

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Sciences Vétérinaires

**LA LEISHMANIOSE FELINE DANS LA REGION D'ALGER :
GENOTYPAGE DE LEISHMANIA *INFANTUM* PAR LA METHODE PCR
(POLYMERASE CHAIN REACTION)**

Par

Mr DJOUDI .Mustapha

Devant le jury composé de :

M.LAFRI	Professeur	I.S.V. Blida	Président
M.KOUIDRI	M.C.A	I.S.V Tiaret	Examineur
H.ZIAM	M.C.A	I.S.V. Blida	Examineur
D.KHELLEF	Professeur	ENSV Alger	Examineur
R. KAIDI	Professeur	I.S.V. Blida	Promoteur
K .AIT-LOUDHIA	Professeur	ENSV Alger	Copromoteur

Blida, Mars 2019

RESUME

Entre 2011 et 2017, une enquête sérologique a été menée chez les chats dans la Wilaya d'Alger très peuplée et de plus en plus urbanisée, dans le but d'actualiser le niveau de séroprévalence de l'infection de la leishmaniose féline. Le premier volet a consisté à mener une enquête auprès des vétérinaires afin d'essayer d'étudier l'approche des praticiens face à des cas de leishmaniose puis de comparer 2 populations (canine et féline) exposées au même risque infectieux. Elle a permis aussi d'évaluer les facteurs de risque associés à la recrudescence de l'infection, d'étudier les signes cliniques caractéristiques et atypiques de la maladie, de déterminer le rôle des chats porteurs asymptomatiques dans la propagation de l'infection et d'identifier les espèces de *Leishmania* en cause isolées au cours de ce travail. Des échantillons de sérum ont été prélevés sur 50 chats et 50 chiens testés au Witness (test de diagnostic rapide) avec des prévalences de 36% pour les chats et 40% pour les chiens, puis sur 220 chats testés grâce aux tests ELISA et RT-PCR et enfin sur 754 chats et testés par techniques d'immunofluorescence indirecte (IFI), ELISA, immunoempreinte ou western-blot (WB) et par PCR. La prévalence globale était de 24,44%. Parmi les chats à diagnostic positif, 18,67% ne présentaient aucun signe clinique de la maladie et 69,72% présentaient une atteinte plus grave. Les principaux signes cliniques observés étaient une perte de poids, des lésions cutanées et une lymphadénopathie. L'analyse statistique a permis de démontrer qu'une relation directe existe entre l'âge, l'état corporel des chats, le milieu environnant et l'infection. Un zymodème a été identifié parmi 25 isolats : MON-1. Ce dernier zymodème est décrit pour la première fois à la fois en Algérie chez le chat.

MOTS CLES

Leishmaniose féline, *Leishmania infantum*, épidémiologie, enquête clinique et sérologique, PCR, formes cliniques, identification isoenzymatique.

ABSTRACT

Between 2011 and 2017, a serological survey was conducted among cats in the densely populated and increasingly urbanized Wilaya of Algiers, with the aim of updating the seroprevalence level of feline leishmaniasis infection. The first part consisted in conducting a survey of veterinarians in order to try to study practitioners' approach to cases of leishmaniasis and then to compare 2 populations (canine and feline) exposed to the same infectious risk. It also made it possible to evaluate the risk factors associated with the recrudescence of the infection, to study the characteristic and atypical clinical signs of the disease, to determine the role of asymptomatic carrier cats in the spread of the infection and to identify the *Leishmania* species involved isolated during this work. Serum samples were collected from 50 cats and 50 dogs tested with Witness (rapid diagnostic test) with prevalences of 36% for cats and 40% for dogs, then from 220 cats tested with ELISA and RT-PCR tests and finally from 754 cats tested with indirect immunofluorescence techniques (IFI), ELISA, immunoprint or western-blot (WB) and PCR. The overall prevalence was 24.44%. Among the cats with a positive diagnosis, 18.67% showed no clinical signs of the disease and 69.72% had more severe disease. The main clinical signs observed were weight loss, skin lesions and lymphadenopathy, and statistical analysis showed that there is a direct relationship between age, body condition, environment and infection. One zymodema was identified among 25 isolates: MON-1. This last zymodema is described for the first time both in Algeria in cats.

KEY WORDS

Feline leishmaniasis, *Leishmania infantum*, epidemiology, clinical and serological investigation, PCR, clinical forms, isoenzymatic identification.

ملخص

بين عامي 2011 و 2017 ، أجري مسح مصلي بين القطط في ولاية الجزائر العاصمة ذات الكثافة السكانية المتزايدة والمزدهرة ، بهدف تحديث مستوى الانتشار المصلي لعدوى الليشمانيا القططية. كان الجزء الأول يتألف من إجراء مسح للأطباء البيطريين من أجل محاولة دراسة نهج الممارسين في حالات داء الليشمانيات ومن ثم مقارنة 2 من السكان (الكلاب والقطط) تعرضوا لنفس الخطر المعدية. كما أنها مكنت من تقييم المخاطر العوامل المرتبطة بتدرج العدوى ، لدراسة العلامات السريرية المميزة وغير النمطية للمرض ، لتحديد دور القطط الحاملة لأعراض المرض في انتشار العدوى والتعرف على أنواع الليشمانيا المشاركة المعزولة خلال هذا العمل. تم جمع عينات مصلية من 50 قطط و 50 كلبًا تم اختبارها مع Witness (اختبار تشخيصي سريع) مع انتشار 36% للقطط و 40% للكلاب ، ثم من 220 قطط تم اختبارها مع اختبارات ELISA و RT-PCR وأخيرًا من 754 قطط تم اختبارها مع التقنيات المناعية غير المباشرة (ELISA ، IFI) ، المناعية أو اللطخة الغربية (WB) و PCR. كان الانتشار العام 24.44 % بين القطط مع التشخيص الإيجابي ، أظهر 18.67 % أي علامات سريرية للمرض و 69.72 % لديهم مرض أكثر شدة. كانت العلامات السريرية الرئيسية الملحوظة هي فقدان الوزن ، الأفات الجلدية واعتلال العقد اللمفية ، وأظهر التحليل الإحصائي وجود علاقة مباشرة بين العمر وحالة الجسم والبيئة والعدوى. تم التعرف على واحدة من zymodema بين 25 عزلة: MON-1. يتم وصفه zymodema للمرة الأولى في كل من الجزائر في القطط.

الكلمات الدالة

داء الليشمانيات الماكر ، الليشمانيا الرضع ، علم الأوبئة ، التحريات السريرية والسيروولوجية ، تفاعل البوليميراز المتسلسل ،

DEDICACES

Mes dédicaces vont avant tout à :

- Mon défunt fils EL AZHAR OUSSAMA parti trop tôt, à la fleur de l'âge, qu'il trouve ici tout mon amour et toute mon affection.
- Ma femme Fatiha Saliha et mes fils Bachir Adel et Mohamed Mehdi.
- Mes sœurs Keira et Yamina et leurs petites familles respectives.
- Ma tante Khadija, mon oncle Ahmed.
- Ma belle-mère Zoulikha.
- Mes beaux-frères Ahmed Youssef et Tarek.
- Mes cousines Zohra «Lulu» et Khadija.
- Toute ma famille et tous mes ami(e)s.

Merci pour votre soutien indéfectible !

REMERCIEMENTS

Je remercie ALLAH le tout puissant qui m'a inspiré qui m'a guidé dans le bon chemin et de m'avoir donné la santé et m'avoir permis d'arriver au jour d'aujourd'hui.

Mes remerciements vont à :

Monsieur LAFRI .M Professeur à l'université Blida 1 qui malgré ses occupations a bien voulu présider ce jury.

Madame KOUIDRI .M M.C.A ISV de Tiaret qui nous a fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.

Monsieur ZIAM .H M.C.A à l'ISV de Blida qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

Monsieur KHELLEF .D Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire El Harrach Alger qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

.Professeur KAIDI .R, mon directeur de thèse pour ce travail pour lequel il n'a cessé de m'épauler et de me prodiguer conseils et encouragements, merci Monsieur.

Professeur AIT-OU DHIA .K mon Co directeur de thèse pour tous les efforts qu'elle a bien voulu fournir pour la réalisation de ce travail et ses conseils judicieux. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle OUAkli .N pour sa présence, sa disponibilité, son soutien et son aide un grand merci.

Monsieur MENOUE RI .N. Professeur, directeur de l'ISV de Blida, pour son soutien et sa confiance, merci.

Monsieur BERRIATUA. Eduardo, Professeur, Faculté vétérinaire de Murcie, Espagne et tout son staff pour son soutien et sa contribution.

Monsieur BERBER .A . Professeur à l'ISV de Blida pour son soutien indéfectible.

Monsieur YAHIMI. A Maître de conférences à l'université BLIDA 1 pour son soutien et sa confiance, merci à lui et à son épouse DJELATA Nadia.

Monsieur ADEL .D et sa petite famille merci pour son aide précieuse.

Enfin, je tiens à remercier Mademoiselle ABADA Lila, SOUAD, Monsieur TCHANCHANE Samir, Monsieur CHAGHI Ali, Monsieur AIT ALI Yazid, Monsieur YAHIA. Achour, mon personnel du département clinique, »ER AIS «, tout le personnel de l'ISV et tant d'autres qui voudront bien m'excuser si je les ai oublié.

Sincères remerciements.

Résumé	
Dédicaces	
Remerciements	
Table des matières	
Liste des illustrations graphiques et tableaux	

TABLES DES MATIERES

Partie bibliographique	
INTRODUCTION.....	16
Chapitre 1 : La leishmaniose.....	20
1-GENERALITES.....	20
1.1- Définition	20
1.2-Importance.....	20
1.2.1 Médicale.....	20
1.2.2 Economique et sociale	21
1.2 – Réservoirs	21
2 – ETUDE DU PARASITE.....	21
2.1 – Taxonomie.....	21
2.2- Morphologie	23
2.3 - Biologie : Cycle évolutif	24
2.4 - Pouvoir pathogène.....	28
2.4.1- Antigènes majeurs du parasite	28
2.4.2 - Inoculation de souches félines à des animaux de laboratoire.....	28
2.4.3 - Réponse immunitaire.....	29
Chapitre II : Epidémiologie	31
1 – Epidémiologie descriptive.....	31
2-Epidémiologie analytique	31
2-1- Espèces réservoirs	31
2-2- Transmission.....	33
2-3- Facteurs favorisants	33
2.4 - Pathogénie	33
2.5- Symptômes	34
2.6 - Prévalence et incidence.....	36
2.6.1- Méthodes parasitologiques.....	36
2.6.2 - Méthodes sérologiques	38
2.6.3 - Prévalence et incidence cliniques.....	39
2.7 - Répartition géographique.....	40
2.7.1 - Variations saisonnières.....	42
2.7.2 - Réservoir félin.....	42
2.7.2.1 - Réceptivité du chat.....	42
2.7.2.1.1 - Facteurs intrinsèques.....	43
a) – Sexe.....	43
b)- Age.....	43
c) – Race.....	44
2.7.2.1.2 - Facteurs extrinsèque.....	44
a)- Mode de vie.....	44
b) – Environnement.....	44

c) - Infection par des rétrovirus.....	45
d) - Affections intercurrentes.....	45
e) - Contamination des phlébotomes à partir du chat.....	45
2.7.2.2 - Sensibilité du chat.....	48
Chapitre III : Etude clinique	53
1-Symptomatologie et traitement chez l'homme.....	53
1.1 – Symptômes.....	54
a-- Cutanés :.....	54
b- Généraux :.....	54
1-2- Diagnostic de confirmation	55
1-3- Traitement.....	55
1- Symptômes et lésions chez le chien	56
a) - Symptômes généraux [.....	56
b. Lésions cutanéomuqueuses.....	57
c. Lésions intéressant le système des phagocytes mononuclés.....	58
d. Lésions oculaires	58
e- Symptômes intéressant l'appareil urinaire.....	58
f. Symptômes digestifs	59
g. Lésions ostéo-articulaires.....	59
h. Modifications sanguines.....	59
h-1-Modifications humorales.....	59
h-2-Modifications cellulaires	59
i- Lésions atypiques.....	60
Symptômes chez le chat.....	60
a-Lésions cutanées.....	61
b- Signes oculaires.....	63
c- Signes généraux.....	63
Chapitre IV : Diagnostic	67
1- Diagnostic biologique	67
1-1- Méthodes non spécifiques	67
a-Examens hématologiques.....	67
b -Examens biochimiques	67
1-2- Méthodes spécifiques	68
a - Mise en évidence du parasite	68
α- Microscopie	69
β- Culture du parasite	69
Ω - PCR	70
c-2- PCR ou réaction d'amplification de gène (Polymerase Chain Reaction)	70
PCR en temps réel.....	70
SYBR Green I (agent intercalant).....	71
γ- Techniques d'immun marquage	72
b- Méthodes sérologiques	72
α - Immunofluorescence indirecte.....	72
β -ELISA	74
Ω - Techniques d'agglutination	75
α - Western Blot	75
2- Chez le chat.....	77
2-1-Diagnostic épidémio-clinique.....	77
2-2 - Diagnostic différentiel.....	77

2-2-1 - En présence de nodules	77
IV-2-2-2 - En présence d'ulcères	78
2-2-3. En présence d'adénomégalie	79
2-3 - Diagnostic de laboratoire.....	80
a- Signes biologiques.....	80
b- Examens directs.....	81
b-1- Examens cytologiques	81
b-2- Examens histologiques.....	81
b-3- Mise en culture.....	82
b-4- Inoculation à des animaux de laboratoire.....	82
c - Méthodes indirectes.....	83
c-1- Sérologie.....	83
Chapitre V : Immunologie	86
V-1 réponse immunitaire chez le chat.....	86
V-2- Rôle de la salive du vecteur	89
Chapitre VI : Traitement & Evolution	92
1 - Traitement de la leishmaniose canine	92
1.1- Décision thérapeutique	92
a- Considérations préalables	92
b- Leishmaniose canine et santé publique	93
c- Thérapeutique spécifique	93
2.2-1 - Molécules actives sur les leishmanies	95
a) Antimoniote de méglumine.....	95
b) Allopurinol.....	95
c) Pentamidine.....	95
d) Amphotericine B.....	95
e) Aminosidine (paromomycine).....	96
f) Spiramycine associée au Métronidazole.....	96
g) Fluoroquinolones.....	96
h) Dérives de l'imidazole.....	96
i) Millefosine.....	96
2.2-2- Traitement chez le chien	97
3- Suivi des cas de leishmaniose féline.....	97
3-1-Chats non traités.....	97
3-2- Chats traités contre la leishmaniose.....	98
Partie expérimentale	100
I-Introduction & Objectifs.....	100
1-Pré-enquête :.....	102
1-2-Matériel	104
1-3-Méthode	104
1-4-1-Résultats de l'enquête :.....	106
1/Etude rétrospective sur l'expérience professionnelle des vétérinaires sondés dans la région d'Alger.....	107
2/Etude rétrospective sur la fréquence de la leishmaniose auprès des vétérinaires sondés selon les saisons.....	107
3/ Etude rétrospective sur le diagnostic de la leishmaniose.....	108
4/Etude rétrospective sur la décision thérapeutique des vétérinaires sondés lors de leishmaniose.....	109
1-4-2- Discussion du pré enquête.....	110

Deuxième partie : test de diagnostic rapide Witness	113
2-1-Etude sérologique par le test WITNESS Leishmania.....	114
2-2-1- Principe du test	114
2-2-2 -Protocole opératoire (voir annexe D)	115
2-2-3-Résultats de l'examen clinique.....	117
2-2-4- Analyses des prélèvements.....	125
Discussion	134
Troisième partie : Troisième partie : tests ELISA et RT-PCR.....	138
3-1 : Résultats	138
3-1-1 : Lésions observées :.....	138
3-2--2-Résultats de la technique ELISA.....	139
3-2-3- Résultats des échantillons par la technique ELISA	139
3-3-Analyse statistique	141
3-4-Résultats qPCR.....	148
Discussion.....	150
Quatrième partie : tests ELISA, IFAT, WB et RT-PCR.....	153
4-Matériels et Méthodes	153
4-1- Présentation de la région d'étude.....	153
4-2- Population féline étudiée	154
4-2-1-Méthode d'échantillonnage.....	154
4-2-2- Examen clinique	155
4-2-3-Prélèvement du matériel biologique.....	156
4-2-3-1-Prélèvement de sang.....	156
4-2-3-2-Ponction ganglionnaire.....	156
4-2-3-3-Biopsie cutanée.....	157
4-2-4-Tests sérologiques.....	157
4-2-4-1-Immunofluorescence Indirecte (IFI)	158
4-2-4-2-Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA).....	159
4-2-4-3-Western Blot.....	159
4-2-4-4- PCR (Polymerase Chain Reaction).....	160
a-Extraction d'ADN	160
b-PCR en temps réel	160
4-5-Identification des parasites.....	161
4-5-1- Isolement et cryoconservation des souches	161
4-5-2- Analyse iso-enzymatique.....	161
4-6-Analyse statistique	163
4-7-Résultats et discussion.....	165
4-7-1-Prévalence Globale.....	165
4-7-2- Résultats de l'étude clinique.....	169
4-7-3-Etude des facteurs de risque.....	173
4-7-4- Résultat de l'analyse iso-enzymatique.....	175
4-8-Discussion.....	177
4-8-1-Prévalence globale.....	177
4-8-2-Détection de la maladie et de l'infection.....	178
4-8-3-Rôles des chats asymptomatiques et manifestations cliniques.....	184
4-8-4- Facteurs de risque.....	186
4-8-5- Typage enzymatique des isolats et importance de l'identification.....	187
4-8-6-Conclusion.....	189

CONCLUSION GENERALE.....	190
RECOMMANDATIONS.....	192

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Répartition mondiale des zones d'endémie de la leishmaniose cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale	20
Figure 1.2 : Forme promastigote	24
Figure 1.2 : Formes amastigotes.	24
Figure 1.3 : Figure 1-3 : cycle évolutif de la leishmaniose	24
Figure 1-4 : Exemples de molécules supposées impliquées dans l'infectiosité	25
Figure 1-5 : Aspect général de <i>Phlebotomus papatasi</i> .	26
Figure 2-1 : Organigramme proposé pour l'étude du rôle du chat	32
Figure 2-2 : Répartition Mondiale de la Leishmaniose	40
Figure 2.3 : Carte de répartition des cas de leishmaniose féline rapportés..	41
Figure 2-4 : Espèces de <i>Leishmania</i> identifiées chez le chat	47
Figure 3.1- Cycle anthroponotique chez l'homme	53
Figure 3.2 : symptômes chez l'homme	54
Figure 3.3 - Diagnostic parasitologique de confirmation	55
Figure 3.4 : Aspect général de chiens atteints de leishmaniose	56
Figure 3.5 : Ulcères cutanés	57
Figure 3.6 : Chancre d'inoculation, ulcère	61
Figure 4.1 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien	68
Figure 4-2 : technique IFI	73
Figure 4-3 : principe du test l'IFI	74
Figure 4-4 : Image d'une membrane de western blot	76
Figure 4.5 : Réaction IFI négative	85
Figure 5-1 : Réponse immunitaire suggérée du félin	86
Figure 5-2 : Différenciation des lymphocytes T CD4+	89

2. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Symptômes observés lors de leishmaniose canine	35
--	----

Tableau 2-2 : <i>Leishmaniose féline-Méthodes parasitologiques</i>	37
Tableau2-3 - <i>Leishmaniose féline : Méthodes sérologiques</i>	39
Tableau 3-1 : <i>Evolution des lésions sur des chats infectés expérimentalement avec Leishmania braziliensis</i>	61
Tableau 3.2 : Nombre de cas observés en fonction des différents sites lésionnels.	62
Tableau 3.3 : <i>Types lésionnels rencontrés lors de leishmaniose féline</i>	62
Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des signes généraux rencontrés dans les cas de leishmaniose féline	64
Tableau 3-5 : comparatif chiens chats des anomalies cliniques	65
Tableau4.1 : Paramètres sanguins renseignés dans les cas publiés et répertoriés	80
Tableau 5.1 : Propriétés de la salive du phlébotome	90
Tableau6.1: Nom et protocole d'utilisation des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine	94
Tableau 6.2: <i>Liste de molécules citées leishmanicides ou leishmaniostatiques</i>	95
Tableau 6.3- Molécules utilisées : Evolution chez les chats traités	98

PARTIE EXPERIMENTALE

1. LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Wilaya d'Alger et ses 57 communes	103
Figure 1.2 : Expérience professionnelle des vétérinaires	107
Figure 1.3 : Fréquence de la leishmaniose selon les saisons	108
Figure 1.4 : Diagnostic de la pathologie	109
Figure 1.5 : Décision thérapeutique	110
Figure 2.1 : Kit Witness leishmania	115
Figure 2.2 : Mode opératoire de la technique du test Witness	115
Figure 2.3 : Lésions observées chez les chiens (photos personnelles)	119
Figure 2.4 : Distribution des lésions chez les chats	122
Figure 2.5 : Lésions observées chez les chats (photos personnelles)	123
Figure 2.6: Représentation des effectifs des chiens prélevés selon l'âge et le sexe	124
Figure 2.7 : Représentation des effectifs des chats prélevés en fonction de l'âge	125

et du sexe

Figure 2.8 : Cas positifs selon le sexe : nombre et fréquence	127
Figure 2.9 : Nombre des cas positifs selon le sexe	128
Figure 2.10 : Pourcentage des cas selon le sexe	129
Figure 2.11 : Nombre des cas selon le sexe et l'âge	129
Figure 2.12 : Pourcentage des cas positifs selon le sexe et l'âge	129
Figure 2.13 : Nombre des cas positifs selon âge et sexe	130
Figure 2.14 : Pourcentage des cas selon sexe et âge	130
Figure 2.15 : Répartition des lésions en fonction du sexe (Chiens)	131
Figure 2.16 : Répartition des lésions en fonction du sexe (chats)	132
Figure 2.17 : Répartition des lésions en fonction de la race (Chiens)	133
Figure 3.1 : chats testés (photos personnelles)	138
Figure 3.2: Résultat du test ELISA (photos personnelles)	139
Figure 3.3: Effectifs chats testés	140
Figure 3.4 : Répartition des cas positifs et négatifs en fonction de l'âge	141
Figure 3.5 : Fréquence ELISA selon le sexe	142
Figure 3.6: Fréquence selon le sexe	143
Figure 3.7 : Fréquence en fonction de l'âge (1 à 3 ans)	144
Figure 3.8 : Fréquence en fonction de l'âge (4 à 6 ans)	145
Figure 3.9 : Fréquence en fonction de l'âge (plus de 6 ans)	146
Figure 3.10 : Extraction de l'ADN (photos personnelles)	148
Figure 3.11 : PCR en temps réel (photo personnelle)	149
Figure 4.1 : lésions cutanées	164
Figure 4.2 : état corporel	164
Figure 4.3 : lymphadénopathie	164
Figure 4.4 : Western blots de sérums douteux des chats naturellement infectés	166
Figure 4.5 : Performances techniques de la RT-PCR Leishmania	168
Figure 4.6 : âge des chats	169
Figure 4.7 : sexe des chats	169
Figure 4.8 : style de vie	169
Figure 4.9 : état corporel	169
Figure 4.10 : Chat leishmanien	172
Figure 4.11 : Chancre d'inoculation au niveau du chanfrein	172

Figure 4.12 : Chat leishmanien (Dépilation et ulcération)	172
Figure 4.13 : Chat leishmanien (anémie)	173
Figure 4.14 : Mobilité électrophorétique sur gel épais d'amidon	176

2. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Comparaison des résultats des enquêtes sur la leishmaniose canine	103
Tableau 2.1 : Signes cliniques des chiens positifs aux tests	118
Tableau 2.2 : Classement des lésions des chiens positifs	119
Tableau 2.3 : Signes cliniques des chats positifs au test Witness	121
Tableau 2.4 : Classement des lésions des chats positifs	122
Tableau 2.5 : Pourcentage des lésions par rapport à l'effectif des chats prélevés	123
Tableau 2.6 : Effectifs des chiens prélevés selon âge et sexe (Chiens)	125
Tableau 2.7 : Effectifs des chats prélevés selon âge et sexe (Chats)	126
Tableau 2.8: Test Witness (Chats)	127
Tableau 2.9 : Test Witness selon le sexe (Chiens)	128
Tableau 2.10: Cas positifs selon le sexe et l'âge (Chats)	129
Tableau 2.11 : Cas positifs selon le sexe et l'âge (Chiens)	130
Tableau 2.12 : Répartition des lésions selon les cas positifs (Chiens)	131
Tableau 2.13 : Répartition des lésions selon les cas positifs (Chats)	132
Tableau 2.14 : Distribution des lésions selon la race (Chiens)	133
Tableau 3.1 : Effectif global des chats testés	140
Tableau 3.2 : ELISA en fonction de l'âge	141
Tableau 3.3 : Fréquence selon le sexe	143
Tableau 3.4 : Fréquence en fonction des tranches d'âge de 1 à 3 ans	144
Tableau 3.5 : Fréquence en fonction de l'âge (4 à 6 ans)	145
Tableau 3.6 : Fréquence en fonction de l'âge (> 6 ans)	146
Tableau 4.1 : Répétabilité et reproductibilité de la technique RT-PCR	167
Tableau 4.2 : Prévalence de l'infection selon les formes cliniques	170
Tableau 4.3 : signes cliniques des chats prélevés	171
Tableau 4.4 : Prévalence de l'infection chez les chats	174
Tableau 4.5 : Synthèse des sensibilités /spécificités des examens para-cliniques	180

INTRODUCTION

L'homme a de tous temps été à l'origine de modifications du milieu dans lequel il évolue. Ainsi, les changements structuraux du paysage, des pratiques sanitaires et écologiques ainsi qu'éco-climatiques sont autant de facteurs pouvant influencer sur la répartition des maladies vectorielles et sur leurs modalités de transmission.

En Algérie nous assistons malheureusement à l'instar de beaucoup de pays dans le monde, à tous ces changements. C'est ainsi que nous remarquons une urbanisation galopante et des pratiques non civiques conduisant à l'émergence de nouveaux biotopes favorisant la propagation de maladies vectorielles telle que la leishmaniose déjà à l'état endémique dans notre pays.

La leishmaniose causée par *Leishmania infantum* est une zoonose de l'Ancien et du Nouveau Monde et les chiens sont considérés comme le principal réservoir du parasite chez les humains [1].

D'autres espèces ont été identifiées comme réservoirs probables de *L. infantum*, en particulier le lièvre et le lapin [2] [3] et le chat [4] [5] [6].

Selon l'état actuel des connaissances, les chats sont très probablement considérés comme un hôte réservoir secondaire pour *L. infantum*, plutôt que comme un hôte accidentel, ce qui ne permettra pas de supporter une infection persistante dans un milieu naturel si l'hôte principal du réservoir est absent.

Autrement dit, les chats seuls ne seraient pas responsables de la persistance de *L. infantum* dans une région où la transmission de la maladie est possible avec des taux d'infection élevés et l'existence de vecteurs compétents en l'occurrence le phlébotome sans la présence de chiens infectés [7].

Au cours des dernières années, plusieurs signalements d'infection naturelle par *L. infantum* ont été décrits en Europe, au Moyen-Orient et au Brésil [8] ; [9]. [10] [11] [12].

Lorsque la séroprévalence chez les chats a été comparée à la séroprévalence dans la population canine de la même région, on a constaté que les chats étaient moins souvent séropositifs que les chiens de la même région. [13] [14] [15] [17] [18] La

prévalence des anticorps chez les chats se situe entre 0 et 68,5 % et la prévalence de la PCR sanguine (réaction de polymérase en chaîne) entre 0 et 60,6 % chez les chats vivant dans des régions où l'infection canine et/ou humaine par *L. infantum* est endémique [18] [19] [4] [20] [21]. [22] [23]

[24] [25] [26] [27]. Cette variabilité peut être due à différents niveaux d'endémicité, au type de populations félines étudiées ou à différentes méthodologies.

L'infection par *Leishmania spp.* chez le chat a été détectée pour la première fois en 1912 en Algérie [29]

.Depuis lors, des cas cliniques de leishmaniose féline ont été signalés, principalement dans des zones où la pathologie est endémique. L'infection par différentes *Leishmania spp.* chez le chat a été signalée dans de nombreux pays.

Bien que l'infection naturelle chez le chat par *Leishmania spp.* semble être rare. La faible prévalence de la leishmaniose féline pourrait s'expliquer par une sous-déclaration ou par une résistance naturelle du chat à cette infection [30]

La leishmaniose est transmise par le phlébotome [31] cependant, le rôle épidémiologique du chat reste à clarifier.

Certains auteurs considèrent que le chat est un hôte accidentel de cette infection, alors que d'autres considèrent qu'il s'agit d'un hôte secondaire d'autres suggèrent que les félidés peuvent servir d'hôtes potentiels d'un réservoir péri-domestique [32]

Les signes cliniques causés par cette infection chez le chat ne sont pas bien définis, mais ils semblent similaires à ceux observés chez le chien.

La leishmaniose chez le chat peut causer des formes cutanées et viscérales de la maladie, bien que la forme cutanée soit la plus courante.

Les altérations oculaires sont également fréquentes au cours de la leishmaniose, en particulier l'uvéite. Dans certains rapports, la leishmaniose féline a été associée à des infections par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) et le virus de la leucémie féline (FeLV) [33] mais cette association n'a pas été confirmée.

En Espagne, la première infection à la leishmaniose chez le chat a été décrite en 1933. [34]

Depuis lors, des cas cliniques sporadiques de leishmaniose cutanée et viscérale féline ont été signalés [35]

[36] Il existe des données épidémiologiques qui indiquent que les anticorps contre *L. infantum* sont courants dans la population féline de certaines régions d'Espagne.

Certaines études sérologiques ont montré des prévalences sérologiques allant de 1,7 à 60 %. 5, 10 Certains chats positifs ont également présenté des résultats positifs au test PCR de Leishmaniose.

La leishmaniose féline (FeL) causée par le Li [31] apparaît comme une maladie féline émergente, en fait, au cours des deux dernières décennies, elle a été de plus en plus fréquemment signalée dans les zones endémiques et sporadiquement observée aussi dans les zones non endémiques chez les chats accueillis [37] ;

[38] [39] [40]

[41] Cependant, le niveau accru de soins médicaux donnés aux chats a contribué à "l'émergence" du FeL ainsi qu'à la disponibilité d'outils de diagnostic plus sensibles et aux progrès dans la compréhension des interactions parasite-hôte-vecteur ([42]

Ces dernières années, des informations plus détaillées sur le FeL ont été publiées et il est de plus en plus évident qu'il existe de plus en plus d'informations sur le FeL. [1]

Ainsi les travaux de Carla MAIA et al ont permis grâce à l'analyse des enzymes de restriction chez un chat souffrant d'un carcinome épidermoïde nasal de révéler la présence du génotype E, précédemment identifié chez les humains et les chiens vivant dans la même région. (2015 Carla Maia, Cristina Sousa, Cláudia Ramos, José Manuel Cristóvão, Pedro Faísca and Lenea Campino First case of feline leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma)

En Algérie, la leishmaniose féline (Lf) représente un défi sanitaire dont la problématique est d'ordre préventif.

Peu de travaux ont fait l'objet de recherches de cette pathologie chez cette espèce qui pourrait représenter un réservoir secondaire d'une maladie déjà à l'état endémique.

Dans notre culture arabo-islamique et dans nos traditions, le chat a de tous temps été « sacralisé » et tient une place prépondérante dans notre société, faisant de cet animal un compagnon proche de l'homme à tel point que ce dernier fait fi par ignorance de tous les dangers que pourrait représenter ce félin domestique pour sa santé (ex :la toxoplasmose dont il est le principal réservoir).

L'objectif de ce travail est de s'interroger sur le fait que le chat (chats errants notamment) dans une région donnée (Alger et ses 57 communes), puisse héberger le parasite responsable de la leishmaniose et ce grâce à l'utilisation d'outils de diagnostic sérologique tel que les tests ELISA, WB et IFAT ; dans le même temps une analyse PCR est effectuée afin de mettre en évidence l'espèce de Leishmania.

CHAPITRE 1 :

LA LEISHMANIOSE

1. GENERALITES

1.1 Définition

La leishmaniose a été découverte à Biskra Algérie en 1910 par les frères Ed et EtSergent, les travaux sur la maladie avaient été entrepris dès 1904 au niveau de l'IPA. (Sergent Ed & Sergent Et, 1910).

La leishmaniose canine est une protozoose infectieuse, inoculable exceptionnellement contagieuse, due au développement et à la multiplication dans les cellules du SPM (Système des Phagocytes Mononuclés) de parasites du genre *Leishmania* transmis par la piqure d'un insecte vecteur, le phlébotome [43].



Figure 1-1 : Répartition mondiale des zones d'endémie de la leishmaniose [44]

1.2. Importance

L'importance de la leishmaniose est multiple :

1.2.1 Médicale

La leishmaniose affecte de nombreux chiens en zone d'endémie et, sa prévalence comme son incidence sont relativement élevées. La prévalence sérologique peut atteindre 30% à 40% de chiens selon les zones étudiées et, l'incidence est notable. L'importance médicale est majorée par la difficulté du diagnostic, liée à l'existence de chiens porteurs asymptomatiques, à une longue durée d'incubation et, à une expression clinique protéiforme.

1.2.2 Economique et sociale

L'importance économique de la leishmaniose est liée aux coûts engendrés par la recherche de diagnostic (consultations, examens complémentaires) mais aussi par le traitement fastidieux, long (souvent à vie) et dispendieux. Dans le meilleur des cas, la guérison n'est que clinique : l'animal n'est jamais stérilisé de ces parasites et restera porteur à vie

Concernant la leishmaniose humaine, les coûts relatifs aux consultations, aux examens de laboratoire, aux soins, aux journées d'hospitalisation et au traitement sont tels que dans certains pays le budget qui leur est consacré dépasse celui des soins de santé publique [1].

L'importance sociale est liée au fait que la leishmaniose canine est une zoonose majeure, parfois mortelle. La leishmaniose viscérale méditerranéenne n'est plus comme autrefois une maladie de l'enfant mais s'exprime la plupart du temps chez des sujets immunodéprimés de façon iatrogène (traitements immunosuppresseurs pour les greffes, corticoïdes, anticancéreux [46]) ou de façon pathologique (coinfection par le virus de l'immunodéficience acquise VIH [47]). Le chien représente le principal réservoir, mais l'homme co-infecté a été en mesure d'infecter le phlébotome [48]. Ceci laisse supposer qu'à l'avenir des transmissions directes d'homme à homme pourraient se produire.

1.2 - Réservoirs

Le réservoir de *Leishmania infantum* est connu depuis la découverte princeps de Nicolle & Conile à Tunis en 1908, comme étant essentiellement canin. Dans toute la région méditerranéenne, le réservoir principal semble être constitué par les chiens

domestiques [49], bien qu'un réservoir sylvatique soit également présent avec une prévalence de 55% chez les renards [50].

Dunan et al [51] ont signalé la présence chez le chat (*Felis felis*) de *Leishmania* dans des foyers de leishmaniose canine. De plus des travaux expérimentaux ont démontré qu'une réponse sérologique significative du chat au parasite inoculé par voie intraveineuse existe, sans que l'animal ne présente des signes cliniques [52]. Quelques rares cas de rongeurs ont été trouvés infestés par *Leishmania infantum*, notamment le rat [53].

2 – ETUDE DU PARASITE

2.1 - Taxonomie

L'infection est due à un protozoaire flagellé, *Leishmania spp.*, appartenant à l'ordre des *Kinetoplastida*, et à la famille des Trypanosomatidés.

PHYLUM : Protozoaires

SUB-PHYLUM : *Sarcomastigophora* (Protozoaire présentant un appareil locomoteur)

CLASSE : *Zoomastigophora* (Protozoaire possédant un ou plusieurs flagelles)

ORDRE : *Kinetoplastida* (Possède un kinétoplaste, au maximum 2 flagelles, sans d'axostyle)

FAMILLE Trypanosomatides (Protozoaire possédant un seul flagelle)

GENRE: *Leishmania*

Différentes espèces de leishmanies responsables de leishmanioses félines ont pu être identifiées : *Leishmania venezuelensis* au Venezuela [54], *Leishmania mexicana* au Texas [55], *Leishmania major* en Egypte [56], *Leishmania panamensis* [57] et *Leishmania braziliensis* [58] au Brésil, *Leishmania infantum* dans le Sud de la France [59]; [60], en Italie [61]; [62], et au Brésil [63]. Ces résultats concordent avec les espèces de leishmanies circulant dans ces régions, excepté pour *Leishmania*

chagasi (= *Leishmania infantum*) identifiée chez un chat à Sao Paolo, ou aucun cas de leishmaniose canine ou humaine n'avait encore été rapporté [64].

Des méthodes biochimiques permettent de différencier les leishmanies par leur équipement enzymatique. Par analyse électrophorétique des enzymes, on obtient pour chaque souche de leishmanies un profil enzymatique caractéristique appelé zymodeme : noté MON (comme Montpellier, centre de référence), suivi d'un numéro spécifique. En Italie, sur 5 chats, 3 zymodemes différents ont été typés : MON1 (3 chats), MON72 et MON201. En France, *L. infantum* MON1 a été identifié sur 3 chats testés : ce zymodeme étant le plus largement répandu en Europe [65].

2.2- Morphologie [66]

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés dimorphes présentant :

- Forme promastigote, allongée, de 15 à 20 μm de longueur, avec un flagelle libre. Cette forme mobile est observée uniquement chez le vecteur et en culture.
- Forme amastigote, globuleuse, de 4 μm de diamètre, avec un flagelle intracytoplasmique appelé rhizoplaste. Cette forme est observée dans les cellules du système des phagocytes mononucléés (S.P.M), au sein d'une vacuole parasitophore de l'hôte définitif (Principalement chien et homme).

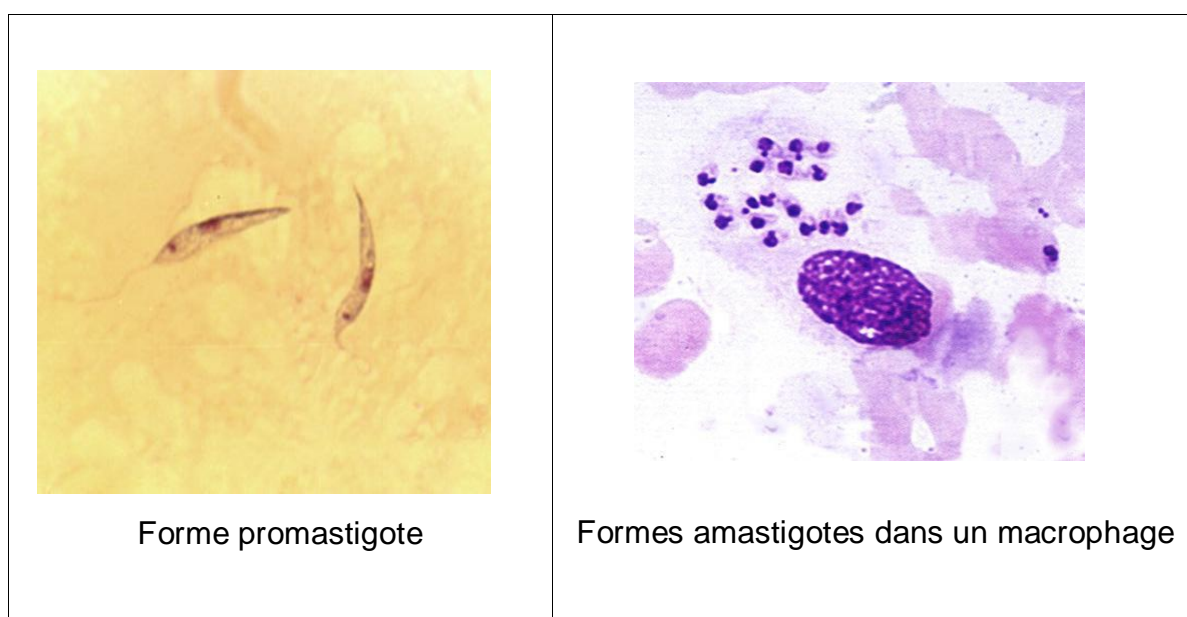


Figure 1-2 : Morphologie des Leishmanies (Instruction-cvhs.okstate.edu)

2.3 - Biologie : Cycle évolutif

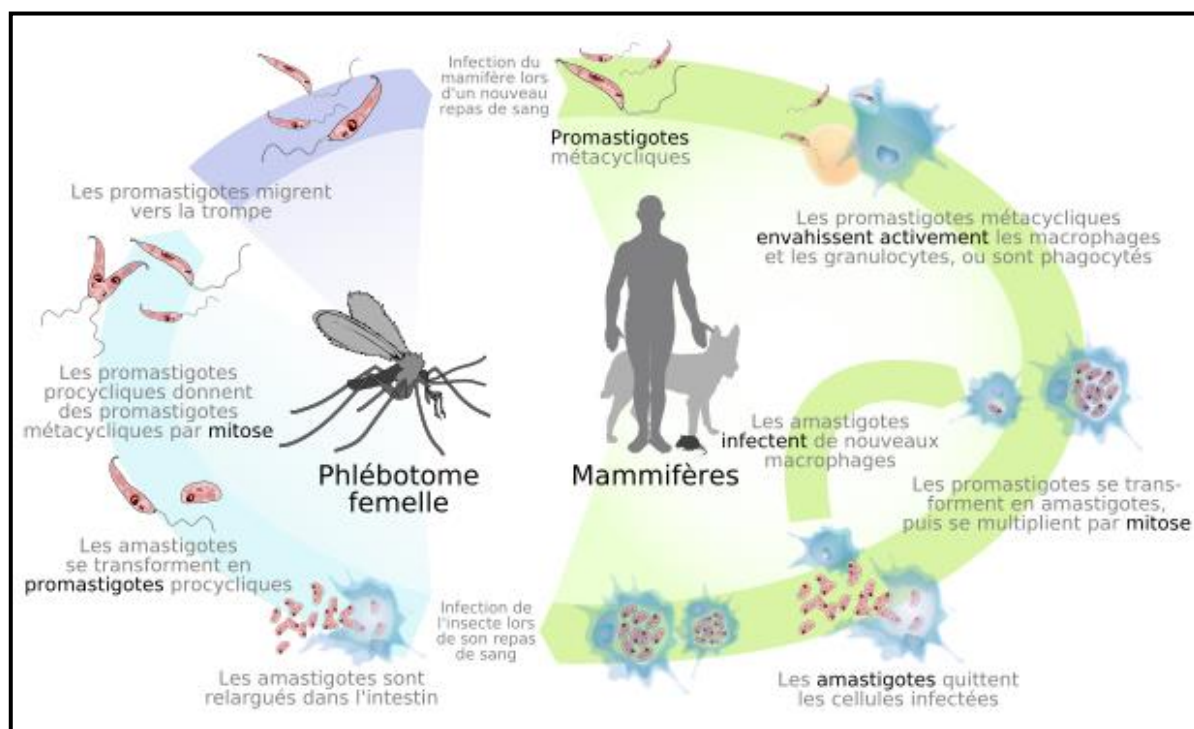


Figure 1-3 : cycle évolutif de la leishmaniose (Wikipedia).

Le cycle biologique des leishmanies est dixéne, avec un vecteur hôte intermédiaire et un hôte définitif. Le vecteur est représenté par un insecte hématophage : le phlébotome, et l'hôte par un mammifère (généralement un chien ou un homme).

Chez l'hôte vertébré, les leishmanies survivent et se multiplient par bipartition sous forme amastigote dans les cellules du système des phagocytes mononuclées (macrophages, histiocytes, cellules réticulaires de la rate, des ganglions, de la moelle osseuse, cellules de Kuppfer du foie, et les monocytes). Leur prolifération entraîne l'éclatement des cellules parasitées et la généralisation de l'infection dans l'organisme de l'hôte.

La femelle du phlébotome s'infecte lors du repas sanguin à partir des formes amastigotes qui se transforment en promastigote. Les leishmanies se multiplient alors par scissiparité dans l'intestin moyen avant de subir une évolution suprapylorique. Les promastigotes remontent vers les pièces buccales et réinfectent un nouvel hôte lors d'un autre repas sanguin, redonnant des formes amastigotes.

L'hôte principal est représenté par les canidés, principalement le chien. La place des canidés sauvages, et en particulier du renard, dans le cycle du parasite n'est pas encore entièrement déterminé [67]. D'autres mammifères peuvent être porteurs de leishmanies et constituer des réservoirs secondaires, en particulier les rongeurs. La place du chat en tant qu'hôte reste méconnue.

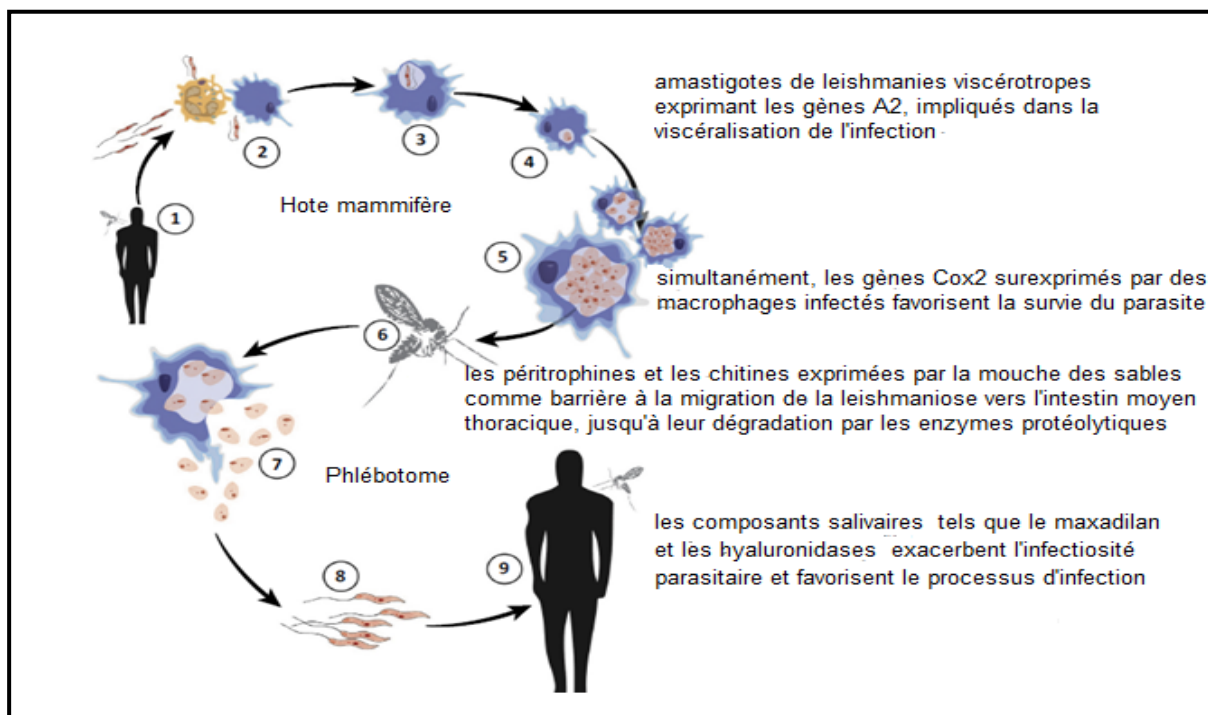


Figure 1-4 : Exemples de molécules supposées impliquées dans l'infectiosité parasitaire et la viscéralisation de l'infection. Cinzia Cantacessi¹, Filipe Dantas-Torres^{2, 3}, Matthew J. Nolan⁴, and Domenico Otranto. 2015

La figure 1-4 décrit les différents stades de l'infection par *Leishmania*, ainsi les mouches des sables de *Phlebotominae* libèrent les stades infectieux de la Leishmaniose (c.-à-d. le métacyclique) aux hôtes mammifères pendant l'alimentation sanguine (1) ; les parasites envahissent les macrophages et les granulocytes (2 et 3) et se développent en amastigotes à l'intérieur du phagolysosome (4) ; les stades amastigote se reproduisent dans le phagolysosome par simple division (5) ; ensuite, les macrophages contenant des amastigotes sont ingérés par les phlébotomes pendant le repas sanguin (6) ; les parasites sont libérés par les macrophages infectés dans l'intestin moyen des insectes (7), où ils se transforment en promastigotes procycliques et se divisent. Ensuite, les parasites migrent vers la valve stomodale (intestin moyen antérieur) et se transforment en différents sous-types de

promastigote qui forment finalement des promastigotes métacycliques (8). Ces stades infectieux sont ensuite libérés dans un nouvel hôte mammifère lors d'un repas sanguin ultérieur (9)[15,25,36,71]. Abréviation : Cox2, prostaglandine-endoperoxydase 2.

Le vecteur est le phlébotome, insecte diptère de la famille des Psychodides et du genre *Phlebotomus*. Seule la femelle est hémaphage, donc susceptible de véhiculer la leishmaniose cette faculté pourrait être utilisée pour lutter contre la leishmaniose par l'introduction de mâles stériles. Les phlébotomes ont une activité crépusculaire et nocturne, en région chaude et en l'absence de vent. Parmi les quatre espèces vectrices de *Leishmania infantum* en Europe,

P. perniciosus est l'espèce la plus largement répandue, du Portugal à la Grèce, *P. ariasi* étant rencontrée du Portugal au nord-ouest de l'Italie. En Europe orientale, la leishmaniose peut être transmise par *P. perfiliewi* et *P. neglectus*. D'autres espèces jouent ponctuellement le rôle de vecteur [68].

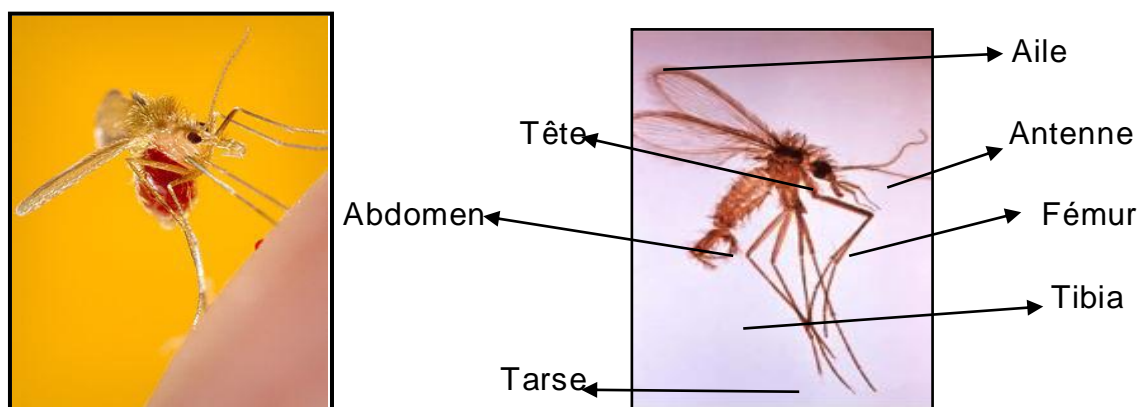


Figure 1-5 : Aspect général de *Phlebotomus papatasi* (Wikipedia)

La femelle phlébotome est hémaphage : elle se nourrit d'un mélange de sang et de lymphes formé à la suite d'une piqûre, assurée par des pièces buccales de fort calibre. Ce repas s'effectue de manière interrompue, à la suite de plusieurs piqûres, sur le même individu ou non. Le repas se compose aussi de l'absorption de sucres obtenus en particulier à partir de sève végétale. Cet apport se révèle d'ailleurs

indispensable à la transformation et à la multiplication des leishmanies dans le tube digestif du phlébotome [5].

La salive inoculée est allergisante (érythème, douleur) et participe activement à l'installation et à la multiplication des leishmanies chez l'hôte [68].

La transmission s'effectue à la faveur d'une pique par un phlébotome infecté lors d'un repas précédant sur un hôte porteur de leishmanies. Des « couples leishmanie/phlébotome ont été identifiés et, dans de nombreux cas, espèce de phlébotome vecteur d'une espèce de *Leishmania* ne permet pas le développement et la transmission d'une autre espèce de *Leishmania*. Chez le chien, de rares cas déclarés en zone non endémique mais ayant côtoyé des chiens leishmaniens laissent supposer la possibilité d'une transmission de la maladie par contact direct. La contamination in utero et par accouplement est possible. Chez l'homme le parasite peut être transmis par des aiguilles souillées ou par transfusion [29].

La longévité de ces insectes est de l'ordre de quelques mois. Un cycle gonotrophique³ complet dure environ 6 semaines. La femelle ne prend qu'un seul repas sanguin par cycle. Au moins 6 jours après ce repas de sang, elle pond entre 80 et 100 œufs qu'elle dépose dans un gîte humide, sombre et sablonneux. Quatre stades larvaires se succèdent ensuite et aboutissent à la formation d'une nymphe qui évoluera en imago. La survie hivernale est assurée par les stades larvaires en diapause. Les adultes apparaissent au printemps et sont présents pendant toute la période estivale, jusqu'à l'automne. Toutefois la longévité des adultes varie d'un endroit à un autre, en fonction des conditions climatiques [5], [28].

A l'heure actuelle, chez le chat, rien n'a été démontré, et aucune infection expérimentale n'a été réalisée en utilisant des phlébotomes, mais seulement des voies intraveineuses [13] et intradermiques [30]. Après la transmission des leishmanies au chat, leur pouvoir pathogène est susceptible de s'exprimer.

2.4 - Pouvoir pathogène

La pathogénie de la leishmaniose est complexe et méconnue chez le chat. Elle repose sur les caractéristiques antigéniques du parasite et sur des mécanismes qui ont été étudiés à partir de modèles expérimentaux.

2.4.1- Antigènes majeurs du parasite [31]

Les leishmanies possèdent de nombreux antigènes de surface, dont certains sont communs à d'autres protozoaires. Certains de ces antigènes jouent un rôle clef dans la réponse immunitaire, la GP 63 et le LPG.

- GP 63

Il s'agit de la glycoprotéine majeure de surface de la leishmanie. Elle intervient dans le processus d'échappement du parasite au système de défense de l'hôte et dans sa capacité à le coloniser. Cette glycoprotéine est capable d'induire une réaction immunitaire favorable.

Elle constitue un des antigènes majeurs présentés par les cellules présentatrices d'antigènes au système immunitaire.

- LPG

Le LPG, ou lipophosphoglycane, est un antigène présent à la surface des formes promastigotes de certaines espèces de leishmanies. Il permet la fixation des parasites aux cellules intestinales des phlébotomes. Le LPG varie d'une espèce de leishmanie à une autre et explique l'existence de « couples » conditionnés entre certaines espèces de phlébotomes et certaines espèces de leishmanies.

2.4.2 - Inoculation de souches félines à des animaux de laboratoire

En 1933, Mac Hattie *et al.* Cités par [32] isolent *Leishmania tropica* à partir de lésions cutanées de deux chats leishmaniens irakiens. Aucun parasite n'est retrouvé dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les souches d'un des deux chats sont cultivées sur milieu NNN (Nicolle, Novay, Mc Neal) puis inoculées à des souris blanches par scarification au niveau de la queue. 30 jours plus tard, les frottis de queue, foie, rate, moelle osseuse sont négatifs. D'autres souris blanches sont infectées parallèlement avec deux souches canines. Ces souris développent des lésions au

point d'inoculation de la queue, et de nombreuses leishmanies sont observées dans la rate et la moelle osseuse. Ils en déduisent que le passage de *L. tropica* chez le chat semble atténuer sa virulence.

En 1986, Craig *et al.* [33] inoculent *Leishmania mexicana* isolée d'un chat atteint de leishmaniose cutanée à des hamsters et à un chien. Un premier lot de hamsters est infecté par voie intradermique au niveau du museau ; ils observent le développement de lésions avec la présence de leishmanies. Un second lot est infecté par voie intrapéritonéale ; ils rapportent l'apparition de lésions sur une oreille et un membre postérieur, avec la présence de leishmanies qui sont également retrouvées dans les nœuds lymphatiques parotidiens. Après inoculation au chien par voie intradermique, ils notent une lésion sur l'oreille, semblable à celle observée chez le chat, mais ne contenant pas de leishmanies et guérissant spontanément. Ils en déduisent que *Leishmania mexicana* possède un tropisme cutané chez le chat, que cette espèce est pathogène chez le hamster mais non chez le chien. [33]. En 1991, Bonfante-Garrido *et al.* [15] réussissent à inoculer à des hamsters du matériel prélevé sur trois chats présentant des nodules leishmaniens [15].

En 2002, dans les travaux de Poli *et al.*, [22] un nodule et des nœuds lymphatiques contenant des leishmanies sont prélevés chez un chat ; le matériel est inoculé à des hamsters, sans résultat. Pour l'instant, l'inoculation de leishmanies du chat à d'autres espèces s'est révélée fructueuse seulement chez des hamsters et a échoué chez le chien. La virulence des leishmanies serait-elle atténuée chez le chat ? Le chat constituerait-il une impasse parasitaire ?

2.4.3 - Réponse immunitaire

La relation hôte-parasite est très complexe dans le cas de la leishmaniose. Elle dépend de l'espèce en cause, et de la réceptivité de l'hôte (réceptivité spécifique et individuelle). Les données suivantes sont extrapolées à partir du modèle du chien. L'inoculation de *Leishmania* par le phlébotome peut entraîner deux types d'évolution [31]:

- Infection localisée à la peau, chez l'animal résistant, qui développe une réponse de type Th1 à médiation cellulaire. L'animal est généralement séronégatif ou faiblement séropositif. Cette réponse immunitaire est fondée sur des phénomènes

de cytotoxicité faisant intervenir les lymphocytes tueurs (CD8+ et NK). Elle est généralement insuffisante pour entraîner une disparition des parasites.

- Dissémination du parasite et une extension de la maladie aux nœuds lymphatiques, à la rate et à la moelle osseuse chez l'animal sensible, qui développe une réponse de type Th2 à médiation humorale. Des anticorps sont produits, mais ils n'ont aucun rôle protecteur. L'animal est en général immunodéprimé, et présente un faible taux de lymphocytes CD4+ circulants.

Cette distinction entre animal résistant et animal sensible est fragile, un animal résistant pouvant devenir sensible sous l'effet de médicaments, d'infections, d'infestations parasitaires ou de néoplasie.

Chapitre 2 : Epidémiologie

La leishmaniose (humaine et animale) est une maladie cosmopolite, présente en Afrique, Moyen-Orient, Amérique du Sud, Inde, et sur le pourtour méditerranéen. Elle concerne 88 pays et la prévalence mondiale de la maladie humaine est actuellement estimée autour d'un demi-million de personnes [34].

1 – Epidémiologie descriptive

Des cas spontanés en zone non endémique sont observés : cas ectopiques, exceptionnels, pour lesquels les circonstances de la contamination ne sont pas toujours connues. Plus importants sont les cas de chiens leishmaniens examinés en zone non endémique mais contaminés dans le sud du pays et qui expriment la maladie dans leur lieu de résidence habituel. La circulation de plus en plus importante de nos compagnons ne fait qu'augmenter le nombre de cas diagnostiqués [35].

Chez les humains, les cas sont de plus en plus fréquents, en particulier chez ceux au système immunitaire fragilisé, comme les personnes contaminées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : depuis 2004, outre les 6.000 chiens infectés, on enregistre chaque année une trentaine de personnes atteintes [34]. Les infections ont lieu du printemps à l'automne, période d'activité des phlébotomes. L'expression clinique est répartie sur toute l'année du fait d'une incubation extrêmement variable.

2-Epidémiologie analytique

2-1- Espèces réservoirs

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

Les chiens, en raison de cette abondance de parasites dans le derme et de la fréquence de leur infection, constituent les véritables réservoirs habituels de la maladie humaine.

Cependant, *Leishmania infantum* affecte également le chat, des rongeurs sauvages et des carnivores sauvages (renard) mais le rôle épidémiologique de ces animaux en tant que réservoir de la maladie humaine est inconnu [36]

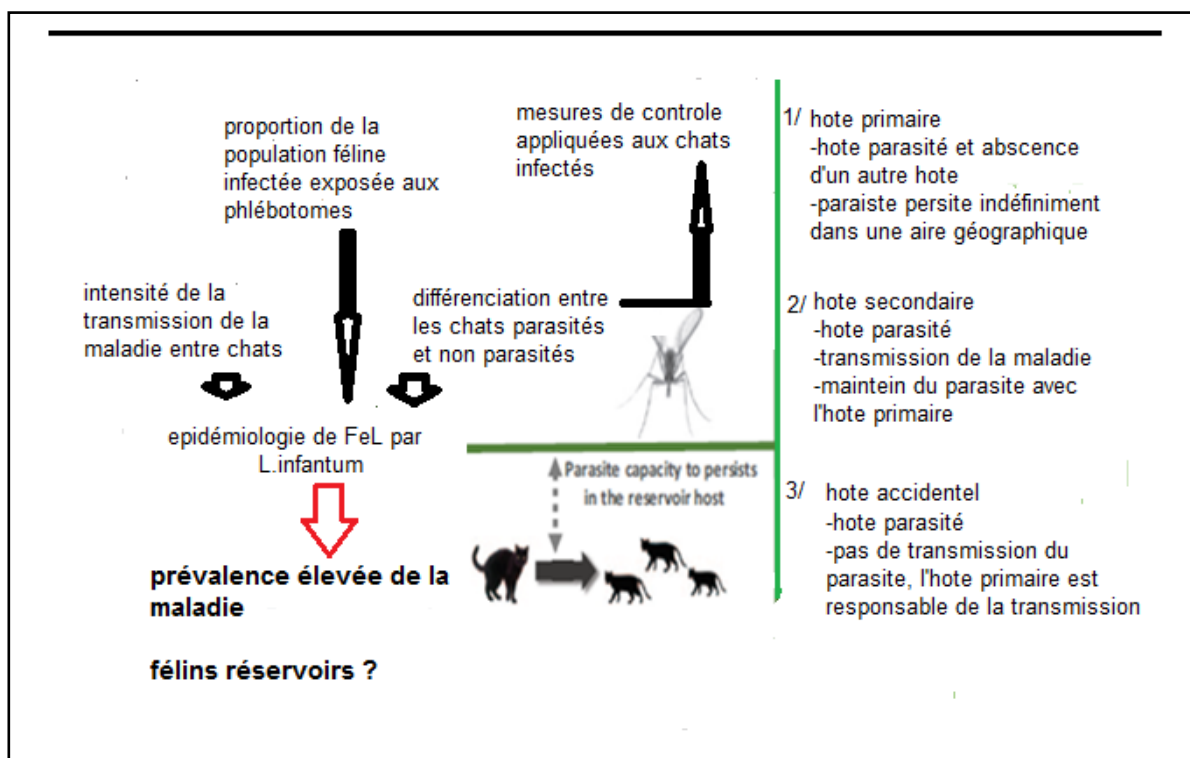


Figure 2-1 : Organigramme proposé pour l'étude du rôle du chat dans l'épidémiologie de l'infection à *Leishmania infantum*. Transmission, hôtes réservoirs et contrôle de la leishmaniose viscérale zoonotique. Quinnell RJ, Courtenay O. Dec 2009.

La figure 2-1 propose une étude de l'épidémiologie de la leishmaniose féline, ainsi les chats peuvent donc être des porteurs asymptomatiques et l'espèce féline pourrait donc jouer un rôle de réservoir de *L. infantum* car il y a un haut pourcentage de chats parasitiques et une transmission possible du parasite à son vecteur. La leishmaniose doit donc être incluse dans le diagnostic différentiel des lésions cutanées ulcératives si le chat vit ou a voyagé dans une région endémique. (Marty et al. 2007 ; Grevot et al. 2005), (Maia et al. 2008 ; Maia et al. 2010), Maroli et al. 2007.

2-2- Transmission

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

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

Enfin, la transmission *in utero* est également possible mais probablement exceptionnelle [36]. De même, une transmission vénérienne n'est pas exclue car les leishmanies sont présentes dans le sperme et des chiennes ont été infectées par cette voie [37].

2-3- Facteurs favorisants

L'abondance des vecteurs favorise les piqûres. Les phlébotomes sont particulièrement actifs et abondants dans les zones d'endémie en été, dans des zones protégées du vent, au crépuscule et, près du sol. Enfin, on a pu considérer que le pelage à poils longs pouvait jouer un rôle protecteur ; mais en réalité les vecteurs attaquent des zones peu protégées par les poils (chanfrein, conques auriculaires) [36].

2.4 - Pathogénie

À la suite de l'inoculation de promastigotes par le phlébotome, les leishmanies sont phagocytées par les macrophages. Le phagosome formé, contenant le parasite, effectue sa fusion avec les lysosomes primaire et secondaire, pendant que le promastigote se transforme en amastigote, survit et se multiplie.

La prolifération des leishmanies dans les macrophages provoque la destruction de ceux-ci et la réaction du système des phagocytes mononucléés : prolifération intense dans la rate, le foie, les nœuds lymphatiques, entraînant une hypertrophie de ces organes, une anémie par hypersplénie et des lésions cutanées par invasion macrophagique du derme. Des lésions sont également provoquées par la formation

de complexes immuns et d'auto-anticorps se déposant dans les glomérules rénaux, dans les articulations, sur les hématies, d'où hémolyse extravasculaire [5].

2.5- Symptômes

La leishmaniose canine a une symptomatologie très polymorphe, pouvant associer simultanément des signes généraux et cutanés. Les symptômes peuvent être plus ou moins marqués et d'évolution plus ou moins rapide, permettant la distinction de formes aiguës et de formes chroniques, ces dernières représentant la majorité des cas.

Les neuf symptômes les plus fréquemment rencontrés dans la leishmaniose canine sont : des lésions dermatologiques (figure 5), un amaigrissement ou une anorexie (figure 6), une lymphadénopathie localisée ou généralisée, des lésions oculaires, une épistaxis, un abattement, une anémie, une insuffisance rénale, de la diarrhée ; toute combinaison de symptômes étant possible. Ces signes cliniques apparaissent au terme d'une période d'incubation dont la durée varie entre 3 mois et 1 an après l'inoculation des leishmanies par le phlébotome [38], [34]. Le tableau 1 résume les symptômes observables.

Tableau 2-1 : Symptômes observés lors de leishmaniose canine [39].

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

Cependant, certains chiens infectés par *Leishmania infantum* ne développent pas la maladie et sont totalement asymptomatiques. Ils peuvent seulement présenter une réaction locale appelée « chancre d'inoculation », à l'endroit de l'inoculation des parasites par le phlébotome. Cela se manifeste par un nodule cutané alopecique, ulcéré et croûteux, de 1 à 3 cm de diamètre, non prurigineux et modérément douloureux. Il se situe souvent sur le chanfrein ou les pavillons auriculaires. Ce nodule peut disparaître spontanément au bout de quelques mois [38].

Pour les sujets qui présentent des symptômes, la maladie évolue lentement mais irrémédiablement vers la mort. C'est souvent l'insuffisance rénale qui est la cause du décès de l'animal.

Nous nous interrogerons également sur la réceptivité et la sensibilité du chat aux leishmanies. Ce paragraphe repose en partie sur les données épidémiologiques des 35 cas recensés dans la littérature mondiale.

2.6 - Prévalence et incidence

La prévalence correspond au nombre de cas recensés à une période donnée. On distinguera la prévalence mesurée par des méthodes parasitologiques, la prévalence mesurée par des méthodes sérologiques et enfin la prévalence clinique, correspondant au recensement de chats leishmaniens présentant des signes cliniques.

L'incidence est le nombre de nouveaux cas recensés dans une période donnée.

2.6.1- Méthodes parasitologiques Les méthodes utilisées sont variables : cytologie, histologie, PCR (Polymérase Chain Réaction). La cytologie et l'histologie donnent des résultats très faibles, excepté dans l'étude de Morsy *et al.* en 1980 [25]. Aujourd'hui, ces méthodes sont abandonnées au profit de la PCR (Polymerase Chain Reaction) qui offre une grande sensibilité. Les pourcentages de chats dépistés sont bien supérieurs, mais il reste toutefois une grande variabilité entre les résultats observés (Tableau 1).

Plusieurs facteurs expliquent la disparité des taux de prévalences obtenues (0 à 60,6%) :

D'abord les méthodes utilisées varient d'une enquête à l'autre : les méthodes cytologiques ont une sensibilité beaucoup plus faible que les méthodes PCR (sensibilité de la PCR sur sang soit remise en question chez le chien [40]).

Les échantillons analysés ne sont pas les mêmes (foie, rate, oreille ou sang).

Les régions et les périodes d'études sont très dispersés, les populations échantillonnées ne sont donc pas soumises aux mêmes pressions d'infection.

La méthode cytologique, par la mise en évidence directe de leishmanies chez 18 chats, démontre l'existence d'une circulation des leishmanies dans l'espèce féline. Par contre, sa trop faible sensibilité est un inconvénient majeur pour mesurer l'importance de cette circulation.

La PCR, au contraire, présente une très grande sensibilité en révélant la présence de l'ADN du parasite, mais elle ne présage ni de l'état des leishmanies ni de leur pouvoir infectant.

Tableau 2-2 : *Leishmaniose féline-Méthodes parasitologiques.* [25]

AUTEUR, Date Pays	Technique	Source	Positifs	/Examinés
Giordano 1933* Italie	Cyto-Histologie	Rate / foie / m.os	0/120	(0)
Ondovilla, 1933* Espagne	Non précisé	Non précisé	1/495	(0,2)
Chagasal, 1938* Brésil	Cytologie	Foie	1/202	(0,5)
Alencar al, 1955* Brésil	Cytologie	Foie	0/214	(0,0)
Deane, 1956* Brésil	Cytologie	Foie	0/142	(0,0)
Morsy et al.,1980* Jordanie	Cytologie	Foie, rate	16/78	
Sherlock, 1996* Brésil	Cytologie	Oreille	1/53	(1,9)
Pennisi et al., 2000* Italie	PCR	Sang	54/89	
Martin-Sanchez-2007	PCR	Sang	47/180	
TOTAL			120/1573	(7,6)

2.6.2 - Méthodes sérologiques

Ces études présentent également des résultats très dispersés : de 0 à 60%. Les facteurs cités précédemment expliquent cette observation : pressions d'infection différentes d'une région à une autre, variabilité des méthodes employées (principes, valeurs seuils). Des doutes ont d'ailleurs été émis quant à la valeur du dépistage sérologique dans le cadre de la leishmaniose féline [41], comme nous le reverrons par la suite. Les méthodes sérologiques montrent que des chats ont été en contact avec le parasite et ont développé une réponse immunitaire, mais elles ne mettent pas directement en évidence la circulation du parasite (Tableau 2-3).

Ces recherches sur la prévalence de la leishmaniose féline prouvent qu'une circulation du parasite au sein de la population féline existe (18 cas dépistés par observation directe du parasite), et qu'à l'issue de ces enquêtes, une moyenne de 12,1% à 19,1% des chats testés a été en contact avec des leishmanies.

Les méthodes PCR et sérologiques ne sont pas des témoins directs de la circulation des leishmanies chez le chat, et la cytologie et l'histologie sont peu sensibles. Il s'avère donc difficile d'estimer l'importance de la circulation des leishmanies chez le chat, ce qui s'explique également par la disparité régionale des pressions d'infection. D' ailleurs, les enquêtes épidémiologiques réalisées chez le chien présentent également des résultats très variables selon les régions.

Tableau 2-3 - *Leishmaniose féline : Méthodes sérologiques.*[25]

AUTEUR Date Pays	Technique sérologique	Positifs
Michael <i>et al.</i> ,1982* Egypte	IHA	3/80 (3,7)
Morsy <i>et al.</i> ,1988* Egypte	IHA	1/28
Bez. 1992 France	IFI	1/174 (0.6)
Marechal, 1993 France	WB	14/110
Morsy, Aboul- El-Seoud, 1994*	IHA	2/60
Sherlock, 1996* Bresil	IFI	0/53 (0,0)
Pennisiet <i>al.</i> ,1998* Italie	IFI	55/93
Ozonet <i>al.</i> ,1999 France	WB	12/97 (12,4)
Simoes-Mattos <i>et al.</i> ,2001* Bresil	ELISA	9/84 (10,7)
Simoes-Mattos <i>etal.</i> ,2002* Bresil	ELISA	43/106
Oliveira, 2002* Bresil	IFI	45/89
Portus <i>et al.</i> ,2002* Espagne	ELISA	2/117
Ramos <i>et al.</i> ,2002* Espagne	DAT	21/50
Poli <i>et al.</i> ,2002 Italie	IFI	1/110
Vita <i>et al.</i> ,2005 Italie	IFI	33/203
Solano-Gallego <i>et al.</i> ,2007 Espagne	ELISA-prot A (44 UE)	28/445 (6,3)
Martin-Sanchez <i>et al.</i> ,2007 Italie	IFI (1/10)	108/180 (60,0)
TOTAL		378/2079 (18)

* Cites par PENNISI, 2006

IHA Inhibition de l'hémagglutination **IFI** : Immunofluorescence indirecte, **WB** : Western Blot, **DAT** : Test d'agglutination directe UE: **Unite ELISA**

2.6.3 - Prévalence et incidence cliniques

Moins d'une quarantaine de cas de leishmaniose féline ont été diagnostiqués dans le monde. 35 cas sont rapportés ici. La prévalence clinique de la maladie parait donc très faible. L'incidence semble avoir augmenté : 9 cas ont été diagnostiqués en 62 ans (entre 1927 et 1989), puis 13 cas en 10 ans (entre 1990 et 2000), et enfin 13 cas en 7 ans (entre 2000 et 2007). Ceci peut s'expliquer par l'amélioration des outils diagnostiques, une recherche accrue de la maladie chez le chat et/ou une augmentation de la pression d'infection. Cette observation laisse toutefois supposer que la leishmaniose féline pourrait être largement sous diagnostiquée. [4]

2.7 - Répartition géographique

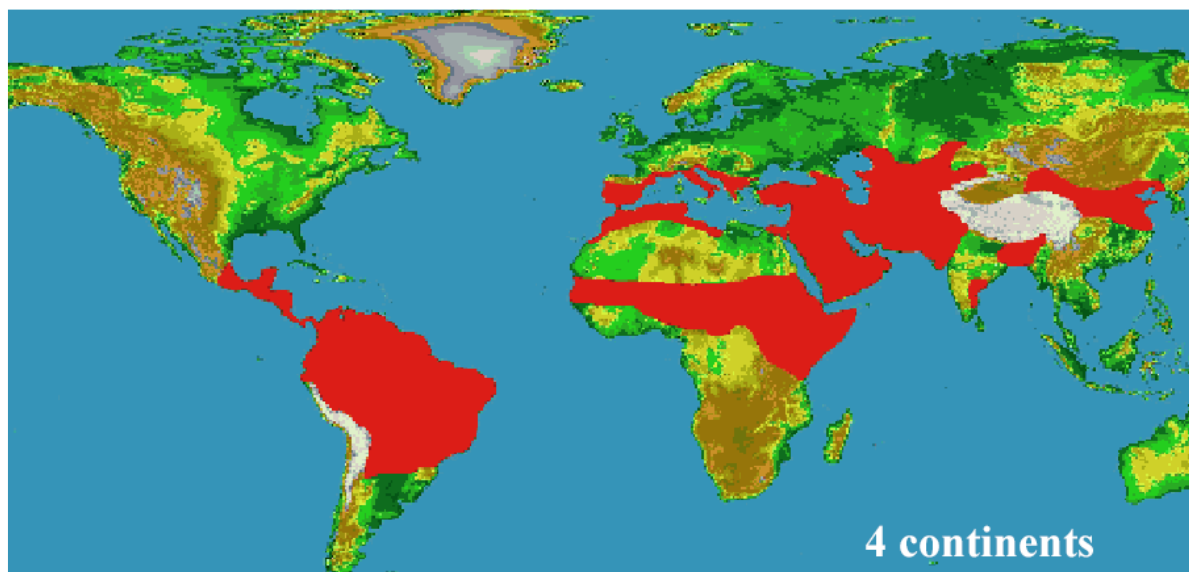


Figure2-2 : Répartition Mondiale de la Leishmaniose

(Source : DEDET, 2001)

Le premier cas de leishmaniose féline reporté dans la littérature en 1912 à Alger (Sergent *et al*, 1912, cités par Pennisi [42]). Parmi les 35 cas répertoriés, nous trouvons :

- Amérique (12 cas): Brésil (6 cas), Argentine (1 cas), Venezuela (4 cas), Texas (1 cas).
- Asie (3 cas): Irak (2 cas), Vietnam (1 cas).
- Afrique (2 cas): Algérie (1 cas), Ile de la Réunion (1 cas).
- Europe (18cas): Suisse (3cas), France (4cas,) Portugal (1cas), Espagne (4cas), Italie (6).



Figure 2.3 : Carte de répartition des cas de leishmaniose féline rapportés.

Cette répartition correspond aux fortes zones d'endémie, où la pression parasitaire est importante. Des enquêtes épidémiologiques ont également été réalisées dans ces mêmes régions du globe. En Egypte, les enquêtes ont montré des prévalences sérologiques inférieures à 5% [106] ; Morsyet *al.*, 1988 cités par Vides et al [25]), mais ces études ne sont pas récentes. En France, un taux de prévalence de 12,7% a été mesuré [43]. Des taux de prévalences sérologiques supérieurs à 40% ont été obtenus en Espagne (Ramos *et al.*, 2002 cités par [25]), au Brésil (Simoès-Mattos *et al.*, 2002 ; Oliveira, 2002 cités par [25]), et en Italie [41]. Il n'existe aucune donnée sur les régions à plus faible pression parasitaire ou nouvellement infectées. La leishmaniose féline reste inféodée dans les zones où circule le vecteur du parasite, le phlébotome.

La leishmaniose féline à *L. infantum* a été trouvée dans l'état de Sao Paulo, au Brésil, où les cas autochtones de leishmaniose humaine ou canine n'ont jamais été signalés. En Iran [44] *Leishmania infantum* a été détectée chez 4 des 40 chats errants prélevés (10%). Le parasite a été isolé dans la rate (3 cas) et le foie d'un chat et dans le milieu de culture. Enfin, récemment en Europe des cas sporadiques de leishmaniose équine à *L. infantum* ont été signalés.

2.7.1 - Variations saisonnières

Les phlébotomes présentent une activité saisonnière marquée.

La leishmaniose féline serait-elle donc soumise à des variations saisonnières ? Mac Hattie *et al.* Suggèrent en 1933 [32] qu'il existe une influence de la saison sur la prévalence. En effet, sur les deux cas de leishmaniose féline qu'ils observent, les premiers signes cliniques apparaissent en hiver. Evaluant la période d'incubation à deux mois, ils supposent que ces chats ont été contaminés en septembre-octobre.

Une étude menée en 1998-1999 sur 89 chats par PCR ne montre aucune corrélation entre le pourcentage de chats PCR positifs et la saison [17].

Le caractère saisonnier de la maladie dans l'espèce féline est difficile à étudier puisque la durée d'incubation est inconnue.

2.7.2 - Réservoir félin

Une espèce réservoir est définie comme une espèce permettant la survie et la transmission d'un agent pathogène. Pour être considéré comme réservoir de la leishmaniose, le chat doit d'abord permettre l'entretien du parasite, donc être une espèce réceptive, c'est-à dire apte à héberger les leishmanies et à en permettre la multiplication (sans forcément en souffrir) et ensuite assurer sa transmission au vecteur.

2.7.2.1 - Réceptivité du chat

Lors d'une expérience menée en 1993 à Nairobi [45], 12 chats errants sont infectés, par voie intraveineuse pour 6 d'entre eux, et par voie intracardiaque pour les 6 autres, à l'aide d'une souche de *Leishmania donovani*. Un chat de chaque groupe est sacrifié 30, 60, 90, 120, 150 et 180 jours après l'infection. Pour tous les chats, les cultures et frottis sur sang, moelle osseuse, foie, rate, reins et nœuds lymphatiques restent négatifs. Les auteurs en déduisent que les chats domestiques semblent non réceptifs, l'infection par cette souche de *Leishmania donovani*. Pourtant, l'existence de cas cliniques et les dépistages cytologiques de leishmanies chez des chats montrent que cette espèce peut effectivement être réceptive. Pour étudier les facteurs de réceptivité du chat, nous disposons de

deux types d'informations : celles concernant les enquêtes épidémiologiques (sérologie et PCR) et celles concernant les 35 cas cliniques répertoriés

Les informations issues des études PCR et sérologiques sont extrapolées, puisqu'elles sont certes le témoin d'un contact leishmanies/chat, mais ne préjugent pas de la survie des leishmanies chez le chat « positif ». Quant aux 35 cas cliniques répertoriés, ce sont des individus réceptifs sensibles : ils hébergent les leishmanies et en permettent la multiplication, Ils font donc partie de la population réceptive, mais ils n'en représentent qu'une sous-population (sous-population des réceptifs souffrant de l'infection par les leishmanies), ce qui peut fausser les résultats en confondant facteur de réceptivité et facteur de sensibilité. Ces données restent toutefois les seules à notre disposition.[30]

2.7.2.1.1 - Facteurs intrinsèques

a) - Sexe

On peut s'interroger sur l'influence du sexe sur la réceptivité des chats : les comportements de chasse et de reproduction pourraient entraîner une exposition plus importante aux piqûres. 25 des 35 cas cliniques référencés renseignent sur le sexe. On compte 17 femelles atteintes et 8 mâles. Ainsi, d'après les cas rapportés, les femelles seraient plus atteintes que les mâles, mais compte tenu de la disparité géographique et temporelle des chats, aucune population de référence ne peut être utilisée afin d'étudier une éventuelle signification de ces résultats. Lors d'une étude menée sur 89 chats, un taux de 61% de PCR (Polymérase Chain Réaction) positives est obtenu et ces résultats révèlent une association faiblement significative avec le sexe (54% de mâles et 73% de femelles) au sein de la population testée [17].

b)- Age

En jouant sur l'activité et la sédentarité du chat, l'âge pourrait avoir une influence sur l'exposition du chat. En observant le tableau épidémiologique des cas recensés (22 cas), on remarque que les chats sont d'âges variant, de 4 mois à 15 ans.

La leishmaniose féline touche aussi bien les jeunes, les adultes et les chats âgés. On note cependant que 68,2% des cas ont moins de 6 ans. La maladie semblerait

atteindre plutôt de jeunes chats adultes. Toutefois, cette observation est non significative compte tenu des faibles effectifs et de l'absence de population de référence.

L'étude réalisée sur 89 chats, citée dans le paragraphe précédent, montre une corrélation faiblement significative des PCR positives avec l'âge (45% des chats positifs ayant moins de 1 an, 65% ayant entre 2 et 15 ans) [17].

c) - Race

Des cas concernant des chats de race sont ponctuellement décrits (Siamois) par Bergeron en 1927 et Bosselut en 1948 [17]. Toujours dans l'étude de Pennisi portant sur 89 chats, aucune influence de la race n'est significativement observée (63% de chats pure race à PCR positive contre 58% de chats non de race à PCR positive, sachant que la population de référence comprend 39% de chats de race et 61% de chats non de race) [17]. On peut s'interroger sur l'influence de la longueur du pelage qui pourrait protéger des piqûres de phlébotomes. Toutefois, les zones à poils courts restent exposées (la tête notamment). Un cas de leishmaniose chez un chat à poil long est d'ailleurs décrit, avec la présence de lésions auriculaires [16].

2.7.2.1.2 - Facteurs extrinsèques

a)- Mode de vie

Six des cas décrits sont renseignés comme étant des chats ayant accès à l'extérieur. Le mode de vie des autres chats leishmaniens n'est pas précisé.

Dans une étude sérologique réalisée sur 97 chats [46], le nombre de chats séropositifs vivant dans les habitations est inférieur au nombre de chats séropositifs vivant à l'extérieur (il n'est pas précisé si ces résultats sont significatifs).

b) - Environnement

Il conditionne l'exposition du chat à la maladie : plus le chat séjourne dans une zone à forte pression d'infection, et plus il est exposé. Au sein même des régions à risque, des conditions d'humidité, de température et de végétation peuvent favoriser la présence du vecteur et donc l'infection. On note toutefois l'existence

d'un cas de leishmaniose féline retrouvé à Sao Paulo, où aucune leishmaniose canine ni humaine n'avait encore été diagnostiquée [24].

c) - Infection par des rétrovirus

A l'instar de la leishmaniose humaine dont le virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIII) est un facteur de risque majeur, on s'attendait à ce qu'il en soit de même chez -nt du virus de la leucose (FeIV). Lors d'une étude sérologique rétrospective sur 93 chats ayant un historique de recherche de FIV, Fe1V ou coronavirus, 59% des chats présentent une sérologie leishmaniose positive [17]. Dans le groupe des FIV+ (dont l'effectif n'est pas communiqué), la prévalence de la leishmaniose est de 70% contre 39%. Cette enquête conclut que l'infection par le FIV est significativement associée à des titres élevés en anticorps anti-leishmaniens. Depuis, d'autres enquêtes épidémiologiques montrent qu'une positivité à la leishmaniose (par sérologie ou par PCR) n'est pas corrélée à une positivité au FIV ou au Fe1V [47], [48], [41]. Parmi les 35 cas référencés, 16 seulement sont renseignés quant à leur statut FeIV et FIV. 6 cas sont FIV positifs (soit 37,5%) et parmi ces 6 cas, 2 sont également Fe1V positifs.

d) - Affections intercurrentes

Parmi les 35 cas répertoriés, il est observé une certaine concomitance à la leishmaniose : des affections cutanées (4 cas) et/ou d'autres affections diverses (respiratoires, rénales, génitales) (4 cas), ainsi qu'à des sérologies positives à certains agents infectieux (Toxoplasmose, Coronavirose, Péritonite infectieuse, Bartonellose). Ainsi actuellement, le seul facteur déterminant observé est le lieu de séjour du chat en zone d'endémie. Aucun facteur intrinsèque n'a pu être précisément défini. Le mode de vie pourrait jouer un rôle dans la mesure où le chat serait plus exposé à l'extérieur. Aucun facteur d'immunodépression n'a pu être déduit, ce qui peut paraître surprenant en comparaison avec la leishmaniose humaine.

e) - Contamination des phlébotomes à partir du chat

Maroliet *al* [49] ont mené une étude afin de savoir si le chat était susceptible de contaminer les phlébotomes. Cette étude est réalisée à partir d'un chat mâle castré de 13 ans provenant de l'île de Lipari (Sicile, Italie), suivi depuis 5 ans pour

une périodontite et une adénomégalie mandibulaire. Au début de l'étude, le chat présente une sévère stomatite, associée à une polyadénomégalie. Le test FeIV/FIV est négatif. Une sérologie leishmaniose (immunofluorescence indirecte) révèle un titre en anticorps de 1/160. Une culture, réalisée à partir des noeuds lymphatiques poplités, est positive et *Leishmania infantum* zymodème MON-1 est identifié. Le chat est anesthésié puis exposé à la morsure de 100 femelles du genre *Phlebotomus perniciosus* qui est le principal vecteur de *Leishmania infantum* en Italie en général, et sur l'île de Lipari en particulier. Ces femelles sont âgées de 4 à 6 jours. Après 90 minutes d'exposition, tous les phlébotomes sont endormis et observés au microscope. Le sang est collecté individuellement et analysé. 6 à 7 jours plus tard, les moustiques sont disséqués et examinés pour étudier la présence éventuelle de promastigotes dans leurs intestins. Après 90 minutes, 20 femelles sur 100 ont pris un repas sanguin. 19 de ces 20 phlébotomes sont disséqués et chez 4 d'entre eux, des leishmanies promastigotes motiles sont retrouvées dans la région du cardia. Ces leishmanies sont identifiées comme *Leishmania infantum* zymodème MON-1. L'identification moléculaire est confirmée par PCR chez les leishmanies du chat et chez les leishmanies isolées à partir des phlébotomes. Ainsi, 20% des phlébotomes ont piqué le chat, et 21% de ceux-ci sont infectés. Chez le chien, ces pourcentages sont très variables selon les études : de 17,1% à 82,6% de phlébotomes ayant piqué (55% en moyenne), et de 2,8% à 92% d'infectés (39% en moyenne).

Cette étude montre donc qu'un chat naturellement infecté par des leishmanies peut, dans des conditions expérimentales, infecter un vecteur compétent de *Leishmania infantum*. Dans les conditions naturelles, le chat serait donc susceptible de transmettre des leishmanies aux phlébotomes. Il semblerait intéressant de tenter d'infecter secondairement des chiens à partir des phlébotomes contaminés par le chat afin d'observer la virulence des souches après passage chez le chat. De même, il semblerait intéressant de réaliser simultanément et dans un même secteur, une étude épidémiologique à la fois chez le chien et chez le chat afin de pouvoir comparer les prévalences obtenues respectivement. Comme nous l'avons vu précédemment, les comparaisons entre les enquêtes sont difficiles en raison du trop grand nombre de facteurs de variation des résultats (secteur géographique et période d'étude, prélèvements réalisés et techniques de laboratoire utilisées). Pour palier à ces

facteurs de variation, une enquête pourrait être réalisée dans les populations canine et féline d'un même secteur, à une même période donnée (les populations étudiées étant ainsi soumises à la même pression d'infection), en utilisant un protocole de prélèvements identique et des techniques de laboratoire similaires.

Les résultats obtenus chez le chat, dont le rôle en tant que réservoir reste non élucidé, pourraient ainsi être comparés à ceux obtenus chez le chien, reconnu réservoir principal de la maladie en zone d'endémie.

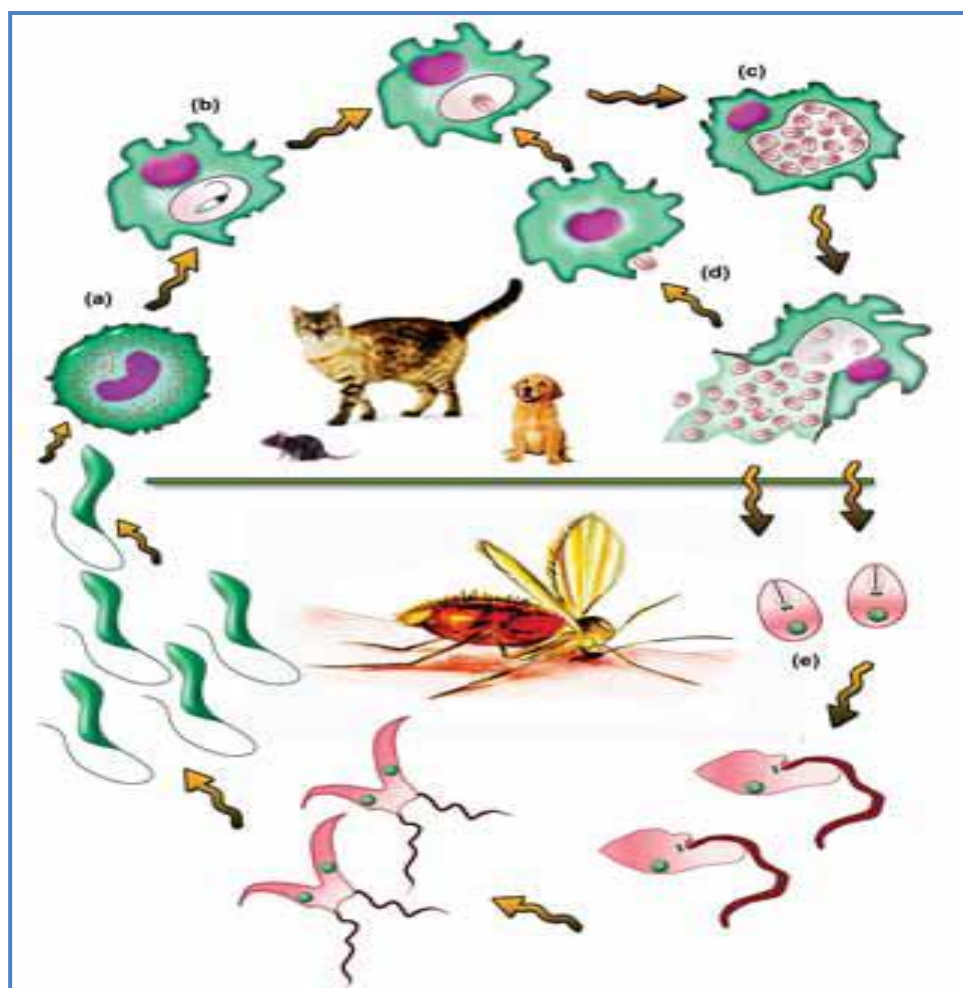


Figure 2-4 : Espèces de Leishmania identifiées chez le chat (Conçu par HanyElsheikha et Hind Mamdowh.2006.)

Cinq espèces de *Leishmania* ont été identifiées chez le chat, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis* et *Leishmania amazonensis* dans le Nouveau Monde, et *Leishmania infantum* dans le Nouveau et l'Ancien Monde. *L. infantum* est la seule espèce isolée du chat en Europe. Les chats ou les chiens agissent comme hôtes définitifs et s'infectent lorsqu'ils sont piqués par un phlébotome. **(a)** Les promoteurs sont inoculés dans le derme et **(b)** colonisent les macrophages résidents. Dans les macrophages, ils se développent en amastigotes et prolifèrent dans le phagolysosome **(c)**. Après la rupture des macrophages, les amastigotes libérés infectent de nouveaux macrophages **(d)**. Si l'hôte ne parvient pas à contrôler l'infection dans la peau, les amastigotes se disséminent par voie lymphatique régionale et le sang pour infecter tout le système réticulo-endothélial. **(e)** Les mastigotes ingérés par une femelle pendant l'alimentation se transforment en promastigotes, qui se répliquent à l'intérieur du phlébotome pour compléter son cycle biologique.

2.7.2.2 - Sensibilité du chat

La sensibilité est définie comme l'aptitude d'un animal à exprimer cliniquement l'action d'un agent pathogène. Les cas de leishmaniose féline semblent rares, le chat apparaît comme étant une espèce naturellement peu sensible à la maladie.

On peut donc supposer qu'il existe des facteurs rendant certains animaux sensibles.

Des expériences ont été réalisées au début du XX^e siècle et se sont toutes soldées par un échec, laissant supposer que le chat était une espèce difficile à infecter au laboratoire ou que les techniques de l'époque n'étaient pas suffisamment performantes (Laveran, 1909 ; Nicolle et Blaizot, 1912 ; Giordano, 1934 ; Mello, 1940 ; cités par SolanoGallego [32]).

L'expérience de Kirckpatrick[13] a utilisé des chats d'âge et de sexe variables. Ils ne présentent pas de parasites intestinaux ni de signes cliniques de maladie infectieuse, et sont testés négatifs à la leucose et à la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*). Ils sont vaccinés contre la panleucopénie féline, la rhinotrachéite et l'infection à calicivirus.

Les souches de leishmanies utilisées sont

- *Leishmania donovani* type WR 438, isolée à partir d'un chien (espèce appartenant au complexe *Leishmania infantum* d'après la nouvelle nomenclature)
- *Leishmania chagasi* type WR 484, isolée à partir de l'homme (correspondant à *Leishmania infantum* ZMON-1).

L'inoculation de formes amastigotes par voie intraveineuse est réalisée sur 10 chats pour *Leishmania donovani* (8.10^8 leishmanies inoculées) et sur 5 chats pour *Leishmania chagasi* ($2,5.10^7$ leishmanies inoculées). Chez 9 chats (6 chats et 3 chatons), des formes promastigotes (5.10^6) de *Leishmania chagasi* sont inoculées par voie intradermique. Après sacrifice de l'animal, les formes amastigotes sont recherchées dans la moelle osseuse, la rate et le foie sur des coupes colorées au Giemsa. Les formes promastigotes sont recherchées dans le sang circulant et les tissus par mise en culture. Le titre en anticorps anti-*leishmania* est mesuré par immunofluorescence indirecte.

Suite à l'inoculation d'amastigotes de *Leishmania donovani* par voie intraveineuse (étude sur 8 semaines) : pendant les 8 premières semaines, les parasites sont détectés dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les cultures sur sang sont positives jusqu'à la 2^e semaine puis sont négatives. Le taux en anticorps s'élève de façon significative dès la 1^{ère} semaine (de 1/16-1/64 à 1/256-1/512 à 8 semaines post-infection).

Suite à l'inoculation d'amastigotes de *Leishmania chagasi* par voie intraveineuse (étude sur 24 semaines) : les parasites sont détectés dans le foie, la rate, et la moelle osseuse à partir de la 4^e semaine et jusqu'à la 16^e semaine dans la rate. A partir de la 24^e semaine, aucun parasite n'est décelé. Les cultures de sang restent négatives. Les taux en anticorps s'élèvent de 1/16-1/32 à 1/256-1/1024 à la 24^e semaine post-infection.

Suite à l'inoculation de promastigotes de *Leishmania chagasi* sur 6 chats adultes par voie intradermique (étude sur 24 semaines) : aucun parasite n'est retrouvé dans le foie, la rate, la moelle osseuse et le sang. Les taux en anticorps s'élèvent de façon significative de 1/16-1/64 à 1/128-1/512 au terme de 24 semaines.

Suite à l'inoculation de promastigotes de *Leishmania chagasi* à 3 chatons par voie intradermique (étude sur 12 semaines) : les chatons sont infectés avec des promastigotes provenant de cultures de tissu splénique des chats infectés par voie intraveineuse. Aucun parasite n'est retrouvé dans le foie, la rate, la moelle osseuse et le sang au terme de 12 semaines. Le dosage des anticorps n'est pas réalisé.

Au cours de ces expériences, aucun chat ne développe de signes généraux (absence de fièvre, amaigrissement, variation de l'hémogramme ou du taux de protéines). Seuls les chats infectés par voie intradermique présentent un nodule 24 heures après inoculation disparaissant au 4^e jour, de même qu'un érythème passager.

Les auteurs déduisent de ces observations que :

- Les chats domestiques sont moins sensibles à l'infection par *L. donovani* ou *L. chagasi* lors d'une inoculation intraveineuse que les hamsters, les chiens et certaines espèces de souris.
- Il semblerait que le chat soit plus sensible à l'infection que certains mammifères, tels que les rats ou les lapins de laboratoire. Cependant, 02 espèces seulement de leishmanies ayant été testées l'existence de souches plus virulentes chez le chat est suggérée.
- Les chats sont capables d'une réponse aux infections par *Leishmania* en produisant des quantités d'anticorps relativement élevées et détectables par immunofluorescence indirecte, et ce quelle que soit la voie d'inoculation.
- La recherche de parasites après inoculation est négative au bout de quelques semaines.

L'expérience de Simoes-Mattos [30], consiste en l'inoculation intradermique de formes promastigotes de *L. braziliensis* sur la truffe et les oreilles de 13 chats âgés de 3-4 mois environ. Un suivi est réalisé sur 72 semaines. Des lésions cutanées sont observées, sous forme de nodules et d'ulcères. Environ 40% des chats présentent une dissémination cutanée sur d'autres sites. 4 chats sont successivement euthanasiés au cours de l'expérience et aucun signe de dissémination viscérale n'est mis en évidence par examen histologique (absence de leishmanies dans la moelle osseuse, la rate et le foie visibles). Cette expérience suggère donc que le parasite n'affecterait que le territoire cutané chez le chat.

D'après la définition initiale de la sensibilité, est considéré comme sensible l'animal qui est apte à exprimer cliniquement la maladie due à l'agent pathogène.

Un animal résistant à la leishmaniose présente, suite à l'inoculation de *Leishmania*, une infection qui reste localisée à la peau. Il est généralement séronégatif ou faiblement séropositif. Chez l'animal dit sensible, le parasite se dissémine et s'étend aux nœuds lymphatiques, à la rate et à la moelle osseuse. Les anticorps produits ne jouent qu'un rôle protecteur mineur voire aucun rôle [31]. Lors de l'inoculation expérimentale réalisée par Simoes-Mattos [30], une infection cutanée est observée, sans signe de dissémination viscérale.

Il existe une disparité entre les formes de leishmaniose féline observées : dans les cas où une dissémination est recherchée, on remarque que parfois les leishmanies sont cantonnées au territoire cutané (et éventuellement au nœud lymphatique satellite) (Mac Hattie *et al.*, 1931 cités par [17] ; [16], tandis que dans d'autres cas, les leishmanies sont disséminées dans la rate, le foie, et/ou la moelle osseuse [42] ; [20]; [50]; [51] ; [52]; [53]; [24].

Ainsi, la rareté apparente des chats cliniquement atteints de leishmaniose, l'expérience d'inoculation de Simoes-Mattos [30] , et l'existence de cas d'infection limitées à la peau, suggèrent que le chat serait naturellement résistant à la maladie. Cependant, la leishmaniose féline étant méconnue des vétérinaires praticiens, la maladie serait peut-être sous voire non diagnostiquée. De plus, dans un nombre important des cas cliniques décrits (23 des 35 cliniques publiés et répertoriés), la dissémination viscérale du parasite n'a pas été recherchée.

Des formes disséminées sont observées, ce qui laisse supposer qu'il existe des facteurs rendant des individus sensibles à la maladie.

Gramiccia et Gradoni [54] supposent que dans les zones d'endémie de Leishmaniose, le chat peut être un hôte-réservoir, plus qu'un simple hôte accidentel à cause :

1. Du haut pourcentage de parasitémie chez le chat (25.7%) associée à une séropositivité de l'ordre de 60%. Combinant ces 2 données, 70.6% de la population féline est ou pourrait être infectées par *L. infantum*.

2. Les chats sont infectés durant plusieurs mois jusqu'à leur guérison spontanée ou sont guéris par un traitement spécifique [50] ou morts [22].

3. Durant l'infection, le chat peut être piqué par un Phlébotome, comme cela a été démontré par plusieurs études [55], et ils deviennent infectieux pour des vecteurs compétents [49].

En bilan, les femelles pourraient être plus sensibles que les mâles et les adultes plus sensibles que les jeunes. Le séjour en zone de forte endémie reste un facteur important. Aucun facteur immunodépresseur systématique n'a pu être mis en évidence.

La répartition géographique de la leishmaniose féline est vaste. Le statut du chat en tant que réservoir ne peut être défini pour l'instant. Serait-il réservoir accidentel ? Accessoire ? Paraissant capable de transmettre les leishmanies aux phlébotomes (au moins après infection expérimentale), son importance en tant que réservoir dépendrait de sa réceptivité. Or, le chat peut être réceptif puisque des cas ont été observés, mais les facteurs de réceptivité et l'existence d'une circulation significative des parasites au sein de la population féline sont méconnus. En effet, les prévalences PCR et sérologiques laissent supposer une circulation conséquente des leishmanies chez les chats en zones d'endémie, mais ces méthodes ne sont que le témoin de contacts entre le chat et le parasite, et ne prouvent pas l'existence d'un portage significatif. Cet aspect est important en matière de santé publique compte tenu du caractère zoonotique de la maladie.

Le chat est aussi victime de la leishmaniose : les cas rapportés sont rares mais la maladie reste peu connue des vétérinaires praticiens, les symptômes sont peu spécifiques, et aucun facteur de sensibilité n'a été encore mis en évidence. Il serait donc possible qu'elle soit largement sous diagnostiquée.

Chapitre 3 :

Etude clinique

On distingue en général différentes formes de leishmaniose : la leishmaniose cutanée et viscérale (chez le chien et chez l'homme), et la leishmaniose cutanéomuqueuse (chez l'homme). Ils existent des formes atypiques.

2- Symptomatologie et traitement chez l'homme

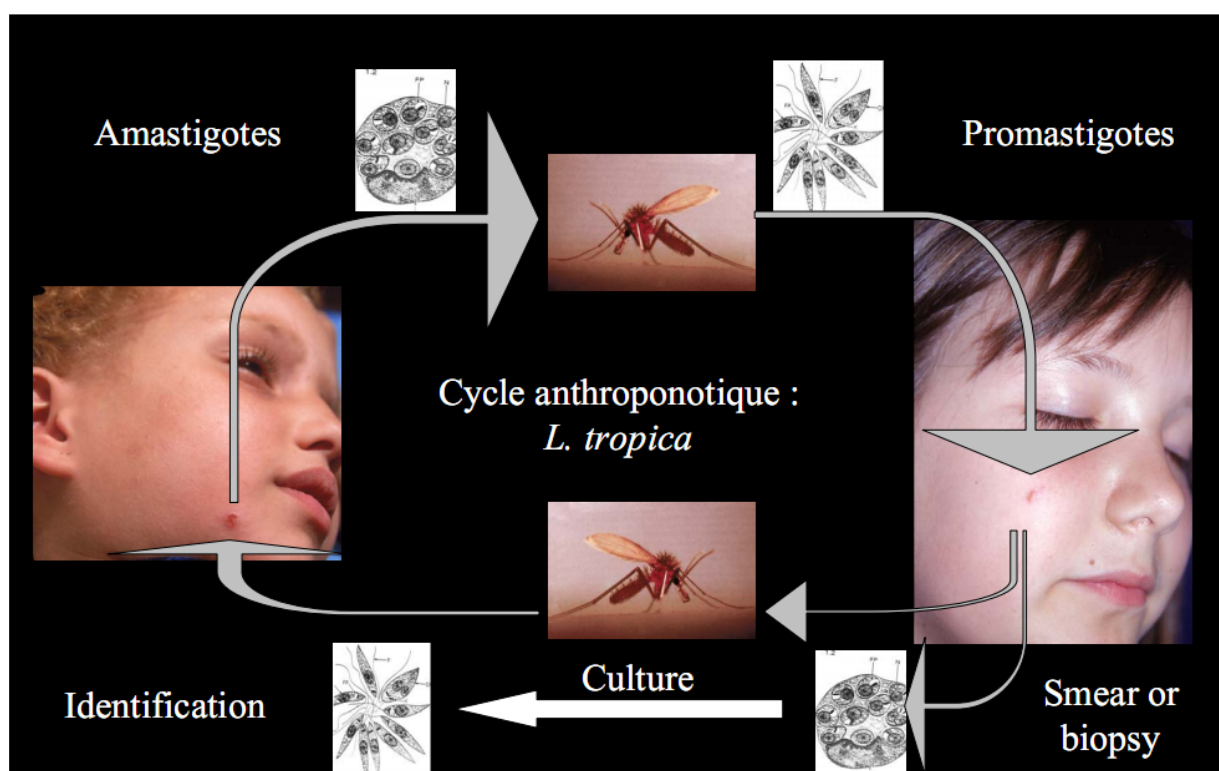


Figure 3.1- Cycle anthroponotique chez l'homme [56]

1.1 - Symptômes

a-- Cutanés :

L'incubation est de durée variable (1 semaine à 1 an). Au point d'inoculation apparaît une macule foncée prurigineuse, se transformant en papule puis en nodule de 2 cm de diamètre. La lésion squameuse est indolore et repose sur une base indurée. Dans la forme sèche, tout en reste là. Parfois le nodule s'ulcère et suinte. La surinfection est fréquente. L'évolution spontanée se fait vers la guérison très lente.[56]



Figure 3.2 : symptômes chez l'homme [56]

b- Généraux :

Les symptômes sont une fièvre avec altération de l'état général, perte d'appétit, amaigrissement, météorisme (ballonnement) abdominal. La pâleur cutanéomuqueuse donne au malade un teint cireux et blafard. L'examen clinique met en évidence une rate et un foie augmentés de volume et une hypertrophie des ganglions.

1-2- Diagnostic de confirmation

-frottis (MGG) positif (amastigotes)

- sérologie positive

-PCR positive (sang)

- IDR positive

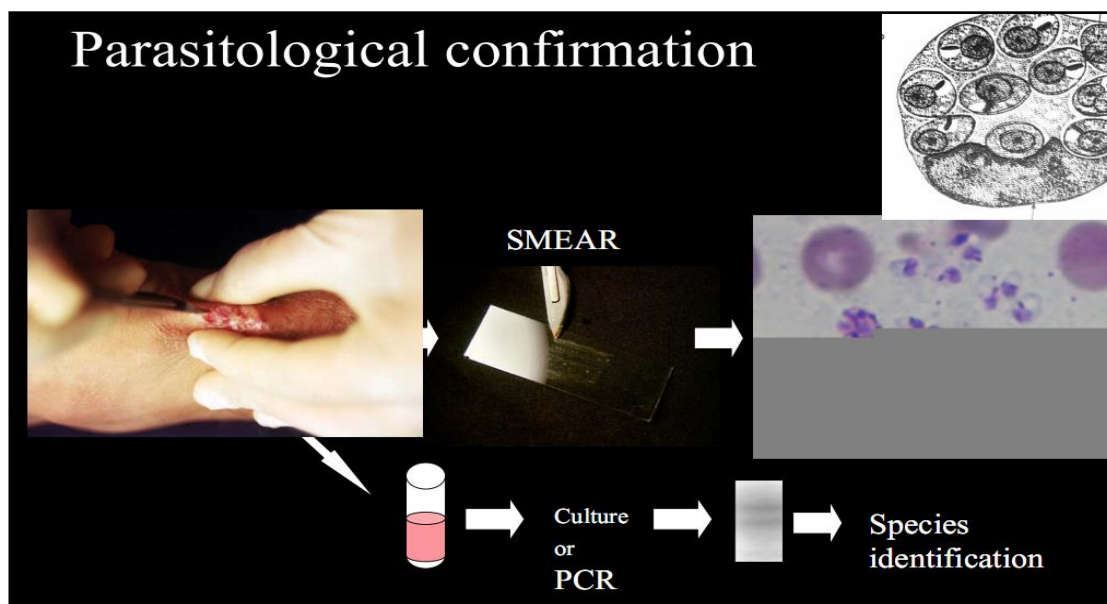


Figure 3.3 - Diagnostic parasitologique de confirmation [56]

La figure 3-3 montre les différentes étapes du diagnostic de la leishmaniose, ainsi le diagnostic va de l'observation directe du parasite par frottis sanguin puis de la sérologie et de la biologie moléculaire (PCR) en passant par l'IDR par injection de leishmanine.

1.3– Traitement : différentes molécules sont utilisées

- Pentamidine : 4mg/Kg x 10 / 17 jrs

- Amphotéricine B (Fungizone N.D) 0,5 mg/Kg / 14jrs

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

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

2 -Symptômes et lésions chez le chien

La clinique associe les différents symptômes décrits par la suite, sachant que toutes les associations sont possibles.

a) - Symptômes généraux cités par [57]; [58]; [59]; [61] On observe fréquemment :

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

- Abattement, qui peut aller en fin d'évolution jusqu'à la prostration.

On peut également observer :

- Hyperthermie, mais celle-ci est transitoire et modérée (39 à 39,5°C).

- Anémie, pouvant être arégénérative (due à l'envahissement de la moelle osseuse par les leishmanies) et étant à l'origine de l'abattement.



Figure 3.4 : Aspect général de chiens atteints de leishmaniose (avec l'aimable autorisation de Didier Pin .ENVL)

b. Lésions cutané-muqueuses [59] ; [60] ; [57].

On peut observer :- Dépilation pouvant aller jusqu'à l'alopecie, sur les faces latérales de la tête et du tronc.

- Hypopigmentation au niveau de la truffe.

- Chancre d'inoculation, inconstant et fugace, siégeant au niveau de la face ou sur la face interne des pavillons auriculaires.

Des modifications de l'épiderme : hyperkératose (au niveau du chanfrein, de la truffe et des coussinets plantaires), parakératose à l'origine du furfurleishmanien (squames de grande taille, sur la totalité ou une partie du corps de l'animal.figure 3-4

- Une Onychogryphose (hypertrophie irrégulière des griffes).

- Ulcères



Figure 3.5 : Ulcères cutanés. Dr F. Beugne(ENVL).2000

-ulcères cutanés, situés sur tout le corps mais apparaissant préférentiellement en regard des articulations et autres points de pression, des régions interdigitales et de la truffe (figure 3-5) ; non douloureux et prurigineux mais qui cicatrisent mal.

- Muqueux, qui saignent facilement et sont à l'origine entre autres d'épistaxis, d'hémorragies digestives.

- Granulomes multiples cutanés ou sous-cutanés, dont la taille peut augmenter rapidement de manière importante (de quelques millimètres à plusieurs centimètres), non adhérents, généralement indolores et non prurigineux. Ces nodules sont rarement observés, et ce type de lésion semble intéresser tout particulièrement les chiens de race Boxer, Teckel à poils durs ou encore Bullmastiff [61].

c. Lésions intéressant le système des phagocytes mononucléés

On peut observer :

- Adénomégalie souvent multiple, intéressant essentiellement les nœuds lymphatiques superficiels, qui sont indolores et non adhérents au plan profond.
- Splénomégalie modérée.
- Envahissement de la moelle osseuse par des parasites.

d. Lésions oculaires [62]

Les symptômes oculaires pouvant être observés sont :

- Une uvéite souvent antérieure et non granulomateuse, liée à de la photophobie, et pouvant dans le plus grave des cas se compliquer en glaucome.
- Une conjonctivite bilatérale, avec une hyperhémie, pouvant être mucopurulente, parfois un chémosis ou des granulomes localisés au bord libre des paupières (leishmaniomes).
- Une kératite superficielle, stromale ou endothéliale mais rarement isolée, s'associant souvent à une uvéite (kérato-uvéite).

e- Symptômes intéressant l'appareil urinaire

Les symptômes concernant l'appareil urinaire sont :

- Une polyuro-polydipsie.
- Une insuffisance rénale causée par une glomérulonéphrite quasiment constante [63]

f. Symptômes digestifs

Les symptômes digestifs observés peuvent être :

-Une entérite diarrhéique plus ou moins hémorragique (en fonction du nombre et de la localisation des ulcères digestifs).

-Une colite chronique [64]

g. Lésions ostéo-articulaires

On peut observer :

-Une polyarthrite souvent bilatérale, à l'origine d'une boiterie. Les atteintes osseuses et articulaires peuvent être de grande importance (ostéolyse pouvant aller jusqu'à la disparition des surfaces articulaires) [65].

-Une synovite ainsi qu'un œdème des articulations.

h. Modifications sanguines

h-1-Modifications humorales

On observe une hyperprotéïnémie liée à une hypergammaglobulinémie et une hypoalbuminémie.

h-2-Modifications cellulaires

On peut observer :

-Une anémie normochrome, initialement régénérative puis devenant arégénérative à la faveur de l'envahissement de la moelle osseuse par les leishmanies. Celle-ci peut être aggravée par les différentes hémorragies et la thrombocytopénie.

-Une thrombocytopénie.

-Une leucocytose puis une leucopénie (liée à l'envahissement de la moelle osseuse).

-Une monocytose.

Certains des symptômes décrits précédemment sont à relier avec la présence en grande quantité d'immuns complexes dans l'organisme (l'uvéite, la glomérulonéphrite, les arthropathies).

i- Lésions atypiques

On peut ainsi noter des cas d'atteinte de la sphère génitale [66] , des cas de méningite [67].

3- Symptômes chez le chat

Ces distinctions semblent beaucoup moins nettes dans l'espèce féline. Sur 35 des cas référencés dans le monde, 16 chats présentent des signes cutanés seuls, 12 des signes cutanés associés à des signes généraux dont 3 avec des signes oculaires, et 2 chats présentent des signes généraux seuls. Dans 10 cas, des affections intercurrentes sont diagnostiquées.

Lors d'une étude expérimentale [30], des chats ont été infectés par des leishmanies et des signes cliniques ont pu être observés. L'expérience est menée sur 13 jeunes chats (âgés d'environ 3-4 mois). Ces chats sont en bon état général, ils sont vermifugés, vaccinés contre la panleucopénie, la rhinotrachéite, les calicivirus et la rage. Ils sont placés en quarantaine 30 jours afin de surveiller l'éventuelle présence du virus FelV. Tous s'avèrent négatifs. Ces chats sont anesthésiés, infectés par 10^7 leishmanies promastigotes (*L. braziliensis*) inoculées par voie intradermique, sur l'oreille droite et la truffe simultanément. Un chat de l'échantillon n'a pas été infecté sur la truffe en raison d'une petite croûte. Trois chats sont infectés sur le pied gauche sous anesthésie pour contrôler l'infection. Un suivi est réalisé sur 72 semaines après l'infection, et 4 chats sont successivement euthanasiés, aux semaines 4, 12, 16 et 24 après l'infection. Des échantillons de rate, de foie et de moelle osseuse sont alors obtenus. Les anticorps sont régulièrement titrés par ELISA, la taille des lésions est mesurée une fois par semaine.

Tous les chats développent un nodule au point d'inoculation. L'évolution des lésions sur les oreilles et le nez est présentée dans le Tableau 3-1.

Tableau 3-1: *Evolution des lésions sur des chats infectés expérimentalement avec Leishmania braziliensis.* [30].

Lesions	Oreille	(%) Nez
Papule	77	75
Nodule	100	100
Lésions satellites	83,3 ^e	45,5 ¹
Lesion étendue	91'	9,1'
Dissémination'	42,6 ^e	8,3'
Infiltration muqueuse	-	88,9 ^g 33,3 ^f
Ulcération	25 ^e	
Guérison	87,5 ^h	100'

L'apparition d'une papule, suivie par l'émergence de papules satellites, est observée. Ces papules convergent en un nodule principal irrégulier.



Figure 3.6 : Chancre d'inoculation, ulcère [68]

Les signes cliniques observés dans les 35 cas référencés et infectés naturellement, on distingue plusieurs groupes de lésions :

a-Lésions cutanées

33 cas présentent des signes cutanés, soit 94% des cas de leishmaniose féline décrits. Ces lésions s'observent principalement au niveau de la tête (23 cas sur 33 présentant des signes cutanés, soit 69 %) : sur la truffe, les pavillons auriculaires, la face, le canthus médial de l'œil et les paupières, ainsi que dans la cavité buccale et sur les lèvres. Certains cas montrent des lésions sur les membres : au niveau du

coude, du tarse et des espaces interdigités. Des lésions diffuses sont parfois notées, soit sur l'ensemble du corps, soit sur des zones plus circonscrites (thorax, abdomen, région lombaire). Enfin, des lésions sont observées au niveau de la queue dans un cas.

Tableau 3.2 : Nombre de cas observés en fonction des différents sites lésionnels.[30]

Localisation	Cas	Cas avec signes	Cas
Truffe	14	42 %	40 %
Oreilles	12	36 %	34 %
Tête (chanfrein, région temporo-mandibulaire,	9	27 %	26 %
Région péri-oculaire	6	18 %	17 %
Région buccale	6	18 %	17 %
Membres	5	15 %	14 %
Lésions diffuses sur le	4	12 %	11 %
Région lombaire	3	9 %	8 %
Thorax	2	6 %	5
Abdomen	1	3 %	2 %

Différents types de lésions sont observées et varient aussi en fonction de la localisation.

Les principales lésions observées sont des ulcères, des nodules hémorragiques ou ulcères principalement localisés sur la face (23 cas, soit 69 % des cas présentant des signes cutanés). Moins caractéristiques, les papules et pustules peuvent être notées. Les chats leishmaniens présentent fréquemment des dermatites ulcératives ou alopéciques, localisées ou diffuses. Des lésions buccales sont parfois associées et dans un cas, elles constituent les seuls symptômes

Tableau 3.3 : Types lésionnels rencontrés lors de leishmaniose féline.[30]

Types de lesion	Cas observés	Cas avec des signes	Cas
Ulcères	16	48 %	46 %
Nodules	16	48 %	46 %
Papules, pustules, cro	7	21 %	20 %
Alopecie, Dépilations	6	18 %	17 %
Stomatite, gingivite	5	15 %	14 %
Erythème	2	6 %	5 %
Squamosis	2	6 %	5 %
Dermatite miliaire	1	3 %	2 %
Effluvium telogène	1	3 %	2 %

De l'érythème peut être noté. De rares cas de squamosis, d'alopécie extensive et de dermatite miliaire sont rapportés. Toutefois ces lésions peuvent être dues à d'autres affections concomitantes (parasitaires ou allergiques). Ainsi, des nodules (hémorragiques ou non) et des plaies ulcérées, surtout lorsqu'ils sont localisés à la face, constituent des signes d'appel de la leishmaniose féline.

De manière *générale*, la leishmaniose devrait faire partie du diagnostic différentiel chez un chat provenant d'une zone d'endémie, et présentant des lésions nodulaires ou ulcératives sur la face, ou des signes cutanés réfractaires aux traitements habituels.

b- Signes oculaires

Des signes oculaires sont observés chez 6 chats (17 % des cas de leishmaniose féline). Il s'agit principalement d'uvéites, uni ou bilatérales pouvant être associées à une kératite ou à une chorio-rétinite.

c- Signes généraux

La leishmaniose féline peut se manifester par des signes généraux, seuls ou associés aux symptômes étudiés précédemment. 20 des 35 cas répertoriés présentent des signes généraux (57 %) (Tableau 3-4).

Aucun signe n'est spécifique et le tableau est très protéiforme. Cependant, en général, ces signes généraux sont associés à d'autres symptômes (94 % des cas). De plus, certaines de ces manifestations peuvent être imputées à une infection intercurrente présentée par le chat, comme la détresse respiratoire lors de bronchite parasitaire ou de bronchopneumonie.

On retient la fréquence de l'adénomégalie (29 % des cas de leishmaniose féline), qui peut être généralisée (6 cas sur 10 présentant une adénomégalie) ou localisée (en particulier sur les nœuds lymphatiques poplités et rétromandibulaires

Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des signes généraux rencontrés dans les cas de leishmaniose féline.[30]

Signes généraux	Cas	Cas avec signes G°	Leishmaniose féline
Cachexie/Amaigrissement	11	55 %	31 %
Adénomégalie	10	50 %	29 %
Abattement	5	25 %	14 %
Anorexie/Dysorexie	5	25 %	14 %
Détresse respiratoire	4	20 %	11 %
Mort brutale	4	20 %	11 %
Hyperthermie	3	15 %	8 %
Vomissements/Diarrhées	3	15 %	8 %
Deshydratation	2	10 %	5 %
Pâleur des muqueuses	2	10 %	5 %
Hépatomégalie	2	5 %	10 %
Splénomégalie	1	5 %	2 %
Ictère	1	5 %	2 %

En bilan, un tableau clinique cutané avec des ulcères et des nodules, principalement localisés sur la face et plus ou moins associés à une adénomégalie, chez un chat provenant d'une zone d'endémie, constitue un signe d'appel de leishmaniose féline (66% des cas observés). Toutefois, on peut noter la diversité des signes présentés par les différents cas étudiés et le tableau clinique de la leishmaniose reste très protéiforme. Le faible nombre de cas observés et la rare identification des espèces de leishmanies en cause ne permettent pas aujourd'hui de corréler certains signes cliniques à une espèce particulière de leishmanie.

Tableau 3-5 : comparatif chiens chats des anomalies cliniques et anatomopathologiques lors de leishmaniose. (Di Pietro et al. 2016; Pennisi et al. 2015a; Saridomichelakis and Koutinas, 2014; Solano-Gallego et al. 2009). (cités par Pennisi 2018).

Signes cliniques et lésions	Chiens	Chats
Signes généraux	+++	+++
Lymphadénomégalie	+++	+++
Perte de poids	++	++
Anorexie	+	++
Polyphagie	+	NR
Léthargie	+	+
Pâleur des muqueuses	++	+
Fièvre	+	+
Polyurie/polydipsie	+	+
Signes cutanés	+++	+++
Dermatite exfoliative (alopécie+/-)	++/+++	+
Dermatite ulcérate	+ / ++	++
Dermatite nodulaire	+	+
Dermatite papillaire	+	NR
Onychogribose	+ / +++	NR
Hyperkératose du nez et coussinets	++	NR
Signes oculaires	+ / +++	++
Blépharite	+	+
Conjonctivite	+	+
Kératoconjonctivite	++	+
Uvéite	++	+
Autres signes	++	++
Lésions cutanéomuqueuses	+	+
Vomissements/diarrhée	+	+
Stomatites	+	++
Splénomégalie	+	+
Epistaxis	+	NR
Boiterie	+	NR
Atrophie des masséters	+	NR
Signes neurologiques	+	NR
Avortement	NR	+
Anomalies biochimiques	NR/+++	+++
Hyperglobulinémie	++/+++	+++
Hypoalbuminémie	+	+
Anémie non régénérative	++	++
Leucocytose/leucopénie	+	+
Thrombocytopénie	+	+
Pancytopénie	NR	+
Protéinurie	+	+
Azotémie	+	+
Élévation des Transaminases	+	NR

++++ : Présent dans ≥ 50 % des cas, ++ : présent dans moins de 50% des cas, + : présent dans moins de 25% des cas. NR: non rapporté.

Chapitre 4 :

Diagnostic

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

3- Diagnostic biologique

1-1- Méthodes non spécifiques

a- Examens hématologiques

La leishmaniose peut entraîner des modifications de l'hémogramme, comme citées précédemment ; elles ne sont pas toujours observées mais on peut parfois noter [69] ; [70].

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

b -Examens biochimiques

Les protéines totales sont souvent augmentées : en général leur taux est supérieur à 80 g/L. Leur électrophorèse met en évidence un pic bêta-gamma (figure 7).

Une hyperglobulinémie est présente associée à une hypoalbuminémie dans plus de 90 % des cas. Le rapport albumine sur globuline peut être un paramètre intéressant dans le cadre du suivi thérapeutique, car il augmente progressivement.

Les paramètres rénaux peuvent également être affectés. Ils sont à évaluer et à suivre en cours de traitement car les molécules utilisées sont néphrotoxiques [69] ; [70].

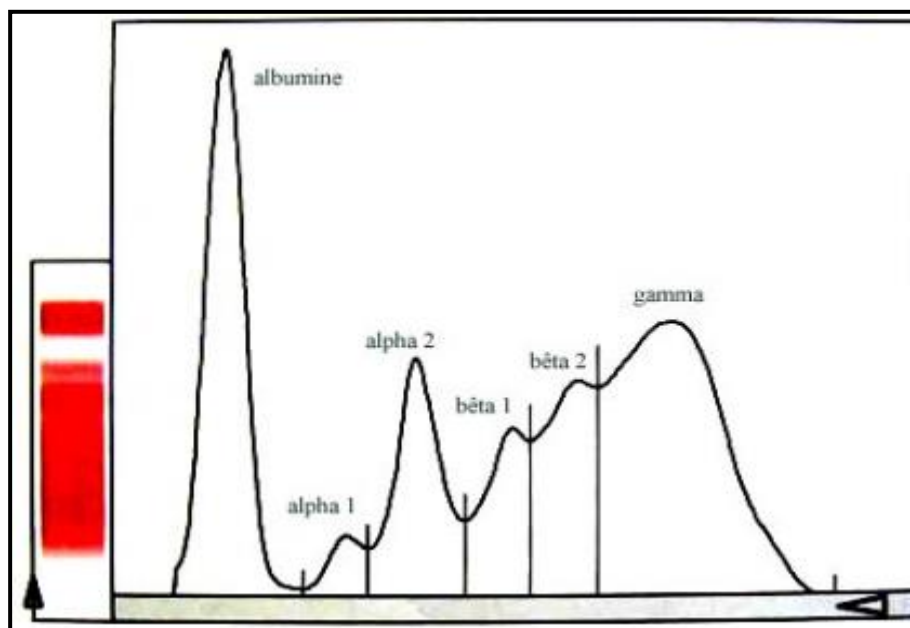


Figure 4.1 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien.

Dépistage, traitement et prévention de la leishmaniose canine en Corse. (Prof Georges Lubas) 2013.

Formoleuco-gélification :

Il s'agit d'un test qui traduit la forte concentration du sérum en protéines (dont les globulines) en les faisant précipiter sous forme visible en ajoutant quelques gouttes de formol au sérum. La prise en masse et l'opalescence traduisent cette hyperglobulinémie (Papierok, 2002).

1-2- Méthodes spécifiques

a - Mise en évidence du parasite

C'est la seule façon d'obtenir un diagnostic de certitude. Les prélèvements possibles pour la réaliser sont [69] :

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

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

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

α- Microscopie

Les parasites intra-monocytaires sont recherchés après fixation à l'alcool et coloration par la technique de May-Grünwald-Giemsa de calques cutanés, d'adénogrammes ou de myélogrammes. Cette méthode est réalisable au cabinet par le vétérinaire praticien un peu expérimenté et permet en cas de mise en évidence du parasite de confirmer très simplement et rapidement le diagnostic. Malheureusement sa sensibilité est faible (60 %) [69].

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

La probabilité d'observer les leishmanies est plus importante en début d'évolution de la maladie, la charge parasitaire étant en effet plus élevée car la multiplication est plus intense, elle est ensuite limitée du fait de la réponse immunitaire de l'organisme [71]

β- Culture du parasite

Le parasite est cultivé dans le milieu de Nicolle-Novy-Mac Neal à partir d'un prélèvement. C'est la méthode de référence, mais elle nécessite quelques semaines d'incubation. Elle n'est réalisée que par les laboratoires de recherche [69].

Ω - PCR

c-2- PCR ou réaction d'amplification de gène (Polymerase Chain Reaction)

L'objectif de cette méthode diagnostique est d'amplifier une région déterminée de l'ADN du parasite (ADN cible) pour détecter ou non sa présence. On réplique un grand nombre de fois *in vitro* une séquence d'ADN à l'aide de deux amorces complémentaires encadrant cette séquence, en utilisant la Taqpolymerase. Chez *Leishmania sp.*, il existe une cible d'ADN répétée en plusieurs milliers d'exemplaires: le kinétoplaste, ce qui a permis la mise en place d'une méthode PCR ultra-sensible. Cette technique s'effectue à partir d'un échantillon de moelle osseuse, de nœud lymphatique, de sang ou de peau.

La réaction est simple, spécifique et extrêmement sensible.

Des études effectuées chez le chien soulèvent quelques interrogations quant à cette technique. En effet, des taux très élevés de résultats positifs sont obtenus à partir de prélèvements de peau de chiens sains en zone d'endémie, certains ayant une sérologie négative, laissant supposer la possibilité d'une contamination cutanée fréquente.

Par contre, des PCR réalisées sur des ponctions de moelle osseuse ou de ganglions s'avèrent positives sur des chiens séronégatifs [75]. De plus, dans l'étude menée en Italie, sur les 11 chats séropositifs testés de nouveau quelques mois plus tard, tous sont positifs à la PCR effectuée sur les nœuds lymphatiques, et seulement 5 sur celle effectuée à partir de prélèvements sanguins [76].

La méthode PCR sur nœuds lymphatiques ou moelle osseuse semble donc plus performante que la PCR sur sang.

L'avantage de ces méthodes indirectes est leur grande sensibilité. La sérologie révèle l'existence d'une réaction immunitaire, la PCR la présence du génome du parasite. L'inconvénient majeur est donc qu'elles ne sont que les témoins d'un contact avec les leishmanies, mais non d'une infection active.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est la plus sensible des trois techniques : sa sensibilité est de 97 %. Elle met en évidence l'ADN de *Leishmania*, même présent en faible quantité, dans les ponctions ganglionnaires ou de moelle. C'est la technique de choix pour l'établissement de la parasitémie. Elle nécessite des équipements sophistiqués et est très sensible aux contaminations, elle est donc réalisée uniquement dans des laboratoires spécialisés. Il est important de noter que 80 % des chiens asymptomatiques vivant en zone d'enzootie peuvent présenter de l'ADN de *Leishmania* dans la peau et les muqueuses mais seulement 10 % dans les ganglions [69]. L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne fait pas la différence entre les leishmanies vivantes et l'ADN leishmanien résiduel ; il est donc préférable de l'utiliser pour confirmer le diagnostic et non dans le cadre d'un suivi thérapeutique [71].

SYBR Green I (agent intercalant) un système de détection le plus simple qui repose sur l'inclusion d'un agent

Intercalant, le 'SYBR Green I' qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets.

La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR.

Le système est simple, très sensible mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces. Le SYBR Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt.

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.

(b) A la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochrome permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence). « PCR EN TEMPS REEL »

REDDAHI .Meriem Rabat 2017.

γ- Techniques d'immunomarquage

Cette technique peut être utilisée lorsque l'histopathologiste n'a pas mis en évidence de parasites malgré la forte suspicion de leishmaniose. Leur but est de révéler la présence d'antigènes présents dans le prélèvement. Il existe plusieurs méthodes [72].

b- Méthodes sérologiques

Elles mettent en évidence et quantifient la présence d'anticorps canins spécifiques de *Leishmania infantum* chez le sujet. Elles ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude mais uniquement de révéler que l'animal a déjà été exposé au parasite (mais des leishmanies sont en général toujours présentes). Un animal en début de contamination ou ayant une immunité cellulaire solide peut se révéler faussement négatif. Un résultat positif correspond à un animal ayant rencontré le parasite et qui a élaboré des anticorps spécifiques, il peut être en début de maladie ou être en état d'immunité acquise et être asymptomatique [69].

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

α - Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte, ou IFI, est la méthode quantitative de référence agréée par l'Office International des Épizooties (O.I.E). Elle est effectuée en utilisant des formes promastigotes de culture comme antigène. Le seuil de positivité est habituellement fixé à 1/100 (ou 1/80). C'est une méthode considérée comme sensible et spécifique. La sensibilité varie entre 92 et 99 % [69] ; [70]

Principe de la technique IFI : [77]

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

- Fixation de l'antigène sur la lame (certaines lames sont commercialisées avec l'antigène déjà fixé)

- Dépôt du sérum du patient et incubation

- Lavage

- Ajout des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par le

fluorochrome

- Lavage

- Lecture à l'aide d'un microscope à fluorescence

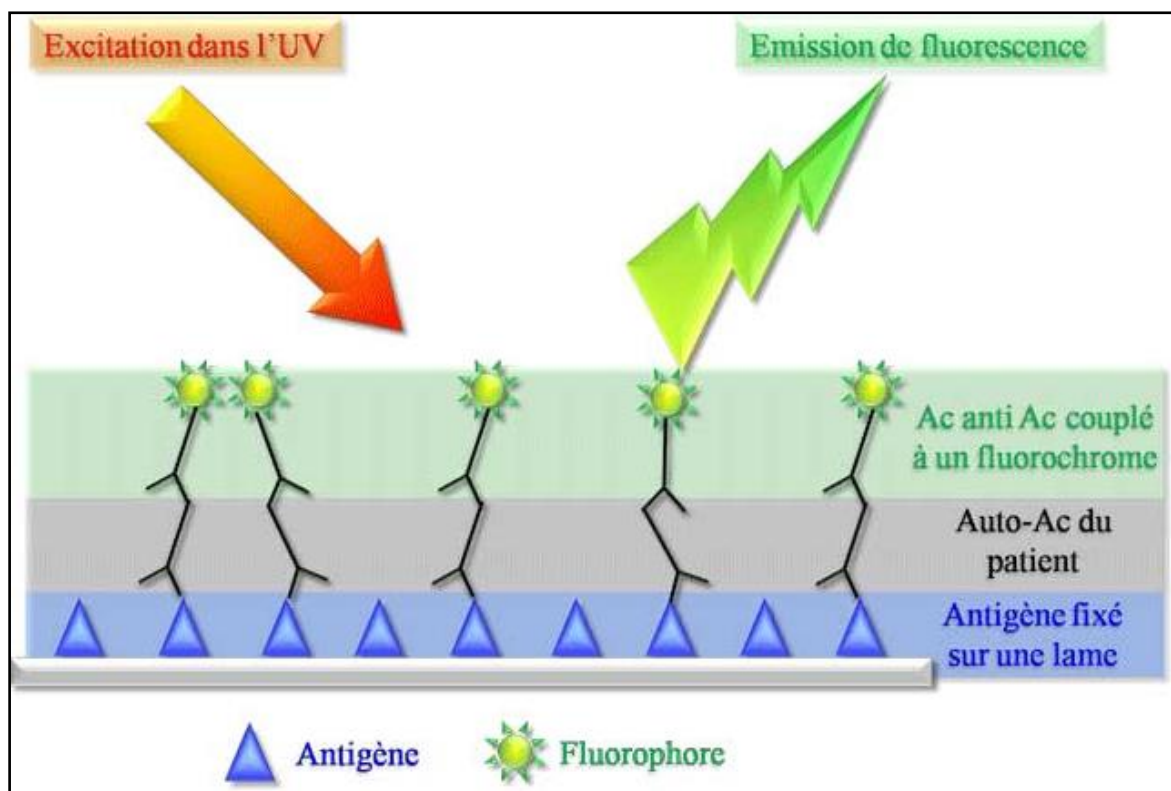


Figure 4-2 : technique IFI [77].

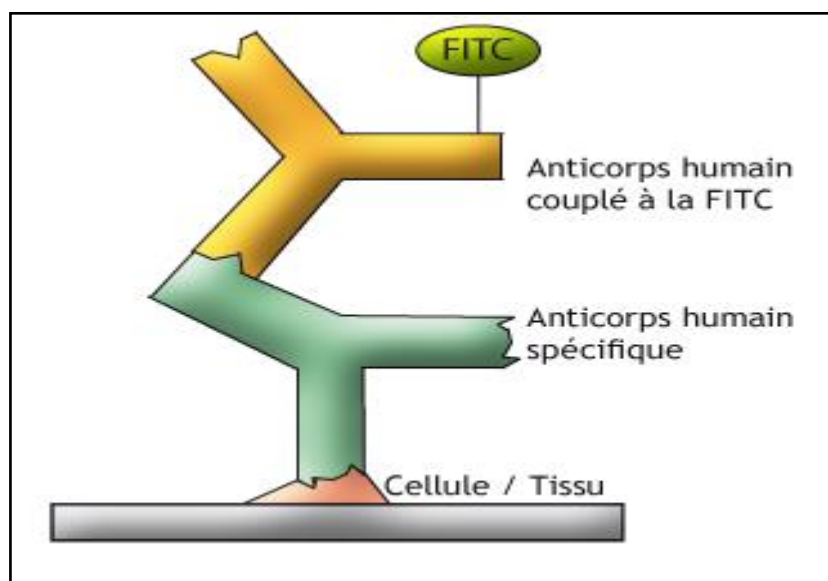


Figure 4.3 : Principe du test IFI [77].

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

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

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

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

β -ELISA

La technique ELISA est une méthode quantitative qui est préférentiellement utilisée par les épidémiologistes car elle a comme propriété d'être automatisable. Elle est au moins aussi sensible que l'IFI, et sa lecture est moins subjective car elle est réalisée par un spectrophotomètre [69].

Ω - Techniques d'agglutination

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

Leur sensibilité est de 95 % et leur spécificité de 94 % [69] ; [71].

α - Western Blot

C'est une méthode qualitative mais elle est très sensible et très spécifique. Elle est pour cela considérée comme la méthode de référence en sérologie. Elle permet de détecter les anticorps spécifiques d'antigènes de *Leishmania infantum* préalablement séparés par électrophorèse [69].

Plus précisément un western blot, ou immunoblot, est une méthode de biologie moléculaire qui permet la détection de protéines spécifiques sur une membrane.

La technique se déroule en plusieurs étapes :

Des échantillons protéiques sont déposés sur un gel d'électrophorèse et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Pour cela, un courant électrique est appliqué dans le gel. Plus les protéines ont une taille importante, moins elles migrent vite ;

Une fois que les protéines ont migré, elles sont transférées sur une membrane qui peut être composée de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines ;

Blocage de la membrane : cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et la membrane. Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées ;

Détection : le principe consiste à appliquer sur la membrane des anticorps marqués qui sont spécifiques des protéines que l'on veut observer. On pourra ainsi observer leur position sur le gel.

Les westerns blots sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche qui s'intéressent aux rôles des protéines. Dans le domaine médical, elles sont utilisées dans le diagnostic de certaines maladies. Les tests VIH de confirmation utilisent cette technologie pour détecter un anticorps anti-VIH dans un échantillon de sérum.

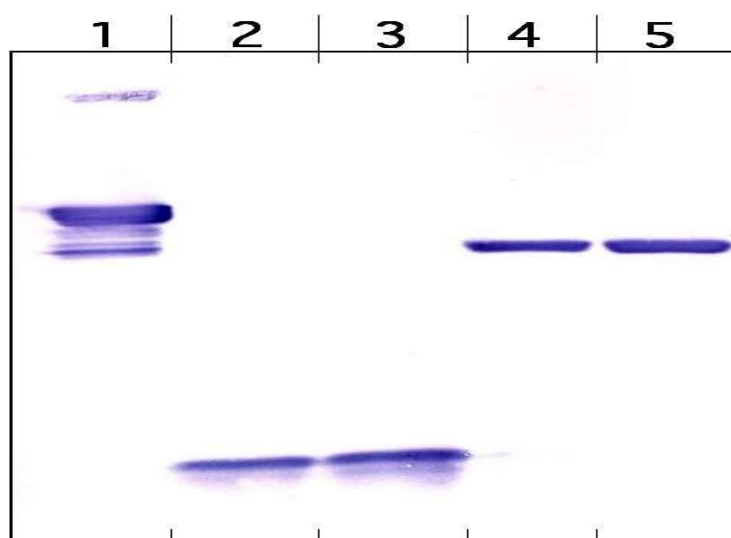


Figure 4-4 : Image d'une membrane de western blot. Les bandes foncées correspondent aux protéines qui ont interagi avec les anticorps marqués utilisés.
JWSchmidt, Wikimedia cité par Nathalie Carré, la leishmaniose viscérale .2010.

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

- Utilisation que l'on veut faire du test : diagnostic de la maladie ou enquête épidémiologique ;
- Zone d'exercice : en zone d'endémie il est important de choisir des méthodes très sensibles pour éviter les faux positifs ;
- Coût de réalisation,
- Stade de la maladie : la PCR permet une détection plus précoce que l'apparition des anticorps et induit moins de faux positifs [72].

Les divers examens spécifiques peuvent être utilisés selon deux objectifs :

- si l'on souhaite confirmer une suspicion clinique (notamment en zone d'enzootie) il faut tenter une observation directe au microscope à partir de calques cutanés, d'adénogramme ou de myélogramme. Si des éléments parasitaires sont présents, le diagnostic est posé. Si le parasite n'a pas été isolé, il faut effectuer une sérologie à partir de sang prélevé sur tube sec il est préférable d'associer deux tests (ELISA et IFI). Si ces analyses sont négatives mais que la suspicion clinique demeure, il faut envisager une PCR réalisée sur un prélèvement de nœud lymphatique ou, à défaut, de sang.

- si l'on souhaite contrôler un animal ne présentant pas de symptômes, il faut faire un contrôle sérologique environ 2 mois après la période de contamination, ou une PCR très sensible à la fin de la saison de contamination [70].

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

4- Chez le chat

2-1-Diagnostic épidémio-clinique

Comme nous l'avons vu précédemment, la leishmaniose devrait être envisagée en présence d'un chat provenant d'une zone d'endémie et présentant des lésions de type nodulaire ou ulcératif, en particulier lorsque celles-ci sont localisées à la face. Toutefois, compte tenu de la diversité des signes présentés par les cas décrits, et de leur manque de spécificité, le diagnostic de la leishmaniose féline repose sur les techniques de laboratoire.

2-2 - Diagnostic différentiel

2-2-1 - En présence de nodules [17]

Les principales dermatoses nodulaires chez le chat sont :

- Abscess sous-cutanés, résultant de bagarres ;
- Phaéohyphomycoses, infections par des champignons de la famille des Dematiacés ;

- Cryptococcose, mycose systémique la plus fréquente chez le chat, due à l' action pathogène de *Cryptococcus neoformans* ;
 - Granulome et la Plaque éosinophylique, qui sont des modalités réactionnelles de la peau du chat ayant des causes variées (Allergies, Infections parasitaires, Infections bactériennes, Agents chimiques, Corps étrangers, Facteurs génétiques)
 - Tumeurs cutanées, qui sont fréquentes chez le chat, et souvent malignes (Carcinome épidermoïde, Carcinome des cellules basales, Fibrosarcome et Mastocytome représentent environ 70% des tumeurs cutanées du chat).
- D'autres dermatoses rares ou exotiques ont également une présentation nodulaire

- Granulomes ou pyogranulomes à corps étranger ;
- Dracunculose, rarissime chez le chat ;
- Toxoplasmose systémique, avec des lésions nodulaires sur les membres ;
- Panstéatite féline, qui provoque des nodules multiples parfois associés à des signes généraux (variété de panniculite due à une carence en vitamine E) ;
- Syndrome granulome/pyogranulomes stérile, qui se manifeste soit par des papules et des nodules érythémateux ou violacés, localisés à la tête ou aux pavillons auriculaires, soit par des plaques jaunâtres bien délimitées, sur les zones pré-auriculaires ;
- Xanthomatose (papules, plaques, nodules blanchâtres ou jaunâtres localisés sur la tête, extrémité des membres ou les proéminences osseuses).

IV-2-2-2 - En présence d'ulcères [17]

Les principales dermatoses ulcératives observées chez le chat sont :

- Pyodermite profonde, souvent secondaire à un corps étranger ;
- Dermatite ulcérate associée au virus Herpes de type I. affectant le chat adulte ou âgé, provoquant des vésicules, des ulcères et des croûtes localisées à la face et à la truffe, une stomatite étant parfois présente ;
- Poxvirose, se traduisant d' abord par une lésion initiale sous forme d'une plaque ulcérée ou proliférative située sur la tête, le cou ou les membres antérieurs, puis par de multiples lésions secondaires parfois accompagnées de signes généraux;
- Allergies et l'intolérance alimentaire, qui peuvent se manifester sous forme

d'une dermatite prurigineuse de la tête et du cou, caractérisées par des excoriations, des lésions ulcératives et des croûtes;

- Ulcère labial atone, localisé à la lèvre supérieure;
- Pemphigus foliacé, dermatite auto-immune la plus rencontrée chez le chat;
- Pododermatite à plasmocytes;
- Carcinome épidermoïde, se présentant sous la forme d'un ulcère térébrant, surtout localisé sur l'extrémité des pavillons auriculaires ou la truffe, plus rarement sur les paupières ou les lèvres
- Carcinome des cellules basales;
- Troubles du comportement.
- Plus rarement, on rencontre les dermatoses ulcératives suivantes:
 - Brulures et gelures;
 - Pyodermites profondes à mycobactéries, à *Nocardiasp.*, à *Actinomyces* sp. ;
 - Péritonite infectieuse féline qui est rarement à l'origine d'ulcères;
 - Anatrichosomose (nematodes rare);
 - Candidose cutanée, les mycoses sous-cutanées et systémiques;
 - Toxidermies
 - Affections dysimmunitaires rares: Pemphigus vulgaire, Pemphigoïde bulleuse, Pemphigoïde des muqueuses, Lupus érythémateux systémique, Epidermolyse bulleuse;
- Syndrome de fragilité cutanée secondaire à un syndrome de Cushing, un diabète sucré, l'administration prolongée d'acétate de mégestrol, Atteinte hépatique.

Certaines des affections suscitées peuvent être présentes de façon concomitante à la leishmaniose, comme cela a pu être observé (Dermatite miliaire et complexe granulome éosinophylique sur un chat allergique, Abscès sous-cutanés, Pemphigus foliacé, Carcinome épidermoïde).

2-2-3. En présence d'adénomégalie [73]

En présence d'adénomégalie, le diagnostic différentiel regroupe les infections bactériennes, les mycoses, la toxoplasmose, les infections par les rétrovirus félines, la péritonite infectieuse féline, les processus tumoraux et en particulier le lymphome. Ainsi, les symptômes de la leishmaniose féline sont très peu

spécifiques et rappellent bon nombre d'autres affections. Le diagnostic fait donc appel à des méthodes de laboratoire.

2-3 - Diagnostic de laboratoire

a- Signes biologiques

Dans certains des cas publiés et répertoriés, les signes biologiques présentés par les chats leishmaniens sont rapportés. Les anomalies hématologiques et biochimiques observées dans les cas de leishmaniose féline sont très diverses et inconstantes. Une neutrophilie et une éosinophilie sont parfois notées. Des anomalies sont par contre systématiquement trouvées lorsque le dosage et de l'électrophorèse des protéines sériques sont effectués. Il est rapporté: une hyperglobulinémie dans tous les cas, une augmentation fréquente des gammaglobulines et une hypoalbuminémie (inversion du rapport Albumine/Globuline).

Tableau 4.1 : Paramètres sanguins renseignés dans les cas publiés et répertoriés. (30)

Paramètres sanguins	7	18	20	21	22	24	25	26	28	29	30	31	33	34
			FIV			FIV+			FIV+	FIV				
Anémie	+	-		+	-	-	-	-		+			-	-
Leucocytes		71	N		N	71		N	71	N		N	71	N
Lymphocytes			N		N	N		N				N	N	N
Neutrophiles			N		N	71	71	N	71				71	N
Monocytes			N			N								
Eosinophiles		71	71			N	71	N						N
Thrombocytes										N				N
Urée			N	71	N	N	N	N					N	
Créatinine			N	71	N	N	N	N					N	
PAL			N		N	N	N	N					N	
ALAT			N		N	N	N	N					N	
Pr.Totales		71	71											
Albumine			N								N			
Globulines		71		71	71	71			71		71	71		71
ct2-globulines									71					
P-globulines			A											
y-globulines		71	A		A				A			N		A
Alb/Glob						N								

Alb = albuminémie Glob = globulinémie .

b- Examens directs

Des cas de leishmaniose féline peuvent être découverts par des examens cytologiques ou histologiques.

b-1- Examens cytologiques [74]

Afin de réaliser un examen cytologique, on effectue préalablement soit un calque par étalement d'un produit récolté par écouvillonnage, soit un calque par étalement d'un produit d'aspiration à l'aiguille fine. Le calque par écouvillonnage est utilisé pour les lésions cutanées anfractueuses, et le calque par aspiration à l'aiguille fine permet de ponctionner les nodules, les nœuds lymphatiques et la moelle osseuse. Des frottis de foie et de rate peuvent également être réalisés à partir de ponctions échoguidées. Le matériel collecté est étalé sur une lame de microscope dégraissée qui est ensuite séchée à l'air. Les lames ainsi obtenues sont colorées à l'aide d'un kit de coloration rapide, puis séchées et observées au microscope optique. L'observation des cellules et des leishmanies s'effectue avec l'objectif à immersion (x100) avec un éclairage suffisant et, avec le diaphragme ouvert.

La visualisation des leishmanies constitue un diagnostic de certitude.

b-2- Examens histologiques

Les lésions cutanées peuvent être biopsiées en vue d'un examen histopathologique. Les biopsies sont effectuées soit par la technique « biopsy punch » sous anesthésie locale, soit par la technique chirurgicale en cote de melon sous anesthésie générale. On choisit autant de sites qu'il existe de lésions d'aspects macroscopiques différents, en évitant les zones remaniées, anciennes et/ou ayant subies des traitements topiques. Les prélèvements sont ensuite placés dans un fixateur et envoyés à un laboratoire d'anatomo-pathologie vétérinaire, accompagnés des commémoratifs [74].

En cas de leishmaniose, on observe des lésions histologiques sous forme d'une réaction inflammatoire granulomateuse, associées ou non à la présence de protozoaires.

Ils sont visibles dans les macrophages. Ces lésions ont été rapportées dans des cas de leishmanioses félines répertoriées [20] ; [19] ; [51]. L'observation de telles lésions en l'absence de parasite visible doit conduire à la réalisation d'autres examens complémentaires plus sensibles.

Des immunomarquages peuvent être effectués. Ils permettent la mise en évidence de leishmanies, non visibles en coloration classique.

b-3- Mise en culture

La mise en culture est effectuée à partir de prélèvements de nœuds lymphatiques ou de moelle osseuse. L'échantillon est mélangé avec un milieu de culture puis mis à incuber pendant 7 jours. La culture est ensuite examinée au microscope. Cette technique n'est valable que dans le cas des leishmanioses disséminées.

La sensibilité de cette technique est souvent faible et variable, en relation avec [75]

- Densité parasitaire faible diminue la sensibilité à l'examen microscopique
- Facteurs techniques influent également fortement sur la sensibilité : le milieu de culture utilisé, le rapport quantitéensemencée/nombre de tubes utilisés (Sensibilité augmente avec le nombre de tubes), le nombre de sites de ponction.

En cas de résultat négatif, on procède à une remise en culture de 7 jours, et ce pendant 4 semaines avant de poser une réponse définitive [42].

Après obtention de la culture, l'identification de l'espèce de leishmanies en cause est possible, ce qui est utile dans le cadre des enquêtes épidémiologiques.

b-4- Inoculation à des animaux de laboratoire

Plusieurs espèces sont utilisées pour la mise en évidence de leishmanies (cobaye, souris, rat, chien, hamster). L'inoculation s'effectue par voie sous-cutanée ou intra péritonéale. L'animal est sacrifié après plusieurs mois. Les leishmanies sont alors recherchées.

L'inoculation ayant réussi plusieurs fois chez le hamster, il est aujourd'hui considéré comme une espèce de choix. Cette technique n'est utilisée que dans le cadre de la recherche compte tenu des délais d'incubation.

L'avantage de ces méthodes directes est l'obtention d'un diagnostic de certitude. Leur inconvénient majeur est leur manque de sensibilité.

c - Méthodes indirectes

Les méthodes indirectes permettent la mise en évidence soit des anticorps antileishmaniens produits en réponse à l'infection, soit de l'ADN du parasite.

c-1- Sérologie

La technique de référence chez le chien est l'immunofluorescence indirecte qui présente une très bonne sensibilité. Il existe d'autres techniques : la méthode ELISA, le Western-blot ou l'électro synérèse.

L'absence de réactions croisées leur confère une très bonne spécificité, exceptée pour l'electrosynérèse : des arcs de précipitation peuvent se former en présence d'auto-anticorps ou d'hypergammaglobulinémie et donner des résultats faussement positifs. Les sensibilités de l'immunofluorescence et du Western-blot sont très bonnes. Celle de l'ELISA est plus faible, mais ce test permet de traiter rapidement de grandes quantités d'échantillons. Une quantité suffisante d'anticorps doit être en circulation pour être détectée. Aussi la sérologie peut ne présenter un résultat positif que plusieurs mois après l'infection [75].

Compte tenu du faible nombre de cas de leishmaniose diagnostiqués chez le chat, des obstacles vont à l'encontre de ces méthodes :

- Obtention de témoins positifs,
- Etablissement de valeurs seuils propres à l'espèce féline.

Des auteurs, à l'issue de certaines études, émettent des doutes quant à la fiabilité des méthodes sérologiques conventionnelles dans la détection d'une infection active chez le chat. En 1984 d'abord, une inoculation d'amastigotes par voie intraveineuse de *L. dovani* et de *L. chagasi* est réalisée. Des leishmanies sont détectées dans le foie, la rate et la moelle osseuse dans les huit premières semaines après infection par *L. dovani*, tandis que le taux en anticorps s'élève de façon significative au bout de huit semaines. Les cultures de sang sont positives uniquement dans les deux premières semaines. Le même phénomène est observé après infection par

L. chagasi, avec un délai de 16 semaines post-infection, mais aucune culture sur sang n'est positive. L'inoculation de formes promastigotes de *L. chagasi* par voie intradermique sur 6 chats entraîne l'augmentation significative du taux d'anticorps tandis qu'aucun parasite n'est retrouvé dans le sang, la moelle osseuse, la rate ou le foie [13]. Ces doutes quant à la valeur du dépistage sérologique sont renforcés par l'observation de Simoes-Mattos et *al.*, [30] lors de l'infection expérimentale de 13 chats par *L. braziliensis* : dans cette étude, la période durant laquelle les chats montrent des lésions actives recelant des parasites ne peut être détectée par les méthodes sérologiques habituelles. En effet, tandis que les lésions apparaissent dans les premières semaines post-infection et diminuent à partir de la 10^e semaine post-infection, le titre en anticorps n'augmente significativement qu'à partir de la 12^e semaine, et diminue à partir de la 32^e semaine. Lors d'une étude séro-épidémiologique menée en Sicile sur 203 chats errants (par immunofluorescence indirecte), 33 chats sont positifs. 11 de ces chats positifs sont de nouveau testés 2 à 6 mois plus tard, et 6 sont alors séronégatifs, tandis que l'ADN de *Leishmania infantum* est détecté par PCR dans les nœuds lymphatiques des 11 chats, mais pas sur le sang [76]. Enfin, dans l'enquête de Martin-Sanchez et *al.*, [41] sur 180 chats testés (immunofluorescence indirecte), 108 ont un titre supérieur ou égal à 1/10 et 51 (28,3 %) ont un titre supérieur ou égal à 1/40, alors que dans le lot témoin, 26 chats sur 28 ont un titre égal à 0 et 2 chats ont un titre égal à 1/20. Sur les 180 chats testés, seulement 11 présentent un seuil de positivité ordinaire pour la leishmaniose canine (titre en anticorps : 1/160) et 3 chats obtiennent des titres très élevés (1/640, 1/1280 et 1/5120), et parmi ces chats, un seul présentant un titre en anticorps de 1/160 donne un résultat positif à la PCR. De plus, la fréquence des PCR positives est la même pour le lot de chats présentant un titre inférieur ou égal à 1/20 que pour le lot ayant un titre supérieur ou égal à 1/40

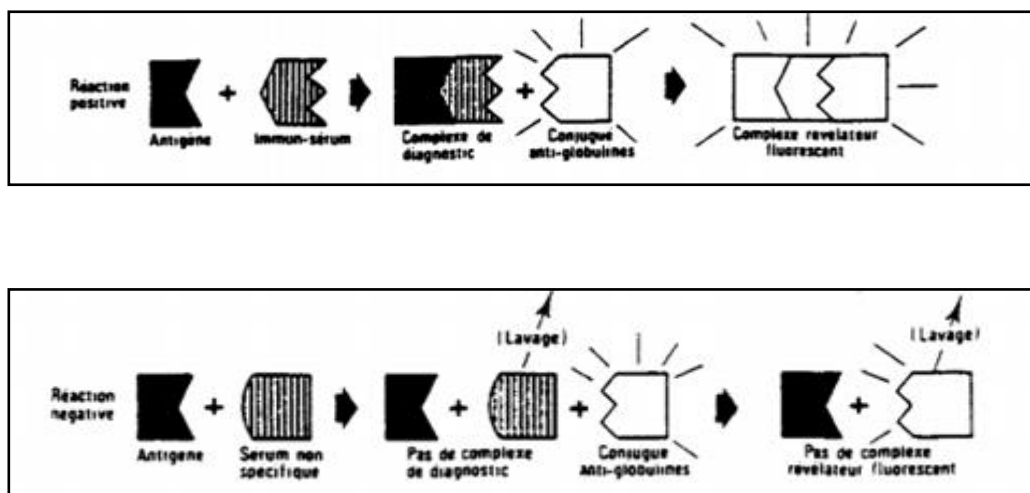


Figure 4.5 : Réaction IFI négative [78]

Ces études suggèrent donc que l'augmentation significative du taux d'anticorps antileishmanian est pas concomitante de l'infection active du parasite, et que de plus, une inoculation intradermique du parasite pourrait entraîner une augmentation du titre sérique sans parasitémie. On peut donc effectivement s'interroger sur la valeur du diagnostic sérologique dans le cadre de la leishmaniose féline. La sérologie semblant être un témoin insuffisant de la présence (ou de l'absence) des leishmanies chez le chat.

Il y a ainsi à notre disposition 2 types de méthodes :

- Méthodes directes qui permettent un diagnostic de certitude mais qui manquent fortement de sensibilité ;
- Méthodes indirectes qui sont très sensibles mais ne prouvent pas une infection active.

Les résultats de ces techniques sont donc à replacer dans le contexte épidémioclinique de l'animal

CHAPITRE 5 :

IMMUNOLOGIE

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

5.1 réponse immunitaire chez le chat .

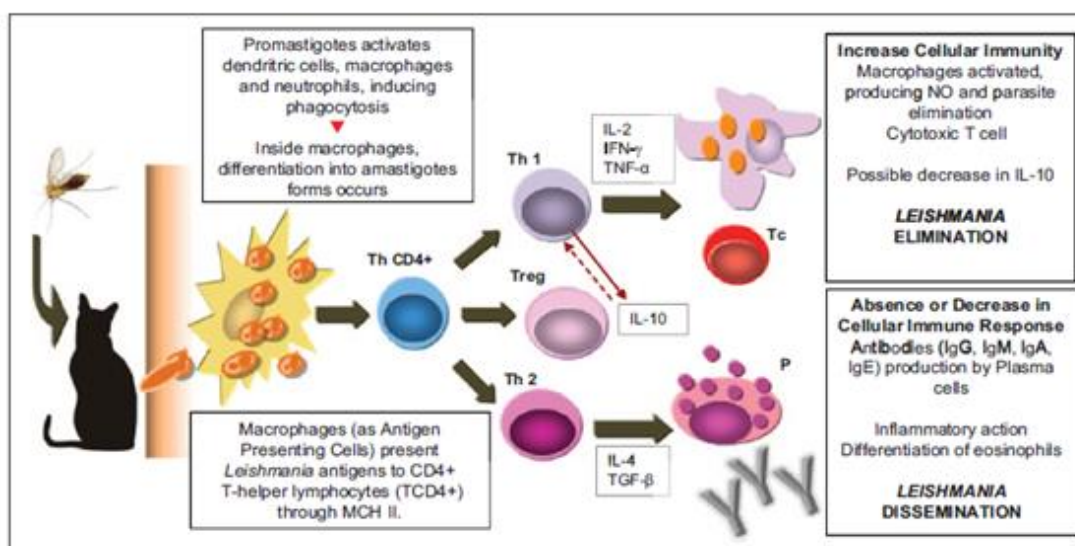


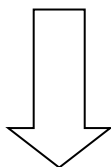
Figure 5-1 : Réponse immunitaire suggérée du félin lors de leishmaniose, conformément au mécanisme immunitaire du Cal. Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniosis. *Parasite Immunol*2006; 28: 329–337. (cité par Pennisi 2018)

Ainsi sur la figure 5-1, l'auteur tente d'expliquer la réponse immunitaire chez le chat selon le schéma suivant :

1/les promastigotes activent les cellules dendritiques, macrophages et neutrophiles induisant la phagocytose à l'intérieur des macrophages, la différenciation en amastigotes se produit.

2/les macrophages (sous forme de cellules antigéniques) présentent l'antigène de Leishmania à CD4+ . , Lymphocytes T auxiliaires (TCD4+), Lymphocytes T auxiliaires (TCD4+) par MCHII (complexe majeur d'histocompatibilité)

3/ il se produit alors une augmentation de l'immunité cellulaire : macrophages activés production de NO et élimination des parasites : cytotoxique diminution cellulaire possible de l'IL-10

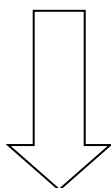


ELIMINATION DES LEISHMANIES.

4/absence ou diminution de la réponse immunitaire cellulaire

(IgG, IgM, IgM, IgA, IgE) production d'anticorps par les plasmocytes

Action inflammatoire, Différenciation des éosinophiles



DISSEMINATION DES LEISHMANIES

Au stade amastigote, l'immunité dépend de la régulation de l'équilibre entre les réactions immunologiques de type Th1 et Th2.

L'acquisition de l'immunité protectrice dépend de la capacité de l'organisme à élaborer une réaction de type Th1, de nature cellulaire, avec des cellules CD4 produisant de l'IFN- γ , de l'IL-12 et de l'IL-2, qui joue un rôle primordial ; le degré de la protection conférée est fonction du nombre des cellules T CD4 intervenant. De ce processus résulte la constitution de granulomes, au sein desquels s'exerce la capacité leishmanicide des macrophages, générateurs de NO (action des leucotriènes) et des neutrophiles : action des substances oxygène-réactives [83]. La réaction Th2, productrice d'anticorps, n'est pas protectrice : des taux élevés d'IgG sont observés au cours de leishmanioses chroniques, n'ayant pas tendance à la

guérison. La réaction Th2 favorise plutôt la pathogénicité des leishmanies par la production d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- β , qui désactivent la réaction Th1. Ainsi, la voie Th2 est à l'origine de la persistance d'une population parasitaire [83].

Alors que la résistance à l'infection reste largement associée à l'action de l'IL-12 produit par une réponse de type Th1, les études utilisant des souris déficientes pour certains gènes ont mis en question le rôle de l'IL-4 dans la sensibilité à la maladie ainsi que des autres candidats impliqués : il a été montré que l'IL-4 n'a pas de rôle aggravant dans la leishmaniose murine. Non seulement les réponses Th2 peuvent être induites indépendamment de l'IL-4 mais aussi que dans certaines circonstances l'IL-4 peut orienter vers la production d'IL-12 et d'une réponse de type 1 [85] ; [86] ; [87].

L'IL-10 est clairement, quant à elle, la principale cytokine immunosuppressive favorisant l'apparition de la maladie et contribuant également de manière significative au maintien d'infections aussi bien chroniques que latentes [85].

L'association de la voie Th1 à la résistance et de la voie Th2 à la sensibilité aux leishmanies intracellulaires est en réalité une simplification d'un système bien plus complexe d'interactions régulatrices et contre-régulatrices. Ces mécanismes dépendent des espèces de *Leishmania* étudiées, de l'hôte utilisé et du tissu examiné [85].

Les cellules T régulatrices ont été démontrées comme étant la seule population connue de cellules T CD4+ capables d'empêcher les maladies auto-immunes et de supprimer l'activation ou la multiplication des lymphocytes auto réactifs. D'une manière générale, elles peuvent être définies par leur capacité à contrôler les réponses immunitaires excessives ou mal dirigées (réponses contre les antigènes du soi ou contre d'autres pathogènes) [88].

Les cellules T régulatrices sont impliquées dans l'induction de l'immunosuppression lors des infections leishmaniennes chroniques. Elles s'accumulent rapidement dans les sites d'infection de *Leishmania major*, supprimant la capacité de la réponse immunitaire à détruire complètement le parasite. Chez la souris, la persistance du parasite est en effet contrôlée par des cellules T régulatrices endogènes : CD4+ et CD25+, qui expriment fortement le gène Foxp3 (essentiel au développement et au

fonctionnement de ces cellules T régulatrices) et la réactivation de la maladie est associée à une augmentation de leur nombre. Ces cellules sécrètent du TGF- β qui participe à la régulation de la croissance du parasite en favorisant sa multiplication et en empêchant la réponse inflammatoire.

Les cellules régulatrices CD4+ et CD25+ sont également capables de sécréter de l'IL-10, qui contribue également à l'immunosuppression [89].

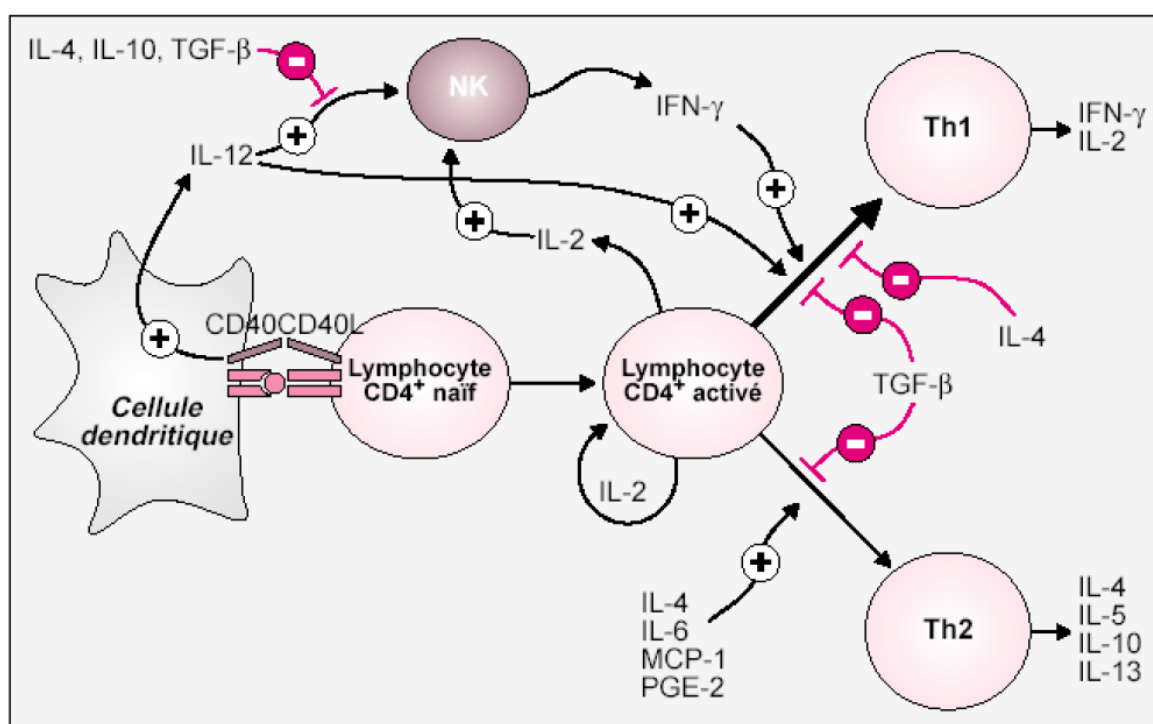


Figure 5-2 : Différenciation des lymphocytes TCD4+ (Filippi, Malherbe et al 2001)

5.2- Rôle de la salive du vecteur

La salive du vecteur contribue directement aux interactions entre *Leishmania* et la réponse immunitaire de l'hôte [101]. L'action de la piqûre des phlébotomes est liée à la vaste gamme de substances pharmacologiques présentes dans leur salive, qui perturbent l'hémostase et la réponse immunitaire de l'hôte. En effet ces molécules aux propriétés anticoagulantes, antiplaquettaires, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immunosuppressives augmentent la probabilité de survie du pathogène [101]. Le tableau 4 liste les propriétés de la salive du phlébotome.

Les leishmanies injectées avec de la salive ont un pouvoir infectant plus important que celles injectées seules et, lorsque peu de parasites sont injectés, la présence de salive détermine si l'infection aura lieu ou non [90].

Tableau 5.1 : Propriétés de la salive du phlébotome [102]

Propriétés vasodilatatrices et immunomodulatrices de la salive du phlébotome
<ul style="list-style-type: none"> - inhibition de l'activation des cellules T - inhibition de l'activation des macrophages - inhibition de la production d'oxyde nitrique et d'H₂O₂ par les macrophages et de la destruction des parasites intracellulaires - augmentation du chimiotactisme et de la phagocytose des parasites par les macrophages - inhibition de l'IFN-γ, de l'IL-12 et de l'iNOS - augmentation de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 - anticomplément - anticoagulation - vasodilatation

La salive du phlébotome oriente la réponse immunitaire de l'hôte vers une réponse de type Th2, caractérisée par une faible production de cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN- γ , et une forte production de cytokines comme l'IL-4 et l'IL-10 [102].

En orientant la production de cytokines, les extraits de glandes salivaires suppriment à la fois la capacité des macrophages à être activés par l'IFN- γ et la fonction de présentation d'antigènes de ces cellules. Ils inhibent donc la production de NO et d'H₂O₂ par les macrophages, ce qui empêche la mort du parasite. Cependant, toutes les fonctions du macrophage ne sont pas affectées car la capture des pathogènes par les macrophages n'est pas altérée [103] ; [90].

D'un autre côté, les hôtes exposés de manière répétée aux piqûres de phlébotomes développent une réponse immunitaire contre des éléments antigéniques présents dans la salive de phlébotome. En effet, les sujets résidant en zone endémique qui ont une réaction d'hypersensibilité retardée au test cutané à la leishmanine développent aussi des anticorps IgG anti-salive de phlébotome et pourraient être protégés contre l'infection leishmanienne.

Ces anticorps pourraient donc servir de marqueur épidémiologique d'exposition au vecteur dans les zones endémiques et de marqueur de protection contre l'infection par la leishmaniose [101] .

Ces observations conduisent à une nouvelle approche des vaccins anti-leishmaniens, en utilisant des composants salivaires pour bloquer la transmission du parasite.

CHAPITRE 6 :

TRAITEMENT ET EVOLUTION

Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude de traitement de la leishmaniose féline. Nous nous baserons donc sur le modèle du chien pour l'étude des molécules actives sur les leishmanies. Nous étudierons ensuite l'évolution de la maladie dans les cas rapportés dans la littérature mondiale lorsqu'un suivi a pu être réalisé, et nous verrons les quelques essais thérapeutiques qui ont été effectués.

1 .Traitement de la leishmaniose canine

1.1- Décision thérapeutique

a- Considérations préalables

Avant d'envisager le traitement long, lourd et coûteux de la leishmaniose canine, deux caractéristiques essentielles doivent être retenues par le praticien confronté au cas clinique [104]:

- le caractère zoonotique de la maladie : la leishmaniose viscérale humaine est due à la même espèce et au même zymodème de leishmanie. La transmission à l'homme se fait, de façon quasi-exclusive, par l'intermédiaire des phlébotomes préalablement infectés à la faveur d'un repas de sang pris sur un chien infecté : l'espèce canine constitue dans nos régions le réservoir du parasite. Notre attitude de clinicien et de thérapeute en la matière est donc potentiellement lourde de conséquences ;
- la persistance du parasite au sein de l'organisme : la leishmanie, par des mécanismes complexes, est capable non seulement de résister aux divers processus de destruction élaborés par le macrophage, mais également de s'y multiplier, de sorte que, non seulement tout chien leishmanien, exprimant des symptômes ou non, est susceptible d'entretenir un foyer endémique (parce qu'il héberge des parasites viables et infectants dans la lymphe dermique capables d'infecter des phlébotomes), mais en outre, même au terme d'un traitement, est exposé à des rechutes (c'est-à-dire des manifestations cliniques variées dues à une multiplication du parasite en divers tissus à partir de quelques leishmanies persistantes).

b- Leishmaniose canine et santé publique

La protection de la santé publique est motivée par plusieurs éléments. Le nombre de cas cliniques humains autochtones n'est pas très élevé, mais le contact homme-parasite est fréquent : une enquête épidémiologique fondée sur un test intradermique à la leishmanine [105] a révélé une moyenne de 30 % de sujets présentant une réaction positive dans la localité de l'Abadie (Alpes-Maritimes), et jusqu'à 60 % chez des personnes âgées.

Ceci démontre qu'en zone d'endémie, la plupart des sujets sont piqués par des phlébotomes infectés, que ceci est proportionnel avec la durée de séjour dans le foyer et qu'ils élaborent à l'encontre de la leishmanie (dont ils sont porteurs) une réaction d'hypersensibilité retardée efficace. Or, les causes d'immunodépression deviennent de plus en plus variées et nombreuses [106] : soit virale (virus de l'immunodéficience humaine responsable du SIDA), soit iatrogénique (utilisation de corticoïdes et/ou d'immunodépresseurs) ; de tels sujets peuvent exprimer, à la faveur de l'immunodépression induite, une leishmaniose.

De plus, la transmission purement mécanique de leishmanies entre le chien (présentant des ulcères cutanés par exemple) et l'homme sensible (enfant, personne âgée ou immunodéprimée) est à envisager. La consultation d'un animal leishmanien vivant au sein d'une famille dont l'un des membres est sensible n'est donc pas médicalement sans risque.

c- Thérapeutique spécifique

Quelques molécules se sont avérées efficaces en matière de leishmaniose canine. Les molécules les plus couramment utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine sont listées dans le tableau 6.1.

Tableau 6.1: Nom et protocole d'utilisation des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine. (104)

<i>principe actif</i>	<i>nom déposé</i>	<i>posologie</i>
antimoniote de méglumine	Glucantime®	100 mg/kg/j SC pendant 3-4 semaines
allopurinol	Zyloric®	(1) 20 mg/kg/j PO en continu (2) 15 mg/kg 2 fois par jour avec 100 mg/kg/j d'antimoniote de méglumine en SC
pentamidine	Lomidine®	2 puis 4 mg/kg, en IM profonde, toutes les 48h pendant plusieurs mois
paromomycine	non commercialisé en France	10-20 mg/kg/j IM pendant 4 semaines
amphotéricine B	Fungizone®	0,5-0,8 mg/kg, IV stricte en 5-30 secondes, 2 à 3 fois par semaine
amphotéricine B sous forme liposomale	AmBisome®	
kétoconazole	Kétofungol®	10-20 mg/kg/j en 2 prises quotidiennes, PO, pendant 2 mois
quinolones : enrofloxacin marbofloxacin	Baytril® Marbocyl®	10 mg/kg/j PO 2 mg/kg/j PO pendant 28 jours

A noter que les molécules présentées dans le tableau 6-1 sont utilisées tant chez le chien que chez le chat.

Plusieurs molécules et combinaisons de molécules ont été testées chez le chien

2.2.1 - Molécules actives sur les leishmanies [104]

Tableau 6.2: *Liste de molécules citées leishmanicides ou leishmaniostatiques.* [104]

Principe actif	Nom commercial
Antimoniote de méglumine	Glucantime®
Pentamidine	Lomidine®
Allopurinol	Zyloric®
Amphotéricine B	Fungizone®
Quinolones* (Enrofloxacin)	Baytril®,
Miltefosine	Impavido®

a) Antimoniote de méglumine

L'animal traité quel que soit son statut clinique et parasitologique, n'est plus source de parasites durant 4-5 mois, il le redevient ensuite, et parfois exprime une rechute. La dose quotidienne optimale est de 100mg/kg, par voie sous-cutanée. La durée d'administration doit être de 20 jours au minimum (voire 30 jours) de façon continue

b) Allopurinol

Cette molécule est leishmaniostatique, et lorsqu'elle est utilisée seule, à la dose de 10-20 mg/kg/jour per os durant plusieurs mois, elle diminue les risques de rechute, mais son utilisation seule ne suffit pas à traiter la leishmaniose.

c) Pentamidine

L'isoethionate de pentamidine est le seul sel de pentamidine actuellement disponible, le mesylate de pentamidine (Lomidine®) ayant été retiré. Ses injections sont parfois douloureuses et peuvent s'accompagner d'hypotension et de nausées. Elle est utilisée à la dose de 3 à 4 mg/kg en 1-3 injections quotidiennes en I.M, à plusieurs jours d'intervalles.

d) Amphotéricine B

Elle est utilisée à la dose de 0,5 à 0,8 mg/kg jusqu'à un total de 8 à 15 mg, par voie intraveineuse stricte, en 2-3 fois par semaine. Ce traitement est efficace mais il est formellement proscrit, car il constitue la base de la thérapeutique chez l'homme. Cette molécule, qui permet une stérilisation parasitaire totale, est donc à bannir chez le chien et chez le chat, afin de ne pas favoriser l'apparition de souches résistantes.

e) Aminosidine (paromomycine)

Ses résultats sont satisfaisants à la dose de 5mg/kg maximum, 2 fois par jour pendant 3 à 4 semaines. Cependant, la prescription de ce traitement requiert un bon fonctionnement rénal, ce qui limite fortement son champ d'utilisation.

f) Spiramycine associée au Métronidazole

Ce traitement comprend 150 kUI/kg de spiramycine, et 25 mg/kg/jour de métronidazole par voie orale pendant 13 semaines, en association avec le Glucantime® ou l'enrofloxacin. Des essais cliniques ont montré des résultats satisfaisants, mais qui ne sont pas supérieurs à ceux obtenus avec le traitement consensus.

g) Fluoroquinolones

L'enrofloxacin, à la dose de 20 mg/kg/jour par voie orale pendant 4 semaines ou en association avec le métronidazole 10 mg/kg/jour par voie orale pendant 4 semaines, et la marbofloxacin, à la dose de 2mg/kg/jour *per os* pendant 10 à 40 jours, sont des molécules qui donnent *in vitro* de bons résultats mais qui nécessitent confirmation par des essais cliniques.

h) Dérives de l'imidazole

Ces molécules donnent des résultats décevants.

i) Millefosine

Elle a montré des résultats prometteurs, avec une bonne efficacité, une faible toxicité et une administration aisée. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a interdit son usage pour les animaux, afin d'éviter l'émergence de souches de leishmanies résistantes.

2.2.2- Traitement chez le chien [104]

A partir des données actuelles, et en combinant les différents critères d'efficacité, de toxicité minimale, et de santé publique, le traitement actuel à privilégier chez le chien est fondé sur l'utilisation de l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) à la dose de 100 mg/kg/jour, pendant au moins 21 jours et pouvant être prolongé jusqu'à 28 jours, exclusivement par voie sous-cutanée, en association avec l'Allopurinol (Zyloric®), à la dose de 15 mg/kg matin et soir, tous les jours, en permanence. Cette association donne des résultats cliniques et sérologiques et des fréquences de rechutes plus favorables qu'en cas d'utilisation de ces composés seuls.

L'animal ainsi traité reste toutefois exposé aux rechutes : la thérapeutique actuelle ne permet pas la stérilisation parasitaire de l'animal. Un suivi de l'état clinique, des analyses biologiques et de la sérologie, est nécessaire afin d'éviter une éventuelle récurrence. Enfin, l'allopurinol à la dose de 15 mg/kg matin et soir de façon continue diminue significativement les risques de rechute. A partir des études effectuées chez le chien et en l'absence de données chez le chat, des traitements ont été tentés dans certains cas.

3- Suivi des cas de leishmaniose féline

Sur les 35 cas répertoriés, le suivi de 22 d'entre eux est réalisé. 7 cas sont morts spontanément (32 % des chats suivis), 6 cas présentent une guérison clinique (27 % des chats suivis). Le suivi de ces chats n'est pas standardisé, ce qui rend difficile une étude comparative de ces cas. Ils sont répartis en 2 catégories : les chats non traités et les chats recevant un traitement spécifique de la leishmaniose.

3.1-Chats non traités

Sur les 22 chats suivis, 15 n'ont reçu aucun traitement spécifique de la leishmaniose.

Sur ces 15 cas, 7 chats sont morts spontanément, soit 27% des cas suivis et 47% des chats n'ayant reçu aucun traitement spécifique de la leishmaniose. 2 d'entre eux présentaient des affections intercurrentes graves (affection pulmonaire, FIV).

La description de 3 cas nous informe de l'existence de signes généraux (amaigrissement, lymphadénite et splénomégalie, hépatomégalie et splénomégalie

avec envahissement de ces organes par des leishmanies). Chez le chat, la dissémination du parasite dans l'organisme semble donc pouvoir engendrer la mort. Parmi les 8 autres chats, 5 sont euthanasiés et 3 montrent une rechute, une persistance ou une aggravation des lésions. 2 d'entre eux développent une insuffisance rénale chronique.

3.2- Chats traités contre la leishmaniose

L'exérèse seule des lésions ne semble pas suffisante : elle a été réalisée en première intention dans 4 cas. L'un d'entre eux est mort, les autres ont présenté des rechutes. Des essais thérapeutiques ont été réalisés sur 9 chats, et la guérison clinique a été obtenue pour 6 de ces cas (67%). Plusieurs traitements ont donc été essayés à partir des molécules plus ou moins efficaces chez le chien.

Tableau 6.3- Molécules utilisées : Evolution chez les chats traités.[104]

Molécule	Résultats
Antimoniote de méglumine	2 fois, seul ou en association avec du kétoconazole a entraîné une guérison clinique
Allopurinol	Employé seul ou associé à diverses molécules (interferon, corticoïdes, antibiotiques). Dans les 4 cas utilisés, la guérison clinique a été obtenue
Pentamidine	Guérison clinique (employée une seule fois)
Aminosidine	En topique n'a entraine aucune amélioration.
Spiramycine metronidazole	+ Utilisée une seule fois, avec du fluconazole, il s'est avéré inefficace chez le chat.
Fluoroquinolones	Enrofloxacin associée à l'allopurinol dans un cas,. la guérison clinique a été obtenue.
Dérivés de l'imidazole	Clotrimazole en topique et le levamisole dans un cas, et l'itraconazole dans l'autre cas, n'ont eu aucun effet.

A noter que l'allopurinol et le n-méthyl-méglumine sont les plus utilisés. Tableau 6-3

Le chat est considéré comme un hôte inusuel de *Leishmania spp.* Par différentes méthodes (HAI, IFI, ELISA, WB), la séroprévalence varie de 0,6% à 59%.

Trois zymodèmes ont souvent été signalés : ZMON1 (2 cas), ZMON72, ZMON201.

L'hémogramme a révélé, une neutrophilie, une lymphopénie, une pancytopénie, une anémie et, plus rarement une éosinophilie. L'électrophorèse des protéines réalisées chez 15 chats a révélé une hyperglobulinémie (14 cas) et une hypoalbuminémie (11 cas).

Bien que le chat semble susceptible de transmettre les leishmanies, le portage du parasite par cette espèce est mal estimé. Ainsi, le rôle du chat dans le cycle du parasite est encore méconnu. Constitue-t-il un hôte occasionnel, un réservoir secondaire?

Ces questions ont leur importance non seulement en médecine vétérinaire, mais également dans le cadre de la santé publique, compte tenu du caractère zoonotique de la maladie. Le chat est également une victime de la maladie. Les cas recensés restent rares, mais s'agit-il d'une capacité du chat à éliminer le parasite, ou simplement du fait que la leishmaniose féline est sous diagnostiquée ?

Le traitement courant de la leishmaniose, le plus utilisé par les vétérinaires étant l'association antimoniée de méglumine-allopurinol, se heurte à des problèmes de toxicité, de rechutes et de résistances, si bien que le traitement optimal de la maladie et la stérilisation parasitaire sont encore impossibles. En revanche, des progrès ont été réalisés dans la prophylaxie de la leishmaniose canine, c'est-à-dire la prévention de l'infection par la réduction des piqûres de phlébotomes grâce à des insecticides topiques et par la vaccination (vaccin disponible au Brésil depuis 2004) [108].

Chapitre 7 :

PARTIE EXPERIMENTALE

I- Introduction & Objectifs

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires endémiques en Algérie, où elles sont dues à diverses espèces de *Leishmania sp.* espèce responsable d'une zoonose des canidés domestiques et sauvages largement répandue dans le monde, notamment sur le pourtour du Bassin méditerranéen. Comme les autres espèces de *Leishmania*, *L. infantum* est transmise, par des espèces spécifiques de phlébotomes.

L'augmentation de la prévalence chez les chiens a été accompagnée également par l'apparition de l'infection chez le chat. Cependant, bien que décrite en 1912, la leishmaniose du chat, *Feliscatus*, a été longtemps considérée comme un phénomène exceptionnel. Elle semble une réalité dans certains pays du sud de l'Europe où des enquêtes ont montré des taux de séroprévalence faibles, Espagne (Ayllon et al., 2008), Grèce (Diakou et al., 2009) à moyens 12% en France (Marty et al., 2006), voire élevés (39 à 59%) en Italie (Pennisi et al., 2005). **Le rôle épidémiologique de cet animal reste encore à déterminer : hôte occasionnel ou vrai réservoir ?**

Il convient de signaler aussi que la plupart des chats infectés peuvent ne présenter aucun signe clinique, ou au contraire présenter des signes cliniques mineurs, modérés ou sévères et de ce fait constituer une source majeure d'infection pour l'insecte vecteur. Cette diversité des manifestations cliniques rend le diagnostic clinique très difficile à établir.

En raison de la forte proportion de chats infectés asymptomatiques et parce que l'examen direct n'est pas assez sensible, la détection d'anticorps spécifiques reste la méthode de choix pour le dépistage aussi bien de la maladie que de l'infection. Les techniques sérologiques les plus couramment utilisées sont : l'immunofluorescence indirecte (IFI) (Lanotte et al., 1975; Gradoni, 2002), le test d'agglutination directe (DAT) (Harithet al., 1989; Cardoso et al., 2004) et les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) (Neogy et al., 1992; Mettler et al., 2005). Récemment,

l'utilisation de la technique d'immunoempreinte ou western blot (WB) de par sa grande spécificité et sa grande sensibilité, est une technique de choix notamment pour confirmation du diagnostic (Talmi-Frank et al., 2009).

L'identification du parasite en cause est indispensable dans toute enquête épidémiologique afin d'établir l'agent causal. L'analyse iso-enzymatiques est la technique de référence d'identification des *Leishmania*. Chez le chat, aucune étude à ce jour n'a été réalisée, afin d'identifier la ou les souches circulantes.

L'étude réalisée est une enquête transversale épidémiologique à visée descriptive. Elle décrit la présence, voire la confirmation de la présence de la leishmaniose chez le chat dans la région dite « Grand Alger », le rôle des chats asymptomatiques comme réservoirs de l'infection, la fréquence des signes cliniques qu'elle entraîne chez les chats malades, la détermination des facteurs de risques de l'infection et l'identification des zymodèmes de *L. infantum* circulants dans la région.

Notre étude se divise en quatre (4) volets :

1/ une enquête rétrospective sur la leishmaniose féline auprès des vétérinaires praticiens de la région d'Alger.

2/ déterminer les prévalences de la leishmaniose chez deux (2) espèces (le chien reconnu réservoir principal et le chat comme hôte occasionnel ou vrai réservoir ? tous les 2 exposés au même risque infectieux) cette étude a été menée grâce à un kit de diagnostic rapide, le Witness leishmania.

3/ le troisième volet a consisté en l'étude de 220 échantillons de sang de chats récoltés au niveau de la fourrière d'Alger HURBAL et testés grâce aux techniques ELISA et RT-PCR.

4/ enfin le quatrième volet a vu la récolte d'un échantillon plus important de sang de chats (754) toujours au niveau de la fourrière HURBAL d'Alger, sur cet échantillon des tests (ELISA, IFAT, WB et RT-PCR) ont pu être effectués

Première partie : Enquête auprès des vétérinaires d'Alger

1. Pré-enquête :

Leishmania infantum (Li) est une zoonose à transmission vectorielle par les phlébotomes, les mouches des sables et les chiens sont considérés comme les principales hôtes réservoir du parasite (Solano-Gallego et al. 2009). En fait, la majorité des chiens infectés ne présentent pas de signes cliniques ou ne développent que de symptômes bénins de la maladie et de soutenant la survie du parasite pendant les saisons froides lorsque les vecteurs ne sont pas actifs (Bates, 2007 ; Pennisi, 2015).

Un certain nombre d'enquêtes ont été - et sont toujours - menées dans le but de mieux comprendre les mécanismes pathologiques de la leishmaniose canine (CanL) 2 de poser un diagnostic précoce et précis, de prendre en charge la maladie et de prévenir la propagation de l'infection.

La leishmaniose féline (FeL) 3 causée par le Li apparaît comme une maladie émergente, en fait, au cours des deux dernières décennies, il a été de plus en plus fréquemment signalés de cas dans les zones endémiques et observés sporadiquement aussi dans les zones non endémiques chez les chats domestiques (Rüfenacht et al., 2005 ; Richter et al, 2014 ; Pennisi et al, 2015a ; Maia et al, 2015 ; Basso et al, 2016 ; Pimenta et al. 2015). Cependant, l'augmentation du niveau de soins médicaux donnés aux chats a contribué à l'"émergence" de FeL ainsi qu'à la disponibilité de FeL.

Des outils de diagnostic plus sensibles et des progrès dans la compréhension des interactions parasite-hôte-vecteur (Cantacessi et al. 2015).

Ces dernières années, des informations plus détaillées sur le FeL ont été publiées et il est de plus en plus évident qu'il y a plus de similitudes avec le CanL qu'on ne l'avait supposé dans le passé et le but de ce travail est de résumer les connaissances actuelles sur le FeL en mettant l'accent sur les similitudes par rapport à CanL.

Tableau 1-1 : Comparaison des résultats des enquêtes sur la leishmaniose canine réalisées à Alger depuis 1910 (publié en 2002)

Période	Total	Positifs	%	Auteurs
1910-1913	833	25	3	Sergent Ed, Sergent Et Senevet .Lemaire et coll
1949-1950	444	35	7.8	Loufrani .Poul
1972-1973	357	9	2.5	Dedet et coll
1990-1997	1800	666	37	Harrat ,Belkaid

Les trois premières enquêtes ont été effectuées de façon systématique au niveau de la fourrière canine. La dernière enquête concernait 8 centres urbains de la capitale. Noter l'augmentation du nombre de cas de chiens leishmaniens au cours de la dernière décennie.

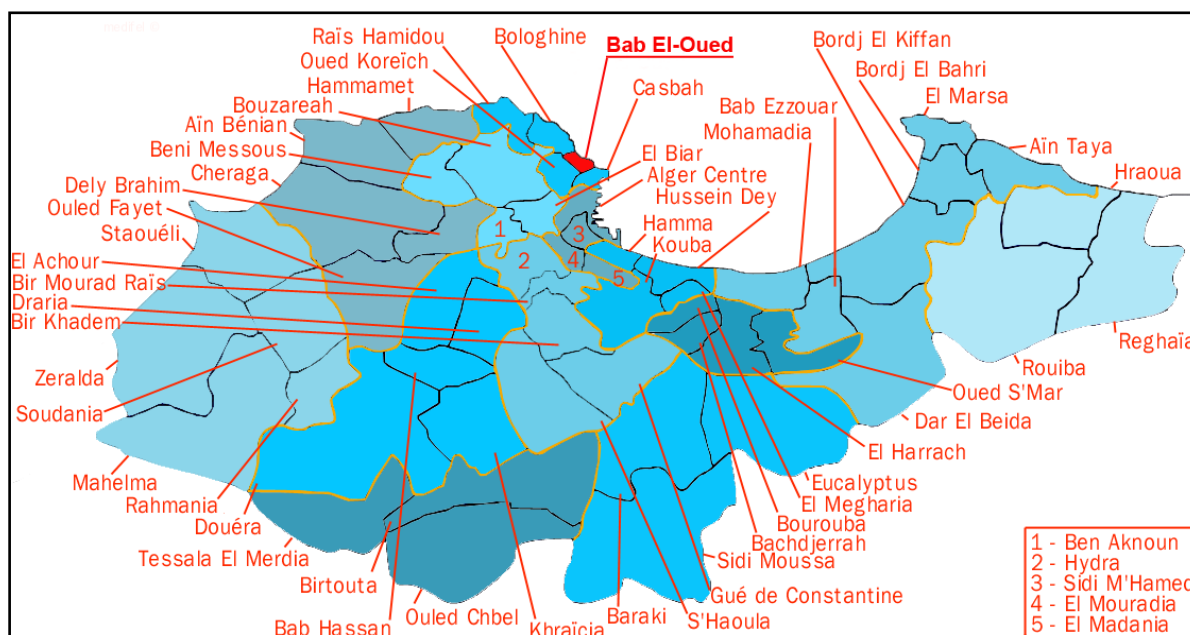


Figure 1.1 : Wilaya d'Alger et ses 57 communes (Wikipédia)

1.2-Matériel

L'objectif de cette enquête est de faire un état des lieux des techniques de dépistage utilisées, des différents traitements mis en place ainsi que de la prévention réalisée vis-à-vis de cette maladie par les vétérinaires praticiens de la région d'Alger.

Tous les praticiens ont été sollicités directement (dans leur propre structure) en vue de participer à l'enquête, ceci afin que cette étude soit la plus représentative possible.

De par ses compétences de clinicien et de thérapeute, le vétérinaire peut concourir à un meilleur dépistage du chien infecté / malade et surtout conseiller et prescrire une prophylaxie vaccinale et insecticide dont l'efficacité sera appréciée par son impact sur la leishmaniose viscérale humaine. (Bourdoiseau. G)

1.3-Méthode

Les questions posées portent sur :

- Des informations générales : nom du cabinet, du praticien, qualité (titulaire, assistant, remplaçant), coordonnées de la structure, type de clientèle.
- Des données épidémiologiques : taille de la clientèle canine (nombre de consultations par tranche), nombre de suspicions au cours des douze derniers mois, sur l'origine des chiens infectés (sédentaires ou de passage), évolution de la maladie.
- Le diagnostic de la maladie : outils utilisés pour établir le diagnostic, proposition d'une liste de signes cliniques dont il est demandé d'évaluer la fréquence relative et la pertinence dans la suspicion clinique, types de chiens atteints préférentiellement (races, activités, âge...), nombre de cas confirmés, nombre de nouveaux cas, recours ou non à l'examen complémentaire pour établir le diagnostic et le cas échéant identification précise des méthodes utilisées, lieu(x) d'établissement du diagnostic.
- Le traitement de la maladie : nombre de chiens traités et proportion de chiens traités parmi les nouveaux cas au cours des douze derniers mois, recours au

traitement, causes de non traitement, liste de traitements proposée associés à leur posologie, durée, fréquence et efficacité estimée, schéma thérapeutique précis de l'utilisation de l'allopurinol lorsqu'il est utilisé, adaptation ou non du protocole thérapeutique et sur quels critères.

- Le suivi et l'arrêt du traitement : réalisation ou non d'un suivi et à l'aide de quels paramètres, arrêt ou non du traitement à l'allopurinol.

- La prophylaxie de la leishmaniose : informations délivrées aux clients concernant la leishmaniose, les mesures de prévention recommandées (limitation de la population de vecteurs, exposition des chiens, traitements topiques, vaccination) et observance des propriétaires, sentiment des praticiens par rapport au nouveau vaccin Canileish® ainsi que sa fréquence relative et son cadre d'utilisation.

Enfin et surtout, suspicion de cas de leishmaniose féline .Durant cette étude, des questionnaires élaborés par nos soins ont été distribués à quinze (15) vétérinaires privés installés dans la région d'Alger notamment Delly Ibrahim, Kouba, Birkhadem, ElHarrach, ElBiar, Baba Hacene, Cheraga et Béni Messous. Notre choix s'est porté sur les praticiens dont l'activité dominante est la canine et qui exercent essentiellement en milieu urbain, ces derniers sont quasiment tous généralistes (14) à l'exception d'un spécialiste (chirurgien), leur expérience professionnelle varie de 5 à 20 ans.

Durant l'année 2012 ces vétérinaires ont eu à suspecter la leishmaniose sur 20 cas en moyenne, aucun d'eux n'a évoqué la suspicion de la pathologie chez le chat. Leur démarche diagnostique est basée sur l'examen clinique de l'animal avec pour signes prédominants chez le chien l'alopécie, l'amaigrissement, les lésions cutanées, les adénopathies et l'épistaxis. L'examen clinique est systématiquement suivi d'un prélèvement sanguin envoyé à l'IPA, quelques rares praticiens utilisent le test d'orientation en l'occurrence la FLG.

Pour le diagnostic épidémiologique, il est surtout tenu compte de leur part des paramètres tels que l'âge et la race.

La majorité des vétérinaires sondés envisagent l'euthanasie de l'animal à quelques rares exceptions qui préconisent un traitement notamment à base d'Allopurinol (disponibilité), et un suivi sérologique.

1.4-Résultats de l'enquête :

1/Etude rétrospective sur l'expérience professionnelle des vétérinaires sondés dans la région d'Alger.

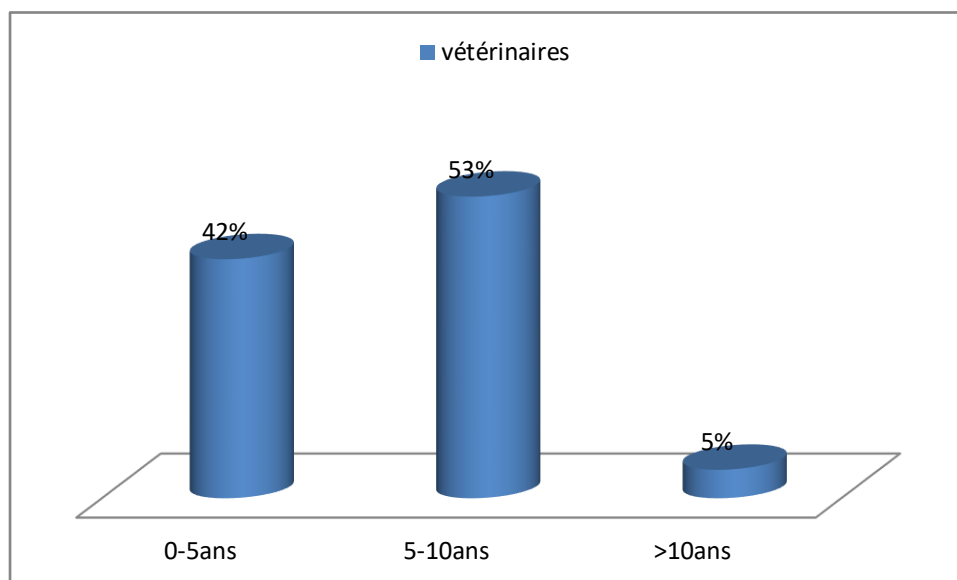


Figure 1-2 : Expérience professionnelle des vétérinaires.

L'enquête sur l'expérience professionnelle des vétérinaires montre qu'une majorité d'entre eux ont plus de 5 ans d'exercice dans la profession ce qui pourrait nous pousser à penser qu'ils ont une connaissance approfondie de la leishmaniose ; il en est de même des 5% possédant plus de 10 ans d'expérience.

2/Etude rétrospective sur la fréquence de la leishmaniose auprès des vétérinaires sondés selon les saisons

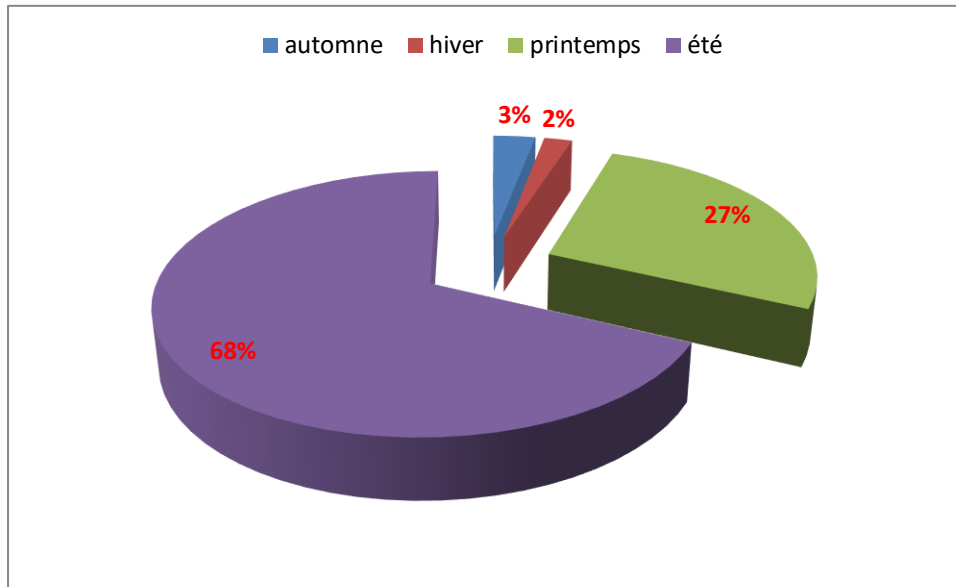


Figure 1.3 : Fréquence de la leishmaniose selon les saisons

L'été semble être la saison où la pathologie est la plus diagnostiquée avec 68% des cas. (Figure 1.3)

3/ Etude rétrospective sur le diagnostic de la leishmaniose

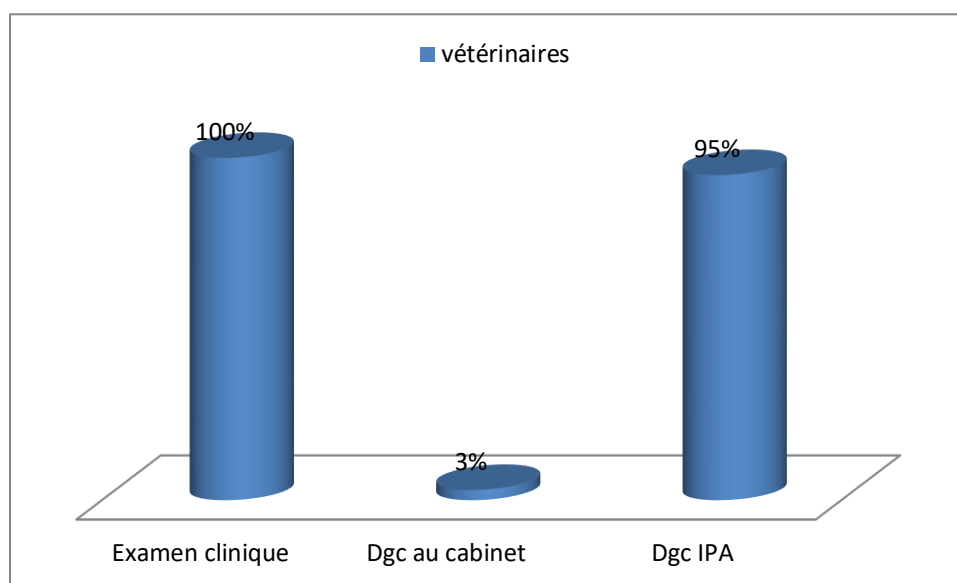


Figure 1.4 : Diagnostic de la pathologie.

L'examen clinique semble être la base du diagnostic de leishmaniose pour les vétérinaires interrogés, en effet 100% d'entre eux estiment que les signes cliniques sont les plus représentatifs de la pathologie ; 3% effectuent un examen d'orientation du type FLG au cabinet et 95% envoient systématiquement des prélèvements sanguins vers une structure spécialisée en l'occurrence l'IPA.(figure 1-4)

4/Etude rétrospective sur la décision thérapeutique des vétérinaires sondés lors de leishmaniose.

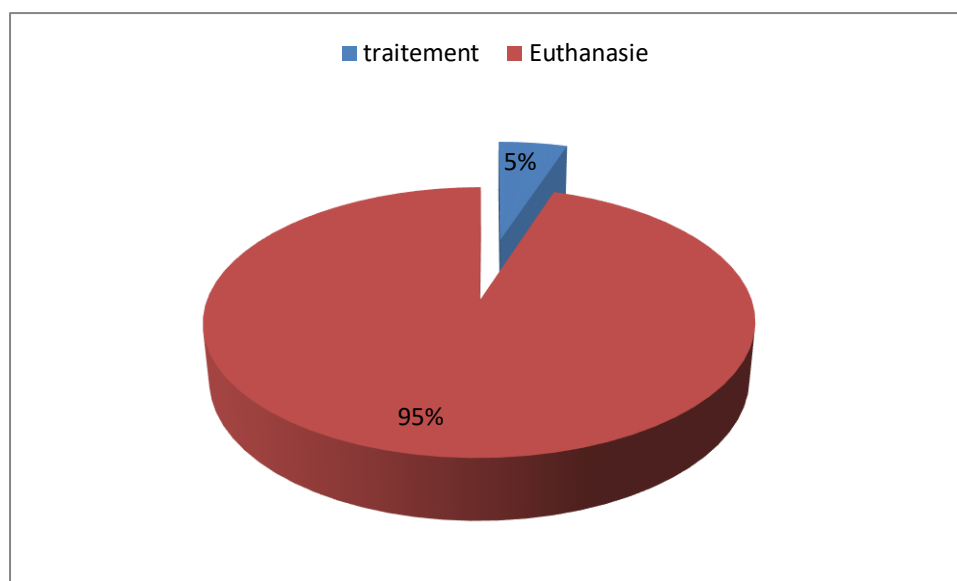


Figure 1.5 : Décision thérapeutique.

95% des vétérinaires devant un diagnostic de certitude de la leishmaniose ont recours à l'euthanasie de l'animal atteint en raison du risque de propagation de la maladie et de la contamination éventuelle du propriétaire lui-même ,3% d'entre eux instaurent un traitement suite à l'insistance du propriétaire. (figure 1.5)

1.5- Discussion de la pré-enquête

Notre enquête semble rejoindre le même objectif que celle menée par Martinetti Léa en 2013 avec des spécificités liées à la région visée, l'auteur citant d'autres intervenants sur la même problématique.

Questions posées aux vétérinaires

Le questionnaire a été élaboré en s'appuyant d'une part sur le questionnaire utilisé dans les travaux d'A. Meunier (2007) et D. Durpoix (2008) en partenariat avec le projet EDEN-Lei (Ruiz De Ybanez et al, 2009), sur le questionnaire de l'enquête menée auprès des praticiens vétérinaires en 2000 par E. Coulibaly et son équipe (2004).

Les questions sont essentiellement d'ordre qualitatif et demandent une réponse fermée donc courte parmi différents choix possibles ce qui facilite l'analyse. Cependant le vétérinaire a toujours la possibilité de rajouter une réponse qui ne figure pas dans la liste des réponses possibles ou de mentionner une information qu'il estime importante.

Les questions posées portent sur :

- Des informations générales : nom du cabinet, du praticien, qualité (titulaire, assistant remplaçant), coordonnées de la structure, type de clientèle.
- Des données épidémiologiques : taille de la clientèle canine (nombre de consultations par tranche), nombre de suspicions au cours des douze derniers mois, sur l'origine des chiens infectés (sédentaires ou de passage), évolution de la maladie.
- Le diagnostic de la maladie : outils utilisés pour établir le diagnostic, proposition d'une liste de signes cliniques dont il est demandé d'évaluer la fréquence relative et la pertinence dans la suspicion clinique, types de chiens atteints préférentiellement (races, activités, âge...), nombre de cas confirmés d'août 2012 à août 2013, nombre de nouveaux cas, recours ou non à l'examen complémentaire pour établir le

diagnostic et le cas échéant identification précise des méthodes utilisées, lieu(x) d'établissement du diagnostic.

- Le traitement de la maladie : nombre de chiens traités et proportion de chiens traités parmi les nouveaux cas au cours des douze derniers mois, recours au traitement, causes de non traitement, liste de traitements proposés associés à leur posologie, durée, fréquence et efficacité estimée, schéma thérapeutique précis de l'utilisation de l'allopurinol lorsqu'il est utilisé, adaptation ou non du protocole thérapeutique et sur quels critères.

- Le suivi et l'arrêt du traitement : réalisation ou non d'un suivi et à l'aide de quels paramètres, arrêt ou non du traitement à l'allopurinol.

- La prophylaxie de la leishmaniose : informations délivrées aux clients concernant la leishmaniose, les mesures de prévention recommandées (limitation de la population de vecteurs, exposition des chiens, traitements topiques, vaccination) et observance des propriétaires, sentiment des praticiens par rapport au nouveau vaccin Canileish® ainsi que sa fréquence relative et son cadre d'utilisation.

- Une dernière question ouverte sur l'attente des praticiens quant aux nouvelles avancées technologiques concernant la lutte contre la leishmaniose a été posée.

A. Meunier en 2007 ,fait remarquer que la situation géographique joue un rôle ,ainsi en altitude (plus de 1000 m) il y a absence de phlébotomes en raison de l'inadaptation de l'insecte à ce climat ce qui réduit le risque de maladie ,de plus il avance l'argument des zones urbaines à forte densité de population qui augmente le risque cité ce qui semble être le cas de la ville d'Alger .

De son côté, D. Durpois en 2008 qui a travaillé dans le cadre du projet EDEN sur la leishmaniose en Europe, a étudié la prévalence de la leishmaniose dans cette zone par le biais d'enquêtes menées auprès de vétérinaires, a fait ressortir des taux de réponses plus importants dans les zones endémiques ce qui semble être le cas en Algérie où il existe des zones indemnes de la pathologie.

Très récemment R.Velez et al « Seroprevalence of canine leishmania infantum infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North –Eastern and Pyrenean areas of Spain “(janvier 2019) lors d'une enquête

menée dans le nord de l'Espagne ,présentent les caractéristiques d'un foyer stable de leishmaniose où la séroprévalence de l'infection à *Leishmania infantum* est de 19.5%, 93.2% des chiens séro positifs sont asymptomatiques ,27.3% des propriétaires de chiens utilisent des mesures prophylactiques contre la maladie et enfin l'âge avancé des chiens semble être un facteur de risque .

. Enfin Coulibaly .E en 2004, affirme que des cas de leishmaniose par des zymodèmes tel que MON-26 jusque-là inconnu dans cette région est apparu au Mali, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle le réchauffement planétaire joue un rôle dans la dissémination de la maladie dans des zones jusqu'ici indemnes.

Ce qu'il y a lieu de retenir à nos yeux est la décision thérapeutique des praticiens qui consiste à euthanasier les chiens positifs, ceci est en contradiction avec les recommandations apportées par P. Marty « *Leishmania infantum* en 2014 » lors des journées sur la leishmaniose du RESFIZ PROCEEDINGS (15 Mars 2014) pour qui cette pratique ne sert pas à éradiquer la maladie en raison de l'existence de plus en plus de cas asymptomatiques qui passent inaperçus.

Deuxième partie : Test de diagnostic rapide Witness

En Algérie, le nombre de personnes atteintes de Leishmaniose recensées entre 2000 et 2013 était de 157.597 cas dont un pic avait été enregistré en 2005, où le nombre de cas avait atteint 30.000 à l'échelle nationale pour se fixer à 6.500 cas en 2013 "grâce aux vastes opérations d'arrosage de pesticides qui ont permis l'élimination des vecteurs qui transmettent cette maladie à l'homme", selon M. Herath. Liberté 13 Avril 2017.

Répartition géographique de la Leishmaniose canine en Algérie (LCN) à *L. infantum* :

- Tout le littoral et le Tell algérien, toute l'année
 - Principaux foyers: Tizi-Ouzou, Ténès, Bordj Menaiel, Bouira, Meftah, Larbaa et **Alger**
- Epelbouin. L. 2012 « prises en charge de la leishmaniose en Algérie »

Notre objectif vise à comparer différentes techniques qui permettraient d'améliorer le diagnostic de la leishmaniose. La combinaison de techniques sérologiques et parasitologiques peut augmenter le nombre de chiens diagnostiqués avec l'infection et étudier la faisabilité chez d'autres espèces potentiellement porteuses du parasite notamment le chat.

Pour ce faire, nous avons comparé deux populations exposées au même risque infectieux dont l'une est réputée comme réservoir de la pathologie en l'occurrence le chien et ce par l'utilisation du test Witness de diagnostic rapide avec un effectif de 50 chiens et 50 chats.

D'un point de vue épidémiologique, le rôle du chat dans la dissémination du parasite est inconnu [4]. Peut-on considérer le chat en Algérie (zone d'endémie de la leishmaniose), comme réservoir primaire ou accidentel (accessoire) de la pathologie ?

2.1-Etude sérologique par le test WITNESS Leishmania

2.1.1- Principe du test

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



Figure 2.1 : Kit Witness leishmania

2.1.2 -Protocole opératoire (voir annexe D)

- Placer une plaquette test sur une surface plane.
- Placer 10 µl de sérum dans le puits échantillon.
- Laisser bien pénétrer l'échantillon dans la membrane.
- Répartir 4 gouttes de la solution tampon (laisser s'imprégner entre chaque goutte).
- Observer au bout de 10 minutes (maximum) la présence ou non de bande de couleur rose dans les fenêtres

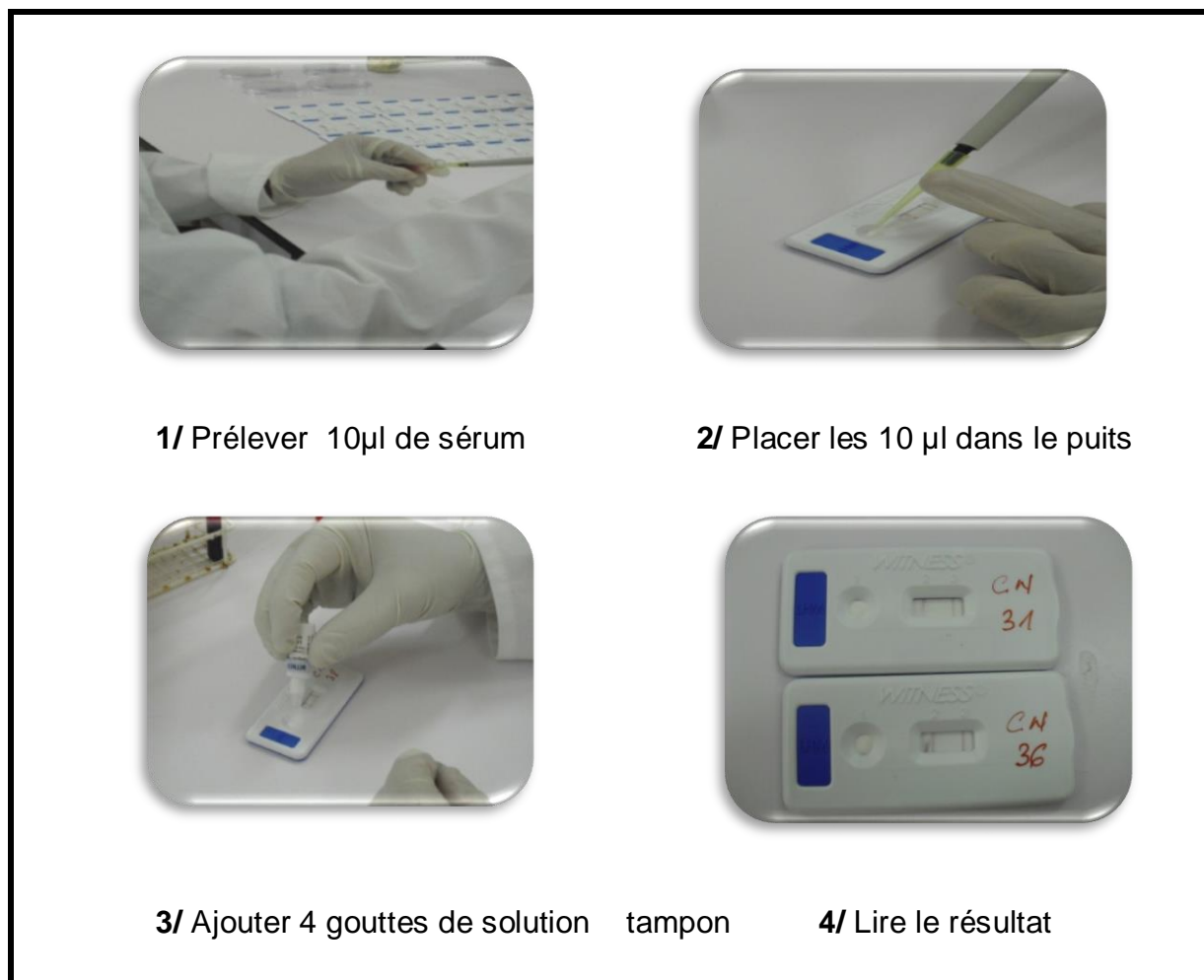


Figure 2.2 : Mode opératoire de la technique du test Witness

La figure 2.2 montre la facilité de manipulation et la lecture rapide d'un test de diagnostic Witness.

2.1.3-Résultats de l'examen clinique

Les chats et les chiens faisant l'objet de l'étude ont été choisis sur la base des signes cliniques apparents qu'ils présentaient, sur la condition qu'ils soient des animaux errants exposés au même risque infectieux sans tenir compte du sexe tout en préférant les sujets adultes aux sujets jeunes.

Ces animaux ont subi systématiquement un examen clinique basé sur l'observation de l'état général, la prise de température rectale et la fréquence cardiaque.

L'examen clinique rapproché et plus minutieux notamment chez les chiens a montré des lésions apparentes comme les dermatites, les ulcérations, l'Onychogribose, le furfur, le squamosis ou encore la kératite.

Certains animaux ont présenté des lésions encore plus flagrantes comme l'aspect de « vieux chien » qui ne correspondait pas avec l'âge supposé après examen de leur dentition

Tableau 2.1 : Signes cliniques des chiens positifs aux tests.

Chiens	Age	Sexe	Race	Signes cliniques
CN1	2 ans	Mâle	Commune	Furfur – Dépilation
CN3	5 ans	Mâle	Commune	Furfur–Dépilation
CN4	4 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN5	5 ans	Mâle	Commune	Onychogriffose-furfur- hyperkératose- aspect vieux chien-squamosis- adénopathie
CN6	3 ans	Femelle	Doberman	Onychogriffose-hyperkératose- épistaxis
CN10	2 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN12	4 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN15	5 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN18	3 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN22	4 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN27	3 ans	Mâle	Commune	Dépilation - furfur
CN28	4 ans	Mâle	Commune	Dépilation -furfur
CN31	6 ans	Mâle	Berger Allemand	Onychogriffose-furfur- hyperkératose- aspect vieux chien- squamosis- adénopathie
CN34	8 ans	Mâle	Commune	Dépilation
CN36	5 ans	Mâle	Commune	Sans signes cliniques
CN39	5 ans	Mâle	Commune	Dépilation - furfur
CN42	17 mois	Femelle	Berger Allemand	Onychogriffose-furfur-squamosis-dépilation
CN48	2 ans	Mâle	Rottweiler	furfur- hyperkératose- aspect vieuxchien- dépilation-kératite- adénopathie-squamosis
CN49	3 ans	Mâle	Commune	Onychogriffose-furfur- hyperkératose- aspect vieux chien- adénopathie-dépilation épistaxis
CN50	4 ans	Mâle	Commune	Onychogriffose-furfur- hyperkératose- aspect vieux chien- adénopathie-dépilation - squamosis

CN : Chien.

Tableau 2.2 : Classement des lésions des chiens positifs.

Chiens	Age	Sexe	Race	Lésions	Witne ss	IFI
CN1	2ans	Male	Commune	6-2	+	0*
CN3	5ans	Male	Commune	6-2	+	0*
CN4	4ans	Male	Commune	6	+	0*
CN5	5ans	Male	Commune	1-2-3-4-5- 8	+	0*
CN6	3ans	Femelle	Doberman	1-3-7	+	0*
CN10	2ans	Male	Commune	6	+	-
CN12	4ans	Male	Commune	6	+	++
CN15	5ans	Male	Commune	6	+	-
CN18	3ans	Male	Commune	6	+	-
CN22	4ans	Male	Commune	6	+	-
CN27	3ans	Male	Commune	6-2	+	-
CN28	4ans	Male	Commune	6-2	+	+
CN31	6ans	Male	BA	1-2-3-4-5- 6-8	+	+
CN34	8ans	Male	Commune	6	+	-
CN36	5ans	Male	Commune	0	+	++
CN39	5ans	Male	Commune	6-2	+	-
CN42	17mois	Femelle	BA	1-2-5-6	+	0*
CN48	2ans	Male	Rottweiler	2-3-4-5-6- 8-9	+	0*
CN49	3ans	Male	Commune	1-3-4-2-6- 7-8	+	0*
CN50	4ans	Male	Commune	1-2-3-4-5- 6-8	+	0*

Codification des lésions : 0 : sans lésion 1 : Onychogribose 2: Furfur amiantacé
3: hyperkératose 4 : Aspect de « vieux chien » 5: Squamosis 6 : Dépilation 7 :
Epistaxis 8 : Adénopathie 9 : Kératite

0* : test IFI non réalisé

Dans le but de faciliter le travail statistique nous avons eu recours à cette codification des lésions retrouvées chez les chiens positifs aux tests effectués.

Nous remarquons que la race commune représente le plus grand nombre de sujets, toutefois des races pures sont également représentées telles que le Berger Allemand, le Rottweiler et le Doberman.

D'après le tableau 2-2, la lésion **6** (dépilation) est la plus retrouvée, un chien s'est avéré positif mais ne présentait aucune lésion, ce dernier a été sélectionné dans le protocole sur le critère de l'âge relativement avancé. A noter que sur les 50 prélèvements, 36 ont pu être traités les 14 restants dont l'identification a été altérée lors de la décongélation.

Sur les 20 chiens positifs au Witness, 10 ont été testés par la méthode IFI, parmi cet effectif 4 chiens ont été positifs à des taux variant de 1/20 à 1/160.

A la lecture de ces données, nous ne pouvons pas avancer une corrélation entre les tests Witness et IFI du fait que le seuil de sensibilité du Witness est plus élevé (96,4%).



Figure 2.3 : Lésions observées chez les chiens (photos personnelles)

Tous les signes cliniques observés sur les photos (Figure 2.3) sont typiques de la leishmaniose (aspect de vieux chien photo **a**, ulcération notamment au niveau des saillies osseuses photo **b**, kératite qui est de l'opacification de la cornée photo **c**, onychogribose en l'occurrence un allongement des griffes photo **d**, squamosise et furfur) sont retrouvés dans la bibliographie.

Les signes cliniques chez les chats ont révélé essentiellement des lésions d'ulcérations et des nodules exclusivement au niveau de la tête avec 5 cas parmi les 18 cas positifs chez qui nous avons remarqué en plus de l'amaigrissement voire de la cachexie et des adénopathies poplités. (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Signes cliniques des chats positifs au test Witness

Chats	Age	Sexe	Race	Signes cliniques
CT20	3 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT21	2 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT22	2 ans	Mâle	Commune	Ulcération-cachexie- adénopathie
CT23	3 ans	Femelle	Commune	Ulcération
CT25	4 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT26	3 ans	Femelle	Commune	Ulcération -cachexie- adénopathie
CT27	3 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT29	4 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT30	5 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT31	3 ans	Mâle	Commune	Ulcération -cachexie- adénopathie
CT32	3 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT33	2 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT34	4 ans	Femelle	Commune	Ulcération -cachexie- adénopathie
CT36	2 ans	Femelle	Commune	Ulcération
CT39	2 ans	Mâle	Commune	Ulcération
CT46	1 an	Femelle	Commune	Ulcération
CT48	10 ans	Mâle	Commune	Ulcération – chancre d'inoculation-cachexie- adénopathie
CT49	4 ans	Mâle	Commune	Ulcération – chancre d'inoculation

Tableau 2.4 : Classement des lésions des chats positifs

Chats	Age	Sexe	Race	Lésions	Witness
CT20	3ans	Male	Commune	1	+
CT21	2ans	Male	Commune	1	+
CT22	2ans	Male	Commune	1-3-4	+
CT23	3ans	Femelle	Commune	1	+
CT25	4ans	Male	Commune	1	+
CT26	3ans	Femelle	Commune	1-3-4	+
CT27	3ans	Male	Commune	1	+
CT29	4ans	Male	Commune	1	+
CT30	5ans	Male	Commune	1	+
CT31	3ans	Male	Commune	1-3-4	+
CT32	3ans	Male	Commune	1	+
CT33	2ans	Male	Commune	1-3-4	+
CT34	4ans	Femelle	Commune	1	+
CT36	2ans	Femelle	Commune	1	+
CT39	2ans	Male	Commune	1	+
CT46	1ans	Femelle	Commune	1	+
CT48	10ans	Male	Commune	2-1-3-4	+
CT49	4ans	Male	Commune	2-1	+

Codification des lésions : 1: *Ulcération* 2 : *Chancre d'inoculation* 3 : *cachexie*

4 : *Adénopathie*

Comme pour les chiens une codification des lésions observées s'est avérée nécessaire pour le traitement statistique des données. (tableau 2.4)

L'on peut remarquer la lésion1 (ulcérations) est la plus rencontrée chez les chats positifs au test, viennent ensuite les lésions 3(cachexie) ,4(adénopathie) et enfin la lésion 2(chancre d'inoculation) .La race commune est exclusive à ce lot étudié.

Tableau 2.5 : Pourcentage des lésions par rapport à l'effectif des chats prélevés

Lésions	1	2	3	4
Pourcentage	36%	4%	10%	10%

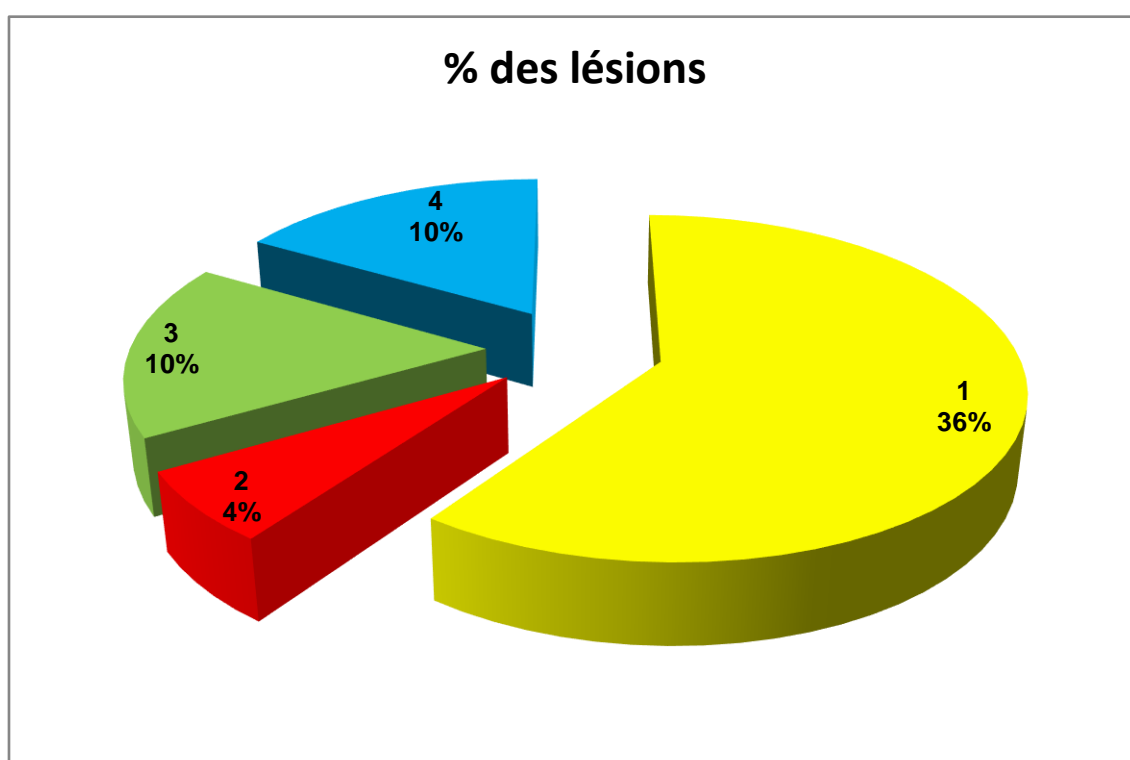


Figure 2.4 : Distribution des lésions chez les chats.

La lésion 1 (ulcérations) (figure 2.4) avec un pourcentage de 36 % apparaît comme la plus retrouvée chez les chats positifs au test Witness tandis que la lésion 2 (chancre d'inoculation) est la moins représentée avec un pourcentage de 2%, les lésions 3 et 4 (cachexie et adénopathie) se rencontrent chez 10% des chats positifs.



Photo 1 et 2 : Ulcérations



Photo 3 : Ulcérations



Photo 4 : Chancre d'inoculation

Figure 2.5 : Lésions observées chez les chats (photos personnelles)

Les lésions retrouvées chez les chats (figure 2.5) intéressent surtout la face et la tête et sont représentées essentiellement par des lésions cutanées.

2.2.4- Analyses des prélèvements

Sous forme de tableaux accompagnés de graphes, sont illustrés les différents résultats obtenus suite à l'analyse des sérums de chiens et de chats suspects cliniquement de leishmaniose :

Tableau 2.6 : Effectifs des chiens prélevés selon âge et sexe (Chiens)

Age	[1-2ans]] 2-3ans]] 3-4ans]] 4-5ans]	>5ans
Mâles	8	13	9	5	5
Femelles	6	3	1	0	0
TOTAL	50				

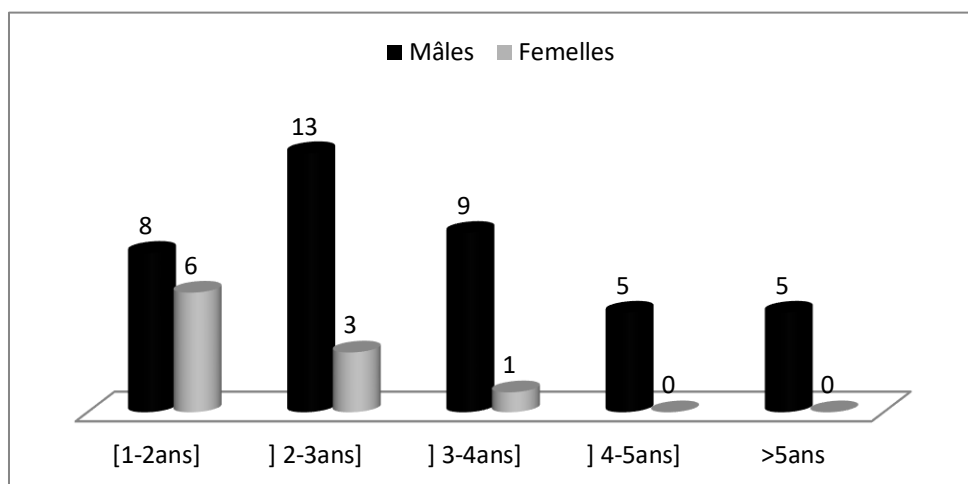


Figure 2.6: Représentation des effectifs des chiens prélevés selon l'âge et le sexe

On remarque que sur l'effectif prélevé, les mâles sont les plus nombreux (40 sujets) par rapport aux femelles (10 sujets) Rappelons que l'échantillon était basé sur un tirage au sort ce qui explique cette disparité. Chez les mâles, la tranche d'âge comprise entre 2 à 3 ans est la plus importante, alors que chez les femelles elle concerne surtout les animaux de 1 à 2 ans.

Tableau 2.7 : Effectifs des chats prélevés selon âge et sexe (Chats)

Age	1 -2ans	2 -3ans	3-10ans
Mâles	11	9	6
Femelles	16	4	4
TOTAL	50		

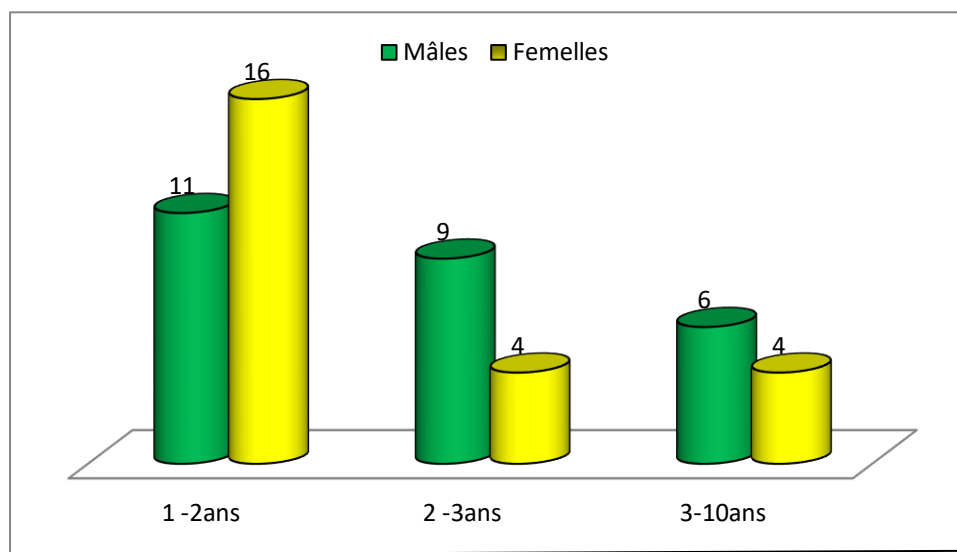


Figure 2.7 : Représentation des effectifs des chats prélevés en fonction de l'âge et du sexe

Les effectifs sont très proches (figure 2.7) : 26 mâles et 24 femelles. La tranche d'âge comprise entre 1 à 2 ans est la plus représentée avec 11 femelles et 16 mâles.

Tableau 2.8: Test Witness (Chats)

	Witness+	%	Witness-	Effectifs
Mâle	13	50%	13	26
Femelle	5	20,83%	19	24
EFFECTIFS	18	36%	32	50

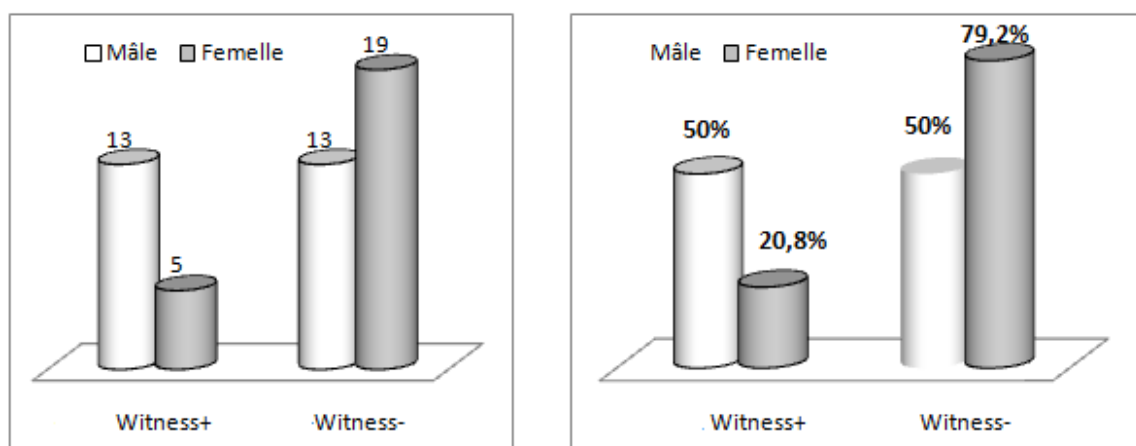


Figure 2.8 : Cas positifs selon le sexe : nombre et fréquence.

Le test Witness leishmania (figure 2.8) fait ressortir 13 mâles positifs, soit 50% de l'effectif (26), et 5 femelles soit 20,8% de l'effectif (24).

Tableau 2.9 : Test Witness selon le sexe (Chiens)

	Witness+	%	Witness-	Effectifs
Mâle	18	41,86%	25	43
Femelle	2	20,83%	5	7
EFFECTIFS	20	40%	30	50

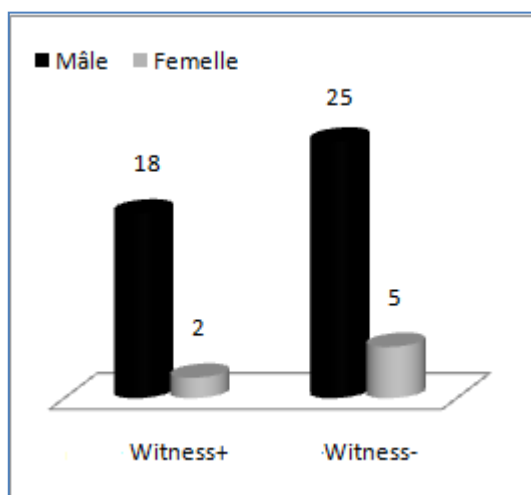


Figure 2.9 : Nombre des cas positifs selon le sexe

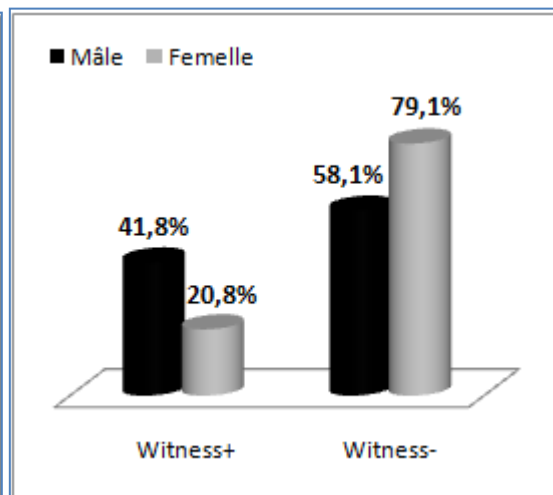


Figure 2.10 : Pourcentage des cas positifs selon le sexe

Le test Witness leishmania (figure 2.9) fait ressortir 18 mâles positifs soit 41,8 % de l'effectif (43), et 2 femelles soit 20,83% de l'effectif (7).

Tableau 2.10: Cas positifs selon le sexe et l'âge (Chats)

Age	1-2ans	%	2-3ans	%	3-10ans	%
Males	4	22,22%	4	22,22%	5	27,77%
Femelles	2	11,11%	2	11,11%	1	5,55%
TOTAL			18			

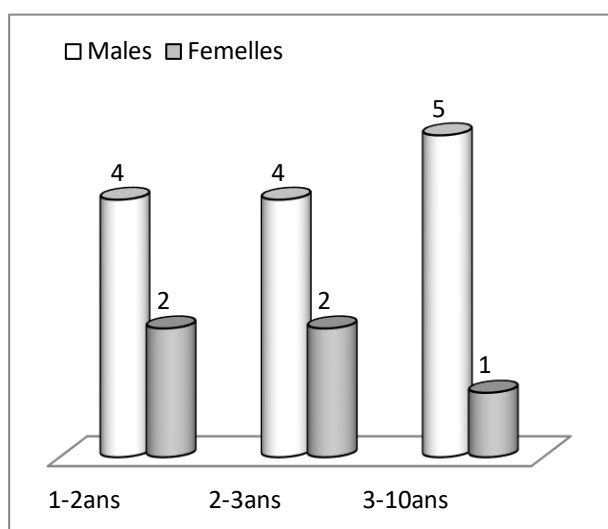


Figure 2.11 : Nombre des cas positifs selon le sexe et l'âge

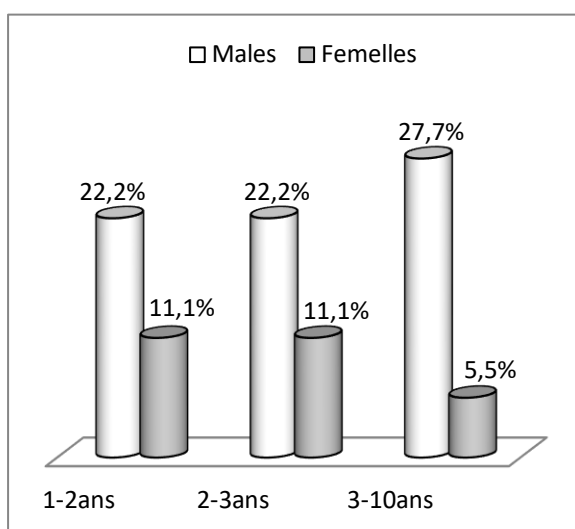


Figure 2.12 : Pourcentage des cas positifs selon le sexe et l'âge

La tranche d'âge la plus touchée pour les mâles est comprise entre 3 à 10 ans (27,7%) sur un total de 13 mâles (figure 2.11). Pour les femelles, les sujets de 1 jusqu'à 3 ans sont les plus atteints avec un taux de 11,1 %. Cela semble diminuer avec l'âge (tranche de 3 – 10 ans ne représentant plus que 5,55 %).

Tableau 2.11 : Cas positifs selon le sexe et l'âge (Chiens)

Age	1-2ans	%	2-3ans	%	3-4ans	%	≥5ans	%
Males	3	15%	3	15%	5	25%	7	35%
Femelles	1	5%	1	5%	0	0%	0	0%
TOTAL				20				

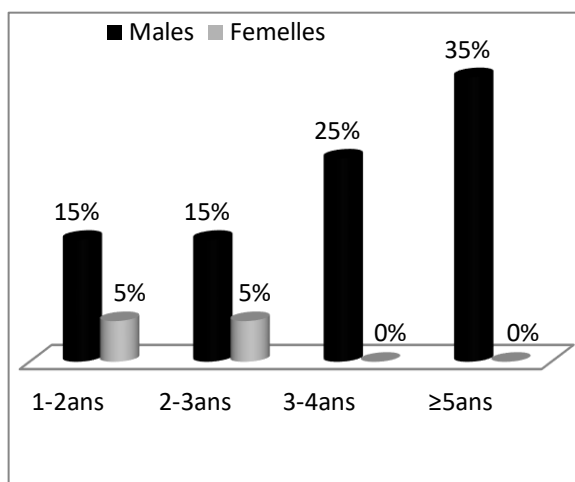
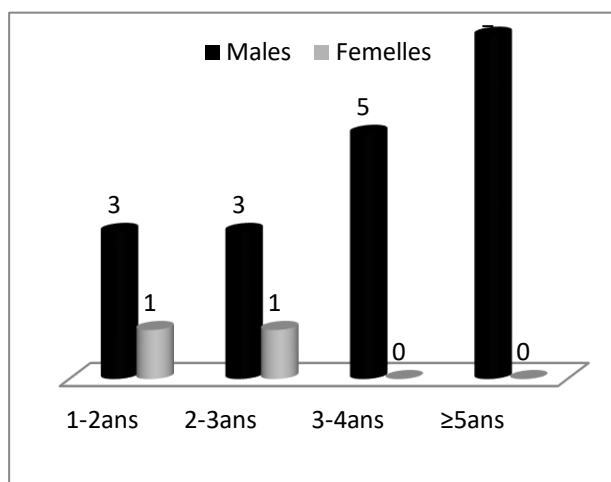


Figure 2.13 : Nombre des cas positifs selon Age et sexe

Figure 2.14 : Pourcentage des cas positifs selon âge et sexe

Contrairement aux chats, il semble que la pathologie évolue avec l'âge notamment pour les mâles (figure 2.13). En effet la tranche d'âge supérieure à 5 ans représente le plus fort taux (35 % pour un effectif de 18 mâles).

Tableau 2.12 : Répartition des lésions selon les cas positifs (Chiens)

Lésions \ Sexe	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mâles	3	10	5	5	4	16	1	5	1
Femelles	2	1	1	0	1	1	1	0	0

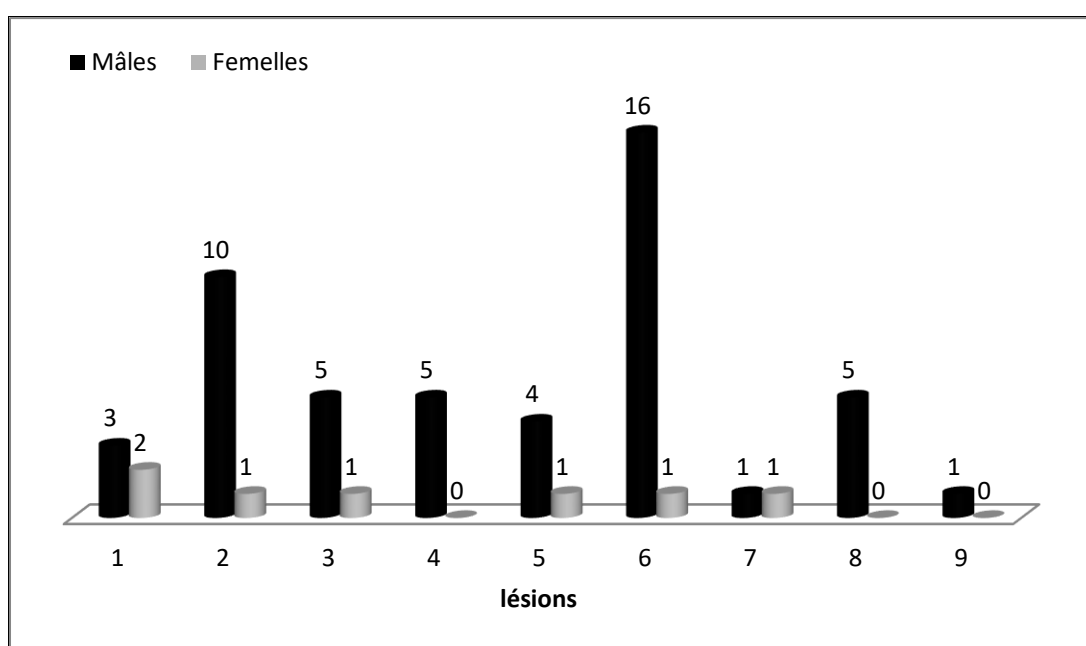


Figure 2.15 : Répartition des lésions en fonction du sexe (Chiens)

Les chiens « positifs » au test Witness leishmania (figure 2.15) (Au nombre de 20) ont tous présenté des lésions. Il apparaît que la lésion 6 (Dépilation) représente le plus fort taux notamment chez les mâles.

Tableau 2.13 : Répartition des lésions selon les cas positifs (Chats)

Lésions \ sexe	1 ulcération	2 chancre
Mâles	11	2
Femelles	5	0

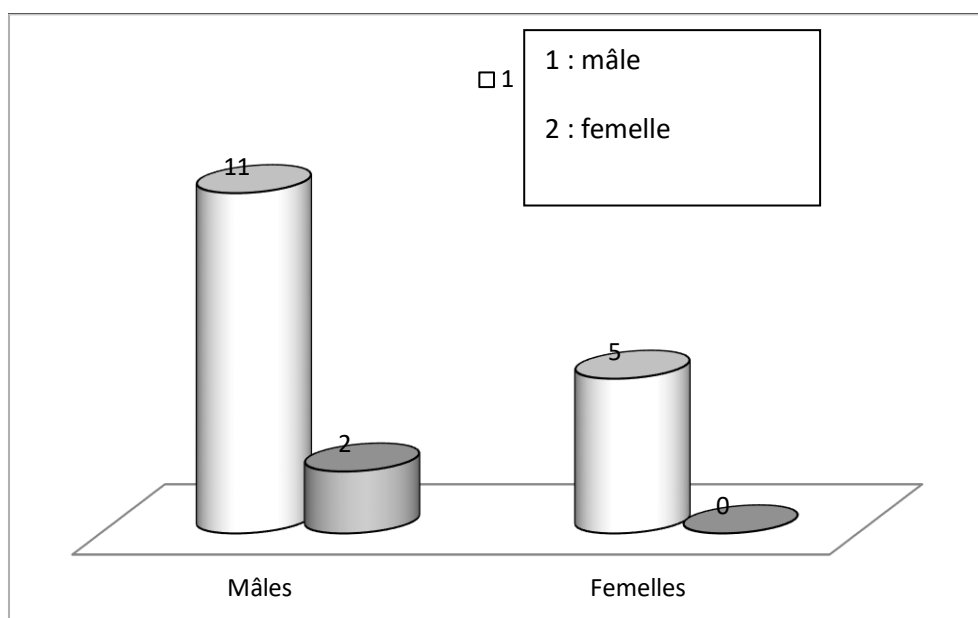


Figure 2.16 : Répartition des lésions en fonction du sexe (chats)

La lésion 1(Ulcération) (figure 2.16) prédomine chez ces sujets positifs au test.

Tableau 2.14 : Distribution des lésions selon la race (Chiens)

Lésions \ Race	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Commune	3	8	3	3	2	14	1	3	0
BA	2	2	1	1	2	2	0	1	0
Doberman	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Rottweiler	0	1	1	1	1	1	0	1	1

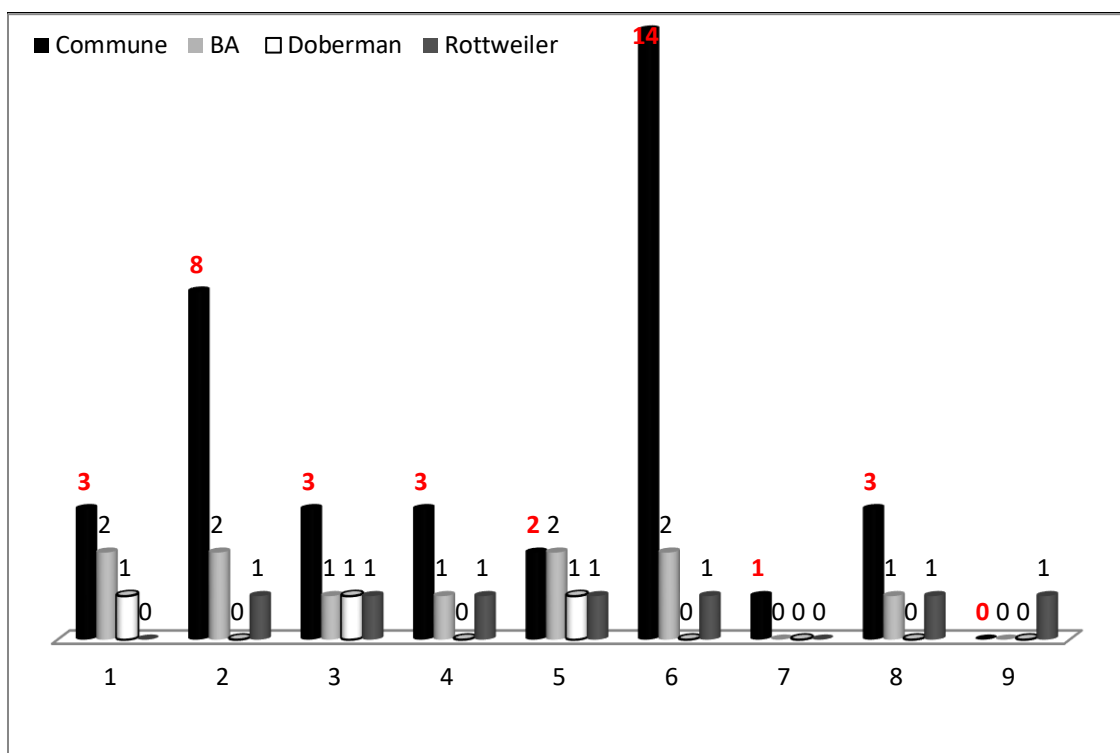


Figure 2.17 : Répartition des lésions en fonction de la race (Chiens)

La race commune est la plus touchée (figure 2.17) : ceci étant expliqué par un effectif plus important.

Discussion

Le dépistage par sérologie présente le gros avantage d'utiliser un prélèvement facile à réaliser pour les vétérinaires praticiens. Le choix de cette méthode reste discutable : une séropositivité à un instant t n'est que le témoin d'un contact plus ou moins récent entre l'animal et le parasite. Cette technique ne permet pas de présager de la présence et de l'état infectieux des leishmanies chez le chat. [4]. Tous les chats ayant fait l'objet de l'étude sont des animaux errants donc vivants à l'extérieur, la séropositivité chez ces sujets est supérieure à celle de chats vivant à l'intérieur Ozon et al 1999.

La prévalence calculée chez cette espèce révèle un taux de 36 % ce qui se rapproche des travaux de Venet 2007 qui a signalé une prévalence de 38,46 % sur un échantillon de 26 chats. Les disparités entre les prévalences retrouvées chez le chat sont nombreuses selon les années, les méthodes de diagnostic sérologique utilisées et enfin le statut immunitaire des animaux testés (chats atteints de FeLV et de FIV) ; ainsi des auteurs tels que Michael et al 1982 signale une prévalence de 3,75% sur un effectif de 80 chats en Egypte, Ozon et al en 1999 retrouvent un taux de 12,4% sur 97 chats et Pennisi et al en 2000 une prévalence de 68 % sur un effectif de 97 chats .Il faut souligner que les méthodes de diagnostic sérologique ont évolué avec les années et avec l'avènement de la biologie moléculaire, les résultats sont devenus plus pointus avec des méthodes telle que la PCR (Polymérase Chain Reaction) .Il est à noter que l'échantillon testé lors de notre enquête composé de 50 sujets pour chaque espèce ne pouvait être représentatif pour un travail de ce genre mais le but initial était d'étudier 2 espèces soumises au même risque infectieux par l'utilisation d'un test de diagnostic rapide, nous ne disposions à cet effet que d'un coffret de 100 plaques qui a eu pour conséquence de limiter l'échantillon.

Les résultats ont fait ressortir qu'il existe une corrélation entre le test Witness et le sexe ($P \leq 0.05$) pour les deux espèces (chiens et chats).

Les P calculés ont à chaque fois été non significatifs et supérieurs à 0,05, sauf pour la relation établie entre les tests et l'âge, ainsi on peut observer chez les chats concernant la tranche d'âge que ceux âgés de 1-3 ans femelles semblent les plus touchés par la pathologie ; les mâles de 3 à 10 ans sont aussi plus touchés ceci

étant expliqué par le fait qu'ils représentent un pourcentage plus important dans l'effectif prélevé et dans l'effectif des chats positifs ce qui ne corrobore pas les résultats de **Pennisi 2002** pour qui les femelles sont plus atteintes que les mâles .Pour ce qui concerne les lésions ,les ulcérations représentent un taux plus élevé car ce type de lésion est le plus souvent rencontré par rapport au chancre d'inoculation .

L'étude statistique a permis aussi pour l'espèce canine d'établir un **P** hautement significatif (≤ 0.001) entre les sujets présentant des lésions et le test positif Witness auquel ils ont été soumis, les autres paramètres étudiés tels que la race ou encore l'âge n'ont pas permis d'établir de relation entre la positivité de ces animaux et ces paramètres.En s'intéressant aux lésions cutanées relevées sur les chats testés positifs ,nous remarquons que sur un total de 18 sujets positifs ,tous présentaient des lésions avec une prédominance de lésion de type ulcération (16 chats) notamment au niveau de la tête (chanfrein ,oreille),dans cet effectif les mâles(11) sont à peu près deux fois plus nombreux que les femelles (5) ,les sujets avec 2 lésions sont au nombre de 2 (tous deux des mâles),Pennisi 1999 fait remarquer le même type de lésions successivement sur une femelle de 14 ans avec ulcération au niveau de la lèvre supérieure et un mâle adulte présentant un chancre d'inoculation au niveau du canthus externe de l'oreille gauche ;après examen cytologique des lésions et des nœuds lymphatiques des deux chats ,l'auteur a pu mettre en évidence des formes amastigotes de leishmania et des titres positifs à l'IFI à *L.infantum* .Deux autres chats ont fait l'objet d'une étude par le même auteur en Pennisi 2001 ;un mâle de 6ans bagarreur ,présentant une chorioretinite et une femelle de 10 ans avec sang et fibrine au niveau de la chambre antérieure des 2 yeux ,les 2 sujets ont été positifs à la toxoplasmose et à la FIV ainsi qu'à la leishmaniose .toujours Pennisi en 2009 ,18 cas ont présenté des lésions cutanées sous forme de d'alopécie de dermatite ulcérate et de nodules.

En étudiant les facteurs âge et sexe par rapport à la positivité au test Witness des sujets étudiés, il en ressort que toutes tranches confondues (1-2ans ,2-3ans ,3-10ans, mâles et femelles) les mâles paraissent à chaque fois plus sensibles à la pathologie que les femelles.

Ces résultats ne corroborent pas ceux rapportés par Pennisi 2002 qui sur une étude menée sur une population de 89 chats a trouvé un taux de 61% grâce à la méthode

PCR avec respectivement 73 % de femelles et 54 % de mâles. L'âge par contre semble influencer sur l'apparition de la maladie, en effet à la lecture des résultats la tranche d'âge de 3ans jusqu'à 10 ans apparaissent comme les plus touchés avec 27,77% des mâles positifs ceci est similaire aux travaux de Venet 2007 qui conclut à une plus longue exposition. Le facteur race n'a pas été étudié car l'échantillon choisi ne représentait qu'une seule race en l'occurrence la race commune ,Pennisi 2002 fait remarquer que sur 89 chats faisant l'objet de son étude 61 % étaient de race commune et 39 % de race connu ,toutefois ce facteur n'a eu aucune influence sur son travail .

Des études récentes menées par Marty et al [116] sur l'utilisation de tests rapides de diagnostic de la leishmaniose (IT-Leish et ID-PaGIA) a démontré que la sensibilité de ces tests est de 97% alors que celle de l'IFI est de 91%.pour nôtre part nous avons utilisé le Witness leishmania dont la sensibilité est de 100% [114].la spécificité des tests étudiés par Marty et al est de respectivement 98% et 94% tandis que celle du Witness est de 96,4%[114].

Par la suite nous avons calculé la valeur prédictive positive (VPP) selon la formule suivante :

$$VPP = \frac{VP}{VP+FP}$$

VPP= valeur prédictive positive

VP= vrais positifs FP= faux positifs

$$VPP = 15/15+3 = 83,33\%$$

Les VP (vrais positifs) sont les plaques sur lesquelles les deux traits étaient apparents tandis que les FP (faux positifs) sont les plaques sur lesquelles le deuxième trait était moins perceptible et qui étaient au nombre de trois (3).

La valeur calculée est à rapprocher de celle retrouvée par Marty et al [116] qui ont trouvé une valeur de 89% pour le test IT-Leishmania mais elle est supérieure à celle du test d'ID-PaGIA qui est de 75 %.

Pour le calcul de la valeur prédictive négative VPN nous avons utilisé la même formule que pour la VPP :

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}}$$

VPN= valeur prédictive négative

VN= vrais négatifs

FN= faux négatifs

$$\text{VPN} = 32/32+2 = 94,11\%$$

Les faux négatifs sont les sujets dont les signes cliniques sont évocateurs de la leishmaniose mais dont le test s'est avéré négatif.

Ces résultats sont identiques à ceux de Marty et al [116] qui retrouvent une VPN de 94% et permettent donc d'exclure d'emblée et rapidement une étiologie leishmanienne devant une lésion cutanée assez évocatrice.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que le test Witness leishmania reste un test qualitatif, facile d'utilisation, rapide et que ses résultats doivent à chaque fois être confirmés par la méthode de référence qui est l'IFI.

Troisième partie : Tests ELISA et RT-PCR

Dans cette partie, nous avons récolté 220 sérums de chats que nous avons testé grâce aux tests ELISA et q PCR.

3.1 : Résultats et discussion :

3.1.1 : Lésions observées : On peut remarquer des lésions oculaires sous forme de blépharite voire de kératite en-dehors des lésions cutanées habituellement rencontrées (figure 3.1).



Figure 3.1 : chats testés (photos personnelles)

3.2.2-Résultats de la technique ELISA

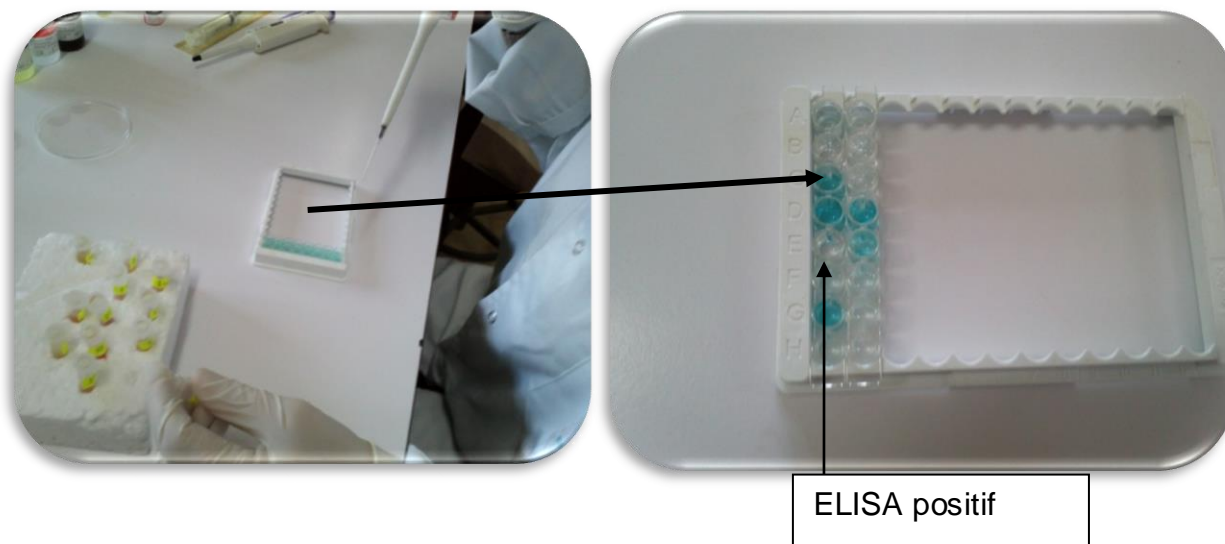


Figure 3.2: Résultat du test ELISA (photos personnelles)

On remarque (figure 3.2) le virage de coloration typique d'une réaction positive du test ELISA faisant réagir Ac et Ag.

3.2.3- Résultats des échantillons par la technique ELISA

Un total de 220 sérums testés par la méthode ELISA, 26 sujets se sont avérés positifs

Tableau 3.1 : Effectif global des chats testés

Effectif	Cas positifs	Cas négatifs	Cas douteux
220	26	37	157

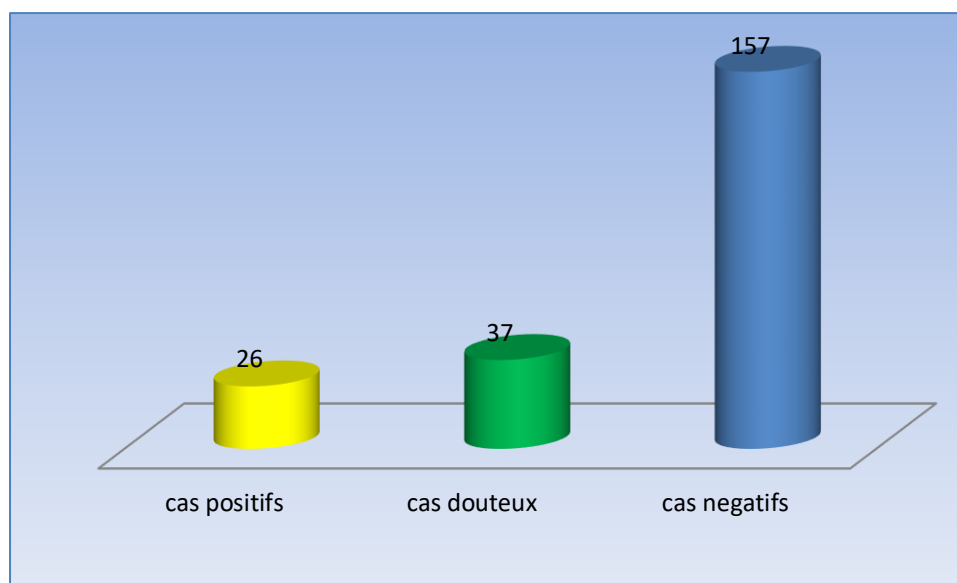


Figure 3.3: Effectifs chats testés

La figure 3.3 montre 26 échantillons positifs tandis que 37 étaient douteux en raison d'un virage de coloration pas très net.

Tableau 3.2 : ELISA en fonction de l'âge

AGE	ELISA +	ELISA -
1 à 3 ans	17	100
4 à 6 ans	7	61
> 6 ans	2	18

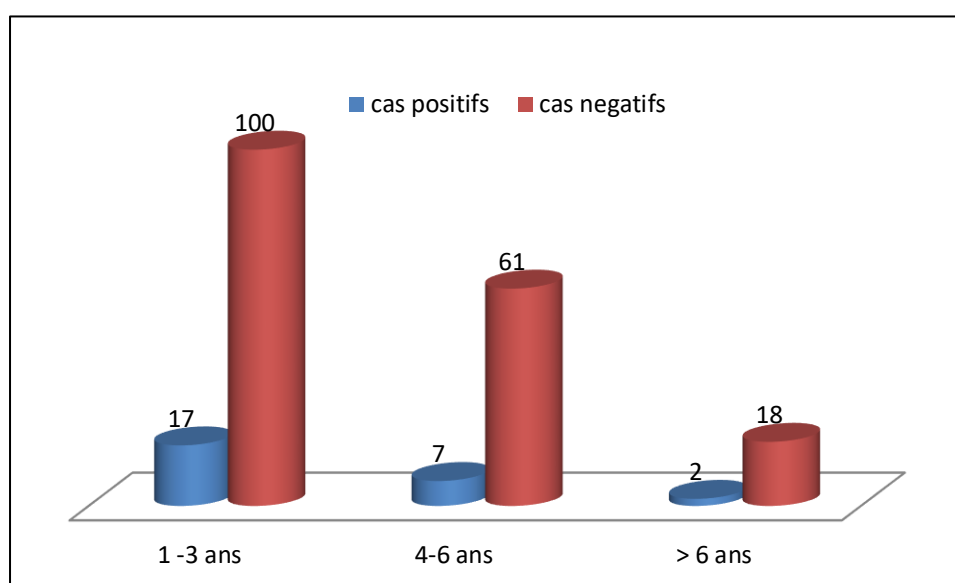


Figure 3.4 : Répartition des cas positifs et négatifs en fonction de l'âge.

La figure 3.4 fait ressortir que la tranche d'âge qui semble la plus touchée se situe entre 1 et 3 ans avec un total de 17 chats tous sexes confondus positifs au test ELISA.

3.3-Analyse statistique

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi² avec correction de continuité de Yates) :Khi² (Valeur observée) 0,023 avec un Khi² (Valeur critique) 3.841(DDL : 1 ; p-value : 0.880, alpha 0.05)

Interprétation du test :

- H_0 : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes.
- H_a : il existe un lien entre les et les colonnes du tableau.

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil $\alpha = 0.05$, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H_0

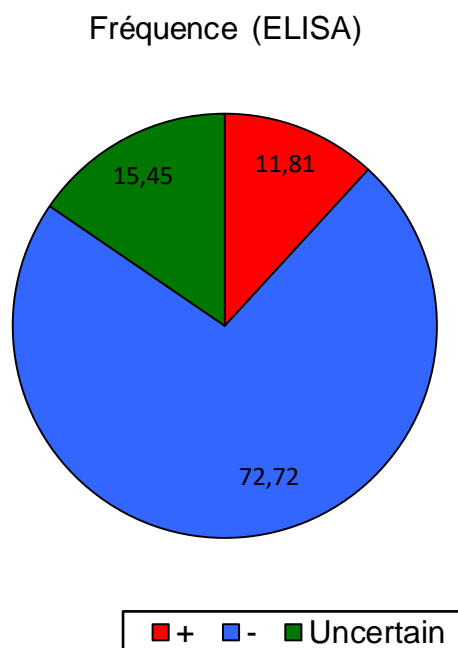


Figure 3.5 : Fréquence ELISA selon le sexe

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (χ^2 avec correction de continuité de Yates) : χ^2 (Valeur observée) 0,023 avec un χ^2 (Valeur critique) 3.841 (DDL : 1 ; p-value 0.880 ; α : 0.05).

Interprétation du test :

H_0 : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes

H_a : il existe un lien entre les et les colonnes du tableau

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil $\alpha = 0.05$, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H_0

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H_0 alors qu'elle est vraie est de **87,96%**.

Tableau 3.3 : Fréquence selon le sexe

Sexe	ELISA +	ELISA -
male	7	42
Femelle	19	118

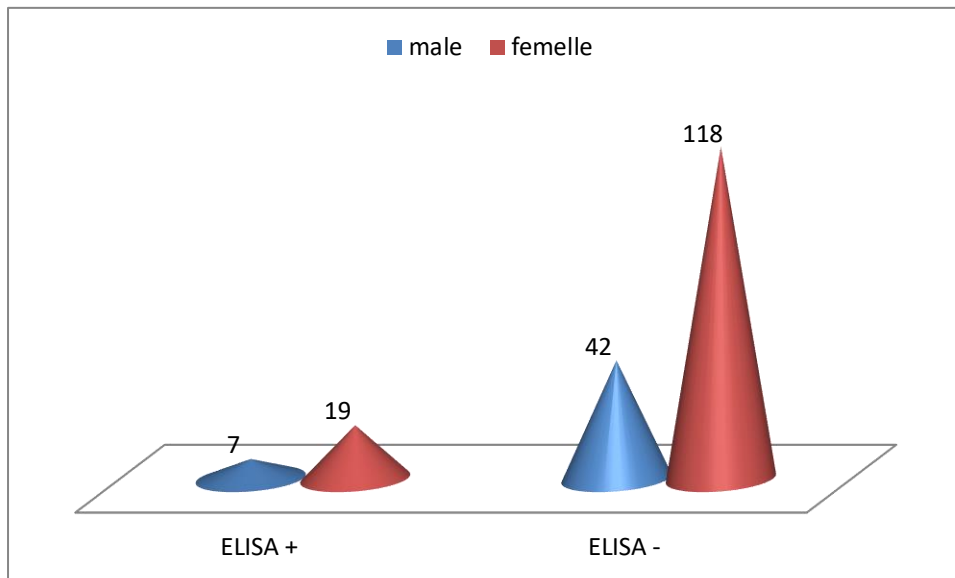


Figure 3.6: Fréquence selon le sexe

Sur la figure 3.6, on peut remarquer que les femelles sont plus sensibles que les mâles comme rapporté par Bettini S et al et Barnes.J.C(55-49).

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi² avec correction de continuité de Yates) : Khi² (Valeur observée) 0,028 avec Khi² (Valeur critique) 3.841 DDL : 1 ; p-value : 0.867 ; alpha : 0.05

Interprétation du test :

- H₀ : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes
- H_a : il existe un lien entre les lignes et les colonnes du tableau

Étant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha = 0.05, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle H₀

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H₀ alors qu'elle est vraie est de **86,68%**.

Tableau 3.4 : Fréquence en fonction des tranches d'âge de 1 à 3 ans

Age	ELISA	Mâle	Femelle
1 à 3 ans	+	13	4
	-	77	23

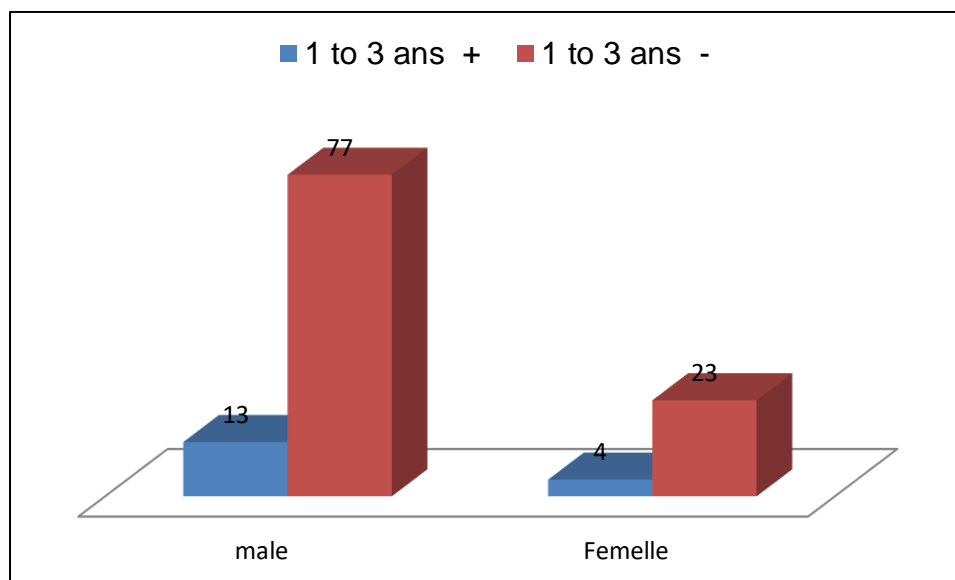


Figure 3.7 : Fréquence en fonction de l'âge (1 à 3 ans)

On remarque que dans la tranche d'âge 1 à 3 ans, les males sont les plus touchés (figure 3.7)

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi² avec correction de continuité de Yates) :Khi² (Valeur observée) 0,069 avec Khi² (Valeur critique) 3.841 (DDL :1 ; p-value :0.792 ; alpha :0.05)

Interprétation du test :

HO : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes

Ha : il existe un lien entre les et les colonnes du tableau

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha = 0.05, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle HO

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de **79.22%**.

Tableau 3.5 : Fréquence en fonction de l'âge (4 à 6 ans)

Age	ELISA	Mâle	Femelle
4 à 6 ans	+	5	2
	-	32	11

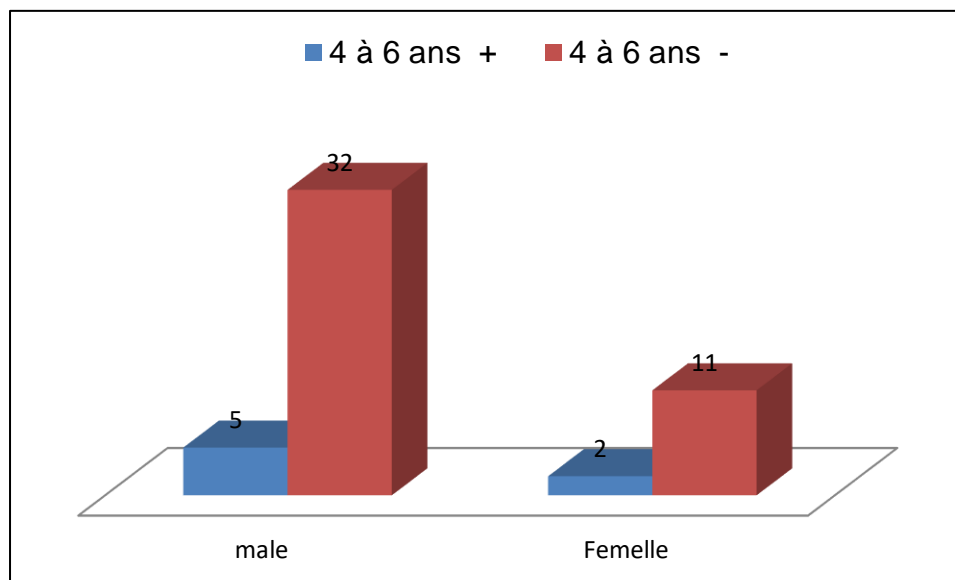


Figure 3.8 : Fréquence en fonction de l'âge (4 à 6 ans)

On remarque que dans la tranche d'âge 4 à 6 ans, les males sont encore une fois les plus touchés (figure 3.8)

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi² avec correction de continuité de Yates) :Khi² (Valeur observée) 0,088 avec Khi² (Valeur critique) 3.841 (DDL : 1 ; p-value : 0.766 ; alpha :0.05)

Interprétation du test :

- HO : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes
- Ha : il existe un lien entre les et les colonnes du tableau

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha = 0.05, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle HO

Le risque de rejeter l'hypothèse nulle HO alors qu'elle est vraie est de **76.62%**.

Tableau 3.6 : Fréquence en fonction de l'âge (> 6 ans)

Age	ELISA	Mâle	Femelle
> 6 ans	+	1	1
	-	9	8

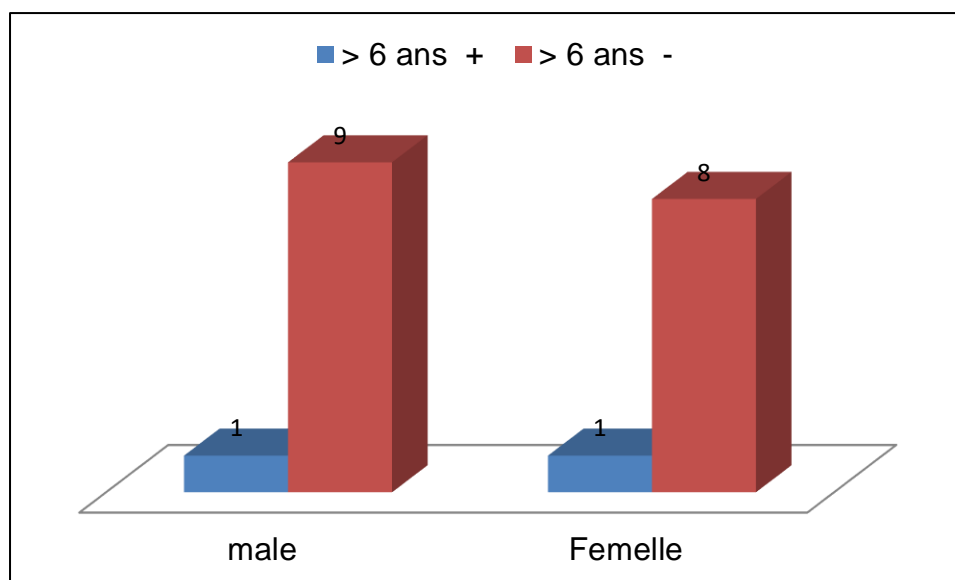


Figure 3.9 : Fréquence en fonction de l'âge (plus de 6 ans)

On remarque que dans la tranche d'âge de plus 6 ans, il existe une parité entre les mâles et les femelles (figure 3.9)

Test d'indépendance entre les lignes et les colonnes (Khi² avec correction de continuité de Yates) :Khi² (Valeur observée) 0,449 avec Khi² (Valeur critique) 3.841 (DDL : 1 ; p-value : 0.503 ; alpha : 0.05)

Interprétation du test :

- HO : Les lignes et les colonnes du tableau sont indépendantes
- Ha : il existe un lien entre les lignes et les colonnes du tableau

Etant donné que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil alpha = 0.05, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle HO. Le risque de rejeter l'hypothèse nulle H0 alors qu'elle est vraie est de **50.30%**.

Pour chaque paramètre clinique étudié, nous avons joint une analyse statistique de type descriptif grâce au logiciel Excel par le **Test du khi²**.

Il en ressort à chaque étude, même si le P n'est pas significatif (>0.05), que l'hypothèse d'une corrélation significative entre les signes cliniques retrouvés et le test ELISA ne peut être rejetée notamment pour le paramètre « sexe » où le

HO (hypothèse nulle) est de 86,68 %, ainsi la fréquence ELISA est corrélée notamment avec le sexe.

Il est à souligner que lors de notre étude, les chats prélevés ne présentaient que des signes cutanés (ulcérations, nodules) et certains sujets avec lésions oculaires.

Cette constatation est à rapporter aux différents travaux d'auteurs qui ont inoculé expérimentalement le parasite à des chats et après une sérologie utilisant le test ELISA a mis en évidence une parasitémie sans aucun autre signe clinique en dehors des lésions cutanées car les sujets de l'expérimentation produisaient une grande quantité d'anticorps. (30)

Pour le test ELISA, la prévalence constatée sur un nombre de 220 échantillons testés est de 11,8% soit 26 individus positifs, nos résultats sont similaires à ceux du Brésil (Simoès-Mattos et al ; 2001) avec un taux de 10,7% et ceux de (Costa et al ; 2009) avec un taux de 11,5%, et enfin encore au Brésil ceux de (Vides et al ; 2011) de 10,9%. Au Mexique (Longoni et al ; 2012) ont trouvé une prévalence de 13,7% qui est proche de nos résultats.

Nos résultats, par contre, ne corroborent pas ceux rapportés successivement par (Figuereido et al ; 2009) avec un taux de 2,4%. Au Brésil, (Coehlo et al ; 2011) avec un taux de 4,2% et (Portus et al ; 2002) avec un taux de 1,7%. Et en Espagne (Gallego et al ; 2007) avec un taux de 6,3%, en Grèce (Diakou et al ; 2009) avec un taux de 3,87% au Portugal (Cardoso et al ; 2010) avec un taux de 2,8% et enfin (Nasereddin et al ; 2008) avec un taux de 6,7% en Palestine.

3.4-Résultats qPCR

L'ADN des tissus a été extrait à l'aide d'un robot automatisé de purification des acides nucléiques (Maxwell® 16, Promega) et sa concentration et sa qualité ont été analysées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop). (figure 3-10).

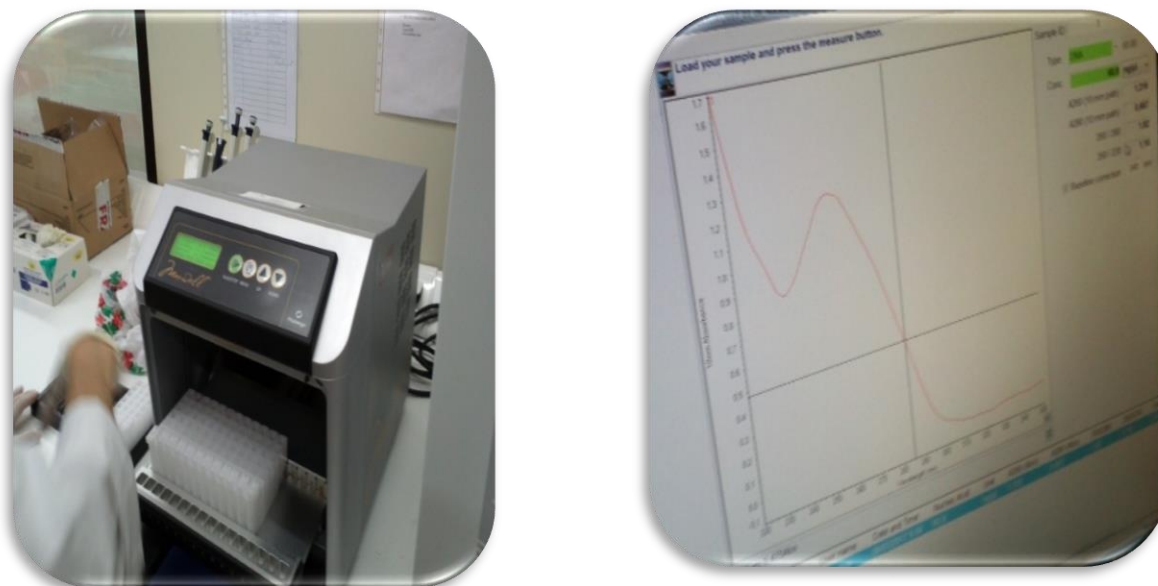


Figure 3.10 : Extraction de l'ADN (photos personnelles)

L'ADN de *L. infantum* a d'abord été étudié avec un TaqMan probe rtPCR ciblant une séquence d'ADN kinetoplaste (ADN kDNA) hautement répétée de 140 pb (Mary et al. ; 2004 ; Martín-Ezquerria et al., 2009, Del Río et al., 2014). Les cycles de seuil d'amplification Rt-PCR (CT), définis comme le cycle auquel se produit une génération de produit quasi logarithmique, ont été utilisés comme mesure semi-quantitative de la charge d'ADN parasite (Gomes et al. 2008). Les échantillons dont le CT = 1-34 ont été considérés comme clairement positifs et ceux dont le CT = 35-38 ont été jugés faiblement positifs à mesure que les quantités cibles approchaient d'une seule copie dans cette fourchette (Mackay, 2007).

La fluorescence (axes-Y) est représentée par une échelle logarithmique en fonction du nombre de cycles PCR (axe X), un seuil positif est calculé et le seuil du cycle CT est défini lorsque la fluorescence atteint le seuil positif. La fluorescence augmente de façon exponentielle à chaque cycle de PCR.

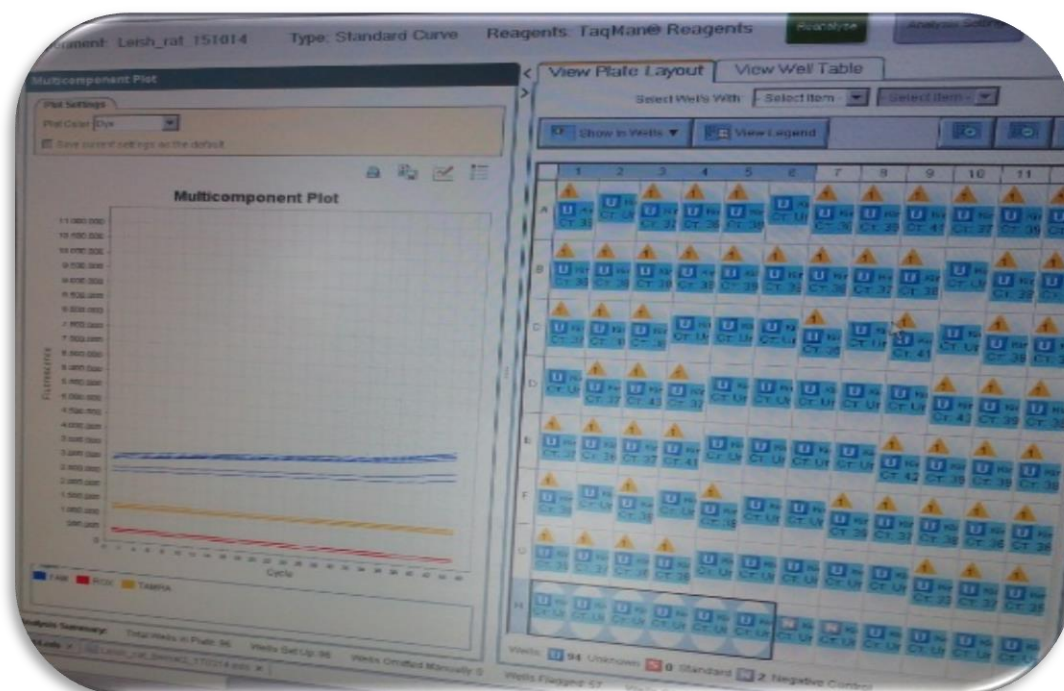


Figure 3.11 : PCR en temps réel (photo personnelle)

La courbe (figure 3.11) est presque plate qui prouve la négativité du test en raison d'un segment d'ADN initial non quantifiable pour les raisons que nous invoquons dans la discussion.

Discussion :

Lors de l'expérimentation par ELISA ,26 échantillons se sont avérés positifs, ces derniers ont été aussi testés par q PCR, nous y avons ajouté 34 autres échantillons qui étaient douteux par la méthode ELISA et issus de chats présentant quelques lésions non évocatrices de la leishmaniose ce qui a fait un total de 60 échantillons passés au test q PCR.

Nos résultats se sont avérés négatifs car les tests ont été effectués sur des Buffy Coat, ces derniers d'après la bibliographie sont souvent négatifs par rapport aux prélèvements sur tissus tels que la moelle osseuse ou la peau ou encore la rate et aussi en raison de certains inhibiteurs qui peuvent se trouver dans les solutions utilisées pour le test PCR.

Les cycles de seuil d'amplification Rt-PCR (CT), définis comme le cycle auquel se produit une génération de produit quasi logarithmique, ont été utilisés comme mesure semi-quantitative de la charge d'ADN parasite (Gomes et al., 2008). Les échantillons dont le CT = 1-34 ont été considérés comme clairement positifs et ceux dont le CT = 35-38 ont été jugés faiblement positifs à mesure que les quantités cibles approchaient d'une seule copie dans cette fourchette (Mackay, 2007).

Les tests PCR effectués sur la moelle osseuse ou les ponctions ganglionnaires étaient positifs chez les chiens séronégatifs (Gradoni ; 2002) . De plus, dans l'étude italienne de 11 chats séropositifs testés à nouveau quelques mois plus tard, tous étaient positifs pour la PCR dans les ganglions lymphatiques, et seulement 5 étaient positifs pour la PCR dans les échantillons de sang (Boari et al ;; 2005).

La méthode PCR sur les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse semble donc plus efficace que la PCR sur le sang. Les techniques de PCR sont généralement considérées comme plus spécifiques que la sérologie pour diagnostiquer la leishmaniose chez le chat (MARTÍN-SÁNCHEZ et al. 2007 ; AYLLON et al. 2008 ; MAIA et al. 2008 ; TABAR et al. 2008 ; TABAR et al. 2008).

Cependant, il faut garder à l'esprit que, selon le stade de la maladie (qui affecte la parasitémie), il peut être nécessaire d'effectuer un test PCR dans les organes lymphoïdes ou la peau et non dans les échantillons de sang.

La leishmaniose féline (FeL)³ causée par le Li apparaît comme une maladie émergente des félins, en fait, au cours des deux dernières décennies, il a été de plus en plus fréquemment signalés dans les zones endémiques et observés sporadiquement aussi dans les zones non endémiques surtout chez les chats domestiques (Rufenacht et al., 2005 ; Richter et al, 2014 ; Pennisi et al, 2015a ; Maia et al, 2015 ; Basso et al, 2016 ;Pimenta et al. 2015).

Ces dernières années, des informations plus détaillées sur le FeL ont été publiées et il est de plus en plus évident qu'il y a plus de similitudes avec le CanL qu'on ne l'avait supposé dans le passé et le but de cet examen est de résumer les connaissances actuelles sur le FeL en mettant l'accent sur les similitudes par rapport à CanL.

Des chats ont été trouvés infectés par les mêmes *Leishmania* spp. détectées et *L. infantum* est l'espèce la plus fréquemment signalée chez les chiens et les chats dans l'Ancien Monde et en Amérique Centrale et du Sud. *Leishmania infantum* a été détectée chez des chats dans les pays méditerranéens (Italie, Espagne, Portugal, France, Grèce, Turquie, Chypre), Iran et Turquie. Brésil (Pennisi et al, 2015a ; Can et al, 2016 ; Attipa et al, 2017 ; Metzdorf et al. 2017). Le Zymodème MON1 est le plus souvent caractérisé zymodème chez les chiens, les chats et les humains en Méditerranée (Maia et al, 2015 ; Pennisi et al, 2015a ; Pralong et al, 2013).

Cependant, les anticorps de *L. infantum* et la prévalence moléculaire sont habituellement considérés comme plus faibles chez les chats que chez les chiens ainsi que les cas de FeL qui sont plus rares (Otranto et al. 2017 ; Pennisi et al. 2015a). ou sporadique ou rare .

En l'occurrence CanLFeL dans les zones non endémiques peut être l'un des facteurs de risque les plus importants. conséquences du retour ou du déplacement d'animaux de compagnie (Solano-Gallego et al, 2009 ; Pennisi, 2015 ; Cleare et al, 2014 ; Svobodova et al, 2017 ; Richter et al, 2014 ; Rufenacht et al, 2005 ; Best et al, 2014).

D'autres espèces de Leishmanioses se trouvent chez les chiens et les chats de la Nouvelle-Angleterre au nouveau Monde (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*) (Solano-Gallego et al. 2009 ; Pennisi et al. 2015a).

Des cas de *Leishmania tropica* et de *Leishmania major* ont rarement été signalés chez le chien et principalement associé à des lésions de la peau ou de la muqueuse cutanée (Baneth et al. 2017).

Récemment, ces dernières espèces ont été confirmées chez des chats en Turquie (Can et al. 2016 ; Paşa et al. 2015).

Quatrième partie : Tests ELISA, IFAT, WB et RT-PCR

5- Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée entre novembre 2012 et juin 2018, dans la Wilaya d'Alger. Le travail a consisté en un échantillon beaucoup plus important de chats (754) que nous avons soumis aux tests ELISA, WB, q PCR et IFAT dans le souci de comparer ces différentes techniques. (sachant que pour le test IFAT, ce dernier n'étant pas disponible en Algérie pour l'espèce féline, il a fallu acheminer les sérums vers l'étranger dans une structure spécialisée)

4-1- Présentation de la région d'étude

Alger, en algérien El-djazair, en berbère Lžayer, surnommée El Bahdja « La Radieuse » ou « la Blanche », est la capitale de l'Algérie et la plus grande ville du pays. Située au bord de la mer Méditerranée, la ville donne son nom à la Wilaya dont elle est le chef-lieu. Alger est également une des principales métropoles d'Afrique, avec environ 2 030 000 habitants depuis 2002. L'agglomération entière en comporte environ 4 250 000, soit 12% de la population du pays et se place parmi les agglomérations les plus peuplées du Maghreb.

Alger est bâtie sur les contreforts des collines du Sahel algérois qui s'étendent sur plus de 273 km². La ville est bordée de l'est à l'ouest par la mer Méditerranée, et au sud par la plaine de la Mitidja qui représente le noyau central de la production agricole pour toute la région du centre.

La région d'Alger a un climat méditerranéen, caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers froids et humides. La moyenne annuelle des précipitations peut atteindre 800 mm, tandis que les températures varient entre 2 ° C (Janvier) et 24,5 ° C (Juin) (Centre National de Météorologie)

Alger est une zone urbaine qui comprend 57 municipalités regroupées en 13 unités administratives appelées « daïra » (Figure 1-1). Les arrondissements périphériques d'Alger abritent aujourd'hui plus de la moitié des habitants de la Wilaya. Notre zone d'étude a les coordonnées géographiques suivantes : latitude Est 36° 45' 47.016" (36.76) et longitude Nord 3° 3' 2.015" (3.015).

4.2- Population féline étudiée

La population féline de l'étude est constituée de chats errants capturés par la fourrière (HURBAL) sachant que cette dernière couvre 57 communes de la wilaya d'Alger.

4.2.1-Méthode d'échantillonnage

Dans cette étude, la méthode d'échantillonnage choisie a consisté à effectuer un dépistage aléatoire des chats. En effet, Il est très difficile de donner une estimation moyenne du nombre de chat dans la zone étudiée, car la taille globale de la population féline est inconnue, constituant ainsi, un handicap pour l'échantillonnage. Pour décider de la taille de l'échantillon à étudier, deux facteurs ont été pris en considération : l'organisation du travail au niveau de la fourrière et les objectifs de l'enquête.

- **Calcul de la taille de l'échantillon de base**

Pour un modèle d'enquête fondé sur un échantillon aléatoire simple, le calcul de la taille requise d'échantillon s'effectue en appliquant la formule suivante (Falissard, 2005).

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

Formule:

Trois facteurs déterminent essentiellement la taille d'un l'échantillon :

- **p** = prévalence estimative de la variable étudiée
- **t** = niveau de confiance visé à 95% (valeur type de 1,96)
- **m** = marge d'erreur acceptable à 5% (valeur type de 0,05).

La prévalence « **p** » prise en considération dans cette étude est représentée par la prévalence la plus élevée retrouvée jusqu'à présent, qui était de 60% ($p = 0.6$) en Italie (Pennisi et al. 1999).

- **Correction de la différence et prise en compte des risques d'erreur.**

La taille de l'échantillon a été multipliée par deux car un sur-échantillonnage est indispensable dans des zones particulièrement urbaines, et un pourcentage de 5% a été rajouté à la taille de l'échantillon calculée afin de tenir compte des risques d'erreurs d'enregistrement. Un nombre total de 757 chats a été ainsi échantillonné entre novembre 2015 et juin 2018 au niveau de la fourrière (HURBAL), couvrant 57 communes de la wilaya d'Alger.

4.2.2- Examen clinique

Tous les chats ont été soumis à un examen physique, afin de rechercher des signes cliniques évocateurs de la leishmaniose tels que : l'augmentation de la taille des ganglions lymphatiques principalement les ganglions poplités, la perte de poids, les lésions cutanées, l'épistaxis, les signes oculaires et d'autres manifestations. L'état clinique de chaque animal a été évalué et défini conformément à la classification de Manciantietal., (1988), en : symptomatiques, animal ayant au moins un symptôme de la maladie et asymptomatiques, sans aucune manifestation clinique.

Une fiche d'enquête a été établie pour chaque animal. Cette dernière comporte toutes les données susceptibles d'être exploitées dans cette étude. Elle permet de renseigner sur l'âge, le sexe, le statut clinique de l'animal, son style de vie (domestique ou errant), et son environnement, mais également des informations sur le propriétaire (nom, adresse et profession...etc.).

4.2.3-Prélèvement du matériel biologique

4.2.3.1-Prélèvement de sang

Les animaux ont subi une prise de sang, avant leur abattage. Cette dernière est pratiquée à la face antérieure du membre thoracique par ponction de la veine céphalique de l'avant-bras, immédiatement au-dessous du pli du coude. Une compression manuelle est effectuée au niveau du bras avec une main, alors que l'autre main effectue la ponction veineuse à l'aide d'une aiguille 1.2 x 40 mm montée sur un porte-vacutainer.

Le sang prélevé est recueilli dans un tube sec stérile de 5 ml. Il est ensuite centrifugé à 2500 tours/min pendant 10 minutes. Cependant, il peut être conservé à température ambiante, si celle-ci n'est pas trop élevée, pendant une ou deux heures jusqu'à ce qu'il soit parfaitement coagulé. Le sérum obtenu est prélevé et conservé dans des tubes Eppendorf puis aliquoté et congelé à -20° C, jusqu'à l'utilisation pour tests sérologiques.

4.2.3.2-Ponction ganglionnaire

Le site privilégié pour exécuter la ponction ganglionnaire est le ganglion poplité au niveau du membre postérieur, du fait de son accessibilité et de sa situation sous cutanée. L'animal est immobilisé en décubitus latéral et le prélèvement est effectué au niveau du membre postérieur opposé, après rasage soigneux et désinfection de la région avec soit de l'eau oxygénée à 10%, soit de l'alcool chirurgical à 70%.

Une anesthésie locale peut être réalisée par injection locale péri-ganglionnaire de xylocaïne® à 1%. Un massage prolongé de la zone infiltrée permet une meilleure diffusion de l'anesthésique, facilitant ainsi la ponction. Le ganglion est ensuite ponctionné à l'aide d'une aiguille de 1.2 x 40 mm montée sur une seringue contenant environ 2 cc de solution de Pénicilline (100 000 UI/ml) dans du sérum salé à 9‰.

La ponction est réalisée par aspiration. Le suc ganglionnaire doit remonter dans la seringue. Seringue et aiguille sont ensuite retirées en maintenant l'aspiration. L'aiguille est séparée de la seringue et remplacée par une nouvelle aiguille stérile.

Le matériel contenu dans la seringue estensemencé à la flamme d'un bec Bunsen (ou à défaut d'un briquet) dans un milieu de culture NNN placé ensuite à $+24 \pm 1^\circ \text{C}$ ou à défaut de milieu de culture dans une de solution de pénicilline (100 000 UI/ml) dans du sérum salé à 9‰ et conservé à $+ 4^\circ \text{C}$ dans une glacière. De retour au laboratoire, le produit est immédiatementensemencé dans un milieu NNN et mis à $+ 24 \pm 1^\circ \text{C}$.

4.2.3.3-Biopsie cutanée

Les biopsies cutanées réalisées dans cette étude ont été effectuées au niveau du chancre d'inoculation retrouvé principalement sur le chanfrein des chats infectés en marge de la lésion ulcérée, au niveau du bourrelet inflammatoire. Ces biopsies sont réalisées après l'abattage de l'animal.

La carotte de tissu prélevée est placée dans un tube stérile contenant du sérum salé à 9‰ et de la Pénicilline (100 000 UI/ml). De retour au laboratoire, la biopsie cutanée est lavée avec du sérum physiologique additionné de Pénicilline (100 000 UI/ml). Elle est ensuite broyée avec une paillette en bois dans un tube Eppendorf stérile toujours avec de la Pénicilline (100 000 UI/ml) puisensemencée dans un tube de culture NNN, maintenu ensuite à $+ 24 \pm 1^\circ \text{C}$.

4.2.4-Tests sérologiques

Les échantillons de sérum collectés ont été analysés par trois techniques sérologiques : immunofluorescence indirecte (IFI) et enzyme linked immunosorbentassays (ELISA) ont été utilisées comme technique de dépistage sur l'ensemble de l'échantillon ($n = 757$), alors que le Western Blot (WB) a été utilisé comme technique de confirmation sur une partie de l'échantillonnage dont les techniques de dépistage donnaient des valeurs limites difficiles à interpréter.

Le but de ce travail a été d'estimer la prévalence globale de l'infection par les méthodes de dépistage et de confirmation, d'évaluer une prévalence relative à chaque test de dépistage et enfin de comparer la sensibilité et la spécificité de l'IFI et l'ELISA par rapport à la positivité globale.

4.2.4.1-Immunofluorescence Indirecte (IFI)

Le principe de la réaction d'immunofluorescence indirecte repose sur la révélation d'un complexe antigène-anticorps formé par le parasite et les anticorps recherchés au moyen d'une anti-immunoglobuline couplée à une substance fluorescente en lumière ultraviolette. Cette technique, utilisée depuis de nombreuses années (Lanotte et al., 1975), sert de méthode de référence.

Il s'agit d'une technique « maison » non commercialisée inspirée de Lanotte et al. (1975). L'antigène utilisé est constitué de formes promastigotes de la souche de référence *L. infantum* zymodème MON-1 (MHOM/FR/78/LEM75). Ces promastigotes sont cultivés puis fixés sur des lames. Les lames sont ensuite séchées à l'étuve à 37°C avant d'être congelées à -80°C. Les anticorps recherchés dans le sérum sont fixés sur l'antigène, puis mis en évidence par l'ajout des anti-immunoglobulines (anti-IgG) de chats conjugués à la fluorescéine (fractions globulines anti-IgG du chien conjuguées à la fluorescéine, Compiègne PARIS, France). Deux sérums de chiens ont été utilisés comme témoins, l'un positif (à une dilution de 1/1280) et l'autre négatif. Il s'agit d'une technique quantitative, dont le résultat est exprimé par la dernière dilution de sérum donnant encore une fluorescence jaune verte. Le seuil de positivité a été fixé à une dilution $\geq 1:80$, correspondant au seuil connu et établi dans de nombreux travaux (Lanotte et al., 1975 ; Ciaramelle et al., 1997 ; Ait-Oudhia et al., 2009). Les sérums qui présentaient une légère fluorescence à une dilution de 1:20 - 1:40 ont été considérés comme douteux et ceux qui ne présentaient aucune fluorescence comme négatifs.

Cette technique est assez facile à réaliser, cependant elle nécessite une certaine habitude de lecture de la fluorescence. Elle est relativement rapide (trois heures) et ne nécessite pas de gros investissements si ce n'est un microscope à fluorescence en lumière UV.

4.2.4.2-Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

L'ELISA est une technique basée sur la réaction des anticorps du sérum à tester avec des antigènes solubles, directement fixés par absorption sur un support en polystyrène (plaques à 96 puits).

Le test ELISA a été réalisé en utilisant un kit commercial (Leishmaniasis Indirect/ID.VET innovative diagnostic. Montpellier. France). Chaque sérum a été testé séparément dans un puits. Les antigènes s'associent aux anticorps anti-Leishmania. Les immunoglobulines en excès sont éliminées lors d'une étape de lavage. Le conjugué enzymatique (IgG-peroxidaseanti-chat) s'associe spécifiquement aux complexes antigène-anticorps formés. Une deuxième étape de lavage élimine le conjugué en excès. L'ajout du substrat de l'enzyme s'accompagne de l'apparition d'une substance classiquement chromogène. Une réaction positive correspond à une réaction colorée apparaissant après l'ajout du substrat révélateur.

La réaction est quantifiée par la lecture au spectrophotomètre à 620 nm. Les résultats sont donnés en valeur de densité optique(DO). Le seuil de positivité est fixé à une valeur indice $\geq 0,5$ (50%). L'interprétation des résultats donnée par le fabricant (ID.VET) en fonction de la valeur indice est : $\leq 0,40$: résultat négatif; entre 0,41 et 0,49 : résultat douteux; $\geq 0,50$: résultat positif. Deux sérums de chats ont été utilisés comme témoins pour valider le test. Un contrôle positif possédant une DO $>0,95$ (95%) et l'autre négatif $<0,40$.(Annexe 2)

Le grand avantage de cette technique est l'automatisation permettant une lecture facile et rapide d'un grand nombre d'échantillons.

4.2.4.3-Western Blot

Le Western blot a pour but d'identifier une protéine dans un mélange complexe ou de déterminer la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum contre les antigènes parasitaires. L'antigène utilisé est constitué de formes promastigotes de la souche de *L. infantum* zymodème MON-1 (MCAN/GR/82/LEM497). Ces antigènes après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide, ont été fixés par électro-transfert sur la surface de bandelettes de nitrocellulose.

Un kit commercial (LEISHMANIA Western Blot IgG / LDBIO DIAGNOSTICS. Lyon. France) a été utilisé. Chaque sérum a été testé séparément avec une bandelette. Les anticorps anti-Leishmania présents dans les prélèvements se fixent sélectivement sur les antigènes leishmaniens présents sur les bandelettes. Le lavage élimine les anticorps non fixés. Chaque bandelette a ensuite été incubée avec le conjugué anti-IgG de chats, qui se lie aux anticorps anti-Leishmania éventuellement fixés. Le conjugué non fixé est éliminé lors du lavage. L'ajout du substrat aux complexes immuns formés s'accompagne de l'apparition de bandes transversales violettes. La réaction de coloration est arrêtée par lavage et les bandelettes sont mises à sécher. (Annexe G)

La présence sur la bandelette des bandes antigéniques 14kDa et/ou 16kDa permet d'interpréter le test positif et de conclure à la présence d'anticorps IgG anti-Leishmania dans l'échantillon testé.

Dans cette étude, les échantillons de sérum trouvés douteux en IFI (entre 1:20 et 1:40) et/ou en ELISA (entre 0.4% et 0.5%) ont été testés.

4.2.4.4- PCR (Polymerase Chain Reaction)

a-Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée avec une résine chélatrice d'ADN Instagene (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) selon les recommandations du fournisseur à partir des ponctions cutanées et des biopsies cutanées, préalablement incubées pendant 1 heure dans une solution de saponine à 5 %. L'ADN extrait est conservé à -20°C après dilution au 1/5 dans l'eau stérile.

b-PCR en temps réel

La RT-PCR est réalisée sur Light Cycler (Roche Diagnostic, Meylan France) selon la technologie Sybr Green. L'ADN des Leishmania a été amplifié sur Light Cycler comme précédemment décrit (de Montbrison et al., 2003).

Les amorces RV1 (5'CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG3') et RV2 (5'CCACCTGGCCTATTTTACACCA3') permettent l'amplification d'une partie du gène leishmania kDNA codant les minicircles. L'interprétation est réalisée à la fin de

la phase de PCR par comparaison de la température de fusion du produit de PCR à celle d'une souche de référence: *L. infantum* MHOM/TN/80/IPT1. Chaque essai comporte un contrôle négatif représenté par du sang total non parasité. (Annexe 4)

4.5- Identification des parasites

4.5.1- Isolement et cryoconservation des souches

Les souches ont été isolées sur milieu de culture NNN (NovyMcNeal Nicolle), qui est un milieu diphasique constitué d'une gélose au sang de lapin, additionné d'antibiotiques (Pénicilline 250 000 UI/ml et streptomycine 100 µg/ml). Les souches ont été cultivées pour obtenir une suspension de promastigotes d'au moins 3 millions par ml puis conservées en azote liquide, après addition de DMSO à 5% (la composition et la fabrication des milieux de cultures sont en annexe VI et le protocole de cryoconservation des souches en annexe 5).

Les souches isolées ont été conservées dans la cryobanque du "Centre national de référence des *Leishmania* (CNRL)", CHRU Montpellier (France). Ces souches ont été ensuite typées par identification enzymatique.

4.5.2- Analyse iso-enzymatique

Pour l'obtention d'extraits en vue du typage enzymatique, le cryostabilat est décongelé assez rapidement, en le maintenant pendant une minute dans un bain-Marie à 40°C, puis transféré sur milieu NNN. Après six jours, la culture est repiquée dans des boîtes de Roux contenant 200 ml milieu CCS (Cœur Cerveau Sang) enrichi à 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, additionné d'antibiotiques (Pénicilline 100 000 UI/ml et streptomycine 50µg/ml), pendant 6 à 7 jours et maintenu à + 24 ±1° C.

A la phase exponentielle de la croissance (6^{ème} au 8^{ème} jour), la suspension des parasites est filtrée sur triple épaisseur de gaze pour éliminer les débris de gélose, puis centrifugée à 2500 tours/min pendant cinq minutes. Le culot de promastigotes est lavé dans du NaCl à 9‰, puis à 3‰ et centrifugé dans les mêmes conditions. Deux lavages successifs des promastigotes en solution saline, permettent d'obtenir un culot contenant uniquement des parasites. Les parasites sont ensuite congelés

dans l'azote liquide, décongelés à température ambiante (choc thermique). Le culot est alors centrifugé à grande vitesse et le surnageant, contenant les enzymes, ensuite congelé sous forme de perles de 50µl obtenues par projection dans l'azote liquide.

Au moment de la manipulation, les perles sont décongelées et centrifugées à 10000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant, maintenu à + 4°C, est absorbé sur des rectangles de papier Whatman(2 x 2 mm) disposés verticalement à l'extrémité inférieure d'un gel à 10% d'amidon hydrolysé, coulé en plaque de 19.5 x 18.5 cm. La révélation des 15 systèmes enzymatiques nécessite la confection de cinq gels d'amidon, et de quatre solutions tampons (tris-citrate pH 9.4, tris-citrate pH 8.6, tris-maléate EDTA pH 7.4 et tris-maléate pH 7.4). Après une migration qui dure environ six heures, sous une tension de 100 volts et un ampérage de 100 milliampères, chaque gel est découpé en tranches de 2 mm d'épaisseur.

L'analyse électrophorétique a été réalisée selon la technique décrite par Rioux et al. (1990), en gel épais d'amidon avec 15 systèmes enzymatiques : 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 1 (NP1) , EC 2.4.2.1. purine nucléoside phosphorylase 2 (NP2) EC 2.4.2.*; glutamate-oxaloacétate transaminases (GOT1 et GOT2), 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.

Pour chaque enzyme, les électromorphes sont identifiés d'après leur mobilité relative par rapport à celle d'une souche-étalon. Quatre souches de référence de *L. infantum* ont été utilisées dans cette étude: MHOM/FR/78/LEM75 zymodème MON-1; MHOM/DZ/82/LIPA59 MON-24; MHOM/DZ/83/LEM425 MON-80; et MHOM/PS/99/LRC-L773 MON-281.

4.6-Analyse statistique

L'analyse statistique a été conduite selon une stratégie de deux étapes successives. Tout d'abord, on a supposé que toutes les observations sont indépendantes. Ensuite, dans un premier temps, nous avons testé l'association entre les résultats de la PCR et le reste des variables explicatives prises individuellement, en utilisant le test de khi2 de Pearson toutes les variables explicatives trouvées statistiquement liées à la maladie au seuil de signification de 20% ($p \leq 0,20$ a été retenue). Ce seuil de 0,20, et non 0,05 comme habituellement utilisé en statistique, permet de prendre en compte des variables qui pourraient être des facteurs de confusion possible ou des facteurs d'interaction.

L'analyse univariée permettait d'estimer les coefficients " β " pour chaque variable prise individuellement « résultats brutes » avec le test de signification correspondant (khi2 de Wald, $p < 0,20$). Cette étape est indispensable, autorisant la sélection des variables à introduire dans le modèle final, tout en éliminant les variables non liées statistiquement, c'est-à-dire $p > 0,20$, notamment les variables désignés en gras dans le tableau **signes nerveux, lésions oculaires, signes digestifs**.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle multivarié final dans lequel nous avons introduit effectivement l'ensemble des variables explicatives trouvées significatives précédemment. En effet nous avons travaillé avec le modèle de régression logistique multivarié en risque de 0,05% ($p < 0,05$). La sélection du modèle final a été faite par descendance.

L'étude de l'effet de l'âge, nous a montré que les jeunes chats sont moins sensibles à la maladie par rapport aux chats adultes avec $\text{odds ratio} = 0,49$ $p = 0,018$, indiquant une diminution significative de 51% du risque.

Les chats errants sont moins sensibles à la maladie avec une diminution du risque à raison de 35% ($\text{odds ratio} = 0,65$ $p = 0,07$) par rapport aux chats domestiques.

En revanche, les symptômes les plus liés significativement à la maladie c'est l'**état corporel-1**, **lésions cutanées-1**, **Lymphadenopathy-1** respectivement $\text{odds ratio} = 2,75$ $p = 0,0001$; $\text{odds ratio} = 3,98$ $p = 0,0001$; $\text{odds ratio} = 2,56$ $p = 0,003$. (figure 4-1 , 4-2, 4-3)

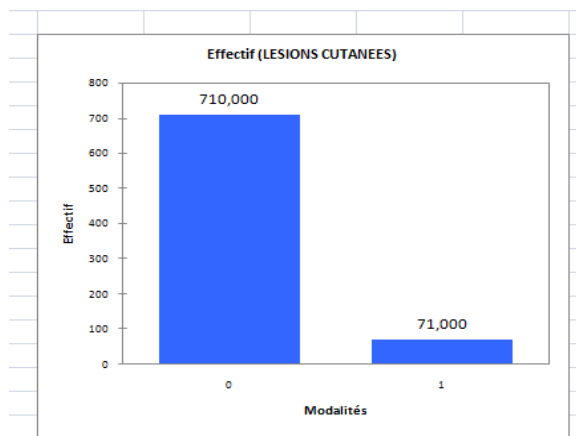


Figure 4.1 : lésions cutanées

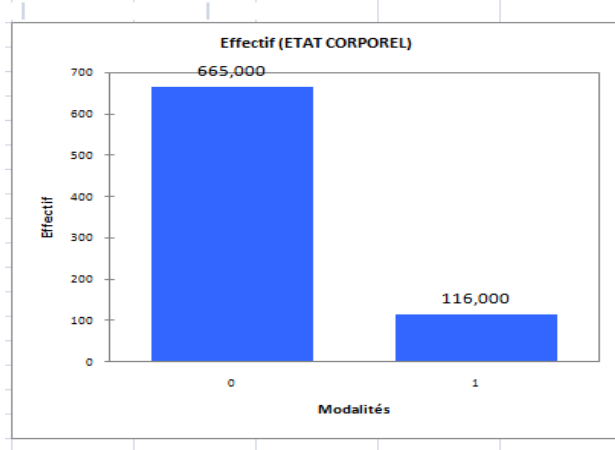


Figure 4.2 : état corporel

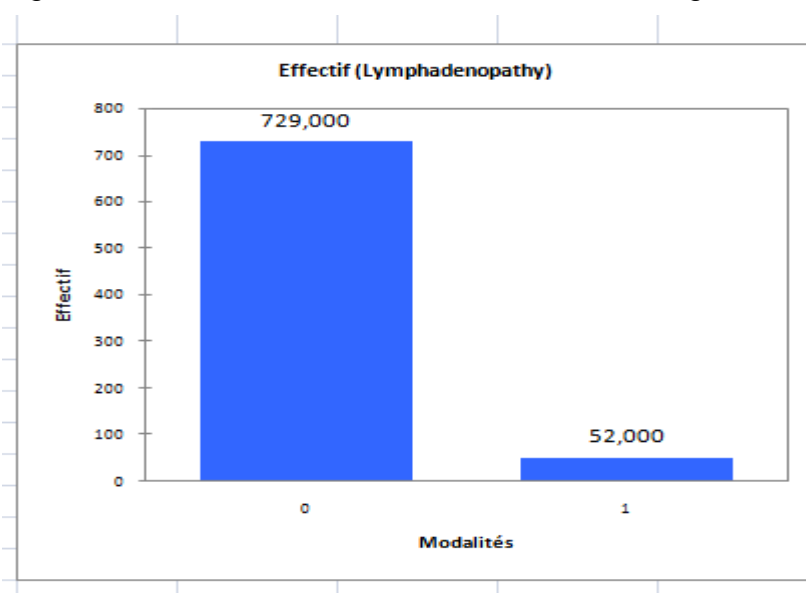


Figure 4.3 : Lymphadénopathie

L'évaluation de la valeur diagnostique des techniques de dépistage (IFI, ELISA et PCR) a été déterminée en mesurant la sensibilité de chaque test par rapport à la prévalence globale.

La concordance des deux tests a été évaluée en utilisant le ratio: (nombre de sérums positifs dans les deux tests + nombre de sérums négatifs dans les deux tests) / nombre total de sérums. Cependant afin de confirmer le niveau de concurrence entre les deux tests, l'indice Kappa de Cohen (Cohen's k) a été estimé. La valeur du coefficient Cohen's k est interprétée comme suit: 1.00±0.81: excellent; 0.80±0.61: Bien; 0.60±0.41: modéré; 0.40±0.21: faible (Ghosh et al. 2016)

Le test de Chi-carré (χ^2) a été utilisé pour comparer les taux de séroprévalence par rapport à l'âge, au sexe, le style de vie et à d'autres facteurs. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque P (Probabilité) correspond à une valeur $\leq 0,05$ avec un intervalle de confiance de 95%. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel statistique SPSS, version 22 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

4.7-Résultats et discussion.

Entre novembre 2012 et juin 2018, 1077 échantillons de sérums ont été prélevés dont 50 de chiens et analysés et 25 souches ont été isolées et identifiées chez le chat.

4.7.1-Prévalence Globale

Les tests effectués sur les 754 échantillons de sérum ont révélé que 185 chats (24,44%, IC 95% : 21.51-27.62%) avaient des anticorps spécifiques anti-Leishmania et donc considérés positifs, selon au moins un des tests de dépistage effectués.

Sur les 757 échantillons de sérum positifs: 137 (18,1%, IC 95% : 15,52 - 21) étaient positifs par l'IFI, 166 (21,93%, IC 95% : 19,13 - 25,01) par l'ELISA et 181 (23,91%, IC 95% : 21,01– 27,08) étaient positifs par RT-PCR

La sensibilité de l'IFI, de l'ELISA et de la PCR par rapport à la prévalence globale de la maladie sont de 74,05% (IC 95% : 71.2 – 79.8) et de 89.64% (IC 95% : 87.6 - 90.4) et 97.87 (IC 95% : 95.4 – 101) respectivement. Il en ressort que l'augmentation de la sensibilité du diagnostic obtenue par l'utilisation de la PCR, par rapport à la sérologie est plus importante. La concordance entre ces tests est presque parfaite entre l'IFI et l'ELISA (l'index Kappa est de 0.77) et le niveau de concurrence est de 88%, et parfaite entre l'ELISA et la RT-PCR, avec un index Kappa est de 0.87) et un niveau de concurrence est de 95%. Cependant il y a comme même une différence significative entre les trois tests vis-à-vis de la détection de l'infection ($\chi^2 = 7,882$, p-value = 0,019).

Les sérums douteux en ELISA et en IFI, ont été testés pour confirmation par WB (n = 46). Tous ont été confirmés positifs par la présence des deux bandes de 14 et 16 kDa (Figure 1).

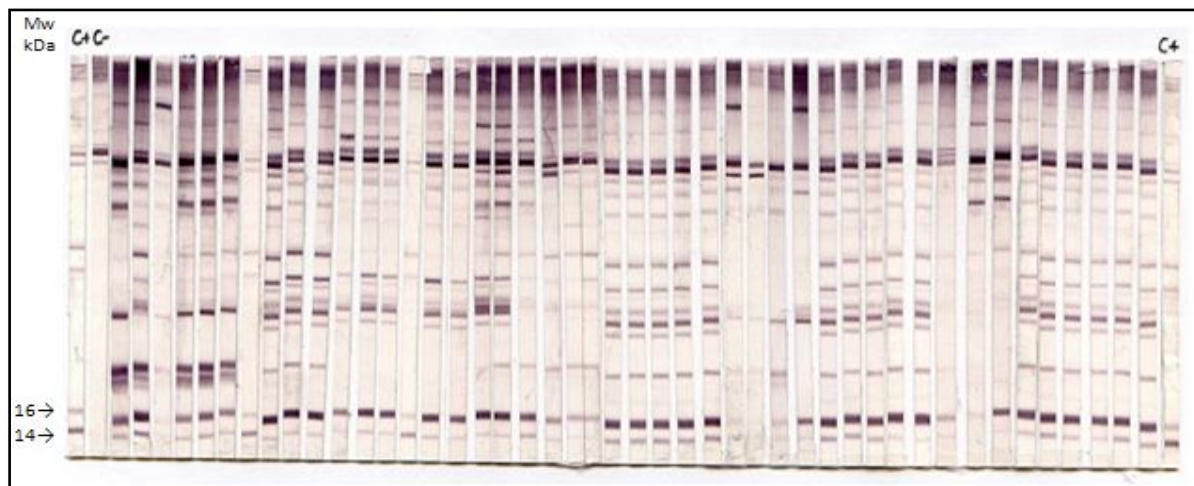


Figure 4.4 : Western blots de sérums douteux des chats naturellement infectés avec *L. infantum*. Les bandes spécifiques de 14 et 16 kDa sont indiquées. (C+) représente le contrôle positif et (C-) le contrôle négatif. (Mw kDa: Poids Moléculaire en kilodaltons).

Les résultats de la RT-PCR montrent une reproduction exponentielle des ADN kleishmanien. Les cycles de positivité observés ont été en moyenne de 24 (Tableau 1). Dans tous les cas positifs, les courbes de dénaturation présentaient les caractéristiques de spécificité attendues.

Tableau 4.1 : Répétabilité et reproductibilité de la technique RT-PCR sur des échantillons leishmaniens.

Parasite Load	Répétabilité					Reproductibilité			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean	SD	Assay 1	Assay 2	Mean	SD
1x10⁵	17.20	17.21	17.19	17.20	0.01	17.20	18.10	17.64	0.64
1x10⁴	20.79	20.72	20.74	20.75	0.04	20.75	21.39	21.07	0.45
1x10³	24.11	24.11	24.11	24.11	0.00	24.11	24.76	24.43	0.46
1x10²	27.56	27.43	27.55	27.51	0.07	27.51	28.04	27.78	0.38
1x10¹	30.73	30.68	30.65	30.69	0.04	30.69	31.44	31.07	0.53
				24.05				24.38	

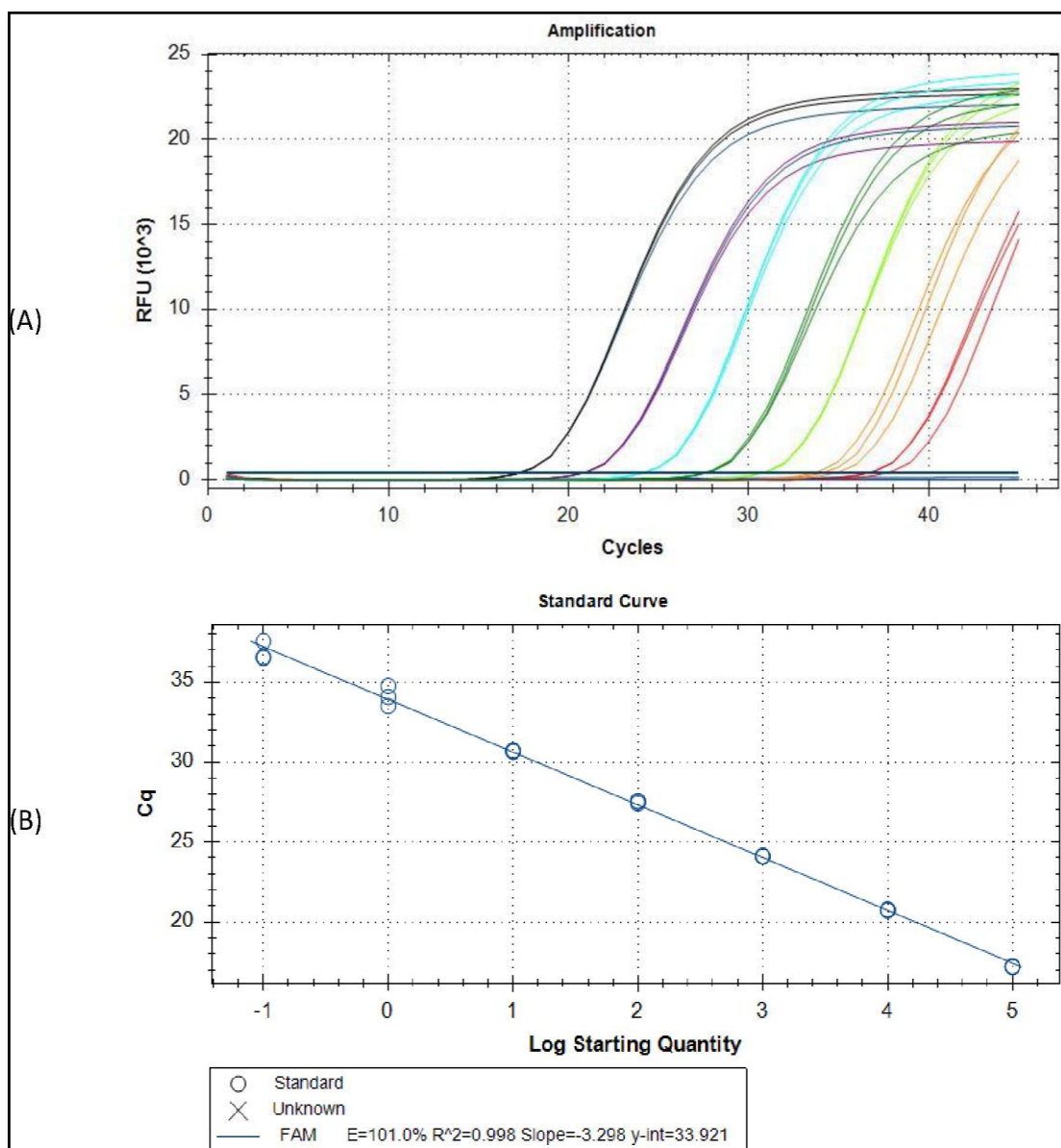


Figure 4.5 : Performances techniques de la RT-PCR Leishmania.

(A) : l'ADN a été extrait de dilutions en série de *L. infantum* cultivées, allant de 1×10^5 à 1×10^{-1} / ml, et soumis à la RT-PCR. Les courbes d'amplification sont présentées pour chaque échantillon, et chaque concentration de parasite est représentée par une couleur différente.

(B) : les valeurs moyennes de Ct sont tracées à partir de triplicatas testés par rapport aux dilutions en série. Chaque point représente le Ct d'un individu échantillon,

4.7.2- Résultats de l'étude clinique

Effectifs des chats prélevés :

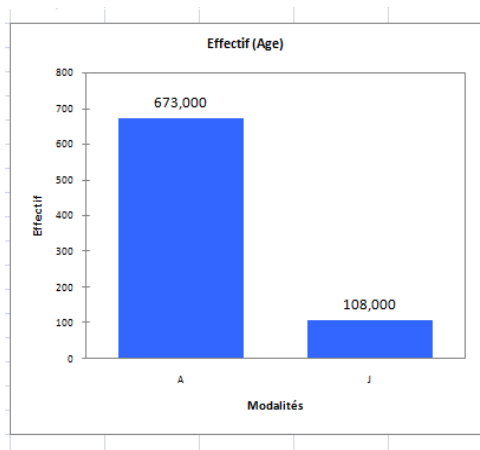


Figure 4.6 : âge des chats

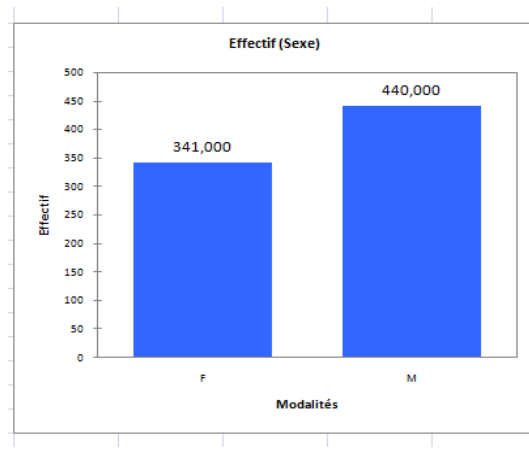


Figure 4.7 : sexe des chats

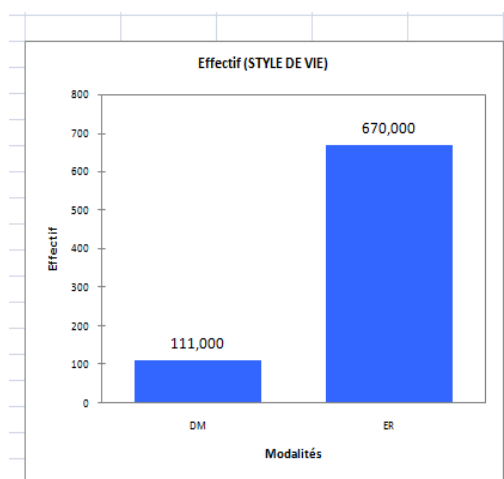


Figure 4.8 : style de vie

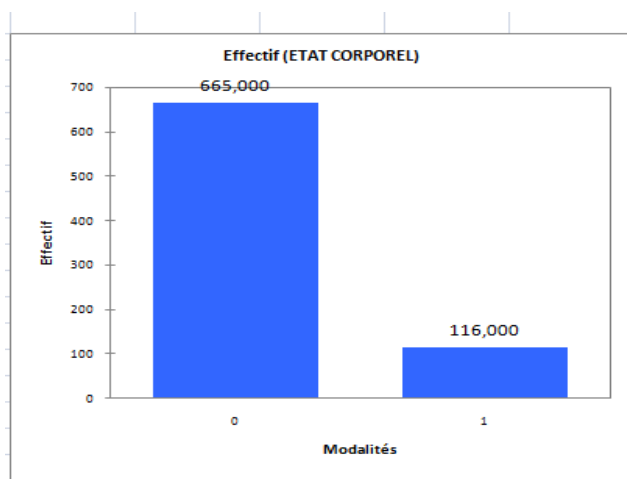


Figure 4.9 : état corporel

Les chats adultes(A) sont plus nombreux que les jeunes(J) Fig4-6), les mâles plus nombreux (fig4-7) ainsi que les chats errants (fig4-8)et enfin les chats à mauvais état corporel(o)sont plus nombreux (fig4-9).

Concernant la prévalence de l'infection par rapport à la classification précédemment décrite des signes cliniques, il existe une différence significative d'une catégorie clinique à l'autre vis-à-vis de l'infection ($\chi^2 = 126,31$, p-value = 0,00001). En effet les chats ayant au moins un signe clinique « dits symptomatiques » ont montré une

positivité beaucoup plus importante (69,72%, IC 95% : 60,55 - 77,56) que ceux ne présentant aucun symptôme (18,63%, IC 95% : 15,86 - 21,85)(Tableau 4-2).

Tableau 4.2 : Prévalence de l'infection selon les formes cliniques.

Formes cliniques	Effectif Félin	Chats positifs	Prevalence % (95% CI)	p-value
Asymptomatiques	648	121	18.67 (15.86 – 21.85)	0.00001
Symptomatiques	109	76	69,72 (60,55 - 77,56)	
Total	757	185	24.44 (21.51 – 27.62)	

Les principaux signes cliniques observés figurent sur le tableau 4- 3. Sur les 185 chats positifs, les symptômes dominant le tableau clinique sont par ordre décroissant : la perte de poids (cachexie, amaigrissement, prostration),lymphadénopathie (principalement les ganglions sous maxillaires et poplités), les lésions cutanées (alopécie, dépigmentation, squamosis, ulcération, formations pseudo-tumorales, dermatite exfoliative...), l'anémie,uneonychogrieffose (avec présence de panaris et d'ulcères interdigités), des signes digestifs (ptyalisme, diarrhées, vomissements, ictère, entérite hémorragique), nerveux (ataxie, convulsions, paralysies), des troubles oculaires (conjonctivite, kératite, kératoconjonctivites),. (Tableau 4-3).

Quelques symptômes atypiques ont été observés tels que des œdèmes des extrémités, chute de griffes, troubles respiratoires (rhinite, pneumonie).

Tableau 4.3 : Principaux signes cliniques observés chez les chats séropositifs (N = 185), fréquence des signes cliniques des chats prélevés

Signes Cliniques	Fréquence % (n)
Perte de poids	67.03 (124)
Lymphadénopathie	24.32 (45)
Lésions cutanées	22.7 (42)
Anémie	20.54 (38)
Troubles digestifs	10.81 (20)
Troubles nerveux	5.95 (11)
Lésions oculaires	4.32 (8)
Chute de griffe	2.16 (4)
Epistaxis	0.54 (2)

Pour illustrer les principaux signes cliniques, quelques photos ont été prises et placées ci-dessous.



Figure 4.10 : Chat leishmanien (cachexie avec amyotrophie et chute des griffes)

Photo personnelle (Fourrière HURBAL)



Figure 4.11 : Chancre d'inoculation au niveau du chanfrein (Photo personnelle)



Figure 4.12 : Chat leishmanien (Dépilation et ulcération)



Figure 4.13 : Chat leishmanien (anémie)

4.7.3-Etude des facteurs de risque

L'analyse statistique a montré que des différences significatives ont été observées avec certains facteurs épidémiologiques qui, dans cette étude, apparaissent comme des facteurs prédictifs : l'âge des chats, leur style de vie et leur état corporel reflétant ainsi leur état de santé.

➤ Age

L'âge des chats analysés est compris entre 1 et 11 ans. Les tranches d'âge étudiées ont été classées en deux catégories : jeunes (1 à 3 ans), adultes (4 à 11 ans) (Tableau 4).

La tranche d'âge la plus affectée est celle comprise entre 4 et 11 ans. Sur 649 chats de cette tranche d'âge, 168 (25,9% ; IC 95% : 22.66 – 29.4) se sont révélés positifs. La séroprévalence chez les chats de moins de 4 ans n'est cependant pas négligeable (15.74% ; IC 95% : 10.07 – 23.77). La vulnérabilité des chats est plus ou moins importante selon l'âge ($\chi^2 = 5.16$, p-value = 0,023), celui-ci constitue de ce fait un facteur de risque majeur de sensibilité à l'infection.

➤ Style de vie

Le style de vie de l'animal est un facteur prédictif de la maladie, puisque ce sont les chats errants, vivants en plein air, à l'extérieur des habitations qui ont été les plus affectés et qui sont statistiquement considérés facteur de risque ($\chi^2 = 19.46$, valeur p = 0,016). La séroprévalence de l'infection chez ces derniers est de 25.22% (IC 95% : 22.08 – 28.65), alors que chez les chats vivants à l'intérieur des habitations « dits domestiques », la prévalence est de 18.4% (IC 95% : 11.65 – 27.09) (Tableau 4).

➤ Santé de l'animal

La santé de l'animal est surtout représentée par son état corporel. Les chats ont été classés en deux catégories : les chats en bon état et les chats en mauvais état corporel. Une prévalence élevée est observée dans la première catégorie de chats (57,55%) contre 19.05 % dans la seconde. Du point de vue statistique, les chats en

bon état de santé constitue un véritable facteur de risque de contracter l'infection ($\chi^2 = 73.16$, p-value = 0,00001) (Tableau 4).

➤ **Autres variables**

Aucune différence statistique n'a été constatée par rapport au sexe des chats ($\chi^2 = 3.429$, p-value = 0,064), à la longueur du poil ou de la fourrure ($\chi^2 = 0.077$, p-value = 0, 874), ou par rapport à son habitat ($\chi^2 = 0.026$, p-value = 0,968). (Tableau 4).

Tableau 4.4 : Prévalence de l'infection chez les chats par rapport aux variables épidémiologiques

Variables		Effectif félin	Chats positifs	Prévalence % (95% CI)	p-value
Age	Jeune	108	17	15.74 (10.07 – 23.77)	0.023
	Adulte	649	168	25.88 (22.66 – 29.39)	
Genre	Femelle	332	92	27.71 (23.17 – 32.76)	0.064
	Male	425	93	21.88 (18.21 – 26.04)	
Fourrure	Court	650	160	24.61 (21.46 – 28.07)	0. 874
	Long	107	25	23.63 (16.36 – 32.22)	
Habitat	Intérieur	105	25	23.80 (20.25 – 26.09)	0.968
	Extérieur	652	160	24.53 (24.04 – 29.68)	
Style de vie	Domestique	87	16	18.39 (11.65 – 27.81)	0.016
	Errant	670	169	25.22 (22.08 – 28.65)	
Etatcorporel	Bon	106	61	57.55 (48.04 – 66.51)	0.000
	Mauvais	651	124	19.05 (16.22 – 22.24)	
TOTAL		757	185	24.44 (21.51 – 27.62)	

4.7.4- Résultats de l'analyse iso-enzymatique

Au total 25 souches ont été isolées de chats atteints de leishmaniose dans la région d'Alger, puis transportées au Laboratoire de Parasitologie "Centre national de référence des Leishmania (CNRL)" CHRU de Montpellier, où elles ont été cryoconservées dans de l'azote liquide à -196°C puis identifiées par typage isoenzymatique.

Le typage isoenzymatique a révélé, que les 250 isolats appartiennent à *Leishmania infantum* zymodème : MON-1. (Figure 7).

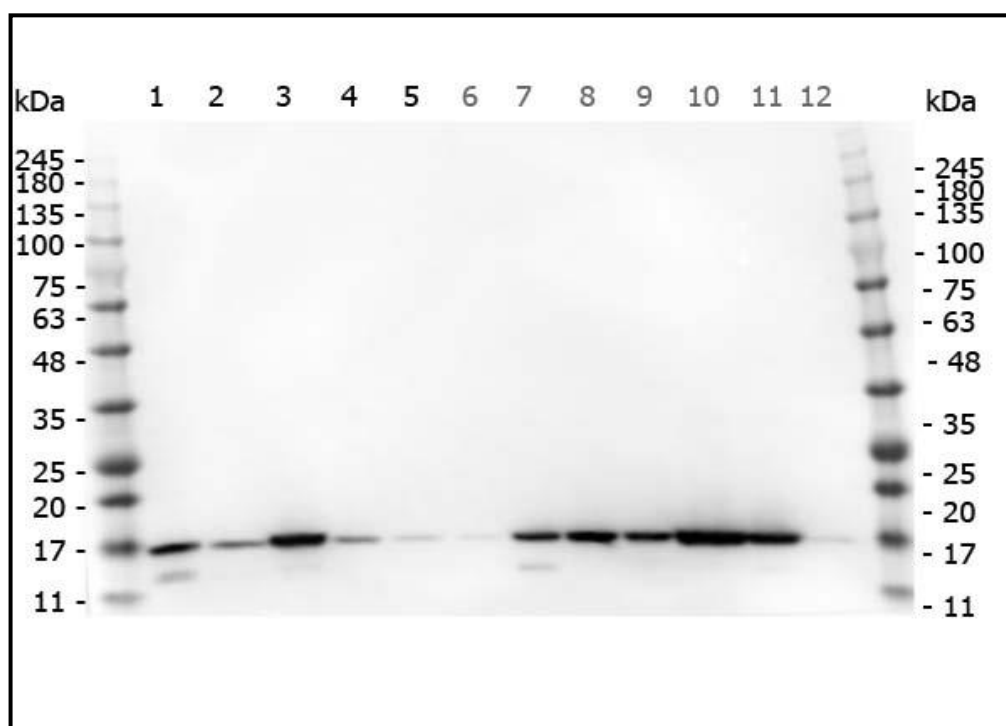


Figure 4.14 : Mobilité électrophorétique sur gel épais d'amidon de la malate déshydrogénase EC1.1.1.37 (MDH) des souches *Leishmania* (MON-1) isolées à partir de chats atteints de leishmaniose.

Discussion :

4.8.1-Prévalence globale

La séroprévalence globale de l'infection féline à *L. infantum* (24,44%) obtenue dans la présente étude est relativement élevée, sachant que le chat ne représente pas officiellement le réservoir de la pathologie. La leishmaniose du chat domestique (*Feliscatus*) a été décrite pour la première fois en Algérie, chez un chat vivant avec un chien et un enfant tous les deux infectés de leishmaniose (Sergent et al., 1912). Depuis, la leishmaniose féline (*L. Fel*) a été rapportée principalement au tour du bassin méditerranéen (Solano-Gallego et al., 2007).

Dans les études antérieurement réalisées dans la région méditerranéenne, la prévalence de la leishmaniose féline (*L. fel*) a fluctué au-dessous de 10% : 6,7% en Israël (Nasereddin et al., 2008), 3,87% en Grèce (Diakouet al, 2009), 2,8% et 1,3% au nord du Portugal (Cardoso et al., 2010 ; Maia et al., 2010). Ces dernières années, la prévalence de la *L. Fel* est en nette augmentation. Elle est de 20% au Portugal (Maia et al., 2016), de 25,3% en Italy (Spada et al., 2013) et de 28% en Espagne (Martín-Sánchez et al., 2017). Ces différences de prévalence observées sont principalement liées d'une part aux périodes d'investigation séparant les différentes études et la présente étude) et d'autre part au nombre de chats analysés, surtout que la majorité des études sus-citées ont été effectuées au niveau des fourrières canines et félines.

Par rapport à diverses études antérieures, l'originalité de ce travail a consisté au choix de l'espèce animale jusqu'à présent très peu étudiée, au choix d'un grand échantillonnage de chats jusqu'ici non égalé et à l'étude d'une aire de distribution élargie à toutes les daïras du gouvernorat d'Alger (étant donné que la fourrière HURBAL n'a pas de limites géographique). Ces paramètres ont permis de mieux refléter la réalité et d'expliquer la différence observée dans les résultats de prévalence de l'enzootie féline.

Les résultats obtenus peuvent en grande partie s'expliquer par les changements écologiques intervenus ces dernières années dans la région du Grand Alger. L'urbanisation intense, la construction de nouveaux logements sociaux par le

gouvernement ainsi que la construction par la population de nouvelles habitations qui ne répondent pas toujours aux normes (des chalets, des bidonvilles, des habitations précaires), qui se sont implantées autour de la capitale, ont entraîné une détérioration des conditions socio-économiques à la périphérie des villes, une importante dégradation de l'environnement, et une augmentation massive de la population féline errante. La végétation naturelle, progressivement modifiée, a ainsi contribué à créer un milieu favorable à l'émergence et à la multiplication des gîtes de phlébotomes, vecteurs de la maladie et responsables de l'accroissement progressif de la transmission à l'intérieur même de la ville.

Selon Desjeux (2002), l'augmentation de la leishmaniose dite urbaine est déterminée par la pullulation et la prolifération du vecteur et l'apparition de certains facteurs environnementaux secondaires à une urbanisation récentes à la périphérie des grandes villes, comme celle observée en ce moment tout autour d'Alger.

4.8.2-Détection de la maladie et de l'infection

Au cours des enquêtes épidémiologiques, dépister une infection ou bien une parasitose, notamment la leishmaniose, sujet de ce travail, nécessite une méthode permettant de dépister non seulement les cas symptomatiques, mais également les cas asymptomatiques. Les techniques sérologiques, permettant de mettre en évidence les témoins de l'infection, se prêtent très bien à ce genre d'enquête. Parmi les techniques les plus couramment utilisées dans le diagnostic sérologique, l'IFI est considérée comme la méthode de référence recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

La séroprévalence de l'infection observée par IFI dans cette étude est de 18,1%, tandis que celle observée par ELISA est de 21,9%. Ces résultats montrent une plus faible sensibilité de l'IFI par rapport à l'ELISA. Toutefois l'analyse statistique a montré que la concordance entre les deux tests sérologiques était parfaite (87%) et que le niveau de concurrence était de 95%. Ceci indique que la sensibilité du dépistage sérologique d'une infection est améliorée lors d'utilisation conjointe de deux tests sérologiques.

Cette association est fortement recommandée par certains auteurs, et considérée fondamentale au dépistage actif de l'infection surtout dans des zones d'endémie (Mettler et al. 2005 ; Ferreira et al. 2007). Pourtant, malgré la forte sensibilité de l'ELISA, quelques incertitudes existent quant à la positivité de certains sérums, du fait que leur DO est relativement proche du seuil de positivité fixé par les laboratoires et dont la spécificité ne peut être affirmée que par une autre technique. C'est pour cela qu'il est alors nécessaire d'utiliser une autre technique de dépistage, ou mieux une technique de confirmation comme le western-blot. Il en est de même pour les valeurs positives mais au-dessous du seuil de spécificité en IFI. L'utilisation de la technique WB dans de nombreuses études a permis de confirmer ou infirmer le diagnostic (Talmi-Frank et al. 2006; Ferroglia et al. 2007).

Dans cette étude, tous les sérums avec des valeurs douteuses en IFI et en ELISA ont été trouvés positifs par la méthode WB, dans laquelle des antigènes 14 et 16 kDa spécifiques de la leishmaniose ont été identifiés. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Iniesta et al. (2002), Talmi-frank et al (2006) et Ferroglia et al., 2007. Ces derniers ont rapporté que l'intensité des bandes spécifiques 12, 14 et 16 kDa, pourrait correspondre au statut de l'infection : l'apparition des bandes 12 et 14 kDa suggère une infection récente, et au fur et à mesure que l'intensité de la bande 12 kDa diminue ou disparaît, celle de la bande 16 kDa augmente d'intensité. Il s'agit d'une reconnaissance d'antigènes par le système immunitaire évoluant dans le temps. Les auteurs supposent que la présence des bandes 12 et 14 kDa révèle une infection nouvelle, alors que les bandes 14 et 16 kDa témoignent une infection ancienne et/ou persistante, suggérant une expression d'antigènes différents au cours de l'infection. Romero et al., 2015, ont conclu que les tests de diagnostic utilisés dans le dépistage de la L. Fel (IFI, DAT et ELISA) détectent assez bien l'infection, mais ne reflètent pas son véritable statut. Le WB, quant à lui, de par sa grande sensibilité et spécificité, permet de confirmer ou d'infirmer une parasitose lorsque les techniques de dépistage donnent des valeurs limites.

A titre indicatif, on retrouve dans la bibliographie des références sur les différents tests utilisés de notre part et que nous avons jugé utile de présenter afin de les comparer à nos propres résultats.

Tableau 4.5 : Synthèse des sensibilités /spécificités des examens paracliniques

ELISA	Western blot	Deux temps ELISA puis Western blot sur ELISA +	PCR
Sérologie positive dans 30 à 40 % des cas à la phase aiguë en fonction des études et des techniques de sérologie utilisées Sérologie positive dans 60 % des cas si on répète la sérologie 4 à 6 semaines après le début des signes		-*	Sensibilité 65 à 90 % dans les biopsies cutanées Spécificité > 99 %
Sensibilité moyenne 97 % (IC95 % = 94 %-99 %) Spécificité moyenne 95 % (IC95 % = 88 %-98 %)	-*	Sensibilité 100 % Spécificité > 99 %	Sensibilité 65 à 90 % dans les biopsies cutanées Spécificité > 99 %
Sensibilité moyenne 77 % (IC95 % = 67 %-85 %) Spécificité moyenne 92 %	Sensibilité 77 % - 100 % Spécificité moyenne 92 %	-*	Sensibilité 10 à 30 % dans le LCS (mais surtout dans l'atteinte neurologique précoce de borrélioze de Lyme) Spécificité > 99 %
Sensibilité moyenne 96 % Spécificité moyenne 94 %	Sensibilité > 99 %	-*	Sensibilité 50 % dans le liquide articulaire 70 % dans les biopsies synoviales Spécificité > 99 %

Méthodes PCR

-Particulièrement utiles pour les faibles charges parasitaires

-Spécificité de 100%

-Sensibilité améliorée de 20 à 70% par rapport aux techniques parasitologiques conventionnelles Rithner and Dujardin, J. Clin. Microbiol., 2007, 45:21-25

	IFAT	ELISA	PCR
True positives	44	42	41
True positives	44	42	41
False positives	0	1	0
False négatives	1	3	4
Sensitivity	97.78%	93.33%	91.11%
Specificity	100%	99%	100%
Specificity	100%	99%	100%

Camargo JB et al 2010 Results of IFAT, ELISA and PCR, compared with direct parasitological test (gold standard)

Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies by different tests at the study starting point as well as anti-*Ehrlichia canis* antibodies in dogs with or without detectable anti-*L. infantum* antibodies.

Tableau 4.6: comparatif des tests

Test	No. of dogs positive/total no. of dogs tested (%)		
	Anti- <i>Leishmania infantum</i> antibodies	Anti- <i>Ehrlichia canis</i> antibodies ^a	
		L-pos dogs	L-neg dogs
IFAT	79/831 (9.5)	14/79 (17.7)	106/752 (14.1)
ELISA	143/837 (17.1)	38/143 (26.6) ^b	86/694 (12.4) ^b
DS	83/845 (9.8)	14/83 (16.9)	112/762 (14.7)

^a L-pos dogs, dogs with detectable anti-*L. infantum* antibodies; L-neg dogs, dogs without detectable anti-*L. infantum* antibodies.

^b $P < 0.001$.

D. Otranto et al 2009 Toward Diagnosing Leishmania infantum Infection in Asymptomatic Dogs in an Area Where Leishmaniasis Is Endemic_

SE_{rel} and SP_{rel} of IFAT, ELISA, and DS serological tests for Leishmania compared to the results of PCR with skin tissue samples from asymptomatic dogs

samples from asymptomatic dogs

Test	November 2005		March 2006		March 2007	
	SE _{rel} (%)	SP _{rel} (%)	SE _{rel} (%)	SP _{rel} (%)	SE _{rel} (%)	SP _{rel} (%)
ELISA	33 ^{*,§,¶}	95	50 ^{†,‡,§,¶}	95.5	9 ^{¶,}	93
IFI	14 ^{*,**}	99	27 ^{†,**,††}	99	13 ^{††}	92
DS			18 ^{,‡‡}	99	4.5 ^{‡‡}	100

* Equal letters correspond to a significant difference ($P < 0.01$).

Results of three serological tests applied to all 161 cats

IFAT	ELISA	WB	No. of observations
-	-	-	114
-	-	+	11
-	+	-	1
-	+	+	2
+	-	-	9
+	-	+	3
+	+	-	0
+	+	+	21

+, positive test result; -, negative test result

Conversely ELISA Sp (98%) and precision (CI: 94–100%) slightly exceeded that of IFAT (97%; CI: 93–100%).

Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard

Maria Flaminia Persichetti¹, Laia Solano-Gallego², Angela Vullo¹, Marisa Masucci³, Pierre Marty⁴, Pascal 2017

	IFAT		ELISA		WB	
	Median	CI	Median	CI	Median	CI
Sensitivity	0.75	0.61–0.87	0.70	0.56–0.83	0.97	0.86–1.00
Specificity	0.97	0.93–0.99	0.98	0.94–1.00	0.99	0.96–1.00

Abbreviation: CI 0.95 credible interval

Output parameters of the accuracy of the tests with allcats studied. Sample prevalence 0.27; CI = 0.20–0.3

Diagnostic performance of ELISA,IFAT and Western blot for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard .

Maria Flaminia Persichetti¹, Laia, Solano-Gallego², Angela Vullo¹, Marisa Masucci³, Pierre Marty⁴, Pascal 2017

Au cours de la dernière décennie, divers tests de PCR en temps réel ont été développés pour la recherche d'outils appropriés pour la détection de différentes espèces de Leishmania. La RT-PCR, en tant que nouvelle technologie, a révolutionné les diagnostics moléculaires en conciliant fiabilité et rapidité. Elle peut ainsi permettre de poser le diagnostic de leishmaniose avant que le tableau clinique ne soit complet (cas suspects). Les résultats de notre étude montrent une très grande spécificité de la technique (97,87%), permettant de détecter 181 chats positifs sur un total de 185 chats leishmaniens. Cependant la présence de l'ADNkleishmanien ne signifie pas forcément la présence d'une infection active. En outre, il a été démontré que l'ADN kinetoplastique se détruit très rapidement (Prina et al., 2017).

La RT-PCR est un processus d'amplification exponentielle de l'ADNk, cependant, cette technique présente un certain nombre de limitations (Bustin, 2000 ; Hossain et al. 2017):

- La première est que les constituants présents dans le mélange réactionnel sont en quantité finie. Il arrive donc un moment où il n'y a plus assez d'amorces et/ou plus assez de nucléotides (dNTPs) pour que la réaction de synthèse d'ADN puisse continuer à se dérouler de manière exponentielle.
- La seconde est que l'efficacité de la duplication n'est pas toujours totale. Il peut ainsi arriver qu'une proportion faible mais constante des amorces ne s'hybrident pas avec la matrice d'ADN à chaque étape d'hybridation des amorces. Cela peut être dû à une mauvaise conception des amorces, ou bien à un choix de température d'hybridation légèrement trop élevé.

- Etant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage;
- Le mauvais appariement (appareillage), générant souvent des bandes d'ADN superflues observables sur gel d'électrophorèse, peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification;
- L'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié par un amplicon plus long qui fixera davantage de molécules fluorescentes par rapport à un amplicon plus court dans la même réaction.

4.8.3-Rôles des chats asymptomatiques et manifestations cliniques

La notion selon laquelle tous les chats infectés avec *L. infantum* finissent par développer une maladie clinique après une période d'incubation variable a été réfutée par de nombreux auteurs (Ferrer et al. 1989 ; Sideriset coll., 1999 ; Cardoso et al 2010). Maia et al (2010) ont démontré que les chats peuvent rester infectés des années, voire toute leur vie par *L. infantum*, sans développer des signes cliniques apparents. Cependant si la maladie s'installe les chats naturellement infectés, ces derniers ne peuvent récupérer sans traitement antileishmania spécifique, et que l'issue est fatale en peu de temps après l'installation de la maladie (Gramiccia et Gradoni, 2015).

Dans la présente étude, la prévalence de chats infectés asymptomatiques est de 18,67%, alors que chez les chats symptomatiques, la prévalence est de 69,72%. Cela signifie que les chats malades « immunodéficients » sont plus sujets à un développement rapide de la leishmaniose, étant donné que le parasite lui-même se développe au niveau du système immunitaire, profitant ainsi d'une baisse de la défense de l'organisme pour s'exprimer. Certains agents immunosuppresseurs, tels que FIV ou FeLV, ou le stress, peuvent induire un dysfonctionnement immunologique et nuire à la réponse immunitaire cellulaire. Ce qui permet la multiplication et la dissémination viscérale et étendue de ce protozoaire (Spada et al., 2010).

La présence d'infection latente chez les félinés joue un rôle important dans le maintien de la présence à long terme du parasite dans les zones d'endémie (Palatnik-de-Sousa et al., 2011), en particulier dans les régions tempérées, comme le bassin méditerranéen, où le parasite est entretenu par les mammifères, essentiellement au cours d'un hiver long et en absence de phlébotomes. C'est pourquoi les chats asymptomatiques pourraient être considérés comme des réservoirs même accidentels de l'infection à *L. infantum* (Campino, 2002; Maia et al., 2010).

La maladie chez le chien présente un grand polymorphisme clinique ; elle est bien connue et décrite depuis le début du siècle dernier comme étant une maladie à caractère protéiforme (Ferrer, 1999). Cependant, chez le chat, les avis divergent d'un auteur à l'autre et jusqu'à présent aucun symptôme pathognomonique n'a été attribué à la maladie. Dans la présente étude, les signes cliniques les plus fréquemment observés sont : une perte de poids, des lésions cutanées, une lymphadénomégalie (hypertrophie des ganglions lymphatiques), quelques troubles oculaires. Ce profil clinique concorde parfaitement avec celui rapporté dans d'autres zones d'endémie, même si la fréquence des symptômes diffère d'une étude à l'autre (Ozon et al, 1998; Hervás et al, 1999; Poli et al., 2002; Leiva et al., 2005). Environ 30% des chats infectés par *L. infantum* ne présente que des dermatoses (da Silveira Neto et al. 2015). La fréquence des adénopathies, couramment développée par les chiens leishmaniens, varie de 3% chez les chats infectés (Pennisi, 2002).

Il est important aussi de souligner la présence de signes cliniques moins fréquents tels que des troubles nerveux, digestifs, rénaux ; et d'autres plutôt atypiques tels que des lésions génitales, précédemment décrites par Cardoso et al. (2010). Le grand polymorphisme clinique de la *L. Fel* pourrait être dû à la capacité du parasite à profiter d'un état d'immunodépression des chats. Le parasite *Leishmania* a la capacité de survivre à l'intérieur des macrophages, et tout défaut d'activation de ces derniers entraîne l'installation des parasites et favorise le développement de l'infection.

Les chats peuvent donc être des porteurs asymptomatiques (Maia et al. 2008 ; Maia et al., 2010). Par ailleurs, Maroliet al. ont montré en 2007 qu'un chat chroniquement

infecté peut transmettre *Leishmania sp.* à son vecteur principal en Italie (*Phlebotomus perniciosus*). L'espèce féline pourrait donc jouer un rôle de réservoir de *L. infantum* car il y a un haut pourcentage de chats parasitiques et une transmission possible du parasite à son vecteur. La leishmaniose doit donc être incluse dans le diagnostic différentiel des lésions cutanées ulcératives si le chat vit ou a voyagé dans une région endémique.

4.8.4- Facteurs de risque

Les études antérieurement réalisées sur les facteurs de risque associés à : l'âge, le sexe, l'habitat, le style de vie des chats, et autres caractéristiques ne sont pas toujours en accord. La présente étude a démontré que l'âge, le mode de vie du chat et l'état corporel jouaient le rôle de facteurs de risque de la maladie.

Concernant l'âge, nos résultats semblent être similaires à ceux obtenus par Zivincjaket al. (2005) qui ont obtenu une prévalence élevée chez des chats adulte de 3-4 ans. Rondon et al. (2008) ainsi que Miro et al. (2014) et Miranda et al. (2018) ont observé une distribution bimodale de 3-6 ans d'âge et ≥ 7 ans. D'autres études ont rapporté que les chats âgés de plus de 8 ans étaient les plus sensibles à l'infection leishmanienne (Cardoso et al. 2014), tandis que Dantas-Torres et coll. (2006) ont observé que les jeunes chatons (≤ 1 âge) étaient plus touchés. Les âges extrêmes semblent être en faveur d'une plus grande sensibilité à l'infection

Pour le style de vie des chats et leur milieu environnant, le taux de prévalence est plus élevé chez les chats vivant à l'extérieur des maisons (en plein air), dans des régions à dense végétation. Cela suggère que, dans le cas d'une infestation dans des conditions naturelles, la population des chats la plus fréquemment touchée correspond à des chats d'intense activité, vivant à l'extérieur des habitations, dans un environnement à végétation dense, exposant ainsi les chats à un maximum de piqûres d'insectes vecteurs. C'est donc la distribution des Phlébotomes qui délimite les zones à risque. Ces zones seraient plus propices au développement des Phlébotomes vecteurs et par conséquent plus propices à la transmission de l'infection.

En ce qui concerne le sexe, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les mâles et les femelles. De même que pour le sexe, l'habitat du chat et la longueur du poil ne semblent pas représenter de facteurs prédictifs de la maladie. Nos résultats sont similaires aux études précédemment citées.

4.8.5- Typage enzymatique des isolats et importance de l'identification

Tous les isolats obtenus (n = 25) ont été identifiés par analyse des isoenzymes comme *L. infantum*: zymodème MON-1. Ce zymodème prédominant est présent chez le chien dans presque tous les pays bordant la mer Méditerranée : Albanie (Campino, 2002), Algérie (Harrat et coll., 1996), Chypre (Deplazes et coll., 1998), France (Pratlong et coll. , 2004), Grèce (Tzamouranis et coll., 1984), Israël et Autorités palestiniennes (Bulle et coll., 2002), Italie (Gramiccia et coll, 1982), Liban (Nuwayri-Saltiet coll., 1997), Malte (Gradoniet coll., 1991), Maroc (Dereureet coll., 1986), Portugal (Abranches et coll., 1993), Espagne (Pratlonget coll., 1989 ; Gallegoet coll., 2001), Syrie (Dereureet coll., 1991), Tunisie (Maazounet coll., 1981), et en Turquie (OK et coll., 2002). Cependant, très peu d'étude ont concerné le chat. Il s'agit de la première description d'une *L. Fel* causée par ce zymodème en Algérie.

Concernant le chien, en Algérie, Quatre zymodèmes appartenant à *L. infantum* ont été identifiées à ce jour : MON-34 et MON-77 retrouvés en région de Kabylie, qui sont responsables chez l'homme de leishmaniose cutanée et viscérale, respectivement (Harrat et al., 1996) et MON-24 retrouvé chez un chien à la périphérie d'Alger (Benikhlef et al., 2004), et est responsable de la forme cutanée sporadique chez l'homme et le zymodème MON-281 (Ait-Oudhia et al., 2009 ; 2011).

Tout autour du bassin méditerranéen, des zymodèmes autres que *L. infantum* MON-1 ont été occasionnellement isolés des chiens : Egypte : MON-98 (Shehata et al., 1990) ; Italie : MON-72 (Gramiccia et al, 1992) , Maroc : MON-24 (Haralambous, 2007) ; Portugal : MON-98 (Cardoso et al., 2002) ; Espagne : MON-77 (Gallego et al., 2001), MON-105 (Alvar Ezquerro, 1997), MON-108 (Chicharro et al., 2002), et MON-199 (Martin-Sanchez et al., 1999). La présence simultanée de deux zymodèmes MON-1 et MON-77 a bien été démontré chez un chien vivant dans la province de Catalogne, en Espagne (Pratlonget coll., 1989). Tous ces zymodèmes sont communs au chien et à l'homme et sont responsable chez l'homme soit de

leishmaniose viscérale : MON-1 (Belazzoug, 1986), MON-72 (Gramiccia et al, 1992), MON-77 (Harrat et al., 1996), MON-199 (Martin-Sanchez et al., 1999), soit de leishmaniose cutanée : MON-98 (Youssef et al., 1989) et MON-108 (Belhadj et al., 2003), soit des deux MON-24 (Benikhlef et al., 2001 ; Belhadj et al., 2002), à l'exception du zymodème MON-105, qui n'a été retrouvé que chez le chien. C'est vrai que se pose la question de la signification de ces petits variants enzymatiques de *L. infantum*.

4.8.6-Conclusion

Le succès des stratégies de contrôle de la leishmaniose féline requiert une bonne connaissance du taux d'infection chez les chats et la localisation des foyers actifs. La détermination des niveaux d'infection dépend de l'évaluation de plusieurs paramètres :

- le dépistage des chats malades et des chats asymptomatiques
- l'évaluation de la prévalence par l'utilisation de techniques sérologiques très sensibles et spécifiques.
- l'identification du parasite responsable

Les diagnostics récents grâce à des tests tels que ELISA, IFAT et WB ont été comparées chez les chats et les chiens.

La technique WB offrait la meilleure sensibilité et spécificité (Persichetti et al. 2017). Lorsque des tests sérologiques et moléculaires sont utilisés en même temps on peut observer des différences chez le chat comme chez le chien (Foglia Manzillo 2013 ; Pennisi et al. 2015a ; Solano-Gallego et al. 2009). Le manque d'uniformité entre les tests sérologiques et moléculaires peuvent dépendre de leurs résultats et leurs différentes performances (sensibilité et spécificité) ont été évidemment influencées par de nombreux facteurs différents.

L'infection féline et maladie féline associées causée par *L. infantum* est de plus en plus signalée dans les zones d'endémie et présente de nombreuses similitudes avec CanL. Toutefois, les connaissances consolidées fondées sur des données probantes au sujet de FeL n'est toujours pas disponible et nous ne pouvons exclure que des différences importantes entre les chiens et les chats existent. En fait, nous n'en sommes encore qu'à nos premiers balbutiements à ce stade des connaissances sur

la transmission, l'immunopathogénèse, le développement, la gestion et la prévention de la maladie féline et nous faisons en sorte de façon empirique.

- Les rapports de cas publiés de FeL ne sont probablement que la partie minime de l'étude de cas de la maladie. Tous les cas diagnostiqués ne peuvent être qu'une partie de tous les cas qui surviennent.

La présente étude sur la leishmaniose féline vient compléter, en actualisant les données, la connaissance de l'épidémiologie de la leishmaniose féline en Algérie, et plus particulièrement dans la région du Grand Alger. Elle contribue de ce fait autant que faire se peut à une meilleure connaissance de cette parasitose dans la région méditerranéenne même si elle n'est représentative que de la région d'Alger.

Le rôle épidémiologique du chat reste encore à déterminer : hôte occasionnel ou vrai réservoir ?

Bien que les chiens aient été universellement considérés comme les réservoirs domestiques de leishmaniose viscérale zoonotique causée par *L. infantum*, certains chercheurs ont émis des hypothèses que les chats peuvent aussi agir comme hôte réservoir secondaire de leishmaniose plutôt que simplement comme hôte accidentel (Coelho et al. 2011 ; Sobrinho et al. 2012).

Ces dernières années, certaines études concernant la leishmaniose féline ont permis l'hypothèse que les chats, comme la majorité de la population canine vivant dans les zones d'endémie, serait susceptible de contracter une infection à *Leishmania*. Néanmoins, la vraie sensibilité / résistance des chats à *Leishmania* et son rôle de réservoir de la leishmaniose est encore controversé. Certains auteurs soulignent que les chats ont un certain degré de résistance naturelle à l'infection en l'absence d'une maladie immunosuppressive ou d'un état de stress (Poli et al. 2002; Diakou et al. 2009).

Selon Bray (1982), un bon réservoir devrait être en contact étroit avec l'homme par le phlébotome, il devrait être sensible à l'agent pathogène et il devrait le rendre disponible au vecteur en quantité suffisante pour provoquer une infection. L'infection

doit présenter une évolution chronique permettant à l'animal de survivre au moins jusqu'à la prochaine saison de transmission.

Toutes ces données, prises ensemble, nous permettent de suggérer que les chats peuvent agir comme hôte réservoir alternatif de *L. infantum* plutôt qu'un hôte accidentel car, au même titre que les chiens, ils peuvent être infectés par *Leishmania* et ne pas développer la maladie; présenter le parasite dans le sang périphérique; ils sont une source potentielle de transmission à des vecteurs compétents et sont en contact quasi permanent avec l'homme. (Gramiccia et Gradoni, 2005).

CONCLUSION

Lors de notre étude, la bibliographie a montré que le chat est une espèce réceptive dans beaucoup de cas à la leishmaniose.

Des questions restent toutefois posées quant à cette réceptivité et aux facteurs de cette dernière ?

Peut-on rejeter l'hypothèse selon laquelle le chat constitue un réservoir accessoire ou autre à la propagation (surtout en zone d'endémie) de cette pathologie ? Quel est le véritable rôle de cette espèce ? L'importance de ce réservoir n'a-t-elle pas pu être encore mal mesurée ?

Le questionnaire distribué par nos soins aux vétérinaires praticiens semble affirmer l'inexistence de cas de leishmaniose féline dans la région d'Alger, ce constat est pour notre part à mettre sur le compte non seulement de la rareté des cas de leishmaniose féline mais aussi sur une méconnaissance clinique de la maladie et surtout en faveur d'un sous diagnostic fréquent.

La leishmaniose féline devrait à notre sens être à chaque fois suspectée, surtout en zone d'endémie, face à des chats présentant des lésions évocatrices de la pathologie notamment des nodules et des ulcères surtout localisés à la face.

Notre travail a permis de découvrir 18 chats séropositifs à la leishmaniose grâce au kit de diagnostic rapide « Witness leishmania » sur la cinquantaine qui constituait l'échantillon, cette découverte laisse supposer un contact entre ces chats errants et les leishmanies dans la région étudiée.

Le diagnostic de la leishmaniose féline est complexe, d'autant que la méthode utilisée lors de notre étude ne permet qu'une suspicion de la maladie. Ce travail s'est donc poursuivi en utilisant des méthodes de diagnostic sérologiques plus performantes telles que ELISA ,IFI , WB et la recherche du zymodème grâce à la technique PCR et ce dans le but d'affiner le diagnostic ,ces techniques ont permis de mettre en évidence une séropositivité chez les chats ayant fait l'objet de l'étude et surtout l'existence pour la première fois en Algérie d'un zymodème MON-1 ce qui n'est pas sans présenter un intérêt en médecine vétérinaire compte tenu de l'importance de la maladie, mais également en médecine humaine sachant que la

leishmaniose est une zoonose grave prenant de plus en plus d'ampleur dans notre pays l'Algérie et ouvrant des perspectives de recherches sur de nouveaux réservoirs potentiels de la maladie en dehors du chien officiellement reconnu comme tel .

RECOMMANDATIONS

A l'issue de ce modeste travail qui s'est avéré être une source d'enseignements divers et riches dans le vaste domaine de ce que l'on pourrait qualifier aujourd'hui de « leishmaniologie » tant la pathologie prend de l'ampleur à l'échelle mondiale et surtout en zone d'endémie qu'elle en devient une des préoccupations majeures d'organisations telle que l'OMS (organisation mondiale de la santé) ,nous souhaiterions proposer en toute modestie quelques recommandations à l'attention d'abord des vétérinaires praticiens qui sont confrontés à cet épineux problème devenu de santé publique ,puis aux laboratoires qui sont l'élément incontournable pour le diagnostic de la pathologie et enfin à l'université antre du savoir .

Toutes les publications et les travaux menés sur la leishmaniose s'accordent à révéler que cette pathologie en Algérie et ailleurs a pour principal réservoir le chien domestique ,nous recommandons à l'issue de nôtre étude de diversifier les axes de recherche en axant le travail sur d'autres sources du parasite chez d'autres espèces qui sont restées jusque-là insoupçonnées voire totalement ignorées ;le chat jusqu'à ce jour n'a jamais fait l'objet de travaux dans ce sens ,nous sommes certains que d'autres espèces peuvent avoir aussi un intérêt (rongeurs etc.)

Ces espèces peuvent selon la littérature héberger le parasite et constituer ainsi un réservoir non négligeable créant ainsi une diversité de porteurs, le chat se retrouvant ainsi un « suspect » pour le vétérinaire praticien dans le portage de la leishmaniose quand bien même celui-ci ne serait que réservoir accessoire, des lésions de type ulcération ou nodule surtout au niveau de la tête devraient faire suspecter la pathologie et exiger un suivi plus rigoureux notamment sérologique.

La seconde recommandation est à l'attention des laboratoires tels que l'IPA (institut Pasteur d'Alger)spécialisés dans le dépistage sérologique de la leishmaniose ,ils devraient à notre sens disposer de tous les moyens susceptibles de leur permettre le diagnostic de la maladie tels que les immunoglobulines antileishmaniennes pour toutes les espèces autres que l'homme et le chien ,des kits de diagnostic rapide devraient être aussi testés ,homologués et vulgarisés par leurs soins pour permettre une meilleure prise en charge de la zoonose .

L'université et spécialement l'institut des sciences vétérinaires (ISV) de Blida ,nous recommandons l'élaboration d'une base de données relative à la leishmaniose par le biais de travaux de PFE (projet de fin d'études) ,de Magister et autres sur toutes les espèces autres que le chien capables de par la bibliographie d'être des sources du parasite ,ces travaux pourraient ne pas être cantonnés aux espèces domestiques mais s'élargir aussi à la faune sauvage vu la diversité de cette dernière et la proximité d'un parc national(PNC) .

Enfin, les travaux menés devraient utiliser des outils de diagnostic encore plus performants notamment grâce à la biologie moléculaire avec des méthodes telles que la PCR (polymérase chain reaction) ou le Western Blot dont devrait être équipé le laboratoire de biotechnologies du département vétérinaire afin de mieux identifier l'agent causal.

APPENDICE A.

Liste des symboles

CN : chien

CT : chat

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

RT-PCR: real time polymerase chain reaction

WB : western blot

IFI : immunofluorescence indirecte

L : leishmania

P : phlebotomus

MON : Montpellier

al : collaborateurs

ADN : acide désoxyribo nucléique

ARN : acide ribo nucléique

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Ig : immunoglobuline

CD T : lymphocyte T

IL : lymphocyte B

FLG : formol leuco géification

°C : degré Celsius

FIV : Feline Immunodeficiency Virus

FeLV : Feline Leukemia Virus

**APPENDICE B –
Leishmaniose canine : Expression clinique**

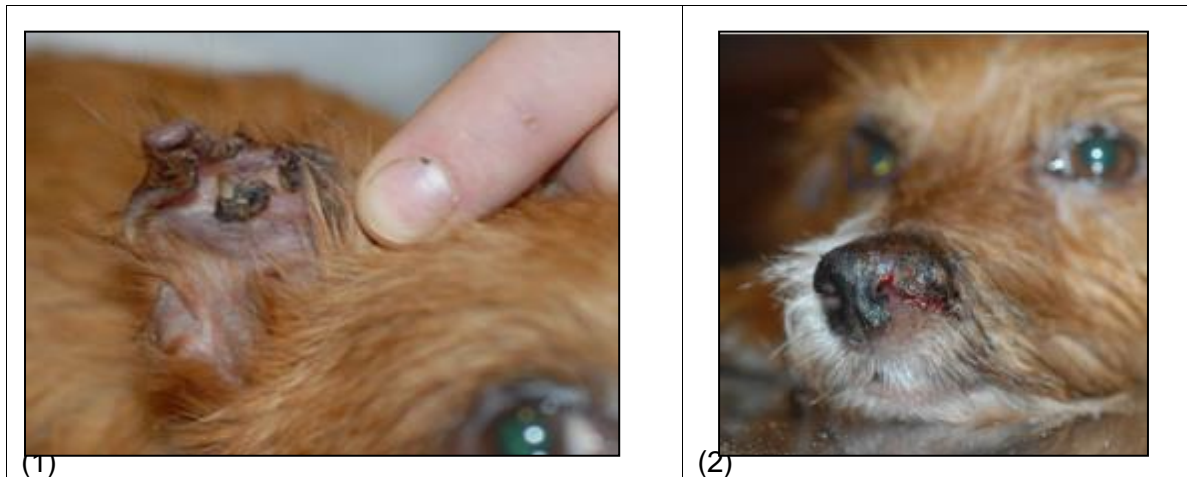


Figure 5 : Lésions dermatologiques du pavillon auriculaire (1) et de la truffe (2) chez un chien leishmanien (laboratoire de parasitologie, ENVA)[113]



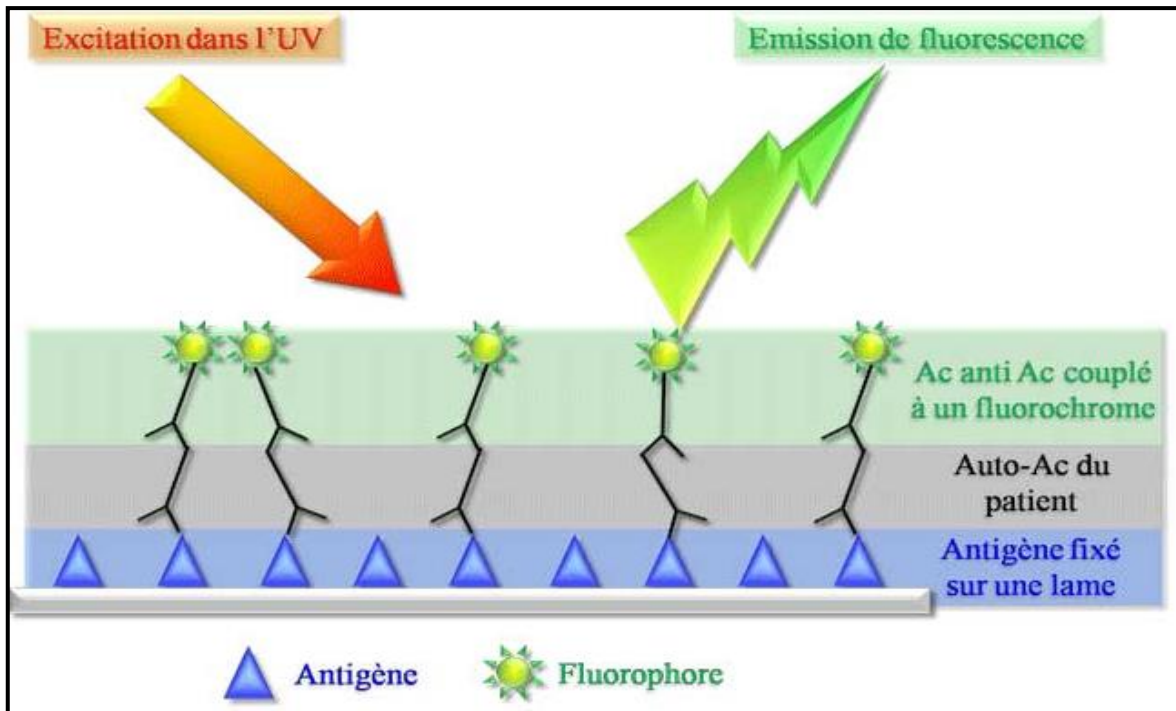
Figure 6 - Cachexie chez un Dogue Allemand leishmanien (Laboratoire de parasitologie, ENVL) [113]

APPENDICE C

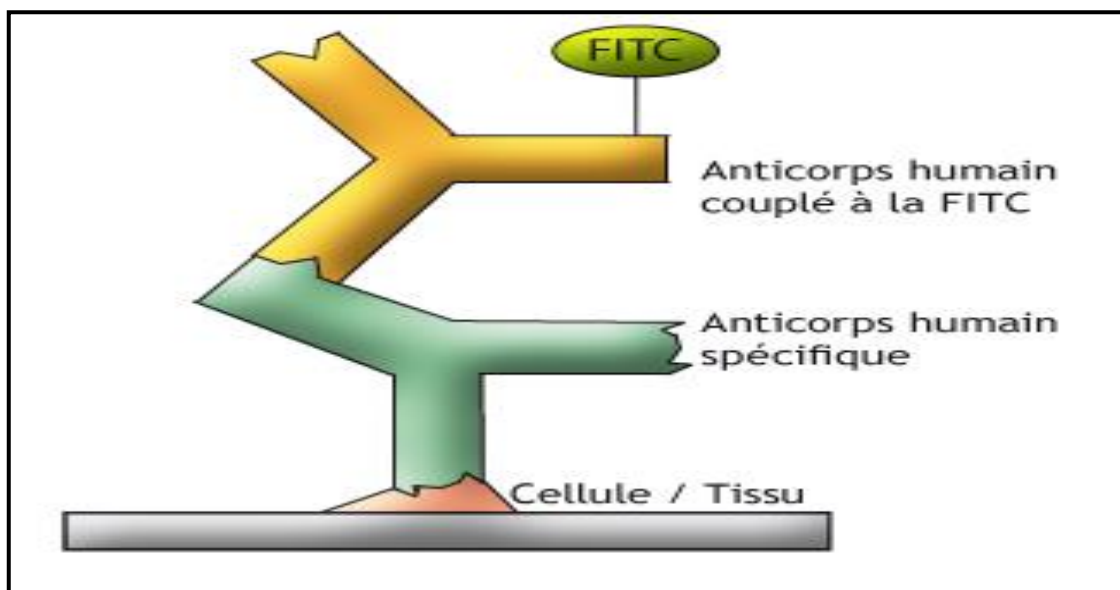
Principe de la technique IFI [77]

L'IFI repose sur la mise en évidence de complexes Ag-Ac grâce au marquage des réactifs immunologiques (Ag) par une substance fluorescente ;

Les Ac recherchés dans le sérum sont fixés sur l'antigène lui-même fixé sur une lame puis mis en évidence par l'ajout d'anti-gamma globulines spécifiques d'espèce marquées par un fluorochrome



Principe du test IFI [77].

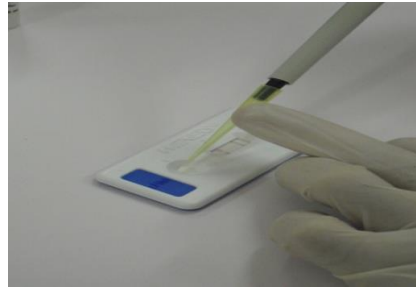


APPENDICE D :

Mode opératoire technique Witness leishmania (photos personnelles)



1/ Prélever 10 μ l de sérum



2/ Placer les 10 μ l dans le puits

















3/ Ajouter 4 gouttes de solution tampon



4/ Lire le résultat

APPENDICE E

Mode opératoire pour la technique manuelle en IFI : TITERPLANE

	<p>Lames avec BIOCHIPS</p> 	<p>Support de réactifs (TITERPLANE), sur son portoir en polystyrène</p> 			
1	Incubation avec les échantillons	 <p>Pipetage des échantillons dilués</p>	<p>volume variable selon la dimension des puits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 25 µl par puits (5 x 5 mm) • 70 µl par puits (9 x 7 mm) 	 <p>Dépôt de la lame à l'envers sur le TITERPLANE</p>	 <p>Incubation (30 min)</p>
2	Lavage au PBS-Tween	 <p>Rincer 1 sec.</p>		 <p>5 min. dans le bac de lavage</p>	
3	Incubation avec le conjugué	 <p>Pipetage du conjugué couplé à la FITC</p>	<p>volume variable selon la dimension des puits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl par puits (5 x 5 mm) • 60 µl par puits (9 x 7 mm) 	 <p>Dépôt de la lame à l'envers sur le TITERPLANE</p>	 <p>Incubation (30 min)</p>
4	Lavage au PBS-Tween	 <p>Rincer 1 sec.</p>		 <p>5 min. dans le bac de lavage</p>	
5	Inclusion et observation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dépôt de la lamelle couvre-objet sur le portoir en polystyrène du TITERPLANE 2. Dépôt du milieu d'inclusion (glycérine) sur la lamelle 	<p>volume variable selon la dimension des puits :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl par puits (5 x 5 mm) • 20 µl par puits (9 x 7 mm) 	 <p>Inclusion par dépôt de la lame incubée sur la lamelle</p>	 <p>Évaluation: lecture de fluorescence sous microscope.</p>
<p><i>NB : dans le cas de l'automatisation de l'IFI, les lames sont techniques à l'endroit de façon « traditionnelle ».</i></p>					

APPENDICE F

- Statistiques descriptives pour les chats :

All Groups Descriptive Statistics (Chats.sta)						
Variable	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Age	50	30,96000	12,00000	120,0000	18,15687	2,567769

Sexe=Mâle Descriptive Statistics (Chats.sta)						
Variable	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Age	26	34,61538	12,00000	120,0000	21,81940	4,279136

Sexe=Femelle Descriptive Statistics (Chats.sta)						
Variable	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.	Standard Error
Age	24	27,00000	12,00000	48,00000	12,38512	2,528103

- Fréquences : Race

Frequency table: Race (Chats.sta)				
Category	Count	Cumulative Count	Percent	Cumulative Percent
Commune	50	50	100,0000	100,0000
Missing	0	50	0,0000	100,0000

- Sexe

Frequency table: Sexe (Chats.sta)				
Category	Count	Cumulative Count	Percent	Cumulative Percent
Mâle	26	26	52,00000	52,0000
Femelle	24	50	48,00000	100,0000
Missing	0	50	0,00000	100,0000

Valeur	Erreur standard	Khi ² de Wald	Pr > Khi ²	Odds ratio	Odds ratio Borne inf. (95%)	Odds ratio Borne sup. (95%)
1,790	0,262	46,555	< 0,0001	5,987	3,581	10,011
0,579	0,576	1,010	0,315	1,784	0,577	5,517
1,696	0,212	64,262	< 0,0001	5,450	3,600	8,249
-0,543	0,217	6,252	0,012	0,581	0,380	0,889
-0,285	0,163	3,039	0,081	0,752	0,546	1,036
-0,798	0,284	7,875	0,005	0,450	0,258	0,786
2,218	0,325	46,611	< 0,0001	9,189	4,861	17,371
0,417	0,421	0,984	0,321	1,518	0,666	3,460
0,570	0,457	1,554	0,213	1,768	0,722	4,329
1,102	0,320	11,855	0,001	3,011	1,608	5,639

MODELE FINAL						
Source	Erreur standard	Khi ² de Wald	Pr > Khi ²	Odds ratio	Odds ratio Borne inf. (95%)	Odds ratio Borne sup. (95%)
Age-J	0,298	5,642	0,018	0,493	0,275	0,884
Sexe-M	0,178	1,904	0,168	0,782	0,552	1,109
STYLE DE VIE-ER	0,237	3,292	0,070	0,651	0,409	1,035
ETAT CORPOREL-1	0,260	15,079	0,000	2,744	1,649	4,568
LESIONS CUTANEEES-1	0,315	8,915	0,003	2,562	1,382	4,750
Lymphadenopathy-1	0,364	14,363	0,000	3,980	1,948	8,130

APPENDICE G

Photos de chiens et chats retrouvés à la fourrière

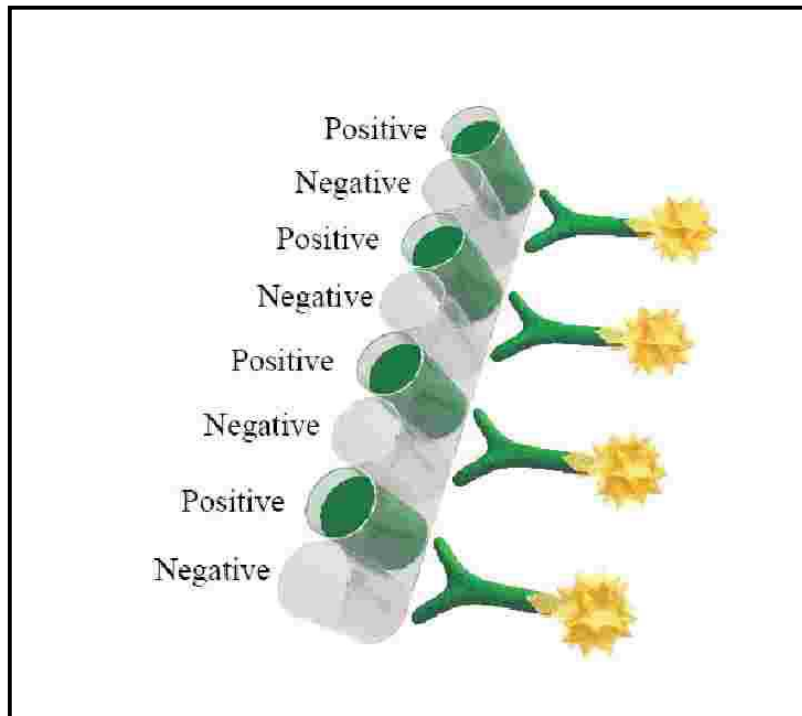




Chats testés (photos personnelles).

APPENDICE H

Procédure ELISA



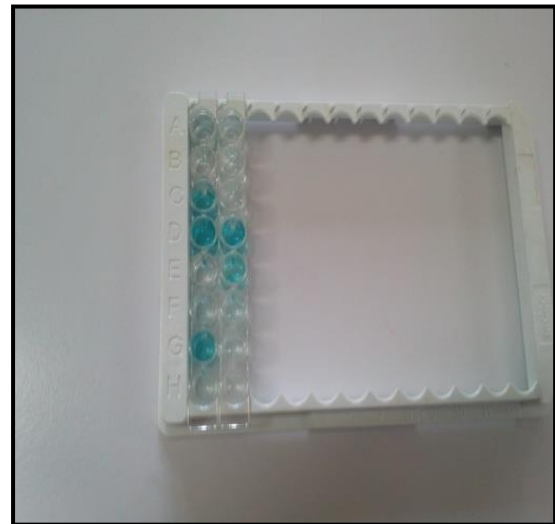
1. Bring all the reagents at 21°C +/- 3°C at least half an hour before use.
2. Dilute the concentrated washing solution 20 fold in distilled water. Be sure that all crystals have disappeared before dilution.
3. Dilute the concentrated dilution buffer 5 fold in distilled water.
4. Keep these solutions between +2°C and +8°C when not used.
5. Dilute faecal samples volume per volume into dilution buffer prepared as instructed in step 2.
6. This is a qualitative dilution only, which must allow the pipetting of faecal suspensions. Discard any gruds by natural decantation for about 10 minutes. Do not centrifuge the suspensions.

7. Add 100- μ l aliquots of the diluted samples to the wells as follows: sample 1 in wells A1 and B1, sample 2 in wells C1 and D1, etc. Proceed in the same manner for the positive reference (ex.: G1 and H1).
8. Incubate the plate at 21°C +/- 3°C for 1 hour. Cover the plate with a lid.
9. Rinse the plate with the washing solution, prepared as instructed in step 2, as follows: empty the microplate of its contents by flipping it over sharply over a sink. Tap the microplate upside down against a piece of clean absorbent paper to remove all the liquid. Fill all the used wells with the washing solution
10. using a spray bottle or by plunging the plate in a vessel of the right dimensions, then empty the wells once more by turning the plate over above a sink. Repeat the entire operation two more times, taking care to avoid the formation of bubbles in the microwells. After the plate has been washed three times proceed to the next step.
11. Distribute the conjugate solution at the rate of 100 μ l per well. Incubate at 21°C +/- 3°C for 1 hour. Cover the plate with a lid.
12. Wash the plate as described in step 6 above
13. Add 100 μ l of the chromogen solution to each well on the plate. The chromogen solution must be absolutely colourless when it is pipetted into the wells. If a blue colour is visible, this means that the solution in the pipette has been contaminated.
14. Incubate for 10 minutes at 21°C +/- 3°C and away from the light. Do not cover. This time is given as a guideline only, for in some circumstances it may be useful to lengthen or shorten the incubation time.
15. Add 50 μ l of stop solution per microwell.
16. Read the optical densities in the microwells using a plate reader and a 450 nm filter. Results must be read fairly soon after the stopping solution has been added since the chromogen may crystallize in wells with strong signals and distort the results accordingly.
17. Calculate the net optical density for each sample by subtracting from the reading for each sample well the optical density of the corresponding negative control.
18. Proceed in the same way for the positive control antigens.

19. The test is validated only if the positive control antigens yield a difference in optical density at 10 minutes
20. that is greater than the values given on the QC data sheet.
21. Divide each resulting value by the corresponding value obtained for the corresponding positive control and
22. multiply this result by 100 to express it as a percentage.

23. $\Delta OD_{spl} * 100$
24. Val = -----
25. ΔOD_{pos}

26. using the first table in the quality control procedure, determine each sample's status (positive, negative).



Test ELISA.

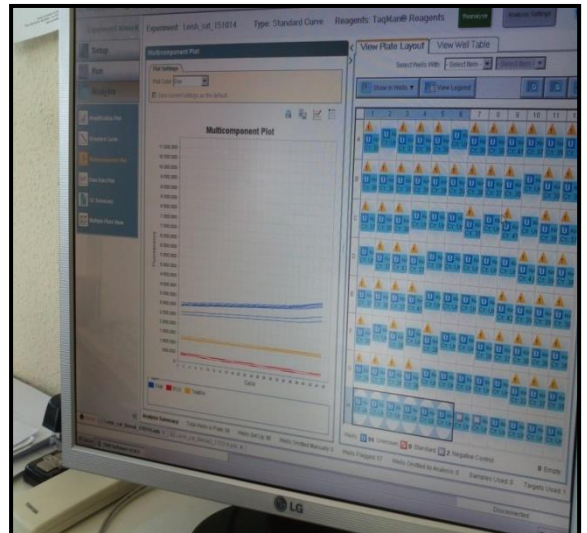
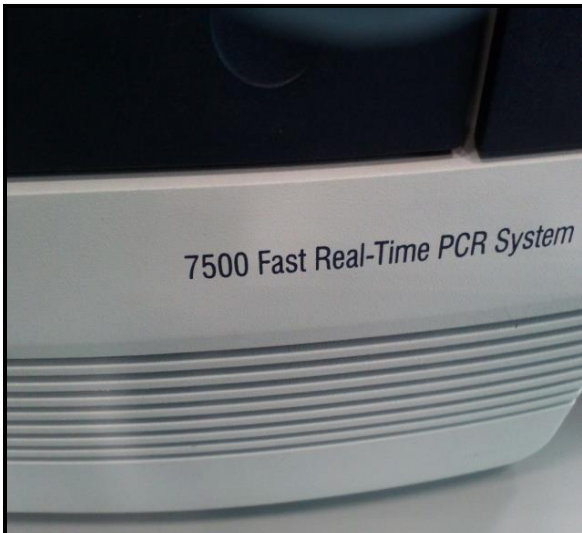
APPENDICE I

Test q PCR



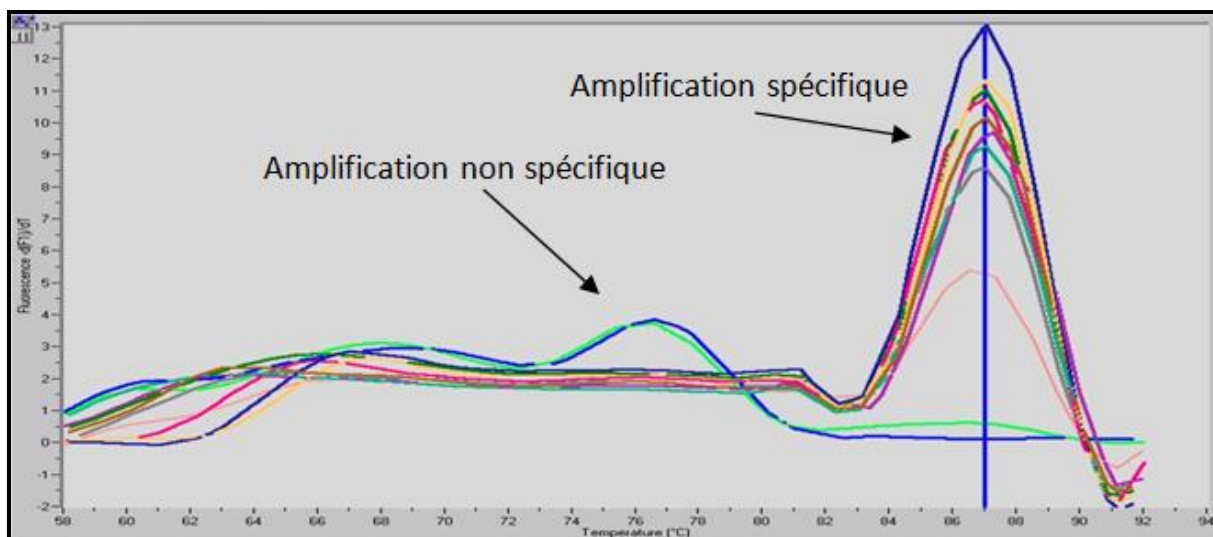
pool_ID	ng_ul	1000_ng	H2O_24	vol_DNA	vol_H2O
5	325.5	3	21	6	42
20	272.9	4	20	7	41
17	220.2	5	19	9	39
15	177.6	6	18	11	37
19	169.3	6	18	12	36
8	141.5	7	17	14	34
16	132.8	8	16	8	16
4	131	8	16	8	16
6	121.7	8	16	8	16
21	100.5	10	14	10	14
10	97.2	10	14	10	14
11	96.2	10	14	10	14
9	94.6	11	13	11	13
14	63.8	16	8	16	8
1	60.8	16	8	16	8
18	59.6	17	7	17	7
7	56.6	18	6	18	6
12	54.8	18	6	18	6
13	54.4	18	6	18	6
2	31.7	32	-8	24	0
3	9.6	104	-80	24	0

Extraction de l'ADN (photos personnelles)

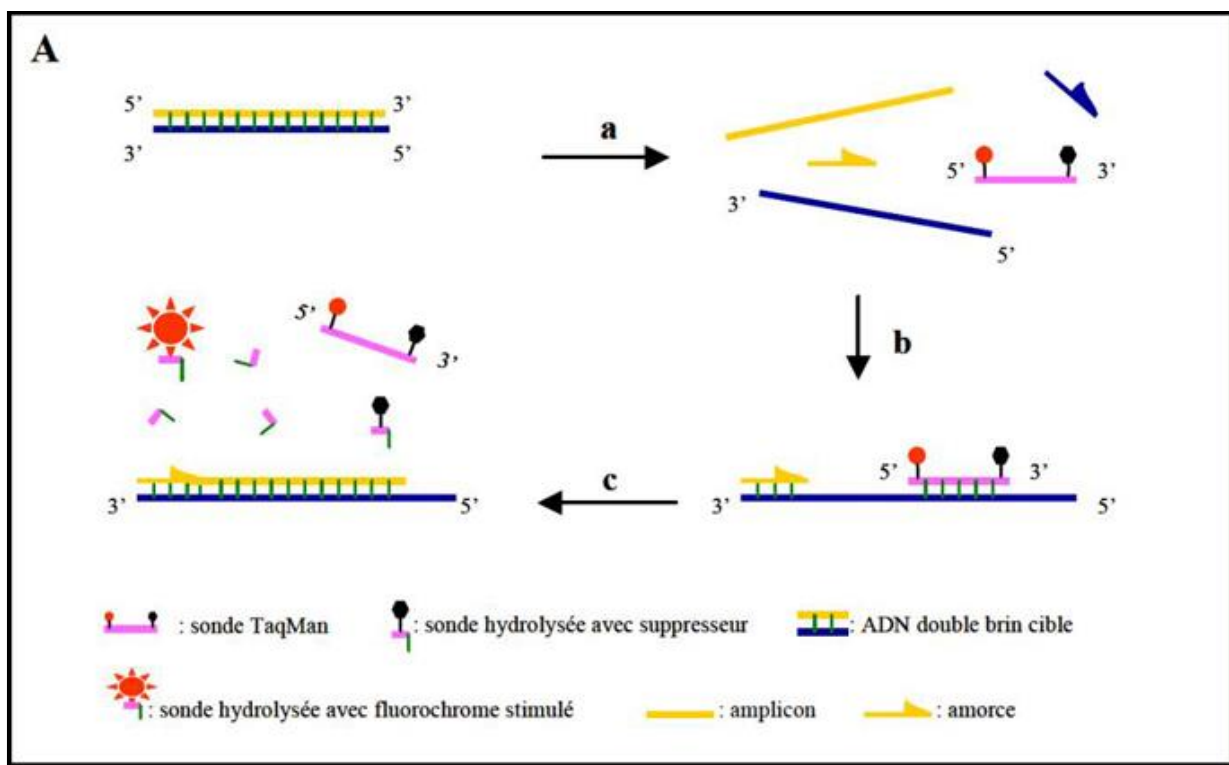


Test q PCR (photos personnelles)

- Signification de la qPCR



Température °CTm = 87°C



Représentation schématique du principe de la méthode Taqman®

APPENDICE J
FICHE DE RENSEIGNEMENTS

(Fourrière HURBAL Alger)

Date :.....

Identification :.....

Espèce :.....

Race :.....

Sexe :.....

Age (approximatif) :.....

Nature du prélèvement :.....

Lésions
observées :.....

.....

.....

.....

.....

QUESTIONNAIRE

I - IDENTIFICATION

IDENTIFICATION DU CABINET

Nom du vétérinaire :

Prénom :

Adresse :

Ville :..... Tél :.....

email :.....

IDENTIFICATION DU REpondant

1/Etes-vous :

Généraliste Spécialiste

2/Quelle est votre activité dominante ?

Canine Rurale Mixte Autre

3/ Pendant l'année 2009 combien de cas de leishmaniose avez-vous eu en consultation ?

.....

4/ Parmi ces cas combien étaient nouveaux ?

.....

5/ Parmi ces cas, y a-t-il eu des chats suspects d'atteinte de leishmaniose ?

Oui Non

Si oui, sur quelle base ?

.....

6/ Combien de cas avez-vous traité ?

.....
7/ Considérez-vous que ces cas étaient issus d'une zone d'enzootie.

Oui Non

II - DIAGNOSTIC

1 - Démarche diagnostique

8 / Utilisez-vous des méthodes de diagnostic : « souvent », « parfois » ou « jamais » ?

Souvent Parfois Jamais

- Clinique seule
- Epidémiologie seule
- Laboratoire seul
- Clinique + épidémiologie
- Clinique + laboratoire
- Epidémiologie + laboratoire
- Clinique + épidémiologie +laboratoire

2 - Diagnostic clinique

9/ Quels sont les symptômes dont vous tenez compte ? (cocher la ou les réponses possibles)

- Baisse de forme
- Onychogryphose
- Amaigrissement
- Splénomégalie
- Fièvre
- Lésions oculaires
- Lésions cutanées
- Troubles digestifs
- Alopécie
- Epistaxis
- Squamosis
- Anémie
- Adénopathie
- Autre, précisez :

10/Confirmez-vous systématiquement le diagnostic clinique par un examen de laboratoire?

Oui Non

11/ Pour le diagnostic épidémiologique tenez-vous compte des facteurs suivants :

	OUI	NON
Lieu de vie		
Mode de vie		
Age		
Race		

12/Avez-vous recours au diagnostic de laboratoire en l'absence de signes cliniques ?

Oui Non

13) Lorsque vous avez recours au laboratoire, faites-vous appel aux techniques de visualisation directe?

Oui Non

14/ Si oui, lesquelles :

- Ponction médullaire
- Calques cutanés
- Ponction ganglionnaire
- Frottis
- Autre, préciser...

15/ Lorsque vous avez recours au laboratoire, faites-vous appel aux techniques indirectes (sérologie) ?

Oui Non

16/ Utilisez-vous un laboratoire extérieur à votre cabinet ?

Oui Non

17/ Pratiquez-vous des tests au cabinet ?

Oui Non
18/ Si oui, lesquels ?

.....
.....
.....

19) Dans quel(s) cas traitez-vous ?

- Symptômes seuls
- Symptômes + environnement
- Test positif seul
- Symptômes + test positif
- En prévention

20/ Dans quel(s) cas ne traitez-vous pas et pourquoi ?

.....
.....

III – CONDUITE THERAPEUTIQUE

21/ Quel(s) protocole(s) utilisez-vous et dans quel cas?

Produit	Principe Actif	Dose	Fréquence	Durée

Suivi du traitement

22/ Utilisez-vous des paramètres de suivi de l'efficacité ?

Oui Non

23) Si oui, avec quel(s) moyen(s) ?

- Clinique - Laborato

24/ Souhaiteriez-vous avoir d'autres moyens de suivi du traitement ?

Oui

Non

25/ Si oui, lesquels ?.....

Arrêt du traitement

26 / Arrêtez-vous le traitement ?

Oui

Non

27/ Si oui, sur quels critères ?

.....

OBSERVATIONS PARTICULIERES

References bibliographiques

1. Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp.Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (5), 305–318.).
2. Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet.Parasitol.* 199(3–4), 264–267
3. Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet. Parasitol.* 202 (3–4), 119–127
4. Diakou, A., Papadopoulos, E., Lazarides, K., 2009. Specific anti-*Leishmania* spp. Antibodies in stray cats in Greece. *J. Feline Med. Surg.* 11, 728–730
5. Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145 (3–4), 267–273
6. Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A., 2014. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis. *Parasit.Vectors* 7, 112.).
7. Maia, C., Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 27, 341–344.).
8. Chatzis, M.K., Andreadou, M., Leontides, L., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Koutinas, A.F., Rallis, T., Ikonopoulou, J., Saridomichelakis, M.N., 2014a. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissue of clinically normal and sick cats. *Vet. Parasitol.* 202, 217–225.
9. Coelho, W.M., Lima, V.M., Amarante, A.F., Langoni, H., Pereira, V.B., Abdelnour, A., Bresciani, K.D., 2010. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 256–258
10. Hatam, G.R., Adnani, S.J., Asgari, Q., Fallah, E., Motazedian, M.H., Sadjjadi, S.M., Srkari, B., 2010. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 313–316
11. Maia, C., Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 27, 341–344

12. Mohebalı, M., Malmasi, A., Khodabakhsh, M., Zarei, Z., Akhoundi, B., Hajjarian, H., Azarm, A., 2017. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: the role of cats in endemic areas of visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 9, 116.
13. Chatzis, M.K., Leontides, L., Athanasiou, L.V., Papadopoulos, E., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Rallis, T., Koutinas, A.F., Andreadou, M., Ikonopoulou, J., Saridomichelakis, M.N., 2014b. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp. Parasitol.* 147, 54–59.
14. A., Papadopoulos, E., Lazarides, K., 2009. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J. Feline Med. Surg.* 11, 728–730.
15. Maia et al. Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L., 2010. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet. Parasitol.* 174, 336–340
16. Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 352–357
17. Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A., 2014. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit. Vectors* 7, 112.
18. Ayllon, T., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., Sainz, A., 2008. Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 361–364.
19. Chatzis et al. Coelho et al, 2011 Coelho, W.M., Richini-Pereira, V.B., Langoni, H., Bresciani, K.D., 2011. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina municipality, São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 176, 281–282 Diakou et al, 2009 ; Maia et al, 2010 ; Martín-Sánchez et al, 2007 ; Millán et al, 2011 ; Miró et al, 2014 ; Mohebalı et al, 2017.
20. Nasereddin, A., Salant, H., Abdeen, Z., 2008. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet. Parasitol.* 158, 364–369
21. Pennisi et al, Pennisi, M.G., Maxia, L., Vitale, F., Masucci, M., Borruto, G., Caracappa, S., 2000. Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 54, 215–216.
22. Poli et al, Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Mancianti, F., 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* 106, 181–191.
23. Sherry et al, Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2011. A serological

- and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11 (3), 239–245
24. Tabar et al, Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2008. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.* 151(2–4), 332–336
 25. Vides et al, Vides, J.P., Schwardt, T.F., Sobrinho, L.S., Marinho, M., Laurenti, M.D., Biondo, A.W., Leutenegger, C., Marcondes, M., 2011. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 178, 22–28.
 26. Vilhena et al, Vilhena, H., Martinez-Díaz, V.L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., Silvestre-Ferreira, A.C., 2013. Feline vector-borne pathogens in the north and Centre of Portugal. *Parasit. Vectors* 6, 99.
 27. Vita et al, Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E., Luciani, A., 2005. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.* 29(Suppl. 2), 319–321.
 28. Pennisi, Pennisi, M.G., 2015. Leishmaniasis of companion animals in Europe: an update. *Vet. Parasitol.* 208, 35–47.
 29. Sergent, E.D., E.T. Sergent, J. Lombard, et al. 1912. La leishmaniose à Alger: infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull. Soc. Pathol. Exotique* 5: 93–98
 30. Kirkpatrick, C.E., J.P. Farrell & M.H. Goldschmidt. 1984. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp. Parasitol.* 58: 125–131.
 31. Maroli, M., M.G. Pennisi, T. Di Muccio, et al. 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 145: 357–360.
 32. Solano-Gallego, L., F. Quintana & L. Iniesta. 2003. A serosurvey of feline leishmaniasis in north-east Spain. *Proc. Am. Cong. Vet. Int. Med.* 423–424.
 33. Martín-Sánchez, J., C. Acedo, M. Muñoz-Pérez, et al. 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145: 267–273.
 34. Baneth, G. 2006. Leishmaniasis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. C.E. Greene, Ed.: 685–698. WB Saunders. Philadelphia, PA
 35. Ondovilla, A.G. 1933. Un chat infecté par *Leishmania* en Espagne. *Trabajos.* 2: 26–27.
 36. Hervás, J., F. Chacón-Manrique De Lara, M.A. Sanchez-Isarria, et al. 1999. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *J. Feline Med. Surg.* 1: 101–105.
 37. Leiva, M., A. Lloret, T. Pena, et al. 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet. Ophthalmol.* 8: 71–75
 37. Rüfenacht et al, Rüfenacht S, Sager H, Müller N, et al. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet Rec* 2005; 156: 542–545

38. Richter et al, Richter M, Schaarschmidt-Kiener D, Krudewig C. Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2014;156:289–94.
39. Pennisi et al, Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, et al. LeishVet update Andrecommendations on feline leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2015; 8: 302
40. Maia et al, Maia C, Sousa C, Ramos C, et al. First case of leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with 2015a concurrent nasal squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg Open Rep* 2015; 1 (2)
41. Basso et al,; Basso, M.A., Marques, C., Santos, M., Duarte, A., Pissarra, H., Carreira, L.M., Gomes, L., Valério-Bolas, A., Tavares, L., Santos-Gomes, G., Pereira da Fonseca, I., 2016. Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. *J. Feline Med. Surg. Open Rep.* 2
42. Pimenta et al. Pimenta, P., Alves-Pimenta, S., Barros, J., Barbosa, P., Rodrigues, A., Pereira, M.J., Maltez, L., Gama, A., Cristóvão, J.M., Campino, L., Maia, C., Cardoso, L., 2015. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Vet. Parasitology Reg. Stud. Rep.* 1–2, 65–69.
43. Cantacessi et al. Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M.J., Otranto, D., 2015. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitology* 31, 100–108.
44. Bussi ras. J ; Chermette. R. « Parasitologie vétérinaire ». Fascicule 4. Entomologie. Polycopié. ENVA, Service de Parasitologie. 163p. (1991)
45. Handman E. “Leishmania virulence: it’s a knock out !” *Trends Parasitol*, 17(2) : 60. (2001).
46. Desjeux. P « La lutte contre les maladies tropicales: la leishmaniose », *Revue de l’OMS*, Genève, 53 p. . (1993).
47. Berenguer. J., Gomez-Campdera. F., Padilla. B., Rodriguezferrero. M., Anaya. F., Moreno. S., Valderrabano. F. “Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) in transplant recipients: case report and review. *Transplant.*, 65(10), 1401-1404. (1998).
48. Cruz. I., Nieto. J., Moreno. J., Canavat. C., Desjeux. P., Alvar. J. “Leishmania/HIV co-infections in the second decade”. *Indian J. Med. Res*, 123,357-388. . (2006).
49. Molina. R., Lohse. J. M., Pulido. F., Laguna. F., Lopez-Velez. R., Alvar J. “Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(1),51-53. (1999).
50. Bettini S., Gradoni L., “Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis”. *Insect. Sci. Applic.*, 7 : 241-245. (1986).
51. Rioux J.A., Golvan Y.J. « Epidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France ». Monographie de l’institut national de la santé et de la recherche médicale n 37. (1969).

52. Dunan S., Mary C., Garbe L., Breton Y., Olivon B., Ferrey P. , Cabassu J.P.
« A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la région marseillaise ». Bull. Soc. Fr. Parasitol., 7 : 17-20. (1989).
53. Kirkpatrick C.E., Farrell J.P. ,Goldschmit M.H.” Leishmania chagasi and L.Donovani : experimental infections in domestic cats”. Exp. Parasitol., 58 : 125-131. (1984).
54. Morillas-Marquez F., Benavides Delgado I., Gonzalez Castro J., Reyes Magana A. Valero Lopez A. « Découverte de Leishmania sp. dans des Rattus rattus de la Province de Grenade (Espagne) ». Annls Parasi. hum. comp., 60 : 768-770.(1985).
55. Bonfante-Garrido. R., Urdaneta.I., Urdaneta.R.,Daneta. R., Alvarado. J, “Natural infection of cats with Leishmania in Barquisimeto, Venezuela” .Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 85, (1), 53. (1991).
56. Barnes.J.C., Stanley.O., Craig.T.M., “Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat” J. Am Vet. Med. Assoc., 202, (3), 416-418. (1993).
57. Pennisi.M.G. “A high prevalence of feline leishmaniosis in southern Italy Proceedings du 2ème forum international sur la Leishmaniose canine”, Seville, Espagne, 6-9 février 2002, 39-48. (2002).
58. Passos. V.M.A., Lasmar. E.B., Gontijo.C.M.F., Fernandes.O., Degrave.W.”Natural infection of a domestic cat (Felis domesticus) with Leishmania (Viannia) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte.State of Minas Gerais, Brazil Mem. Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , 91,(1), 19-20. (1996)
59. Schubach.T.M.P., Figueiredo. F.B., Pereira.S.A., Madiera M.F., Santos.I.B., Andrade .M.V., Cuzzi.T., Marzochi.M.C.A., Schubach.A., “American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro. Brazil: first report of natural infection with leishmania(Viannia) braziliensis” tran. R. Soc. Trop. Med.Hyg., 98,(3), 165-167. (2004).
60. Ozon. C., Marty.P., Pratlong.F., Breton.C., Blein.M., Lelievre A., Haas P.”Disseminated feline leishmaniasis due to Leishmania infantum in Sowthern France” Vet.Parasitol. 75,(2-3), 273-277. (1998)
61. Grevot A., JaussaudHugues P., Marty P., Pratlong F., Ozon C., Haas P., Breton C., Bourdoiseau G., “Leishmaniosis due to Leishmania infantum in a FIV and FeLV positive cat with squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods” . parasite, 12, (3), 271-275. (2005).
62. Poli A., Abramo F., Barsotti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi A., Mancianti F. « Feline leishmaniosis due to Leishmania infantum in Italy » Vet. Parasitol., 106, (3), 181-191.(2002).
63. Poli A., Abramo F., Barsotti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi A., Mancianti F. « Feline leishmaniosis due to Leishmania infantum in Italy » Vet. Parasitol., 106, (3), 181-191.(2002).

64. Savani E.S., De Oliveira Camargo M.C., de Carvalho M.R., Zampieri R.A., Dos Santos M.G., D'Auria S.R., Shaw J.J., Floeter-Winter L.M. "The first record in Americas of an autochthonous case of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in a domestic cat (Felix catus) from Cotia Country , Sao paulo State, Brazil .Vet. parasitol., 120, (4), 229-233. (2004).
65. Pennisi M.G., « Feline leishmaniosis Proceedings de la 3ème journée d'actualités sur la Leishmaniose », Nice, France, 23 Septembre 2006, 19-20. (2006).
66. Chauve C. « Maladies parasitaires du système des phagocytes mononuclés ». Cours magistral de parasitologie de la 2ème année de 2ème cycle . ENVL. (2004).
67. Chauve C. « Maladies parasitaires du système des phagocytes mononuclés ». Cours magistral de parasitologie de la 2ème année de 2ème cycle . ENVL. (2004).
68. Dedet J.P., Pratlong F., "Point epidemiologique sur les foyers d'endemie leishmanienne en Europe Proceedings de la 1ère journée d'actualités sur la Leishmaniose », Nice, France, 23 Septembre 2006, 9. (2006)
69. Pennisi M.G., "Case report of Leishmania spp, infection in two cats from the Aeolian archipelago (Italy)" Proceedings du 24ème congrès WSAVA, Lyon, France, 23-26 septembre 1999, CD.(1999)
70. Papierok GM. « Diagnostic biologique de la leishmaniose canine et perspectives ». Nouv. Prat. Vét., 159, 65-68. (2002).
71. Keck N. » Diagnostic de laboratoire de la leishmaniose canine. Leishmaniose canine : Surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie ». Résumés. Lyon : Société Française de Parasitologie,. (2004)
72. Hubert B. » Comment diagnostiquer la leishmaniose canine ». Le Point Vét., 270, 54-59. (2006).
73. Lamothe J, Gaudray C, Zarka P. "Diagnostic de la leishmaniose canine ». Prat. Méd. Chir. Anim. Cie, 39, 41-46. (2004).
74. Hebert F., « Tableaux étiologiques, in: Guide Pratique de médecine interne canine et féline » MED'COM, Paris, 456p. (2002)
75. Lapouge V., Site de l'Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, [en ligne] Adresse URL : <http://www.vet-lyon.fr/etu/dermato/index.htm/>(2006).
76. Gradoni L., « Diagnostic : les nouvelles techniques » Action Vet. Ed. Sp6., (leishmaniose), 6-9. (2002).
77. Boari A., Vita S., Petrotta E., Lucian A., Britti D. "Feline leishmaniasis : serological investigation in Abruzzo ".Proceedings du 3ème congrés mondial sur la Leishmaniose, Palermo-Terrasini, Italie, 15 avril 2005, 115. (2005).
78. Charrol P. « Contribution à l'étude du diagnostic immunologique de la leishmaniose canine ». Thèse de doctorat vétérinaire, faculté Paul Sabatier, Toulouse, 175pp. (1989).

79. Ambroise-Thomas P., Golvan Y.J. « Les nouvelles techniques en parasitologie et immunoparasitologie ». Flammarion Médecine-Sciences, 298pp. (1994).
80. Lemahieu JC. « Le système immunitaire : organes, cellules et molécules ». In : Cours d'immunologie PCEM 2. (2004)
81. Mossalayi M .D., Appriou M. « Intérêt du monoxyde d'azote dans la défense anti-parasitaire des macrophages humains ». Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 138, 7-17. (1999)
82. Baneth G. "Pathoimmunology of canine leishmaniasis". PROC 14th ECVIM-CA Congress, Barcelona . (2004)
83. Moreno J. "Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis". Trends Parasitol., 23, 86-88. (2007)
84. Euzeby J. « Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire ».Paris : Lavoisier, 818p. . (2008)
85. Roitt IM., Brostoff J., Male D K. « Immunité vis-à-vis des protozoaires et des Helminthes".In : Immunologie. 3rded. Bruxelles : De Boeck-Wesmael, 16.1-16.22. . (1993)
86. Alexander J., Bryson K. "T helper (h)1/Th2 and Leishmania" : paradox rather than paradigm. Immunol., 99, 17-23. (2005).
87. Alexander J, McFarlane E. "Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent ?" Microbes Infect, 10, 953-959. (2008).
88. Noben-Trauth N. "Susceptibility to Leishmania major infection in the absence of IL-4". Immunol.Lett., 75, 41-44. (2000).
89. Mendez S., Reckling SK., Piccirillo CA., Sacks D., Belkaid Y. "Role for CD4+CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity". J. Exp. Med., 200(2), 201-210. (2004).
90. Rodrigues O.R., Marques C., Soares-Clemente M., Ferronha M.H., Santos-Gomes G M. « Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infectio ». Immunobiology, 214, 101-111. (2009).
91. Pinelli E., Rutten VPMG., Ruitenberg EJ. « Cellular immune responses in canine leishmaniasis ».In : Canine leishmaniasis : an update. Barcelona, Spain, 1999.
92. Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del REAL G., Ruitenberg J. "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum". Infect. Immun., 62, 229-235. (1994).
93. Cardoso L., Neto F., Sousa JC., Rodrigues M., Carbal M. "Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity". Vet. Parasitol., 79(3), 213-220. (1998).

94. Cardoso L., Schallig HDFH., Cordeiro DA., Silva A., Cabral M., Alunda JM., Rodrigues M. "Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 117, 35-41. (2007)
95. Barbieri CL. "Immunology of canine leishmaniasis". *Parasite Immunol.*, 28, 329-337. (2006).
96. Carrillo E., Moreno J. "Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 128, 67-70. (2009).
97. Ji J., Masterson J., Sun J., Soong L. "CD4+CD25+regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection". *J. Immunol.*, 174, 7147-7153. (2005)
98. Nieto CG., Garcia-Alonso M., Requena JM., Miron C., Soto M., Alonso C. "Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum* : correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117-130. (1999)
99. Iniesta L., Gallego M., Portus MI. "Diotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 119, 189-197. . (2007).
100. Almeida MAO., Jesus EEV., Sousa-Atta MLB., Alves LC., Berne MEA., Atta AM. "Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*". *Vet. Immunol.*, 106, 151-158. (2005).
101. Day MJ. "Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis : a review and analysis of pitfalls in interpretation". *Vet. Parasitol.*, 147, 2-8. (2007)
102. Andrade BB., Oliviera Cl., Brodskyn Cl., Barral A, Barral-Netto M. « Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis" : current insights. *Scand. J. Immunol.*, 66, 122-127. (2007).
103. Titus RG., Bishop JV., Mejia JS. "The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission". *Parasite Immunol.*, 28, 131-141. (2006).
104. Rohousva I., Volf P. "Sand fly saliva : effects on host immune response and *Leishmania* transmission". *Folia Parasit.*, 53(3), 161-171. (2006).
105. Bourdoiseau G., Dénerolle P. « Traitement de la leishmaniose canine : actualités ». *Revue Méd. Vét.*, 151, 395-400. (2006).
106. Marty P., Ozon C., Rahal A, Garti-Toussant M., Lelievre A., Izri MA . « Leishmaniose dans les Alpes-Maritimes. Caractéristiques épidémiologiques actuelles ». *Méd. Armées*, 22, 29-31. (1994).
107. Michael SA., Morsy TA., Abou El-Seoud SF., Saleh MSA. « Leishmaniasis antibodies in stray cats in Ismailiya Governorate, Egypt. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, 12-283-286. (1982).

108. Bourdoiseau G. "Parasitologie Clinique du chien " Créteil : NEVA, 456p. (2000)
109. Tulasne L. « Actualités dans la lutte contre la leishmaniose canine ». Thèse doctorat vétérinaire ENVA. (2005).
110. Bosselut H « Un cas de leishmaniose générale du chat ». Archives de l'IPA. 26 :14.(1948).
111. Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. (2001).
112. A. Bouratbine , K. Aoun , M. Gharbi , N. Haouas , J. Zaroui , Z. Harrat , H. Baba et M.A. Darghouth : »données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques sur la leishmaniose générale canine en Tunisie ». (2005).
113. Halloin E «étude épidémiologique de la symptomatologie de la leishmaniose canine dans le sud de la France « thèse de doctorat vétérinaire ENVL. (2008).
114. Tulasne .L « Actualités dans la lutte contre la leishmaniose canine dans le sud de la France « thèse de doctorat vétérinaire ENVL (2009).
115. Woodley Equipment Company Ltd Witness®Leishmania (2007).
116. McGill University Centre of Tropical Diseases.(2005).
117. Marty.P, Delaunay.P, Fissore.C, LePichoux.Y "la leishmaniose méditerranéenne due à Leishmania infantum, mise au point-intérêt des tests de diagnostic rapide : IT-LEISH® et ID-PAGIA ®Leishmaniasis (2007).
118. V. Mathys et al 2014(1, 2P. Lefèvre(1, 3), V. Fontaine(1), M. Dehem(4), P.Y.Donnio(5), F. Février(6), A. Le Coustumier(6), P. Bifani(1) La PCR en temps réel : principe et application en infectiologie
119. Tania Ayllon et al Serologic and Molecular Evaluation of Leishmania infantum in Cats from Central Spain. 2008.
120. Anastasia Diakou DVM, PhD et al 2009 Specific anti-Leishmania spp. antibodies in stray cats in Greece.
121. C. Maiaa, et al Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal .2008
122. Cinzia Cantacessi et al The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics .2015
123. Tabar, M. et al. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). Vet. Parasitol. 151, 332–336 .(2008)
124. Martín-Sánchez, J. et al. Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain. Vet. Parasitol. 145, 267–273. (2007)
125. Nasereddin, A. et al. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. Vet. Parasitol. 158, 364–369(2008)
126. Solano-Gallego, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 676–680 .(2007)

- 127 .Ayllon, T. et al. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 1149, 361–364.2008
- 128.Vides, J. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* .2011
- 129.Carla Maiaand Lenea Campino Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? 2015
- 130.Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., .Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitology* 145, 267–273.(2007)
- 131.Maria Grazia Pennisi et al Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?2018
- 132.Coelho, W.M.D., Lima, V.M.F., de Amarante, A.F.T., do Langoni, H., Pereira, V.B.R.,Abdelnour, A., Bresciani, K.D.S., Occurrence of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev. Bras.Parasitologia Vet.* 19, 256–258.(2010)
- 133.Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L., .Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet.Parasitology* 174, 336–340.(2010)
- 134.Benassi, J.C., Benvenga, G.U., Ferreira, H.L., Pereira, V.F., Keid, L.B., Soares, R., deOliveira, T.M.F.S..Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp. Parasitology* 177, 93–97.(2017)
- 135.Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., .Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study inSpain. *Vet. Parasitology* 145, 267–273.(2007)
- 136 .Metzdorf, I.P., da Costa Lima, M.S., de Fatima Cepa Matos, M., de Souza Filho, A.F., de Souza Tsujisaki, R.A., Franco, K.G., Shapiro, J.T., de Almeida Borges, F., .Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 166,121–125.(2017)
- 137.Persichetti, M.F., Solano-Gallego, L., Vullo, A., Masucci, M., Marty, P., Delaunay, P.,Vitale, F., Pennisi, M.G., . Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard.*Parasites Vectors* 10, 119.(2017)
- 138.Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua, C.M.L.,Prata-Júnior, R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coêlho, Z.C.B.,Coêlho, I.C.B., Barral, A., Pompeu, M.M.L., The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet. Parasitology*127, 199–208.(2005)
- 139.Pennisi, M.-G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G., Solano-Gallego, L., *LeishVet* update and recommendations on feline leishmaniosis.*Parasites Vectors* 8, 302. (2015)

140. Persichetti, M.-F., Solano-Gallego, L., Serrano, L., Altet, L., Reale, S., Masucci, M., Pennisi, M.-G. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasites Vectors* 9, 247. (2016)
141. Vides, J.P., Schwarzt, T.F., Sobrinho, L.S.V., Marinho, M., Laurenti, M.D., Biondo, A.W., Leutenegger, C., Marcondes, M., Leishmania chagasi infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitology* 178, 22–28. (2011)
142. Vides, J. et al. Leishmania chagasi infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* (2011)
143. Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M., Alberola, J., Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 676–680. (2007)
144. Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267–273. (2007)
145. Pennisi, M., A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Intervet International Boxmeer, Barcelona, pp.39–48. (2002)
146. Otranto, D., Napoli, E., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Tarallo, V.D., Greco, G., Lorusso, E., Gulotta, L., Falsone, L., Basano, F.S., Pennisi, M.G., Deuster, K., Capelli, G., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Feline and canine leishmaniasis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet. Parasitology* 236, 144–151. (2017)
147. Cleare, E., Mason, K., Mills, J., Gabor, M., Irwin, P.J., Remaining vigilant for the exotic: cases of imported canine leishmaniasis in Australia 2000–2011. *Aust. Vet. J.* 92, 119–127. (2014)
148. Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M.M., Roosje, P.J., Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet. Rec.* 156, 542–545 (2005)
149. Svobodova, V., Svoboda, M., Friedlaenderova, L., Drahotsky, P., Bohacova, E., Baneth, G., Canine leishmaniasis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic. *Vet. Parasitology* 237, 122–124 (2017)
150. Pratlong, F., Lami, P., Ravel, C., Balard, Y., Dereure, J., Serres, G., Baidouri, F.E.L., Dedet, J.-P., Geographical distribution and epidemiological features of Old World Leishmania infantum and Leishmania donovani foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology* 140, 423–434. (2013)
151. Baneth, G., Yasur-Landau, D., Gilad, M., Nachum-Biala, Y., Canine leishmaniasis caused by Leishmania major and Leishmania tropica: comparative findings and serology. *Parasites Vectors* 10, 113. (2017)

- 152.IVETE L. DE MENDONÇA, JOILSON F. BATISTA¹, IULIANA M. M. RIBEIRO,FERNANDA S. B. ROCHA, SORAIA O. SILVA and MARIA N. MELOLeishmania infantum in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil (2017)
- 153.Figueiredo, F. B., Bonna, I. C. F., Nascimento, L. D., Costa, T.,Baptista, C., Pacheco, T. M. V., Amendoeira, M. R. R. and Madeira, M. F..Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42, 141–5.(2009)
- 154.Daliah Alves Coelho Trevisan et al Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. (2014)
- 155.Baneth, G. .Leishmaniasis. In Infectious Diseases of the Dog and Cat. C.E. Greene, Ed.: 685–698. WB Saunders. Philadelphia, PA. (2006)
- 156.Maria Alexandra Basso et al Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methylglucamine antimoniate .(2016)
- 157.Hüseyin Can et al Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of Leishmania tropica and Leishmania infantum in stray cats of İzmir, Turkey .(2016)
- 158.Dedola C.et al. Serological and molecular detection of Leishmania infantum in cats of Northern Sardinia, Italy .(2018)
- 159.Mancianti, F. et al ., Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? (2004)
- 160.Soraya Mohamadzadeh Dorbadam et al Evaluation of Leishmania infantum in cat by PCR-RFLP in an endemic region of visceral leishmaniasis in meshkin-shahr, Iran .(2014)
- 161.Luca Galluzzi et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis .(2018)
- 162.C. Maia et alFeline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal .(2010)
- 163.Gabriela Capriogli Oliveira et al. Antibodies to Leishmania spp. in domestic felines .(2015)
- 164.Gomes APS, Cordeiro RLR. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina.Rev Bras Parasitol Vet 2004; 23(S1): 238.
165. Maria-Grazia Pennisi, Luís Cardoso, Gad Baneth 2015 LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis .
- 166.Carla Maia et al .First case of feline leishmaniosis caused by Leishmania infantum genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma (2015).

167. Attipa, C., Papasouliotis, K., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Sarvani, E., Knowles, T.G., Mengi, S., Morris, D., Helps, C., Tasker, S., 2017. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus. *Parasit. Vectors* 10, 130.
168. Gradoni L. 2013 : Epidemiological surveillance of leishmaniasis.
169. Aït-Oudhia K, Harrat Z, Benikhlef R, Dedet JP, Pratlong F. Canine Leishmania infantum enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Trop.* 2011 May; 118(2):80-6.
170. Ait-Oudhia K., P. Lami, s. Lesceu, Z. Harrat, B. Hamrioui, J. P. Dedet and F. Pratlong. Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 103, No. 8, 1–15 (2009)
171. Bustin, S. A.. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* # 25: 169-193 (2000)
172. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, et al. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol* 2010; 174: 37–42.
173. Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani FD: Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2011, 176(2–3):281–282.
174. Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003 ; 97 : 387-90. 15.
175. Diakou A, Papadopoulos E and Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 728–730.
176. E. Spada, D. Proverbio, C. Giudice, M. Di Giancamillo, M. Lodi, and R. Perego, "Pituitary-dependent hyperadrenocorticism and generalised toxoplasmosis in a cat with neurological signs," *Journal of Feline Medicine and Surgery*, vol. 12, no. 8, pp. 654–658, 2010.
177. Ghosh P, Bhaskar KRH, Hossain F, Khan MAA, Vallur AC, Duthie MS, et al. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors. Parasites & Vectors*; 2016; 9: 383. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1667-2> PMID: 27377266
178. Hossain F, Ghosh P, Khan M.A.A, Duthie MS, Vallur AC, Picone A, et al. Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. *PLoS ONE* 12(9):e0185606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185606> (2017)

179. Maia C, Gomes J, Cristovão J, et al. Feline leishmaniasis infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol* 2010; 174: 336–340.
179. Maia C, Nunes M and Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 8: 555–559.
180. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* 2017; 145: 267–273.
181. Nasereddin A, Salant H and Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol* 2008; 158: 364–369.
182. Prina E, Roux E, Mattei D, et al. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real time PCR. *Microb Infect* 2017; 9: 1307.
183. Sergent E, Sergent E, Lombard J, et al. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull*
184. Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, de Lima VM, Perri SH, Generoso D, Langoni H, Leutenegger C, Biondo AW, Laurenti MD, Marcondes M: Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2012, 187(1–2):302–306.
185. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Iniesta L, et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in core regions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 676–680.
186. Feline leishmaniasis: Is the cat a small dog? Maria Grazia Pennisia, ^a, Maria Flaminia Persichetti, ^b 2018.
187. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain Velez R. ^{a,b}, Ballart C. ^{a,b}, Domenech E. ^c, Abras A. ^{a,b,d}, Fernández-Arévalo A. ^{a,b,e}, Gómez S. ^{A.a}, Tebar S. ^b, Muñoz C. ^{e,f}, Cairó J. ^c, Gállego M. ^{a,b} Janvier (2019) .