ni viscérales. Les lésions sont localisées au site d'inoculation du parasite par le phlébotome ; elles siègent de préférence sur les parties découvertes du corps. La lésion typique est une ulcération croûteuse indolore sur un nodule inflammatoire mal délimité d'environ deux centimètres de diamètre, bordé d'un bourrelet périphérique riche en parasites [34]. Les variants enzymatiques de *L. infantum* responsables de la forme cutanée du nord sont : les zymodèmes MON-24, MON-80 et MON-1. Les vecteurs prouvés sont *Phlebotomus perfiliewi* et *P. perniciosus*, le réservoir fortement suspecté est le chien [35](Figure.



Figure 7 : la leishmaniose cutanée (ref)

2. Forme viscérale

C'est une atteinte systémique de la lignée des phagocytes mononucléés, dont l'évolution spontanée aboutit généralement à la mort en un à deux ans. L'incubation est extrêmement variable, en moyenne entre trois et six mois, mais pouvant aller jusqu'à plusieurs années ; elle

semble plus courte chez les enfants. Dans la forme infantile, s'ensuit après la période d'incubation, une phase d'invasion, caractérisée par une forte fièvre, irrégulière, accompagnée d'une splénomégalie et d'une pâleur cutanéomuqueuse, signe d'anémie. A ce stade, certaines infections régressent spontanément. Durant la phase d'état, s'installent une anorexie, une asthénie et un amaigrissement. Ces signes à peu près constants s'accompagnent d'une hépatomégalie. Une éruption cutanée, non ulcéreuse, peut également être [35].

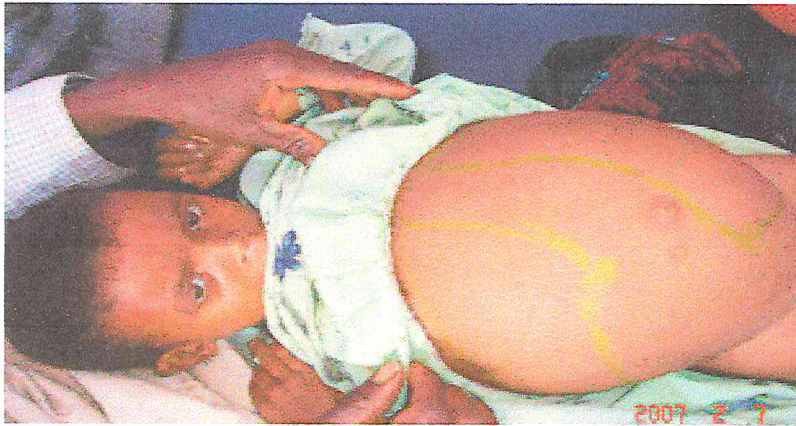


Figure 8 : la leishmaniose viscérale (ref)

Symptomatologie :

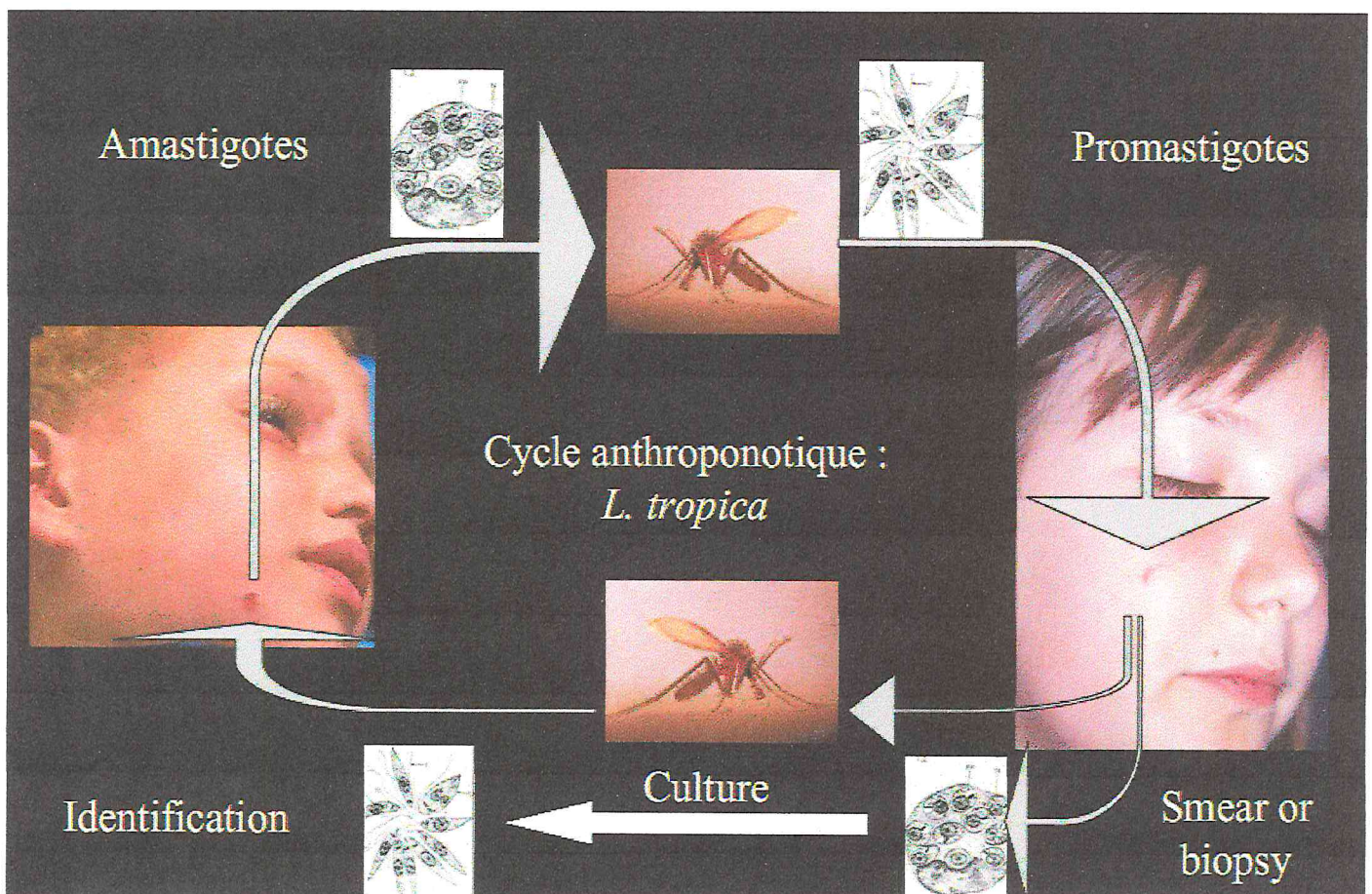


Figure 09 : Cycle anthroponotique chez l'homme (*L. tropica*)[36] .

3. symptômes Généraux :

- Fièvre
- Splénomégalie
- Asthénie
- Hémorragies des muqueuses
- Rate palpable
- Toux
- Thrombopénie
- Ictère

4.- Diagnostic de confirmation

- frottis de peau(MGG) positif (amastigotes)
- sérologie positive
- PCR positive (sang)
- IDR négative

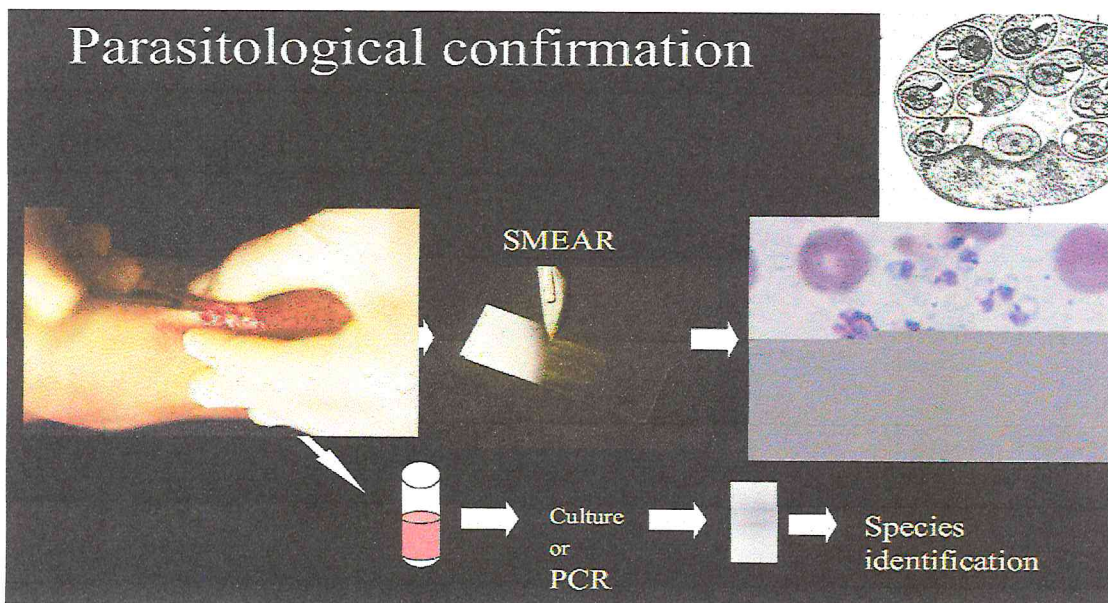


Figure 10 : Diagnostic parasitologique de confirmation [37]

5. Traitement :

- Pentamidine : 4mg/Kg x 10 / 17 jrs
- Glucantime
- Amphotéricine B (Fungizone N.D) 0,5 mg/Kg / 14jrs

- Amphotéricine B liposomale (AmBisome) 3mg/Kg J1- J5 et J10 18mg/Kg J1 et J10

Il faut souligner que l'AmBisome est l'une des dernières molécules sur le marché sans effets secondaires par rapport à l'Amphotéricine B.

8- diagnostic :

La démarche diagnostique lors de la leishmaniose, passe par différentes étapes, à savoir :

8-1-Diagnostic biologique

8-1-1- Méthodes non spécifiques

- Examens hématologiques

La leishmaniose peut entraîner des modifications de l'hémogramme, comme citées précédemment ; elles ne sont pas toujours observées mais on peut parfois noter ;

- Anémie arégénérative normochrome normocytaire et/ou une thrombocytopénie
- Leucocytose avec granulocytose en début de maladie
- Leucopénie plus tardive
- Monocytose (fréquemment)
- Troubles de la coagulation: le temps de saignement et de coagulation est augmenté.

- Examens biochimiques

Les protéines totales sont souvent augmentées : en général leur taux est supérieur à 80 g/L. Leur électrophorèse met en évidence un pic bêta-gamma (figure 11). Une hyperglobulinémie est présente associée à une hypoalbuminémie dans plus de 90 % des cas. Le rapport albumine sur globuline peut être un paramètre intéressant dans le cadre du suivi thérapeutique, car il augmente progressivement.

Les paramètres rénaux peuvent également être affectés. Ils sont à évaluer et à suivre en cours de traitement car les molécules utilisées sont néphrotoxiques [38] ; [39].

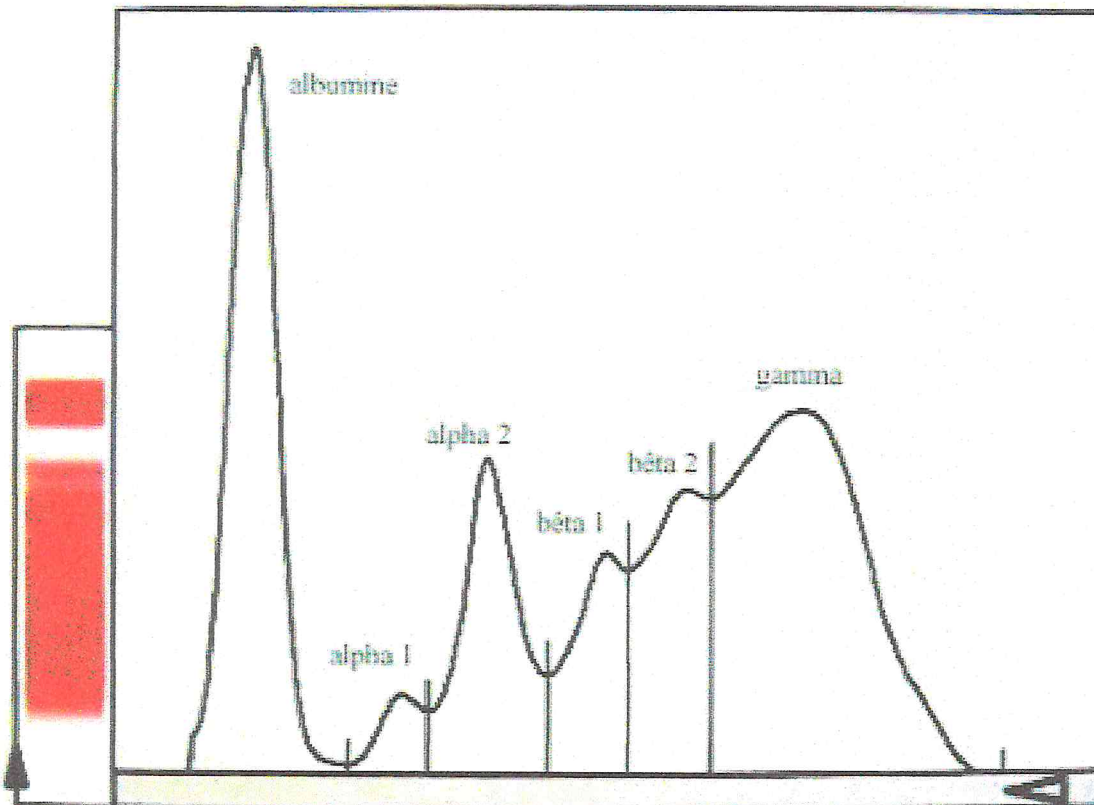


Figure , 11 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien (Lubas)

8.1.2. Formoleuco-gélification :

Il s'agit d'un test qui traduit la forte concentration du sérum en protéines (dont les globulines) en les faisant précipiter sous forme visible en ajoutant quelques gouttes de formol au sérum. La prise en masse et l'opalescence traduisent cette hyperglobulinémie [38]

8.1.3- Méthodes spécifiques

- Mise en évidence du parasite

C'est la seule façon d'obtenir un diagnostic de certitude. Les prélèvements possibles pour la réaliser sont [38] :

- Ponction de moelle osseuse (premières sternèbres, jonction chondro-costale) ou de noeud lymphatique ;
- Ponction d'un nodule cutané à l'aiguille fine ;

- Frottis conjonctival ;
- Prélèvement de lymphes dermiques par test du copeau cutané ;
- Calque cutané d'une lésion ulcéreuse ;
- Biopsie cutanée pour réaliser une histologie.

Une fois le prélèvement effectué, quatre techniques permettent de mettre en évidence le parasite :

- Microscopie

Les parasites intra-monocytaires sont recherchés par la technique de May-Grünwald-Giemsa (coloration) de calques cutanés, d'adénogrammes ou de myélogrammes. Cette méthode est réalisable au cabinet par le vétérinaire praticien un peu expérimenté et permet en cas de mise en évidence du parasite de confirmer très simplement et rapidement le diagnostic.

Malheureusement sa sensibilité est faible (60 %) [38].

Il convient de privilégier, en cas d'adénomégalie, la ponction de ganglion, et, en l'absence d'adénomégalie, de réaliser une ponction de moelle osseuse. La sensibilité décroît ensuite si l'observation se fait à partir d'une ponction d'un nodule cutané à l'aiguille fine, d'un frottis conjonctival, d'une biopsie cutanée.

La probabilité d'observer les leishmanies est plus importante en début d'évolution de la maladie, la charge parasitaire étant en effet plus élevée car la multiplication est plus intense, elle est ensuite limitée du fait de la réponse immunitaire de l'organisme [40]

- Culture du parasite

Le parasite est cultivé dans le milieu de Nicolle-Novy-Mac Neal à partir d'un prélèvement. C'est la méthode de référence, mais elle nécessite quelques semaines d'incubation. Elle n'est réalisée que par les laboratoires de recherche [38].

8-1-4- PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est la plus sensible des trois techniques : sa sensibilité est de 97 %. Elle met en évidence l'ADN de *Leishmania*, même présent en faible quantité, dans les ponctions ganglionnaires ou de moelle. C'est la technique de choix pour l'établissement de la parasitémie. Elle nécessite des équipements sophistiqués et est très sensible aux contaminations, elle est donc réalisée uniquement dans des laboratoires spécialisés. Il est important de noter que 80 % des chiens asymptomatiques vivant en zone d'enzootie peuvent présenter de l'ADN de *Leishmania* dans la peau et les muqueuses mais seulement 10 % dans les ganglions [38].

L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne fait pas la différence entre les leishmanies vivantes et l'ADN leishmanien résiduel ; il est donc préférable de l'utiliser pour confirmer le diagnostic et non dans le cadre d'un suivi thérapeutique [40].

8-1-5 Techniques d'immunomarquage

Cette technique peut être utilisée lorsque l'histopathologiste n'a pas mis en évidence de parasites malgré la forte suspicion de leishmaniose. Leur but est de révéler la présence d'antigènes présents dans le prélèvement. Il existe plusieurs méthodes [41].

8-2-1 Méthodes sérologiques

Elles mettent en évidence et quantifient la présence d'anticorps canins spécifiques de *Leishmania infantum* chez le sujet. Elles ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude mais uniquement de révéler que l'animal a déjà été exposé au parasite (mais des leishmanies sont en général toujours présentes). Un animal en début de contamination ou ayant une immunité cellulaire solide peut se révéler faussement négatif. Un résultat positif correspond à un animal ayant rencontré le parasite et qui a élaboré des anticorps spécifiques, il peut être en début de maladie ou être en état d'immunité acquise et être asymptomatique [38].

Nous évoquerons dans une prochaine partie l'intérêt du suivi sérologique pour apprécier une baisse du taux d'anticorps lors d'une réponse thérapeutique favorable.

- Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte, ou IFI, est la méthode quantitative de référence

agrée par l'Office International des Épizooties (O.I.E). Elle est effectuée en utilisant des formes promastigotes de culture comme antigène. Le seuil de positivité est habituellement fixé à 1/100 (ou 1/80). C'est une méthode considérée comme sensible et spécifique. La sensibilité varie entre 92 et 99 % [38] ; [39]

Principe de la technique IFI :

Différentes étapes de la réalisation d'une technique d'immunofluorescence indirecte :

- Fixation de l'antigène sur la lame (certaines lames sont commercialisées avec l'antigène déjà fixé)
- Dépôt du sérum du patient et incubation
- Lavage
- Ajout des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par le fluorochrome
- Lavage
- Lecture à l'aide d'un microscope à fluorescence [42]

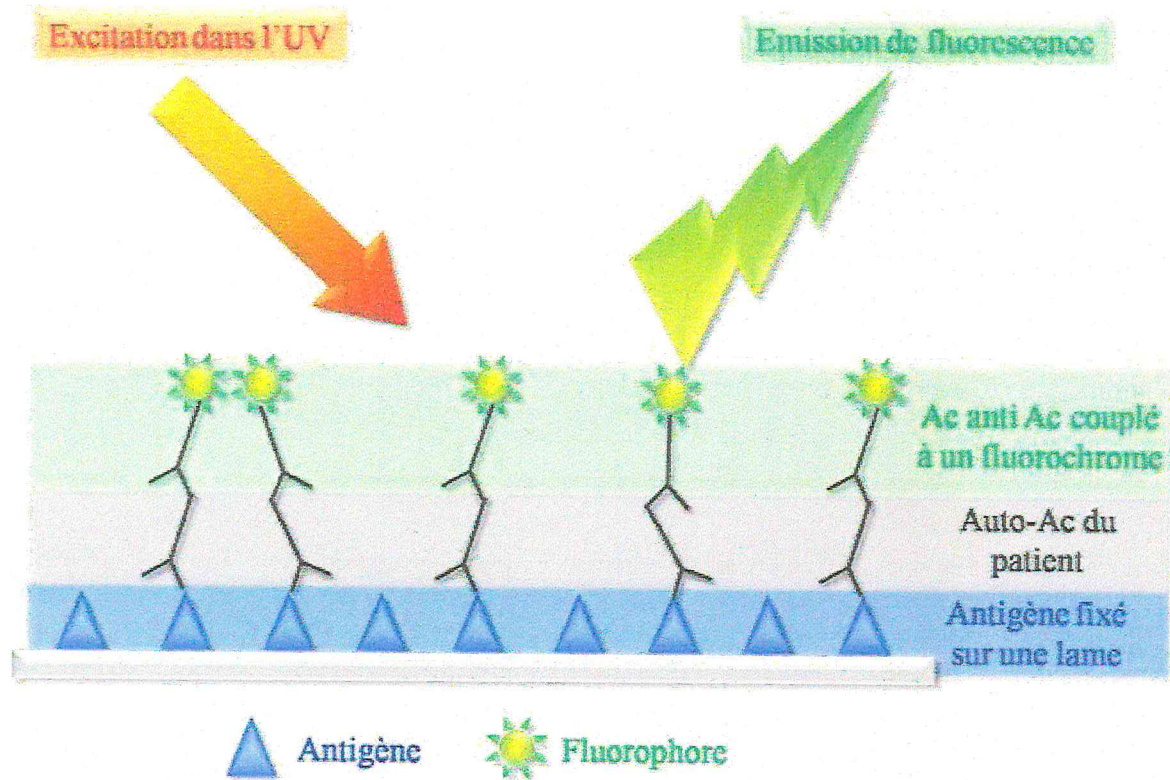


Figure12 : technique IFI [42].

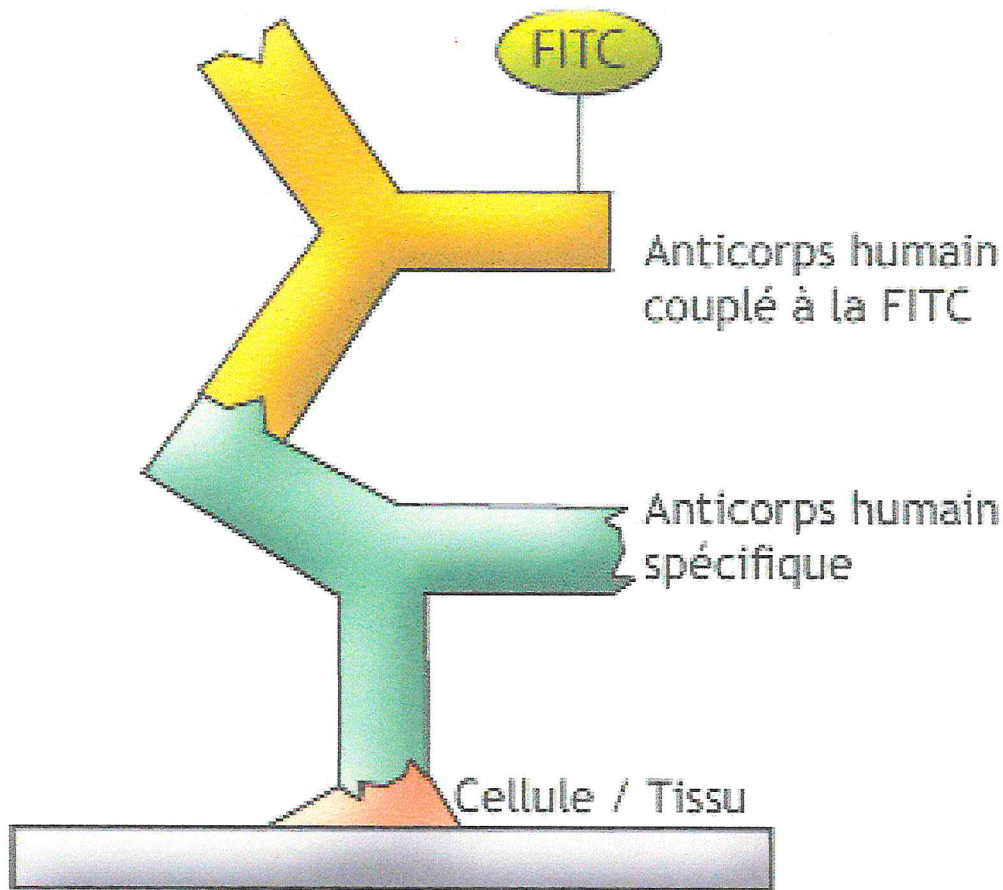


Figure13 : Principe du test IFI [42].

Des cellules infectées ou non, des tissus ou des substances purifiées, biochimiquement caractérisés, sont utilisés comme substrats antigéniques.

> Si l'échantillon est positif, les anticorps spécifiques présents dans l'échantillon de sérum dilué se lient aux antigènes fixés à la phase solide.

> Dans une seconde étape, les anticorps liés sont détectés avec des anticorps anti-humain couplés à la fluorescéine et analysés avec un microscope à fluorescence.

> Les échantillons positifs peuvent être titrés en plusieurs étapes de dilutions. L'intervalle de titration le plus adapté est obtenu avec le facteur de dilution 3.162 (racine carrée de 10). De cette manière, toute seconde étape de dilution représente dans son dénominateur une puissance de 10 (1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1000, 1:3200, 1:10000 etc.). D'autres méthodes de dilutions peuvent également être utilisées (1 :80 ; 1 :160,...)

8-2-2-ELISA

La technique ELISA est une méthode quantitative qui est préférentiellement utilisée par les épidémiologistes car elle a comme propriété d'être automatisable. Elle est au moins aussi

sensible que l'IFI, et sa lecture est moins subjective car elle est réalisée par un spectrophotomètre [38].

8-2-3-Techniques d'agglutination

Ce sont des techniques semi-quantitatives. Il est possible de réaliser une agglutination ou une hémagglutination. Elles sont peu utilisées mais elles permettent de mettre en évidence une affection précoce chez des chiens primo-infectés car elles détectent les IgM.

Leur sensibilité est de 95 % et leur spécificité de 94 % [38] ; [39].

8-2-4 -Western Blot

C'est une méthode qualitative mais elle est très sensible et très spécifique. Elle est pour cela considérée comme la méthode de confirmation en sérologie. Elle permet de détecter les anticorps spécifiques d'antigènes de *Leishmania infantum* préalablement séparés par électrophorèse [38].

En pratique, il est essentiel de choisir les analyses les plus intéressantes en fonction de:

- Utilisation que l'on veut faire du test : diagnostic de la maladie ou enquête épidémiologique ;
- Zone d'exercice : en zone d'endémie il est important de choisir des méthodes très sensibles pour éviter les faux négatifs ;
- Coût de réalisation,
- Stade de la maladie : la PCR permet une détection plus précoce que l'apparition des anticorps et induit moins de faux négatifs [41].

Les divers examens spécifiques peuvent être utilisés selon deux objectifs :

- si l'on souhaite confirmer une suspicion clinique (notamment en zone d'enzootie) il faut tenter une observation directe au microscope à partir de calques cutanés, d'adénogramme ou de myélogramme. Si des éléments parasitaires sont présents, le diagnostic est posé. Si le parasite n'a pas été isolé, il faut effectuer une sérologie à partir de sang prélevé sur tube sec il est préférable d'associer deux tests (ELISA et IFI). Si ces analyses sont négatives mais que la suspicion clinique demeure, il faut envisager une PCR réalisée sur un prélèvement de nœud lymphatique ou, à défaut, de sang.
- si l'on souhaite contrôler un animal ne présentant pas de symptômes, il faut faire un contrôle sérologique environ 2 mois après la période de contamination, ou une PCR très sensible à la fin de la saison de contamination [39].

Les méthodes sérologiques de diagnostic reflètent l'installation d'une réponse immunitaire suite à l'infection par les leishmanies. Cette réponse immunitaire est plus ou moins protectrice contre la maladie. [39]

Chapitre II :

Repense immunitaire

9-Réponse immunitaire :

L'étude des réponses dirigées contre le parasite est nécessaire afin de mieux comprendre l'immunité de l'hôte face à l'organisme pathogène et de pouvoir alors développer des vaccins contre les maladies humaines et animales.

L'infection d'un chien par leishmania ne se manifeste pas nécessairement par l'expression de la maladie. On distingue ainsi, au sein de chiens infectés, des animaux symptomatiques et des animaux asymptomatiques. Cette dualité peut suggérer une différence dans la réponse immunitaire.

9-1. Rappels d'immunologie :

L'immunité met en jeu deux processus :

-l'immunité non spécifique, ou immunité, qui se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction ; elle peut garder la mémoire de la rencontre.

a) les cellules de l'immunité

✓ Les lymphocytes

Ils sont présents dans le sang, la lymphe et tous les organes lymphoïdes. Deux types principaux de lymphocytes coexistent : les lymphocytes B(LB) et les lymphocytes T (LT). Ce sont des cellules effectrices de l'immunité acquise. Chaque lymphocyte porte un récepteur lui permettant d'identifier un déterminant antigénique(épitope) [43]

On distingue deux populations de lymphocyte T :

-les LT CD8 sont des lymphocytes précurseurs des lymphocytes cytotoxiques (L Tc) ;

- les LT CD4 sont des lymphocytes précurseurs des lymphocytes helper ou auxiliaires (LTh) : ils ont entre autres rôles celui d'activer les cellules de la réaction immunitaire : macrophages, LB, LTc. Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les LTh se différencient soit en LTh1 qui orientent la réponse immunitaire vers une immunité à médiation humorale (production d'anticorps).

• Les cellules NK

Les cellules NK (naturel Killer) ont été qualifiées de cellules tueuses naturelles car elles sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable, au contraire des lymphocytes T de nombreux mécanismes de régulation empêchent les cellules NK de s'attaquer aux saines, et l'activation des cellules des NK dépend entre autres de la diminution d'expression du CMH à la surface des cellules anormales. [43]

Les principales CPA sont :

-le système des phagocytes mononucléés (SPM) : monocytes et macrophage,

- les cellules dendritiques (dont les cellules de langerhans),

-les lymphocytes B.

- L'activation des lymphocytes

L'activation des lymphocytes dépend d'abord de la reconnaissance simultanée de l'antigène et de la molécule du CMH de classe I et la classe II :

-molécule de la classe I plus peptide endogène reconnus par les lymphocytes T helpers.

La reconnaissance de l'antigène constitue le premier signal, mais, pour que le lymphocyte soit active, un second signal est nécessaire : il est fourni par des molécules de costimulation et par des cytokines.

Les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes qui vont produire les anticorps et les lymphocytes T activés en LTc, qui sécrètent des molécules cytotoxiques et des facteurs solubles appelés cytokines, et deviennent les acteurs de l'immunité à médiation cellulaire[43]

b) Les molécules de l'immunité

- Citokine

Les cytokines interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et de la réponses immunitaires . Elles exercent leurs effets sur les cellules qui les ont produites (effets autocrine), sur d'autres cellules proches (effet paracrine) ou encore agissent à distance sur des organes ou tissu (effet endocrine). [43].

Ce sont des petites glycoprotéines (poids molécules situé entre 10 et 50 kDA). Il n'ya pas d'homologie dans leur structure. Elles sont toutes synthétisées de novo. On ne les trouve généralement pas dans les cellule au repos et elles ne sont produits qu'a la suite d'une activation.

Les lymphocytes Th sont les principales cellules productrices, mais d'autres cellules en produisent également : presque toutes des cellules de système immunitaires , les fibroblastes ,les cellules de l'endothélium vasculaires, les cellules épithéliales. [43]

-Immunoglobuline :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines comprenant quatre chaînes : deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques réunies entre elles par des ponts disulfures. Elles sont divisées en 5 classes : IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), IgM, IgA (IgA1 et IgA2), IgD et IgE. Les immunoglobulines synthétisées par les plasmocytes diffusent dans le sérum et les humeurs et se lient à l'antigène pour former des immuns complexes éliminés par les phagocytes [44].

9.1.1. Les réactions immunitaires lors de leishmaniose : modèle général

Après l'inoculation de promastigotes métacycliques par le phlébotome, les leishmanies se transforment en amastigotes intra-macrophagiques, macrophages à l'intérieur desquels le parasite peut persister et se multiplier (à la différence d'autres protozoaires), permettant ensuite sa dissémination dans l'organisme et la généralisation de l'infection.

9-1-2- Immunité innée

-Les antigènes majeurs du parasite : gp63 et LPG

Le processus immunologique commence par la présentation aux cellules immuno-compétentes des antigènes leishmaniens. Les antigènes majeurs du parasite sont la gp63 et le LPG ou lipophosphoglycane de surface. La gp63, glycoprotéine majeure de surface de la leishmanie, est un antigène essentiel impliqué dans le processus d'échappement au système de défense de l'organisme et dans sa capacité à le coloniser. En outre, la gp63 est l'un des antigènes susceptible d'induire une réaction immunitaire favorable. Elle est l'un des antigènes majeurs présentés par les cellules présentatrices d'antigènes au système immunitaire compétent [44].

- Rôle des macrophages

Le premier moyen de défense de l'hôte est une réponse immunitaire non spécifique.

Suite à l'infection, les macrophages tissulaires ou sanguins constituent la première ligne de défense, car ils ont pour fonction de phagocyter les leishmanies et de présenter leurs antigènes aux lymphocytes, initiant ainsi une réponse plus ou moins spécifique de ces cellules. Le macrophage joue le rôle de cellule présentatrice d'antigènes aux lymphocytes, en particulier aux lymphocytes T auxiliaires (ou « helper » : LTh) qu'il stimule grâce à une interleukine,

l'IL-1 [80] ; [59]. La survie des parasites à l'intérieur des macrophages montre qu'ils ont résisté à l'action lytique exercée par l'environnement intracytoplasmique (pH acide : 4,5-5,0, enzymes lysosomales, hydrolases, etc.). En effet, plusieurs mécanismes permettent aux leishmanies d'y échapper. Elles ont la capacité d'inhiber la protéine kinase C, une enzyme intervenant dans la synthèse de métabolites oxygénés par les macrophages. Elles produisent par ailleurs des lipophosphoglycane qui empêchent la maturation des phagolysosomes macrophagiques. Mais une réponse immunitaire spécifique, cellulaire et humorale, se met également en place [45] ; [46].

- Rôle des cellules de Langerhans

On considère généralement que la présentation des antigènes est également effectuée par les cellules de Langerhans, mais cette conception est mise en doute par certains auteurs ayant étudié le processus chez les souris soumises à l'infection par *Leishmania major* [47]. La réponse initiale à l'infection serait le fait des cellules dendritiques dermiques, tandis que les cellules épidermiques de Langerhans seraient responsables des phénomènes d'évasion immunitaire des parasites : les promastigotes qui ont pénétré dans les cellules de Langerhans échapperaient aux réactions immunitaires. Cette hypothèse rendrait compte de l'incapacité des cellules de Langerhans activées par les antigènes leishmaniens de conférer l'immunité.

Les cellules dendritiques élaborent de l'IL-12, qui active les cellules tueuses naturelles (cellules NK), les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Les cellules tueuses sécrètent de l'IFN- γ qui active les macrophages, puis lysent les macrophages parasités ; les polynucléaires, activés par l'IFN- γ détruisent les leishmanies par action oxydative (action du monoxyde d'azote : NO) [48].

Lorsque l'agent ne peut être éliminé par l'activité anti-microbienne non spécifique, une réponse spécifique peut être établie, dirigée en partie par les cytokines et anticorps dérivés des lymphocytes reconnaissant de manière spécifique les antigènes parasitaires exprimés sur les macrophages. Cependant, un échappement à ces défenses est souvent observé, aboutissant à l'apparition des signes cliniques [45].

9-1-3-Immunité acquise

Les réactions immunologiques à l'infection leishmanienne sont bien connues dans le cas de la leishmaniose dermatrope à *Leishmania major* inoculée à des souris résistantes : réponse de type Th1 productrice de taux élevés d'IL-2, d'IFN- γ et de NO.

Activation des macrophages et synthèse de NO

Le principal mécanisme impliqué dans la réponse immunitaire protectrice est l'activation des macrophages par IFN- γ et TNF- α pour tuer les amastigotes intracellulaires.

Les métabolites de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) sont produits par les macrophages activés par ces cytokines. Ces macrophages libèrent davantage d'ions superoxydes et d'eau oxygénée que les macrophages résidents normaux, et leurs mécanismes de toxicité indépendants de l'oxygène sont plus efficaces [48].

Le monoxyde d'azote (NO) est l'un des produits cytotoxiques dont la synthèse est fortement stimulée par des cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ qui agissent en synergie. C'est un métabolite de la L-arginine, produit par les macrophages et les cellules endothéliales. Il contribue à la résistance de l'hôte dans la leishmaniose en provoquant la destruction des parasites [84]. Sa production est le résultat de l'activation des macrophages parasités, par la voie génératrice de NO synthase : iNOS (i=inducible) [48].

L'implication de la voie du NO dépendant de la L-arginine dans la destruction des

Leishmania par les macrophages est démontrée par plusieurs faits : l'addition de l'inhibiteur de NOS, la NG-monométhyl-L-arginine, inverse l'activité leishmanicide et les donneurs chimiques de NO induisent la destruction extracellulaire et intracellulaire des espèces de leishmanies .

9-2-Les réactions immunitaires du chien infecté par *Leishmania infantum*

○ Infection expérimentale des chiens

L'infection expérimentale des chiens pour étudier les réponses immunitaires présentes au cours de la leishmaniose est très différente d'une infection naturelle pour les raisons suivantes [49] :

- le nombre de parasites nécessaires à la réussite d'une infection expérimentale est extrêmement élevé et est probablement plusieurs ordres de grandeurs au-dessus du nombre de promastigotes déposés par le phlébotome lors d'une infection naturelle ;

- lors d'une infection naturelle, les parasites sont inoculés avec la salive du phlébotome, dont le rôle a été démontré dans l'infection ;

- infecter des chiens par la piqûre de phlébotomes infectés expérimentalement est techniquement difficile. Killick-Kendrick et al. (d'après Pinelli et al. [49]) ont effectué la préparation de doses infectantes de *Leishmania infantum* à partir de phlébotomes infectés expérimentalement (autorisés à se nourrir sur un chien infecté cliniquement). Ces doses contenaient un extrait de glandes salivaires de phlébotomes qui améliore l'infectivité du parasite. L'infection des chiens s'est faite par inoculation intradermique de $5-8 \times 10^3$

promastigotes métacycliques prélevés sur les phlébotomes. Cette technique, plus proche de la réalité de l'infection naturelle, demande des niveaux d'expertise rarement disponibles.

- Différences entre les réponses immunitaires des chiens résistants et des chiens sensibles

Chez le chien, l'état de « résistance », c'est-à-dire l'absence de symptômes chez un chien infecté, est caractérisé par une forte immunité cellulaire protectrice, tandis que celui de « sensibilité », caractérisé par le développement de la maladie, correspond à une forte réponse humorale (fort taux d'anticorps) [50]. La présence d'une forte immunité cellulaire est recherchée par le test cutané à la leishmanine, aussi connu comme la réaction de Monténégro, méthode de choix pour mettre en évidence les réponses spécifiques d'hypersensibilité retardée (ou hypersensibilité de type IV) chez le chien. Le test cutané à la leishmanine est utilisé pour mettre en évidence l'immunité cellulaire spécifique dirigée contre des parasites du genre *Leishmania* chez les chiens asymptomatiques vivant en région endémique ; en effet, l'hypersensibilité de type IV ou retardée ne se produit que chez des individus déjà sensibilisés ; lors du contact avec l'antigène injecté dans le derme, les CPA (macrophages et cellules de Langerhans) captent cet antigène et le présentent aux LT mémoire circulant dans l'organisme. La reconnaissance de l'antigène par les LT CD4 mémoire provoque la synthèse de cytokines (en particulier IFN- γ). Il en résulte un recrutement de macrophages activés à l'endroit de l'inoculation en 48 à 72 heures, ayant pour rôle de phagocyter les antigènes responsables de l'activation, et un recrutement de LT mémoire. C'est cet afflux important de cellules qui se traduit macroscopiquement par une papule inflammatoire au site d'injection de la leishmanine [51].

La leishmanine est une suspension tuée de promastigotes entiers (0,5-1.107/mL) ou détruits (250 μ g de protéines/mL) dans une solution saline sans pyrogène contenant du phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème, caractéristique de fortes réactions cellulaires.

Ce test est utilisé pour le diagnostic des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses humaines mais n'a pas de valeur pour le diagnostic de la leishmaniose canine (Cardoso et al., 1998). La présence d'une forte réponse humorale est mise en évidence par la détection d'anticorps spécifiques anti-leishmanies dans le sérum [52].

Chapitre III :

Traitement et
prophylaxie

10- Traitement de la leishmaniose canine

a) **protocole classique** : association allopurinol – antimoniate de méglumine. Il repose sur l'association de l'antimoniate de méglumine (Glucantime) et de l'allopurinol (Zyloric) pendant 3 à 4 semaines [53] aux doses répertoriées dans le tableau . l'administration du Zyloric peut être commencé dès le premier jour ; lors de la confirmation diagnostic, même si l'état de l'animal nécessite une thérapeutique de réanimation rénale qui interdit l'administration de Glucantime.[54]

Au-delà de semaine afin de limiter les structures qui assombrissent le pronostic, le Zyloric administré seul, comme traitement d'entretien, à la dose de 20mg/kg/jour en 2 prise quotidiennes.[55].

L'allopurinol est le plus ancien antileishmanien oral en médecine vétérinaire. Il s'agit d'une hypoxanthine métabolique par *L. infantum* en analogue actif de l'inosine, incorporé dans l'ARN du parasite, provoque des fautes de traduction et l'arrêt de la synthèse protéique, d'où ses propriétés leishmaniostatique.[56]

L'antimoniate de méglumine inhibe les enzymes leishmaniennes impliquées dans la glycolyse et l'oxydation des acides gras et a une action leishmanicide.

Tableau 3 : Traitement de la leishmaniose canine : association **Glucantime et Zyloric** [54]

Molécules	Nom déposé	Posologie
Antimoniate de méglumine	Glucantime (AMM chien)	100 mg/kg/jjour,tous les jours pendant 21 ou 28 jours,voie sous cutanée (une injection par jour)
Allopurinol	Zyloric	30 mg/kg/jour tous les jours,voie orale,(deux prises par jour)

Cette bithérapie a montré un meilleur taux de rémission clinique par rapport à une monothérapie avec une seule des deux molécules (DENEROLLES ,1996),(DENEROLLE et BOURDOISEAU ,1999).

Toutefois, la limite de cette bithérapie est liée à la toxicité de l'antimoniote de méglumine. En effet cette molécule a une élimination rénale lente et sa toxicité se traduit par des troubles rénaux, hépatocellulaire, et des anomalies pancréatique pour citer les plus courante.

b) Allopurinol seul La monothérapie à l'Allopurinol (Zyloric®) est intéressante, surtout lorsque les possibilités thérapeutiques sont réduites, comme c'est le cas lors d'insuffisance rénale. En effet, elle permet une bonne rémission clinique, son efficacité et les moyennes de survie sont similaires à la méglumine seule [56].

Ses avantages résident en la facilité d'administration per os, et son coût peu élevé. Par contre, comme pour le Glucantime® et de nombreux agents, l'Allopurinol seul ne permet pas une élimination complète et durable du parasite [56].

Il est intéressant de préciser les effets de l'Allopurinol administré seul, sur la progression des lésions rénales, et sur la protéinurie. Une étude menée par PLEVRAKI et al. en 2006 sur 40 chiens leishmaniens, montre qu'une administration d'Allopurinol pendant 6 mois à raison de 10 mg/kg/ matin et soir prévient la protéinurie chez les chiens non protéinuriques, et limite, voire fait disparaître la protéinurie chez les autres. Cependant, il n'y a pas d'amélioration des lésions de glomérulonéphrites.

Un essai de traitement de la leishmaniose canine a été réalisé en Algérie chez 4 chiens leishmaniens, avec un suivi de six mois. Une seule rechute a été observée, les trois autres chiens ont répondu favorablement, avec une guérison clinique et parasitologique.[57]

c) Les quinolones : exemple de la marbofloxacin

La Marbofloxacin (Marbocyl®) est une quinolone de troisième génération. Ses propriétés immunomodulatrices, son pouvoir leishmanicide in vitro et la ressemblance de la structure génomique de *Leishmania infantum* avec celle des bactéries ont récemment conduit à l'utiliser comme nouvelle molécule dans le traitement de la leishmaniose canine. En 2008, ROUGIER et al., ont conduit une étude sur 24 chiens leishmaniens grecs pendant 9 mois pour évaluer l'efficacité clinique et le pouvoir leishmanicide in vivo et déterminer le meilleur protocole de traitement. L'efficacité définie par la rémission et la non-visualisation des parasites à la ponction de ganglion, est obtenue dans 67% des cas. Le meilleur protocole correspond à 28 jours de traitement avec 83% d'efficacité et une rémission clinique plus rapide ; cette amélioration clinique n'est visible qu'après le 20^{ème} jour de traitement, notamment pour les lésions cutanées. L'adénomégalie, l'onchogryphose et la splénomégalie sont les symptômes les plus longs à disparaître. Cependant, le traitement à la Marbofloxacin aurait peu d'effet sur les lésions oculaires. Compte tenu de l'innocuité rénale de cette molécule, son emploi semble judicieux chez les insuffisants rénaux atteints de leishmaniose.[58]

d) La dompéridone

La dompéridone (Motilium®) est un prokinétique gastrique et un anti-émétique, antagoniste de la dopamine. Dans une étude récente [59], 98 chiens ont été traités uniquement avec la dompéridone à la dose de 1 mg/kg deux fois par jour par voie orale, pendant un mois. Une

réduction des signes cliniques (dans 80% des cas) et du titre d'anticorps (dans 39% des cas) ont été notés. Cette molécule est d'un coût abordable et peut être utilisée chez les insuffisants rénaux. La dompéridone est une molécule qui provoque une hyper prolactinémie. La prolactine a un rôle central dans la réaction immunitaire, mais son mécanisme d'action est encore très peu connu. Cette hormone, dont la fonction principale est destimulerait la voie Th1 et l'action des macrophages et inhiberait la voie Th2 [59].

e) La miltéfosine

La miltéfosine (Impavido®) perturbe le métabolisme lipidique au niveau de la membrane des parasites. Elle inhibe ainsi la pénétration des leishmanies dans les macrophages. Chez le chien, les effets secondaires surviennent dans 25% des cas et se manifestent en général au niveau du tractus digestif par des vomissements et de la diarrhée. Les effets sont brefs, tolérables et réversibles à l'arrêt du traitement ou à la réduction de la dose. WOERLY et al (2009) ont étudié l'efficacité de la miltéfosine administrée à raison de 2 mg/kg/jour, une fois par jour, pendant 28 jours. Le pourcentage de réduction du score clinique fut de 61.2%. La miltéfosine semble donc efficace et est facile d'emploi (voie per os). Mais ce médicament est réservé pour le moment au traitement de la leishmaniose viscérale humaine. [60]

f) Autres molécules

D'autres molécules sont ou ont été utilisées mais présentent des inconvénients majeurs : - L'amphotéricine B, très efficace, est un polyène qui interagit avec le stérol de la membrane des 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 cette molécule.

- L'inconvénient de cette substance est sa toxicité rénale importante. 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 un chien dont les reins sont déjà endommagés. De plus cette substance nécessite une administration intraveineuse stricte et une préparation laborieuse. Son utilisation par les est par conséquent assez limitée.

- - Il existe une forme liposomale de l'amphotéricine B (Ambisome®) dont l'efficacité a été prouvée chez l'homme avec moins d'effets indésirables, mais son coût est beaucoup plus élevé. Son utilisation chez le chien permet une guérison clinique rapide mais généralement suivie de rechutes. Par ailleurs, afin d'éviter le développement de résistance à ce traitement, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) n'encourage pas son utilisation chez le chien atteint de leishmaniose. Dans une étude récente AIT OUDHIA et al ont mis en évidence des souches de *L. infantum* isolées de chiens en Algérie, résistantes à l'Amphotéricine B. - Combinaison spiramycine et métronidazole : Une étude comparative entre l'association

Glucantime®-Zyloric® et spiramycine – métronidazole faite par PENNISI et al. en 2005, montrèrent qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux protocoles suggérant que la combinaison spiramycine-métronidazole pouvait être proposée comme alternative pour le traitement de la leishmaniose canine. [61]

- La paramomycine, efficace mais néphrotoxique, doit être réservée à un usage hospitalier. [62]

10-1 – Traitement symptomatique

a) Thérapeutique de soutien rénal

Après avoir évalué l'insuffisance rénale à l'aide de la mesure de l'urémie et de la créatinémie, on peut utiliser des corticoïdes qui, secondairement, limiteront la formation de complexes immuns, en diminuant la synthèse d'immunoglobulines. La prednisone à la dose de 1 mg/kg/jour est préconisée pendant au moins 4-5 jours, puis le traitement est poursuivi, à doses moins élevées [54]. Un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peut aussi être utilisé.

b) Traitement oculaire

Il est important en cas de symptômes oculaires, car l'uvéite et la kératite génèrent de la douleur, répondent mal au traitement classique et peuvent aller jusqu'à la cécité. On utilise des pommades et des topiques ophtalmiques anti-inflammatoires, des injections sous-conjonctivales de corticoïdes retards [54]

10-2 – Suivi de l'animal

L'animal traité doit être suivi régulièrement par :

- Un examen clinique rigoureux afin de détecter aussi précocement que possible toute rechute. L'animal reste source de parasites même après le traitement, il est donc primordial d'en informer le propriétaire. L'administration continue d'allopurinol diminue significativement les risques de rechute. [63]

- Un examen biologique complet (numération formule sanguine, électrophorèse des protéines, urémie, créatinémie, densité urinaire) pour suivre l'évolution de l'anémie et de l'insuffisance rénale.

- Un examen sérologique (IFI), l'augmentation significative du titre d'anticorps étant préalable ou synchrone d'une rechute. C'est bien l'augmentation d'anticorps étant préalable ou synchrone d'une rechute. C'est bien l'augmentation du titre qui est significative et non le maintien du titre à un niveau élevé, la séronégativité n'étant pas une finalité. [68]

. Prévention

Dans l'attente de traitement efficace et sans danger, la prophylaxie de la leishmaniose canine, soit par la vaccination, soit par la lutte contre les piqûres de phlébotomes, reste une mesure très importante à considérer dans la lutte contre la leishmaniose canine.

10-3. Prophylaxie sanitaire

En l'absence de vaccin commercialisé à ce jour en Algérie, seul le recours aux insecticides peut prévenir les piqûres infectantes de phlébotomes. Ils appartiennent à la famille des pyréthrynoïdes. Le produit principalement utilisé en Algérie est la deltaméthrine. Ce produit peut être présenté sous forme de collier (Scalibor®) dont l'action préventive contre les phlébotomes est de 5 mois [64]. Une étude menée en France, dans la vallée de l'Ariège confirme l'efficacité de ces colliers puisque une nette diminution de la prévalence de la maladie (11.67% à 2.72%) a été notée entre 1994 et 2007 suite à une utilisation massive de ce traitement préventif.[65]

10-4. Prophylaxie médicale

Il existe actuellement deux vaccins, le premier, Canileish®, empêche la survenue de signes cliniques chez l'animal mais celui-ci reste réservoir, et la transmission est toujours possible. Le second, Leishmune®, en plus de l'action du premier, est un vaccin qualifié d'altruiste car il empêche la présence de leishmanies dans le derme de l'animal, et donc la transmission de la maladie[66]. Grâce à ce vaccin, il semble possible d'enrayer la progression de la leishmaniose, voire de mener à son éradication. Ce vaccin est disponible en Europe, où les vétérinaires ont déjà commencé à l'administrer. Bien que le traitement anti-leishmanien avec les molécules courantes confère une amélioration clinique chez les chiens atteints de leishmaniose, il n'empêche pas la survenue de rechutes de la maladie et n'a pas pour conséquence une stérilisation parasitaire, d'où l'intérêt d'un suivi des animaux malades.

Partie expérimentale

1 Introduction

La lutte contre la leishmaniose canine dépend en grande partie du succès du traitement. Actuellement, les médicaments utilisés pour le traitement de la leishmaniose viscérale tels que l'antimoine de méglumine, l'aminosidine, l'allopurinol et l'amphotéricine, permettent d'obtenir une amélioration clinique, bien que rarement, la thérapie soit associée à l'élimination des parasites ou à la prévention de rechutes cliniques de la maladie. De plus, leur toxicité et l'émergence de résistances limitent souvent leur efficacité. De fait, plusieurs études sont en cours pour découvrir de nouveaux médicaments anti-leishmaniens [67]. Sachant que l'association doxycycline/hydroxychloroquine est active sur des agents infectieux bactériens intracellulaires (comme *Coxiella burnetii*), il est important de connaître l'activité de cette thérapie dans le cas de la leishmaniose due à un parasite dont le cycle comprend une phase intracellulaire (macrophages) [68]. Notre étude originale a pour but d'évaluer l'efficacité de cette association doxycycline (DOX)/hydroxychloroquine (HCQ) dans le traitement de la leishmaniose cutané-viscérale du chien. Elle constitue la partie consacrée au chien leishmanien d'une recherche plus large comprenant des études réalisées in vitro et sur la souris de laboratoire infectée ainsi que, en fonction des résultats, lors d'essais cliniques chez l'homme.

Matériel et méthodes

2. Protocole de l'étude

Notre étude a été réalisée de janvier à mai 2014. Elle s'est déroulée en deux phases : la première consiste à trouver des chiens cliniquement malades, à les traiter et à suivre leur évolution clinique, ensuite, une deuxième phase a été consacrée à l'analyse des échantillons collectés.

2.1. Recrutement des chiens malades

Durant cette phase, un déplacement sur le terrain, en Kabylie (Tizi-Ouzou) était nécessaire du janvier au début d'avril 2014. Sur les lieux, nous avons cherché des chiens qui présentent des signes cliniques de leishmaniose (alopécie, ulcérations

cutanées, amaigrissement, hypertrophie des nœuds lymphatiques, onychogryphose). Sur place, le diagnostic est confirmé par un test sérologique rapide spécifique (Witness® Leishmania).

2.2 Traitement

Après l'obtention de l'accord du propriétaire, le protocole thérapeutique a été mis en œuvre. Durant quatre mois, les chiens ont reçu tous les jours, par voie orale (au moment du repas), les deux médicaments suivants :

- hyclate de doxycycline (Doxycycline arrow®) à la dose de 10 mg/kg
- hydroxychloroquine (Plaquemil®) à la dose de 10 mg/kg.

Les chiens ainsi traités bénéficiaient éventuellement de soins cutanés mais ne recevaient pas d'autre traitement de la leishmaniose par la voie générale.

2.3 Suivi vétérinaire

Dès le début de l'étude, un fichier numérique a été créé de manière à recueillir toutes les informations nécessaires au suivi du chien : race, sexe, poids, lieu de vie (géo-localisation), environnement, nom du propriétaire, adresse, historique de la maladie, description clinique (température corporelle, appétit), localisation et taille des lésions, traitements préalables, Des photos numériques ont accompagné ce recueil de façon à créer un dossier individuel. Un score cutané (SC) a été établi selon une échelle de 1 à 5, en fonction de l'importance des lésions (alopécies, squamosis, ulcérations, nodules, épistaxis, onychogryphose) : 1 (absence de lésion), 2 (lésions réduites), 3 (lésions moyennes), 4 (lésions importantes) et 5 (lésions très importantes). De même un score général (SG) prenant en compte les symptômes non cutanés de la leishmaniose (amaigrissement, atteinte de l'état général, hypertrophie des nœuds lymphatiques, splénomégalie, lésions oculaires) a été établi de 1 à 5, selon la même échelle : absence, réduit, moyen, important, très important.

A J0, avant le traitement, chaque chien a fait l'objet de plusieurs prélèvements :

- une prise de sang (tube EDTA et tube sec).
- un écouvillonnage des lésions cutanées.

- une ponction ganglionnaire, en cas d'hypertrophie des nœuds lymphatiques (ganglions poplités) puis déposé dans un cryotube.

-Le sérum a été extrait du tube sec après décantation à température ambiante puis déposé dans un cryotube.

- Le tube EDTA, les cryotubes (sérum et fluide ganglionnaire) et écouvillons ont été conservés et congelés. Chaque prélèvement a été bien identifié (N° du chien). Les scores SC et SG ont été établis et enregistrés.

A J +1 mois, J +2mois, J +3mois et J +4mois, les mêmes prélèvements ont été réalisés en plus d'un examen clinique et de la prise de photos. Des observations cliniques figurent donc dans le dossier de suivi, chaque mois.

En cas d'aggravation clinique, d'intolérance au traitement ou d'autres événements relatifs au chien, le vétérinaire traitant ou le propriétaire ont été priés de nous avertir pour que le vétérinaire ayant initié le traitement participe ainsi à la prise de décision sur la conduite à tenir.

2.4 Analyses des prélèvements

Pour le diagnostic de la leishmaniose canine, nous avons utilisé deux techniques : un test de diagnostic rapide (Witness®Leishmania), utilisé sur place au moment du prélèvement et la PCR en temps réel au laboratoire a marseille unité de recherche sur les maladies infectieuses Et tropicale émergente

2.5 Tests rapides de diagnostic

Le test Witness®Leishmania permet de confirmer rapidement au cabinet du vétérinaire une suspicion clinique ou dépister une leishmaniose inapparente en zone d'enzootie ou au retour d'un voyage [68]

➤ Principe du test

Le test Witness®Leishmania (Zoetis, Lyon) est un test de réalisation simple, fondé sur

une technique d'immunomigration rapide (Rapid Immuno Migration, RIM™). L'échantillon à tester contenant les anticorps anti-leishmania (sang total, sérum, plasma) est mis en contact avec des particules d'or colloïdal sensibilisées. Le complexe ainsi formé migre sur une membrane avant d'être capturé sur une zone réactive, au niveau de laquelle sa concentration provoque la formation d'une bande de couleur rose clairement visible. Une bande de contrôle, située à l'extrémité de la membrane, permet de s'assurer que le test a été réalisé correctement [69].

➤ Echantillons

Le test peut être réalisé sur du sang total, du sérum ou du **plasma**. Pour le sang total, l'échantillon est prélevé sur anticoagulant (citrate ou héparine). Les échantillons doivent toujours être prélevés avec une seringue et une aiguille stériles. Ils doivent être testés immédiatement au plus tard dans les 4 heures s'ils sont conservés à température ambiante. Si l'analyse est repoussée (jusqu'à 2 jours), l'échantillon devra être conservé réfrigéré entre +2°C et +8°C. Pour une conservation prolongée, il est conseillé de congeler l'échantillon (plasma ou sérum seulement) à -20°C.

➤ Réalisation du test et résultats (Figure 14)

Nous laissons tomber les gouttes d'échantillon et de solution tampon sur la membrane dans le puits échantillon, fenêtre (1). On observe au bout de 10 minutes, la présence ou non de bandes de couleur rose dans les fenêtres (2) et (3). Le test est validé si une bande est présente dans la fenêtre de lecture au niveau du repère correspondant (3). La présence d'une bande de couleur rose au niveau du repère 2 et l'apparition d'une bande au niveau du repère 3 signifie que le test est positif, donc la présence d'anticorps anti-Leishmania.

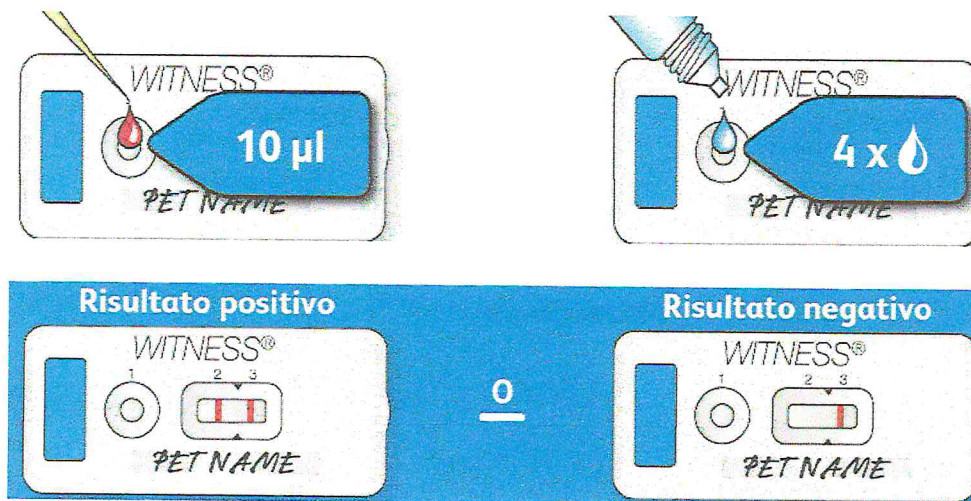


Figure 14 : Mode opératoire technique du test Witness® Leishmania (Zoetis, 2010)

2.6 Technique de biologie moléculaire :

En plus de la microscopie classique, de la culture et des méthodes sérologiques, de nombreux tests moléculaires basés sur la détection de l'ADN ont été décrits, en particulier l'utilisation de la technologie PCR. La sensibilité de ces méthodes semble être variable, en fonction du choix de la séquence cible et de l'objectif de l'étude. Les techniques de PCR standard améliorent la sensibilité du diagnostic, en particulier à partir d'échantillons de sang, mais sont incapables de quantifier la charge parasitaire. En revanche, la PCR en temps réel a été conçue pour une quantification précise de la séquence cible. Cette technique peut être utile à des fins épidémiologiques et diagnostiques, en particulier pour la quantification de la parasitémie à un faible niveau durant le suivi post-thérapeutique.

❖ Principe de la technique

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (Ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière

catégorie, il existe actuellement quatre technologies principales : l'hydrolyse de sondes (Taqman Assay), l'hybridation de deux sondes (HybProbes), les balises moléculaires (Molecular Beacons) et les amorces scorpion (Scorpion primers)[71].

❖ Protocole :

Pour l'extraction de l'ADN, nous avons utilisé l'automate EZ1 BioRobot (Qiagen, Allemagne). La technique des particules magnétiques donne à l'ADN une haute qualité. Elle est utile pour une utilisation directe de l'amplification ou pour d'autres applications enzymatiques. L'extraction dure 15 minutes. Pour le sang, nous avons directement procédé à l'extraction d'ADN à partir de 200µl du sang total. Pour l'extraction à partir des écouvillons, le suc ganglionnaire et les organes, on a incubé ces derniers dans 200µl de tampon G2. Pour notre travail, nous avons appliqué un protocole PCR précédemment décrit (Mary C, 2004). Ce protocole est optimisé pour atteindre une sensibilité de 0,0125 parasites/ml de sang en ajoutant 16µl du mélange réactionnel par tube à 1 µl d'ADN extrait.

3. Déroulement de l'enquête :

3.1. Echantillonnage : L'enquête a été réalisée de mars jusqu'au début avril 2014. Cent chiens au total ont été dépistés dans la wilaya de Tizi Ouzou. Les prélèvements sanguins, effectués à la veine radiale superficielle, ont été récoltés dans deux tubes différents, un avec un anticoagulant (EDTA) pour la PCR et un tube sec pour les analyses sérologiques.

Des écouvillonnages ont été aussi faits lorsque les chiens présentaient des lésions susceptibles d'être dues à la leishmaniose. A la fin, tous les prélèvements ont été congelés et transportés au laboratoire à Marseille (URMITE).

Commune	Nombre des chiens
Makouda	13

Boudjima	1
Tigzirt	11
Iflissn	3
Timizart	21
Freha	3
Aghribs	4
Azazga	43

Tableau 4 : Répartition des 90 chiens dépistés dans la wilayas de Tizi-Ouzou

3.2 Evolution des symptômes cliniques

L'évolution des symptômes clinique de chaque chien a été évaluée par un score cutané (SC) sur une échelle de 1 à 5, en fonction de l'importance des lésions et un score général (SG) prenant en compte les symptômes non cutanés de la leishmaniose de 1 à 5, selon la même échelle : absence, réduit, moyen, important, très important.

Ces données sont présentées dans un tableau (Tab. 14) qui résume l'état des chiens depuis le début du traitement jusqu'à la fin. **Nous** devons prendre en considération que la majorité des chiens n'ont pas dépassé deux mois de mise sous traitement. D'autre part, l'évolution clinique est objectivée grâce aux photos prises tous les mois (Fig. 18 à Fig. 39).

Résultats

Première partie :

Essai thérapeutique : Durant la période de recherche de chiens malades, nous avons pu mettre neuf chiens sous traitement quatre chiens ont été traités à partir de janvier, deux à partir de février et le dernier à partir du mois de mars (Tab. 4). Quatre chiens sont morts durant cette période dans des circonstances qui seront décrites ultérieurement. nous avons rencontré des obstacles pour recruter d'autres chiens pour le traitement, d'une part à cause de la diminution de cette maladie ces dernières années, et des difficultés que trouvent les vétérinaires dans le diagnostic de cette pathologie. D'autre part, la majorité des propriétaires de chiens malades refusent l'option de l'essai thérapeutique, ils optent directement pour l'euthanasie du fait du risque zoonotique et des désagréments du traitement.

CNA N°	Date de début du traitement	Commune	Propriétaire	Race	Sexe	Age	Catégorie
1	07/01	Azazga	A.Chouai	BA	Femelle	2	Garde
2	07/01	Aghribs	A.Selloum	Doberman	Mâle	2	Chasse
3	10/01	Boudjima	MChetouan	BA	Mâle	8	Garde
4	20/01	T_Rachd	A. Kalem	Rottweiler	Femelle	2	Garde
5	07/02	Azazga	H. Seghir	Berger Allemand	Mâle	5	Garde
6	07/02	Aghribs	A. Seghir	Espagnol	Mâle	3	Chasse
7	13/03	Aghribs	A. Amenouche	Griffon	Mâle	3	Chasse

8	19/03	Azazga	A .Dahoun	Griffon	Femelle	8	Garde
9	07/01	Aghribs	A.selami	Commune	male	7	Chasse

Tableau 5 : Liste des chiens mis sous traitement.

1. Caractéristiques cliniques des chiens mis sous traitement

Dans notre étude, les principaux signes cliniques décrits dans la bibliographie ont été observés :

- Les symptômes dominants sont les lésions cutanées. Plusieurs aspects ont été mis en évidence allant de la simple desquamation jusqu'aux ulcères chroniques surinfectés. L'alopecie est souvent rencontrée. Elle est surtout visible sur les extrémités et autour des yeux.
- L'amaigrissement est apparent au niveau de la face et de l'arrière train.
- L'hypertrophie des nœuds lymphatiques est présente chez presque tous les chiens de notre étude.
- Les signes hémorragiques, représentés essentiellement par l'épistaxis ont été rencontrés chez un seul chien, mais la majorité des propriétaires ont déclaré que leurs chiens ont déjà manifesté un saignement de nez.
- L'onchogryphose, qui est considéré par les vétérinaires comme un indice de suspicion de la leishmaniose canine, a été clairement apparente chez trois chiens.

CNA N°	Symptômes généraux et viscéraux	Lésions cutanées	Lésions muqueuses
1	-Amaigrissement -Adénite	-Dépilations -Dermite furfuracée -Epaississement de la peau	-
2	-Amaigrissement -Adénite	-Dépilations -Epaississement de la peau - Onychogryphose	-
3	-Amaigrissement -Adénite	-Dermite furfuracée	-Lésions conjonctivales
4	-Signe de vieillesse -Adénite	-Epaississement de la peau -Dépilations -Ulcérations	-
5	-Adénite	Dépilations périorbitaires	-
6	-Adénite	Dépilations Ulcérations	-
7	-Amaigrissement -Adénite	-Dépilations -Dermite furfuracée - Epaississement de la peau, -Ulcérations -Lésion en forme des croûtes	-

8	Adénite	Dépilations périorbitaire	-
9	-Cachexie -Adénite	-Dépilations -Epaississement de la Peau -Onychogryphose	-Epistaxis

Tableau 6 : Description symptomatologique de chaque chien, à l'état initia



Figure 15: CNA 1 à M0 Figure 16 : CNA 2 à M 0 Figure 17 : CNA 03 à M 0



Figure 18 : CNA 4 à M 0
à M 0

Figure 19 : CNA 5 à M 0

Figure 20 : CNA 6



Figure 21 : CNA 7 à M 0

Figure 22 : CNA 8 à M 0

Figure 23 : CNA 9 à M 0

0

2. Evolution des symptômes cliniques :

L'évolution des symptômes de chaque chien a été évaluée par deux scores :

- Un score cutané (SC) sur une échelle de 1 à 5, en fonction de l'importance des lésions.
- un score général (SG) prenant en compte les symptômes non cutanés de la leishmaniose de 1 à 5, selon la même échelle : absence, réduit, moyen, important, très important.

Le tableau (Tab. 6) résume l'état des chiens depuis le début du traitement jusqu'à sa fin. L'évolution clinique est objectivée grâce aux photos prises tous les mois (Fig. 18 à Fig. 39).

CNA N°	M 0			M + 1			M + 2			M + 3		
	Poids (kg)	SC	SG	Poids	SG	SG	Poids	SC	SG	Poids	SC	SG
01	12	3	3	Mort								
02	12	3	3	15	2	2	Mort					
03	12	3	2	14	2	2	15	2	2	Mort		
04	15	3	3	15	3	3	16	2	2	16	2	2

05	18	3	3	16	3	3	16	3	3	-	-	-
06	16	3	3	17	2	2	17	2	2	-	-	-
07	13	5	3	14	5	3	13	4	2	-	-	-
08	13	2	2	15	0	0	-	-	-	-	-	-
09	11	4	4	Mort								

Tableau 7 : Evolution des scores relatifs à l'état clinique des chiens sous traitement.



Figure n°24 : CNA 1



Figure n°25 : CNA 1 à M+1

CNA 1, on a constaté une légère amélioration de l'état générale un mois après le début du traitement (Fig. 19 et 20). Ce chien est mort dans des circonstances non connues. Son propriétaire n'a rien remarqué d'anormal avant la mort, on peut suspecter une insuffisance hépatorenale avancée, comme une cause de la mortalité.



Figure n°26 : CNA



Figure n°27 : CNA 2 à M+ 1

CNA 2, on a noté une reprise de poids et la disparition du durcissement de la peau (Fig. 9, 21 et 22). Le larmoiement a presque disparu après le premier mois. Ce chien a

malheureusement été euthanasié par son propriétaire, au cours du deuxième mois de traitement, après avoir été mordu par un chien enragé.



Figure n°28 : CNA 3

Figure n°29 : CNA à M + 1

Pour le CNA N° 3 : pendant les premiers jours de traitement, ce chien a présenté des améliorations de l'état général : reprise de l'appétit, légère guérison des articulations, disparition des épitaxie, mais à la fin, il a rechuté et nous le faisons euthanasier a cause de la dégradation de son état.



Figure n°30 : CNA 4

Figure n°31 : CNA 4 à M+ 2

CNA 4 nous n'avons noté aucune amélioration durant les deux mois de traitement. Il présente toujours les lésions initiales croûteuses et les ulcères. Ce chien a été euthanasier a cause d'une contamination rabique (Fig. 13, 32 et 33).



Figure n°32 : CNA 5

Figure n°33 : CNA 5 à M+ 1

CNA 5, après un mois de traitement, nous avons noté une reprise d'un peu de force mais aucune autre amélioration (Fig. 36 et 37).



Figure n°34 : CNA 6

Figure n°35 : CNA 6 à M+ 2

CNA 6, nous n' avons noté aucun changement durant les deux mois de traitement, ce chien présente toujours les symptômes observés à l'état initial (Fig. 11, 28 et 29). Le propriétaire nous a informé que le chien ne prend pas le traitement régulièrement vu ses difficultés de transit.



Figure n°36 : CNA 7

Figure n° 37: CNA 7 0 M+1

CNA 7 nous avons constaté une légère atténuation des lésions, surtout pour celles des oreilles (Fig. 12 et 30)



Figure n°38 : CNA 8



Figure n° 39: CNA 8 à M + 1

CNA 08, ou bout d'un mois de traitement nous avons noté une guérison des lunettes (dépilations périorbitaires) et l'arrêt du larmoiement purulent. (Fig. 38 et 39)

3. Résultats des analyses de laboratoire :

Tous les chiens sont positifs à la sérologie réalisée avec le test rapide Witness® Leishmania (Fig. 40)

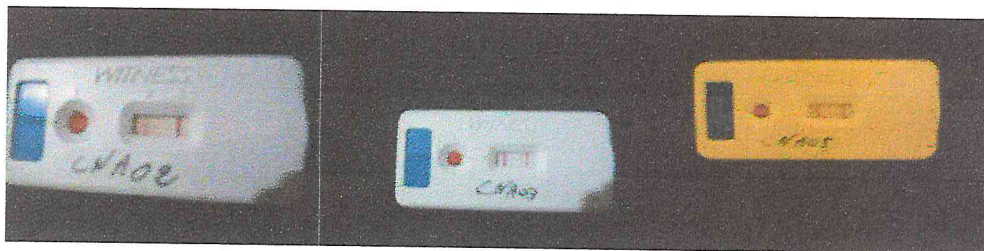


Figure 40 : Exemples d'un teste positifs.

La PCR quantitatives en temps réel nous a permis d'évaluer la parasitémie et de détecter l'ADN leishmanien dans les lésions cutanées (Tab. 7, Annexes 4 et 5).

C N A N	M 0		M+ 1		M+ 2		M+3	
	Nombre de leishmanies /ml de sang	Ecou vil- lons	Nombre de leishmani es/ml de sang	Ecou villon s	Nombre de leishmani es/ml de sang	Ecou villon s	Nombre de leishmani es/ml de sang	Ecou villon s
1	21 050 000	PO S	Mort					
2	10 650	pos	1 935	pos	Mort			
3	10 650	pos	169 000	pos	83 500	pos		
4	228 500	pos	64 150 000	pos	2 913 500	Pos		
5	29 950 000	Pos	419 000	pos				
6	11 300 000	pos	2 395	pos	1 675	Pos		
7	1 175 000	pos	167 500	pos	626 000	Pos		
8	65	pos	NEG	NEG				
9	2 730 000	pos						

Tableau 8 : Evaluation des résultats par la PCR.

Uniquement le CNA 08 qui a donné un résultat négatif à la PCR après un mois de traitement, tous les autres restent toujours porteurs d'ADN parasite pendant toute la durée du traitement. Avant traitement (M 0), La moyenne de parasitémie est de 6 041 371 de leishmanies/ml., à M +1, elle est de 9 272 833 parasites/ml et à M +2 elle est de 724 935 leishmanies/ml. L'analyse statistique de ces résultats (test de Kruskal Wallis sur logiciel SPSS20) montre qu'il n'y a pas de différence significative dans le niveau de la parasitémie au long du suivi.

4. Evaluation du traitement

D'après les résultats cliniques, ceux de laboratoire et leur analyse statistique, nous avons déduit que le traitement n'a pas donné de résultats satisfaisants. A part le chien 08 qui est guéri cliniquement et biologiquement, les autres chiens même s'ils présentent parfois des améliorations cliniques, restent toujours porteurs du parasite avec des fluctuations non probantes de la parasitémie au cours du traitement.

Deuxième partie :

Enquête de prévalence

1. Résultats des tests diagnostics (Annexe 5)

Sur les quatre vingt dix chiens dépistés, 17 sont positifs à la PCR et 14 positifs à la sérologie dont 4 positifs pour les deux tests. Les résultats sont reportés sur le tableau suivant (Tab. 9).

CNA N°	Race	Catégorie	Sexe	Age (an)	Sérologie	PCR Nombre de leishmanies/ml du sang
3	commune	Garde	Mâle	1	NEG	1 010
5	Berger Allemand (BA)	Garde	Mâle	2	NEG	675
6	Locale	Garde	Mâle	1	NEG	415
10	Locale	Garde	Mâle	1	NEG	415
16	BA	Garde	Femelle	0,6	POS	NEG
21*	Locale	Berger	Mâle	2	POS	NEG
27	Sloughi	Garde	Mâle	3	NEG	535
29	Staff	Garde	Mâle	1,3	NEG	389
46	Braque	Chasse	Femelle	4	POS	1 120 000
49	Locale	Chasse	Mâle	0,6	POS	NEG
51	Locale	Garde	Mâle	0,6	NEG	1 600
52	BA	Garde	Mâle	4	NEG	1 615
56*	BA	Garde	Mâle	3	POS	NEG
57	Epagneul	Chasse	Femelle	0,6	POS	1 150
60	Locale	Garde	Femelle	0,6	NEG	570
68	Griffon	Chasse	Mâle	3	NEG	1 025
74	BA	Garde	Femelle	2,5	POS	NEG
75*	BA	Garde	Mâle	4	POS	NEG
78	Pit-bull	Garde	Mâle	2	POS	NEG
79*	Braque	Chasse	Mâle	4	POS	1 345
82	Braque	Chasse	Mâle	4	POS	NEG
86	Epagneul	Chasse	Mâle	7	NEG	442
88	BA	Garde	Mâle	7	NEG	1 320
90	Griffon	Chasse	Mâle	1,5	NEG	1 435
93	BA	Garde	Femelle	3	POS	NEG
98*	Locale	Garde	Femelle	1	POS	4 895

Tableau 9 : Résultats positifs obtenus par la sérologie et la PCR [* chiens symptomatiques]

2. Influence de l'âge

La moyenne d'âge des chiens prélevés est de 3 ans. La tranche d'âge des chiens de notre étude est comprise entre 6 mois et 10 ans. Le chien positif le plus jeune a 8 mois. En faisant le tri des chiens par classe d'âge en trois catégories : jeunes (0 à 2 ans), adultes (plus de 2 ans et moins de 5 ans) et chiens âgés (plus de 5 ans), on remarque que les chiens jeunes et les adultes sont plus touchés que les chiens âgés, cela paraît évident puisque les chiens âgés sont pas très représentés dans notre étude (Tab. 9). Cette influence est non significative d'après l'analyse statistique (test de Kurskal-Wallis)

Tranche d'âge	Tranche d'âge	Effectif	Nombre % de positifs
0-2ans	52	12	12%
2-5 ans	38	12	12%
> 5 ans	10	3	3%
Total	100	27	27%

Tableau 10 : Répartition des chiens positifs (PCR et/ou sérologie) en fonction de l'âge

3. Influence du sexe

Les résultats montrent que les deux sexes sont touchés d'une façon très inégale avec une prédominance des mâles 74 %.

Cela est du à la préférence des propriétaires.

4. Influence du mode de vie

Dans notre étude, les chiens ont été classés en deux catégories : les chiens de chasse (25 sujets) et les chiens de garde (65 sujets). Une fréquence élevée de l'atteinte est observée chez la catégorie des chiens de garde (74%). Dans cette catégorie, la race la plus vulnérable est le Berger Allemand. D'après le test Khi-deux de Pearson, la distribution des positifs est identique pour toutes les catégories.

5. Symptômes observés

La majorité des chiens positifs à la PCR et/ou à la sérologie (78%) sont asymptomatique.

Les autres les principaux signes cliniques observés sont : l'amaigrissement, l'hypertrophie des nœuds lymphatiques, l'alopecie, la pyodermite. (Fig. 41 et Fig. 42).



Figure 41 : Amaigrissement et alopecie du CNA 98 Figure 42 : Pododermatite du CNA 79

Discussion

1. A propos des moyens de diagnostic

La méthode de référence « gold standard » pour le dépistage de la leishmaniose canine est encore l'immunofluorescence indirecte (IFI). Cependant, elle nécessite des laboratoires spécialisés et un coût très élevé. Par ailleurs, les variations du titre des anticorps sériques représentent une bonne indication pour le clinicien qui peut ainsi suspecter le passage d'un état asymptomatique à un début de maladie. Par contre, lors d'une sérologie ponctuelle (cas des enquêtes de prévalence), le titre obtenu n'est pas en relation avec l'état clinique du chien (Rodriguez-Cortes A, 2010). Ainsi, un chien sain peut avoir une IFI à 1/2 560, alors qu'un chien malade sera positif au 1/160. Cela amène à réviser le statut de l'IFI comme un étalon-or pour le diagnostic de la leishmaniose (Maia C, 2010).

En fonction de notre objectif qui était d'une part de confirmer des suspicions cliniques et d'autre part de réaliser une enquête de prévalence, nous avons choisi d'utiliser un outil de diagnostic, facile à mettre en œuvre, même chez le propriétaire de chien. C'est le cas de tous les tests rapides (kits commerciaux) basés sur l'immunochromatographie ou l'ELISA. Le test qualitatif que nous avons pu utiliser (WitNESS® Leishmania – Zoetis) possède une très grande spécificité (100%) et une moins bonne sensibilité (Rodríguez-Cortés A, 2013). Lors de l'enquête, on a ainsi observé que deux chiens présentant des signes cutanés étaient négatifs au test rapide, mais positif en PCR. Pour la mise en place du traitement, ce test a été performant car nous avons pu sélectionner avec certitude des chiens leishmaniens.

D'une manière différée, nous avons mis en œuvre une technique de PCR en temps réel quantitative, sensible et spécifique, utilisant la détection de l'ADN kinétoplastique des leishmanies (Mary C, 2004 ; Solano-Gallego L, 2011). Nous avons opté pour la PCR sur le sang pour des raisons pratiques et de standardisation de l'échantillon. Ce choix a limité la sensibilité du diagnostic qui est meilleure sur la moelle osseuse, les nœuds lymphatiques, la rate, la peau ou les écouvillons conjonctivaux. Les quantifications que nous avons obtenues dans le sang ont été un très bon marqueur de l'état clinique des chiens (symptomatiques *versus*

asymptomatiques) et de la gravité de l'atteinte. Par exemple, le chien CNA 4 présentait encore de nombreuses lésions cutanées ulcérées à M+3 et avait 402 millions de leishmanies par millilitre de sang. Par contre, le CNA 08, peu atteint à M +1 65 leishmanies/ml. Pour suivre l'effet du traitement, cette PCR a été un bon indicateur. Ainsi, pour le chien CNA N° 08, nous avons objectivé la négativation de sa parasitémie en même temps que nous avons constaté sa guérison. L'emploi de la PCR pour évaluer l'efficacité d'un traitement a déjà fait l'objet d'études, notamment dans le cas d'un traitement avec la miltéfosine et l'allopurinol (Manna L, 2008).

Dans le cadre de l'enquête de prévalence, la PCR s'est montré plus sensible que la sérologie pour 14 chiens ce qui est classique, du fait du manque de sensibilité des tests rapides. Par ailleurs, 10 chiens ont une sérologie positive et une PCR négative. Cela aussi n'est pas surprenant, car un chien ayant eu un contact avec le parasite (piqûre d'un phlébotome infecté) peut avoir une réaction immunologique avec l'apparition d'anticorps sans que les leishmanies se multiplient dans l'organisme. La parasitémie moyenne observée chez les chiens asymptomatiques est significativement plus faible que chez les malades. Ce résultat est cohérent. Cependant, il restera difficile de fixer un seuil au-delà duquel le chien est considéré comme malade. Le diagnostic doit toujours associer les signes cliniques aux résultats des analyses (sérologie et PCR).

2. A propos du traitement

Nous avons traité 09 chiens présentant des signes cliniques, plus ou moins importants. Le suivi des chiens a varié d'un à trois mois, trois chiens n'ayant pu être observés que pendant seulement deux mois. Quatre sont morts, trois d'une mort naturelle et un a été euthanasié suite à une morsure par un chien enragé. Aucune des causes de ces mortalités n'a pu être démontrée. D'une part, nous ne disposions pas des moyens nécessaires pour réaliser, dans chaque cas, des autopsies et des analyses anatomo-pathologiques, et d'autre part certains propriétaires ne nous ont avertis qu'après avoir enterré leurs chiens.

L'hypothèse de la toxicité du traitement appliqué mérite d'être discutée. Pour l'hyclate de doxycycline, le protocole que nous avons retenu (10 mg/kg/1 fois par jour/voie orale) n'est pas original. Il est appliqué, chez le chien, fréquemment dans les tableaux

cliniques d'infections, comme l'ehrlichiose, la leptospirose ou bien les pyodermites. Aucune contre-indication n'est connue (sauf pour les femelles en gestation). La toxicité hépatique ne survient qu'à des doses très élevées. En ce qui concerne l'hydroxychloroquine, la dose de 10 mg/kg/j, *per os*, n'est pas réputée toxique chez le chien. Elle est même déjà utilisée en thérapeutique du lupus discoïde érythémateux (Oberkirchner U, 2011). Chez le chien, à la dose de 100 mg/kg par injection parentérale, un effet cardiaque apparaît (tachycardie). Notre protocole n'est donc pas en cause dans la mort des quatre chiens. Nous émettons l'hypothèse que ces chiens souffraient d'une insuffisance hépato-rénale grave, d'origine leishmanienne, qui a causé leur mort (décompensation brutale avec acidose fatale). Il est évident que, si nous en avions eu les moyens, nous aurions suivi, au départ et au long du traitement, les deux paramètres biologiques importants dans l'insuffisance hépato-rénale : l'urée et la créatinine.

L'hydroxychloroquine a montré une activité dans certaines infections virales, bactériennes et fongiques (Rollain JM, 2007). Les mécanismes principaux d'action sont en lien avec l'alcalinisation des vésicules des cellules infectées et l'altération des mécanismes de synthèse des protéines. Cela a été démontré *in vitro* et *in vivo* avec le modèle de l'infection avec *Coxiella burnetii*, l'agent responsable de la fièvre Q, maladie qui comme pour la leishmaniose passe à la chronicité. Récemment, il a été montré que l'HCQ avait une activité contre les amastigotes intracellulaires dans les macrophages en culture infectés par *Leishmania amazonensis* (Rocha VP, 2013). L'action de l'HCQ est notée par une accumulation de corps multivésiculaires dans le corps du parasite, la formation de myéline et l'élargissement de l'appareil de Golgi. L'influence des antimalariens sur le développement des leishmanies a aussi été décrite pour l'artémisinine (Sen R, 2010). La doxycycline, quant à elle, est un inhibiteur de la traduction des protéines. Elle se lie à la sous-unité 30S du ribosome où se situe le centre de décodage de l'ARN messager. Son action sur les protozoaires est connue et utilisée, en particulier, pour la chimioprophylaxie du paludisme. Au total, des données scientifiques existent, elles nous ont conduits à essayer, à priori pour la première fois, un protocole DOX/HCQ pour le traitement de la leishmaniose canine.

Nos résultats sont partiels mais décevants pour les cas cliniques graves que nous avons suivis. Par contre, un chien peu atteint (uniquement des dépilations péri-

orbitales) a guéri. Notre travail consistait à faire, à peu de frais et dans un délai record, un essai (non randomisé) nécessairement limité. Il conviendrait pour conclure d'étendre l'essai clinique grâce à des moyens financiers adaptés. Cependant, les chiens vont continuer à recevoir le traitement prévu quatre mois. Nous pourrions encore suivre leur état en interrogeant leur propriétaire et les vétérinaires praticiens qui se chargent habituellement de leur santé.

Par ailleurs, des études menées *in vitro* sur des cultures de *L. infantum* apporteraient de nouvelles informations sur l'efficacité à attendre de ce protocole. La démonstration de l'efficacité thérapeutique de nouveaux protocoles contre la leishmaniose viscérale (canine ou humaine) est un véritable défi. Notre travail n'est donc qu'un apport limité à ce chantier mais il permet d'identifier des points d'améliorations qui, une fois maîtrisés, conduiraient à mener ce type d'essai clinique chez des chiens naturellement leishmaniens et à aboutir à des conclusions scientifiques.

3. A propos de l'enquête de prévalence

Notre travail épidémiologique a pris la forme d'une enquête transversale de prévalence de la leishmaniose canine dans certaines communes de Kabylie. Le choix de notre échantillonnage n'a pas suivi les règles de représentativité de la situation globale de ce territoire. C'est pour cela que nous avons appelé notre travail « enquête », car elle a été menée selon nos opportunités. Nos résultats sont cependant interprétables d'une manière générale, il est exclu de comparer la prévalence par commune ou par biotope, les effectifs sont trop limités pour cela. Par prévalence globale, nous avons retenu comme critère la positivité à une (ou les deux) des deux analyses mises en œuvre. La prévalence totale pour la Kabylie est de 27% (27/100). En ce qui concerne les chiens asymptomatiques, elle est de 22,3% (21/94). En Grande Kabylie, la séroprévalence était, lors d'une enquête déjà ancienne, de 11,4% (Dedet JP, 1977). Nous avons trouvé, en sérologie, un taux de 8,5% (8/94). On peut émettre l'hypothèse d'une baisse de l'incidence de l'infection peut-être due aux mesures mises en place depuis plus de trente ans, comme l'euthanasie des chiens cliniquement atteints, réservoirs importants de parasites.

La méta-analyse de centaines d'enquête montre que la séroprévalence a augmenté en Espagne et au Portugal, mais reste assez stable en France, avec une séroprévalence moyenne de 9,1% au cours de la période 1991-2001 et de 11,1% au cours de la période 2001-2003 (Franco AO, 2011). L'évolution peut varier d'un endroit à l'autre. En Italie, des foyers sont maintenant observés dans le nord alors que dans le sud, la séroprévalence sur 845 chiens était de 9,5% (Otranto D, 2009). Le changement climatique pourrait avoir influencé l'écosystème, en particulier, la densité du vecteur. A Alger, il a été ainsi observé une augmentation de la prévalence de la leishmaniose canine (Aït-Oudhia K, 2009).

Notre résultat, relatif à la prévalence moléculaire chez des chiens asymptomatiques, de 15,9% (15/94) peut être rapproché de ceux publiés à propos d'enquêtes du même type. Elle était ainsi de 29,4% sur 153 chiens aux alentours de Barcelone en Espagne (Tabar MD, 2009). Dans les chenils militaires français du Var, elle était de 41,4% sur 140 chiens (Aoun O, 2009). La parasitémie moyenne était de 0,043 parasites/ml [min: 0,0002 – max: 2], résultat très inférieur à nos données (moyenne de 75 520 leishmanies/ml). En fait, selon les auteurs, un seuil de positivité est choisi en fonction de la QPCR mise en œuvre. Comme il n'y a pas de technique PCR de référence, toute comparaison de taux de prévalence nous paraît illusoire, sauf si les échantillons sont traités de la même façon et les résultats présentés en fonction d'un seuil identique.

Dans une région, comme la Kabylie, où la leishmaniose viscérale clinique est relativement courante, le portage asymptomatique canin est lui aussi fréquent. Il doit en être de même chez l'homme, comme l'a montré une enquête réalisée chez les donneurs de sang de la région niçoise (12%) (Le Fichoux Y, 1999). Parmi les chiens asymptomatiques et porteurs, il est sûr que quelques-uns sont en phase pré-clinique et que leur état va évoluer vers la maladie. Certainement que les chiens ayant une parasitémie très élevée seront les plus rapidement malades. Les propriétaires des chiens positifs seront avertis pour qu'ils surveillent l'état de leur animal et prennent précocement des mesures adaptées. Actuellement, en Algérie, les autorités sanitaires préconisent l'euthanasie des chiens malades. Nonobstant, il serait, sans doute, possible de traiter les chiens en tout début de maladie, d'en suivre l'évolution clinique et de différer ainsi la décision d'euthanasie. La

comparaison de taux de prévalence nous paraît illusoire, sauf si les échantillons sont traités de la même façon et les résultats présentés en fonction d'un seuil identique.

Conclusion

Ce travail nous a permis d'évaluer, de manière préliminaire, l'efficacité de l'association doxycycline/hydroxychloroquine dans le traitement de la leishmaniose cutané-viscérale du chien et d'effectuer une enquête de prévalence de cette zoonose en Kabylie. Les résultats de l'étude de l'efficacité de ce traitement sont partiels, car la majorité des onze chiens suivis n'ont pas dépassé deux mois de traitement. Tout de même, les premières observations sont décevantes pour les cas cliniques graves que nous avons suivis. Malgré l'amélioration clinique constatée sur certains chiens, ils restent toujours porteurs de leishmanies. Par contre, un chien peu atteint (uniquement des dépilations péri-orbitales) a guéri, cliniquement et biologiquement, après un mois de traitement.

Notre enquête sur la prévalence de la leishmaniose canine confirme que la Kabylie reste toujours une région d'enzootie importante en Algérie. En excluant les chiens mis sous traitement, 27% (27/100) des chiens dépistés sont positifs. La plupart des chiens positifs (78%) sont asymptomatiques, et seulement six animaux positifs (22%) présentent, au moins, un signe clinique. Les chiens asymptomatiques constituent un réel danger puisqu'ils sont réservoirs et donc susceptibles de transmettre la leishmaniose à d'autres chiens voire à l'homme via les phlébotomes. Nous avons aussi montré que, statistiquement, tous les chiens sont exposés à l'infection d'une manière identique quel que soit leur sexe, leur âge ou leur mode de vie.

Notre travail n'est donc qu'un apport modeste à la connaissance des moyens de maîtrise de la grave zoonose qu'est la leishmaniose canine. Nonobstant, nous pensons, d'une part, qu'il serait possible d'étendre cette étude clinique grâce à des moyens plus importants ; d'autre part, qu'il conviendrait aussi de réaliser des travaux *in vitro* (sur des cultures de leishmanies) et *in vivo* (sur le modèle souris) pour évaluer de manière pertinente l'efficacité de l'association doxycycline/hydroxychloroquine dans le traitement de la leishmaniose cutané-viscérale du chien.

REFERANCE :

1. DEDET J.P. Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. Maladies infectieuses 2009. 8-506-A-10. 14p
2. HARRAT Z. La leishmaniose canine en Algérie. Analyse épizootologique, écologique et étude du parasite. Thèse doctorale en Sciences Vétérinaire. Centre Universitaire d'El Tarf, Algérie 2006.
3. DEDET JP. ADDADI K. & LANNUZEI B. Epidémiologie des leishmanioses en Algérie. La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. Bull. Soc. Path. Exot., 1977, 70, 250-265.
4. HARRAT Z., HAMRIOUI B., BELKAÏD M. & TABEL-DERRAZ O. (1995). Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie Bull Soc Pathol Exot ; 88 :180-184
6. BELAZZOUG S. et coll. La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 1985, 65, 329-335
8. Bourdoiseau G(2000) -Parasitologie clinique du chien –Créteil : NEVA 456P
9. JARRY D.M. Historique de la leishmaniose et leurs et complexe pathogène. In DADET J.P. (1999). Les Leishmanioses. Edition Ellipses, 253p.
10. Euzeby J-(1986) Protozoologie médicale comparée. Vol.1 : Sarcosporidies (Flagellé , Rhizopode)-Cilié, 212-313., Ed. coll. M. Mérieux, Lyon, p 463.
11. Sergent, E, Sergent, E. "Kala-azar. Existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger", Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 3 (1910) ,510 -511
12. www.science directe.
13. Desjeux. P. << La lutte contre les maladies tropicales : la leishmaniose. Revue de l'OMS Genève ,53p(1993).
14. Bussiéras, J., Chermette, R. Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, service parasitologie. (1992) 186 p.).
15. (Berenguer, J., Gomez-campdera, F., Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) in transplant recipients : case report and review, Transplant , V.65 , n°10 , (1998) 1401-1404.).
16. Cruz, I., Niéto, J., Canavat, C., Desjeux, P., Alvar, J., Leishmania /HIV coinfection in the second decade. Indian J. Med. Res, 123, (2006), 356-388.
17. Molina, R., Lohse, J.M., Pulido, F., Laguana, F., Lopez-Velez, R., Alvar, J. Infection of sand human immunodeficiency virus. Am. J. Trop. Med. Hyg., V 60, n°1, (1999), 51-53

18. Service de biologie parasitaire, institut pasteur d'Algérie, Alger, Algérie : la lettre de l'infectiologie – tome XXI-n°1- janvier- février 2006 (9,10)
19. BUSSIERAS J, CHERMETTE R. (1992) Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2 . Protozoologie. Cours de monsieur docteur TRIKI.
20. (Killich_Kendrich R.and Molyneux DH_1981. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlébotomie mechanisms.trans .Soc.Trop Med .Hy 75(1) .152_154 p
21. Bussiéras J, Chermette R 1991.Parasitologie Vétérinaire. Fascicule 4. Entomologie. Polycopie. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, service parasitologie .163p.)
- [22].Bussiéras J, Chermette R 1991 .Parasitologie Vétérinaire. Fascicule 4. Entomologie. Polycopie
- 23.killich-kendrick ,R.,“ biologieand control of Phlébotome sand flies “ clinics in Dermatology , volume 17, Issue 3, (May- june 1999), pages 279-298
24. [organisation mondiale de la santé , leishmaniose aide mémoire NO 375, 2014 [http =www, who. Int médicament r/FACTETSHEETS FS 375 /f](http://www.who.int/médicament/r/FACTETSHEETS_FS_375_/f)
25. BUSSIERAS J, CHERMETTE R (1992) parasitologie vétérinaire. Faculté 2. Protozoologie .polycopié . Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, service de parasitologie 186 p.
26. ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK. (1993) Immunité vis-à-vis des protozoaires et des helminthes. In : Immunologie. 3rd ed. Bruxelles : De Boeck-Wesmael, 16.1-16.22.
27. BEUGNET F., BOULOUIS H-J., CHABANNE L., CLEMENT M-L., DAVOUST B.HADDAD N. (2006). Leishmaniose générale du chien à Leishmania infantum. Dépêche v t., supplément technique, 99, 36-41.
- 28.LAMOTHE J., RIBOT X. (2004). Leishmanioses : actualités. Bull. bimestr. Soc. v t. prat. Fr., 88, 24-44.
29. AMARA A., ABDALLAH H. B., JEMLI M. H., REJEB A. (2003). Les manifestations oculaires chez les chiens leishmaniens. Point v t., 235, 50-55.
30. PRIANTI M. G., YOKOO M., SALDANHA L. C. B., COSTA F. A. L., GOTO H. (2007)Leishmania chagasi-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. Braz. J. med. biol. Res., 40(6), 819-823.
31. ADAMAMA-MORAITOU K. K., RALLIS T. S., KOYTINAS A. F., TONTIS D., PLEVRAKI K., KRITSEPI M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with Leishmania infantum : a prospective study. Am. J. Trop. ed.

32 Meunier A. « Etude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l'influence des facteurs environnementaux en France depuis 1965, dans le sud-ouest en 2006 ». Thèse Méd. Vét., Lyon, 106p. (2007).

33. HARRAT Z. BERROUANE Y. BEN ABDESSLAM S. BELKAID M. TABET-DERRAZ O. La leishmaniose viscérale en Algérie évolution de la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. Arch. Inst. Pasteur Algérie, 1992, 58 : 255-272.

34. JOANNE A. Géographie de l'Ariège. Ed. Hachette, réédition 04/94. La leishmaniose canine dans le sud de la France. N°spéciale leishmaniose. Prat. Med. Chir. An. Comp. 1988.

35. BENIKHLEF R. PRATLONG F. HARRAT Z. SERIDI N. BENDALI-BRAHAM S. BELKAID M. & DEDET JP. Leishmaniose viscérale infantile causée par *Leishmania infantum* zymodème MON-24 en Algérie. Manuscrit n° 2189. "Parasitologie". Reçu le 21 avril 2000. Accepté le 25 juillet 2000.

36. Buffet P. "Traitement des leishmanioses". DIU Physiopathologie & Thérapeutique en maladies infectieuses . IP Paris. Mai 200

37 Bourdoiseau G.. Chapitre 13 : Maladies parasitaires disséminées, la leishmaniose. In : Parasitologie clinique du chien, Ed.NEVA, Créteil, 325-362.19 (2000)

38. Papierok GM. « Diagnostic biologique de la leishmaniose canine et perspectives ». Nouv. Prat. Vét., 159, 65-68. (2002).

39. Keck N. » Diagnostic de laboratoire de la leishmaniose canine. Leishmaniose canine : Surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie ». Résumés. Lyon : Société Française de Parasitologie,. (2004)

40. Hubert B. » Comment diagnostiquer la leishmaniose canine ». Le Point Vét., 270, 54-59. (2006).

41. Lamothe J, Gaudray C, Zarka P. "Diagnostic de la leishmaniose canine ». Prat. Méd. Chir. Anim. Cie, 39, 41-46. (2004).

42. Charrol P. « Contribution à l'étude du diagnostic immunologique de la leishmaniose canine ». Thèse de doctorat vétérinaire, faculté Paul Sabatier, Toulouse, 175pp. (1989).

43. LEMAHIEU JC. (2004) Le système immunitaire : organes, cellules et molécules. In : Cours d'immunologie PCEM 2 [en-ligne], mise à jour le 13 janvier 2004 [http://anne.decoستر.free.fr/immuno/orgcelri/orgcelmo.htm] (consultée le 5 mars 2009).

44. Lemahieu JC. « Le système immunitaire : organes, cellules et molécules ». In : Cours d'immunologie PCEM 2. (2004)

45. Mossalayi M .D., Appriou M. « Intérêt du monoxyde d'azote dans la défense anti-parasitaire des macrophages humains ». Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 138, 7-17. (1999)
46. Baneth G. "Pathoimmunology of canine leishmaniasis". PROC 14th ECVIM-CA Congress, Barcelona . (2004)
47. Moreno J. "Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis". Trends Parasitol., 23, 86-88. (2007).
48. Euzeby J. « Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire ». Paris : Lavoisier, 818p. . (2008)
49. Pinelli E., Rutten VPMG., Ruitenberg EJ. « Cellular immune responses in canine leishmaniasis ». In : Canine leishmaniasis : an update. Barcelona, Spain, 1999.
50. Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del REAL G., Ruitenberg J. "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*". Infect. Immun., 62, 229-235. (1994).
51. Cardoso L., Neto F., Sousa JC., Rodrigues M., Carbal M. "Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity". Vet. Parasitol., 79(3), 213-220. (1998).
52. Cardoso L., Schallig HDFH., Cordeiro DA., Silva A., Cabral M., Alunda JM., Rodrigues M." Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs". Vet. Immunol. Immunopathol., 117, 35-41. (2007)
53. BOURDOISEAU G. (2000). Chapitre 13 : Maladies parasitaires disséminées, la leishmaniose. In : Parasitologie clinique du chien, Ed.NEVA, Créteil, 325-362.
54. BOURDOISEAU G. DENEROLLE P. Traitement de la leishmaniose canine: actualités. Revue Méd. Vét., 2000, 151, 5, 395-400
55. GINEL P.J., LUCENA R., LOPEZ R., MOLLEDA J.M. (1998). Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. J. Small. An. Pract., 39, 271-274.
56. BANETH G., SHAW SE. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. Vet. Paras., 106, 315-324.
57. DJERBOUH A. et al.,. La leishmaniose canine en Algérie : essai de traitement avec l'allopurinol. Ann. Med. Vet, 2005, 149, 132-134
58. RAQUIN E., Etude rétrospective de cas de leishmaniose canine à l'ENVA de 2000 à 2009. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. France. 2010.

59. GOMEZ-OCHOA P., CASTILLO J.A., GASCON M., ZARATE J.J., ALVAREZ F., COUTO C.G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis : a clinical trial. *The Vet. Jour.*, 179, 259-263.
60. 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.
61. BRIFFOD, C. Revue actuelle en matière de leishmaniose canine. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 101 f.
62. BOURDOISEAU G., FRANC M. (2008). Leishmaniose canine et féline. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Vétérinaire, Médecine générale, 1350. 93
63. GINEL P.J., LUCENA R., LOPEZ R., MOLLEDA J.M. (1998). Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J. Small. An. Pract.*, 39, 271-274.
64. KILLICK-KENDRICK R., KILLIK-KENDRICK M., FOCHEUX C., DEREURE J., PUECH M.P., CADIERGUES M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, 15, 358-363.
65. DEREURE J., VANWAMBEKE S.O., MALE P., MARTINEZ S., PRATLONG F., BALARD Y., 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. *Vect. Zoon. Dis.*, 9(6), 687-694.
66. DANTAS-TORRES F. (2006). Leishmune® vaccine : the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.*, 141, 1-8.
67. - Farca A, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuglio A, et al. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitology Research* 2012; 110(6):2509–13.
68. - Rollain JM, Colson P, Raoult D. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30 (2007) 297–308.
69. - Zoetis. Witness® Leishmania. 2010.
<http://www.prontuarioveterinario.it/Download.aspx?type=file1&id=4200>.
70. - Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42(11):5249-55.

71. - Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications *Reviews in Biology and Biotechnology* 2002;2(2):2-11.