



139THV-2

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



UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme  
De Docteur vétérinaire

**LA LEISHMANIOSE CANINE EN ALGERIE :  
CONTRIBUTION A L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE  
DU FOYER DE LA GRANDE KABYLIE**

Présenté par :

**Amar BESSAD**

Soutenu devant le Jury composé de :

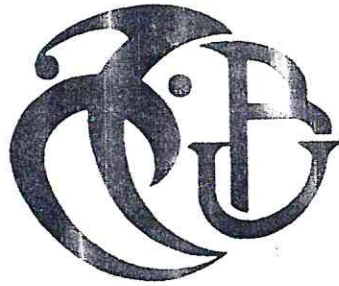
**Mr BERBERE A  
Mme HAMAI F  
Mr NEBRI R  
Mr HARRAT Z  
Mr MOULOUA A.K**

**Maître de conférences  
Maître assistante  
Chargé de cours  
Maître assistant  
Chargé de cours**

**Président  
Examinatrice  
Examinateur  
Promoteur  
Co-Promoteur**

Promotion 2006/2007

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



UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme  
De Docteur vétérinaire

LA LEISHMANIOSE CANINE EN ALGERIE :  
CONTRIBUTION A L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE  
DU FOYER DE LA GRANDE KABYLIE

Présenté par :

Amar BESSAD

Soutenu devant le Jury composé de :

Mr BERBERE A

Mme HAMAI F

Mr NEBRI R

Mr HARRAT Z

Mr MOULOUA A.K

Maître de conférences

Maître assistante

Chargé de cours

Maître assistant

Chargé de cours

Président

Examinatrice

Examinateur

Promoteur

Co-Promoteur

Promotion 2006/2007

*À la mémoire de mon Père*

*À ma mère*

*À mes sœurs*

*À toute ma famille*

*À tous mes amis*

## REMERCIEMENTS

Nous voudrions d'abord souligner la contribution de plusieurs personnes, sans qui la réalisation de ce travail n'aurait été possible.

Nous tenons, surtout, à remercier le Dr Z. HARRAT, Chef de Service d'Eco-épidémiologie parasitaire à Institut Pasteur d'Algérie, pour nous avoir orientés et suivis durant plus d'une année, ainsi que pour avoir mis à notre disposition tout le matériel dont nous avons besoin.

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

Nos remerciements vont, aussi :

Au Dr A.K MOULOUA, Maître Assistant au Département des Sciences Vétérinaires, à l'Université de Blida, qui a accepté de nous encadrer, et pour sa coopération et son aide précieuse.

Au Dr A. BERBERE, Chef de Département des Sciences Vétérinaires, à l'Université de Blida, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de thèse.

A Mr R. NEBRI, Chargé de cours au Département des Sciences Vétérinaires, à l'Université de Blida, de l'intérêt qu'il a porté à notre travail, et pour avoir accepté de le juger.

Au Dr F. HAMAIDI, Maître assistant au Département des Sciences Biologiques, à l'Université de Blida, qui nous a fait l'honneur de participer à ce Jury.

A la merveilleuse équipe du Centre National de Référence en Leishmaniose :  
Ghania pour son aide et ses conseils le long de notre travail sur l'IFI.  
Rafik, Ihssan et Sihem qui nous ont accompagnés en PCR.  
Razika qui nous a orientés lors du typage enzymatique.  
Nawel Et Souad pour leur assistance et contribution à la réalisation des cultures.

Au personnel du laboratoire Régional Vétérinaire de Tizi Ouzou.

Au Dr A.HAMANI, Pour avoir participé à cette étude.

A Mohand et Abd-El-Ghani qui se sont déplacés avec nous, et nous ont aidés à la réalisation des prélèvements.

## RESUME

Dans la présente étude, réalisée entre Mars 2007 et Janvier 2008, 109 sérums canins, provenant de la contrée Sud-est de la Wilaya de Tizi Ouzou ont été testés en immunofluorescence indirecte (IFI). 10 échantillons, soit 9,17%, ont montré un taux d'anticorps égal ou supérieur à 1/80, et sont ainsi retenus positifs. La répartition des résultats selon la commune d'origine nous permet de constater une grande variabilité de la fréquence de l'enzootie canine, qui oscille entre 2,5 et 33,3%.

21 cultures ont été confectionnées à partir de différents tissus (rate, ganglion, moelle osseuse et sang) des chiens positifs à la sérologie. 10 ont été abandonnées du fait des contaminations massives par les champignons. Les 11 cultures maintenues en incubations sont restées négatives après quatre repiquages sur milieu NNN.

Parmi les 5 chacals (*Canis aureus*) capturés au niveau de la région d'Illoula ou Malou, divers prélèvements ont été effectués sur 2 d'entre eux. Le sérum d'un chacal âgé de 3 ans s'est montré positif à l'IFI à la dilution 1/40. La PCR appliquée sur du tissu splénique du même animal a décelé la présence d'ADN leishmanien.

Deux souches de leishmanies ont été isolées à partir de la rate et de la moelle osseuse du sujet infecté. L'identification biochimique des deux isolats par électrophorèse, sur gel d'amidon, de 15 systèmes enzymatiques, réalisée à l'Institut Pasteur d'Algérie, a révélé l'appartenance du parasite au variant enzymatique MON1 du complexe *Leishmania infantum*.

L'espèce *Canis aureus*, un canidé sauvage très réparti dans la rive sud de la Méditerranée, occupe, vraisemblablement une place prépondérante dans les foyers de leishmanioses viscérale humaine et canine de cette région. Il serait le réservoir selvatique du parasite *L.infantum*.

## SUMMARY

In the present study, 109 canine sera were collected in the South-eastern region of Tizi-Ouzou, from March 2007 to January 2008, and tested by indirect fluorescence antibody test (IFAT). Anti-leishmanial antibodies were detected in 10 samples of 109 tested (9,17%). The geographic distribution of cases showed that the seroprevalence of canine leishmaniasis fluctuate from one district to another: it varies from 2,5 to 33,3%.

21 samples were collected from several tissues (spleen, liver, blood, lymph nodes and bone marrow) of seropositive dogs for culturing in NNN media. 10 cultures were discarded only after few days because of the contamination. The 11 cultures maintained in incubator remained negative after four weeks.

Several biopsies were taken from two of five jackals (*Canis aureus*) trapped in the Illoula ou Malou region. The serum of one jackal was positive by IFAT, at the dilution of 1/40. Spleen tissue of the same animal subjected to PCR revealed a *Leishmania* infection.

Two strains of *Leishmania* were isolated from spleen and bone marrow of the infected jackal. The biochemical characterization of the leishmanial isolates was carried out at «Institut Pasteur d'Algérie». Starch-gel electrophoretic analysis of 15 isoenzymes showed that the parasite belong to the zymodeme MON 1 of *Leishmania infantum* complex.

The jackal population (*Canis aureus*) is very great in the Southern Mediterranean shore. This wild canid may occupy a prime place in the human visceral and canine leishmaniasis focus of this area. It could be the sylvatic reservoir of *L.infantum*.

## **Liste des illustrations :**

### **Figures :**

- Figure.1.1 : Ultrastructure d'un amastigote [139].
- Figure .1.2 : Principaux antigènes de surface de Leishmania [119].
- Figure.1.3 : Cycle de vie du phlébotome [37].
- Figure.1.4 : Epidémiologie des leishmanioses [47].
- Figure.1.5 : Cycle de la leishmaniose chez les mammifères [143].
- Figure.1.6 : Orientation de la réponse immunitaire suite à l'infection par les leishmanies [1].
- Figure.1.7 : Formol-leucogélification [56].
- Figure.1.8 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien [39].
- Figure.1.9 : Principe d'amplification génique [5].
- 
- Figure.2.1 : Localisation géographique de la région étudiée [DSA T.O].
- Figure.2.2 : Principe de la technique d'immunofluorescence indirecte [33].
- Figure.2.3 : Distribution des dilutions sur la lame à antigènes <sup>♦</sup>.
- Figure.2.4 : Séroprévalence de la Lcan dans les 7 localités <sup>♦</sup>.
- Figure.2.5 : Circuit du parasite leishmanien dans le nord de l'Algérie <sup>♦</sup>.

### **Photos :**

- Photo.1.1 : Statuette découverte au Pérou : ( lésion mutilante du nez) [94].
- Photo.1.2 : *Leishmania* : forme promastigote [94].
- Photo.1.3 : Leishmanie : forme amastigote [125].
- Photo.1.4 : Phlébotome adulte [145].
- Photo1.5: Chancre d'inoculation, face interne de l'oreille [37].
- Photo.1.6 : Onychogryphose [125].
- Photo.1.7 : Dépilation autour des yeux (lunettes) avec conjonctivite [125].
- Photo.1.8 : Leishmanies disposées en rosettes : aspect caractéristique [125].
- 
- Photo.2.1 : *Canis aureus* capturé en Kabylie \*
- Photo.2.2 : Résultat de l'amplification, par PCR, du génome codant pour l'ARNr de leishmanies détectées dans la rate du chacal \*.
- Photo.2.3 : Résultat de la révélation de l'enzyme  $\beta$ -TPI \*

## **Tableaux :**

**Tableau.1.1 : Espèces et sous-espèces de Leishmania [121].**

**Tableau.1.2 : Principales espèces de la sous famille *Phlebotominea* [47].**

**Tableau.1.3 : Hôtes naturels ou occasionnels de Leishmania dans l'Ancien Monde [37].**

**Tableau.1.4 : Tableau clinique de la leishmaniose canine [16, 105, 15].**

**Tableau.1.5 : Prévalence des principaux signes cliniques de la leishmaniose canine [65].**

**Tableau.1.6 : Tableau comparatif des tests sérologiques appliqués au diagnostic de LC [69]**

**Tableau.1.7: Altération des paramètres biologiques associée à la leishmaniose canine [105].**

**Tableau.2.1 : Solutions tampons utilisées pour le typage enzymatique. ♦**

**Tableau.2.2 : Conditions de révélation enzymatique. ♦**

**Tableau.2.3 : Résultats de l'enquête sérologique sur la Lcan. ♦**

**Tableau.2.4 : Répartition des résultats en fonction de la race. ♦**

**Tableau.2.5 : Profils enzymatiques des souches analysées. ♦**

**♦ : Personnels**



**Listes des annexes :**

**Annexe i :** Fiche de renseignements pour les prélèvements.

**Annexe II :** Liste des chiens prélevés.

**Annexe III :** Résultats de l'enquête séro-épidémiologique.

**Annexe IV :**

Préparation du milieu Novy-McNeal-Nicolle (NNN).

Préparation du milieu Cœur-Cerveau-Sang (CCS).

Préparation du milieu Sérum de Lapin Coagulé (SLC).

**Annexe v :** Préparation de l'antigène leishmanien pour IFI.

**Annexe vi :** Préparation du tampon PBS ph 7, 2.

**Annexe vii :** Préparation des solutions de révélation.

### Liste des abréviations :

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ALAT :</b>	Alanine amino transferase
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ASAT :</b>	Aspartate amino-transférase
<b>bp :</b>	Base paires.
<b>CCS :</b>	Cœur, cerveau, sang
<b>CD :</b>	Cluster of differentiation
<b>CPK :</b>	Cellule présentatrice d'antigènes.
<b>dATP :</b>	Deoxyadenosine triphosphate
<b>dCTP :</b>	Deoxycytosine triphosphate
<b>dGTP :</b>	Deoxyguanine triphosphate
<b>dTTP :</b>	Deoxythymine triphosphate
<b>EDTA :</b>	Ethylene diamine tetra acid
<b>ELISA :</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>FITC</b>	Fluoresceine isothiocyanate
<b>GIPL :</b>	Glycosylinositol phospholipide
<b>gp63 :</b>	Glycoprotéine 63
<b>GPI :</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>IFI :</b>	Immuno-fluorescence indirecte
<b>Ig :</b>	immunoglobuline
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>IFN :</b>	Interféron
<b>Lcan :</b>	Leishmaniose canine
<b>LPG :</b>	Lipophosphoglican
<b>LV :</b>	Leishmaniose Viscérale
<b>NAD :</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<b>NADP :</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate.
<b>NNN :</b>	Novy-Nicolle-Mac Neal
<b>NRAMP :</b>	Naturel resistance associated macrophage protein
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé

<b>PBS :</b>	Phosphate buffer saline
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Peni-strepto :</b>	Pénicilline streptomycine
<b>PPG :</b>	Protéophosphoglycanes PPG
<b>RE :</b>	Réticulum endoplasmique
<b>SIDA :</b>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>SPM :</b>	Système des phagocytes mononuclés
<b>TAE :</b>	Tris acétate EDTA
<b>Taq :</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TCE :</b>	Tris citrate EDTA
<b>TE :</b>	Tris EDTA
<b>Th :</b>	T helper
<b>TNF :</b>	Tumor necrosis factor
<b>U :</b>	Unité internationale
<b>UV :</b>	Ultra violet
<b>VIH :</b>	Virus d'immunodéficience humaine

# TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
<b><u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : GENERALITES SUR LA LEISHMANIOSE</u></b>	
<b>1 Historique.....</b>	<b>2</b>
<b>2 Protagonistes de la leishmaniose.....</b>	<b>3</b>
2-1 Le parasite .....	3
2-1-1 Taxonomie .....	3
2-1-2 Différentes formes et leur localisation .....	5
2-1-3 Molécules de surface .....	7
2-2 Le vecteur .....	8
2-2-1 Classification .....	8
2-2-2 Morphologie .....	9
2-2-3 Biologie .....	10
2-2-4 Interaction <i>Leishmania</i> -vecteur .....	11
2-2-5 Effet de la salive du vecteur sur l'hôte .....	12
2-3 Les hôtes réservoirs .....	12
2-3-1 Le chien .....	15
2-3-2 Les canidés sauvages .....	15
2-3-3 Les rongeurs .....	15
2-3-4 Les hôtes occasionnels .....	16
<b>3 Le cycle biologique .....</b>	<b>17</b>
<b>4 Relation hôte-parasite .....</b>	<b>18</b>
4-1 Pathogénie .....	18
4-2 Immunité .....	19
4-2-1 réponse humorale .....	20
4-2-2 réponse cellulaire .....	21
4-3 Symptomatologie .....	21
<b>5 Diagnostic .....</b>	<b>23</b> ✕
5-1 Diagnostic épidémio-clinique .....	23
5-2 Diagnostic expérimental.....	23
5-2-1 Observation directe du parasite .....	23

5-2-2 Mise en culture du parasite .....	24
5-2-3 tests sérologiques .....	25
5-2-4 Biologie clinique .....	26
5-2-5 Biologie moléculaire .....	28
5-2-6 Intradermoréaction à la leishmanine .....	29
<b>6 Traitement .....</b>	<b>30</b>
6-1 Principes actifs .....	30
6-2 Problèmes liés au traitement .....	33
6-3 Le suivi .....	33
<b>7 Mesures de lutte .....</b>	<b>34</b>
7-1 lutte antivectorielle .....	34
7-2 Protection individuelle contre les piqûres de phlébotomes .....	34
7-3 Dépistage et surveillance systématiques des chiens .....	34
7-4 Compagnes de sensibilisation .....	35
7-5 Vaccination des chiens .....	35

**ETUDE PERSONNELLE :**

**LA LEISHMANIOSE CANINE EN ALGERIE: CONTRIBUTION A L'ETUDE  
EPIDEMIOLOGIQUE DU FOYER DE LA GRANDE KABYLIE**

<b>1 Aperçu sur la région d'étude .....</b>	<b>36</b>
<b>2 Matériels et méthode .....</b>	<b>36</b>
2-1 Population étudiée .....	36
2-2 Méthodologie .....	38
2-2-1 Prélèvement de sang .....	38
2-2-2 Biopsie-exérèse d'organes .....	38
2-2-3 Sérologie .....	39
2-2-3-1 Généralités.....	39
2-2-3-2 Protocole .....	40
2-2-4 Culture .....	41
2-2-5 Diagnostic moléculaire .....	42
2-2-5-1 Principe de la PCR .....	42
2-2-5-2 Protocole .....	43
a-Extraction d'ADN .....	43
b-Préparation de la PCR .....	44
c-Préparation du support de migration .....	45

2-2-6 Identification des parasites par électrophorèse des isoenzymes .....	46
2-2-6-1 Principe et historique .....	46
2-2-6-2 Extraction des enzymes solubles .....	47
2-2-6-3 Électrophorèse en gel épais d'amidon .....	48
a-Systèmes enzymatiques étudiés .....	48
b-Solutions tampons .....	48
c-Préparation du support de migration .....	50
d-Migration électrophorétique .....	50
e-Révélation des électromorphes .....	51
<b>3 Résultats .....</b>	<b>53</b>
3-1 Chiens .....	53
3-1-1 Enquête séro-épidémiologique .....	53
3-1-2 Culture des leishmanies .....	54
3-2 Chacals .....	55
3-2-1 Biologie moléculaire .....	55
3-2-2 Sérologie et isolement du parasite .....	56
3-2-3 Typage isoenzymatique .....	56
3-2-3-1 Lecture des électrophorégrammes .....	56
3-2-3-1 Identification des souches .....	57
<b>4 Discussion .....</b>	<b>58</b>
<b>5 Conclusion et perspectives .....</b>	<b>61</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>62</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>74</b>

## **Introduction :**

La leishmaniose est une anthroponose infectieuse, inoculable et exceptionnellement contagieuse, due à la prolifération au sein des cellules du système des phagocytes mononuclés (SPM), d'un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*, transmis par la piqûre d'un diptère vecteur, le phlébotome.

Largement répandue à travers le monde, la leishmaniose est considérée comme l'une des six maladies tropicales majeures dans les pays en voie de développement selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). On estimait à 12 millions le nombre de personnes infectées par les différentes espèces de *Leishmania* en 2000, avec une incidence annuelle mondiale d'environ 1.5 à 2 millions dans 88 pays endémiques [142]. Dans les dernières années, la recrudescence du nombre de cas de leishmaniose est associée à l'apparition d'un nouveau phénomène, celui de la co-infection *Leishmania*-VIH. L'immunodépression engendrée par le SIDA favorise l'expression de la leishmaniose qui serait normalement demeurée inapparente et aggrave celle en évolution [35]. De son côté, la leishmaniose viscérale accélère le développement du SIDA et diminue l'espérance de vie des patients [101, 121], ainsi, le tiers des sidéens décède suite à l'infection par *Leishmania* causant la leishmaniose viscérale [30].

En Algérie, comme dans tous les pays du bassin méditerranéen occidental, le chien domestique, est considéré comme le réservoir par excellence de *L.infantum*, agent de la leishmaniose viscérale et cutanée sporadique du nord, et dont *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus perfiliewi* sont respectivement les vecteurs [72, 73]. La région de la Grande Kabylie est connue depuis longtemps comme un foyer très actif de la leishmaniose humaine et canine [36]. Depuis la découverte du premier cas de Kala-azar dans la région, en 1946, [126], plusieurs travaux ont été initiés afin de comprendre le complexe pathogène de la maladie et de caractériser ce foyer. Les différents résultats qui en découlent rapportent une prévalence variant entre 11 et 37% au sein de la population canine [36, 12]. Le variant enzymatique dominant, chez cette espèce, est *L.infantum* MON1 [13]. Par ailleurs, et contrairement à *L.major*, agent de la leishmaniose cutanée, dont les réservoirs selvatiques ont été identifiés, (*Psammomys* et *Meriones*) [12], aucun réservoir sauvage n'est connu pour *L.infantum*.

La présente étude a, donc, pour objectif de contribuer à l'amélioration des connaissances sur l'épidémiologie de la leishmaniose canine dans le foyer de la Grande Kabylie.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE : GENERALITES SUR LA LEISHMANIOSE

### 1 HISTORIQUE :

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leur forme cutanée. En effet, la constatation des lésions tégumentaires bien évidentes remonte à la plus haute antiquité. Une tablette d'argile du palais de Ninive (700-600 av.j-c), transcription d'un écrit akkadien du deuxième ou troisième millénaire avant notre ère, étudiée par Boisier (1894) évoque une ulcération indolore de la face [94].



Photo.1.1 Statuette découverte au Pérou (époque précolombienne: lésion mutilante du nez) [94]

Al Boukhari, médecin du X<sup>ème</sup> décrivait incontestablement cette affection cutanée, et Avicenne l'attribuait à une piqure de moustique.

La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1882, et c'est Cunningham en 1885 qui découvrit le parasite en examinant des coupes histologiques pratiquées à partir d'un ulcère de Delhi. [94].

En 1898, le médecin militaire Borovsky établit la nature protozoaire du parasite responsable du "bouton d'orient" au Turkestan. Ce même parasite fut mis en évidence par William Leishman, en 1903 [86], dans la rate d'un sujet mort de la fièvre de Dum-dum et évoqua sa relation avec les trypanosomes. Ces observations furent confirmées, peu après, par Charles Donovan [43].

Laveran et Mesnil considèrent que c'est un parasite des hématies et le nomment *Piroplasma donovani* [84], avant que Ross ne démontre qu'il ne s'agit pas d'un parasite des globules rouges et l'appelle *Leishmania donovani* [122]. En 1906, Lühre propose le nom de *Leishmania tropica* au parasite de Wright. La première culture fut obtenue par Nicolle et Sicre en 1908, qui découvrent aussi le même protozoaire chez le chien, puis chez le cheval et le chat. Ils font ainsi de la leishmaniose une maladie commune à l'homme et aux autres mammifères [103].



## **2 PROTAGONISTES DE LA LEISHMANIOSE :**

### **2.1 Le parasite :**

#### **2-1-1 Taxonomie :**

Phylum	:	<i>Protozoa</i>
Sous- phylum	:	<i>Sarcomastigophora</i>
Superclasse	:	<i>Mastigophora</i>
Classe	:	<i>Zoomastigophora</i>
Ordre	:	<i>Kinetoplastida</i>
Sous-ordre	:	<i>Trypanosomatina</i>
Famille	:	<i>Trypanosomatidae</i>
Genre	:	<i>Leishmania</i>

D'après Baker J.R [7]

Espèce	:	Sous une apparence morphologique quasi uniforme, les espèces appartenant au genre <i>Leishmania</i> diffèrent par :
		-leur équipement enzymatique (zymodème).
		-la densité de leur acide désoxyribonucléique.
		- leurs caractères antigéniques.
		-leurs affinités tissulaires chez les vertébrés.
		-les espèces de phlébotomes vecteurs.
		-mode de développement chez le vecteur.

[41]

Tableau.1.1 : **Espèces et sous-espèces de Leishmania [121]**

**Sous genre *Leishmania***

<b>Espèce</b>	<b>Maladies</b>	<b>Distribution</b>
<i>L.donovani</i>	Kala-azar	Inde, Bangladesh,
<i>L.archibaldi</i>		Soudan, Ethiopie,
<i>L.infantum</i>	Kala-azar	Nord de l'Asie, Moyen Orient, Sud de l'Europe, Afrique du Nord,
<i>L.chagasi</i>		Centre et Sud de Amérique,
<i>L.tropica</i>	Bouton d'Orient	Inde, Moyen Orient,
<i>L.killicki</i>		Tunisie,
<i>L.major</i>	Bouton de Biskra	Afrique, Moyen Orient, Asie soviétique,
<i>L.gerbilli</i>		Chine, Mongolie,
<i>L.arabica</i>		Arabie saoudite,
<i>L.aethiopica</i>		Ethiopie, Kenya,
<i>L.mexicana</i>	Ulcère de Chicleros	Mexique, Guatemala,

<i>L.amazonensis</i>		Bassin amazonien Brésil,
<i>L.venezuelensis</i>		Venezuela,
<i>L.enrietti</i>		Brésil,
<i>L.hertigi</i>		Panama, Costa Rica,
<i>L.deanei</i>		Brésil
<i>L.pifanoi</i>	Leishmaniose tégumentaire diffuse	Venezuela, Ethiopie,

**Sous genre *Viannia***

<i>L.braziliensis</i>	Espundia	Brésil,
<i>L.peruviana</i>	Uta	Ouest des Andes,
<i>L.guyanensis</i>	Pian Bois	Guyane, Surinam,
<i>L.panamensis</i>		Panama, Costa Rica,

### 2-1-2 Différentes formes et leur localisation :

En fonction de l'hôte, les leishmanies se présentent sous deux formes morphologiques principales : promastigote et amastigote.

**Les promastigotes :** Ce sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif de l'arthropode vecteur. Au microscope photonique, on distingue un corps fusiforme de 10 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur et de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de largeur pourvu d'un flagelle antérieur qui peut atteindre 20  $\mu\text{m}$  de longueur et qui entraîne le protozoaire. Ce flagelle est relié au grain basal (blépharoplaste) situé à la partie antérieure du corps, loin du noyau qui se localise vers le centre. Ce grain basal est lui-même en relation avec le kinétoplaste caractéristique de tous les trypanosomidés.

Seule la microscopie électronique permet de distinguer l'infrastructure de ces organites. Le grain basal comporte, ainsi, 9 triplets de fibrilles disposés en cercle, prolongé par un flagelle formé de 9 doublets toujours disposés en cercle avec une paire centrale.

Sous le grain basal, on distingue une masse importante, le kinétoplaste formé de deux parties : un disque ovoïde contenant des molécules d'ADN disposées en '8', et une partie allongée représentant l'unique mitochondrie chez ces organismes et caractérisée par ses crêtes.

Autour du corps et sous la membrane cellulaire, on observe une série de microtubules ayant vraisemblablement un rôle dans les mouvements et la contractilité.

Le cytoplasme contient, également, les composants classiques d'une cellule eucaryote : ribosomes, appareil de Golgi, vacuoles, RE ... [94,74].

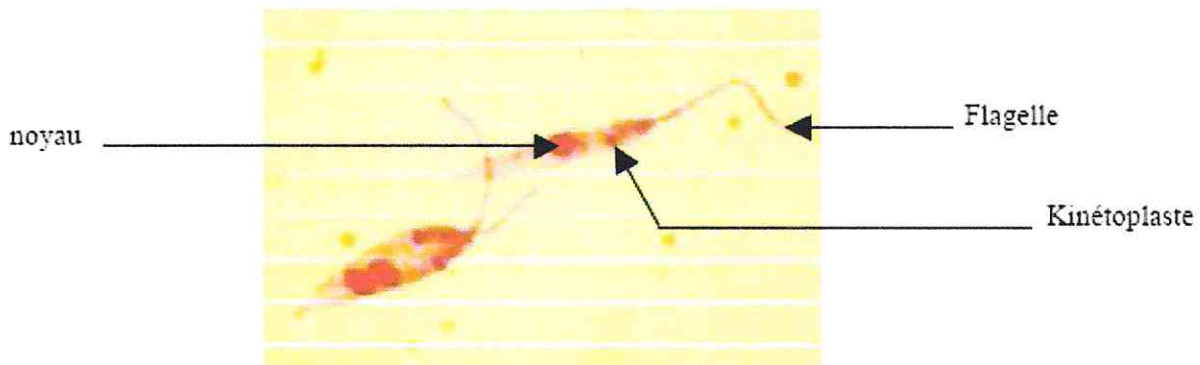


Photo.1.2 *Leishmania* : forme promastigote. [94]

**Les amastigote :** Ce sont des parasites intracellulaires immobiles qui nichent dans les macrophages de l'hôte vertébré. A ce stade les leishmanies présentent un corps ovoïde ou sphérique de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de long et de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de large. Le flagelle est réduit à une ébauche flagellaire ne dépassant pas le corps cellulaire. Le noyau est généralement situé contre la paroi de la cellule. Le kinétoplaste de ces éléments parasitaires est le plus souvent juxtanucléaire. L'infrastructure montre les mêmes éléments que ceux déjà exposés pour la forme promastigote. [94]

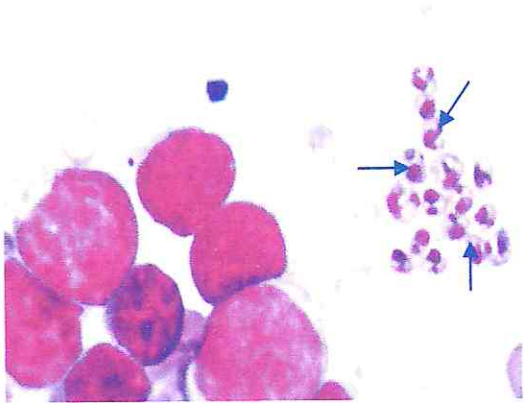


Photo.1.3 Leishmanie : forme amastigote .

[125]

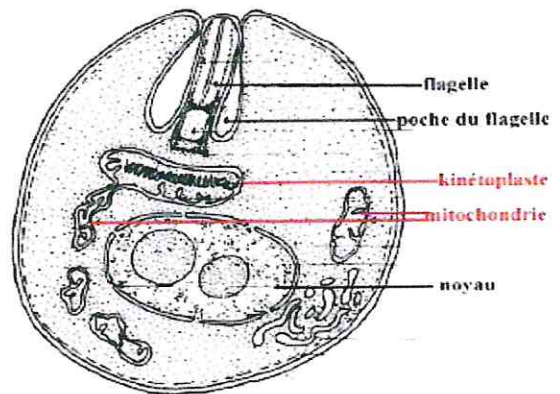


Figure.1.1 Ultrastructure d'un amastigote.

[139]

Un troisième type connu sous le terme de paramastigote a été identifié principalement au niveau du pharynx des phlébotomes infectés. A ce stade, les parasites sont ramassés, munis d'un flagelle court et montrent un kinétoplaste juxtanucléaire. La position de ce morphotype dans le cycle biologique des leishmanies n'est pas encore élucidée. [94]

### 2-1-3 Molécules de surface :

Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx variant entre 7nm chez les procycliques et 17nm pour les métacycliques alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus [110]. Ce manteau est constitué de composés glycosyliés et de protéines ayant tous une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Le lipophosphoglican (LPG) est la molécule la plus abondante chez les promastigotes. Elle est principalement composée d'unités répétées d'un disaccharide et d'un phosphate suivant l'ancre GPI. Les espèces de *Leishmania* se différencient par la présence de chaînes latérales de glycanes, ainsi que par la composition et la situation de celles-ci sur la structure de base du LPG. En effet, le LPG de *L.major* est très ramifié alors que celui de *L.donovani* ne l'est pas [96]. Les promastigotes portent aussi, à leur surface, la glycoprotéine gp63, une autre molécule qui leur permet de se lier aux macrophages. Cette métalloprotéinase requérant la présence de zinc présente une grande variété de substrats tels la caséine, la gélatine, l'albumine, l'hémoglobine et le fibrinogène [98]. Elle recouvre l'entière surface du protozoaire, tout comme le LPG, mais 10 fois moins abondante que lui.

Le phospholipide de glycosylinositol (GIPL) est une petite molécule 10 fois plus abondante que le LPG, appartenant à la classe des glycolipides et ayant une ancre GPI [97]. Contrairement à LPG qui éliminée continuellement, le GIPL se caractérise par une longue demi-vie et joue ainsi un rôle de protection de la surface du promastigote [112]. De plus, le parasite peut sécréter certaines molécules telles les protéophosphoglycanes (PPG) et les phosphatases acides. Les dernières sont des enzymes hydrolytiques qui jouent un rôle dans la résistance du parasite à son hôte de même que dans sa pathogénicité et sa nutrition [91]. *L. major* est dépourvu de phosphatases acides. [92] Chez les amastigotes, deux aspects majeurs caractérisent les molécules de surface : une diminution marquée du LPG [97] et une diminution légère de la gp63 [128]

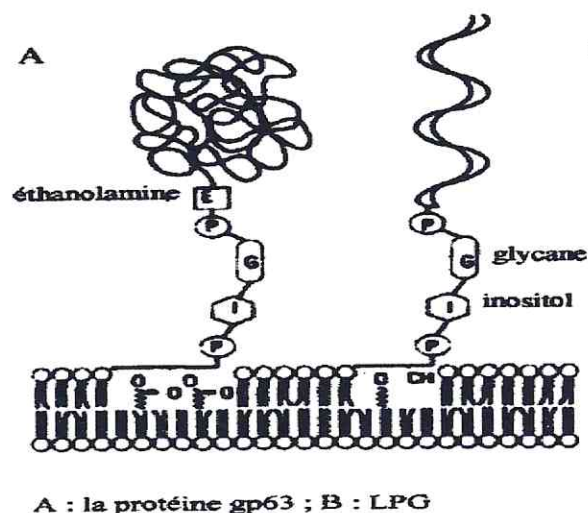


Figure.1.2 Principaux antigènes de surface de *Leishmania*.

## 2-2 le vecteur :

Le rôle vecteur de la mouche des sables a été établi, en Algérie, par les frères Sergent et leurs collaborateurs en 1921 en réussissant la transmission du « bouton d'orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées [129]. Mais la transmission par piqûre ne fût prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber [4].

### 2-2-1 Classification : [144]

Règne : <i>Animal</i>	S/Classe : <i>Pterygota</i>	Famille : <i>Psychodidae</i>
Phylum : <i>Arthropoda</i>	Super ordre : <i>Mecopteroïda</i>	S/Famille: <i>Phlebotominea</i>
S/ Phylum : <i>Mandibulata</i>	Ordre : <i>Diptera</i>	Genre : - <i>Phlebotomus</i>
Super classe : <i>Tracheata</i>	S/Ordre : <i>Nematocera</i>	- <i>Lutzomyia</i>
Classe : <i>Insecta</i>	Super famille : <i>Psychodoïdeae</i>	

**Espèce :** Sur 700 espèces que compte la sous/famille *Phlebotominea*, au moins 50 ont été confirmées comme vecteur des différentes leishmanies. Certaines d'entre elles transmettent une seule espèce de *Leishmania*, alors que d'autres peuvent transmettre deux ou davantage.

Tableau. 1.2 : **Principales espèces de la sous famille *Phlebotominea* [47]**

	<b>Genres :</b>	<b>Espèces :</b>	<b>Mdies transmises :</b>
<b>Dans l'Ancien Monde</b>	<i>Phlebotomus</i>	<i>P. ariasi, P. perniciosus, P. perfiliewi, P. papatasi, P. major, P. smirnovi, P. chienensis, P. martini, P. argentipes.</i>	Leishmaniose viscérale.
		<i>P. sergenti, P. bergeroti, P. papatasi, P. mongolensis, P. duboscqui, P. ansarii, P. longipes, P. pedifer.</i>	Leishmaniose cutanée.
<b>Dans le Nouveau Monde</b>	<i>Lutzomyia</i>	<i>L. longipalpis, L. umbratilis.</i>	Leishmaniose viscérale.
		<i>L. olmeca, L. pessoana, L. trapidoï, L. peruensis, L. intermedia, L. flaviscutellata, L. verrucarum, L. panamensis.</i>	Leishmaniose cutanéomuqueuse.

### 2-2-2 Morphologie :

Le phlébotome est un diptère hématophage présentant un corps grêle et allongé (2 à 5mm), recouvert, ainsi que les ailes, d'une fine pilosité. La tête forme avec le corps un angle d'environ 45°, lui donnant une allure bossue. Il est de couleur jaune paille avec des pattes longues et des ailes lancéolées, abondamment nervurées, dressées en « V » au repos. [94, 82, 48].



**Photo.1. 4.5 Phlébotome adulte. [145]**

### 2-2-3 Biologie :

L'étude de l'épizootiologie des leishmanioses passe impérativement par une connaissance parfaite de l'écologie du phlébotome, vecteur exclusif de ces protozooses. Ce diptère présente un cycle holométabole. Le contact avec une surface humide stimule la femelle qui pond des œufs se développant en larves, sur le sol, dans les terriers, les nids, la poussière des anfractuosités des roches ou de vieux murs. Les larves mueront en pupes, puis en imagos. [37]

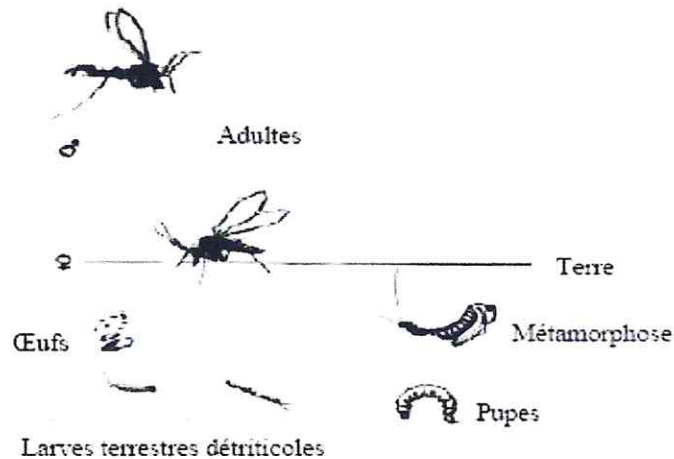


Figure.1.3 Cycle de vie du phlébotome. [37]

Les phlébotomes adultes, de mœurs nocturnes, gisent durant la journée dans des endroits retirés sombres et relativement humides (terriers, étables, maisons...), et sortent au crépuscule par temps chaud (19-20°C) et calme (pas de vent) à degré hygrométrique élevé (80%). Leur vol actif est généralement court (200-800 m) de sorte que les foyers de leishmanioses sont relativement peu étendus. Certaines espèces sont attirées par la lumière de faible intensité, d'autres ne manifestent que peu ou pas de phototropisme. De plus, certaines espèces sont endophiles alors que d'autres préfèrent l'extérieur.

Le sang est indispensable pour le développement des œufs, ce qui explique l'hématophagie de la femelle qui se nourrit sur les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les batraciens. L'attraction des mouches des sables vers l'homme dépend de la production de CO<sub>2</sub> par ce dernier mais également de son odeur. En outre, les espèces qui piquent l'homme sont généralement également zoophiles, ce qui explique le rôle du phlébotome dans la transmission de la leishmaniose.

Chez les animaux, ce sont les zones glabres (museau, oreilles,...) qui sont les plus exposées aux piqûres, alors que chez l'homme ce sont les parties découvertes (visage, cou, mains, pieds,...) [94, 47].



#### **2-2-4 interaction *Leishmania*-vecteur :**

Bien que l'analyse du contenu stomacal d'un phlébotome puisse révéler l'existence de plusieurs espèces du genre *Leishmania*, il n'est pas dit que ce vecteur transmettra toutes les espèces du parasite de façon aléatoire. En effet, le développement d'un parasite dans le tractus digestif de cet insecte dépend de la capacité du protozoaire à surmonter certains obstacles tels les enzymes digestives de l'intestin médian, la membrane péritrophique entourant le repas sanguin et, finalement, l'excrétion du contenu de l'intestin suite à la digestion [123].

Pour échapper à l'action des enzymes digestives, le parasite sécrète des protéines contenant des phosphoglycane (e.g.PPG et une phosphatase acide). Ces protéines formeraient une matrice qui diminuerait la quantité des enzymes digestives de l'intestin et leur charge négative protégerait le parasite de l'effet hydrolysant des enzymes à proximité. Le LPG, à la surface du parasite, jouerait également le même rôle [124]. Par ailleurs, les leishmanies doivent s'évader de la membrane péritrophique qu'elles lysent en produisant une chitinase [127]. Finalement, et pour éviter d'être éliminé avec le reste du repas sanguin, le protozoaire doit s'attacher aux cellules épithéliales de l'intestin par établissement d'une interaction entre les membranes de ces dernières et le LPG du premier [76]. En effet, les différences de structure entre les LPG des différentes espèces de *Leishmania* sont à l'origine de la spécificité de la relation vecteur parasite. A titre d'exemple, les ramifications de résidus galactose du LPG de *L.major* permettraient son attachement dans son vecteur naturel *P.papatasi*, alors l'absence de ramification du LPG chez *L.donovani* empêcherait cette adhésion [111]. Cette spécificité se confirme aussi pour *P.sergenti*, vecteur de *L.tropica*, dont le LPG contient beaucoup de glucose et d'arabinose ne permettant pas, ainsi, à *L.major* et *L.donovani* de coloniser l'intestin médian de ce phlébotome [76] .

### **2-2-5 Effets de la salive du vecteur chez l'hôte :**

Lors de son repas sanguin sur l'hôte, la femelle du phlébotome injecte de la salive au site de piqûre qu'elle soit infectée ou non par *Leishmania*. Des études menées par Belkaid, 1998 [10], Lima et Titus, 1996 [89], Mbow, 1998 [95], ont démontré que des homogénats de glandes salivaires de cet insecte avait provoqué une immunomodulation locale lorsque injectés de façon concomitante avec des leishmanies favorisant, ainsi, la diffusion du parasite et l'augmentation de la taille de la lésion. Cette immunodépression se manifeste par une libération accrue de l'IL4 et une inhibition de plusieurs fonctions du macrophage : présentation de l'antigène, production de monoxyde d'azote et prolifération de lymphocytes T spécifiques au parasite.

La salive de vecteur est aussi reconnue pour conférer une immunité contre la leishmaniose. Une pré-exposition de souris aux homogénats de glandes salivaires les épargnait une exacerbation de la pathogenèse suite à une co-injection d'homogénats et de parasites. L'acquisition de l'immunité a été confirmée par l'apparition de plus petites lésions et moins de parasites sur des souris soumises au préalable à des piqûres de phlébotomes non infectés puis à une infection par des phlébotomes porteurs de *L.major*. [10, 77]

### **2-3 Les hôtes réservoirs :**

Plusieurs vertébrés ont été retrouvés porteurs de protozoaires appartenant au genre *Leishmania*. Hormis certaines espèces de lézards, tous les hôtes, qu'ils soient accidentels ou naturels, appartiennent à la classe des mammifères. Ainsi, 8 ordres de cette classe peuvent faire partie du cycle de *Leishmania* : Primates, Carnivores, Rongeurs, Marsupiaux, Edentés, Insectivores, Hyracoïdes et Chiroptères [2]. A noter que dans l'Ancien Monde, 42 espèces appartenant à 4 ordres ont été retrouvées infestés par des leishmanies intégrant 8 complexes leishmaniens [37].

Tableau.1.3 : Hôtes naturels ou occasionnels de *Leishmania* dans l'Ancien Monde

[37]

Ordre	Famille	Espèce	L. major	L. arabica	L. turanica	L. donovani	L. tropica	L. killicki	L. infantum	L. aethiopica	L. gerbilli	
Primates	Cercopithecidae	<i>Cercopithecus aethiops</i>	⊗									
	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	⊗			⊗	⊗	⊗	⊗	⊗		
Carnivora	Canidea	<i>Canis familiaris</i>	⊗	⊗		⊗	⊗		⊗			
		<i>Canis aureus</i>						⊗				
		<i>Canis lupus</i>						⊗				
		<i>Vulpes vulpes</i>						⊗				
	Felidea	<i>Fennecus zerda</i>							⊗			
		<i>Felis felis</i>							⊗			
		<i>Felis serval</i>					⊗					
	Viverridae	<i>Genetta genetta</i>				⊗						
	Procyonidae	<i>Nyctereutes procyonides</i>							⊗			
	Hyracoidea	Procaviidae	<i>Procavia capensis</i>						⊗			
			<i>Procavia johnstoni</i>						⊗		⊗	
<i>Procavia habessinica</i>										⊗		
<i>Heterohyrax brucei</i>										⊗		
<i>Dendrohyrax arboreus</i>										⊗		
Rodentia	Sciuridae	<i>Xerus rutilus</i>	⊗									
		<i>Xerus gerulus</i>							⊗			
	Muridae	<i>Tatera gambiana</i>	⊗									
		<i>Tatera robusta</i>	⊗									
		<i>Tatera nigricauda</i>	⊗									
		<i>Tatera indica</i>	⊗									
		<i>Taterillus emini</i>	⊗									
		<i>Psammonys obesus</i>	⊗									
		<i>Rhombomys opimus</i>	⊗		⊗							⊗
		<i>Meriones shawi</i>	⊗									
		<i>Meriones libicus</i>	⊗									
		<i>Meriones crassus</i>	⊗									
		<i>Meriones hurricanae</i>	⊗									
		<i>Meriones meridianus</i>	⊗									
		<i>Meriones erythrouros</i>	⊗									
		<i>Meriones persicus</i>	⊗									
		<i>Gerbillus pyramidum</i>	⊗									
		<i>Acomys albigena</i>					⊗					
		<i>Arvicantis niloticus</i>	⊗				⊗			⊗		
		<i>Mastomys erythroleucus</i>	⊗									
		<i>Mastomys natalensis</i>	⊗									
		<i>Nezokia indica</i>	⊗									
		<i>Aethomys kaiseri</i>	⊗									
		<i>Rattus rattus</i>					⊗	⊗		⊗		
		<i>Rattus norvegicus</i>								⊗		
		<i>Cricetomys gambianus</i>									⊗	

En fonction du réservoir, on peut distinguer trois types de cycles (ou foyers) de leishmaniose :

- Foyer primaire : entretenu par les animaux sauvages qui représentent ici les réservoirs primaires. L'homme ne pourra dès lors se contaminer qu'à l'occasion de contact avec le milieu naturel (chasse, cueillette, séjour dans un milieu récemment anthropisé,...).
- Foyer primo-secondaire : entretenu par des réservoirs sauvages et des réservoirs péri-domestiques ou domestiques. La transmission à l'homme pourra se faire alors par l'intermédiaire d'un vecteur zoo-anthropophile.
- Foyer secondaire : entretenu par des réservoirs domestiques et péri-domestiques qui peuvent assurer ainsi le rôle de relais au sein du complexe pathogène. [47]

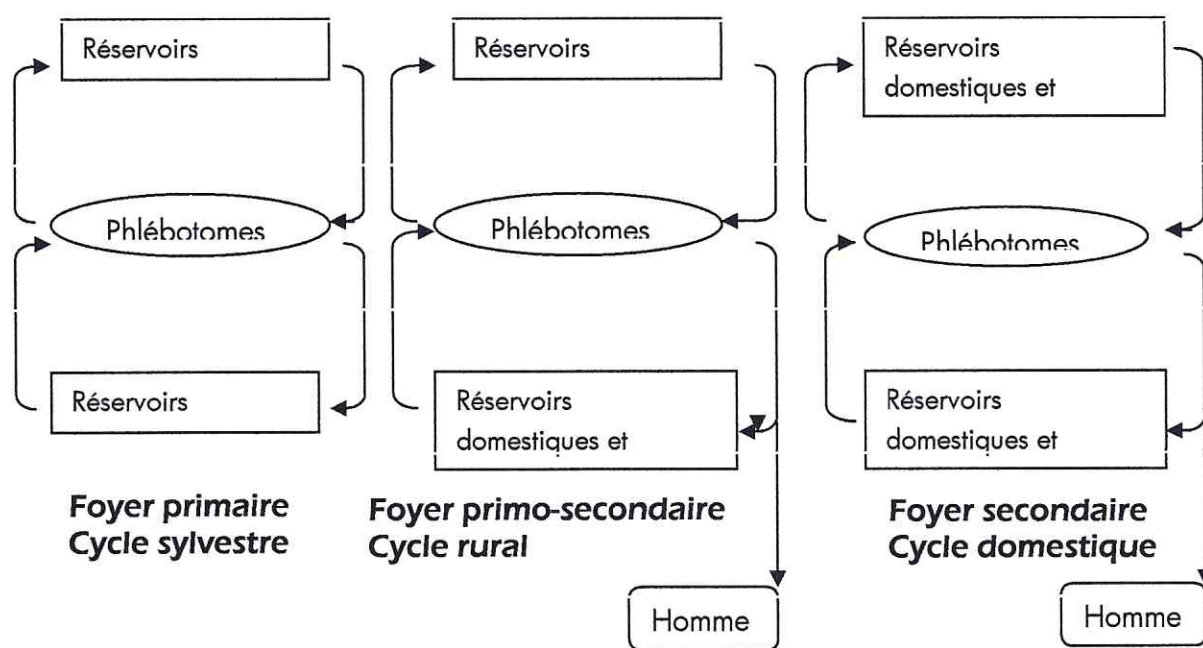


Figure.1.4 Epidémiologie des leishmanioses. [47]

### **2-3-1 Le chien :**

Le réservoir canin est considéré depuis longtemps comme un élément crucial dans le cycle secondaire de la leishmaniose viscérale [102]. Ainsi, cet animal dont le mode de vie le rend très proche de l'homme d'un côté, et augmente les probabilités de contact avec le vecteur de l'autre côté, joue un rôle de relais entre les réservoirs sauvages et l'homme, et permet ensuite une circulation plus rapide du parasite. Ce fait s'accroît plus pour les chiens vagabonds, et à moindre degré pour les chiens de chasse, qui ont volontiers tendance à rôder pendant d'assez longues périodes et sur des dizaines de kilomètres. Sur le plan clinique, il faut noter que la majorité des formes de leishmaniose canine s'accompagnent d'une très riche infection du derme rendant les chiens particulièrement favorables à l'infection des phlébotomes [59].

### **2-3-2 Les canidés sauvages :**

A l'instar des chiens, les canidés sauvages sont des réservoirs de leishmaniose viscérale. Ils sont incriminés dans le maintien des foyers primaires (selvatiques) de cette protozoose, ce qui complique davantage la lutte anti-*Leishmania*. Les plus importants dans l'Ancien Monde sont : le renard, le chacal, le fennec et le loup [118,32, 85].

Une enquête menée au nord de l'Iran a révélé que 12,5% des chacals de la région sont infestés [64], alors qu'au Brésil des taux d'infestation de 4 à 12% ont été mis en évidence chez le renard *Lycalopex vetulus* [34].

### **2-3-3 Les rongeurs sauvages :**

La plus part des réservoirs des espèces de *Leishmania* à tropisme cutané sont des rongeurs. Ces animaux entrent dans un cycle primaire « rongeurs-phlébotome-rongeurs » permettant la pérennité du parasite dans les zones qu'ils peuplent. Lorsque les populations de rongeurs réservoirs sont affectées par des variations saisonnières, les cas d'infection humaine s'étendent et se multiplient prenant un aspect épidémique pendant la saison de pullulation des rongeurs [47].

Le rôle de ces petits mammifères comme réservoir de leishmaniose viscérale, quoiqu'infime, n'est pas à négliger. En effet, le rat noir *Rattus rattus* a été trouvé infecté par *L.infantum* en Espagne, et il est de même pour les gerbilles *Meriones* et *Psammomysen* en Afrique du Nord [12]. Comme il a été démontré que le rat rossard *Arvicanthis niloticus*, est réservoir de *L.archibaldi* en Afrique Orientale.

### 3 Le cycle biologique :

Le cycle des leishmanies est un cycle hétéroxène qui nécessite un passage par deux hôtes, un hôte invertébré (phlébotome) et un hôte vertébré (homme, chien,...). Au cours de son repas sanguin sur un sujet infesté, l'insecte aspire des phagocytes contenant des parasites sous la forme amastigote. Le repas sanguin est rapidement entouré par une membrane péritrophique produite par les cellules de l'intestin moyen. Selon Shortt [131], les formes amastigotes ingérées se divisent à l'intérieur même de la membrane péritrophique avant que celle-ci se déchire au bout de 3-4 jours. La transformation en forme amastigote ne peut se réaliser qu'après la destruction du facteur inhibiteur existant dans le sang de l'hôte vertébré. Ainsi ce n'est qu'après ce temps de latence que les formes promastigotes apparaissent [94].

Il sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes allongés et motiles grâce à leur flagelle, appelés Nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian pour le type suprapylaria, du pylore pour le type peripylaria, et de l'intestin postérieur pour le type hypopylaria [80].

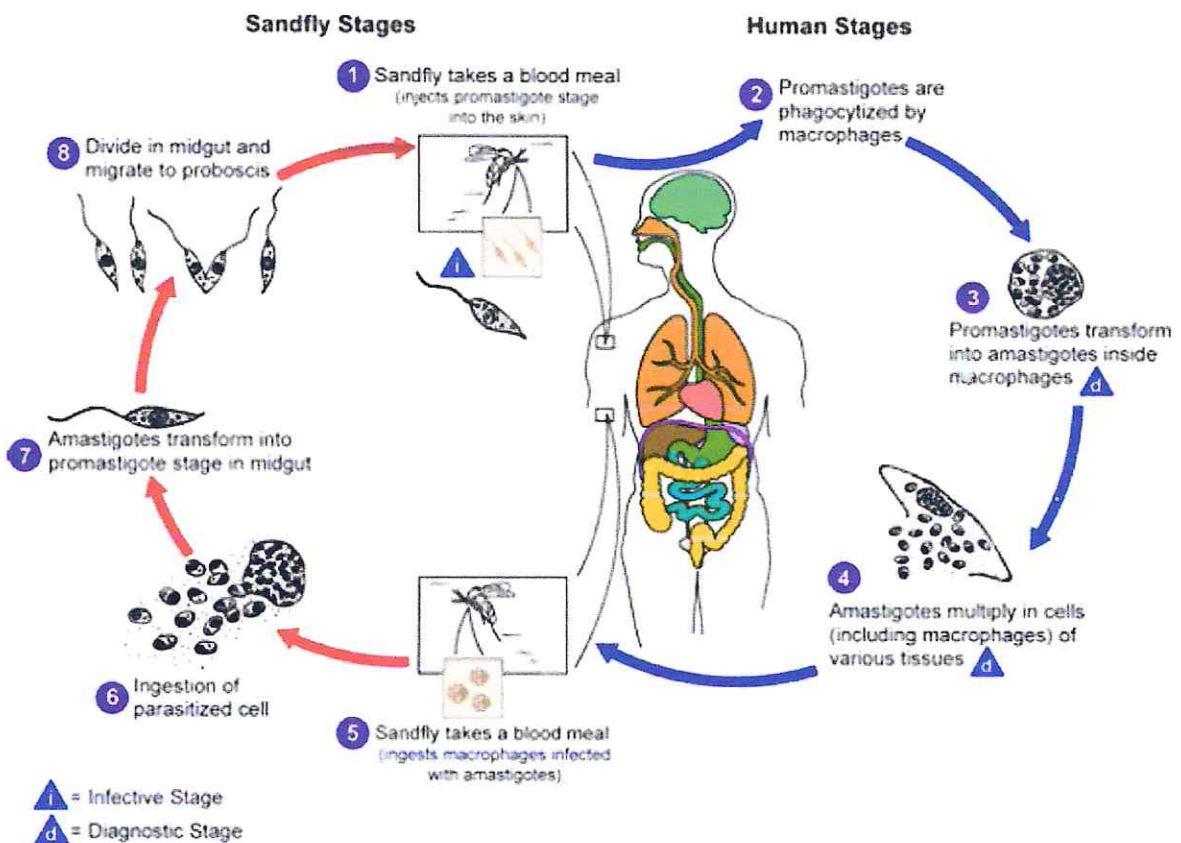


Figure.1.5 Cycle de la leishmaniose chez les mammifères. [143]

A partir du 7<sup>ème</sup> jour, les flagellés se libèrent et migrent vers la partie antérieure du tractus digestif, le proventricule, où ils se transforment en Haptomonades qui sont plus petits et plus arrondis. Ces parasites se fixent en insérant leurs flagelles entre les cellules en brosse et poursuivent leur multiplication. Les leishmanies se détachent de nouveau et se dirigent vers l'œsophage et le pharynx où ils prennent la forme métacyclique. A ce stade les parasites ne se divisent plus mais sont infectieux pour les mammifères [124].

La durée de l'évolution chez le vecteur est de 4 à 18 jours suivant l'espèce de *Leishmania*, au terme de laquelle les leptomonas parviennent à la lumière du labium où ils forment des rosettes caractéristiques du genre. De ce fait, le phlébotome peut inoculer le parasite à un animal ou à l'homme par contraction du labium ou suite à un phénomène de blocage proventriculaire entraînant une régurgitation du sang absorbé. Une fois dans la circulation de l'hôte vertébré, les promastigotes envahissent d'emblée des cellules du système phagocytes mononuclées, essentiellement des macrophages et des monocytes. A l'intérieur d'une vacuole parasitophore les leishmanies subissent une série de transformation aboutissant aux formes amastigotes. Elles deviennent ovoïdes ou sphériques, leur flagelle est réduit à une ébauche flagellaire. S'en suit une multiplication du parasite par fission binaire entraînant la lyse cellulaire et la dissémination, dans le sang ou la lymphe, des amastigotes qui seront phagocytés par de nouvelles cellules du système réticulo-endothélial.

#### **4 Relation hôte-parasite :**

##### **4-1 Pathogénie :**

L'action pathogène du protozoaire *Leishmania* dépend plutôt de la réponse de l'organisme à l'infection que du parasite lui-même. En effet, diverses études ont démontré que contrairement aux chiens réfractaires (dont l'infection ne provoque pas de symptômes), les chiens susceptibles produisent une catégorie d'anticorps qui aggravent l'évolution de l'infection plus qu'ils ne l'améliorent [69] :

- l'augmentation des titres en anticorps IgG1 est étroitement corrélée à l'exhibition des symptômes.

- les auto-anticorps (antinucléaires, antimuscles lisses), les facteurs rhumatoïdes présents donnent à l'affection l'aspect d'une maladie auto-immune [25, 52, 132].

- la formation et le dépôt de complexes immuns dans l'uvée, la synovie, la membrane basale des néphrons et des vaisseaux sanguins aboutissent respectivement à une uvéite, arthrite, glomérulonéphrite ou une vascularite [132, 90].

De plus les macrophages sollicités sécrètent une grande quantité de TNF (Tumor necrosis factor) qui augmente considérablement le catabolisme protéique d'où l'amaigrissement [18].

Les lésions déterminées par le parasite lui-même sont principalement des granulomes au niveau du foie suite à la colonisation des cellules de Küpffer, une polyadénomégalie et une splénomégalie dues à la prolifération des macrophages et monocytes après l'invasion du système des phagocytes mononucléés par les leishmanies. Enfin la dissémination du parasite dans la moelle osseuse provoque une pancytopenie : la thrombopénie aggrave les hémorragies engendrées par la formation d'ulcères [21, 18].

#### **4-2 immunité :**

La connaissance assez large de la leishmaniose sur le plan clinique est contrebalancée par une exploration réduite de la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection. Cette réponse immunitaire dont les diverses modalités expliquent le large spectre clinique et pronostique de la maladie.

Les réactions immunitaires de l'organisme déclenchées par les leishmanies et étudiées dans les modèles expérimentaux murins ne sont pas toujours transposées à l'homme et au chien. Cependant la résistance génétique démontrée chez des lignées sélectionnées de souris (C57BL/L.major) existe dans l'espèce canine, car l'exposition d'une large population de chiens au parasite dans des conditions identiques n'entraîne pas la même évolution sur l'ensemble de l'échantillon [138]. D'autres études ont attribué le développement de la maladie à une déficience de l'immunité à médiation cellulaire [38], et à une réponse humorale notable mais inefficace qui permet la dispersion du parasite à travers l'organisme et l'apparition de lésions inflammatoires généralisées [93]. Cette résistance génétique serait due à un gène, NRAMP1, qui code pour une protéine transporteuse intervenant dans le contrôle de la réplication intra-phagosomale des leishmanies et dans l'activation des macrophages. Les chiens sensibles auraient probablement une mutation de ce gène [9].



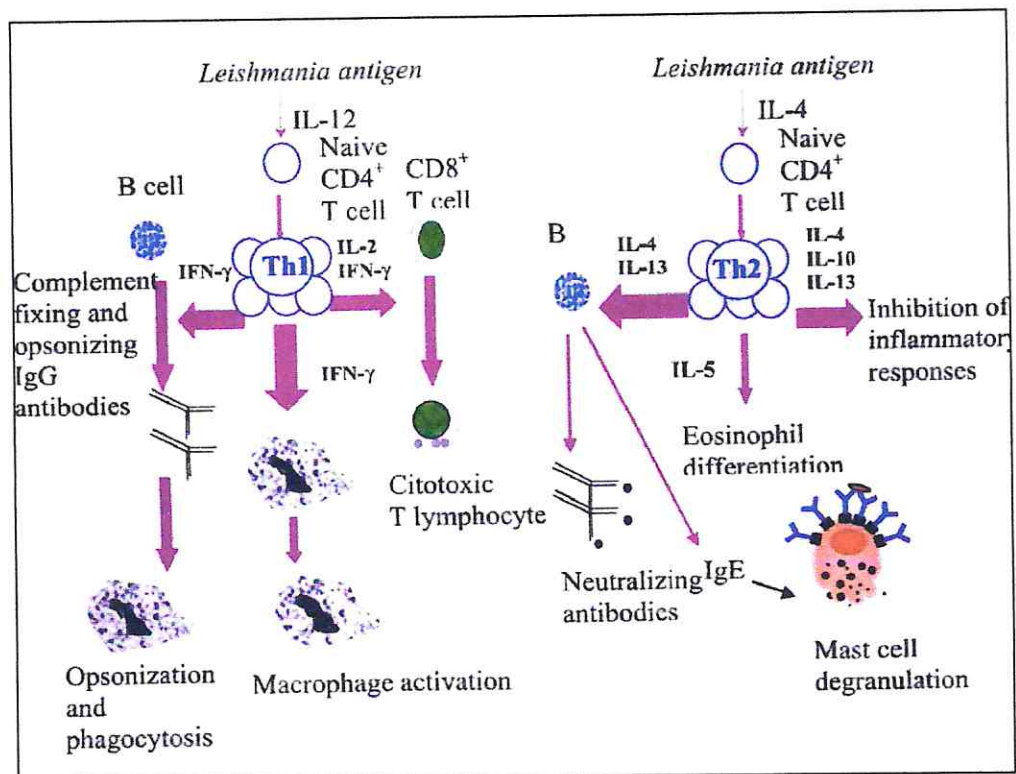


Figure.1.6 Orientation de la réponse immunitaire suite à l'infection par les leishmanies [1]

#### 4-2-1 réponse humorale :

L'immunité à médiation humorale ne confère pas une protection efficace à l'animal. La grande majorité des anticorps produits ne sont pas spécifiques des leishmanies. Ils appartiennent essentiellement à la classe des immunoglobulines G (IgG1, IgG2) [93]. L'IgG2 est retrouvée de façon prédominante chez des chiens asymptomatiques infectés par *L.infantum* et donc associée à une résistance au parasite, alors que l'IgG1 est associée au développement de la maladie [19, 40].

En outre, les parasites de certaines espèces de *Leishmania* sont capables d'esquiver l'action des anticorps par un phénomène de « capping ». Ce phénomène observé chez les promastigotes, comme chez les amastigotes, leur permet de regrouper rapidement leurs antigènes de surface après fixation d'anticorps. Les complexes antigène-anticorps peuvent migrer, dès lors, à un pôle de la cellule avant d'être éliminés [45].

Il est classique de distinguer deux formes évolutives : aiguë et chronique. Toutefois, il est fréquemment observé que les formes chroniques débutent par un épisode aigu et, chez les jeunes, les formes aiguës ne deviennent jamais chroniques, la mort en précédant l'apparition [27, 47].

Par ailleurs, le tableau clinique de la leishmaniose canine peut être brossé en envisageant quatre grands types symptomatiques : général, viscéral, cutanéomuqueux et autres symptômes.

Tableau.1.4 : **Tableau clinique de la leishmaniose canine [16, 105, 15]**

Général	Viscéral	Cutanéomuqueux		Autres symptômes
		cutané	muqueux	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abattement</li> <li>• pâleur des muqueuses</li> <li>• Fente musculaire</li> <li>• Hyperthermie intermittente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hépatomégalie</li> <li>• Splénomégalie</li> <li>• Polyadénopathie</li> <li>• Insuffisance rénale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alopecie</li> <li>• Squamosis (furfur)</li> <li>• Hyperkératose</li> <li>• Ulcérations</li> <li>• Nodules</li> <li>• Onychogryphose (ongles de Fakir)</li> <li>• Dermatitis pustuleuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ulcération de la cavité buccale</li> <li>• Ulcération de la muqueuse nasale (épistaxis)</li> <li>• Lésions oculaires :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- conjonctivite</li> <li>- kératite</li> <li>- uvéite</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hémorragies diverses</li> <li>• Troubles nerveux :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- de sensibilité</li> <li>- tremblement</li> <li>- parésie</li> </ul> </li> <li>• Diarrhée hémorragique</li> <li>• Polyarthrite</li> </ul>

Néanmoins, ce ne sont pas tous les signes cliniques qui sont observés sur le même chien leishmanien, à moins qu'il soit en phase terminale. L'amaigrissement et les lésions cutanées semblent assez constants. Entre 1990 et 1997, environ 600 chiens positifs au test sérologique IFI ont été examinés par les vétérinaires d'Alger, et les renseignements apportés ont contribué à la connaissance de la prévalence relative des différentes manifestations associées à la leishmaniose canine [65].

Tableau.1.5 : **Prévalence des principaux signes cliniques de la leishmaniose canine [65].**

Symptômes	Pourcentages
Amaigrissement	67
Lésions cutanées	52,1
Chute de poils	47,2
Onychogryphose	44
Adénopathie	43,6
Epistaxis	23
Lésions	10
Asymptomatiques	25



**Photo.1.6 Onychogryphose [125]**



**Photo.1.7 Dépilation autour des yeux (lunettes) avec conjonctivite [125]**

Finalement, une rémission spontanée des symptômes peut être observée sans qu'il y ait guérison totale, et l'animal reste, ainsi, toujours susceptible de rechute [3].

## **5 DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CANINE :**

### **5-1 Diagnostic épidémioclinique :**

En zone d'enzootie (où la présence de phlébotome est confirmée) ou devant un chien ayant vécu en zone d'enzootie, des signes cutanés tels : une alopecie, un squamosis ou une hyperkératose associés à une maigreur et un état d'asthénie sont des indices souvent évocateurs de la leishmaniose.

### **5-2 Diagnostic expérimental :**

#### **4-2-1 Observation directe du parasite :**

La mise en évidence du parasite doit être réalisée en première intention pour obtenir un diagnostic de certitude. Elle est effectuée à partir de divers types de prélèvements qui sont classées par Gradoni [60] selon leur sensibilité décroissante :

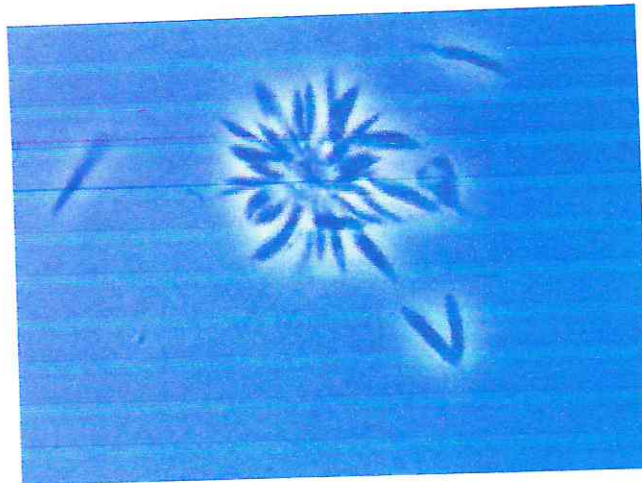
- Ponction de la moelle osseuse.
- Ponction de nœud lymphatique.
- Ponction d'un nodule dermique.
- Raclage conjonctival.
- Calque de lymphes dermiques à partir d'un copeau cutané.

Les frottis sont fixés à l'alcool et colorés au May-Grunwald-Giemsa. Les lames sont ensuite soigneusement lues au microscope à l'objectif 40 puis à l'objectif 100. Les parasites intramacrophagiques ou libres se présentent avec un noyau rouge pourpre, un kinétoplaste de couleur violette et un cytoplasme bleu pâle [83].

Si le parasite est présent en grande quantité, l'identification est facile. Mais parfois il n'y a que très peu de formes amastigotes dans le frotti : le diagnostic devient alors beaucoup plus difficile à établir [54]. Selon Gradoni [60], la sensibilité du test est plus importante en début d'évolution que dans les formes anciennes.

### **5-2-2 Mise en culture du parasite :**

Le milieu classique de Novy-Mc Neal-Nicolle (NNN), mélange de gélose et de sang frais de lapin, est le plus utilisé avec ses deux phases solide et liquide. Les tubes ensemencés, à partir d'une ponction de moelle ou de ganglion, sont incubés à 24°C pendant, au minimum, 14 jours puis des repiquages sont effectués tous les 7 jours. L'observation, sous le microscope, des promastigotes disposés en « rosettes » devient alors possible [49].



**Photo.1.8 Leishmanies disposées en rosettes : aspect caractéristique [125].**

Le bouillon Cœur-Cerveau-Sang CCS, le sérum de lapin coagulé, le sérum de veau fœtal et le milieu RPMI1640 sont aussi utilisés pour la culture des leishmanies [50, 11].

### 5-2-3 Tests sérologiques :

Bien que n'autorisant pas un diagnostic de certitude, la sérologie est d'un intérêt certain, ne serait-ce que pour justifier l'indication ou la répétition des explorations parasitologiques qui demeurent la référence. Certaines méthodes sérologiques ont d'excellentes sensibilité et spécificité mais aucune n'a une sensibilité de 100%. Or une sérologie négative n'exclut pas l'hypothèse d'une leishmaniose, et inversement, un chien possédant des anticorps dirigés contre *Leishmania* ne manifeste pas forcément des symptômes de leishmaniose [54, 55]. De plus, il n'y a pas de relation entre la sévérité des signes cliniques et le titre sérologique. Par conséquent, le dosage sérologique n'a aucune valeur pronostique et ne peut être utilisé pour contrôler les progrès et l'efficacité d'un traitement [116, 53]. Mais les résultats des travaux, initiés dans ce sens, restent toujours convergents sur l'existence de cette corrélation. En fin, des réactions croisées avec les plasmodiums, les mycobactéries, et les schistosomes ont été rapportées.

Tableau.1.6 : Tableau comparatif des tests sérologiques appliqués au diagnostic de LC [69]

Méthode	Principe	Substrat	Sensibilité	Résultat	Commentaire
Test immuno-chromatographique	Révélation d'Ac sériques sur membrane (Speed Leish®)	Sérum Plasma Sang	++	Coloration des deux bandes après éclaircissement du fond	-Substance tampon liée à l'échantillon -Faibles taux peu révélés -Auto-suggestion (barres)
Agglutination au latex	Billes de latex recouverts d'Ag semi-purifiés (Leishmate®)	Sérum Plasma	++	Agglutinats blancs visibles à l'œil nu	Détection précoce (Igm) -Phénomène de zones lors de taux faibles et de taux élevés -Lecture subjective
Elisa (enzyme linked immunosorbent assay)	Ag solubles fixés sur par absorption sur un support en polystyrène	Sérum	+++	Titre seuil : 0,80	-Méthode de choix -Faux positifs très rares par communautés antigéniques avec les mycobactéries et <i>Toxoplasma</i> à des titres très élevés
IFI (immuno-fluorescence indirecte)	Ag de paroi, forme leptomonas, anti-IgG canine marquée à la fluorescéine	Sérum	+++	Titre seuil : 1/50 ou 1/80 selon le laboratoire	-Méthode de référence -Lecture au microscope subjective -Faux négatifs de 5 à 19 %, soit par mauvaise conservation du sérum ou par immunodéficience
Western blotting test	Réaction immuno-enzymatique par migration électrophorétique	Sérum	+++	Révélation des substrats Ag en présence des Ac sériques	-Laboratoire spécialisé -Utilisé en cas de sérum canin douteux ou de sérum félin

NB : D'autres réactions moins spécifiques permettant de soutenir le diagnostic, peuvent être réalisées par le clinicien lui-même : la leucogélification et la séroflocculation.

#### **5-2-4 Biologie clinique :**

Des analyses hématologiques, biochimiques et urinaires permettent de rechercher d'éventuelles lésions hépatiques et rénales. Néanmoins, les résultats obtenus sont peu spécifiques car d'autres affections peuvent entraîner des résultats similaires [69].

#### **Bilan hématologique :**

On observe, généralement, lors d'une leishmaniose :

- L'augmentation de la vitesse de sédimentation avec l'apparition des premiers signes cliniques [33].

- Une anémie normochrome, normocytaires régénérative ou non, dont l'intensité augmente avec l'aggravation de la maladie (apparition d'hémorragies) [21]. L'anémie est un symptôme observé systématiquement alors que les perturbations de la formule blanche ne sont pas systématiques [21].

- Une leucocytose associée à une leishmaniose débutante ou stabilisée, ou bien une leucopénie liée à l'apparition des symptômes ou à l'ancienneté du processus pathologique.

- Une monocytose et une thrombopénie. [21]

#### **Bilan biochimique :**

Les examens biochimiques révèlent plusieurs modifications :

- augmentation des transaminases, de la bilirubine et du cholestérol total (LDL-cholestérol).

- diminution de la glycémie et du taux de phosphatases alcalines [17].

- Taux d'urée-créatinine légèrement supérieur à la normale [69].

- une hyperprotidémie constante et importante avec inversion du rapport albumine/ globulines consécutive à l'élévation des globulines et à la diminution de l'albumine, décelée chez 90% des chiens leishmaniens [120].

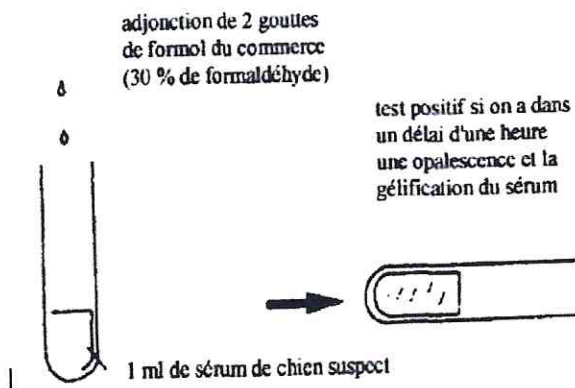


Figure.1.7 Formol-leucogélification [56].

Le test peut être mis en œuvre au chevet du malade selon la technique de Gater-Papacostas, mais il n'est pas spécifique et peut être positif lors de maladies infectieuses ou parasitaires. Par contre s'il existe des faux positifs, les faux négatifs sont très rares [18].

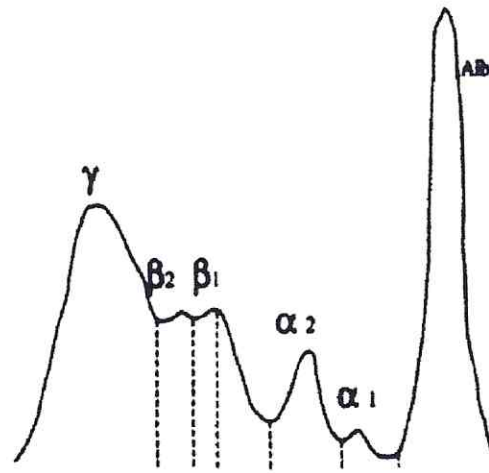


Figure.1.8 Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien [39].

La diminution de l'albumine est associée à une augmentation des globulines  $\beta$  et  $\gamma$  qui forment un bloc homogène. C'est durant la phase initiale de la maladie que les globulines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  enregistrent une élévation suivies, par la suite, des globulines  $\beta_3$  et  $\gamma$  [56]. Les globulines  $\alpha_2$  augmente également, signes d'une atteinte rénale ou d'un processus inflammatoire [21]. Par ailleurs, la surveillance des protéines sériques permet d'affiner le pronostic en se faisant une idée sur l'ancienneté de la maladie et semble la meilleure manière d'évaluer la réponse au traitement [21].

#### Bilan urinaire :

Une hématurie, une protéinurie, la présence de leucocytes, de cylindres ou de cellules épithéliales sont des signes fréquents lors d'une leishmaniose canine avancée ; ils témoignent des lésions rénales liées aux dépôts de complexes immuns. L'existence d'une insuffisance rénale contre-indique l'utilisation de certains antileishmaniens néphrotoxiques tels : Glucantime® et l'AmphotéricineB.

Tableau.1./: Altération des paramètres biologiques associée à la leishmaniose canine [105].

<b>Hyperglobulinémie</b>	70-100%
<b>Rapport albumine/globuline bas</b>	76%
<b>Hypoalbuminémie</b>	68-94%
<b>Les élevées</b>	63,3-91%
<b>Anémie</b>	21-94,2%
<b>Leucopénie</b>	22%
<b>Leucocytose</b>	8-24%
<b>Thrombopénie</b>	29,3-50%
<b>Urémie et hypercréatininémie</b>	38-45%
<b>Protéinurie</b>	29-91%
<b>Elévation des enzymes hépatiques</b>	16-61%

#### **5-2-5 Biologie moléculaire :**

La détection moléculaire des leishmanies vient compléter les approches parasitologiques et sérologiques classiques dans le cadre du diagnostic initial de la maladie. La « polymérase chain reaction » est la technique de choix, elle permet de détecter et éventuellement de quantifier un fragment spécifique d'ADN leishmanien, et autorise un suivi des animaux traités. Cette technique est plus sensible (97%) que les autres techniques, surtout en début d'évolution, et met en évidence d'infimes quantités d'ADN de *Leishmania* dans les prélèvements de moelle osseuse, de nœuds lymphatiques, de peau, et éventuellement de liquide céphalorachidien, de liquide synovial et de l'humeur aqueuse. Son pouvoir de détection est, par contre, moins bon dans le sang [114].



## **6 TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE**

Le traitement ne doit être mis en place qu'après avoir établi un diagnostic de certitude par la confrontation de l'anamnèse, de l'examen clinique et des examens complémentaires mis en œuvre (sérologie ou mise en évidence directe du parasite). Avant d'entreprendre le traitement, il s'avère important de réaliser des bilans hématologique et biochimique, notamment le dosage de l'urée et de la créatinine afin de détecter d'éventuelles insuffisances rénale ou/et hépatique qui nécessiterait d'adapter le protocole thérapeutique [69].

Le traitement de la leishmaniose est long et difficile, et les rechutes sont malheureusement fréquentes. La localisation intracellulaire et le métabolisme du parasite confèrent à celui-ci une certaine «résistance» vis à vis du système immunitaire et de la plupart des molécules utilisés en médecine vétérinaire.

### **6-1 Principes actifs :**

#### **•Dérivés de l'antimoine :**

- antimoniate de méglumine (Glucantime®): c'est la forme pentavalente de l'antimoine utilisée depuis longtemps pour le traitement de la leishmaniose. Son mécanisme d'action est mal connu. Il peut être injecté par voie intramusculaire, intraveineuse ou sous cutanée, cette dernière étant celle qui provoquerait les concentrations plasmatiques les plus durables. Les nombreuses études réalisées montrent que le maximum d'efficacité était observé avec le protocole suivant : administration quotidienne, par voie sous cutanée, de 100 mg/kg durant une période de 20 jours au minimum [22, 14]. Bien qu'il donne de bons résultats, le Glucantime ® comporte une certaine toxicité : il peut entraîner chez le chien des troubles digestifs, une torpeur, des douleurs musculaires et articulaires, ainsi qu'une néphrotoxicité parfois grave [109].
- stibogluconate de sodium (Pentostam®): administré par voie intramusculaire ou intraveineuse à raison de 20 mg/kg/jour (850 mg maximum) pendant 20 jours en moyenne.

• **Allopurinol (Zyloric®) :**

C'est une molécule utilisée chez l'homme dans le traitement de la goutte et possède cependant des propriétés leishmaniostatiques : il empêcherait le parasite de synthétiser un ARN normal, en prenant la place des bases azotées. L'allopurinol est administré par voie orale, à la dose de 15mg/kg, 2 fois par jour.

Le protocole idéal conseillé à tous les praticiens lors du congrès de la SNVSPA consiste à associer le Glucantime® et le Zyloric® pendant un mois, aux doses citées précédemment, puis l'administration de Zyloric® seul pendant 3 à 12 mois supplémentaires selon les auteurs. La cure est ensuite maintenue par administration de Zyloric® à la dose de 20 mg/kg/j, une semaine par mois. Cela permettrait de diminuer le risque de rechute sans pour autant stériliser l'animal sur le plan parasitaire [81, 22, 14].

• **Pentamidine (Lomidine®):**

Elle peut s'utiliser à la dose de 2, puis de 4 mg/kg toutes les 48 heures, par voie intramusculaire, pendant plusieurs mois. En plus de sa toxicité très élevée aussi bien localement (nécrose, abcès froid), que sur l'ensemble de l'organisme avec une atteinte rénale, cardiaque et pancréatique, aucune étude n'a prouvé une efficacité supérieure au Glucantime®, y compris en association avec lui [22].

• **Amphotéricine B :**

Cet antibiotique s'attaquerait aux stérols de la membrane plasmique du parasite de la même manière qu'il le fait avec les champignons [42].

Elle possède également des propriétés immunostimulantes. L'Amphotéricine B est administré par voie intraveineuse stricte à la dose de 0,5 à 0,8 mg/kg, 2 à 3 fois par semaine jusqu'à une dose totale de 15 mg/kg. Elle est très efficace (97% de guérison) et aucune résistance n'a encore été rapportée [136]. Elle est par contre plus coûteuse que les traitements à l'antimoine et les effets secondaires sont importants. Pour diminuer cette toxicité, certaines formulations lipidiques d'Amphotéricine B ont été élaborées, soit les liposomes, dispersions colloïdales ou complexes lipidiques. Les liposomes sont les plus efficaces et les moins toxiques mais les coûts extrêmement élevés de l'ensemble de ces produits ne permettent pas leur usage dans les pays en voie de développement [62].

•**Les quinolones :**

Elles inhibent l'action d'une enzyme : ADN gyrase, conduisant ainsi au blocage de la réplication et de la transcription de l'ADN. Elles ont donc des propriétés bactéricides et également leishmanicides. L'enrofloxacin (Baytril®), à la dose de 10mg/kg/jour a montré une certaine efficacité notamment sur les symptômes généraux mais semble avoir moins d'effets sur les ulcères cutanés. Vu leur faible toxicité, les quinolones méritent d'être étudiés afin de définir un protocole d'utilisation de ces antibiotiques dans le traitement de la leishmaniose canine [22, 14].

•**Association spiramycine et métronidazole :**

Le protocole recommandé associe le métronidazole à raison de 25mg/kg/jour, et la spiramycine à raison de 150000UI/kg/jour, per os durant 30 jours. L'efficacité de ce traitement a été prouvée notamment lorsqu'il est utilisé simultanément au Glucantime® [24, 31].

Plusieurs autres composés sont testés et donnent parfois des résultats encourageants notamment dans le traitement de la leishmaniose chez l'homme, entre autres : Sitamaquine, [130], la paromomycine [137], la miltefosine [133, 57], kétoconazole, itraconazole, fluconazole [81].

Un traitement symptomatique s'avère parfois nécessaire pour minimiser l'impact des complexes immuns circulants sur la membrane des glomérules et l'uvée. Or, les corticoïdes sont les molécules les plus recommandées. (prednisolone à 1mg/kg/jour, per os pendant 5 à 6 jours) [22].

## **6-2 Problèmes liés au traitement :**

Malgré les nombreux outils thérapeutiques utilisés, le traitement de la leishmaniose canine est souvent confronté à plusieurs problèmes. Il permet une guérison clinique temporaire sans pour autant débarrasser l'animal de ses parasites. Le chien reste ainsi porteur et est donc exposé aux rechutes [22]. De plus, la toxicité importante de certaines molécules limite le choix thérapeutique chez les chiens leishmaniens : l'antimoniote de méglumine, l'amphotéricine B et la pentamidine sont néphrotoxiques et doivent être évités en cas d'insuffisance rénale.

Mais le problème majeur des médicaments reste l'émergence grandissante de souches de parasites résistants chez le chien, mais aussi chez l'homme. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté des échecs de traitement au Glucantime® dans plusieurs régions du monde. Sundar [134] affirme que jusqu'à 70% des patients infectés en Inde ne répondent présentement pas au traitement, alors que Gramiccia [61] a démontré que la sensibilité des parasites à l'antimoniote de méglumine s'est révélée beaucoup plus faible après une période de traitement des chiens à la même molécule.

## **6-3 Le suivi :**

Un suivi clinique rigoureux permet de déceler tout signe évocateur d'une rechute ou d'effets secondaires à la thérapeutique. Un contrôle biologique des paramètres rénaux, de l'hématopoïèse et de l'équilibre albumine/globuline (par électrophorèse) devra permettre à son tour une surveillance de l'évolution de la maladie. Ainsi, une augmentation de l'albumine et une baisse des gammaglobulines avec effacement du bloc bêta-gamma traduit le retour à la normale de la courbe des protéines. La sérologie, en association avec l'électrophorèse des protéines, peut contribuer à déceler une récurrence. Mais elle ne doit pas être réalisée immédiatement après la fin de la cure car le titre des anticorps ne diminue quasiment pas le premier mois, puis baisse de moitié en 6 mois et continue de baisser longtemps après la guérison clinique pour devenir très faible au bout de 18 mois. Il convient, alors, d'attendre au moins 6 semaines. Toute augmentation du taux de positivité de deux dilutions, même en l'absence de symptomatologie évocatrice, signifie une rechute et exige un renouvellement du traitement [14].

## **7 MESURES DE LUTTE CONTRE LA LEISHMANIOSE**

### **7-1 lutte antivectorielle :**

La lutte contre le phlébotome doit faire essentiellement appel à des stratégies bien coordonnées et à des objectifs bien étudiés. C'est ainsi que les campagnes de pulvérisation d'insecticides doivent se faire selon des plannings qui prennent en considération les résultats des enquêtes épidémiologiques et entomologiques, qui permettent, notamment, d'apprécier la dynamique saisonnière du vecteur

Par ailleurs, les phénomènes de résistance aux insecticides nécessitent une optimisation des moyens de lutte et le développement de nouveaux utiles de contrôle du vecteur en veillant au respect de l'environnement [63, 67].

### **7-2 Protection individuelle contre les piqures de phlébotomes :**

L'utilisation de moustiquaires à mailles fines de préférence imprégnées de pyréméthrine de synthèse permet de réduire considérablement la densité des phlébotomes à l'intérieur des habitations.

Pour la protection des chiens, on peut utiliser un collier à base de déltaméthrine (Scalibor ®) ou un spray à base de perméthrine (Douwin ®) [79].

Récemment, un insecticide à base de perméthrine et d'imidaclopride (advantix®) a été commercialisé sous forme de spot-on. Il aurait un effet anti-engorgement pendant les semaines suivant son administration [109].

### **7-3 Dépistage et surveillance systématiques des chiens :**

En zone d'endémie, la détection active des cas de leishmaniose canine s'avère nécessaire pour contrôler la maladie. Ce dépistage peut être associé aux campagnes de vaccination contre la rage. On recherche pour chaque animal les signes cliniques de la leishmaniose avant de prélever du sang pour le diagnostic sérologiques des échantillons pour les examens parasitologiques. Les chiens à parasitologie positive doivent être éliminés et ceux à sérologie positive doivent être surveillés.

En zones indemnes, les chiens seront contrôlés dès leur retour d'un séjour en zone endémique [142].

#### **7-4 Campagnes de sensibilisation :**

La première priorité est d'entraîner les professionnels de santé à effectuer efficacement les fonctions requises à chaque niveau de la lutte contre la maladie (agents des soins de santé primaires, médecins, laborantins, vétérinaires, etc.).

On peut informer, motiver les communautés et expliquer les avantages de la lutte contre la LV humaine et canine par l'intermédiaire des écoles ou d'autres organisations.

Le soutien du secteur clinique et les interventions précoces doivent accompagner toute action dans le domaine de l'éducation sanitaire.

L'éducation sanitaire doit exploiter tous les moyens de communication disponibles (posters, prospectus, radio, télévision, vidéos, diapositives) [142, 67].

#### **7-5. Vaccination des chiens :**

La meilleure méthode prophylactique serait la vaccination des chiens, mais aucun vaccin n'est aujourd'hui utilisable.

Plusieurs types de vaccins ont été envisagés : des vaccins de 1<sup>ère</sup> génération correspondant au parasite (promastigote) tué et inactivé, des vaccins de 2<sup>ème</sup> génération correspondant à un antigène parasitaire associé à un adjuvant, ou des vaccins à partir d'ADN (vaccin génétique) [75].

Dernièrement, des essais d'immunothérapie ont été menés par Hugnet, Lemesre, Papierok et Bourdoiseau sur 4 chiens atteints de leishmaniose dont 2 en situation récidive. Les résultats montrent une réponse clinique franche puisque une amélioration est notée chez les 4 chiens dès le 15<sup>ème</sup> jour après la première injection. On assiste à l'absence de leishmanies sur les ponctions de moelle osseuse 2 mois après la 2<sup>ème</sup> injection et une guérison sans rechute des 4 chiens 2 ans après l'initiation du protocole [87, 70].

## **ETUDE EXPERIMENTALE.**

# **LA LEISHMANIOSE CANINE EN ALGERIE : CONTRIBUTION A L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DU FOYER DE LA GRANDE KABYLIE**

### **1 Aperçu sur la zone d'étude :**

Sept communes rurales de la contrée Sud-est de la wilaya de Tizi Ouzou ont été concernées par notre étude : Illoula ou Malou, Idjeur, Beni Zeki, Bouzguene, Imsouhal, Ifigha et Azazga. Cette région, à climat sub-humide, est située entre 36°55' et 36°74' Nord, 4°36' et 4°53' Est. Elle est limitée au nord par le mont d'Akfadou et la Forêt de Yakourène, au Sud et à L'Est par le versant Est de la chaîne de Djurdjura. Elle est sillonnée de nombreux cours d'eau qui coulent vers l'Oued Sebaou. La végétation est composée essentiellement d'oliviers, de chêne et de broussailles à genêt épineux.

Cette zone montagneuse compte environ 140000 habitants, résidant dans des villages qui s'échelonnent entre 180 et 1080m d'altitude.

### **2 matériels et méthodes:**

#### **2-1 Population étudiée :**

Notre étude a porté sur 114 canidés, 109 chiens domestiques (*Canis familiaris*) et 5 chacals (*Canis aureus*), vivant dans la zone précédemment décrite. Les prélèvements ont été effectués au sein des habitations, dans le cadre d'une enquête sérologique, menée durant la période s'étalant du mois de Mars 2007 au mois de Janvier 2008. Les chiens ont été prélevés sans distinction de race, d'âge, de sexe ou d'état clinique. Dans certains villages, le taux de chiens prélevés avoisinait les 100%.

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements, sur laquelle figurent le signalement du chien, son adresse, d'éventuels signes cliniques observés lors du prélèvement et le type de prélèvement.

Les chacals ont été capturés au niveau de la région d'Illoula ou Malou. Trois d'entre eux ont été retrouvés en état de dégradation avancée et n'ont pu être prélevés. Les deux autres, capturés vivants, ont été euthanasiés au thiopental. Aucun signe clinique évocateur de la leishmaniose n'a été observé sur ces deux sujets âgés de 9 mois et de 3 ans.

### **2-2-5-2 Protocole:**

#### **a) L'extraction d'ADN :**

L'extraction d'ADN a été pratiquée sur du tissu splénique du chacal n° 2, selon la technique de Helen Pearson et David Stirling [108]. Dans un tube conique, une quantité de 0,5 g de tissu est traitée avec 0,5 ml de tampon de digestion d'ADN contenant 0,25 mg de la protéinase K. le mélange est ensuite incubé à 50°C pendant une nuit. Au retrait, le tube est additionné de 0,7 ml de phénol/chloroforme/isoamyl alcool, puis placé dans un agitateur durant une heure. Après centrifugation à 12000 g pendant 5 minutes, le surnageant est transféré dans un autre tube. Il est de nouveau mélangé avec 0,7 ml de phénol/chloroforme/isoamyl alcool, agité pendant une heure, centrifugé à 12000g pendant 5 minutes. L'opération est, ainsi, répétée jusqu'à la disparition de l'interphase. Le surnageant est alors dispersé dans 1 ml d'éthanol à 100%. Le tube est agité délicatement jusqu'à l'apparition de précipitât d'ADN (méduse), puis centrifugé à 12000g pendant 5 minutes. La phase supérieure est écartée, et le tube est maintenu renversé sur un papier durant 15 minutes à température ambiante afin de sécher l'ADN obtenu. L'extrait est enfin resuspendu dans 100 µl du tampon TE est incubé à 65°C pendant 15 minutes pour dissoudre l'ADN.

#### **Remarque :**

Tampon de digestion d'ADN : 50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, pH 8.0.

Tampon TE : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.



## b) Préparation de la PCR:

La préparation du mélange réactionnel doit s'effectuer de la manière la plus stérile pour éviter toute contamination par l'ADN du milieu environnant. Nous l'avons donc réalisée dans une hotte à UV. Ce mélange réactionnel est préparé sur un seul tube puis réparti sur une batterie de X microtubes. Chaque microtube reçoit 24 µl de mélange à lequel on rajoute 1 µl de l'extrait d'ADN à analyser.

Ainsi, pour obtenir 24 µl de solution de réaction il faut prévoir :

- 14,25 µl d'eau distillée stérile.
- 2,5 µl de mixtion de nucléotides contenant 200 µM de chacun de dATP, dTTP, dCTP et de dGTP
- 1 µl d'amorce 1. (1 µM)
- 1 µl d'amorce 2. (1 µM)
- 2,5 µl de tampon d'incubation (10 µM Tris HCl + 50 µM KCl. Eurobio).
- 0,25 µl de Taq Polymérase (1,25 U).

L'échantillon d'ADN est substitué par 1 µl d'eau stérile pour le contrôle négatif, et par 1 µl d'extrait d'ADN de suspension de culture de leishmanies pour le contrôle positif.

La séquence d'ADN cible est le gène codant pour l'ARN ribosomal 18 S, et les amorces utilisées sont :

- R221 : 5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3''
- R332 : 5' GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3''

Les préparations vortexées quelques secondes, sont incubées dans un thermocycleur [Techne, Genius] Les conditions de températures obéissent au profil suivant :

Début : 94°C pendant 4 minutes

40 cycles { 94°C pendant 30 secondes  
54°C pendant 30 secondes  
72°C pendant 90 second

Fin : 72°C pendant 10 minutes

c) Préparation du support de migration :

Le support de migration que nous avons utilisé est un gel d'agarose à 1,5% . Nous l'avons préparé en dissolvant 7,5 g de poudre d'agarose dans 50 ml de TAE (Trice Acide acétique EDTA). La dissolution de la poudre nécessite souvent un chauffage de quelques minutes dans un micro-onde. 3,5 µl de bromure d'ethidium sont ensuite ajoutés à la suspension, avant de la transvaser dans une cuve à électrophorèse. Un peigne à dent plates est introduit verticalement dans la cuve et laissé sur place jusqu'à la gélification de la solution. Le peigne est ainsi retiré laissant apparaître des puits dans le gel.

Sur une feuille en aluminium, on mélange chaque produit de la PCR avec une goutte de Bleu de Bromophénol, et on introduit le produit délicatement dans un puits. La cuve contenant le gel est émergée dans un tampon (TAE), et soumise à un courant électrique de 150 V. Le temps de migration est de 60 minutes.

## **2-2-6 Identification des parasites par électrophorèse des isoenzymes :**

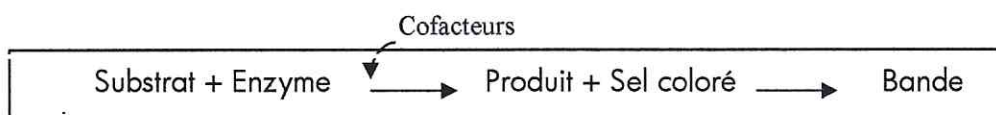
### **2-2-6-1 Principe et historique :**

La caractérisation isoenzymatique des leishmanies repose sur la faculté des protéines constituant les systèmes enzymatiques du cycle énergétique du parasite à migrer sur un support inerte, solide, et poreux soumis à un courant électrique constant et uniforme. La migration peut être réalisée sur 4 types de support :

- ✓ Acétate de cellulose.
- ✓ Gel d'agarose.
- ✓ Gel d'amidon.
- ✓ Gel de polyacrylamide.

Le pH du tampon utilisé pour la préparation du gel, doit être ajusté à ce que la charge électrique globale de chaque enzyme soit négative. Ainsi, toutes les enzymes vont migrer dans le même sens (vers l'anode), et la distance parcourue par chacune d'entre elles est fonction de son poids moléculaire et de son degré de négativité.

Au terme de l'opération, chaque protéine est visualisée grâce à une solution de révélation adéquate, constituée d'un substrat spécifique de l'enzyme à analyser, de cofacteurs nécessaires à la génération de la réaction et d'un sel coloré réagissant avec le produit de la réaction [51].



Les bandes colorées obtenues, appelées électromorphes, sont spécifiques et stables; elles permettent d'identifier l'espèce et la souche du parasite étudié. L'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique forment un zymodème.

À chaque zymodème est affectée une souche marqueur désignée par 4 initiales :

- La classe animale à laquelle appartient l'hôte à partir duquel la souche a été isolée. M : mammifère, I : insecte ; ainsi que le nom du genre pour un mammifère, et le nom de l'espèce pour un phlébotome. Can : canidés, Lon : longicuspis.
- Le nom du pays où l'hôte a été retrouvé infecté.
- L'année d'isolement indiquée par les 2 derniers chiffres.
- Le code du laboratoire ayant identifié la souche.

Exemple : M̄HŪM̄/DZ/82/LIPÁ59 ( zymodème MŪN24).

L'application de l'électrophorèse des isoenzymes à la taxonomie de *Leishmania* a été initiée par Gardener et Howells en 1972 [58], en utilisant la migration de la MDH en gel de polyacrylamide. En 1973, Ebert [46] montre par électrophorèse des Estérases et des Phosphatases, acides et alcalines, l'existence de plusieurs types biochimiques chez *L. donovani*. Par la suite, des variations électrophorétiques des ALAT et ASAT, en gel d'amidon, ont permis à Kilgour [78] de distinguer quatre variants au sein du complexe *L. mexicana*.

En 1978, l'étude de trois systèmes enzymatiques en gel de polyacrylamide, G6-PD, MDH et PGM, a permis à Chance [29] et Brazil [26] de constater des ressemblances entre des souches provenant de foyers situés dans des régions géographiques différentes. Depuis, l'analyse isoenzymatique des leishmanies est devenue la méthode la plus courante pour l'identification des souches. Elle est reconnue par l'OMS.

### **2-2-6-2 Extraction des enzymes solubles :**

L'extraction d'une quantité suffisante de protéines, nécessaire à l'électrophorèse, requiert une masse importante de promastigotes.

Les leishmanies isolées sur milieu NNN sont repiquées en flacons de 25 ml contenant 5 ml de milieu de culture CCS (cœur, cerveau, sang). Les flacons sont, ensuite, incubés à 24°C pendant 4 à 6 jours. La phase liquide, contenant les parasites, est transférée dans des flacons de 250 ml contenant 25 ml de milieu de culture CCS. Après une incubation de 4 à 6 jours à 24°C, on ajoute à chaque flacon 5ml d'eau physiologique, et on verse le contenu liquide de 4 flacons dans une boîte de Roux, contenant 120 ml de milieu de culture CCS.

A la phase exponentielle de croissance (7 à 10 jours), le surnageant est recueilli puis filtré sur une gaze pour éliminer les débris de gélose. Le filtrat est suspendu dans 20ml d'eau physiologique à 9 ‰, puis centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes. Le culot, contenant les parasites, est souvent riche en hématies. Elles sont lysées par suspension dans une solution d'eau physiologique à 3 ‰, suivie d'une centrifugation à 2500 g durant 10 minutes. Les promastigotes sont enfin lavés dans une solution saline à 9 ‰.

Le culot final est récupéré dans un Eppendorf, et émergé dans de l'azote liquide pour provoquer la lyse des cellules et la libération des enzymes. Le lysat cellulaire est, par la suite, centrifugé à 12000 g pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu est réparti, à l'aide d'une pipette, en perles de 50 µl qui sont conservées dans de l'azote liquide.

**Remarque :** toutes les centrifugations sont menées à 4°C.

### **2-2-6-3 Électrophorèse en gel épais d'amidon :**

Le typage isoenzymatique des souches isolées est basé sur l'électrophorèse, en gel épais d'amidon, des extraits protéiques obtenus, selon la technique préconisée par Rioux et al (1990) [117].

#### **a) systèmes enzymatiques étudiés :**

Les quinze systèmes enzymatiques utilisés sont les suivants : malate déshydrogénase, MDH, EC 1.1.1.37 ; enzyme malique, ME, EC 1.1.1.40 ; isocitrate déshydrogénase, ICD, EC 1.1.1.42 ; 6-phosphogluconate déshydrogénase, PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PD, EC 1.1.1.49 ; glutamate déshydrogénase, GLUD, EC 1.4.1.3 ; NADH diaphorase, DIA, EC 1.6.2.2 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 1, EC 2.4.2.1 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 2, EC 2.4.2.\* ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 1, EC 2.6.1.1 ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 2, EC 2.6.1.1 ; phosphoglucomutase, PGM, EC 5.4.2.2 ; fumarate hydratase, FH, EC 4.2.1.2 ; mannose phosphate isomérase, MPI, EC 5.3.1.8 ; glucose phosphate isomérase, GPI, EC 5.3.1.9

#### **b) Solutions tampons :**

L'étude des quinze systèmes enzymatique a nécessité la préparation de 4 solutions salines appropriées. Chacune d'entre elles sert de solution mère d'un tampon destiné à la préparation d'un gel, et d'un tampon d'électrode (tampon pont) pour le même gel. Certaines enzymes ont été étudiées au sein d'un même gel.

Tableau.2.1 : **Solutions tampons utilisées pour le typage enzymatique**

Solution tampon	Enzymes à révéler
TME, pH 7,4, NADP	G6PD, PGD, GPI, PGM
TM, pH 7,4	FH, GOT2, GOT1
TC, pH 8,6, NADP	NP1, MPI, GLUD, DIA, ICD, NP2
TCE, pH 9,5	MDH, ME

Les solutions tampons préparées au niveau du laboratoire peuvent être conservées pendant un mois à température ambiante. Au moment de l'emploi, on vérifie le pH et on effectue les dilutions.

1) Tris-Citrate 8,6 NADP :

Tampon pont :

- Tris (0,661L).....400g
- Acide citrique (0,083M).....87g
- Eau distillée..... 5l

Tampon gel :

- Tampon pont TC 8,6.....18,7ml
- NADP 1%.....4ml
- Compléter à 400 ml avec de l'eau distillée.

2) Tris-Maléate EDTA 7,4 NADP :

Tampon pont :

- Tris (0,1M).....60,5g
- Acide maléique (0,1M).....58g
- .EDTA (0,01M)..... 16,8g
- MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (0,01M).....10g
- Eau distillée.....5l

Tampon gel :

- Tampon pont TME 7,4.....40ml
- NADP 1%.....5ml
- Compléter à 400ml avec de l'eau distillée.

3) Tris-Citrate EDTA 9,5 :

Tampon pont :

- Tris .....48,45g
- Acide citrique .....20g
- EDTA.....7,32g
- Eau distillée..... 2l

Tampon gel :

- tampon TCE 9,5..... 80ml
- Compléter à 400ml avec de l'eau distillée.

4) Tris-Maléate 7,4 :

Tampon pont :

-Tris	60,5g
-Acide maléique .....	58g
-MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O .....	10g
-Eau distillée.....	5l

Tampon gel :

-Tampon TM 7,4.....	40ml
---------------------	------

- Porter le volume à 400ml avec de l'eau distillée.

c) Préparation du support de migration :

L'électrophorèse est réalisée sur gel épais d'amidon préparé de la manière suivante :

- ✓ Incuber 45g d'amidon dans l'étuve à 37°C pendant quelques heures, afin de le déshydrater.
- ✓ Mélanger, dans un Erlenmeyer, l'amidon avec 400ml de tampon adéquat, contenant les additifs et dont le pH est vérifié.
- ✓ Chauffer, au dessus d'un bec bunsen, tout en agitant le récipient jusqu'à ce que la suspension devienne visqueuse.
- ✓ Agiter très fortement pendant une minute puis arrêter le chauffage.
- ✓ Dégazer à l'aide d'une trompe à vide jusqu'à la disparition des bulles d'air qui envahissaient le gel.
- ✓ Verser le gel dans un moule en verre de 30×25×1 cm, en évitant la formation de bulles d'air.
- ✓ Couvrir avec une plaque de verre ou un film en plastique, et laisser polymériser durant au minimum 6 heures.

d) Migration électrophorétique :

❖ Une fois le gel revêtu une parfaite texture, il est placé dans un réfrigérateur (4°C) pendant une demi-heure, afin que l'intégralité des enzymes soit conservée durant les manipulations à suivre.

❖ Les perles d'extraits protéiques sont décongelées, à température de réfrigération, dans des Eppendorfs sur lesquels sont inscrits les codes des souches à analyser.

❖ À l'aide d'un peigne à dents plates, espacées de 5mm, et humectées d'une solution de bleu de Bromophénol ; on creuse, dans le gel, des puits disposés sur une ligne verticale à l'axe de migration.

❖ Des rectangles calibrés de papier Whatman n° 3 sont imbibés d'extrait protéique, puis introduits délicatement dans les puits avec une pince.

❖ Une fiche individuelle d'électrophorèse, sur laquelle est indiqué l'ordre de dépôt des extraits protéiques, est indispensable pour l'interprétation des résultats.

❖ La cuve contenant le gel est placée entre deux bacs. Chacun d'entre eux contient environ 500ml du tampon adéquat dans lequel baigne un électrode. La jonction entre « solution anodique-gel-solution cathodique » est assurée par deux pièces plates d'éponge synthétique (Chamex), qui forment des ponts recouvrant le gel, sur 2×20cm de sa surface, des deux cotés : anodique et cathodique.

❖ Le gel est recouvert d'abord d'un film en plastique, puis d'une plaque en verre sur laquelle deux lignes parallèles distantes de 7 cm sont tracées. La première ligne correspond à celle des puits, alors que la deuxième limite le front de migration.

❖ L'ensemble du système est placé sous une seconde lame de verre, sur laquelle sont déposées des pochettes de glaces. Ce procédé de réfrigération simple, maintient la température dans le gel entre 4 et 10°C, évitant ainsi la perte d'élasticité du gel et la dénaturation des enzymes.

❖ La migration est interrompue une fois le front de du bleu de Bromophénoï franchit la ligne tracée sur la plaque de verre. Ceci nécessite une durée moyenne d'environ 6 heures.

#### d) Révélation des électromorphes :

Une fois la migration terminée, le gel est débarrassé du bord anodique au niveau du front de migration du bleu de Bromophénoï, et du bord cathodique à 2 cm en avant de la ligne des puits.

Le gel, ainsi taillé, est coupé en épaisseur à trois reprises à l'aide d'un couteau à gel, ce qui nous permet d'obtenir quatre feuilles de 2 mm d'épaisseur. Sur chacune d'entre elles, nous étudions une isoenzyme.

Les tranches minces sont, ensuite, transférées dans des bacs de coloration et sont immédiatement traitées par la solution de révélation convenable. Chaque bac est muni d'une étiquette sur laquelle est inscrit le nom du système enzymatique à étudier.

La température et la durée d'incubation dépendent de l'enzyme à révéler. Cependant, toutes les réactions de coloration doivent être réalisées à l'abri de la lumière.

**Remarque:** Les procédés de préparation des solutions de révélation spécifiques des isoenzymes étudiées se trouvent détaillés dans l'annexe X



Tableau.2.2 : **Conditions de révélation enzymatique**

Enzyme	Températures de révélation	Durée de révélation
MDH	37°C	Une heure
ME	Température ambiante	Une heure
G6PD	37°C	30minutes
GOT1,GOT2	Température ambiante	30mn avec chaque solution
NP1, NP2	37°C	30minutes
FH	37°C	Une heure
DIA	Température ambiante	Une heure
MPI	37°C	30minutes
PGD	37°C	Une heure
GPI	04°C	Une heure
PGM	37°C	Une heure
ICD	37°C	Une heure
GLUD	37°C	Une heure

Les réactions de coloration sont arrêtées une fois des bandes colorées visibles sont apparues sur les gels. L'aspersion d'une solution de fixation à base d'alcool, d'acide acétique et de glycérol limite la diffusion des enzymes et préserve la forme des électrophorogrammes. Les gels, ainsi fixés, peuvent être conservés plusieurs jours à 4°C.

### **3 Résultats :**

#### **3-1 Chiens :**

##### **3-1-1 Enquête séro-épidémiologique :**

Sur les 109 sérums de chiens testés avec l'immunofluorescence indirecte, 10 ont montré un taux d'anticorps égal ou supérieur à 1/80, ce qui donne une prévalence de la leishmaniose canine, dans la contrée Sud-est de la wilaya de Tizi Ouzou, de 9,17%.

Les résultats obtenus pour chaque commune sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Tableau.2.3 : **Résultats de l'enquête sérologique sur la Lcan.**

Localités (communes)	Nbr de chiens prélevés	Nbr de chiens positifs	Pourcentage %
Illoula ou Malou	39	01	02,5
Imsouhal	01	00	00
Bouzguene	12	02	16,6
Ait Ziki	06	02	33,3
Idjeur	23	02	08,6
Ifigha	13	01	07,6
Azazga	15	02	13,3
Total	109	10	09,1

**Nbr:** nombre.

Notre échantillon est constitué de 88 chiens de la race commune, et 21 de races pures : 4 épagneuls, 4 bergers belges, 3 pointer, 3 bergers allemands, 2 braques, 2 bleus de Gascogne, un doberman, un basset et un griffon. 2 chiens du lot positif sont un berger belge et un berger allemand, les 8 autres appartiennent à la race commune.

Tableau.2.4 : Répartition des résultats en fonction de la race.

	Nbr de sérums testés	Nbr de sérums positifs	pourcentage
Races pures	21	02	09,5
Race commune	88	08	09

Nbr : nombre.

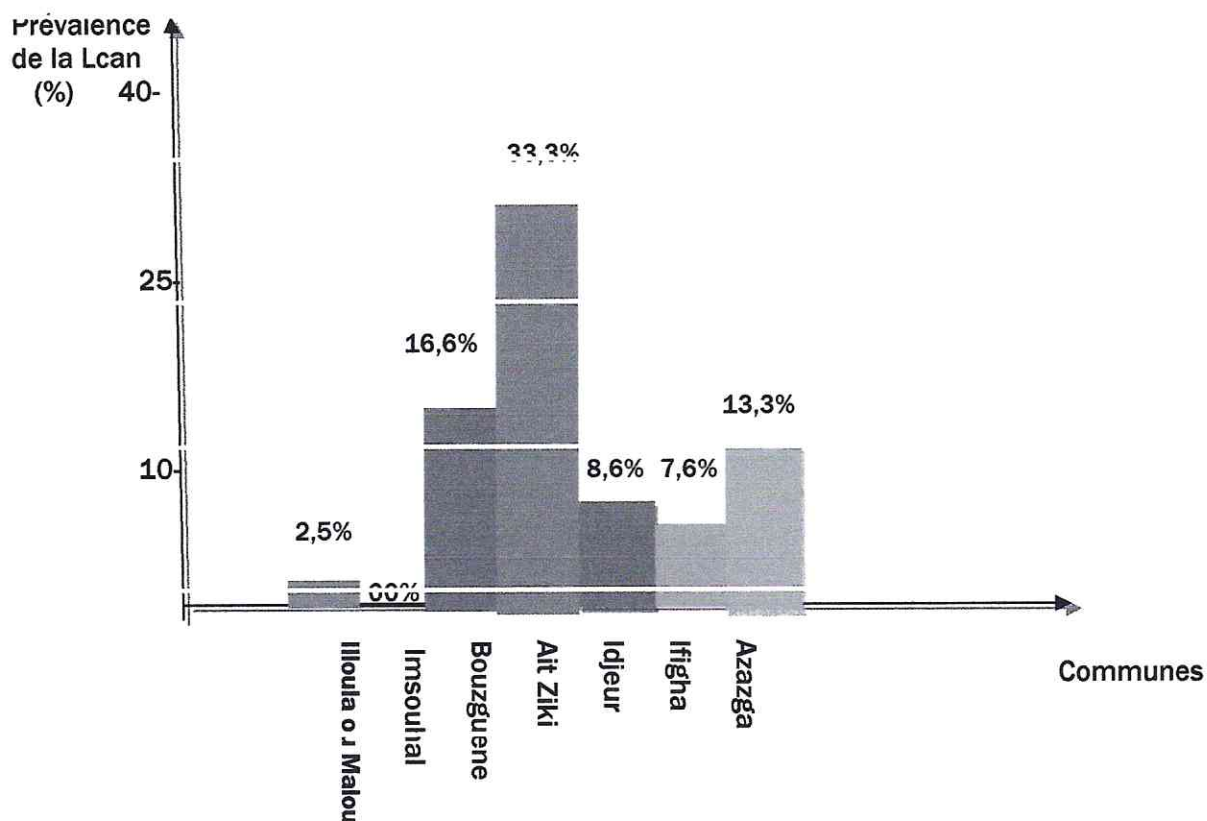


Figure.2.4 Séroprévalence de la Lcan dans les 7 localités.

### 3-1-2 Culture des leishmanies :

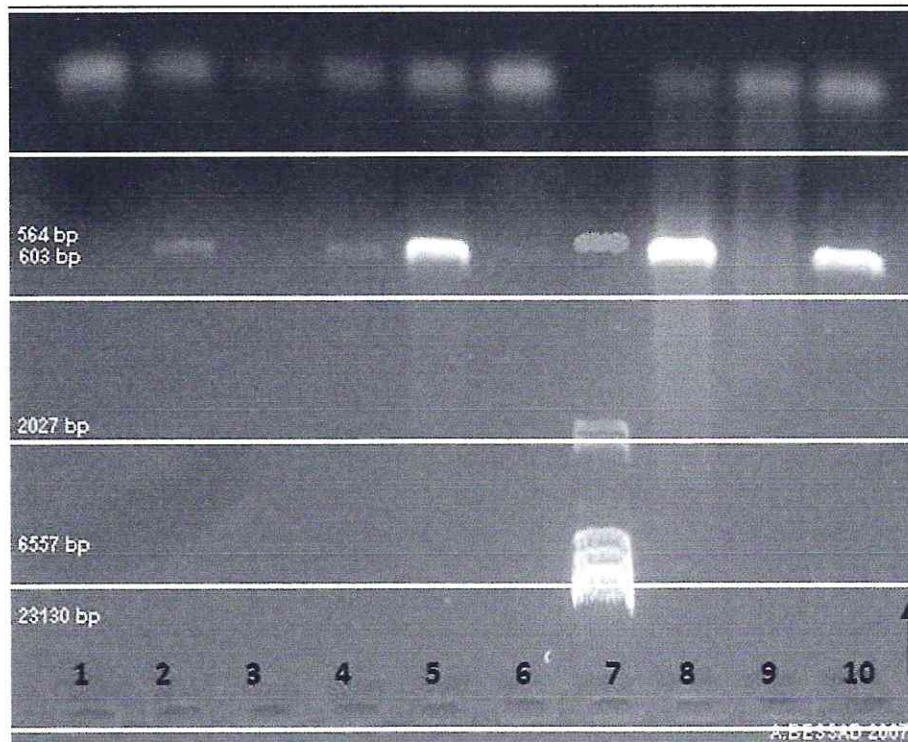
Après quatre repiquages sur milieu NNN, les 11 cultures confectionnées à partir de divers tissus des chiens positifs à la sérologie, sont restées négatives.

## **3-2 Gnacais :**

### **3-2-1 Biologie moléculaire :**

L'échantillon d'ADN extrait de la rate, et amplifié par PCR selon la technique précédemment décrite, et placé dans trois puits parmi les 10 que comptait le gel d'agarose.

Après la migration, le gel est déposé sur une lampe aux rayons UV. Le résultat photographié, est représenté par la photo 2.2.



**Photo.2.2 Résultat de l'amplification, par PCR, du génome codant pour l'ARNr de leishmanies détectées dans la rate du chacal.**

1. Témoin négatif.
2. Témoin positif.
- 7 Marqueur du poids moléculaire
- 5.8.10 Le gène leishmanien amplifié, donnant des bandes de 603 bp. (Echantillons testés)

### **3-2-2 Sérologie est isolement du parasite :**

Le sérum du chacal n°2 s'est révélé positif à l'immunofluorescence indirecte à la dilution 1/40. alors que le sérum du 1<sup>er</sup> était dépourvu d'anticorps anti-leishmaniens.

Le parasite a été isolé à partir de deux biopsies de l'animal n°2: la rate et la moelle osseuse. La première s'est montrée positive après deux repiquages sur milieu SLC, et la 2<sup>ème</sup> après trois repiquages sur milieu NNN. Deux souches de leishmanies sont ainsi obtenues :

- MCAN/DZ/08/LIPA 7208.
- MCAN/DZ/08/LIPA 7308.

Les cultures préparées à partir de broyats de foie sont restées négatives après 4 repiquages sur des tubes au milieu NNN. Il est de même pour tous les prélèvements provenant du chacal n°1.

### **3-2-3 Typage isoenzymatique :**

#### **3-2-3-1 lecture des électrophorégrammes :**

Sur chaque gel, nous mesurons la distance parcourue par chaque électromorphe. Les valeurs obtenues sont utilisées pour calculer les indices de mobilité électrophorétique pour les systèmes enzymatiques des souches en étude.

L'indice de mobilité est donné par la relation suivante :

$$IM_{(x)} = [d_{(x)} / d_{(75)}] \times 100$$

**IM** : indice de mobilité d'une enzyme de la souche étudiée.

**d (x)** : distance parcourue par cette enzyme sur le gel.

**d (75)** : distance parcourue par l'enzyme de la souche de référence.

Deux souches de référence ont été utilisées pour identifier les deux isolats provenant du chacal :

- MHOM/FR/78/LEM 75 *L.infantum* MON1
- MHOM/MA/81/LEM 265 *L.major* MON25

### 3-2-3-2 Identification des souches :

Les profils enzymatiques de nos deux isolats ont été identiques à celui de la souche marquer MHOM/FR/78/LEM 75. Ils appartiennent donc au complexe *L.infantum*, et au zymodème MON1.

Tableau.2.5 : Profils enzymatiques des souches analysées.

Enzymes Souches		MDH	ME	G6PD	NP1	NP2	GOT1	GOT2	FH	MPI	PGD	ICD DIA	GLUD	GPI	PGM.
		<b>Souches de référence</b>	<i>L.infantum</i> MON1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>L.major</i> MON25	150	88	94	400	90	110	120	87	150	122	100	200	77	118
	LIPA 7208	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	LIPA7308	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

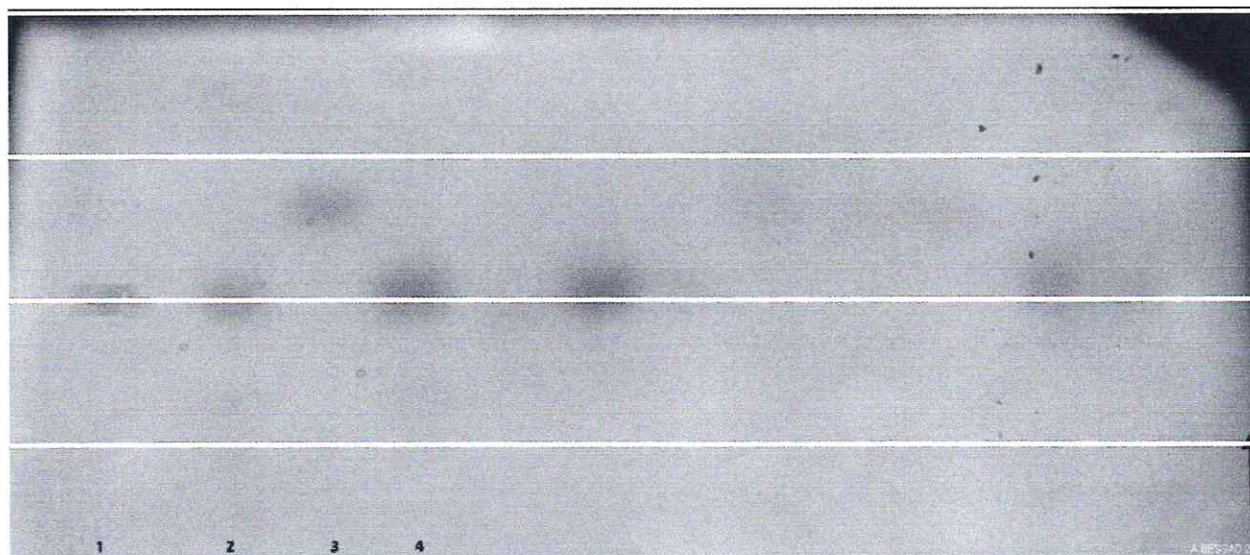


Photo.2.3 : Résultat de la révélation de l'enzyme MPI.

- 1-Souche marquer : MHOM/FR/78/LEM 75. *L.infantum* MON1.
- 2-Souche du chacal : MCAN/DZ/08/LIPA 7208.
- 3-Souche marquer : MHOM/MA/81/LEM 265. *L.major* MON25.
- 4-Souche du chacal : MCAN/DZ/08/LIPA 7308.

#### 4 discussion :

La leishmaniose est une infection très fréquente chez la population canine du nord de l'Algérie. Les chiens, notamment de race commune, portent le parasite durant de longues années, et ne manifestent des symptômes qu'à la sénescence.

L'enquête séro-épidémiologique que nous avons menée dans une zone rurale située au cœur d'une région endémique, nous a permis de révéler une fréquence de l'enzootie canine de 9,1 %. Ce taux semble faible par rapport à celui retrouvé par Bellazoug (37 % en 1985), et Item (30% en 2005) [12, 71] dans la même région. Cela serait dû à la manière avec laquelle la collecte des échantillons est effectuée. En effet, les sérums adressés par les vétérinaires praticiens sont souvent prélevés sur des chiens qui présentent un tableau symptomatique évocateur de la leishmaniose, ce qui augmente la probabilité pour les résultats positifs à la sérologie. Dans notre lot, seuls deux prélèvements nous ont été envoyés par des vétérinaires. De plus, la campagne nationale de lutte contre la leishmaniose, qui a démarré en 2006, a certainement contribué à la diminution de l'incidence de la maladie durant ces deux dernières années.

Le résultat que nous avons obtenu s'avère, donc, plus proche de celui retrouvé par Dedet et al en 1977 (11,4%) [36].

Par ailleurs, un écart important est observé au niveau de la prévalence de l'infection entre des zones géographiquement très proches. La localité d'Ait Ziki apparaît la plus touchée avec 33,3 %. Cela pourrait s'expliquer par l'abondance des cours d'eau dans cette région montagneuse, et par le nombre important de chiens errants qui sillonnent les villages.

Vu l'échantillon insignifiant que nous avons collecté dans la commune d'Imsohal (un sérum), la fréquence de la leishmaniose canine est la plus faible au niveau de la région d'Illoula ou Malou (2,5 %), où l'abattage des chiens errants a été perpétré à plusieurs reprises durant ces dernières années.

Dans notre étude, le facteur de la race n'a pas d'influence sur la prévalence de la leishmaniose chez la population canine (9,5 % chez les races pures, et 9 % chez la race commune) ; contrairement à d'autres travaux où la prédisposition de certaines lignées à l'infection a été évoqué [66]. Le nombre de bergers allemands et de dobermans (quatre en tout), considérés comme les plus sensibles [66], est faible dans notre lot, ce qui pourrait être à l'origine de cet équilibre entre les deux sous-populations.

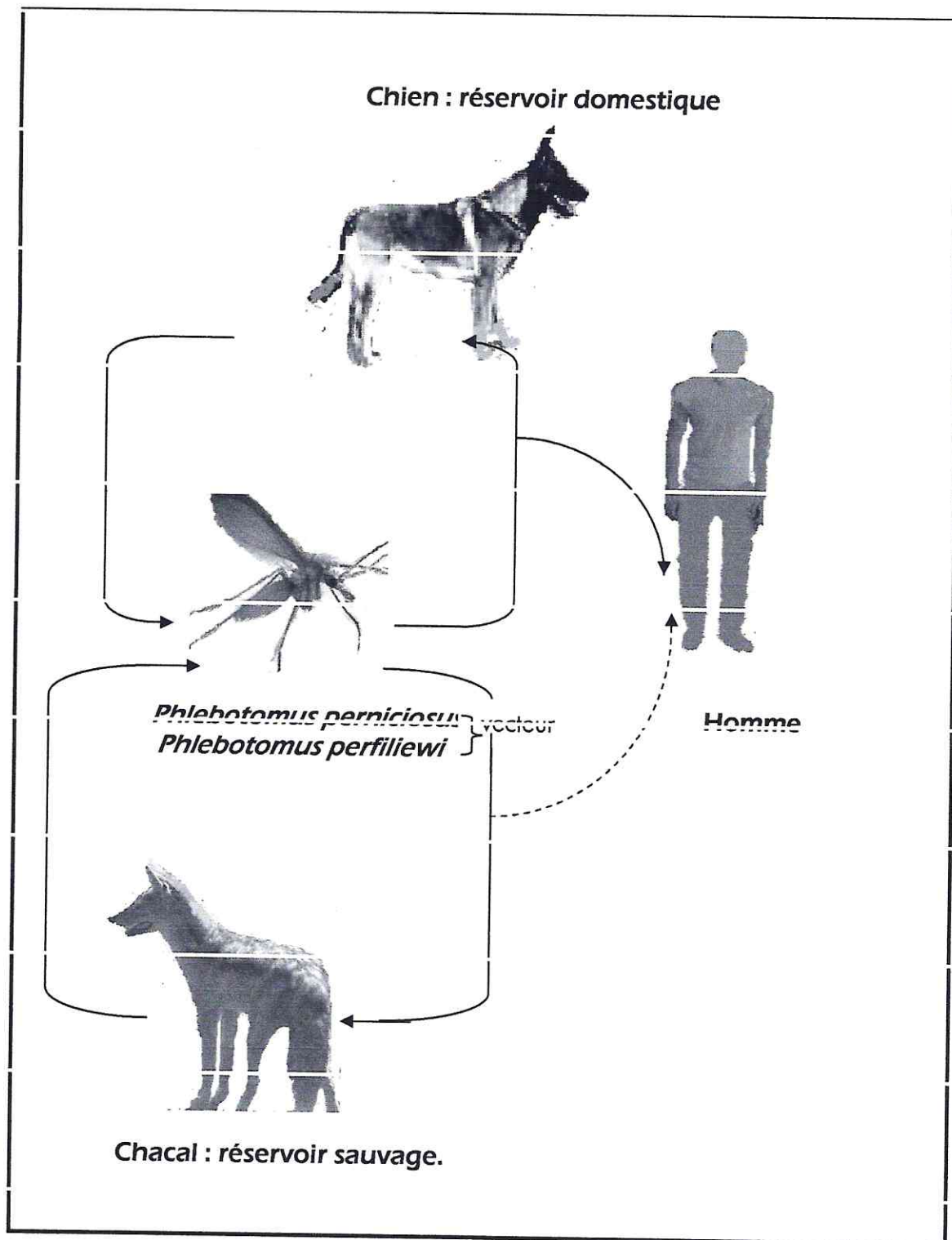


Figure.16 Circuit du parasite leishmanien dans le nord de l'Algérie



## **5 Conclusion et perspectives:**

Au terme de cette étude, nous parvenons aux conclusions suivantes :

- La prévalence de la leishmaniose canine, dans le foyer de la Grande Kabylie est toujours élevée. Malgré la campagne nationale de lutte contre cette maladie, le taux de chiens infectés reste considérable, 9,1 %. L'application d'insecticides (déltaméthine) est une mesure qui s'avère insuffisante pour contrôler la maladie. La sensibilisation de la population sur l'intérêt du dépistage annuel des chiens, qui doit s'effectuer simultanément avec la vaccination antirabique, et sur la nécessité de l'euthanasie des animaux présentant un taux d'anticorps anti-leishmanien égal ou supérieur à 1/80, est un moyen très efficace qui doit accompagner la lutte antivectorielle.

- Trois chiens du lot positif à la sérologie vivaient dans des villages implantés à plus de 1000 m d'altitude. Selon l'étude menée par Rioux en 1969, au sud de la France [118], l'espèce *P. perniciosus* est très rare à cet étage. Le vecteur de la leishmaniose canine dans ces zones montagneuses serait vraisemblablement *P. perfiliewi*, déjà incriminé dans la transmission de la forme cutanée sporadique. Une étude des phlébotomes du foyer de la Grande Kabylie semble donc nécessaire pour identifier les espèces susceptibles de véhiculer le parasite leishmanien.

- Les chiens errants, l'abondance des cours d'eau et la densité de la végétation font que les fluctuations de la séroprévalence de la leishmaniose canine d'une région à une autre, au sein du même foyer, soient importantes.

- Le chacal (*Canis aureus*) semble jouer un rôle non négligeable dans le cycle de la leishmaniose. Il serait le réservoir selvatique de *Leishmania infantum*, agent de la forme viscérale méditerranéenne. Un dépistage sérologique incluant un nombre plus important de chacals permettrait de déterminer la fréquence de l'enzootie au sein de cette population, et d'évaluer l'importance de ce canidé dans l'entité éco-épidémiologique de la leishmaniose dans la rive Sud de la Méditerranée.

**Annexe i** : Fiche de renseignements pour les prélèvements.

**Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière**

Institut Pasteur d'Algérie  
Service d'Eco-épidémiologie  
et Génétique des Populations



N° d'enregistrement

Tel :  
Fax :

**Fiche de renseignement**  
Leishmaniose canine

Date : / /

**Demandeur**

Nom(ou organisme) :

Prénom :

Enquête

Adresse :

**Chien**

Nom :

Age :

Race :

Sexe :

**Signes cliniques**

Amaigrissement

Allongement des griffes

Lésions cutanées

Hémorragies

Adénopathies

Chute de poils

Autres signes : \_\_\_\_\_

**Type de prélèvement**

Sang

Ganglions

Rate

Autres(souches, grattages, organes...) : \_\_\_\_\_

**Cadre réservé au service**

Souche :

Sérum :

## Annexe II : Liste des chiens prélevés.

N° du prlv	Age	Sexe	Race	Localité	Résultat de IFI
001	10m	♂	Cmn	Illoula	—
002	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
003	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
004	18m	♂	Pointer	Illoula	—
005	6 n	♀	Cmn	Illoula	—
006	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
007	7 n	♂	Cmn	Illoula	+ 1/80
008	5 n	♂	Cmn	Illoula	—
009	9 m	♂	Cmn	Illoula	—
010	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
011	2 n	♂	Cmn	Illoula	—
012	6 n	♂	Cmn	Illoula	—
013	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
014	6 n	♂	Cmn	Illoula	—
015	2 n	♂	Cmn	Illoula	—
016	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
017	2 n	♀	Cmn	Illoula	—
018	1 n	♂	Cmn	Illoula	—
019	8 n	♀	Cmn	Illoula	—
020	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
021	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
022	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
023	5 n	♂	Cmn	Illoula	—
024	2 n	♂	Cmn	Illoula	—
025	6 n	♀	Cmn	Illoula	—
026	5 n	♂	Cmn	Illoula	—
027	7 n	♂	Cmn	ILLOULA	—
028	4 n	♂	Cmn	ILLOULA	—
029	1 n	♂	Cmn	ILLOULA	—
030	4 n	♂	Cmn	ILLOULA	—
031	8 n	♂	Cmn	Bouzugue	—
032	3 n	♂	Cmn	Bouzugue	—
033	6 n	♀	Cmn	Bouzugue	—
034	2 n	♂	Cmn	Bouzugue	—
035	6 n	♀	B.belge	Bouzugue	+ 1/80
036	5 n	♂	Cmn	Illoula	—
037	5 n	♂	Cmn	Illoula	—
038	3 n	♂	Cmn	Illoula	—
039	1 n	♂	Pointer	Bouzugue	—
040	2 n	♂	Epagneul	Bouzugue	—
041	2 n	♂	Braque	Bouzugue	—
042	5 n	♂	Epagneul	Bouzugue	—
043	2 n	♂	Cmn	Bouzugue	+ 1/80
044	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
045	30m	♂	Cmn	Idjeur	+ 1/40
046	5 n	♂	Cmn	Idjeur	+ 1/20
047	7 m	♂	Cmn	Idjeur	—
048	4 m	♂	Dobrmn	Idjeur	+ 1/20
049	4 m	♂	Cmn	Idjeur	—

N° du prlv	Age	Sexe	Race	Localité	Résultat de IFI
050	10 n	♂	Cmn	Idjeur	—
051	4 n	♂	Cmn	Idjeur	—
052	1 n	♂	Cmn	Idjeur	—
053	10m	♂	Cmn	Idjeur	—
054	2 n	♂	Cmn	Idjeur	—
055	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
056	4 n	♂	Cmn	Ifigha	+ 1/20
057	18m	♂	Cmn	Ifigha	+ 1/80
058	8 n	♂	Cmn	Ifigha	—
059	8 n	♂	Basset	Ifigha	+ 1/20
060	5 n	♂	Cmn	Ifigha	—
061	3 n	♂	Cmn	Ifigha	—
062	7 m	♂	Bl.Gsgn	Ifigha	—
063	3 n	♂	Griffon	Ifigha	—
064	7 n	♂	Braque	Ifigha	—
065	7 m	♀	Bl.Gsgn	Ifigha	—
066	2 n	♂	Cmn	Ifigha	—
067	4 n	♂	Cmn	Ifigha	—
068	6 n	♂	B.belge	Azazga	—
069	18m	♂	B.belge	Azazga	—
070	18m	♀	Epageul	Azazga	—
071	18m	♀	Epageul	Azazga	—
072	4 n	♀	B.allem.	Azazga	—
073	30m	♂	Cmn	Azazga	—
074	3 n	♂	Cmn	Azazga	—
075	2 n	♂	Cmn	Illoula	+ 1/20
076	4 m	♂	Cmn	Illoula	—

N° du prlv	Age	Sexe	Race	Localité	Résultat de IFI
077	10 n	♂	B.allem.	Azazga	+ 1/80
078	4 n	♂	Cmn	Ifigha	—
079	6 n	♂	Cmn	Bouzguene	—
080	4 n	♂	Cmn	Azazga	—
081	18 m	♂	Cmn	Azazga	+ 1/80
082	3 m	♂	Cmn	Azazga	—
083	3 n	♂	Cmn	Azazga	—
084	10n	♀	Cmn	Azazga	+ 1/20
085	18 m	♂	Cmn	Azazga	+ 1/40
086	3 n	♂	Cmn	Idjeur	—
087	4 m	♂	Cmn	Idjeur	—
088	5 n	♀	Cmn	Idjeur	—
089	10 n	♂	Cmn	Idjeur	+ 1/80
090	18 m	♂	Cmn	Idjeur	—
091	3 n	♂	Cmn	Idjeur	—
092	7 n	♂	Cmn	Idjeur	—
093	7 n	♀	Cmn	Idjeur	—
094	4 n	♂	Cmn	Idjeur	—
095	4 n	♂	Cmn	Idjeur	—
096	9 n	♂	B.belge	Idjeur	—
097	9 n	♂	Cmn	Idjeur	+ 1/80
098	8 n	♂	Cmn	Idjeur	—
099	4 n	♂	Cmn	Ait Ziki	—
100	4 n	♂	Cmn	Ait Ziki	+ 1/80
101	2 n	♂	Pointer	Ait Ziki	—

N° du prlvm	Age	Sexe	Race	Localité	Résultat de IFI	N° du prlvm	Age	Sexe	Race	Localité	Résultat de IFI
102	2 n	♂	Cmn	Ait Ziki	—	106	2 n	♂	Cmn	Imsouhal	—
103	6 n	♀	Cmn	Ait Ziki	+ 1/80	107	4 n	♂	Cmn	Idjeur	—
104	9 n	♂	Cmn	Ait Ziki	—	108	4 n	♂	Cmn	Illoula	—
105	10 n	♂	B.allem.	Azazga	—	109	1 n	♂	Cmn	Illoula	—

**Prlvm** : Prélèvement      **m** : mois

**n** : ans                      **Cmn** : commun

**B** : berger                  **BLGsgn** : Bleu de  
Gascogne

Annexe III : Résultats de l'enquête séro-épidémiologique.



- ■ Chiens positifs à la sérologie.
- ● Chacal positif à la sérologie.

#### Annexe IV : Préparation du milieu Novy-McNeal-Nicolle (NMN).

##### Ingrédients :

Gélose (DIFCO) .....	5 g
Na Cl .....	3 g
Eau distillée .....	500 ml
Sang de lapin .....	50 ml
Citrate de sodium .....	3 ml
Pénicilline .....	25000 UI
Spectinomycine .....	25000 UI

##### Préparation de la gélose :

Sur feux doux, dissoudre le sel dans l'eau distillée, puis ajouter la gélose.

Remuer sans arrêt avec une baguette de verre jusqu'à la dissolution de la gélose.

Distribuer dans des tubes à vis stériles à raison de 7 ml par tube.

Stériliser à 120°C pendant 20 minutes.

Conserver à 4°C.

##### Ponction cardiaque :

Placer un lapin adulte sur le dos et raser la région thoracique.

Détecter, avec le doigt, le choc précordial, désinfecter la peau à l'alcool puis enfoncer une aiguille stérile montée sur une seringue de 50 ml.

Aspirer en maintenant l'aiguille en place jusqu'à l'épuisement du sang.

Transvaser, devant un bec bunsen, dans un flacon contenant l'anticoagulant et les antibiotiques, et agiter d'un mouvement circulaire pour mélanger.

Conserver à 4°C.

##### Préparation du mélange gélose-sang :

Retirer les tubes du réfrigérateur et les placer dans de l'eau distillée, puis porter à ébullition pour liquéfier la gélose.

Laisser refroidir quelques minutes et ajouter 1 ml de sang pour chaque tube.

Agiter les tubes pour bien mélanger le sang et la gélose, tout en évitant la formation de bulles d'air.

Laisser les tubes en position inclinée, à température ambiante, pendant 24 heures.

Conserver à 4°C, et utiliser dans le mois qui suit la préparation.

### Préparation du milieu Cœur-Cerveau-Sang (CCS).

Dissoudre 26 g de Brain Heart Infusion agar (DIFCO) dans 500 ml d'eau distillée sur feu doux.

Porter à ébullition, puis répartir dans des boîtes de Roux à raison de 100 ml par boîte, ou dans des flacons à raison de 20 ml par flacon.

Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Laisser refroidir jusqu'à 50°C, puis ajouter 20 ml de sang de cheval par boîte, et 5 ml par flacon.

Mélanger par des mouvements circulaires.

Laisser à température ambiante pendant 24 heures.

Conserver à 4°C.

### Préparation du milieu Sérum de Lapin Coagulé (SLC).

Prélever du sang par ponction cardiaque d'un lapin (environ 50 ml).

Ajouter 25000 UI de Pénicilline et de Streptomycine.

Laisser décanter une nuit à température ambiante.

Centrifuger dans des tubes coniques à 2500 g pendant 10 minutes.

Répartir le sérum obtenu sur des tubes à vis à raison de 2 ml par tube.

Placer les tubes en position inclinée dans un bain-marie pendant 10 minutes.

Conserver à 4°C.



### Annexe v : Préparation de l'antigène leishmanien pour IFI

L'antigène utilisé pour le diagnostic de la leishmaniose par immunofluorescence indirecte, est préparé à partir de souches humaines ou canines.

Les souches sont cultivées en boîtes de Roux, puis incubées à 24°C pendant 10 à 11 jours.

Le surnageant est recueilli puis filtré sur une gaze pour éliminer les débris de gélose.

Le filtrat est suspendu dans 20ml d'eau physiologique à 9 ‰, puis centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes.

Le culot, contenant les parasites, est additionné d'une solution d'eau physiologique à 3 ‰, et centrifugé à 2500 g durant 10 minutes (lyse des hématies).

Les promastigotes sont enfin lavés dans une solution saline à 9 ‰, puis dispersés dans de l'eau physiologique à la concentration de 2000 parasites/mm<sup>3</sup> (comptage à la cellule de Thomas).

L'antigène est déposé sur les lames à raison d'une goutte par puits.

Les lames sont séchées à l'étuve, puis conservées à -20°C.

**Annexe vi**: Préparation du tampon PBS pH 7,2.

Solution mère :

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	60 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O .....	13.8g
Eau distillée .....	1000 ml

Ajuster le pH à 7,2

Conserver à 4°C

Au moment de l'emploi :

Solution mère de PBS .....	40 ml
Eau physiologique à 9‰ .....	1000 ml

## Annexe VII : préparation des solutions de révélation.

- **Glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PD « EC 1.1.1.49 »**
- Tris HCl (0,2 M) pH 8 ..... 10 ml
  - Glucose-6-phosphate.....20ml
  - EDTA ..... 10 ml
  - NADP 1% ..... 1 ml
  - NBT 1% ..... 1 ml
  - Incubation à 37°C pendant 30 mn.
  - PMS 1% .....0,5 ml
  - Agar 2% .....5 ml
- **6 Phosphogluconate déshydrogénase, 6PGD « EC 1.1.1.44 »**
- Tris HCl (0,2 M) pH 8 ..... 10 ml
  - Acide-6-phosphogluconique .....40 ml
  - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,5M) ..... 1 ml
  - NADP 1% ..... 1 ml
  - NBT 1% ..... 1 ml
  - Incubation à 37°C pendant 30 mn.
  - PMS 1% ..... 1 ml
  - Agar 2% .....5 ml
- **Glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT «EC 2.6.1.1»**
- Tris HCl (0,2 M) pH 8 ..... 10 ml
  - X.Kétoagglutarate..... 150 mg
  - Acide aspartique.....300 mg
  - Pyridonal-5-phosphate..... 15 mg
  - Ajuster à pH 7,4 .
  - Verser cette solution sur le gel.
  - Laisser en contact pendant 30 mn.
  - Jeter cette solution, et ajouter la moitié de la solution suivante :
  - Fast bleu-BB.....225 mg
  - Tris HCl (0,2M) ..... 75 ml
  - Rincer le gel puis ajouter l'autre moitié de la solution.

➤ **Glucose phosphate isomérase, GPI «EC 5.3.1.9 »**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 ..... 10 ml
- MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (0,5M) ..... 1 ml
- NADP<sup>+</sup> 1% ..... 0,5 ml
- NAD 1% ..... 1 ml
- NBT 1% ..... 1 ml
- Fructose-6-phosphate ..... 10 mg
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- Glucose-6-phosphate déshydrogénase..... 50µl
- PMS 1% ..... 0,5 ml
- Agar 2% ..... 5 ml

➤ **Phosphoglucomutase, PGM «EC 5.4.2.2»**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 ..... 10 ml
- MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (0,5M)..... 1 ml
- NADP 1% ..... 0,5 ml
- NAD 1% ..... 1 ml
- NBT 1% ..... 1 ml
- Glucose-1-phosphate ..... 300 mg
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- Glucose-6-phosphate déshydrogénase ..... 50µl
- PMS 1% ..... 0,5 ml
- Agar 2% ..... 5 ml

➤ **fumarate hydratase, FH «EC 4.2.1.2»**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 ..... 580 mg
- NAD 1% ..... 3 ml
- Pyruvate sel monosodique ..... 20 mg
- NBT 1% ..... 3 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- Malic déshydrogénase ..... 200 µl
- PMS 1% ..... 0,5 ml
- Agar 2% ..... 5 ml

➤ **Mannose phosphate isomérase, MPI « EC 5.3.1.8»**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 .....8 ml
- Mannose-6-phosphate sel de Na .....10 mg
- Mg Cl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O .....1 ml
- NADP 1% .....1 ml
- NBT 1% .....1 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- Phosphoglucose isomérase.....50 µl
- Glucose-6-phosphate déshydrogénase .....100µl
- PMS 1% .....1 ml
- Agar 2% .....5 ml

➤ **Purine nucléoside phosphorylase, NP « EC 2.4.2»**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 .....16 ml
- Inosine .....40 mg
- NBT 1% .....2 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- Xanthine oxydase .....100 µl
- PMS 1% .....1 ml
- Agar 2% .....10 ml

➤ **Enzyme malique, ME « EC 1.1.1.40»**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 .....8 ml
- Solution A .....5 ml
- MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O (0,2M).....1 ml
- NADP 1% .....1 ml
- NBT 1% .....1 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- PMS 1% .....0,5 ml
- Agar 2% .....5 ml

• Solution A :

- Dissoudre 3,10 g de Na<sub>2</sub> Ca<sub>3</sub> anhydre dans 15 ml d'eau distillée.
- Placer la solution dans un bac de glace.
- Ajouter lentement 3,35 g d'acide L.malique.
- Après dissolution, ajouter 10 ml d'eau distillée.
- Ajuster le ph à 7 avec une solution d'acide L.malique.

➤ **Isocitrate déshydrogénase, ICD « EC 1.1.1.42 »**

- Tris HCl (0,2 M) pH 8 .....8 ml
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,25M).....1 ml
- Acide isocitrique (0,1 M).....4 ml
- NADP 1% .....1 ml
- NBT 1% .....1 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- PMS 1% .....0,5 ml
- Agar 2% .....5 ml

➤ **Glutamate déshydrogénase, GLUD «EC 1.4.1.3»**

- Tris HCl (0,2 M) pH 7,5 .....8 ml
- L.glutamic acid sel monosodique.....5 ml
- NADP 1% .....2,5 ml
- NBT 1% .....2 ml
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- PMS 1% .....0,5 ml
- Agar 2% .....5 ml

➤ **NADH diaphorase, DIA «EC 1.6.2.2 »**

● Solution 1 :

- Tris HCl (0,2 M) pH 7,5 .....8 ml
- B.NADH.....10mg
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.

● Solution 2 :

- MTT.....10 mg
- Eau distillés.....2 ml
- Bien dissoudre.
- Tris HCl (0,2 M) pH 8 .....2 ml

● Solution 3 :

- DICIP ( 1 mg/1 ml de tris HCl pH 8) 0,1 %
- Mélanger les solutions 1, 2, 3.

➤ **Malate déshydrogénase, MDH « EC 1.1.1.37 »**

- Tris HCl (0,2 m ) ph 8 .....8 ml
- Solution A .....5 ml
- NAD 1%.....1 ml
- NBT 1%.....1 ml
- Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> .....10 mg
- Incubation à 37°C pendant 30 mn.
- PMS 1% .....0,5 ml
- Agar 2% .....5 ml

## Références bibliographiques

1-Abbas A.k, Murphy K.M and Sher A. 1996  
Functional diversity of hepatic T lymphocytes.  
*Nature*, 383: 787-793

2- Acha N.P and Szyfres B. 1989  
Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux.  
P : 043-002

3-Adler.S andTheodor.O. 1932  
Investigations on Mediterranean Kala-azar. VI. Canine visceral Leishmaniasis.  
Proc. R. Soc. London, 110 :402-441

4-Auier .S et Ber.M. 1941  
The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*.  
Indian Journal of Medical Research, 29: 803-809.

5-Amboise-Thomas P et Golvan Y.J. 1994  
Les nouvelles techniques en parasitologie et immunoparasitologie.  
Flammarion Médecine-Sciences: 298pp

6-Anders G. 2003  
PCR diagnostic of leishmaniasis in Israel and West Bank. Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies.  
Université de Berlin: 31-34

7-Baker.J.R. 1973  
Classification of the parasitic Protozoa.  
Hutchinson University Library, London: pp.15-20.

8-Baneth G and Jaffe C.L. 1999  
Canine visceral leishmaniasis in Israel : an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection.  
Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, 1999.

9-Baneth. G. 2004  
Pathoimmunology of canine leishmaniasis.  
IX<sup>th</sup> ECVIM-CA Congress, Barcelona 2004.

10-Belkaid Y, Kamhawi S., Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E Ribeiro J and Sacks D.L. 1998  
Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis.  
*The Journal of Experimental Medicine* , 188 :1941-1953.

11-Belkaid D , Tabet.Derraz O, Amrioui B, Zenaidi N, Bahbou M. 1992  
Diagnostic de laboratoire en parasitologie.  
*Arch. USD Blida*, A61-45: p 153.155.

12-Bellazoug S. 1985  
Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : -étude des réservoirs. -Analyse chimiotaxonomique des parasites.  
*Arch.USDBlida*, 32 610 369 :

13-Benikhlef R. 2004  
Profil isoenzymatique des souches canines isolées en Algérie.  
*Journal de la journée scientifique sur la leishmaniose canine*, IPA. 21 Novembre 2004



14-Bensignor E et Groux D. 1999  
Leishmaniose : actualités thérapeutiques.  
L'Action Vétérinaire n° 1484.

15-Blavier A. Keroack S. Denerolle P and al. 2001  
Atypical forms of leishmaniasis.  
The Veterinary Journal, 162: 108-120

16-Bogdan C, Röllinghoff M and Solbach W. 1990  
Evasion strategies of *Leishmania* parasites.  
Parasitology Today, 6 (6): 183-187

17-Bourdeau P. 1983  
Eléments pratiques de diagnostic de la leishmaniose canine.  
Point Vétérinaire, 15 (72) : 43-50

18-Bourdoiseau G. 1993  
La leishmaniose canine.  
Fascicule destiné aux étudiants des écoles vétérinaires, Rhône -Mérieux, Lyon, 37p.6

19-Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E and al. 1997  
Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 59: 21-30

20-Bourdoiseau G. 1997  
Identification de populations cellulaires (cutanées et circulantes) par l'immunohistochimie et la cytométrie en flux chez le chien infecté naturellement par *Leishmania infantum*.  
Thèse d'université, Faculté de médecine Claude Bernard, Lyon, 211p+annexes

21-Bourdoiseau G, Bonnefont C, Chabanne L, Gevrey J, Grangeon E, et Fournier C. 1997  
Modifications sanguines (cellulaires et humorales) chez le chien leishmanien. Suivi des chiens infectés traités et non traités.  
Rev. Med. Vet, 148 (3) : 219-228

22-Bourdoiseau G et Denerolle Pn, 2000  
Traitement de la leishmaniose canine : actualités.  
Rev. Méd. Vét, 151, 5 : 395-400

23-Bourdoiseau G et Franc M. 2002  
Leishmaniose canine.  
Encyclopédie Vétérinaire, ELSEVIER, Paris 2002 (5) : 1500, 9p

24-Bourdoiseau G. 2004  
Traitement de la leishmaniose canine : données actuelles, procédure et protocole de consensus.  
Leishmaniose canine : surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie.  
Lyon, Septembre 2004

25-Brandonisio O, Carelli G, Altamura M and al 1990.  
Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis.  
Parassitologia, 32 (2):275-281

26-Brazil R.P. 1978  
Electrophoretic variation of enzyme phosphoglucomatase in different strains of *Leishmania*.  
Ann. Trop. med. Parasit, 72 (3) : 269-291

27-Cabassu H. 1933  
Leishmaniose spontanée du chien.  
Thèse Doct. Vét. Vigot éd, Paris :62 pp

26-Cabrai M, McInerney R, Gomes S, O'Grady J, Frame I, Sousa J.C, Miles M.A and Alexander J. 1993  
Demonstration of natural Leishmania infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity.  
Arch Inst. Pasteur Tunis, 70:473-479

27-Chance M.L, Simur L.F, Thomas S.C and Peters W. 1976  
The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania*.  
Ann. Trop. Med. Parasit, 72 (6): 533-542

30-Chou M.N. 2005  
Caractérisation du complexe protéique eIF2 $\alpha$  impliqué dans la régulation de l'initiation de la traduction chez le parasite protozoaire *Leishmania*.  
Thèse M.SC, Faculté des études supérieures, Université de Laval

31-Ciaramella P and Corona M 2003  
Canine leishmaniasis: therapeutic aspects.  
Compendium, vol 25, n° 5: 370-375

32-Conroy J.D, Levine N.D et Small E. 1970.  
Visceral leishmaniasis in a fennec fox (*Fennecus zeraii*).  
Path.Vet, 7:163-170.

33-Daeninckx F. 1998  
Etude comparative, en immunofluorescence indirecte, des formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania infantum*.  
Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Claude Bernard, Lyon, 89p

34-Deane L.M et Deane M.P. 1955  
Observações preliminares sobre a importancia comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em area endêmica ú caiaza no Ceará.  
Hospital, 48:61-76.

35-Dedet J.P. 2000  
Les leishmanioses : actualités.  
Press. Méd, 29 : 1019-1026

36-Dedet J.P, Addadi K et Lannuzel B. 1977  
Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : 7- La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie.  
Bull.Soc.Path.Exo.70 :250-256.

37-Dedet J.P. 1999  
Les leishmanioses.  
Edition Ellipses :253 pp

38-De Luna R, Vuotto M.L, Ielpo M. T.L and al. 1999  
Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 70: 95-103.

39-Denerolle P. 1996  
Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement.  
Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie, 31 : 137-145

40-Deplazes. P, Smith.N.C, Arnold.P, and al. 1995  
Specific IgG1 and IgG2 antibodies responses of dogs to *Leishmania infantum* and others parasites.  
Parasit Immunology, 17: 451-458

41-Dereure J, Fraiiong F, Dedet J.P. 1999  
Geographic distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin.  
Proceeding of a canine leishmaniasis Forum, Barcelona :pp 18-25

42-Desjeux Pn et Dedet J.P. 2005  
Actualités sur le traitement de la leishmaniose viscérale.  
JNI, 8-10 Juin 2005, Nice.

43-Donovan C. 1903  
On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in india.  
Bull.Soc.Path.Exo.22: 252-253

44-Dunan S, Mary C, Garbe L, Breton Y, Olivon B, Ferrey P et Cabassu J.P. 1989  
A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la région marseillaise.  
Bull. Soc. Fr. Parasitol, 7 :17-20

45-Dwyer D.M. 1976  
Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens.  
The Journal of Immunology. 117(6): 2081-2090

46-Ebert F. 1973  
Charakterisierung von *Leishmania donovani*. Stämmen mit der disk-electrophorese.  
Z. Tropenmed. Parasit, 24 : 517-524

47-EUZEBY J. 1984  
les parasitoses humaines d'origine animale : caractères épidémiologiques.  
P : 48.58

48-EUZEBY J. 1986  
Protozoologie médicale comparée.  
Collection Fondation Mérieux, Lyon : 463P

49-Euzeby J. 1995  
Protozoologie médicale et comparée.  
Fondation Marcel Mérieux, Lyon : 436pp

50-Evans D.A. 1987  
*Leishmania* : in vitro methods for parasite cultivation.  
Acad Press. London: 52-75

51-Evans D. 1989  
Handbook on Isolation, Characterization and Crypreservation of *Leishmania*.  
For UNDP/World Bank/WHO TDR: P 25-27

52-Ferrer L 1992  
Leishmaniasis. in :Current veterinary therapy in small animal practice.  
W. B. Saunders. Ed, Philadelphia: 266-270

53-Ferrer L, Aisa M.J, Roura X and al. 1995  
Serological diagnostic and traitement of canine leishmaniasis.  
The Veterinary Record, 136: 514 516

54-Ferrer. L. M. 1999  
Clinical aspects of canine leishmaniasis.  
Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, 1999

55-Forastiero R.R et al. 1997  
Relationship of anti-beta2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies.  
Thrombosis and Haemostasis, 78(3):1008-14

56-Franc M. 1995  
Leishmaniose canine.  
Encyclopédie vétérinaire, Parasitologie tome 5 : 1-5

57-Ganguiy N.K. 2002

Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis: The potential impact of miltefosine on visceral leishmaniasis in India.

*TDRnews*: 68, 2

58-Gardener P.J and Howells R.E. 1972

Isoenzyme variation in *Leishmania* parasite.

*J. Protozool* : p19-47

59-Giraud P, Ranque J, Cabassu H. 1950

Épidémiologie de la leishmaniose viscérale humaine méditerranéenne, en particulier dans ses rapports avec la leishmaniose canine.

*Rev.Path.Comp.Hyg.Gén*, 617 : 282-300

60 Gradoni L. 2002

The diagnostic of canine leishmaniasis.

Proceeding of 2<sup>nd</sup> International Canine Leishmaniasis Forum , Sevilla, Spain, 7-14

61-Gramiccia M, Gradoni L and Orsini S. 1992

Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment.

*Annual Tropical Medical Parasitology*, 86 : 613-620.

62-Guerin P.J., Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S.L., Desieux P, Wasunna M.K and all. 2002

Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda.

*Lancet Infectious Diseases*, 2 : 494-501

63-Hammou M. 2004

La lutte antivectorielle dans la leishmaniose: quelles perspectives ?

Journée scientifique sur la leishmaniose canine. IPA, 21 Novembre 2004

64-Hamidi AN, Nadim A, Edrissian GH, Tahvildari-Bidrouni G and Javadian E. 1982

Visceral leishmaniasis of jackal and dogs in northern Iran

*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*, 76 : 756-757.

65-Harrat Z et Belkaid M. 2002

Les leishmanioses dans l'Algérie. Données épidémiologiques.

*Bull. Soc. Path. Exot.* 96, 3 : 212-214

66-Harrat Z, Benkherouf K, Taharboucht Z, Bendali-Braham S, Yahi T, Hamrioui B et Belkaid M. 1995

La leishmaniose canine urbaine.

*Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 60 : 157-165

67-Harrat Z, Berrouane Y, Ben Abdesslam S, Belkaid M, Tabet-Derraz Z. 1992

La leishmaniose viscérale en Algérie. Evolution de la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie.

*Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 58 : 255-272

68-Hervás J, Méndez A, Carrasco L and Gómez-Villamondos J.C. 1996

Pathological study of visceral leishmaniasis in jackal (*Canis aureus*).

*Veterinary Record*, 139: 293-295

69-Hubert B. 2006

Comment diagnostiquer la leishmaniose canine.

*Le Point Vétérinaire*. N°270. Novembre 2006 : 54-59

70-Hugnet C et al. 2004

Vaccination anti-leishmaniose canine : premiers résultats.

Leishmaniose canine : surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie.

Lyon, Septembre 2004

71-item in et Toumi H. 2000

Etude épidémiologique sur la leishmaniose canine dans la région centre. ( Algérie)

Arch. USD Blida, 43 THV

72-Izri MA, Bellazoug S, Boudjebla Y, Derreure J, Pratlong F, et al. 1990

*Leishmania infantum* Mon-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie.

Ann Parasitol Hum Com, 1990, 65: 507-508

73-Izri MA, Bellazoug S. 1993

*Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* naturally infected with demotrophic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria.

Trans R Soc Trop Med Hyg : 87,399

74-Jadin J.M et Greemers J. 1966

L'ultrastructure des formes en rosaces de *Leishmania tropica* (Wright, 1905).

Ann.Soc.Belge Med.Trop.46: 349-354

75-Jaffe C.L. 1999

Prospectives for a vaccine against canine leishmaniasis.

Proceeding of the international Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, 1999.

76-Kamhawi S, Modi G.B, Pimenta P.F.P, Rowton E and Sacks D.L. 2000

The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan mediated midgut attachment.

Parasitology, 121 : 25-33

77-Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E and Sacks D. 2000

Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies.

Science, 290 : 1331 - 1334

78-Kilgour V, Gardener P.J, Godfrey D.J and Peters W. 1974

Demonstration of electrophoretic variation of two amino transferase in *Leishmania*.

Ann. Trop. Med. Parasit. 47: 779-785

79-Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Derreure J, Puech M.P and Cadiergues M.C. 1997

Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for the control of canine leishmaniasis.

Medical and Veterinary Entomology, 11:105-111

80-Lainson R et Shaw J.J. 1979

The role of animals in epidemiology of South American Leishmaniasis.

In "Biologie of kinetoplastida". (W.H.R.Lumsden and D.A. Evans eds) Vol.II.

Academic Press. London: pp.1-166.

81-Lamothe J, 1999

Treatment of canine leishmaniasis, from A (amphotericin B) to Z (ZYLORIC®).

Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, 1999

82-Lane.R.P, 1993

Sandflies (Phlebotominae) in Medical Insect and Arachnids.

London: Chapman and Hall. Pp:78-108

83-Laroche V. 2002

Les anticorps anti-nucléaires dans la leishmaniose canine.

Thèse d'université, Faculté de médecine Claude Bernard, Lyon, n° 108

84-Laveran A et Mesnil F. 1903

Sur un protozoaire nouveau : *Tiropiasma donovani*. Parasite d'une fièvre de l'Inde. C.r.Hebdo.Séan.Acad.Sci.Paris, 137 : 957-961

85-Latyshnev N.I., Krjukova A.P. et Fovaisnina T.P. 1951  
Essays on the regional parasitology of Middle Asia. 1. Leishmaniasis in Tadjikistan.  
Trans. Gamaleya Inst.Moscow, 7: 35-62

86-Leishman W.b. 1903  
On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in india.  
Br.Med.J.1 : 1252-1254

87-Lemesre J.L. 2004  
Les antigènes d'excrétion sécrétion des formes promastigotes de *Leishmania infantum* confèrent une protection à l'encontre d'une leishmaniose viscérale expérimentale chez le chien.  
Leishmaniose canine : surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie.  
Lyon, Septembre 2004

88-Liew F.Y. 1989  
Functional heterogeneity of CD 4+ T cells in leishmaniasis.  
Immunology Today, 10(2): 40-45

89-Lima H.C and Titus R.G. 1996  
Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice.  
Infection and Immunity , 64 : 5442-5445

90-Lopez R, Lucena R, Novales M and al. 1996  
Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis.  
Journal of Veterinary Medicine, B43: 469-474

91-Lovelace J.K, Dwyer D.M and Gottlieb M. 1986  
Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*.  
Molecular and Biochemical Parasitology , 20 : 243-251

92-Lovelace J.K. and Gottlieb M. 1986  
Comparison of extracellular acid phosphatases from various isolates of *Leishmania*.  
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene , 35 : 1121-1128.

93-Martinez-Moreno A, Moreno T, Martinez-Moreno F.J and al. 1995  
Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 48: 209-220

94-Mazelet L. 2004  
La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français.  
Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

95-Mizow M.L, Dieyenberg J.A, Hall L.R and Titus R.G. 1996  
*Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*.  
Journal of Immunology , 161 : 5571-5577

96-McConville M.J, Schnur L.F, Jaffe C and Schneider P. 1995  
Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter and intra-specific polymorphism in Old World species.  
Biochemical Journal , 310 : 807-818

97-McConville M J and Ralton I F 1997  
Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites.  
Behring Institute Mitt. , 99 : 34-43

98-McMaster W.R, Morrison C.J, MacDonald M.H and Joshi F.B. 1994  
Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases.  
*Parasitology*, 108 : 529-536

99-Mosmann T.R, Cherwinski H, Bond M.W, Giedlin M.A and Coffmann R.L. 1986  
Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
*Journal of Immunology*, 126 : 2348-2357

100-Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. 1986  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction.  
*Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51 : 263-273

101-Murray H W 1999  
Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection.  
*AIDS Patient Care STDS*, 13: 459-465

102-Nicolle C et Compte C. 1908  
Origine canine du Kala-azar.  
*Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 3: 59-62

103-Nicolle C et Sicre A. 1908  
Culture du parasite du Bouton d'Orient.  
*C.r..Acad.Sci.Paris*, 146 : 842-843

104-Nicolle C et Compte C. 1908  
Recherches sur le Kala-azar entreprises à l'Institut Pasteur de Tunis.  
*Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 3 : 99-103

105-Noli C. 1999  
La leishmaniose canine.  
*Waltham Focus*, 9 : 16-24

106-Oddo F.G and Gasco G. 1965  
Il test di immunofluorescenza nelle leishmaniosi viscerale e cutanea.  
*Riv. Ist. Sieroter. Itl*, 38 : 139-145

107-Pampiglione S, Manson Bahr PEC, Laplaca M, Borqatti MA and Musumeci S. 1975  
Studies in mediteranean leishmaniasis.  
*Tran. Soc. Trop. Med. Hyg*, 69: 60-68

108-Pearson H and Stirling D.  
*Methods in Molecular Biology*, Vol 226. PCR Protocols, Second Edition.  
Humana Press Inc, Totowa, NJ

109-Pernot M. 2005  
Les anticorps anti-β2 GP1 au cours de la leishmaniose.  
Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Claude Bernard, Lyon1, n° 17

110-Pimenta P.F, Saraiva E.M and Sacks D.L. 1991  
The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*.  
*Experimental Parasitology*, 72 : 191-204

111-Fimenta F.F., Saraiva E.M., Rowton E., Mouti G.B., Garraway L.A., Beverley S.M., Turco S.J and Sacks D.L. 1994

Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 : 9155-9156

112-Proudfoot L, O'Donnell C.A and Liew F.Y. 1995

Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages.  
European Journal of immunology, 25 : 745-750

113-Quillici M, Toga I, Dunan S et Dumon H. 1968

L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la réaction de fixation du complément.  
Méd. Trop. 28(1) : 37-43

114-Reale S and al. 1999

Detection of *leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood.  
J. Clin. Microbiol, 37: 2931-2935

115-Reed S.G and Scott P. 1995

T-cell and cytokine responses in leishmaniasis.  
Current Opinion in Immunology, 5: 524-531

116-Rhalem A, Sahibi H, Lasri S and al. 1999

Analysis of immune responses in dogs with canine leishmaniasis before and after drug treatment.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 71 (1): 69-76

117-Rioux J.A, Lanotte G, Serres E and al. 1990

Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification.  
Annal. Parasitol. Hum. Comp, 65: 11-125

118-Rioux J.A, Albaret J.L, Houin R, Dedet J.P et Lanotte G. 1968

Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes*).  
Annals Parasit.Hum.Comp, 4 : 421-428

-Rioux J.A, Golvan Y.J. 1969

Epidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France.  
Monographie de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, 37 : 9-223

119-Roitt I.M, Brostoff J et Male D.K. 1997

Immunologie.  
De Gruyter University, Braunschweig, 400p

120-Romdane M.N, Romdhames B, Jemli M, et Metoui K. 1992

Profils électrophorétiques dans la leishmaniose canine.  
Rev. Méd. Vét, 143 (10) : 753-756

121-Roberts L.S and Janovy J.J. 2000

Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology.  
McGraw-Hill Higher Education, Boston

122-Ross R. 1903

Note on the parasite recently described by Leishman and Donovan.  
Br.Med.J.II: 1261-1262

123-Sacks D. 2001

*Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence.  
Cellular microbiology, 3 : 109 - 110.



124-Sacks D and Kamhawi S. 2001

Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis.  
Annual Reviews in Microbiology, 55 : 453-483

125-Sarfati C. 2004

Les leishmaniose.  
Hôpital Saint Louis

126-Sarrouy Ch, Combe P et Claude. 1946

Un cas de kala-azar infantile traité par la diamidine.  
Algérie. Médicai. 447-448

127-Schlein Y, Jacobson R.L and Shlomai J. 1991

Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector.  
Proceedings of the Royal Society of London Ser. B., 245 : 121-126

128-Schneider F, Rosal J.-F, Bouvier J, Louis J and Bourcier C. 1992

*Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages.  
Experimental Parasitology, 75 : 196-206.

129-Sergent Ed, Sergent Et, Parrot L, Donatien A et Beguet M. 1921

Transmission de ciou de Diskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi*).  
C.R. Acad. Sci. Paris, 173 : 1030-1032

130-Sherwood J.A, Gachihi G.S, Muigai R.K and al. 1994

Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis.  
Clinical Infectious Diseases, 19 : 1034-1039

131-Shortt H.E. 1928.

The life history of *Leishmania donovani* in its insect and mammalian hosts.  
Trans. 7<sup>th</sup> Cong. Far. East. Ass. Trop. Med. December 1927. Vol. III. Calcutta: Thacker's Press: 12-18

132-Slappendel R.J. 1988

Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands.  
Veterinary Quarterly. 10: 1-16

133-Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia V, et al. 1998

Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis.  
Lancet 1998 ; 352 : 1821-3

134-Sundar S. 2001

Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.  
Tropical Medicine and International Health, 6 : 849-854

135-Swaminath C.S, Short H.E et Anderson L.A.P. 1942

Transmission of Indian Kala-azar to men by the bites of *Phlebotomus argentipes*.  
Indian J. Med. Res, 30: 473-477

136-Thakur C.P, Sinha G.P and Pandey A.K. 1996

Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar.  
Indian Journal of Medicine Research, 103 : 259-263

137-Thakur C.P, Kanyok T.P, Pandey A.K, Sinha G.P, Messic k.C and Olliaro P. 2000

Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine): an open-label randomized phase-II clinical study.  
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94 : 432-433

138-Vidor E, Dedet.J.P et Pratlong F. 1991

Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Etude d'une cohorte en région cévenole.  
Prat. Méd. Chir. Anim. Comp, 26 :133-137

**Soutenu le : 3 Avril 2008 à l'Université de  
Blida**