

ANNEE 2022 THESE : 2022– TOU 3 – 4057

---

# PRÉVALENCE DE LA LEISHMANIOSE CANINE DANS LES CÉVENNES

---

THESE d'EXERCICE  
pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**BOSSA Anaïs, Emma, Danièle**

**Directrice de thèse : Mme Emilie BOUHSIRA**

---

**JURY**

---

PRESIDENT :

**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Emilie BOUHSIRA**

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Emmanuel LIENARD**

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉE :

**Mme Laurence LACHAUD**

Professeure à la Faculté de Médecine de MONTPELLIER



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup>  
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup>  
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

## MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

**A Monsieur le Professeur Valentin Alexis**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Zoologie, Parasitologie

Merci d'avoir accepté de présider mon jury.

**A Madame le Professeur Emilie Bouhsira**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Zoologie, Parasitologie

Merci d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse, pour votre aide précieuse dans les démarches administratives et dans la rédaction de ce manuscrit. Merci par ailleurs pour vos enseignements en Parasitologie.

**A Madame le Professeur Laurence Lachaud**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Mycologie, Parasitologie

Merci de m'avoir intégrée avec gentillesse et bienveillance dans votre équipe de recherche, pour votre aide dans la mise en place de ce projet, lors des expérimentations et de la rédaction de ce manuscrit.

**A Monsieur le Professeur Emmanuel Liénard**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Zoologie, Parasitologie

Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury et pour vos enseignements en Zoologie et Parasitologie.

## Table des matières

Introduction.....	14
I. Généralités sur le cycle.....	16
A. Le parasite.....	16
1. Taxonomie.....	16
2. Description morphologique.....	17
B. Le vecteur.....	19
1. Taxonomie.....	19
2. Description morphologique.....	19
3. Bio-écologie.....	20
a) Lieux de vie.....	20
b) Régime alimentaire.....	21
c) Cycle de vie.....	22
C. Les hôtes mammifères.....	23
D. Les modalités de transmission et les facteurs influençant la qualité de l'inoculum.....	23
E. Cycle de <i>Leishmania infantum</i> .....	24
II. La leishmaniose canine.....	26
A. Facteurs de risque.....	26
1. Les caractéristiques de l'hôte.....	27
a) L'âge.....	27
b) Le sexe.....	28
c) Le pelage.....	28
d) Le type d'activité.....	28
e) La race.....	28
f) La génétique.....	29
g) Maladies concomitantes.....	30
2. L'influence de l'environnement.....	31
a) Microclimat favorable au vecteur.....	31
3. Zone urbaine ou rurale.....	31
4. Présence d'animaux de ferme.....	31
5. Mode de vie.....	32

B.	La réponse immunitaire de l'hôte.....	32
1.	La réponse immunitaire innée .....	32
a)	Les polynucléaires neutrophiles : premiers arrivés sur le site d'inoculation .....	32
b)	Les macrophages : hôtes et destructeurs du parasite.....	33
c)	Les cellules dendritiques : cellules présentatrices d'antigènes professionnelles	34
d)	La lyse directe des leishmanies <i>via</i> l'action du complément .....	34
e)	Les mécanismes d'échappement à l'immunité innée .....	35
2.	La réponse immunitaire adaptative .....	36
a)	La réponse à médiation cellulaire .....	36
b)	La réponse à médiation humorale.....	38
C.	Signes cliniques .....	39
1.	Signes cliniques généraux et physiopathologie.....	40
2.	Signes cutanés .....	41
3.	Signes rénaux .....	44
4.	Signes ophtalmologiques .....	45
5.	Troubles musculosquelettiques.....	46
6.	Troubles digestifs.....	48
7.	Autres manifestations cliniques.....	48
D.	Signes biologiques .....	49
1.	Les anomalies de formule sanguine .....	49
2.	Les anomalies biochimiques.....	50
3.	Les troubles de l'hémostase .....	54
E.	Gradation clinique.....	54
1.	Classification clinique proposée par le « <i>Canine Leishmaniasis Working Group</i> » (CLWG) .....	54
a)	Les exposés .....	55
b)	Les infectés .....	55
c)	Les malades.....	55
d)	Les sévèrement malades.....	55
2.	Classification clinique proposée par le groupe LeishVet.....	56
a)	Stade 1 : maladie « légère » .....	56
b)	Stade 2 : maladie « moyenne ».....	56

c) Stade 3 : maladie « grave » .....	57
d) Stade 4 : maladie « très grave » .....	57
F. Les méthodes de diagnostic .....	57
1. Diagnostic direct.....	58
a) La cytologie .....	58
(1) Organes ou tissus analysés.....	58
(2) Analyse des échantillons .....	59
(3) Les limites de la cytologie .....	60
b) L'histologie .....	60
c) La PCR : « <i>Polymerase Chain Reaction</i> ».....	61
(1) Les cibles .....	62
(2) Les échantillons à prélever.....	63
(3) Interprétation des résultats .....	63
d) Le xénodiagnostic .....	64
e) Autres techniques de diagnostic direct.....	64
2. Les méthodes de diagnostic indirect.....	65
a) L'immunophénotypage.....	65
b) La sérologie.....	66
(1) Les différentes techniques disponibles .....	66
(2) Les antigènes utilisés .....	70
(3) L'interprétation des résultats .....	70
(4) Les limites de la sérologie.....	70
3. Guide pour une démarche diagnostique adaptée.....	71
G. Prise en charge thérapeutique .....	72
1. Les molécules disponibles .....	73
a) L'antimoniote de méglumine.....	73
b) L'allopurinol.....	73
c) La miltéfosine.....	74
d) L'association de l'allopurinol à l'antimoniote de méglumine : traitement de consensus en Europe .....	75
e) Les autres traitements décrits dans la littérature .....	76
2. Les effets secondaires des traitements .....	77

3.	Les protocoles de traitements en fonction des stades cliniques.....	78
4.	Le suivi .....	80
5.	Les facteurs influençant la réponse au traitement.....	80
H.	Facteurs pronostiques.....	81
I.	Mesures préventives.....	82
1.	limiter le contact avec les phlébotomes .....	83
a)	La gestion du lieu et du mode de vie .....	83
b)	L'utilisation de topiques insecticides .....	83
2.	La vaccination.....	85
a)	L'intérêt de la vaccination .....	85
b)	L'unique vaccin disponible en France : Letifend®.....	85
3.	Bilan des mesures préventives adaptées à chaque cas .....	86
III.	Etude du foyer cévenol .....	86
A.	Etats des lieux des connaissances sur les foyers de leishmaniose canine à l'échelle du monde, de l'Europe et de la France .....	86
1.	La leishmaniose canine dans le monde .....	86
a)	<i>Leishmania infantum</i> : principal parasite incriminé.....	86
b)	Les vecteurs .....	87
c)	Les hôtes .....	88
d)	Données sur la prévalence mondiale .....	89
2.	La leishmaniose canine en Europe .....	90
a)	Distribution géographique de la leishmaniose canine en Europe.....	90
b)	Prévalence de la leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen .....	91
c)	Distribution géographique des phlébotomes.....	92
d)	Abondance saisonnière des phlébotomes dans le bassin méditerranéen.....	94
3.	La leishmaniose canine en France métropolitaine .....	95
B.	Etats des lieux des connaissances sur le foyer cévenol de la leishmaniose canine ...	96
1.	Caractéristiques du biotope cévenol.....	97
a)	Données climatiques.....	97
b)	Types de végétation .....	99
c)	Conséquences du réchauffement climatique sur le biotope cévenol.....	99
2.	Connaissances actuelles sur les populations de phlébotomes des Cévennes.....	100

a)	Les populations présentes dans les Cévennes .....	100
b)	Distribution des phlébotomes en fonction de l'altitude .....	100
c)	Influence des conditions climatiques.....	102
d)	Distribution saisonnière des populations de phlébotomes dans les Cévennes	103
e)	Abondance des femelles phlébotomes au cours de la journée.....	103
f)	Évolution de la population cévenole des phlébotomes en 35 ans .....	103
g)	La population canine .....	104
h)	Les autres hôtes identifiés.....	104
i)	Données sur la prévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes .....	104
j)	Quelle peut-être la prévalence de la leishmaniose canine de nos jours ? .....	105
C.	Travail personnel : Étude de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer cévenol en 2022 .....	107
1.	Matériel et méthodes.....	107
a)	Accord du comité d'éthique .....	107
b)	Zone d'étude.....	107
c)	La population canine ciblée.....	108
d)	Prélèvement des échantillons .....	109
e)	Techniques sérologiques.....	109
f)	Collecte d'informations .....	110
g)	Analyses statistiques .....	110
2.	Résultats .....	111
a)	Description de la population canine étudiée et des lieux de vie .....	111
b)	Connaissances des propriétaires sur la leishmaniose canine et mesures préventives appliquées .....	115
c)	Séroprévalence dans la population étudiée .....	117
d)	Performances comparées des différents tests sérologiques et concordance des tests.....	119
e)	Analyses des facteurs de risque : sexe, âge, longueur des poils, autres mammifères ou volailles dans un rayon d'un kilomètre .....	120
f)	Influence de l'utilisation des traitements répulsifs .....	121
3.	Discussion .....	121
a)	Revue des données récentes .....	121

b) Difficultés d'échantillonnage .....	122
c) Effets « cluster ».....	123
d) Résultats de séroprévalence et de prévalence de la maladie en comparaison avec d'autres pays et d'anciennes données.....	123
e) Comparaison des résultats des ELISA et des tests d'immunochromatographie sur membrane.....	125
f) Évaluation de l'efficacité des mesures préventives .....	127
g) Étude des facteurs de risque .....	129
h) Données relatives aux propriétaires.....	130
i) Difficultés pour diagnostiquer des chiens vaccinés .....	131
Conclusion .....	133
Bibliographie .....	137
Annexes .....	158
Annexe I : Questionnaires distribués aux propriétaires .....	159
Annexe II : Poster présenté au congrès annuel de la Société Française de Parasitologie et de Mycologie médicale, Rouen (France), du 21 au 24 Juin 2022.....	161
Annexe III : Poster présenté au congrès WorldLeish 7, Carthagène (Colombie), du 1 <sup>er</sup> au 6 Août 2022.....	162

## Table des illustrations

### Tableaux

<b>TABLEAU 1.</b> LES PRINCIPALES ESPECES DE <i>LEISHMANIA</i> ET LEURS ZONES DE REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	16
<b>TABLEAU 2.</b> TAXONOMIE DES <i>LEISHMANIA</i> D'APRES LEVINE <i>ET AL.</i> , 1980.....	17
<b>TABLEAU 3.</b> VALEURS DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DE DIFFERENTS TESTS IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES ANALYSES DANS LA LITTERATURE. ....	67
<b>TABLEAU 4.</b> VALEURS DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DE DIFFERENTS TESTS ELISA ANALYSES DANS LA LITTERATURE.....	69
<b>TABLEAU 5.</b> SPECIALITES A BASE DE PYRETHRINOÏDES DISPONIBLES EN FRANCE ET CHEZ LE CHIEN. ....	84
<b>TABLEAU 6.</b> LES PRINCIPALES ESPECES DE <i>LEISHMANIA</i> DECRITES CHEZ LE CHIEN ET LEUR DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE.....	87
<b>TABLEAU 7.</b> RESERVOIRS DE <i>L. INFANTUM</i> IDENTIFIES DANS LE MONDE. ....	89

<b>TABLEAU 8.</b> DONNEES DE LA LITTERATURE DECRIVANT LA PREVALENCE DE LA MALADIE, PREVALENCE DE L'INFESTATION ET LA SEROPREVALENCE DE LEISHMANIOSE CANINE DANS DIFFERENTS PAYS DU MONDE.....	90
<b>TABLEAU 9.</b> DONNEES DE LA LITTERATURE DECRIVANT LA PREVALENCE DE LA MALADIE, PREVALENCE DE L'INFESTATION ET LA SEROPREVALENCE DE LEISHMANIOSE CANINE DANS DIFFERENTS PAYS DU BASSIN MEDITERRANEEN.....	91
<b>TABLEAU 10.</b> TAUX DE POSSESSION DE CHIENS EN FONCTIONS DU TYPE D'HABITATS. ....	104
<b>TABLEAU 11.</b> EFFECTIFS PAR RACES REPRESENTÉES PAR LES CHIENS DE L'ETUDE .....	114

## Figures

<b>FIGURE 1.</b> FORMES AMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. COLORATION MAY-GRÜNWARD GIEMSA X1000.....	18
<b>FIGURE 2.</b> PROMASTIGOTE DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> . CULTURE SUR MILIEU NNN x1000. ....	18
<b>FIGURE 3.</b> PHLEBOTOME FEMELLE OBSERVEE AU MICROSCOPE OPTIQUE. ....	19
<b>FIGURE 4.</b> CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i> .....	20
<b>FIGURE 5.</b> PHOTOGRAPHIE D'UN GITE LARVAIRE ET LIEU DE REPOS POTENTIELS POUR LES PHLEBOTOMES : MUR DE PIERRES SOUS UN CHENE VERT DANS LE VILLAGE DE CAUSSE-DE-LA-SELLE (34).....	21
<b>FIGURE 6.</b> CYCLE DE VIE DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> . ....	26
<b>FIGURE 7.</b> SCHEMA REPRESENTANT L'ACTIVATION ET LA REGULATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE A MEDIATION CELLULAIRE LORS DE LEISHMANIOSE CANINE.....	39
<b>FIGURE 8.</b> CACHEXIE CHEZ UN CHIEN ATTEINT DE LEISHMANIOSE CLINIQUE. ....	40
<b>FIGURE 9.</b> COUPES HISTOLOGIQUES COLOREES A L'HEMALUN-EOSINE D'UN NŒUD LYMPHATIQUE PAROTIDIEN D'UN CHIEN ATTEINT DE LEISHMANIOSE.....	41
<b>FIGURE 10.</b> DERMATITE EXFOLIATIVE SUR LE PAVILLON AURICULAIRE.. ....	42
<b>FIGURE 11.</b> HYPERKERATOSE NASALE. ....	43
<b>FIGURE 12.</b> DERMATITE PAPULEUSE SUR LE CHANFREIN. ....	43
<b>FIGURE 13.</b> ONYCHOGRYPHOSE.....	43
<b>FIGURE 14.</b> DERMATITE ULCERATIVE AVEC PERTE DE SUBSTANCE BIEN DELIMITEE ET RELATIVEMENT PROFONDE SUR LE COUSSINET METACARPIEN. ....	44
<b>FIGURE 15.</b> DEPIGMENTATION NASALE. PHOTOGRAPHIE ORIGINALE. ....	44
<b>FIGURE 16.</b> BLEPHARITE NODULAIRE ET ULCERATIVE, CONJONCTIVITE PURULENTE ET UVEITE ANTERIEURE AVEC OPACIFICATION CORNEENNE ET NEOVASCULARISATION SUPERFICIELLE.. .....	46
<b>FIGURE 17.</b> ATROPHIE BILATERALE ET SEVERE DES MUSCLES TEMPORAUX CHEZ UN CHIEN LEISHMANIEN ATTEINT DE MYOSITE CHRONIQUE DES MUSCLES MASTICATEURS.....	47
<b>FIGURE 18.</b> ÉLECTROPHORESE DES PROTEINES SERIQUES CHEZ UN CHIEN SAIN (A) ET CHEZ UN CHIEN ATTEINT DE LEISHMANIOSE CLINIQUE (B) .....	54

<b>FIGURE 19.</b> DESCRIPTION DES LIEUX DE VIE DES CHIENS. TION DE L'ALTITUDE ET DES ETAGES DE VEGETATION EN LANGUEDOC .....	54
<b>FIGURE 20.</b> REPARTITION ET FREQUENCE DE <i>P. PERNICIOSUS</i> , <i>P. ARIASI</i> ET <i>S. MINUTA</i> EN FONCTION DE L'ALTITUDE ET DES ETAGES DE VEGETATION EN LANGUEDOC.....	101
<b>FIGURE 21.</b> DESCRIPTION DES LIEUX DE VIE DES CHIENS.....	112
<b>FIGURE 22.</b> VALEURS DE SENSIBILITE ET DE SPECIFICITE DE CHAQUE TEST.....	119
<b>FIGURE 23.</b> VALEURS DU KAPPA DE COHEN ENTRE DIFFERENTS TESTS DE L'ETUDE.....	120

## Diagrammes

<b>DIAGRAMME 1.</b> CLIMATOGRAMMES DES VILLES DE CARDET, ALZON ET SAINT-SAUVEUR-CAMPRIEU.....	98
<b>DIAGRAMME 2.</b> BILAN DES MESURES PROPHYLACTIQUES UTILISEES PAR LES PROPRIETAIRES. ...	116
<b>DIAGRAMME 3.</b> POURCENTAGE DE CHIENS RECEVANT UN ANTIPARASITAIRE EXTERNE CONFORMEMENT AUX RCP DES SPECIALITES DANS LE CADRE DE LA LUTTE CONTRE LES PHLEBOTOMES.....	117
<b>DIAGRAMME 5.</b> POURCENTAGE DE CHIENS SEROPOSITIFS ET SERONEGATIFS POUR CHAQUE TEST SUR LA POPULATION DE CHIENS VACCINES (N=29).....	118
<b>DIAGRAMME 4.</b> POURCENTAGE DE CHIENS SEROPOSITIFS ET SERONEGATIFS POUR CHAQUE TEST SUR L'ENSEMBLE DE LA POPULATION (N=169).....	118
<b>DIAGRAMME 6.</b> POURCENTAGE DE CHIENS SEROPOSITIFS ET SERONEGATIFS POUR CHAQUE TEST SUR LA POPULATION DE CHIENS NON VACCINES (N=140).....	118

## Cartes

<b>CARTE 1.</b> DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE MONDIALE DES PRINCIPAUX GENRES DE PHLEBOTOMES.. .....	88
<b>CARTE 2.</b> CARTE REPRESENTANT LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE <i>PHLEBOTOMUS ARIASI</i> EN EUROPE ET ASIE OCCIDENTALE EN MARS 2022.....	93
<b>CARTE 3.</b> CARTE REPRESENTANT LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE <i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i> EN EUROPE ET ASIE OCCIDENTALE EN MARS 2022.....	93
<b>CARTE 4.</b> MODELISATION DES FUTURES DISPERSIONS GEOGRAPHIQUES DE <i>P. PERNICIOSUS</i> SELON DIFFERENTS SCENARIOS DE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE.. .....	94
<b>CARTE 5.</b> LOCALISATION DES CAS DE LEISHMANIOSE CANINE RAPPORTES ENTRE 1965 ET 2007..	96
<b>CARTE 6.</b> CARTE DES RELIEFS DE FRANCE.. .....	97
<b>CARTE 7.</b> CARTE REPRESENTANT LES LIEUX D'ECHANTILLONNAGE. ....	108

## Introduction

La leishmaniose canine est une maladie zoonotique parasitaire largement distribuée dans le bassin méditerranéen (EFSA, 2015). Dans cette région, le parasite incriminé est le protozoaire *Leishmania infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Il est transmis majoritairement à la faveur de la piqûre d'une femelle de phlébotome infestée. En France, les deux espèces les plus souvent impliquées dans la transmission sont *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Prudhomme *et al.*, 2015). Le chien (*Canis familiaris*) est le réservoir principal du parasite, bien que d'autres espèces de mammifères comme le renard roux (*Vulpes vulpes*) ou le chat (*Felis silvestris catus*) soient également décrites comme des hôtes ou potentiels réservoirs (Alemayehu *et al.*, 2017).

*Leishmania infantum* est un parasite des cellules du système des phagocytes mononucléés. La leishmaniose canine est une maladie qui touche de multiples tissus et organes. Elle est à l'origine de nombreux signes cliniques non spécifiques et variables d'un individu à l'autre. Ainsi, en région endémique, de nombreux chiens sont porteurs asymptomatiques et infectieux pour les phlébotomes, favorisant ainsi la propagation insidieuse de la maladie au sein de la population canine (Velez *et al.*, 2019). Dans une application concrète du concept « *One Health* », la détection active et précoce de ces chiens porteurs du parasite est cruciale pour le contrôle de cette maladie, tant pour la population canine qu'humaine.

Comme dans de nombreux pays endémiques, la distribution de la leishmaniose canine en France métropolitaine est très hétérogène. Les Pyrénées orientales, les Cévennes, la Provence, les Alpes-Maritimes et la Corse sont décrites comme des foyers d'endémicité de la leishmaniose canine (Dedet *et al.*, 2013). La séroprévalence dans ces régions atteindrait près de 10% d'après un rapport rédigé par l'EFSA en 2015. Par ailleurs, d'après l'étude de Le Rutte *et al.*, (2021), le nombre de cas de leishmaniose canine avérée serait en augmentation en France.

Cependant, jusqu'ici, peu d'études ont été réalisées dans le foyer cévenol. Ainsi, peu de données sont disponibles afin d'évaluer l'endémicité de cette maladie dans ce territoire

de la France, ainsi que son évolution au cours des années. En effet, la dernière étude s'intéressant à la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer cévenol date de 2003 (Keck *et al.*, 2003). Depuis, des facteurs comme le réchauffement climatique, l'évolution de la distribution des populations de phlébotomes, l'utilisation de répulsifs à base de pyréthriinoïdes et la vaccination canine ont pu modifier cette prévalence. Des études réalisées dans d'autres pays européens ont montré que la distribution de la leishmaniose canine s'étendait vers le nord (EFSA, 2015).

Le but de ce travail est de contribuer à l'actualisation des données relatives à la leishmaniose canine dans le foyer cévenol. Les objectifs ont donc été de : (i) estimer la séroprévalence actuelle de la leishmaniose canine dans ce foyer, (ii) évaluer l'utilisation des mesures prophylactiques mises en place chez le chien et (iii) comparer les performances de quatre tests de diagnostic sérologique commerciaux.

## I. Généralités sur le cycle

### A. Le parasite

Les *Leishmania* sont des parasites dont l'origine est très ancienne. En effet, d'après Antoine *et al.*, (1999), la séparation des genres *Leishmania/Crithidia* et *Trypanosoma* précède celle des amphibiens et des mammifères, survenue depuis environ 340 millions d'années.

**Tableau 1.** Les principales espèces de *Leishmania* et leurs zones de répartition géographique.

Espèces	Répartition géographique
<i>Leishmania aethiopica</i>	Ethiopie, Kenya
<i>Leishmania major</i>	Afrique du Nord, Moyen-Orient, Afrique subsaharienne et ceinture du Sahel, Soudan, nord de l'Inde, Pakistan, Asie centrale
<i>Leishmania mexicana</i>	Amérique centrale
<i>Leishmania amazonensis</i>	Amérique du Sud, nord de l'Amazonie
<i>Leishmania braziliensis</i>	Amérique du Sud, Amérique centrale et Mexique
<i>Leishmania peruviana</i>	Pérou, Argentine
<i>Leishmania infantum</i>	Moyen-Orient, Asie Centrale, Chine, Amérique centrale, Amérique du Sud, Europe, nord de l'Afrique
<i>Leishmania donovani</i>	Ethiopie, Soudan, Kenya, Inde, Chine, Bangladesh, Birmanie
<i>Leishmania tropica</i>	Afrique du Nord, Moyen-Orient, nord de l'Inde, Pakistan, Asie centrale
<i>Leishmania guyanensis</i>	Amérique du Sud

### 1. Taxonomie

*Leishmania* appartient au sous-règne des protozoaires, à l'ordre des kinétoplastes et à la famille des Trypanosomatidae.

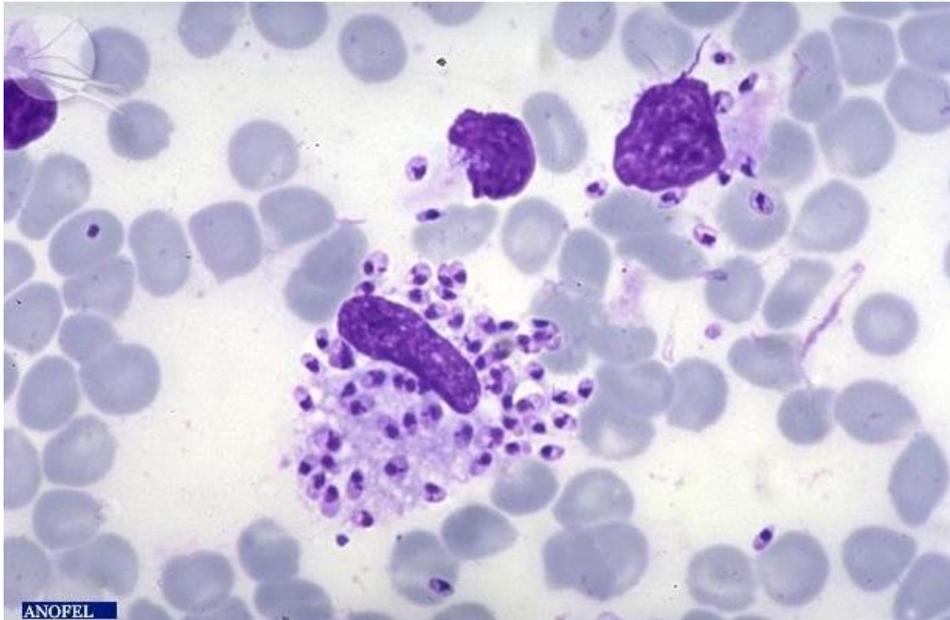
**Tableau 2.** Taxonomie des *Leishmania* d'après Levine *et al.*, 1980.

<b>Règne</b>	Protista
<b>Sous-règne</b>	Protozoa
<b>Embranchement</b>	Sarcomastigophora
<b>Classe</b>	Zoomastigophorea
<b>Ordre</b>	Kinetoplastida
<b>Sous-ordre</b>	Trypanosomatina
<b>Famille</b>	Trypanosomatidae
<b>Genre</b>	<i>Leishmania</i>

## 2. Description morphologique

Les leishmanies sont des protozoaires qui présentent différents stades évolutifs distincts pendant leur cycle. Les amastigotes sont des parasites intracellulaires que l'on retrouve majoritairement dans le système des phagocytes mononucléés, dont les macrophages, où ils se logent dans une vacuole parasitophore. Néanmoins, les leishmanies peuvent affecter de nombreux autres types cellulaires, comme les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les hépatocytes, les neutrophiles, les éosinophiles voire même les cellules néoplasiques (Saridomichelakis, 2009). L'infestation de cellules non phagocytaires est rarement productive, mais permet la survie à long terme des parasites. Ainsi, on retrouve des formes amastigotes dans tout l'organisme de l'hôte vertébré, dont ses organes, comme la rate et le foie. Par ailleurs, ils sont présents en plus grand nombre dans le derme que dans le sang. Le stade promastigote, mobile, est retrouvé dans le tube digestif du phlébotome.

Le stade amastigote est de forme ovale, mesure de deux à six micromètres et présente deux inclusions : le noyau, arrondi, et le kinétoplaste (origine du flagelle) juxta-nucléaire en forme de bâtonnet (Figure 1). Les amastigotes possèdent un flagelle, mais ce dernier est court et ne dépasse pas le corps cellulaire.



**Figure 1.** Formes amastigotes de *Leishmania* spp. Coloration May-Grünwald Giemsa X1000. Source : eANOFEL ([http://www.eanofel.fr/4daction/w3\\_Identification](http://www.eanofel.fr/4daction/w3_Identification), consulté le 22/10/21)

Le stade promastigote est de forme allongée, mesure de 10 à 25 micromètres de long pour une largeur de un à quatre micromètres. Il présente un noyau central, un flagelle à l'extrémité antérieure pouvant mesurer jusqu'à 20 micromètres de long et le kinétoplaste (Figure 2). Ce dernier contient l'ADN mitochondrial de *Leishmania* et est situé entre le noyau et le flagelle.



**Figure 2.** Promastigote de *Leishmania infantum*. Culture sur milieu NNN x1000. Source : eANOFEL ([http://www.eanofel.fr/4daction/w3\\_Identification](http://www.eanofel.fr/4daction/w3_Identification), consulté le 22/10/21)

## B. Le vecteur

Plus de 900 espèces de phlébotomes ont été identifiées dans le monde (Ready, 2013). Ces espèces sont réparties en cinq genres : *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* et *Warileya*. Seuls les phlébotomes des genres *Phlebotomus* et *Lutzomyia* seraient vecteurs de *Leishmania* spp. (Alemayehu *et al.*, 2017).

### 1. Taxonomie

Les phlébotomes sont des arthropodes, insectes de l'ordre des Diptères, du sous-ordre des Nématocères et de la famille des Psychodidés.

### 2. Description morphologique

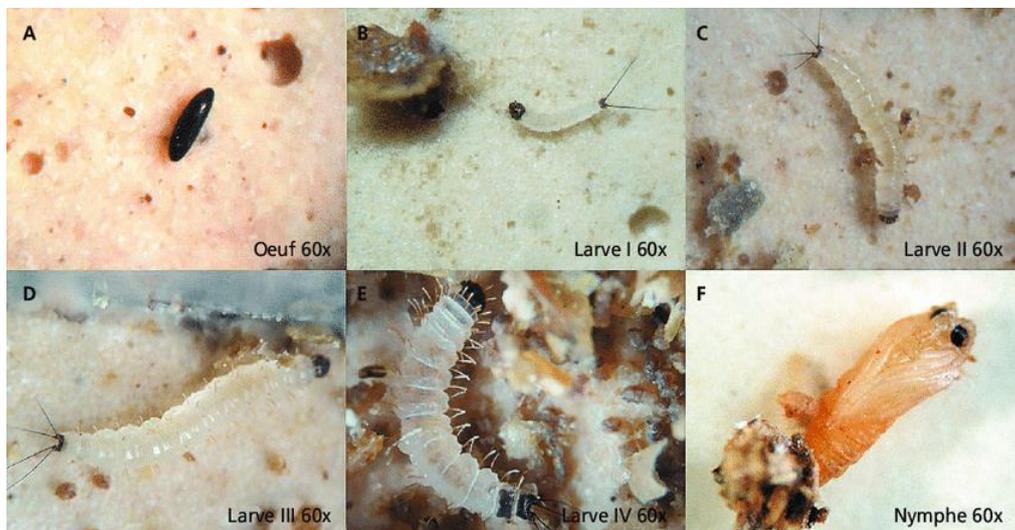
Les adultes, d'une taille de deux à trois millimètres, présentent un corps allongé et velu de couleur jaunâtre à rougeâtre, des yeux noirs, trois paires de longues pattes, une paire d'ailes velues, lancéolées, à apex pointu, redressées au repos et dont les nervures convergent vers le thorax, des pièces buccales de type piqueur chez la femelle et qui forment une courte trompe, de longues antennes de 16 articles et de calibre uniforme, un tarse à cinq articles, un thorax arrondi et bossu et un abdomen segmenté (Figure 3).



**Figure 3.** Phlébotome femelle observée au microscope optique. Source : eANOFEL ([http://www.eanofel.fr/4daction/w3\\_Identification](http://www.eanofel.fr/4daction/w3_Identification), consulté le 22/10/21)

La nymphe de trois millimètres de long, a un céphalothorax et un abdomen segmenté dont le dernier segment présente encore l'exuvie larvaire. Le tégument est recouvert de soies courtes (Léger et Depaquit, 1999).

Le cycle des phlébotomes (Figure 4) comprend quatre stades larvaires terrestres consécutifs. Les larves de type éruciforme ont un corps vermiforme en trois parties : tête, thorax et abdomen. Elles présentent une ou deux paires de soies caudales sur leur neuvième segment abdominal. Leur tête est bien distincte, de couleur noire et sans antenne. L'œuf est de forme elliptique, légèrement incurvé et mesure environ 400 micromètres de long. Au moment de la ponte, les œufs sont de couleur blanchâtre ou jaune clair puis deviennent progressivement brun foncé en cinq à six heures.



**Figure 4.** Cycle de développement de *Lutzomyia longipalpis*. Source : N. Léger, J. Depaquit, (1999).

(A) œuf, (B) larve de stade 1 (C) larve de stade 2 (D) larve de stade 3, (E) larve de stade 4 et (F) nymphe.

### 3. Bio-écologie

#### a) Lieux de vie

Les phlébotomes sont des insectes crépusculaires ou nocturnes. Pendant la journée, on les retrouve dans des niches écologiques où le microclimat leur est favorable. Ainsi, ils sont dans des endroits humides, tempérés et calmes comme les terriers, les granges, les

grottes, les litières au pied des arbres, les fissures des murs ou du sol ou encore, dans les trous des murs que l'on appelle des barbacanes dans les Cévennes (Léger et Depaquit, 1999, Prudhomme *et al.*, 2015). En zone tempérée, leur période d'activité s'étend d'avril à novembre. Ils se déplacent par un vol court, saccadé, silencieux et proche du sol. Leur distance de vol dépasse rarement un kilomètre, bien que la dispersion active des femelles soit plus étendue, car dépendante de la recherche d'un hôte pour le repas sanguin. Les phlébotomes sont sensibles au vent et ne sortent généralement que par temps calme et sec quand la vitesse du vent ne dépasse pas un mètre par seconde (Léger et Depaquit, 1999). Néanmoins, ce dernier favorise leur dispersion, car il leur permet de parcourir, passivement, de plus grandes distances.



**Figure 5.** Photographie d'un gîte larvaire et lieu de repos potentiels pour les phlébotomes : mur de pierres sous un chêne vert dans le village de Causse-de-la-Selle (34). Photographie originale.

## **b) Régime alimentaire**

Les phlébotomes mâles et femelles se nourrissent de sucres floraux et fruitiers ainsi que de miellats de pucerons. Les femelles se nourrissent également par telmophagie, c'est-à-dire en réalisant des repas sanguins sur mammifères, oiseaux, reptiles et batraciens. Le repas de sang

de 30 secondes à cinq minutes et peut se faire sur le même hôte ou sur plusieurs hôtes différents si le phlébotome est dérangé pendant son repas. La trompe lacère les tissus et les parois vasculaires, ce qui crée un micro-hématome ou lac sanguin, dans lequel la femelle va venir aspirer le sang. C'est au cours de ce repas, que les leishmanies présentes dans le derme sont libérées et aspirées par le phlébotome. Par ailleurs, le sang est nécessaire à la maturation des œufs.

Notons que Rioux *et al.*, ont montré en 1969, que *P. ariasi* présentent un phototactisme positif et que ce comportement est d'autant plus marqué chez les femelles. Certaines espèces de phlébotomes sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons ou les abris des animaux comme *P. papatasi*, tandis que d'autres sont exophiles comme *P. perniciosus* (Depaquit *et al.*, 1999).

### c) Cycle de vie

Les phlébotomes sont holométaboles et leur cycle de vie, d'une durée de 35 à 60 jours, comprend une métamorphose complète. La durée du cycle gonotrophique varie en fonction des espèces, des facteurs environnementaux comme la température et l'humidité et de la quantité de sang ingérée (Volf *et al.*, 2011).

L'accouplement des phlébotomes se fait à proximité des zones de repos et a lieu avant ou après le repas sanguin selon les espèces. Cinq à dix jours sont nécessaires avant que la femelle pondre 100 à 110 œufs dans des gîtes larvaires. Ces derniers sont caractérisés notamment par une abondance de matière organique (par exemple des fèces de lapin), une humidité favorable et une température aux alentours de 26 à 30°C. Le contact avec une surface humide est le stimulus qui provoque l'oviposition. Les œufs éclosent quatre à 17 jours après leur ponte pour donner des larves (Dolmatova *et al.*, 1972). Quatre stades larvaires d'environ trois semaines se succèdent. La larve reste dans le substrat du lieu de ponte, dans lequel elle s'enfonce. Avant la nymphose, la larve de stade IV remonte en surface dans des endroits faiblement humides. Une fissure apparue sur l'aspect dorsal de la cuticule de la larve IV va permettre la sortie de la nymphe, qui s'accroche au substrat *via*

son exuvie larvaire, restée fixée à son abdomen. Le stade nymphal dure de sept à dix jours avant l'émergence de l'imago. La durée du cycle peut s'allonger en cas de diapause hivernale qui survient lorsque les conditions de développement ne sont pas favorables. Cette diapause concerne l'œuf ou les stades larvaires, mais se produit la plupart du temps au quatrième stade larvaire. Les femelles vivent en moyenne deux semaines à deux mois alors que la durée de vie des mâles est plus courte.

### **C. Les hôtes mammifères**

De nombreuses espèces de mammifères ont été décrites comme hôtes voire réservoirs de l'agent pathogène. Ainsi, des cas de leishmaniose ont été identifiés chez des carnivores dont les félidés, des primates dont l'Homme, des marsupiaux, des lagomorphes, des rongeurs, des chiroptères et des chevaux (Roque *et al.*, 2014 ; Souza *et al.*, 2014 ; Tsakmakidis *et al.*, 2017). Les auteurs s'accordent pour dire que le chien, *Canis familiaris*, est le réservoir principal de *L. infantum* dans le monde (Alemayehu *et al.*, 2017). Néanmoins, des travaux de recherche sont encore en cours et confirmer le rôle réservoir d'un hôte est complexe et est souvent défini pour une localité et sur une période donnée. En effet, comme le décrivent Roque *et al.*, (2014), la dynamique d'infestation des leishmanies est dépendante de facteurs liés aux hôtes (espèces, maladies concomitantes, sexe, âge, comportement), au parasite (temps de génération, caractéristiques moléculaires et biologiques), à l'exposition (taille de l'inoculum) et aux conditions environnementales.

### **D. Les modalités de transmission et les facteurs influençant la qualité de l'inoculum**

La principale voie de transmission de *Leishmania* spp. est vectorielle, à la faveur de la piqûre d'une femelle de phlébotome. Néanmoins, comme les leishmanies ne sont pas seulement dans le sang périphérique, mais aussi dans la peau, les muqueuses, la salive, le tractus génital, le sperme et les organes, d'autres modalités de transmission ont été décrites par Quinnell *et al.*, (2009). Ainsi, chez le chien, des auteurs ont mis en évidence une

transmission congénitale (Rosypal *et al.*, 2005), vénérienne (Silva *et al.*, 2009) après transfusion sanguine (De Freitas *et al.*, 2006) ou encore après une morsure d'un autre chien (Naucke *et al.*, 2016). Chez l'Homme, il existe aussi des cas liés à des transplantations d'organes et au partage de seringues chez les toxicomanes. D'après Quinnell *et al.*, (2009), certains auteurs ont également étudié l'éventualité d'une transmission vectorielle par d'autres arthropodes comme *Rhipicephalus sanguineus* et *Ctenocephalides* spp., bien que leur rôle vectoriel n'ait jamais été confirmé pour l'instant.

D'après Giraud *et al.*, (2019), l'inoculum d'un phlébotome infesté par *L. infantum* contiendrait en moyenne 268 promastigotes (tous stades confondus). Les inocula les plus riches en formes métacycliques, c'est-à-dire en formes infestantes, sont aussi ceux qui contiennent, proportionnellement, le moins de parasites. Ainsi, les inocula contenant  $10^2$  ou  $10^3$  promastigotes sont composés d'environ 89% de formes métacycliques alors que les inocula contenant plus de  $10^3$  promastigotes n'en ont que 63% en moyenne. Les phlébotomes demeurent infestants après plusieurs piqûres (au moins dix voire plus) et la qualité de l'inoculum augmente au fur et à mesure. Ils ont également montré que la composition de l'inoculum conditionne le devenir de la maladie. En effet, ceux qui contiennent les plus grandes proportions de formes métacycliques attirent plus de macrophages, car la libération de chémokines CCL3 est plus importante. Néanmoins, les phlébotomes délivrant de riches inocula moins infestants ont un rôle important dans la transmission de la maladie, dans la mesure où ils sécrètent et régurgitent plus de protéophosphoglycane filamenteux (facteur favorisant le développement et l'inoculation du parasite chez l'hôte) et qu'ils ont tendance à piquer davantage que les autres (Giraud *et al.*, 2019).

### **E. Cycle de *Leishmania infantum***

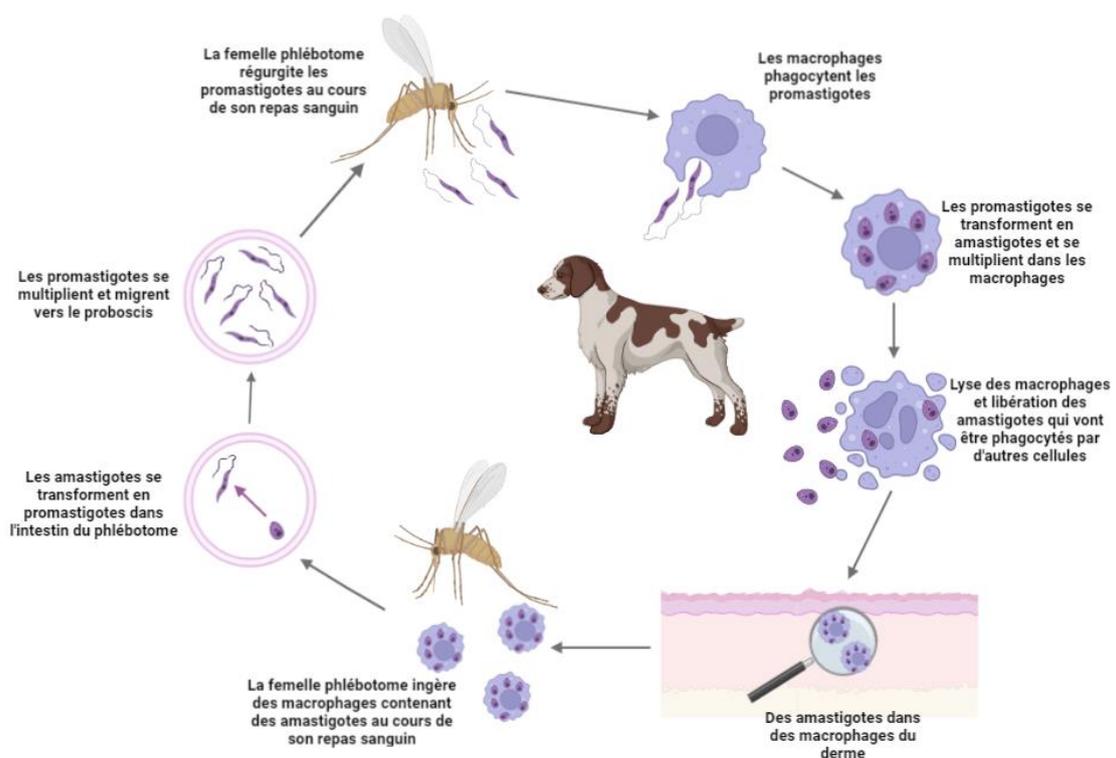
Les leishmanies sont des parasites à cycle dixène. Ce dernier nécessite donc deux hôtes, le phlébotome, vecteur biologique où la forme promastigote évolue et un hôte vertébré, où l'on retrouve la forme amastigote (Figure 6).

Pendant le repas sanguin sur l'hôte vertébré, le phlébotome insère sa trompe dans le derme, à une profondeur de 0.26 à 0.32 mm, dilacère les tissus et les parois des capillaires sanguins. D'après Bates, (2007), ceci libère les macrophages auparavant présents dans le derme et contenant des amastigotes, ou des amastigotes libres, qui se retrouvent alors dans le lac sanguin qui est ensuite aspiré par le vecteur.

Au sein du phlébotome, la baisse de température et la hausse de pH liées au changement d'hôte déclenchent le passage de la forme amastigote à promastigote procyclique en 12 à 18 heures. Elle est caractérisée par un parasite faiblement mobile et qui se réplique dans le sang aspiré, au niveau de l'intestin moyen du phlébotome. Ceci est favorisé par la formation d'une matrice péritrophique sécrétée par l'épithélium de l'intestin moyen et composée de chitine et de protéines. Quatre jours plus tard, les promastigotes procycliques vont ralentir leur multiplication et se différencier en une forme allongée et très mobile, les nectomonades. Ces derniers sont capables de s'accrocher aux villosités de l'intestin moyen grâce, entre autres, à un de leur glycoconjugué de surface, le lipophosphoglycane. Il se lie à une galactine présente sur l'épithélium intestinal. A partir du septième jour, ces formes vont migrer, en franchissant l'aspect antérieur de la matrice péritrophique à la faveur de chitinases produites par les promastigotes puis en rejoignant la valve du stomodeum séparant l'intestin moyen de l'intestin antérieur. Les nectomonades se transforment en leptomonades, des formes plus petites et qui terminent la phase de réplication. Les leptomonades sont également à l'origine de la sécrétion d'un gel. Celui-ci, constitué en grande partie d'un protéophosphoglycane, dilate et obstrue l'intestin antérieur du phlébotome, contient les promastigotes et est à l'origine du phénomène de régurgitation permettant la transmission des leishmanies à l'hôte. Par ailleurs, certains des leptomonades et nectomonades s'attachent à la valve du stomodeum et se différencient en haptomonades qui eux, s'attachent à l'épithélium intestinal *via* leur flagelle. Ces haptomonades faciliteraient la mise en place du gel. Enfin, certains des leptomonades se différencient en promastigotes métacycliques qui sont le stade infestant pour les hôtes. Une détérioration de la chitine de la valve du stomodeum associée à des pompes du pharynx et de l'armature cibariale facilite le reflux des promastigotes

métacycliques et leur ascension vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis, d'où ils sont ensuite régurgités.

Finalement, lorsqu'une femelle phlébotome pique son hôte, elle inocule des promastigotes mais aussi de la salive et du gel de promastigote. La salive a des propriétés vasodilatatrices et anti-hémostatiques et le gel de promastigote modulerait la réponse immunitaire de l'hôte, favorisant ainsi l'inoculation, la survie et la réplication des leishmanies. Le promastigote métacyclique inoculé rejoint alors un phagocyte mononucléé et se différencie en forme amastigote. En position intracellulaire, les amastigotes vont se diviser par scission binaire jusqu'à provoquer une lyse cellulaire et sont alors libérés dans le sang (Kaye *et al.*, 2011).



**Figure 6.** Cycle de vie de *Leishmania infantum*. Source : schéma original réalisé grâce à BioRender.com (consulté le 28/08/22).

## II. La leishmaniose canine

### A. Facteurs de risque

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence des facteurs de risque de portage du parasite et de développement d'une forme symptomatique de la maladie. Certaines caractéristiques de l'hôte et de l'environnement vont favoriser le contact entre l'hôte et le vecteur et donc l'inoculation du parasite. D'autres vont influencer son devenir au sein de l'organisme, avec notamment la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice ou délétère. En effet, les animaux séropositifs voire malades développeraient une réponse immunitaire mixte Th1 et Th2 associée à une immunosuppression à l'origine d'une baisse d'efficacité de la réponse immunitaire. D'après l'étude de De Almeida Leal *et al.*, (2014), les animaux qui parviendraient à éliminer le parasite ont une réponse immunitaire majoritairement de type Th1, considérée comme protectrice.

## **1. Les caractéristiques de l'hôte**

### **a) L'âge**

L'âge a une influence sur la séropositivité des chiens testés. Néanmoins, deux avis divergent. Cortes *et al.*, (2012), et Rombolà *et al.*, (2021), mettent en évidence un pic de séropositivité autour de cinq à huit ans alors que Gálvez *et al.*, (2010), décrivent une distribution bimodale, avec des animaux majoritairement atteints de un à deux ans puis de sept à huit ans. D'après Cortes *et al.*, (2012), et Rombolà *et al.*, (2021), les chiens âgés ont eu plus de contacts avec les phlébotomes au cours de leur vie, ont été plus souvent à l'extérieur que les jeunes et ont donc plus de risque d'être infestés. Selon Belo *et al.*, (2013), il se peut également que la période de séroconversion soit très longue et que certains jeunes animaux infestés soient négatifs, car testés avant la séroconversion. Dans l'étude conduite par Rombolá *et al.*, (2021), la distribution bimodale observée serait liée à un biais, car les chiens inclus étaient de race Boxer, connue pour être à risque de développer une leishmaniose et ce dès le plus jeune âge (Rombolà *et al.*, 2021).

## **b) Le sexe**

Les auteurs ne s'accordent pas quant à l'influence du sexe sur la séropositivité des chiens. En effet, Cortes *et al.*, (2012), ne trouvent pas de différence significative entre mâle et femelle, alors que Rombolà *et al.*, (2021), montrent que les chiens mâles sont plus à risque, dans la mesure où ils auraient plus tendance à avoir un comportement de fugue voire d'errance dans leur milieu de vie et qu'ils sont plus souvent utilisés comme chien de garde, donc plus souvent à l'extérieur que les femelles.

## **c) Le pelage**

Les études montrent que les chiens à pelage court ou mi-long sont plus à risque d'être séropositifs (Cortes *et al.*, 2012 ; Rombolà *et al.*, 2021). En effet, les phlébotomes ont tendance à piquer les chiens sur les zones glabres du corps. Par ailleurs, les longs poils seraient à l'origine d'une baisse de l'émission de CO<sub>2</sub> et de radiations associées à la chaleur émise par le corps, ce qui rend les chiens moins attractifs pour les phlébotomes (Belo *et al.*, 2013 ; Rombolà *et al.*, 2021).

## **d) Le type d'activité**

Les chiens de garde sont plus à risque que ceux vivant en intérieur strict dans la mesure où ils sont plus en extérieur et donc plus en contact avec le vecteur. Ainsi, l'étude de Almeida Ado *et al.*, (2012), a montré qu'ils avaient 1.78 fois plus de risques d'être séropositifs que les autres. De plus, les chiens de chasse sont également deux fois plus à risque. En effet, ils passent beaucoup de temps en extérieur et vivent souvent en meute. Or, il a été démontré que la cohabitation avec d'autres chiens était également un facteur de risque (Rombolà *et al.*, 2021).

## **e) La race**

Toutes les races de chiens peuvent être atteintes par la leishmaniose. Néanmoins, des études ont montré que les chiens croisés sont moins à risque d'être séropositifs que les pures

races et que parmi les pures races, certaines seraient plus susceptibles de développer une leishmaniose clinique que d'autres. Par ailleurs, des races endémiques dans certaines régions, comme le Podenco d'Ibiza dans les îles Baléares, seraient plus résistantes à l'infestation. Cela pourrait s'expliquer par la pression de sélection qui s'est opérée sur ces races depuis des années et qui a favorisé les individus résistants (Rombolà *et al.*, 2021). Des races comme les Boxers, les Cockers Spaniels, les Rottweilers, les Bergers allemands et les Dogues allemands sont considérées comme plus sensibles à l'infestation (Solano-Gallego *et al.*, 2009 ; Belo *et al.*, 2013).

#### f) La génétique

Comme décrit ci-dessus, les chiens croisés et de certaines races présentent le même niveau d'exposition au parasite que les autres, mais développent moins la maladie parce qu'ils ont une immunité protectrice (Saridomichelakis *et al.*, 2009). Ainsi, d'après l'étude de Solano-Gallego *et al.*, (2000), le Podenco d'Ibiza, considéré comme plus résistant à la leishmaniose, a une réponse à médiation cellulaire prédominante et particulièrement efficace contre le parasite. Des auteurs se sont intéressés à l'influence de la génétique sur la réponse immunitaire mise en place face aux leishmanies.

Ainsi, certains gènes sont étudiés plus particulièrement. Par exemple, le gène CBD1 (Canine  $\beta$ -defensin-1) qui participe à la mise en place d'une immunité innée efficace et dont le polymorphisme nucléotidique pourrait être considéré comme un marqueur de résistance ou susceptibilité d'après De Vasconcelos *et al.*, (2019). En effet, il code pour des défensines produites par les cellules épithéliales et les neutrophiles. Ces protéines jouent un rôle important dans l'immunité innée à travers leurs effets chimiotactique, antimicrobien et régulateur. L'effet chimiotactique est notamment important pour attirer les cellules dendritiques sur le site d'inoculation. L'étude de Da Silva *et al.*, (2017), met en évidence l'importance de quatre paires de bases et leur génotype associé dans la résistance à l'infestation par les leishmanies.

Par ailleurs, un des gènes dont le polymorphisme est le plus souvent associé à une susceptibilité à la leishmaniose dans la littérature est le gène NRAMP1, également appelé Slc11a1 (« solute carrier family 11 member a1 ») et qui code pour un transporteur membranaire d'ions. D'après Saridomichelakis *et al.*, (2009), et Da Silva *et al.*, (2017), il participerait à l'activation des macrophages *via* la régulation de la production de chémokines comme l'interleukine (IL) IL-1b, l'induction de l'oxyde nitrique synthase, la production des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, de TNF- $\alpha$  et de monoxyde d'azote.

Enfin, il existe certains gènes codant pour des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, comme le gène DLA-DRB1\*01502 dont l'expression est positivement corrélée au risque d'infestation et au titre d'immunoglobulines (Ig) G (Saridomichelakis *et al.*, 2009).

#### **g) Maladies concomitantes**

D'après Saridomichelakis *et al.*, (2009), de nombreux cas de chiens ayant des maladies concomitantes existent, avec notamment des animaux atteints d'infestations parasitaires (ehrlichiose, dirofilariose, babésiose...), des affections à médiation immune (pemphigus foliacé, lupus érythémateux), des endocrinopathies (dont l'hypothyroïdisme) et des néoplasies (hémangiosarcome, lymphome...). Néanmoins, en région endémique, la prévalence de la maladie est telle qu'il est logique qu'on la trouve associée à de nombreuses autres pathologies. Cependant, une co-infection avec la leishmaniose canine semble favoriser le développement d'autres maladies. Elle est à l'origine d'une immunosuppression favorisant la sortie de latence des agents pathogènes ou l'apparition d'une infestation, notamment pour *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* et *Demodex canis*. De plus, il est également possible que les chiens soient d'abord atteints d'une maladie autre que la leishmaniose, qui affecte le système immunitaire qui n'est alors plus ou pas assez efficace pour lutter contre les leishmanies, lors d'une infestation ultérieure. C'est d'ailleurs une des hypothèses avancées pour expliquer le fait que les animaux âgés soient plus touchés par la

maladie. Enfin, les traitements utilisés dans la prise en charge des maladies dysimmunitaires peuvent également favoriser l'infestation et le développement du parasite au sein de l'hôte.

## **2. L'influence de l'environnement**

### **a) Microclimat favorable au vecteur**

Les auteurs s'accordent pour dire que certains microclimats sont favorables à la survie du vecteur. Ainsi, Cortes *et al.*, (2012), ont mis en évidence un gradient de séropositivité de la côte méditerranéenne vers l'intérieur du pays. En effet, en France, par exemple, les chiens vivant dans les Cévennes sont plus à risque que ceux vivant en zone côtière. Ceci serait dû au fait que les conditions de température et d'humidité créent un microclimat favorable aux phlébotomes dans cette région.

## **3. Zone urbaine ou rurale**

L'étude de De Almeida Ado *et al.*, (2012), menée au Brésil a montré que la présence de champs de culture à proximité du lieu de vie des chiens majorait le risque d'être séropositifs de 1.68 fois. En effet, il semblerait que la présence de cultures ou de zones boisées favoriseraient la survie des vecteurs, comme l'indiquent Belo *et al.*, (2013).

## **4. Présence d'animaux de ferme**

Certains auteurs s'intéressent à la cohabitation des chiens, principaux réservoirs, avec d'autres animaux, notamment les animaux de ferme. Ainsi, une étude a mis en évidence l'influence, bien que non significative, de la présence de volailles à proximité. En effet, d'après Belo *et al.*, (2013), l'accumulation de matières organiques associée à ces élevages favorise le bon déroulement du cycle du vecteur et donc la potentielle infestation des chiens. Pour Alexander *et al.*, (2002), au contraire, la présence de volailles serait protectrice dans la mesure où elles peuvent servir de source de repas sanguin aux phlébotomes sans que les leishmanies puissent y effectuer leur cycle.

## 5. Mode de vie

D'après Cortes *et al.*, (2012), les chiens ayant accès à l'extérieur ou vivant en extérieur strict sont plus à risque d'être contaminés, ayant plus de contact avec les vecteurs. Ils sont également des réservoirs du parasite et participent à son expansion géographique (Belo *et al.*, 2013). Ainsi, l'étude menée par De Almeida Ado *et al.*, (2012), au Brésil a montré que les chiens vivant en extérieur strict avaient 3,19 fois plus de risques d'être séropositifs que les autres.

### B. La réponse immunitaire de l'hôte

#### 1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire non spécifique, également appelée innée, est la première ligne de défense de l'hôte contre les leishmanies. Elle met en jeu des cellules telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, mais également des cytokines et la cascade du complément. Les cellules de l'immunité innée permettent de détruire directement le parasite et produisent des cytokines favorisant l'élimination du pathogène. D'après Hosein *et al.*, (2017), cette immunité permet également l'installation d'une réponse immunitaire adaptative spécifique et de longue durée.

##### a) Les polynucléaires neutrophiles : premiers arrivés sur le site d'inoculation

Les neutrophiles sont les premières cellules présentes en masse au site d'inoculation. Selon Pereira *et al.*, (2017), ils peuvent être protecteurs mais aussi délétères, en fonction de la génétique de l'hôte et de l'espèce de parasites incriminée.

Les neutrophiles ont de multiples stratégies de destruction des parasites, grâce à des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs. Ainsi, ils peuvent phagocyter les agents pathogènes et les détruire dans leurs phagolysosomes contenant des dérivés oxygénés et des agents microbicides. Ceci implique les mécanismes de stress oxydatif ou l'exocytose d'élastases (Pereira *et al.*, 2017). D'après l'étude de Toepp *et al.*, (2020), les neutrophiles produisent

également de l'IL-8 qui favorise la mise en place d'un NET (« neutrophil extracellular trap »). Goggs *et al.*, (2019), décrivent le NET comme un complexe filamentaire composé en grande partie de chromatines décondensées et éjectées dans l'espace extracellulaire et de protéines antimicrobiennes comme les élastases, les cathepsines et les myéloperoxydases. Une fois les leishmanies phagocytées, les neutrophiles produisent également du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  qui recrutent et activent les macrophages.

D'après Hosein *et al.*, (2017), la viabilité des neutrophiles et la production des dérivés oxygénés diminue dans les stades finaux de la maladie.

#### **b) Les macrophages : hôtes et destructeurs du parasite**

Les macrophages sont les principaux effecteurs qui phagocytent les parasites et permettent de l'éliminer.

D'après Saridomichelakis *et al.*, (2009), les leishmanies présentes dans le derme vont adhérer aux molécules du complément présentes à la surface des macrophages puis être phagocytées. Après phagocytose, les leishmanies sont contenues dans des vacuoles parasitophores dont la structure se rapproche de celle d'un phagolysosome (Pereira *et al.*, 2017). D'après Toepp *et al.*, (2020), le macrophage produit alors des dérivés oxygénés qui permettent la destruction des parasites et empêchent le développement de la maladie. Les macrophages produisent notamment de l'oxyde nitrique (NO) grâce à l'oxyde nitrique synthase, qui convertit un des nitrogènes terminaux du groupe guanidine de la L-arginine en NO (Hosein *et al.*, 2017). D'après Saridomichelakis *et al.*, (2009), cette production est dépendante de l'expression suffisamment importante de la molécule de surface B7. Par ailleurs, d'après l'étude de Toepp *et al.*, (2020), les macrophages produisent de l'IL-12 qui favorise la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative protectrice de type Th1, qui peut être mesurée par la prolifération de LT-CD4+ et la production d'IFN- $\gamma$ , qui à son tour stimule les macrophages.

Les macrophages reconnaissent les PAMPs (« pathogen associated molecular patterns ») des parasites *via* de nombreux types de récepteurs dont les TLRs (« toll-like receptors»), qui

sont parmi les plus décrits dans la littérature. Le rôle de ces TLRs est très complexe tant ils participent à l'élimination du parasite, mais aussi à la pathogénicité de la maladie. Ce sont des récepteurs transmembranaires, présents chez les phagocytes et les cellules présentatrices d'antigènes (Hosein *et al.*, 2017). L'expression de ces TLRs peut conduire à l'activation ou à l'inhibition des cellules effectrices et à la production de cytokines pro-inflammatoires, d'IFN de type 1, de chémokines et de molécules de costimulation. Ils permettent notamment la production d'IL-12. Peu d'études ont été réalisées sur l'implication des TLRs dans l'évolution de la leishmaniose canine. Néanmoins, d'après Hosein *et al.*, (2017), la baisse de l'activation des TLRs est associée à une progression de la maladie, sauf pour le TLR-2. Ainsi, d'après Toepp *et al.*, (2020), une étude a montré que le TLR-4 est impliqué dans la production des dérivés réactifs oxygénés limitant la croissance du nombre de parasites. La présence d'un grand nombre de TLR-2 serait quant à elle associée à la progression de la maladie chez le chien (Hosein *et al.*, 2017).

#### **c) Les cellules dendritiques : cellules présentatrices d'antigènes professionnelles**

Les cellules de Langerhans sont un type de cellules dendritiques qui sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. D'après l'étude de Papadogiannakis *et al.*, (2015), alors que les neutrophiles et les macrophages ont gagné le site d'inoculation, les cellules de Langerhans présentes dans l'épiderme rejoignent le derme, attirées par les cytokines et les chémokines produites par l'hôte et le parasite. Elles phagocytent les leishmanies, migrent vers les nœuds lymphatiques drainant la zone et présentent les antigènes parasitaires aux lymphocytes T, grâce aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II présentes à leur surface. Les cellules dendritiques produisent également de l'IL-12.

#### **d) La lyse directe des leishmanies *via* l'action du complément**

D'après l'étude de Tirado *et al.*, (2021), la lyse directe du complément a un rôle majeur dans le contrôle de l'infestation dans la mesure où elle permet la destruction d'une grande

partie des parasites inoculés par le vecteur. Le système du complément est composé de protéines plasmatiques et membranaires. Il peut être activé par trois voies : classique, alternative ou *via* les lectines. La voie classique est activée après reconnaissance d'anticorps liés à la présence du parasite. La voie des lectines est déclenchée après reconnaissance de PAMPs, comme le mannose, par des lectines. Enfin, la voie alterne est directement initiée par fixation d'une des protéines du complément sur le pathogène. Une fois le complément activé par une de ces trois voies, le complexe protéique C3 convertase clive le C3 en C3a et C3b, ce qui conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire qui crée des pores à la surface des leishmanies, à l'origine de leur destruction.

En plus de permettre la destruction des parasites, le complément est également à l'origine de leur opsonisation, ce qui favorise leur adhésion aux cellules hôtes et donc leur phagocytose.

#### **e) Les mécanismes d'échappement à l'immunité innée**

La pression de sélection a favorisé l'apparition d'espèces de leishmanies ayant de multiples mécanismes d'échappement à l'immunité innée. Ainsi, le lipophosphoglycane (LPG) et la glycoprotéine-63 sont d'importants facteurs de résistance pour le parasite. D'après Tirado *et al.*, (2021), certaines espèces de leishmanies ont développé des mécanismes d'échappement à l'action du complément. En effet, le lipophosphoglycane se lie au C3b, permettant la mise en place du complexe d'attaque membranaire. Cependant, par son action, le LPG entraîne un mauvais positionnement du complexe d'attaque membranaire sur la paroi du parasite, en bloquant l'insertion de la protéine C5b-9, ce qui rend impossible son action. Par ailleurs, la glycoprotéine-63 favorise le dépôt de la protéine C3 mais inactive le C3b ce qui empêche la mise en place du complexe d'attaque membranaire.

Enfin, les leishmanies semblent également bénéficier de l'action des neutrophiles. D'après Toepp *et al.*, (2020), ces derniers ont un rôle de cheval de Troie pour les parasites, car ils sont ensuite phagocytés par les cellules du système des phagocytes mononucléés, qui sont les cellules cibles des leishmanies. De plus, la phagocytose des granulocytes

neutrophiles infestés apoptotiques diminue leur nombre et donc l'activation des macrophages et des cellules dendritiques. Le NET permet aux leishmanies de rester immobilisées sur le site d'inoculation, ce qui augmente leur chance d'être phagocytées par les macrophages tout en échappant à l'action destructrice du NET *via* l'enzyme 3'-nucléotidase/nucléase (Hosein *et al.*, 2017).

## **2. La réponse immunitaire adaptative**

Les cellules de l'immunité adaptative ont un rôle important dans la lutte contre le parasite, mais aussi dans les différentes manifestations cliniques liées à la présence et au développement du pathogène chez l'hôte. Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la mise en place de l'immunité adaptative se fait à la faveur des cytokines et chémokines produites par les cellules de l'immunité innée. Ces dernières orientent également le type d'immunité adaptative prépondérante.

### **a) La réponse à médiation cellulaire**

Une fois activées, les cellules présentatrices d'antigènes vont migrer jusqu'au nœud lymphatique le plus proche où elles vont interagir avec les lymphocytes T (LT) naïfs (LTh0), dans la zone T du nœud lymphatique. Ainsi, d'après l'étude de Papadogiannakis *et al.*, (2015), en conditions expérimentales, des amastigotes ont été retrouvés 96 heures après inoculation dans les nœuds lymphatiques drainants et la rate de chiens infestés. Les cellules présentatrices d'antigènes ont, à leur surface, des glycoprotéines qui font partie du CMH. Les molécules du CMH de classe II présentent les antigènes exogènes aux LTh0. Les lymphocytes T naïfs ont tous des récepteurs TCR spécifiques à un antigène. Les cellules présentatrices d'antigènes vont effectuer une étape de sélection clonale où elles vont établir de brefs contacts avec des LT naïfs jusqu'à mettre en place une liaison forte avec le LT qui aura le TCR avec la plus grande affinité pour l'antigène présenté. Ce lymphocyte est alors activé et rentre dans l'étape d'amplification clonale où il va se multiplier à la faveur de l'IL-2. Dans le contexte d'une infestation causée par les leishmanies, les lymphocytes activés

secrètent de l'IL-12 et de l'IFN- $\gamma$  qui oriente la différenciation du LT CD4 + en LTh1 ou de l'IL-4 qui l'oriente vers une réponse de type Th2.

Dans la littérature, une réponse immunitaire avec des LTCD4+ de type Th2 est souvent associée à la progression de la maladie. Saridomichelakis *et al.*, (2009), montrent que les chiens présentent souvent un profil mixte de type Th1 et Th2 mais que la prépondérance du type Th1 est associé à une résistance au parasite. Néanmoins, d'après Hosein *et al.*, (2017), l'environnement de cytokines est variable d'un organe à l'autre et l'orientation de la réponse cellulaire de type Th1 ou Th2 est plutôt dépendante de l'organe.

D'après l'étude de Toepp *et al.*, (2020), les LT CD4+de type Th1 ont un rôle important dans l'activation des macrophages et la destruction des parasites *via* la production de l'IL-12, du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$ . Ainsi, l'effecteur Th1 activé rentre en contact avec le macrophage infesté, produit de l'IFN- $\gamma$  et exprime à sa surface le ligand CD40, ce qui de façon synergique, conduit à déclencher l'activité microbicide du macrophage. Les LT CD4+ de type Th1 produisent également de l'IL-2 qui exerce un rétrocontrôle positif sur leur prolifération.

D'après ces mêmes auteurs, les lymphocytes Th17 jouent également un rôle pro-inflammatoire lors de la réponse immunitaire innée. En effet, ils produisent de l'IL-17 qui permet le recrutement des neutrophiles et des macrophages sur le site d'inoculation. Cette interleukine favorise également la production d'IFN- $\gamma$  et limite celle de l'IL-10. En cas d'infestation persistante, la production d'IL-17 par les LTh17 conduit à un recrutement massif des neutrophiles sur le site d'inoculation, ce qui peut être à l'origine des dommages tissulaires rencontrés.

Lors d'infestation subclinique, les LT CD8+ prolifèrent et aident à combattre le parasite en détruisant les macrophages infestés. Néanmoins, leur action lytique conduit parfois à des dommages tissulaires. Pour prévenir cela et établir un équilibre, une très faible quantité d'IL-10 est produite, afin de réduire partiellement cet environnement pro-inflammatoire pouvant s'avérer délétère pour les tissus de l'hôte.

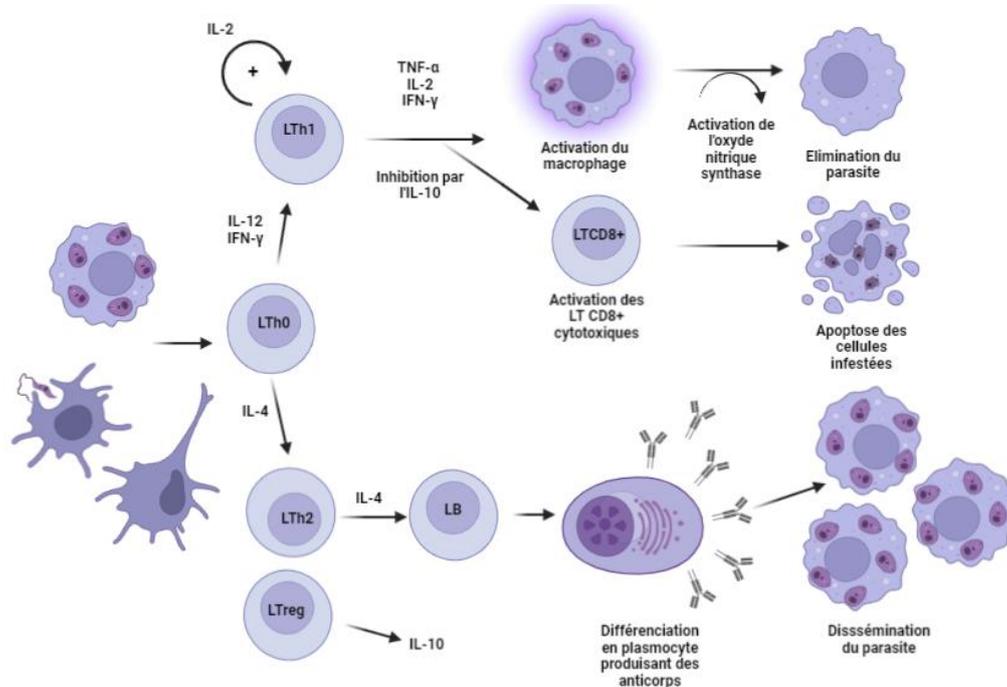
## b) La réponse à médiation humorale

D'après Toepp *et al.*, (2020), les lymphocytes B (LB) et les LT interagissent pour la lutte contre les leishmanies. Les LB produisent des anticorps, mais ont également un rôle de cellule présentatrice d'antigènes pour les LT-helpers. Au début, les anticorps produits par les LB sont spécifiques des leishmanies et permettent leur destruction *via* les phénomènes d'opsonisation permettant la phagocytose des parasites par les macrophages ou par l'activation de la voie classique du complément. Ainsi, Papadogiannakis *et al.*, (2015), montrent que, chez le chien atteint de dermatite exfoliative liée à la leishmaniose, de nombreux LB infiltrent le derme.

Le titre en anticorps est corrélé à la population de parasites et à l'intensité de l'infestation et est souvent utilisé comme facteur pronostique de la maladie par les vétérinaires (Hosein *et al.*, 2017). Chez le chien, la maladie commence généralement par une forme subclinique, avec une faible charge parasitaire, un taux élevé d'IgG1 et une faible affinité des IgG totaux pour le parasite ; puis, la maladie évolue vers une forme clinique avec une forte charge parasitaire, un taux élevé d'IgG2 et un forte affiné des IgG totaux pour le parasite. Ces IgG non spécifiques se lient aux antigènes des leishmanies et forment des immuns complexes qui vont activer la production d'IL-10 par les macrophages.

Finalement, la réponse immunitaire adaptative est régulée par un équilibre entre réaction pro-inflammatoire et réparatrice, qui parvient à maintenir, sur une certaine durée, une infestation subclinique. Néanmoins, d'après Koutinas *et al.*, (2014), quand la stimulation antigénique persiste, avec une période d'incubation de trois mois à sept ans, l'expression des cytokines et donc le profil de réponse immunitaire mis en place changent. Ainsi, les lymphocytes régulateurs (LT-reg) vont se multiplier, l'IL-10 va devenir majoritaire, ce qui inhibe la prolifération des LTCD4+ à l'origine de la réponse de type Th1, diminue la production d'IFN- $\gamma$  et donc l'activité des macrophages. D'après l'étude de Chiku *et al.*, (2016), les lymphocytes TCD4+ expriment alors divers récepteurs dont les PD-1 (programmed cell death 1) qui reconnaissent un ligand présenté par une cellule présentatrice d'antigène et CTLA-4 qui empêche la mise en place du signal d'activation des

lymphocytes T pendant la sélection clonale. Progressivement, l'inhibition de la réponse de type Th1 couplée à l'augmentation du titre en anticorps circulant va entraîner la hausse de la charge parasitaire et l'apparition de la forme clinique de la leishmaniose canine (Figure 7).



**Figure 7.** Schéma représentant l'activation et la régulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire lors de leishmaniose canine. Source : schéma original réalisé avec BioRender.com (consulté le 28/08/22).

### C. Signes cliniques

D'après Manolis *et al.*, (2009), une fois que le parasite a pénétré dans l'organisme de l'hôte vertébré, il peut directement être éliminé, ou être séquestré dans la peau et les nœuds lymphatiques, ce qui conduit à une infestation non disséminée et souvent asymptomatique ; ou encore atteindre tout l'organisme du chien, ce qui entraîne une infestation disséminée symptomatique ou asymptomatique. Les manifestations cliniques de leishmaniose canine sont très variables, dépendent de la génétique de l'hôte et du type de profil immunologique prépondérant. *Leishmania infantum* est souvent à l'origine d'une forme généralisée de la maladie, avec des atteintes cutanées, oculaires, musculosquelettiques et viscérales (Koutinas *et al.*, 2014).

## 1. Signes cliniques généraux et physiopathologie

Les signes cliniques de la maladie comprennent des symptômes généraux : amaigrissement, cachexie voire émaciation (Figure 8), anorexie ou polyphagie, léthargie, poly-lymphadénomégalie périphérique, intolérance à l'exercice, muqueuses pâles, épistaxis, splénomégalie inconstante, tardive et douloureuse, polyuro-polydypsie, hyperthermie, vomissements et diarrhée (Koutinas *et al.*, 2014). L'amaigrissement peut être causé par l'anorexie, la compétition entre l'hôte vertébré et le parasite pour des nutriments essentiels comme le tryptophane, une malabsorption intestinale ou encore être secondaire à une pathologie rénale (Manolis *et al.*, 2009).



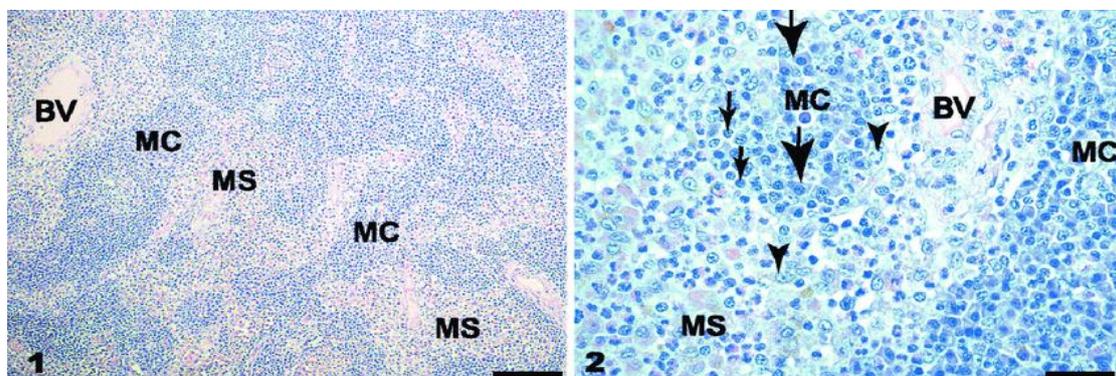
**Figure 8.** Cachexie chez un chien atteint de leishmaniose clinique. Source : Solano-Gallego *et al.*, 2011.

D'après l'étude de Lima *et al.*, (2004), au début de l'infestation, les nœuds lymphatiques présentent une corticale et une médullaire hypertrophiées, avec des hypertrophies et hyperplasies des macrophages des cordons et sinus médullaires, une réaction inflammatoire dans les sinus sous-capsulaires, une hyperplasie folliculaire corticale, de la congestion et de l'hémossidérose (Figure 9). Au contraire, dans les stades tardifs de la maladie, les nœuds lymphatiques peuvent être normaux ou hypoplasés (Solano-Gallego *et al.*, 2004 ; Manolis *et al.*, 2009).

L'épistaxis est associée à une thrombocytopathie (avec des anomalies d'agrégation plaquettaire), une augmentation de la viscosité sanguine avec une hyperglobulinémie, une rhinite avec parfois des ulcérations au niveau du philtrum ou des cavités nasales, une

vascularite voire, dans une moindre mesure, à un défaut d'hémostase lié à une production hépatique insuffisante de facteurs de coagulation (Koutinas *et al.*, 2014).

La splénomégalie est due à la prolifération et l'infiltration des cellules immunitaires dans cet organe, associée à l'hypertrophie des pulpes blanche et rouge (Manolis *et al.*, 2009).



**Figure 9.** Coupes histologiques colorées à l'hémalum-éosine d'un nœud lymphatique parotidien d'un chien atteint de leishmaniose. Source : Costa *et al.*, 2008.

MC : cordon médullaire, MS : sinus médullaire, BV : vaisseau sanguin

1 (100  $\mu$ m) : Cordons médullaires et sinus médullaires hypertrophiés par des macrophages

2 (50  $\mu$ m) : Augmentation du nombre de plasmocytes (grosse flèche), de macrophages (tête de flèche) et de lymphocytes (petite flèche) dans les cordons et sinus médullaires.

## 2. Signes cutanés

D'après l'étude de Manolis *et al.*, (2009), une atteinte cutanée est rencontrée chez près de 80 à 90% des chiens atteints de leishmaniose. Ainsi, 53 à 73% des chiens ayant une forme clinique de la maladie présentent une dermatite exfoliative (Figure 10). Elle peut être alopecique, érythémateuse, généralisée, régionale ou localisée (Koutinas *et al.*, 2014). Elle est caractérisée par de nombreuses squames de grande taille et brillantes (« furfur amiantacé »), de l'hyperkératose (Figure 11), de la xérose cutanée, de l'érythème, de l'hyperpigmentation et parfois de l'alopecie (Manolis *et al.*, 2009). D'autres types d'atteintes cutanées sont possibles, avec notamment une dermatite ulcérate, une dermatite nodulaire, une dermatite proliférative, une dermatite papuleuse (Figure 12) et une onychogryphose (Figure 13), (Manolis *et al.*, 2009 ; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Dans le cas de la dermatite nodulaire, des nodules sous-cutanés, non douloureux, de quelques centimètres de diamètre peuvent être palpés et sont liés à la prolifération des macrophages dans le derme. Ils ne doivent pas être confondus avec les chancres d'inoculation qui sont les zones de piqûres des phlébotomes. Plus rarement, les chiens infestés peuvent présenter une dermatite

pustuleuse, une dépigmentation nasale, une hyperkératose nasodigitée, une panniculite, une dermatite de léchage, une alopecie *aerata* et un érythème multiforme (Koutinas *et al.*, 2014). Par ailleurs, les chiens malades peuvent présenter des pyodermites secondaires, superficielles ou profondes et un développement plus important de *Malassezia pachydermatis* (Manolis *et al.*, 2009 ; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

D'après l'étude de Manolis *et al.*, (2009), cette atteinte cutanée est causée par une infiltration granulomateuse à pyogranulomateuse et le dépôt d'immuns complexes dans les différentes strates de la peau. Ainsi, les analyses histopathologiques mettent en évidence une inflammation granulomateuse voire pyogranulomateuse qui peut être périvasculaire, interstitielle, nodulaire, péri-annexielle voire panniculaire. Se retrouvent également des lésions d'hyperkératose ortho ou para-kératosique de l'épiderme, des follicules pileux et des glandes sébacées, de l'acanthosis et une ulcération de l'épiderme. L'analyse histopathologique des lésions d'onychogryphose montrent une dermatite lichénoïde, qui, comme l'hyperkératose naso-digitée, peut être considérée comme une forme localisée de dermatite exfoliative (Koutinas *et al.*, 2014).

De plus, les muqueuses peuvent s'ulcérer, avec des pertes de substance en cupules qui ont tendance à l'extension, avec un écoulement séreux riche en leishmanies pour la forme humide ou cicatrisées pour la forme sèche. Les muqueuses les plus classiquement atteintes sont celles du pavillon interne de l'oreille, des coussinets plantaires à l'origine d'une boiterie (Figure 14), des cavités nasales (Figure 15), de la bouche et du tube digestif (Koutinas *et al.*, 2014).



**Figure 10.** Dermatite exfoliative sur le pavillon auriculaire. Source : Idrissi *et al.*, 2021.



**Figure 11.** Hyperkératose nasale.  
Source : Gharbi *et al.*, 2015.



**Figure 12.** Dermatite papuleuse sur le chanfrein. Source : Lombardo *et al.*, 2014.



**Figure 13.** Onychogryphose. Source :  
Idrissi *et al.*, 2021.



**Figure 14.** Dermatite ulcérate avec perte de substance bien délimitée et relativement profonde sur le coussinet métacarpien. Source : Saridomichelakis *et al.*, 2014.



**Figure 15.** Dépigmentation nasale. Photographie originale.

### 3. Signes rénaux

La maladie rénale est également fréquente dans le cas de leishmaniose clinique et constitue même parfois l'unique manifestation de cette maladie chez le chien. Il peut s'agir d'une protéinurie asymptomatique, d'une maladie rénale chronique, d'un syndrome néphrotique voire du stade final d'une atteinte rénale, le syndrome urémique, lorsque la majorité des néphrons sont détruits (Solano-Gallego *et al.*, 2009 ; Koutinas *et al.*, 2014). Il

s'agit d'une atteinte majeure, dans la mesure où elle est la principale cause de décès des chiens atteints de leishmaniose clinique. Elle est due au dépôt d'immuns complexes sur la membrane basale des glomérules conduisant à une glomérulonéphrite, souvent mésangioproliférative ou membranoproliférative et secondairement tubulo-interstitielle voire, dans de rares cas, à de l'amyloïdose rénale. L'atteinte tubulaire est secondaire à l'atteinte glomérulaire et à l'inflammation causée par le dépôt de complexes immuns dans l'interstitium rénal et dans les membranes des tubules (Manolis *et al.*, 2009). Cette protéinurie d'abord asymptomatique conduit à une baisse ou une hausse du débit de filtration glomérulaire, qui entraîne une hypertension qui, à son tour, favorise les lésions rénales (Koutinas *et al.*, 2014 ; Braga *et al.*, 2015).

#### **4. Signes ophtalmologiques**

D'après Koutinas *et al.*, (2014), dans 3.7 à 16% des cas, il s'agit de l'unique signe clinique présenté chez le chien. Comme le décrit l'étude de Manolis *et al.*, (2009), la pathogénicité peut être liée à l'infiltration granulomateuse et lymphoplasmocytaire secondaire à la présence du parasite, au dépôt de complexes immuns, à des lésions secondaires des structures oculaires (avec par exemple, une conjonctive secondaire à une atteinte des paupières) ou à une atteinte systémique (avec par exemple, un décollement de rétine secondaire à l'hypertension artérielle systémique). L'atteinte peut concerner les conjonctives, le limbe, le corps ciliaire, l'iris, la cornée, la sclère, l'angle irido-cornéen, la choroïde et la gaine du nerf optique. On peut donc avoir une blépharite (exfoliative, ulcéralive ou nodulaire), une conjonctivite nodulaire, une kératoconjonctivite (parfois sèche) ou encore une uvéite antérieure (Figure 16). Cette dernière est une des pathologies oculaires les plus fréquentes et est caractérisée par un œdème cornéen, un myosis, un dépôt de fibrine dans la chambre antérieure et de multiples nodules au niveau de l'iris. Elle peut s'accompagner d'une uvéite postérieure, où l'animal présente une inflammation de la rétine avec des foci hyper-réfléctifs, un décollement de rétine et des signes d'hémorragie à l'étude du fond d'œil. Une uvéite peut conduire à un glaucome voire à une perte de vision. La kérato-conjonctivite sèche est également une entité fréquente dans les atteintes

ophtalmologiques liées à la leishmaniose. Les chiens présentent alors de la chassie, une cornée sèche voire ulcérée et une néovascularisation. Il semble que l'inflammation granulomateuse détruit les glandes lacrymales et de Meibomius, que les tissus atteints obstruent les canaux lacrymaux adjacents et que la leishmaniose soit à l'origine d'une hyposécrétion de larmes secondaire à une hypoesthésie de la cornée. Enfin, le décollement de rétine, la présence d'une artère rétinienne dilatée et tortueuse ou encore l'hyphéma, sont également fréquemment rencontrés et consécutifs à l'hypertension systémique et l'inflammation des structures intra ou extra-oculaires (Koutinas *et al.*, 2014 ; Solano-Gallego *et al.*, 2009).



**Figure 16.** Blépharite nodulaire et ulcéralive, conjonctivite purulente et uvéite antérieure avec opacification cornéenne et néovascularisation superficielle. Source : Koutinas, *et al.*, 2014.

## 5. Troubles musculosquelettiques

Plus rarement, des troubles musculosquelettiques peuvent être présents. Ainsi, des chiens atteints de leishmaniose peuvent présenter une boiterie consécutive à une polyarthrite érosive ou non érosive, une ostéomyélite, une polymyosite ou encore une myosite atrophique des muscles masticateurs (Figure 17). D'après l'étude de Manolis *et al.*, (2009), cette dernière montre une évolution progressive vers une amyotrophie sévère des

muscles masticateurs causée par la présence d'amastigotes et d'un dépôt de complexes immuns sur les myofibrilles, une vascularite neutrophilique et la production d'anticorps dirigés contre les fibrilles. Ceci cause une inflammation granulomateuse et/ou lymphoplasmocytaire à l'origine d'une atteinte dégénérative, nécrotique et fibrotique des myofibrilles (Vamvakidis *et al.*, 2000). Une polymyosite est également possible, mais, peu de cas ont été décrits dans la littérature. Elle est associée à une faiblesse musculaire, une atrophie des muscles appendiculaires, une boiterie et une intolérance à l'effort.



**Figure 17.** Atrophie bilatérale et sévère des muscles temporaux chez un chien leishmanien atteint de myosite chronique des muscles masticateurs.  
Source : Koutinas *et al.*, 2014.

Des atteintes articulaires sont également possibles, avec notamment une mono ou polyarthrite, consécutive à l'inflammation lymphoplasmocytaire à granulomateuse qui atteint la membrane synoviale due à la présence d'amastigotes et du dépôt d'immuns complexes. De plus, des cas d'ostéomyélite ont également été décrits et sont à l'origine de problèmes locomoteurs plus sévères, avec de l'ostéolyse et de l'ostéoprolifération consécutives à l'inflammation granulomateuse.

## 6. Troubles digestifs

Des troubles digestifs sont assez rarement constatés chez des chiens atteints de la maladie et souvent associés à une hépatite ou une colite chronique subclinique (Koutinas *et al.*, 2014). L'atteinte hépatique peut d'abord être localisée aux sinusoides, puis s'étendre aux espaces portes pour finalement atteindre la capsule hépatique voire diffuser sur tout l'organe (Manolis *et al.*, 2009). Les analyses histopathologiques montrent une infiltration du foie liée à l'inflammation chronique granulomateuse, la présence des parasites dans les hépatocytes ou les cellules de Kupffer, l'hypertrophie/hyperplasie des cellules résidentes, la dégénérescence vacuolaire et la nécrose des hépatocytes, de la fibrose, de la congestion passive associée et, plus rarement, de l'amyloïdose (Koutinas *et al.*, 2014 ; Manolis *et al.*, 2009 ; Rallis *et al.*, 2005).

Par ailleurs, une étude réalisée par Pinto *et al.*, (2011), a démontré la présence d'infiltrations granulomateuses sur toutes les portions de l'intestin chez des chiens symptomatiques et asymptomatiques, avec un fort taux de parasite, notamment au niveau du côlon.

## 7. Autres manifestations cliniques

D'autres manifestations cliniques, moins fréquentes, sont également décrites. Certains chiens présentent notamment des pathologies orales avec des stomatites ou glossites à nodules ou papules, de distribution multifocale. Cela est dû à la migration des macrophages dans des zones de microtraumatismes (Saridomichelakis, 2009).

Certains auteurs décrivent des cas de pathologies cardiopulmonaires associés à la leishmaniose avec notamment des myocardites, des péricardites fibrineuses et des cas de pneumonie, bien que le lien entre le parasite et ces atteintes n'ait pas été prouvé. D'après Manolis *et al.*, (2009), les cas de pneumonies, bien que très rares, sont liés au dépôt d'immuns complexes et à des infections secondaires à l'immunosuppression. Les atteintes myocardites seraient consécutives à l'infiltration granulomateuse, le dépôt d'immuns complexes et l'hypertension artérielle systémique.

L'étude Solano-Gallego *et al.*, (2011), décrit également des troubles vasculaires avec des cas de vascularite systémique ou de thrombo-embolisme artériel.

De plus, les leishmanies pourraient aussi être à l'origine de troubles neurologiques (cervicalgie, paraplégie, perte de conscience, changements de comportements) liés à des méningo-encéphalomyélites avec des méningites granulomateuses et/ou neutrophiliques, des dépôts d'immuns complexes dans les méninges, des granulomes dans le système nerveux central et des accidents vasculaires cérébraux (Manolis *et al.*, 2009 ; Koutinas *et al.*, 2014).

Enfin, la leishmaniose est également à l'origine de pathologies de l'appareil reproducteur mâle. Ainsi, des cas d'orchite interstitielle et lymphoplasmocytaire, avec une dégénérescence testiculaire secondaire, d'épididymite histiolympocytaire, de prostatite chronique, de balanoposthite histioplasmocytaire et d'inflammation granulomateuse du pénis ont été décrits (Manolis *et al.*, 2009 ; Koutinas *et al.*, 2014).

## **D. Signes biologiques**

### **1. Les anomalies de formule sanguine**

Une grande partie des chiens atteints de leishmaniose clinique présente également des anomalies de formule sanguine. Ainsi, une anémie non régénérative est fréquemment rencontrée, avec, dans 50 à 70% des cas, une forme normocytaire normochrome mais aussi dans de rares cas, hypochrome (Ribeiro *et al.*, 2013 ; Torrecilha *et al.*, 2016). Ainsi, une étude de Carneiro de Freitas *et al.*, (2012), a mis en évidence une diminution de la moyenne du nombre d'érythrocytes, de l'hémoglobininémie et de l'hématocrite chez les chiens atteints de leishmaniose. De nombreux mécanismes sont à l'origine de cette anémie avec notamment des hémorragies, une hémolyse, une maladie rénale chronique, une diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes, une inflammation chronique et une hypoplasie/aplasie médullaire liée à l'infiltration granulomateuse de cette dernière (Carneiro de Freitas *et al.*, 2012 ; Ribeiro *et al.*, 2013). D'après Ribeiro *et al.*, (2013), la moelle osseuse est un site important pour l'hématopoïèse et est très souvent atteinte par les

parasites. Ceci conduit à des anomalies de synthèse des érythrocytes, des leucocytes et également des plaquettes et donc, à une pancytopenie. Par ailleurs, des cas d'anémie hypochrome ont été décrits et peuvent être expliqués par un déficit en fer, consécutif à son utilisation par le parasite (Torrecilha *et al.*, 2016). De plus, d'après Paltrinieri *et al.*, (2016), l'insuffisance rénale chronique, potentiellement présente, cause une diminution de la production d'érythropoïétine. Enfin, cette étude a mis en évidence une hémolyse chez certains chiens présentant un test de Coombs positif.

Les leucocytes sont également atteints en cas de leishmaniose canine. Ainsi, on peut rencontrer des cas de leucopénie, leucocytose, neutrophilie, éosinopénie, éosinophilie, lymphopénie, lymphocytose ou encore de monocytose. La neutrophilie est liée à la réponse inflammatoire initiée après l'inoculation du parasite et à l'infiltration granulomateuse à pyogranulomateuse décrite dans les tissus et organes. L'éosinopénie peut être liée à l'infiltration granulomateuse de la moelle osseuse qui entraîne une diminution des précurseurs (Torrecilha *et al.*, 2016).

Enfin, des cas de thrombopénie et de thrombopathie ont également été mis en évidence et expliqués par l'hypoplasie ou aplasie médullaire qui entraîne une diminution du nombre de précurseurs de plaquettes (Carneiro de Freitas *et al.*, 2012 ; Petanides *et al.*, 2008). Par ailleurs, une vascularite, la présence d'anticorps antiplaquettaires à l'origine d'une destruction périphérique à médiation auto-immune et les insuffisances rénales et hépatiques peuvent être à l'origine d'une thrombopénie (Paltrinieri *et al.*, 2016 ; Abbehusen *et al.*, 2017). De plus, d'après Carneiro de Freitas *et al.*, (2012), les anticorps circulants peuvent se fixer aux plaquettes et empêcher l'appariement entre le facteur de Von Willebrand et le récepteur membranaire plaquettaire GPIb-IX ce qui bloque le phénomène d'agrégation plaquettaire.

## **2. Les anomalies biochimiques**

Les leishmanies peuvent disséminer dans de nombreux organes, dont le foie et les reins, ce qui conduit à des anomalies biochimiques.

Ainsi, des marqueurs de souffrance hépatique, comme l'activité des ASAT (aspartate aminotransférase) et des ALAT (alanine aminotransférase), sont fréquemment augmentés chez des chiens atteints de leishmaniose (Ribeiro *et al.*, 2013 ; Torrecilha *et al.*, 2016). De même pour les marqueurs de cholestase comme les phosphatases alcalines (Rallis *et al.*, 2005). De plus, d'après l'étude de Torrecilha *et al.*, (2016), une insuffisance hépatique peut également se mettre en place et être à l'origine d'une hypoalbuminémie, d'une hypotriglycémie et d'une hyperbilirubinémie. L'hypoalbuminémie peut également être liée au processus inflammatoire en cours, à une insuffisance rénale ou à un défaut d'absorption intestinale (Rallis *et al.*, 2005). D'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), une insuffisance hépatique peut également conduire à des troubles de l'hémostase à la faveur d'un défaut de production des facteurs de coagulation et de fibrinogène.

Par ailleurs, comme décrit plus haut, de nombreux mécanismes sont à l'origine d'une atteinte rénale que l'on retrouve dans les anomalies biochimiques. Ainsi, une azotémie est parfois mise en évidence, avec une hyperurémie et une hypercréatininémie (Solano-Gallego *et al.*, 2011 ; Ribeiro *et al.*, 2013). Néanmoins, l'azotémie est souvent tardive et n'est pas toujours constatée au moment du diagnostic. En effet, bien qu'une atteinte rénale soit très souvent présente, elle débute par une protéinurie souvent asymptomatique et évolue progressivement vers une azotémie. D'après Pereira *et al.*, (2020), la maladie rénale chronique devient symptomatique plus tardivement, quand de nombreux néphrons sont atteints. L'insuffisance rénale est considérée comme le principal facteur pronostic négatif. Dans cette étude, il a été démontré que 75% des chiens qui ne présentent pas d'insuffisance rénale au moment du diagnostic et qui sont correctement traités contre la leishmaniose survivent au moins 4 ans. Les atteintes rénales peuvent être classées en stade, décrits par l'«*International Renal Interest Society*» (IRIS) en 2019. Ils dépendent de la créatininémie, du taux plasmatique de diméthylarginine symétrique (SDMA), de la protéinurie et de la pression artérielle systolique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypercréatininémie est un signe tardif d'atteinte rénale et est donc peu sensible. Les auteurs ont alors recherché d'autres marqueurs permettant de détecter une insuffisance rénale plus précocement. Ainsi, la méthode permettant la meilleure estimation de la fonctionnalité rénale est la mesure du

débit de filtration glomérulaire. La concentration sérique en cystatine C, parfois utilisée comme marqueur d'atteinte rénale, ne semble pas être un bon outil dans le cadre de la leishmaniose. Des conclusions similaires ont été établies quant à l'intérêt de la SDMA comme marqueur précoce d'atteinte rénale dans un contexte de leishmaniose canine (Torrent *et al.*, 2018 ; Giapitzoglou *et al.*, 2019). Par ailleurs, d'après Paltrinieri *et al.*, (2016), des marqueurs d'hypertension et /ou d'inflammation, parfois concomitantes à l'insuffisance rénale, comme l'augmentation de la concentration sérique en homocystéine ou en endothéline I ont été décrits chez des chiens atteints de leishmaniose, mais, des études sont encore nécessaires pour déterminer s'ils sont utiles pour détecter une atteinte rénale précoce dans le cadre de cette maladie.

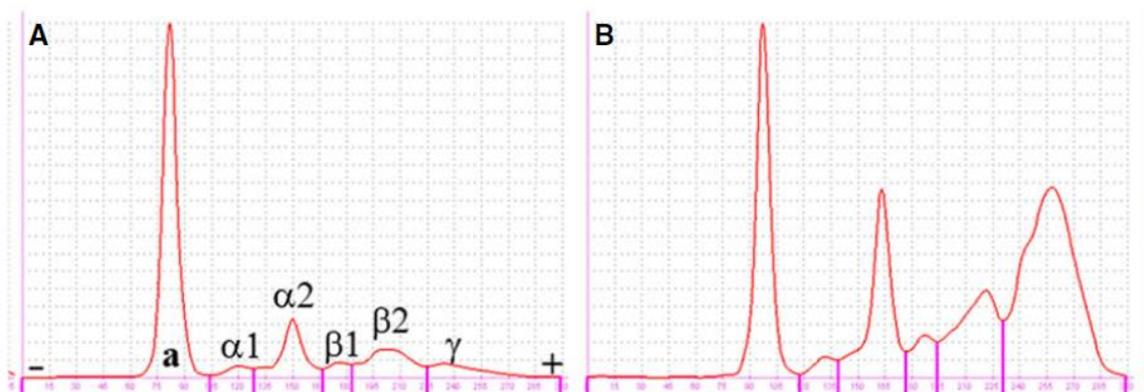
Par ailleurs, cette étude montre également que l'analyse d'urine peut également présenter des anomalies liées à l'atteinte rénale. En effet, l'atteinte tubulo-interstitielle cause une baisse de la capacité à concentrer les urines et donc une baisse de la densité urinaire. On peut également mettre en évidence une protéinurie et/ou une glucosurie avec une bandelette urinaire. De plus, il est intéressant de mesurer le rapport protéines sur créatinine urinaire chez les chiens protéinuriques afin de déterminer leur stade IRIS. Les chiens dont le rapport protéines sur créatinine urinaire est supérieur à 0.5 sont considérés comme protéinuriques. De plus, l'analyse du culot urinaire peut révéler la présence de bactéries, d'hématies ou de neutrophiles, ce qui est associé à une infection du tractus urinaire qui peut être concomitante et/ou liée à la leishmaniose. La protéinurie peut également être étudiée *via* une électrophorèse des protéines urinaires sur gel d'agarose (SDS-AGE) ou de polyacrylamide (SDS-PAGE) afin de déterminer le poids moléculaire des protéines présentes et donc d'identifier leur origine glomérulaire (haut poids moléculaire) ou tubulaire (faible poids moléculaire). Les chiens atteints de leishmaniose ont souvent un pattern mixte, avec des protéines de haut et de faible poids moléculaire, correspondant à une atteinte glomérulaire et tubulo-interstitielle. Il est également possible de mesurer l'activité des enzymes gamma-glutamyl transférase (GGT) et de la N-acetyl-b-N-glucosaminidase dans les urines pour identifier une atteinte tubulaire. En effet, ces enzymes sont présentes dans le cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires et lorsque ces dernières

sont lésées, les enzymes sont libérées, ce qui augmente leur activité mesurée dans les urines. Par ailleurs, une analyse d'urine peut montrer une élévation de la concentration urinaire en CRP (protéine C réactive), en ferritine et adiponectine, ce qui peut être lié à l'inflammation et/ou à l'atteinte rénale.

Les leishmanies sont également à l'origine de réponses inflammatoire et immunitaire qui modifient les paramètres biochimiques. Ainsi, d'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), on peut avoir une hyperprotéïnémie, une hyperglobulinémie qui peut être polyclonale ou ne concerner que les gamma ou bêtaglobulines et une hypoalbuminémie. D'après Paltrinieri *et al.*, (2016), l'hyperprotéïnémie est corrélée à la sévérité de l'atteinte clinique. L'hyperglobulinémie est associée à la production d'anticorps dirigés contre les leishmanies par les lymphocytes B. Elle est également corrélée à une hyperviscosité sanguine (Petanides *et al.*, 2008). On rencontre parfois également une diminution du rapport albumine sur globulines causé par une hypoalbuminémie liée au processus inflammatoire ou encore à une éventuelle néphropathie (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Ainsi, l'électrophorèse des protéines sériques réalisée chez les chiens atteints de leishmaniose est décrite, par Paltrinieri *et al.*, (2016), selon le pattern suivant : une hypoalbuminémie, un pic modéré en alpha-2 (qui comprend les protéines de l'inflammation aiguë) et un pic marqué en gamma (qui comprend les immunoglobulines). Parfois, un pic en bêta est présent et est lié aux anticorps circulants, aux IgM et aux protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Figure 18). Les protéines dites « positives » de la phase aiguë vont voir leur concentration sérique augmenter alors que celles des protéines dites « négatives » vont diminuer. Une des protéines « négatives » de la phase aiguë est la transferrine, qui, lorsqu'elle est déficitaire, diminue la concentration en fer et l'activité de l'enzyme paraoxonase I. Cette dernière joue un rôle dans le stress oxydatif lié à la présence du parasite. Des auteurs ont également mis en évidence une baisse de l'activité des enzymes adenosine deaminase et butyrylcholinestérase chez des chiens atteints de leishmaniose, alors qu'elles

jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire (Paltrinieri *et al.*, 2016).



**Figure 18.** Electrophorèse des protéines sériques chez un chien sain (A) et chez un chien atteint de leishmaniose clinique (B). Chez ce dernier, on note une gammopathie polyclonale avec un pic en alpha-2 et en gamma.

Source : Paltrinieri *et al.*, 2016.

### 3. Les troubles de l'hémostase

D'après Paltrinieri *et al.*, (2016), des troubles de l'hémostase, bien que rares, peuvent survenir chez des chiens parasités. En effet, les temps de thromboplastine et de prothrombine peuvent être allongés, bien que cela soit souvent causé par des facteurs pré-analytiques comme une hyperglobulinémie, qui est une anomalie fréquente en cas de leishmaniose. De plus, une hypercoagulabilité sanguine est souvent décrite dans la littérature. Elle peut être due à une perte glomérulaire d'antithrombine III chez des patients souffrant de néphropathie ou encore à l'hyperglobulinémie totale qui favorise l'hyperviscosité sanguine.

#### E. Gradation clinique

##### 1. Classification clinique proposée par le « *Canine Leishmaniasis Working Group* » (CLWG)

Le CLWG propose une classification des différents stades de la maladie en fonction de critères cliniques et des tests diagnostiques de laboratoire (Paltrinieri *et al.*, 2016). Il

propose de séparer les chiens en quatre groupes différents : les exposés, les infectés, les malades et les sévèrement malades.

**a) Les exposés**

Les chiens exposés sont asymptomatiques, ont un titrage sérologique faible et sont négatifs en PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») ou à la cytologie.

**b) Les infectés**

Les chiens infectés sont asymptomatiques, ne présentent pas d'anomalie hématologique ou biochimique, sont positifs en sérologie et chez eux, le parasite a été mis en évidence par diagnostic direct. Ils sont ainsi positifs en PCR ou à l'examen cytologique sur moelle osseuse, nœud lymphatique, rate, peau ou sang.

**c) Les malades**

Les chiens malades sont des animaux chez qui le parasite a été identifié par diagnostic direct indépendamment du titrage sérologique ou qui présentent un titrage sérologique élevé. Les chiens malades peuvent avoir un ou des signes cliniques compatibles avec la leishmaniose.

**d) Les sévèrement malades**

Enfin, les chiens sévèrement malades présentent des anomalies cliniques graves comme une néphropathie protéinurique ou une maladie rénale chronique. Ils peuvent également avoir des pathologies concomitantes, reliées ou non à la leishmaniose, comme une atteinte oculaire à l'origine d'une perte de la fonction visuelle, une atteinte des articulations à l'origine d'une baisse de la mobilité du chien et nécessitant un traitement immunosuppresseur, une co-infection, un processus néoplasique, une maladie endocrinienne ou une maladie métabolique. Enfin, les chiens chez qui les traitements initiés ne montrent pas de réponse favorable sont également dans cette catégorie.

## 2. Classification clinique proposée par le groupe LeishVet

Le groupe LeishVet propose une classification des chiens selon quatre catégories en fonction du statut sérologique, des signes cliniques et des atteintes hématologiques ou biochimiques. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), ceci a pour but d'aider le vétérinaire clinicien à déterminer le traitement approprié et donne une idée de pronostic pour chaque stade. Les traitements à envisager seront présentés ultérieurement.

### a) **Stade 1 : maladie « légère »**

Le stade 1 est défini comme une maladie « légère » pour lequel les chiens présentent des titres en anticorps négatifs à faiblement positifs, des signes cliniques modérés tels qu'une lymphadénomégalie isolée ou une dermatite papuleuse. Leurs résultats d'analyses hématologique et biochimique sont sans anomalie avec notamment des paramètres rénaux dans les normes (créatininémie inférieure à 1.4 mg/dL, pas de protéinurie et un rapport protéinurie sur créatininurie inférieur à 0.2). Le pronostic vital est bon.

### b) **Stade 2 : maladie « moyenne »**

Le stade 2 correspond à des chiens qui présentent une maladie dite « moyenne », avec des titres en anticorps faibles à élevés, des signes cliniques modérés comme précédemment ou d'autres comme des lésions cutanées diffuses ou symétriques telles qu'une dermatite exfoliative, une onychogryphose, des ulcérations (de la truffe, des coussinets, des saillies osseuses ou encore des jonctions muco-cutanées), une lymphadénomégalie généralisée, une perte d'appétit ou une perte de poids. Ces chiens ont également des anomalies de leurs profils hématologique et biochimique avec notamment une légère anémie arégénérative, une hypergammaglobulinémie, une hypoalbuminémie ou un syndrome d'hyperviscosité sanguine. On distingue alors deux sous-stades, le premier avec un profil rénal normal (créatininémie inférieure à 1.4 g/dL et un rapport protéinurie sur créatininurie inférieur à 0.5) et le second avec un profil rénal anormal (créatininémie inférieure à 1.4 g/dL mais un

rapport protéinurie sur créatininurie compris entre 0.5 et 1). Le pronostic est favorable à réservé.

**c) Stade 3 : maladie « grave »**

Dans le stade 3, les chiens présentent une maladie dite « grave ». Ils ont des titres en anticorps moyens à élevés. Ils peuvent avoir les mêmes signes cliniques qu'aux stades 1 et 2, mais également d'autres liés au dépôt d'immuns complexes, comme une uvéite ou une glomérulonéphrite. Leurs profils hématologiques et biochimiques sont anormaux avec une légère anémie arégénérative, une hypergammaglobulinémie, une hypoalbuminémie ou un syndrome d'hyperviscosité sanguine et une maladie rénale chronique de stade IRIS I (rapport protéinurie sur créatininurie compris entre 1 et 5) ou II (créatininémie comprise entre 1.4 et 2 mg/dL). Le pronostic est alors réservé à sombre.

**d) Stade 4 : maladie « très grave »**

Enfin, le dernier stade correspond à des chiens qui ont une maladie dite « grave », associée à des titres en anticorps moyens à élevés, des signes cliniques du stade 3 et éventuellement une thromboembolie pulmonaire, un syndrome néphrotique ou un stade terminal de maladie rénale chronique. Ils présentent également des anomalies hématologiques et biochimiques comme les précédents stades, une maladie rénale chronique de stade IRIS III (créatininémie comprise entre 2.1 et 5 mg/dL) ou IV (créatininémie supérieure à 5 mg/dL), voire un syndrome néphrotique (avec une protéinurie marquée mise en évidence par un rapport protéinurie sur créatininurie supérieur à 5). Le pronostic est alors très mauvais.

**F. Les méthodes de diagnostic**

Dans de nombreux contextes, des méthodes de diagnostic de leishmaniose canine sont nécessaires. Un vétérinaire praticien peut suspecter une leishmaniose clinique chez un chien qui présente des signes cliniques ou des anomalies hémato-biochimiques compatibles.

De plus, dans le cadre d'études épidémiologiques, l'objectif est de déterminer la prévalence des chiens porteurs du parasite, en zones endémiques ou non. Cela peut également être utilisé pour éviter l'importation d'animaux porteurs du parasite en zone non endémique, dans le cadre d'un test avant transfusion sanguine ou encore pour le suivi de la réponse au traitement (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

## **1. Diagnostic direct**

Les méthodes de diagnostic direct s'appuient sur la mise en évidence du parasite au sein de l'organisme du chien. Les leishmanies peuvent être observées directement avec la cytologie et l'histologie. D'autres techniques visent à détecter et amplifier le génome du parasite. Enfin, certaines études épidémiologiques utilisent la technique du xénodiagnostic, dont le but est de mettre en évidence la présence de leishmanies viables chez les chiens étudiés.

### **a) La cytologie**

La recherche directe de parasite peut s'effectuer grâce à l'analyse cytologique d'échantillons prélevés sur l'animal suspect. Le but de la cytologie est de mettre en évidence les parasites au sein des cellules infestées, voire, si le taux de parasite est élevé et que des phénomènes de lyse cellulaire ont lieu, sur le fond de lame de prélèvement.

#### **(1) Organes ou tissus analysés**

Une aspiration à l'aiguille fine peut être réalisée sur toutes lésions nodulaires ou nœuds lymphatiques hyperplasiés. Celles-ci peuvent avoir des localisations sous-cutanées ou plus anecdotiques comme la langue, les testicules, les cavités orale ou nasale. Paltrinieri *et al.*, (2016), préconisent de prélever toutes lésions nodulaires en cas de suspicion de leishmaniose clinique chez un chien présentant d'autres signes cliniques évocateurs, ou des anomalies hématologiques ou biochimiques compatibles avec cette maladie. Si aucune lésion cutanée ou nodulaire n'est présente, mais que d'autres signes cliniques font suspecter une leishmaniose, il est conseillé d'avoir recours à une analyse cytologique de tissus contenant

un grand nombre de macrophages, c'est-à-dire la moelle osseuse, les nœuds lymphatiques ou encore la rate. Par ailleurs, des lésions cutanées ulcératives peuvent être analysées après prélèvement sur calque.

## (2) Analyse des échantillons

Comme décrit plus haut, le but de la cytologie va être de mettre en évidence le parasite et éventuellement des anomalies cellulaires compatibles avec sa présence. Néanmoins, il peut être difficile de les identifier au sein de lésions ulcératives pour lesquelles la nécrose, les débris cellulaires ou encore des bactéries secondaires peuvent masquer la présence du parasite. En cas de leishmaniose, d'après Paltrinieri *et al.*, (2016), l'analyse cytologique peut révéler une infiltration granulomateuse à pyogranulomateuse des tissus, associée ou non à une infiltration lymphoplasmocytaire de la peau et des lésions nodulaires. Les nœuds lymphatiques peuvent être hyperplasiés et leur analyse cytologique met en évidence une infiltration lymphoplasmocytaire et macrophagique, associée à un nombre important de neutrophiles activés.

Au sein de la moelle osseuse, d'autres anomalies peuvent être identifiées comme une hypoplasie érythroïde associée à un pool de précurseurs normal ou à une hyperplasie myéloïde et un ratio myéloïde sur érythroïde augmentés. Une ostéomyélite peut également être mise en évidence avec une augmentation du nombre de macrophages, parfois associée à une érythro ou cytophagie, une augmentation du nombre de neutrophiles matures et une plasmocytose modérée à marquée, caractérisée par un nombre élevé de cellules plasmatiques et de lymphocytes. Enfin, de façon plus anecdotique, une dysmyélopoïèse secondaire peut être mise en évidence avec une cytopénie périphérique (érythropénie, thrombopénie) et des atypies cellulaires au sein de la moelle osseuse comme des mitoses anormales, un asynchronisme de la maturation nucléocytoplasmique ou encore une fragmentation nucléaire. Par ailleurs, l'analyse cytologique de la moelle osseuse pourrait différencier un animal infesté asymptomatique d'un animal infesté malade dans la mesure où le taux de parasites et l'importance des anomalies cytologiques seraient plus élevés chez les animaux présentant des signes cliniques. Mais les auteurs ne s'accordent pas sur cela et

l'étude de Momo *et al.*, (2014), montre que le taux de parasites n'est pas toujours corrélé à l'importance des signes cliniques. En effet, certains chiens ayant un taux de parasites élevé ne présentent pas d'anomalie clinique.

### (3) Les limites de la cytologie

D'après Gomes *et al.*, (2008), la cytologie est une méthode rapide, spécifique, nécessitant peu de matériel et peu coûteuse (sauf en personnel technique qualifié). La mise en évidence des amastigotes au sein des macrophages tissulaires confirme la présence du parasite. Néanmoins, si leur présence n'est pas associée aux patterns cytologiques couramment présents en cas de leishmaniose décrits ci-dessus, le clinicien ne doit pas exclure les autres maladies qui pourraient causer les signes cliniques identifiés. De même, si aucun amastigote n'est visualisé à la cytologie et que les signes cliniques sont fortement évocateurs ou qu'un pattern cytologique habituellement présent en cas de leishmaniose est décrit, le clinicien doit avoir recours à d'autres techniques de diagnostic direct plus sensibles comme la PCR par exemple. Ainsi, d'après Paltrinieri *et al.*, (2016), la cytologie, bien que très spécifique, est parfois limitée par sa sensibilité. En effet, le nombre d'amastigotes généralement détectés est faible à modéré (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Cette technique est plus sensible chez des chiens symptomatiques, pour lesquels la réponse immunitaire n'est pas parvenue à ralentir la multiplication du parasite au sein des tissus, ce qui explique qu'un plus grand nombre d'amastigotes soient présents et donc plus facilement décelables en cytologie (Moreira *et al.*, 2007). D'après Gomes *et al.*, (2008), la sensibilité de la cytologie dépend également de la qualité des préparations, des compétences du lecteur, du temps qu'il consacre à la lecture des lames et de la quantité de champs étudiés.

#### b) L'histologie

L'histologie permet également la mise en évidence du parasite au sein d'échantillons de tissus prélevés sur les chiens. Elle s'appuie sur la coloration des tissus et des parasites à l'hémalum-éosine. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), la leishmaniose peut être suspectée si des infiltrations granulomateuses, pyogranulomateuses ou lymphoplasmocytaires des

organes sont présentes, associées ou non à une hyperplasie des nœuds lymphatiques. D'après Moreira *et al.*, (2007), l'histologie est plus sensible sur des échantillons de nœuds lymphatiques que sur la moelle osseuse ou la rate. Cependant, c'est une technique qui a quelques désavantages par rapport aux autres. Elle est plus laborieuse et longue à réaliser et l'identification des amastigotes peut s'avérer plus difficile qu'avec la cytologie. En effet, des auteurs ont montré que cette technique était peu sensible pour détecter les amastigotes au sein d'échantillons de foie de chiens malades. En routine, l'histologie peut être utilisée sur des échantillons préalablement analysés en cytologie, présentant un pattern lésionnel compatible sans mise en évidence d'amastigotes. D'après Paltrinieri *et al.*, (2016), l'histologie permet néanmoins d'avoir des informations supplémentaires sur les patterns lésionnels présents et certaines « *guidelines* » suggèrent d'y avoir recours systématiquement.

D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), l'immunohistochimie serait plus sensible et serait donc à privilégier dans le cadre d'une démarche diagnostique, et d'autant plus sur des chiens asymptomatiques. En effet, dans l'étude de Moreira *et al.*, (2007), la sensibilité de l'immunohistochimie est de 100% sur les symptomatiques, 92.98% sur les oligosymptomatiques et 76% sur les asymptomatiques, pour une spécificité de 100%. Pour autant, l'immunohistochimie est une méthode coûteuse et assez longue, ce qui explique qu'elle soit peu utilisée en routine pour le diagnostic des animaux avec suspicion de leishmaniose.

### c) La PCR : « *Polymerase Chain Reaction* »

La technique PCR ou « *Polymerase Chain Reaction* », permet de dépister le parasite en amplifiant une séquence ADN ou d'ARN de celui-ci, à partir d'échantillons de tissus ou de fluides biologiques prélevés sur les chiens. Il existe de nombreuses techniques PCR. Les plus souvent utilisées en routine sont la PCR conventionnelle, la PCR nichée et la PCR quantitative (qPCR). La sensibilité et la spécificité de cette méthode dépendent du type d'échantillons et de PCR utilisés.

## (1) Les cibles

L'ADN des leishmanies présente une organisation particulière, utile à connaître pour comprendre comment les tests diagnostiques sont élaborés. D'après l'étude de Galluzzi *et al.*, (2018), les leishmanies possèdent 34 à 36 chromosomes et un ADN mitochondrial appelé kinétoplaste organisé en des milliers de mini-cercles et une douzaine de maxi-cercles. Comme les mini-cercles sont présents en des milliers de copies par parasite, ils sont une cible privilégiée pour les méthodes de diagnostic par détection d'ADN. Des régions de l'ADN chromosomique sont également souvent utilisées, avec notamment les gènes codant pour les ARNs ribosomiaux. Des dizaines voire des centaines de copies de ces gènes sont présentes par cellule, ce qui explique qu'ils soient une cible privilégiée des tests.

Le choix de la cible du test dépend de l'objectif de ce dernier. Ainsi, d'après De Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), le gène de la protéine HSP70 peut être ciblé pour identifier l'espèce de leishmanie alors que l'ADN du kinétoplaste est utilisé pour détecter le parasite.

La PCR quantitative en temps réel présente des avantages majeurs par rapport aux autres techniques. En effet, elle se déroule en système fermé ce qui évite les contaminations extérieures, elle présente une bonne sensibilité, même sur les échantillons avec un faible taux de parasites, et, elle permet de savoir combien de copies de séquences d'ADN ou d'ARN étaient présentes dans l'échantillon de départ. Ceci permet d'estimer le taux de parasites présents au sein de l'échantillon, ce qui peut être utile dans le cas d'un suivi d'efficacité de traitement. Travi *et al.*, (2018), décrivent la qPCR comme la méthode la plus sensible, mais, tous les auteurs ne s'accordent pas sur cela. Ainsi, dans l'étude de Francino *et al.*, (2006), les auteurs montrent que sur échantillons de moelle osseuse, la qPCR était positive pour 0.2 parasite par millilitre d'échantillon, contre 30 parasites par millilitre pour la méthode classique et qu'elle était positive pour 0.0125 parasite par millilitre de sang si la cible était l'ADN du kinétoplaste. Néanmoins, cette méthode nécessite que le laboratoire analysant les échantillons dispose du matériel nécessaire, ce qui n'est pas toujours le cas. Afin d'améliorer la sensibilité de la PCR, Duthie *et al.*, (2018), ont mis en place des protocoles de qPCR

déTECTANT une combinaison de deux antigènes, celui du kinétoplaste (« *kDNA* ») et un ARN ribosomal (le « *canine 18S rRNA* »).

## (2) Les échantillons à prélever

Différents types d'échantillons peuvent être prélevés dans le but de réaliser une recherche directe du parasite par PCR. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), tout type de tissus ou de fluides biologiques peut théoriquement être utilisé pour une PCR. Néanmoins, il ne paraît pas utile de réaliser cela sur des tissus pour lesquels une analyse cytologique ou histologique a déjà révélé la présence d'amastigote, sauf si une analyse quantitative est nécessaire. Cependant, une PCR peut être réalisée sur des échantillons analysés par cytologie ou histologie et pour lesquels rien n'a été identifié, dans la mesure où la PCR est plus sensible que ces deux précédentes techniques. Chez un chien présentant des lésions nodulaires ou une lymphadénomégalie, la PCR devrait être réalisée sur des échantillons de ces lésions ou sur les nœuds lymphatiques, prélevés par biopsies à l'aiguille fine. Si seules des anomalies hématologiques ou biochimiques sont présentes, les auteurs préconisent de prélever des échantillons de moelle osseuse, de nœud lymphatique ou de rate. D'autres études ont montré que la PCR était aussi assez sensible sur des écouvillons oraux ou nasaux ou encore sur buffy coat ou sang total. Le sang est le substrat pour lequel la PCR est la moins sensible, mais c'est également un prélèvement facile à réaliser en routine et moins invasif qu'un prélèvement de moelle osseuse par exemple (Francino *et al.*, 2006 ; Paltrinieri *et al.*, 2016). Enfin, dans leur étude de 2018, Galluzzi *et al.*, montrent que l'urine de chiens naturellement infestés contient aussi des parasites, mais à un taux plus faible que le sang ou la moelle osseuse.

## (3) Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats d'une PCR dépend du contexte dans lequel on l'utilise. En effet, un résultat positif met en évidence un chien porteur du parasite, de façon transitoire ou définitive, mais pas nécessairement malade. Ainsi, si de l'ADN du parasite est détecté dans des échantillons prélevés sur un chien présentant des signes cliniques ou paracliniques

compatibles avec la leishmaniose, ceci renforce la suspicion, d'autant plus si une analyse histologique ou cytologique a été réalisée auparavant et avait mis en évidence des patterns lésionnels compatibles avec cette maladie. Cependant, si de l'ADN de leishmanies est amplifié sur des échantillons de chiens ne présentant aucun signe clinique ou paraclinique compatibles, les auteurs conseillent au vétérinaire de s'intéresser aux autres maladies pouvant expliquer les signes cliniques observés. Par ailleurs, un chien peut être porteur de façon transitoire du parasite. Une PCR réalisée sur un échantillon de tissus cutanés d'un chien sain fréquemment piqué par des vecteurs infestés pourra être positive, sans que cela n'implique qu'une dissémination systémique des parasites survienne (Duthie *et al.*, 2018). En effet, les séquences génomiques amplifiées peuvent être celles de leishmanies phagocytées par les macrophages résidant dans le derme, qui pourront contrôler, voire éliminer les parasites localement. Néanmoins, un des avantages de la PCR est qu'elle peut être positive avant la période de séroconversion et permet donc un diagnostic plus précoce des chiens exposés.

#### **d) Le xénodiagnostic**

Le xénodiagnostic est une technique qui montre qu'un chien est porteur du parasite, mais également qu'il est infectieux pour les autres espèces. Il permet de s'assurer que les leishmanies présentes sont viables. D'après l'étude de Galluzzi *et al.*, (2018), des phlébotomes naïfs réalisent un à plusieurs repas sanguins sur les chiens testés et les parasites sont ensuite recherchés au sein du tube digestif des vecteurs. L'identification microscopique des leishmanies au sein du tube digestif des phlébotomes prend beaucoup de temps. Une recherche directe des parasites par PCR sur broyat de phlébotomes est également possible. C'est une technique qui n'est pas utilisée en routine et qui est réservée aux expérimentations dans des laboratoires agréés.

#### **e) Autres techniques de diagnostic direct**

D'autres techniques d'amplification du génome sont décrites dans la littérature. On peut notamment citer la LAMP (« *Loop-Mediated Isothermal Amplification* ») qui est

présentée comme une des principales alternatives à la technique PCR. D'après De Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), elle est plus rapide, moins coûteuse et ne nécessite pas de thermocycleur. Ainsi, elle peut plus facilement être utilisée pour les expérimentations de terrain.

Les parasites peuvent également être isolés après culture sur des tissus prélevés, mais selon Solano-Gallego *et al.*, (2009), cette longue technique est exclusivement utilisée dans le cadre de la recherche.

## **2. Les méthodes de diagnostic indirect**

Les méthodes de diagnostic indirect s'appuient sur la mise en évidence d'une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre *Leishmania infantum*, ce qui témoigne d'un précédent contact entre le chien et l'agent pathogène.

### **a) L'immunophénotypage**

Il existe différentes méthodes pour étudier la réponse à médiation cellulaire de l'hôte, comme le dosage de l'interféron gamma après stimulation antigénique *in vitro*, un test cutané *in vivo* appelé test de Montenegro ou un test de stimulation antigénique *in vitro* des lymphocytes (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

D'après Carstens-Kass *et al.*, (2021), le test de Montenegro débute par une injection d'antigènes de leishmanies dans le derme, ce qui entraîne une réponse immunitaire à médiation cellulaire avec une hypersensibilité de type IV, chez des chiens ayant déjà été en contact avec le parasite. Si le test est positif, un petit nodule de cinq à six millimètres va alors se former, résultant de l'activation des lymphocytes T qui recrutent des macrophages et d'autres cellules de l'immunité sur le site de l'injection. Néanmoins, ce test présente de nombreuses limites. En effet, il est négatif en cas de lésions récentes, diffuses ou chez des patients immunodéprimés. Par ailleurs, d'après de Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), ce test est soumis à la subjectivité de l'opérateur, à la coopération du patient et s'il faut refaire le test, un délai d'au moins 2 ans entre deux tentatives est nécessaire.

## b) La sérologie

Dans le cadre d'un diagnostic indirect, on cherche à mettre en évidence des marqueurs de la réponse immunitaire de l'hôte suite au contact avec le parasite. Ici, la sérologie vise à déterminer la présence d'anticorps circulants dirigés contre les leishmanies.

### (1) Les différentes techniques disponibles

De nombreuses techniques de sérologie existent, mais certaines comme le Western Blot ou la cytométrie en flux ne sont pas utilisées en routine. Les trois techniques les plus couramment décrites sont l'IFAT (« *immunofluorescent antibody test* ») ou immunofluorescence indirecte, l'ELISA (« *enzyme-linked immunosorbent assay* ») et l'ICT (immunochromatographie sur membrane).

L'ICT est une des techniques avec laquelle sont fabriqués les kits rapides disponibles pour les vétérinaires praticiens. Elle permet d'obtenir un résultat qualitatif (*i.e* présence ou absence d'anticorps) mais pas quantitatif. Plusieurs kits sont disponibles sur le marché. Ils utilisent d'uniques ou multiples antigènes recombinants de leishmanies qui doivent être incubés avec du sang total, du sérum ou du plasma. D'après Paltrinieri *et al.*, (2016), la spécificité de la sérologie en ICT est bonne, mais la sensibilité varie de 30 à 70% selon les kits (Tableau 3). D'autres kits sont disponibles et utilisent des tests immuno-enzymatiques. La sensibilité est meilleure si le chien présente des signes cliniques compatibles que s'il est asymptomatique. Pour toutes ces raisons, les auteurs conseillent d'utiliser les kits rapides à ICT en début de démarche clinique, sur des animaux qui présentent des signes cliniques évocateurs. Si le résultat est positif, une autre technique de sérologie devra être utilisée pour avoir des données quantitatives. Par ailleurs, si le test est négatif alors que le clinicien a une forte suspicion, il vaut mieux utiliser une autre technique de sérologie plus sensible comme l'IFAT ou l'ELISA.

**Tableau 3.** Valeurs de sensibilité et de spécificité de différents tests immunochromatographiques analysés dans la littérature.

Auteurs	Nom commercial	Nombre de chiens	Antigènes utilisés	Gold standard	Sensibilité	Spécificité
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	INGEZIM® LEISHMACROM	60	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	Infestation expérimentale	75	100
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	SNAP® Leishmania	60	Antigène de promastigote	Infestation expérimentale	66	100
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	WITNESS® Leishmania	60	Antigènes de leishmania conjugués à des particules d'or	Infestation expérimentale	58	100
Ferroglio <i>et al.</i> , 2013	Speed Leish K®	250	Kinésine recombinante	IFAT	96,3	100
Athanasίου <i>et al.</i> , 2014	SNAP® Leishmania	109	Antigène de promastigote	IFAT	89,23	100
Athanasίου <i>et al.</i> , 2014	ImmunoRun CLI Antigen Detection kit	109	Antigènes de leishmania conjugués à des particules d'or	IFAT	86,15	100
Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2014	Speed Leish K®	203	Kinésine recombinante	ELISA	63,6	100
Souza <i>et al.</i> , 2019	Dual path platform (DPP®)	94	rK39	Culture parasitaire	95,8	100
Herrera <i>et al.</i> , 2019	Kalazar Detect® Rapid Test, Canine	126	rK39	IFAT	82,9	92,6
Herrera <i>et al.</i> , 2019	DPP®	126	rK39	IFAT	85,7	79,6
Villanueva <i>et al.</i> , 2019	FASTest® LEISH	232	Anticorps monoclonaux conjugués à des particules colloïdales d'or et des antigènes recombinants de <i>L. infantum</i>	ELISA, IFAT	100	99,1
Basurco <i>et al.</i> , 2020	FASTest® LEISH	215	Anticorps monoclonaux conjugués à des particules colloïdales d'or et des antigènes recombinants de <i>L. infantum</i>	<i>Latent Class analysis</i>	99,38	98,43

L'IFAT est parfois considérée comme le gold standard pour le diagnostic sérologique, mais n'est pas utilisée en routine, dans des cabinets vétérinaires, car elle nécessite du matériel spécialisé et du personnel formé. D'après Francino *et al.*, (2006), sa sensibilité et sa spécificité chez les chiens symptomatiques sont proches de 100%. Les titres seuils pour distinguer des chiens positifs des négatifs sont fixés de 1 :40 à 1 :160 selon les laboratoires (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Néanmoins, l'IFAT peut avoir des réactions croisées avec les trypanosomes et est moins sensible dans la détection des chiens asymptomatiques que la technique ELISA. Par ailleurs, la technique ELISA permet d'analyser plusieurs échantillons simultanément et utilise un spectrophotomètre pour mesurer la densité optique des échantillons et la relier à un titrage en anticorps. Ceci limite le biais lié à l'expérimentateur. La sensibilité et la spécificité de la méthode ELISA varient en fonction de l'antigène cible (Tableau 4).

Enfin, de nouvelles techniques ont été récemment étudiées, comme la cytométrie en flux. D'après de Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), cette technique a une bonne sensibilité, spécificité, et ce, même chez des chiens présentant d'autres pathogènes comme *Trypanosoma cruzi* ou chez des chiens vaccinés. Mais celle-ci présente un coût élevé, ce qui explique qu'elle soit réservée à l'usage de laboratoire pour le moment.

**Tableau 4.** Valeurs de sensibilité et de spécificité de différents tests ELISA analysés dans la littérature.

Auteurs	Nom commercial du test	Nombre de chiens	Antigène cible	Gold standard comparatif dans l'étude	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Porrozzì <i>et al.</i> , 2007	Non renseigné	100 pour sensibilité, 39 pour spécificité	rK26 de <i>L. infantum</i>	IFAT	80	90
Porrozzì <i>et al.</i> , 2007	Non renseigné	100 pour sensibilité, 39 pour spécificité	rK39 de <i>L. infantum</i>	IFAT	83	85
Porrozzì <i>et al.</i> , 2007	Non renseigné	100 pour sensibilité, 39 pour spécificité	rA2 de <i>L. donovani</i>	IFAT	77	96
Porrozzì <i>et al.</i> , 2007	Non renseigné	100 pour sensibilité, 39 pour spécificité	Antigène brut soluble	IFAT	59	87
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	LEISCAN® Leishmania ELISA Test	60	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	Infestation expérimentale	98	100
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	INGEZIM® LEISHMANIA	60	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	Infestation expérimentale	78	100
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2013	INGEZIM® LEISHMANIA VET	60	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	Infestation expérimentale	76	100
Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2014	Leiscan®	203	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	ELISA	92,5	100
Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2014	ID Screen®	203	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	ELISA	95,3	100
Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2014	Leishmania 96®	203	Extrait soluble de <i>L. infantum</i>	ELISA	92,5	89,6
Fujimori <i>et al.</i> , 2021	Non renseigné	140	rK39	Direct agglutination test	97,3	100
Fujimori <i>et al.</i> , 2021	Non renseigné	140	rK28	Direct agglutination test	95,9	100
Fujimori <i>et al.</i> , 2021	Non renseigné	140	rKR95	Direct agglutination test	95,9	100
Fujimori <i>et al.</i> , 2021	Non renseigné	140	rK18	Direct agglutination test	89,1	98,6

## **(2) Les antigènes utilisés**

Différents antigènes peuvent être utilisés pour la sérologie. Ainsi, les antigènes peuvent provenir de promastigotes, d'amastigotes ou encore de protéines recombinantes. D'après de Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), les antigènes peuvent, par exemple, être les protéines recombinantes rK39, rK26 ou rKLO8, les glycoprotéines membranaires gp63, gp70, gp72 ou encore la protéine A2. De nouvelles études ont montré l'efficacité de protéines chimériques à multi-épitope ou encore d'antigènes excrétés-sécrétés par les leishmanies (Travi *et al.*, 2018). Par ailleurs, les antigènes peuvent être combinés et testés en même temps, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité des tests, notamment pour la méthode ELISA.

## **(3) L'interprétation des résultats**

La sérologie a pour but de déterminer si un chien a été en contact ou non avec le parasite à travers la mise en évidence d'une activation du système immunitaire. Si le chien présente une réponse immunitaire efficace, le titre en anticorps circulants sera faible, et ce chien sera décrit comme infesté ou exposé. Au contraire, si sa réponse immunitaire s'avère inefficace, le titre en anticorps devrait être très élevé. En effet, d'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), la période d'incubation étant relativement longue, les chiens symptomatiques sont généralement séropositifs. Néanmoins, bien que les titres en anticorps soient généralement corrélés à la sévérité des signes cliniques, il se peut que les chiens symptomatiques présentent un titrage faible à modéré (Paltrinieri *et al.*, 2016). Dans le cadre d'une démarche diagnostique, les auteurs préconisent d'utiliser la sérologie en complément de la PCR ou de l'utiliser pour l'étude d'échantillons de chiens symptomatiques chez lesquels une étude cytologique ou histologique n'a pas mis en évidence de parasite.

## **(4) Les limites de la sérologie**

La technique de sérologie présente des limites que le vétérinaire clinicien ou l'épidémiologiste doivent connaître.

En effet, certains chiens qui ont été contact avec le parasite ne présentent pas de séroconversion et sont ainsi à l'origine de faux-négatifs. En effet, d'après Moreno *et al.*, (2002), le temps médian de séroconversion est estimé à cinq mois lors d'une infestation naturelle et trois mois lors d'une infestation expérimentale. D'autres ont montré que certains chiens peuvent avoir eu une séroconversion seulement un mois après l'exposition aux parasites (Travi *et al.*, 2018). Ainsi, un chien porteur peut être testé trop tôt et ne sera pas séropositif. Par ailleurs, si la dissémination du parasite est bien contrôlée par le système immunitaire, le taux d'anticorps est généralement faible, voire en-dessous des seuils de détection. D'après De Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), les chiens immunodéprimés peuvent également avoir un taux d'anticorps trop faible pour être détecté.

Des faux-positifs peuvent également survenir. C'est le cas notamment des chiens vaccinés ou lors de réactions croisées avec d'autres parasites comme ceux responsables de l'ehrlichiose, de la babésiose, de trypanosomes ou encore des espèces de leishmanies autre que *L. infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Ces réactions croisées auraient d'avantage tendance à survenir lorsque les antigènes utilisés sont des extraits bruts d'amastigotes. Des études ont montré que les réactions croisées seraient moins fréquentes quand les antigènes utilisés sont les peptides recombinants rA2, rK9, rK26 et rK39. Par ailleurs, afin d'éviter les réactions croisées, de Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2015), préconisent de réaliser deux tests complémentaires, avec deux techniques différentes et utilisant des antigènes cibles différents.

### **3. Guide pour une démarche diagnostique adaptée**

Les méthodes de diagnostic direct ou indirect présentées ci-dessus sont utilisées dans deux contextes différents. Le premier est celui d'une démarche diagnostique réalisée par un vétérinaire clinicien lorsqu'il a une suspicion de leishmaniose sur un de ses cas. L'autre est celui d'un épidémiologiste qui va étudier la prévalence des chiens porteurs ou ayant été en contact avec ce parasite au cours de leur vie dans une région donnée. Les méthodes à utiliser ne sont pas les mêmes dans ces deux cas.

Ainsi, d'après Paltrinieri *et al.*, (2016), pour un chien avec une forte suspicion clinique, le vétérinaire praticien doit privilégier le prélèvement des lésions présentes ou encore des organes lymphoïdes comme les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse ou la rate afin d'utiliser une méthode de diagnostic directe comme la PCR, la cytologie ou l'histologie. Si le parasite est mis en évidence, le diagnostic étiologique peut être considéré comme définitif. Il s'agit alors de déterminer la charge parasitaire en réalisant, si cela n'a pas été déjà fait, une PCR quantitative. Ceci sera également utile pour le suivi du traitement. Une sérologie quantitative permet également de connaître le titrage en anticorps, de déterminer le stade clinique de la maladie, de donner un pronostic aux propriétaires et sera utile dans le suivi du traitement. Néanmoins, si des lésions ne sont pas disponibles ou si les organes lymphoïdes sont difficilement accessibles pour la ponction, il est possible d'utiliser le sang comme substrat ou commencer par une sérologie quantitative. Si le titre en anticorps est modéré ou élevé, la suspicion est renforcée et il serait préférable d'avoir recours à une méthode de diagnostic direct.

Pour des chiens asymptomatiques vivant en région d'endémicité, il est également intéressant de réaliser une sérologie afin de déterminer l'exposition du chien aux parasites. Il faut alors tenir compte du délai de séroconversion après la période d'exposition aux phlébotomes et des différents cas possibles de faux-négatifs ou faux-positifs.

### **G. Prise en charge thérapeutique**

La prise en charge thérapeutique des cas de leishmaniose est à adapter en fonction du stade clinique. Les traitements existants ne permettent pas d'éliminer tous les parasites de l'organisme du chien. Cependant, d'après Ribeiro *et al.*, (2018), ils peuvent diminuer le taux de parasites dans l'organisme, l'infectiosité du chien envers les vecteurs, l'intensité des signes cliniques et des anomalies hémato-biochimiques, augmenter l'espérance de vie de l'animal et améliorer son confort de vie.

## 1. Les molécules disponibles

Dans la littérature, de nombreuses molécules ont été étudiées dans le cadre de la gestion thérapeutique des chiens atteints de leishmaniose.

### a) L'antimoniote de méglumine

En France, peu de molécules sont autorisées et une seule possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de la maladie, il s'agit de l'antimoniote de méglumine. Il exerce une activité « leishmanicide ». En effet, il inhibe les enzymes nécessaires à l'oxydation des acides gras et la glycolyse réalisées par les leishmanies (Oliva *et al.*, 2010).

L'antimoniote de méglumine existe sous le nom de Glucantime® en France et doit être administré à la posologie de 100 mg/kg en voie sous-cutanée une fois par jour ou à 50 mg/kg deux fois par jour pendant un mois (Lamoureux *et al.*, 2016 ; Oliva *et al.*, 2010). En effet, il est préférable de l'administrer deux fois par jour, comme l'antimoniote de méglumine a une courte demi-vie chez le chien ; de 21, 42 et 122 minutes, lorsqu'il est respectivement administré par voie intraveineuse, intramusculaire et sous-cutanée. De plus, d'après l'étude de Oliva *et al.*, (2010), six à neuf heures après administration, 80 à 95% de l'antimoniote de méglumine est éliminé par les reins.

Une baisse de sensibilité à l'antimoniote de méglumine des amastigotes a été décrite chez certains chiens, en France, en Espagne et en Italie (Lamoureux *et al.*, 2016 ; Oliva *et al.*, 2010 ; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Les études montrent que cette molécule présente une bonne efficacité, mais les auteurs s'accordent pour dire qu'elle ne permet généralement pas d'éliminer la totalité des parasites.

### b) L'allopurinol

Même sans AMM, l'allopurinol est considéré comme un des traitements de première intention de la leishmaniose canine, en association ou non avec l'antimoniote de

méglumine. D'après Lamoureux *et al.*, (2016), il permet d'inhiber la multiplication du parasite et exerce donc une activité « leishmaniostatique ». Il s'agit d'un analogue structural de l'hypoxanthine qui inhibe l'activité de la xanthine oxydase, une enzyme qui catalyse la transformation d'hypoxanthine en xanthine et de xanthine en acide urique. L'activité « leishmaniostatique » est due au fait que les leishmanies ne peuvent pas synthétiser de purines *ex novo* et nécessitent l'apport de celles-ci par l'organisme de l'hôte. De plus, d'après Oliva *et al.*, (2010), une fois dans l'amastigote, l'allopurinol est transformé en un composé toxique pour les leishmanies, le 4- amino-pyrazole-pyrimidine.

L'allopurinol doit être administré à la posologie de 10 à 15 mg/kg par voie orale (certains praticiens vont jusqu'à 30 mg/kg) deux fois par jour pendant 6 mois, à un an minimum (Lamoureux *et al.*, 2016). D'après Miró *et al.*, (2018), lorsqu'il est utilisé seul, son activité « leishmaniostatique » explique qu'il ne permette pas de détruire tous les amastigotes présents. Le chien reste donc porteur du parasite. Par ailleurs, des cas de leishmanies résistantes à l'allopurinol isolées chez des chiens ont été décrits et ceci était associé à une rechute de la maladie (Lamoureux *et al.*, 2016 ; Ribeiro *et al.*, 2018).

La durée du traitement à l'allopurinol dépend du stade clinique initial, de la réponse au traitement et de la tolérance du chien à la molécule. D'après Lamoureux *et al.*, (2016), l'arrêt de l'allopurinol est possible, mais sous certaines conditions et ceci est associé à un risque de rechute élevé. Le chien doit présenter une guérison clinique complète avec normalisation des paramètres hémato-biochimiques et ce, au moins un an après le début du traitement à l'allopurinol. De plus, son titre sérologique doit être négatif à discrètement positif. Certains chiens ne pourront cependant pas arrêter l'allopurinol et un traitement à vie devra être mis en place (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

### c) **La miltéfosine**

Dans d'autres pays européens, la miltéfosine est davantage utilisée en association avec l'allopurinol que l'antimoniote de méglumine. D'après Oliva *et al.*, (2010), elle agit sur

les voies de signalisation et sur la synthèse membranaire du parasite, ce qui conduit à sa mort.

Ces mêmes auteurs conseillent de l'utiliser en association avec l'allopurinol et à une posologie de 2 mg/kg par voie orale, une fois par jour pendant 28 jours.

En France, la miltéfosine est interdite pour l'usage vétérinaire, car elle est destinée à l'usage strict de la leishmaniose humaine, notamment chez les patients immunodéprimés. Dans le cadre du respect de la cascade, le vétérinaire praticien doit d'abord envisager le traitement de consensus, à base d'antimoniote de méglumine associé à de l'allopurinol. Dans des cas particuliers (insuffisance rénale aiguë, échec du traitement de consensus), une demande argumentée auprès de l'Agence Nationale du Médicament (ANSES) est possible. Par ailleurs, la miltéfosine est abortive et tératogène.

Cette molécule possède une AMM pour le traitement de la leishmaniose chez le chien dans des pays frontaliers avec la France, tels que l'Espagne ou l'Italie, en raison de son efficacité, de sa néphrotoxicité moindre, et d'une façon générale, de la moindre importance de ses effets secondaires. Par ailleurs, son administration *per os* la rendrait plus pratique pour les propriétaires, ce qui facilite l'observance du traitement.

#### **d) L'association de l'allopurinol à l'antimoniote de méglumine : traitement de consensus en Europe**

D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), l'association de l'allopurinol à l'antimoniote de méglumine est le protocole de traitement considéré comme le plus efficace. Il s'agit ainsi du traitement de consensus préconisé par les experts européens. Ces deux molécules administrées en association auraient un effet synergique, ce qui permettrait de diminuer les doses et la durée du traitement, tout en augmentant les succès de traitement en diminuant le risque de rechute (Miró *et al.*, 2018). La combinaison des deux permet également de rallonger la période de rémission (Oliva *et al.*, 2010). Dans ce protocole, d'après Ribeiro *et al.*, (2018), l'antimoniote de méglumine est administré à la posologie de 100 mg/kg en voie sous-cutanée une fois par jour ou, de façon optimale à 50 mg/kg deux fois par jour pendant

un mois. Il est associé à l'allopurinol distribué à la posologie de 10 mg/kg par voie orale deux fois par jour pendant au moins 6 mois.

#### e) Les autres traitements décrits dans la littérature

D'autres molécules sont décrites dans la littérature, mais leur usage n'est pas autorisé en France. Leurs utilisations n'ont pas encore été suffisamment étudiées ou les effets secondaires sont trop importants pour que leur utilisation soit conseillée (Lamoureux *et al.*, 2016). Ainsi, des protocoles utilisent l'amphotéricine B, l'aminoside (ou paromomycine), la pentamidine, le kétoconazole, la marbofloxacin, l'enrofloxacin l'association métronidazole et spiramycine, des immunomodulateurs comme la dompéridone ou encore des cytokines (Solano-Gallego *et al.*, 2009 ; Ribeiro *et al.*, 2018).

La dompéridone, plutôt utilisée en prévention, agit *via* son activité anti-dopaminergique, sur la réponse immunitaire innée, en activant les cellules phagocytaires et en favorisant la destruction intracellulaire des amastigotes grâce à la prolactine libérée suite à la production de sérotonine. D'après Ribeiro *et al.*, (2018), ceci diminue le risque que le chien reste infesté à vie et peut prévenir le développement de la leishmaniose clinique.

L'amphotéricine B agit sur les stérols membranaires des leishmanies et présente également une bonne efficacité selon différentes études. Mais, d'après l'étude d'Oliva *et al.*, (2010), elle est néphrotoxique, provoque de la fièvre, des vomissements, de l'anorexie, elle est coûteuse et son administration par voie intraveineuse n'est pas la plus aisée en pratique.

D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), l'aminoside empêche l'appariement des sous-unités ribosomiales du parasite, mais est néphrotoxique et ototoxique, ce qui limite son utilisation chez le chien.

La pentamidine est une diamidine aromatique qui agirait sur la biosynthèse des polyamines et sur le potentiel membranaire mitochondrial (Oliva *et al.*, 2010). Ce traitement est coûteux et la pentamidine serait moins efficace que les traitements usuels. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), elle présente de nombreux effets secondaires comme

des vomissements, de la diarrhée, de l'hypersalivation, de l'hypotension et des chocs anaphylactiques.

La combinaison du métronidazole, présentant des propriétés anti-leishmanies *in vitro*, et de la spiramycine a été étudiée, mais son efficacité n'a pas été prouvée, en comparaison avec l'association de l'allopurinol et de l'antimoniote de méglumine (Oliva *et al.*, 2010).

Une étude s'est intéressée à l'intérêt de la marbofloxacin dans le traitement de la leishmaniose canine. D'après l'étude d'Oliva *et al.*, (2010), elle aurait une activité leishmanicide *via* le TNF- $\alpha$  et la voie de synthèse de l'oxyde nitrique et améliorerait les signes cliniques du chien. L'enrofloxacin est une fluoroquinolone qui favorise l'activité de destruction macrophagique des amastigotes grâce à la production d'oxyde nitrique, mais son utilisation dans le cadre de la leishmaniose canine n'a montré que des améliorations cliniques partielles et de courtes durées.

Par ailleurs, l'étude de Da Silva *et al.*, (2012), a montré l'efficacité d'une thérapie avec de l'antimoniote de méglumine et de l'allopurinol encapsulés dans un liposome. En effet, ce traitement a permis d'éliminer le portage du parasite chez des chiens atteints (Ribeiro *et al.*, 2018). Néanmoins, celui-ci n'est pas encore mis sur le marché.

Enfin, d'après Miró *et al.*, (2018), l'administration de nucléotides en associant avec un traitement à l'allopurinol et l'antimoniote de méglumine était à l'origine de bonnes améliorations cliniques.

## **2. Les effets secondaires des traitements**

Les molécules disponibles sur le marché peuvent également être à l'origine d'effets secondaires que le vétérinaire praticien doit garder en mémoire afin d'en surveiller leur apparition.

L'allopurinol inhibe la xanthine oxydase, ce qui entraîne une accumulation de xanthine dans l'organisme, ce qui peut être à l'origine de xanthinurie, de néphrolites ou d'urolithiases. Lors de prescription d'allopurinol, une alimentation à teneur modérée en protéines et pauvre en purines doit être mise en place (Lamoureux *et al.*, 2016).

L'antimoniote de méglumine est connu pour sa néphrotoxicité et son utilisation chez des chiens présentant une maladie rénale chronique doit être discutée. Des abcès cutanés et des lésions de cellulites ont été rapportés en regard des points d'injection chez certains animaux (Lamoureux *et al.*, 2016). De la fièvre, des épisodes diarrhéiques et une dysorexie ont également été rapportés. Des augmentations transitoires des activités des ALAT et de l'amylase sont également décrites, ainsi qu'un cas de pancréatite aiguë consécutif à l'injection d'antimoniote de méglumine (Oliva *et al.*, 2010).

La miltéfosine, quant à elle, peut entraîner des troubles gastro-intestinaux (Ribeiro *et al.*, 2018).

D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), la toxicité serait d'ailleurs majorée chez des chiens dont le débit de filtration glomérulaire est diminué, c'est-à-dire chez des chiens ayant une maladie rénale chronique. En effet, chez eux, les molécules seront éliminées de façon moindre et moins rapidement, elles vont alors s'accumuler et exercer leurs effets toxiques.

### **3. Les protocoles de traitements en fonction des stades cliniques**

Le protocole de traitement est à adapter en fonction de chaque stade clinique et il est important de se rappeler qu'un chien infesté n'est pas nécessairement malade.

Ainsi, pour les chiens de stade 1 selon la classification LeishVet, Oliva *et al.*, (2010), suggèrent qu'il n'est pas nécessaire de mettre en place un traitement. Cela pourra même être délétère pour les chiens comme certaines de ces molécules sont immunomodulatrices et/ou présentent des effets secondaires importants (Miró *et al.*, 2018). Un suivi des anomalies cliniques et des paramètres hémato-biochimiques est néanmoins vivement conseillé afin de détecter les débuts de la maladie et est à réaliser tous les trois à six mois. Néanmoins, Solano-Gallego *et al.*, (2011), estiment qu'un traitement peut être initié, probablement de plus courte durée, et utilisant une ou deux molécules comme l'allopurinol ou l'antimoniote de méglumine. La gestion thérapeutique des chiens en stade 1 est donc encore discutée dans la littérature et d'avantages d'études sont nécessaires.

Pour les chiens de stade 2 et 3, d'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), un traitement avec l'association d'allopurinol et d'antimoniote de méglumine voire de miltéfosine doit être mis en place. Par ailleurs, le traitement des complications doit également être initié. Ainsi, pour le stade 3, si le chien présente une glomérulopathie, une alimentation de soutien rénal doit être commencée, voire un traitement anti-protéinurique si la protéinurie persiste après la mise en place du traitement (Lamoureux *et al.*, 2016).

Enfin, pour les chiens de stade 4, le pronostic est tel que la décision de mettre en place un traitement doit être discutée avec le propriétaire. Si un traitement est envisagé, l'association de l'allopurinol avec l'antimoniote de méglumine ou la miltéfosine peuvent être utilisées. Lamoureux *et al.*, (2016), conseillent néanmoins d'utiliser l'allopurinol seul, compte tenu des propriétés néphrotoxiques de l'antimoniote de méglumine. Les diverses complications présentes doivent également être prises en charge.

D'après Ribeiro *et al.*, (2018), la durée du traitement varie en fonction du stade clinique de l'animal, de sa tolérance au traitement et de la réponse clinique associée.

En cas d'inefficacité du traitement ou de rechute, d'après Oliva *et al.*, (2010), une vérification de l'observance du traitement est nécessaire. Il est également conseillé de faire un examen clinique et hémato-biochimique afin d'identifier si une maladie concomitante est en cours, avec notamment un processus tumoral, une autre infestation ou une maladie dysimmunitaire. Si le diagnostic avait été sérologique, il est intéressant de refaire cette sérologie ou de faire une analyse par PCR afin de bien confirmer que le chien présente une leishmaniose clinique. Enfin, si le diagnostic est bien correct, il est conseillé de changer de traitement et notamment de molécules. Le recours à un traitement alternatif est possible dans les cas où une rechute survient rapidement après la mise en place du traitement de consensus, si de nombreux effets secondaires sont présents ou si le propriétaire ne parvient pas à avoir une bonne observance du traitement. On peut par exemple passer de l'association de l'allopurinol avec l'antimoniote de méglumine à l'allopurinol seul à 10 mg/kg par voie orale deux fois par jour pendant au moins 6 mois, ou à l'association de l'allopurinol à 10

mg/kg par voie orale deux fois par jour pendant au moins 6 mois avec la miltéfosine à 2 mg/kg par voie orale une fois par jour pendant 28 jours.

Dans tous les cas, dès qu'un chien est diagnostiqué comme porteur du parasite, d'après Ribeiro *et al.*, (2018), l'utilisation de répulsifs contre les phlébotomes est vivement conseillée dans la mesure où elle diminue le risque de transmission à ses congénères et à l'Homme.

#### **4. Le suivi**

Les paramètres cliniques et hémato-biochimiques à suivre après la mise en place du traitement sont à adapter à chaque individu, selon ses anomalies présentes lors du diagnostic. Cependant, Solano-Gallego *et al.*, (2009), et Lamoureux *et al.*, (2016), recommandent de réaliser un suivi des paramètres biochimiques, une numération formule et une analyse d'urine comprenant la détermination du rapport protéinurie sur créatininurie chez tous les chiens traités.

Un premier suivi est préconisé un mois après le début du traitement, puis tous les trois à quatre mois et enfin tous les six mois à un an si le chien présente une résolution des signes cliniques. Lamoureux *et al.*, (2016) préconisent également de réaliser une sérologie quantitative, dans le même laboratoire et avec la même technique, six mois après le début du traitement puis tous les six mois à un an. En effet, d'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), des études ont montré que les titres en IgG et IgA diminuaient lentement et progressivement et que ceci était associé à une diminution de l'intensité des signes cliniques. Enfin, en cas de sérologie avec l'IFAT, la diminution du titre sérologique est considérée comme significative si celui-ci est deux fois moins important que lors du premier titrage.

#### **5. Les facteurs influençant la réponse au traitement**

La réponse au traitement est très variable. Elle dépend notamment du statut clinique et hémato-biochimique initial du patient. Ainsi, d'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), les patients présentant une insuffisance rénale au moment du diagnostic répondent moins favorablement au traitement que ceux qui n'ont pas d'atteinte rénale ou qui ont une

protéinurie modérée. Par ailleurs, une majorité de chiens auront une réponse clinique favorable dès le premier mois du traitement, alors que pour d'autres cela pourra être plus long. La baisse du titre en anticorps et le rétablissement des paramètres hématobiochimiques nécessitent généralement un délai plus long que l'amélioration clinique. Aussi, certains chiens auront une baisse significative de leur titre en anticorps six mois à un an après le début du traitement, alors que pour d'autres le délai sera plus long. Par ailleurs, certains verront une amélioration de leur état clinique sans baisse du titre anticorps. Au contraire, une hausse du titre en anticorps sera un marqueur de rechute, notamment chez des chiens qui ne reçoivent plus de traitement.

#### **H. Facteurs pronostiques**

Une fois le diagnostic établi, il est important de discuter avec les propriétaires des facteurs pronostiques et de l'espérance de vie du chien afin d'obtenir leur consentement éclairé pour la mise en place du traitement. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2009), le pronostic en cas de leishmaniose canine dépend fortement du stade de la maladie, et donc des signes cliniques et hématobiochimiques.

D'après Miró *et al.*, (2018), une atteinte rénale présente au moment du diagnostic assombrit le pronostic. L'étude de Pereira *et al.*, (2020), a permis de donner une idée de l'espérance de vie associée à chaque stade IRIS avec traitement médical. Ainsi, les chiens de stade IRIS 1 auraient une espérance de vie de quatre ans, contre 2.5 ans pour les chiens de stade IRIS 2 et autour d'un mois pour ceux de stade IRIS 3 et 4. Par ailleurs, cette étude a montré que le stade IRIS de la maladie rénale se détériorerait chez un patient sur quatre et était à l'origine de la plupart des décès ou décisions d'euthanasie. D'après Roura *et al.*, (2013), 75% des chiens qui ne présentent pas d'insuffisance rénale au moment du diagnostic peuvent vivre encore quatre ans et plus s'ils reçoivent un traitement adapté.

Par ailleurs, l'espérance de vie des chiens est également moindre si une maladie infectieuse est concomitante (Pereira *et al.*, 2020).

En l'absence de traitement, d'après l'étude de Roura *et al.*, (2013), 30 à 70 % des chiens infestés en région endémique développeront une maladie clinique deux à trois ans après le diagnostic. La mise en place d'un traitement à l'allopurinol seul ou en association avec l'antimoniote de méglumine ou la miltéfosine permet de significativement augmenter l'espérance de vie des chiens malades. En effet, l'étude de Pereira *et al.*, (2013), montre que l'absence d'une prise en charge thérapeutique conduit à une détérioration de l'état clinique et à une augmentation du taux de parasites circulants. La réponse au traitement mis en place rentre également en considération. En effet, d'après Roura *et al.*, (2013), des chiens de stade IRIS 1 ou 2, chez qui la protéinurie n'est pas réduite après le traitement présentent un moins bon pronostic que ceux du même stade, qui avaient des protéinuries plus sévères, mais qui ont bien répondu au traitement.

Le rapport de Solano-Gallego *et al.*, (2011), donne des pronostics pour chaque stade de la maladie de la classification LeishVet. Ainsi, le pronostic du stade 1 est bon, favorable à réservé pour le stade 2, sombre à mauvais pour le stade le 3 et mauvais pour le 4. De plus, le suivi des chiens pendant le traitement est essentiel, comme la clinique du chien peut s'améliorer ou se détériorer et influencer son pronostic vital.

Enfin, d'après l'étude de Miró *et al.*, (2018), l'espérance de vie des chiens atteints de leishmaniose clinique est en constante progression grâce aux avancées scientifiques en termes de diagnostic et de gestion thérapeutique.

## **I. Mesures préventives**

Les traitements aujourd'hui disponibles peuvent parfois s'avérer laborieux et coûteux pour les propriétaires. Ils ne permettent généralement pas d'éliminer le portage du parasite et des rechutes cliniques peuvent survenir. Soigner la leishmaniose représente donc un défi thérapeutique majeur. C'est pourquoi les mesures préventives sont très importantes dans la gestion de cette maladie, notamment en zone d'endémicité. Celles-ci vont s'appuyer sur deux axes principaux : limiter le contact avec les phlébotomes et renforcer l'immunité du chien avec la vaccination.

## 1. Limiter le contact avec les phlébotomes

### a) La gestion du lieu et du mode de vie

D'après l'étude de Ribeiro *et al.*, (2018), une majeure partie de la prévention contre la leishmaniose canine s'appuie sur la réduction du contact entre le vecteur et le chien. Pour cela, des moustiquaires peuvent être placées au niveau des fenêtres et des chenils. Lamoureux *et al.*, (2016), conseillent de ne pas laisser les chiens dehors la nuit d'avril à novembre, en période d'activités des phlébotomes, en zone endémique. D'après cet article, il est également intéressant de détruire les gîtes larvaires, en éliminant, tant que possible, la matière organique et d'éloigner les lieux de vie des chiens des zones de micro-habitats favorables aux phlébotomes, comme les amoncellements de pierres et de morceaux de bois. Cependant, ces gîtes sont très difficiles à identifier.

### b) L'utilisation de topiques insecticides

Une autre méthode est l'usage d'insecticides répulsifs sous forme de collier, spot-on ou spray à base de pyréthrinoïdes (Ribeiro *et al.*, 2018). Ils sont les seuls insecticides exerçant un effet antigorgement et donc répulsif sur les phlébotomes. Chez le chien, on dispose notamment de la deltaméthrine, de la perméthrine, de la tétraméthrine et de la fluméthrine. Les différentes spécialités à base de pyréthrinoïdes disponibles pour les chiens en France sont présentées dans le tableau 5 ci-après.

Par ailleurs, d'après l'étude menée par Solano-Gallego *et al.*, (2009), l'imidaclopride présente une action synergique avec la perméthrine dans l'action répulsive contre les phlébotomes. Cette même étude rappelle que l'usage de ces topiques nécessite un bon respect du mode d'application et de leurs fréquences de renouvellement, et ce tout au long de la période d'activité des phlébotomes. Ainsi, pour les chiens voyageant vers une zone d'endémie, il est conseillé de mettre le collier une semaine avant l'arrivée dans le pays et de le renouveler tous les 5 mois ou d'appliquer le spray ou le spot-on deux jours avant l'arrivée et de renouveler l'application respectivement toutes les 2 à 3 semaines.

**Tableau 5.** Spécialités à base de pyréthrinoides disponibles en France et chez le chien.

Spécialité disponible en France	Molécules	Formulation	Activité (Autorisation de Mise sur le Marché) vis-à-vis des phlébotomes	Durée d'action contre les phlébotomes
Advantix®	Imidaclopride + perméthrine	Spot on (diffusion surface peau)	Oui	Deux à trois semaines
Aérosol Bioalléthrine Chien THEKAN®	Bioalléthrine + Piperonyl butoxyde	Spray	Non	Non applicable
Deltatic®	Deltaméthrine	Collier	Oui	Cinq mois
DOG-NET®	Perméthrine	Spot-on (diffusion surface peau) et spray	Oui pour le spot-on	Huit jours pour le spot-on
Effitix®	Fipronil + perméthrine	Spot-on (diffusion surface peau)	Oui	Quatre semaines
Frontline Tri-Act®	Fipronil + perméthrine	Spot-on (diffusion surface peau)	Oui	Trois semaines
Oidermyl®	Perméthrine	Pommade auriculaire	Non	Non applicable
Perfikan®	Fipronil + perméthrine	Spot-on (diffusion surface peau)	Oui	Quatre semaines
Permetrix®	Perméthrine + imidaclopride	Spot-on (diffusion surface peau)	Oui	Trois semaines
Poudre tétraméthrine Chat, Chien, Oiseau, Rongeur Thékan®	Tétraméthrine	Poudre	Non	Non applicable
Poudre APE Chien Tétraméthrine SETRIC®	Tétraméthrine	Poudre	Non	Non applicable
Shampooing tétraméthrine Biocanina®	Tétraméthrine	Shampooing	Non	Non applicable
Synergix®	Fipronil + perméthrine	Spot-on (diffusion surface peau)	Oui	Quatre semaines
Shampooing tétraméthrine Thékan®	Tétraméthrine	Shampooing	Non	Non applicable
Pulvex®	Perméthrine	Shampooing	Non	Non applicable
Scalibor®	Deltaméthrine	Collier	Oui	Un an
Seresto®	Imidaclopride + fluméthrine	Collier	Oui	Sept ou huit mois
Vectra 3D®	Dinotéfurane + perméthrine + pyriproxifène	Spot on (diffusion surface peau)	Oui	Un mois

## 2. La vaccination

### a) L'intérêt de la vaccination

Comme les mesures visant à limiter le contact avec les phlébotomes ne sont pas efficaces à 100%, la vaccination présente un intérêt majeur dans la lutte contre la leishmaniose canine. Différents vaccins existent pour les chiens dans le monde, avec des vaccins inactivés, à antigènes purifiés, à antigènes recombinants ou encore des vaccins à ADN (Miró *et al.*, 2018). La vaccination permet la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace contre les parasites, *via* l'activation notamment des cellules de type Th1. Elle diminue le risque de développer une leishmaniose clinique, atténue les signes cliniques et réduit l'infectiosité des chiens envers les phlébotomes (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Elle ne permet pas d'éviter l'infestation, mais limite l'évolution vers une leishmaniose clinique et réduit la probabilité d'apparition de signes cliniques (Lamoureux *et al.*, 2016). Les vaccins doivent donc être administrés en complément d'antiparasitaires externes à effet répulsif.

### b) L'unique vaccin disponible en France : Letifend®

Actuellement en France, l'unique vaccin disponible est le Letifend®, un vaccin à protéine recombinante Q. Il s'agit d'une protéine chimérique, formée après la fusion de cinq fragments antigéniques provenant des protéines hautement antigéniques ribosomiales LiP2A, LiP2B et LiP0 et de l'histone H2A. Il ne contient pas d'adjuvant. Il peut être administré chez les chiens séronégatifs à partir de 6 mois, en une dose de primovaccination, suivie par des rappels annuels. Il est conseillé de réaliser une sérologie quantitative avant de vacciner le chien pour s'assurer de sa séronégativité. D'après Solano-Gallego *et al.*, (2011), si le chien est séropositif, il n'est pas conseillé de le vacciner, qu'ils présentent des signes cliniques ou non. L'étude réalisée par Fernández Cotrina *et al.*, (2018), sur 549 chiens vivant en France et en Espagne, a montré que ce vaccin permet de réduire le risque d'incidence des signes cliniques par neuf, les cas de leishmaniose clinique par cinq et le portage du parasite. Ainsi, il aurait une efficacité de 72% dans la protection contre le développement

d'une forme clinique de leishmaniose. Il présenterait également une bonne innocuité comme il est administré en une dose unique et sans adjuvant.

### **3. Bilan des mesures préventives adaptées à chaque cas**

Pour conclure, la prévention de la leishmaniose canine doit être multimodale. La combinaison de la vaccination à l'utilisation de topiques insecticides semble être la méthode la plus efficace (Miró *et al.*, 2018 ; Ribeiro *et al.*, 2018). Cela permet d'avoir une protection optimale contre l'infestation et la maladie clinique.

## **III. Etude du foyer cévenol**

### **A. Etats des lieux des connaissances sur les foyers de leishmaniose canine à l'échelle du monde, de l'Europe et de la France**

#### **1. La leishmaniose canine dans le monde**

##### **a) *Leishmania infantum* : principal parasite incriminé**

D'après l'étude de Dantas-Torres *et al.*, (2012), la leishmaniose canine est présente sur tous les continents. Jusqu'à peu, l'Océanie était considérée comme indemne mais, d'après Giancchetti *et al.*, (2020), des cas de leishmaniose cutanée ont été identifiés chez des macropodidés natifs d'Australie. La leishmaniose canine est endémique dans près de 50 pays, avec une majorité de cas en Europe et en Amérique du Sud. *Leishmania infantum* aurait été introduit en Amérique lors des vagues migratoires des conquistadors en Amérique du Sud (Kuhls *et al.*, 2011). La leishmaniose canine a tendance à l'expansion géographique vers l'ouest et le nord de l'Europe (Giancchetti *et al.*, 2020).

Dans le monde, près de 53 espèces de leishmanies ont été mises en évidence, dont 12 infestantes pour le chien (Tableau 6). On peut notamment citer *L. major*, *L. tropica*, et *L. braziliensis* (Depaquit *et al.*, 2017). *Leishmania infantum* (synonyme de *L. chagasi*) est la principale espèce responsable des cas de leishmaniose canine.

**Tableau 6.** Les principales espèces de *Leishmania* décrites chez le chien et leur distribution géographique. Source : Solano-Gallego *et al.*, 2009.

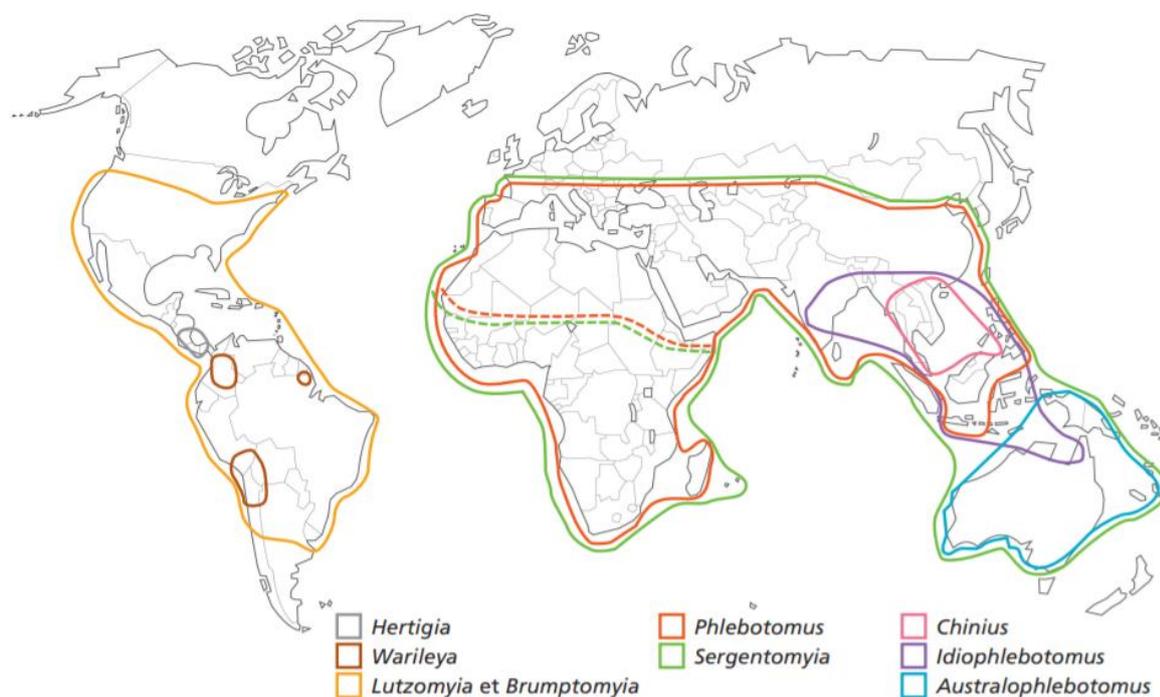
Espèces	Répartition géographique
<i>L. infantum</i>	Bassin méditerranéen, Moyen-Orient, Asie du Sud, Iran, Arménie, Afghanistan, Asie centrale, Chine
<i>L. infantum</i> synonyme de <i>L. chagasi</i>	Amérique du Sud et Amérique Centrale
<i>L. donovani</i>	Afrique de l'Est
<i>L. tropica</i>	Afrique du Nord
<i>L. braziliensis</i>	Amérique Centrale et Amérique du Sud
<i>L. peruviana</i>	Andes péruviennes
<i>L. panamensis</i>	Amérique Centrale

## b) Les vecteurs

Plus de 600 espèces de phlébotomes ont été identifiées dans le monde (Alemayehu *et al.*, 2017). Les phlébotomes du genre *Phlebotomus* spp. sont les vecteurs de *Leishmania* spp. dans l'Ancien Monde (Europe, Asie et Afrique), avec notamment les espèces : *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus tobbi*. Dans le Nouveau Monde (Amérique), le genre majoritairement impliqué dans la transmission est *Lutzomyia*, avec notamment l'espèce *Lutzomyia longipalpis*. D'autres espèces sembleraient également en cause, comme *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia cruzi* et *Lutzomyia migonei* (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Les phlébotomes sont présents sur tous les continents et dans des zones tropicales à tempérées, où le climat leur est favorable, comme l'Afrique, l'Asie, l'Amérique du Sud, le Moyen-Orient et le bassin méditerranéen (Carte 1). La distribution des phlébotomes s'étend vers le nord de l'Europe, à la faveur du réchauffement climatique, des transports qui permettent la migration sur de longues distances et de l'urbanisation. Par ailleurs, le phénomène d'urbanisation des pays en voie de développement favoriserait la propagation de la maladie (Desjeux, 2001). En effet, l'exode rural massif contraint les migrants à s'installer dans des bidonvilles périurbains, où la concentration en hôtes et vecteurs de leishmaniose est importante. Ceci est également associé à de mauvaises conditions de salubrité qui favorisent la survie des vecteurs. Ceci a notamment été décrit par Desjeux en

2001 en Syrie, Turquie ou encore en Iraq. Par ailleurs, la déforestation, le développement de l'agriculture, les nouveaux systèmes d'irrigation ou encore les migrations transfrontalières favoriseraient l'expansion géographique de cette maladie chez l'Homme. Des résultats similaires peuvent être attendus chez le chien (Giancchetti *et al.*, 2020).



**Carte 1.** Distribution géographique mondiale des principaux genres de phlébotomes. Source : Depaquit *et al.*, 2017.

En région tropicale, la leishmaniose canine sévit toute l'année alors qu'en région méditerranéenne la période de transmission est saisonnière, débutant en mai et se terminant en octobre dans la majorité des pays.

### c) Les hôtes

Les hôtes de *Leishmania infantum* sont des vertébrés (Dantas-Torres *et al.*, 2012). Une grande diversité d'espèces domestiques ou sauvages peuvent être infestées, avec entre autres des rongeurs, des marsupiaux, des primates ou encore des carnivores et des reptiles (Tableau 7). Près de 70 espèces de mammifères sont des hôtes du parasite (Ribeiro *et al.*, 2018). Le chien est considéré comme le principal réservoir de leishmanies.

**Tableau 7.** Réservoirs de *L. infantum* identifiés dans le monde. Source : Alemayehu *et al.*, 2017.

Région	Pays	Hôtes réservoirs
Ancien Monde	Afrique du Nord, Afrique Centrale et Asie de l'Ouest	Chien, Homme, rongeurs
Ancien Monde	Ethiopie, Kenya	Chien, Homme, rongeurs, animaux domestiques, chauve-souris, rock hyrax
Ancien Monde	Inde, Népal, Bangladesh et Afrique de l'Est	Chien, Homme, rock hyrax, rongeurs
Ancien Monde	Bassin méditerranéen, Asie de Centrale et de l'Ouest et Afrique de l'Ouest	Chien, Homme, rongeurs, renard
Ancien Monde	Europe	Chien, renard
Nouveau Monde	Argentine, Belize, Bolivie, Brésil, Colombie, Costa Rica, République Dominicaine, Equateur, Le Salvador, Guyane, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Martinique, Mexique, Nicaragua, Etats-Unis, Venezuela, Paraguay, Pérou, Suriname, Panama	Chien, rongeurs, chat, marsupiaux, renard, fourmilier, singes, coati, paresseux, tatou, porc-épic, kinkajou, raton-laveur, écureuil roux

#### d) Données sur la prévalence mondiale

En région d'endémicité, la prévalence de l'infestation pourrait atteindre près de 63 à 80% de la population canine (Baneth *et al.*, 2008). Ainsi, en Europe du Sud, près de 2.5 millions de chiens seraient infestés. Le nombre de chiens atteints en Amérique du Sud se compteraient également en millions, avec des forts taux d'infestation notamment au Venezuela et au Brésil.

La transmission du parasite dans l'espèce canine peut être modélisée grâce au  $R_0$  ou nombre de reproduction de base. Il s'agit du nombre moyen de cas secondaires émanant d'un cas primaire dans une population sensible. À Malte, le  $R_0$  a été estimé à 11, contre neuf au Brésil, en région amazonienne (Quinnell *et al.*, 2009).

Dans leur revue de la littérature de 2009, Solano-Gallego *et al.*, ont réalisé un tableau récapitulant les valeurs de prévalence de maladie, de l'infestation et de séroprévalence dans différentes études (Tableau 8). Ces valeurs peuvent être très variables d'une étude à l'autre car elles dépendent de la technique diagnostique utilisée. Ainsi, la séroprévalence est souvent bien inférieure à la prévalence de l'infestation déterminée à partir de la détection d'ADN de *Leishmania* par PCR.

**Tableau 8.** Données de la littérature décrivant la prévalence de la maladie, prévalence de l'infestation et la séroprévalence de leishmaniose canine dans différents pays du monde. Source : Solano-Gallego *et al.*, 2009. ND : non déterminé.

Pays	Nombre de chiens	Prévalence de la maladie	Séroprévalence	Prévalence de l'infestation
Brésil	1381	11%	24%	ND
Tunisie	250	Chiens apparemment sains	6%	ND
Maroc	1013	0.4%	8.6%	ND
Turquie	490	1.1%	5.3%	ND
Chypre	301	≥ 3.7%	10%	ND
Israël	122	8.2%	11.5%	ND
Israël (autre étude)	148	ND	6.8%	25%
Grèce	73	Chiens apparemment sains	12.3%	65.8%

## 2. La leishmaniose canine en Europe

### a) Distribution géographique de la leishmaniose canine en Europe

La leishmaniose canine est considérée comme endémique dans le bassin méditerranéen et notamment dans certains pays comme l'Albanie, la Croatie, la France, la Grèce, Chypre, l'Italie, Malte, le Portugal ou encore l'Espagne. Son endémicité est suspectée dans d'autres, comme en Roumanie, en Bosnie, en Macédoine, au Monténégro et en Bulgarie (EFSA, 2015). La zone d'endémicité de la leishmaniose canine a tendance à l'expansion géographique vers le nord et à des altitudes plus importantes.

## b) Prévalence de la leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen

La séroprévalence dans le bassin méditerranéen atteint près de 10 % alors que le taux de prévalence de l'infestation (*i.e.* le taux de chiens porteurs du parasite) atteint près de 63 à 80 % (EFSA, 2015). Dans leur revue de la littérature de 2009, Solano-Gallego *et al.*, ont réalisé un tableau récapitulant les valeurs de prévalence de maladie, de l'infestation et de séroprévalence dans différentes études (Tableau 9).

**Tableau 9.** Données de la littérature décrivant la prévalence de la maladie, prévalence de l'infestation et la séroprévalence de leishmaniose canine dans différents pays du bassin méditerranéen. Source : Solano-Gallego *et al.*, 2009. ND : non déterminé.

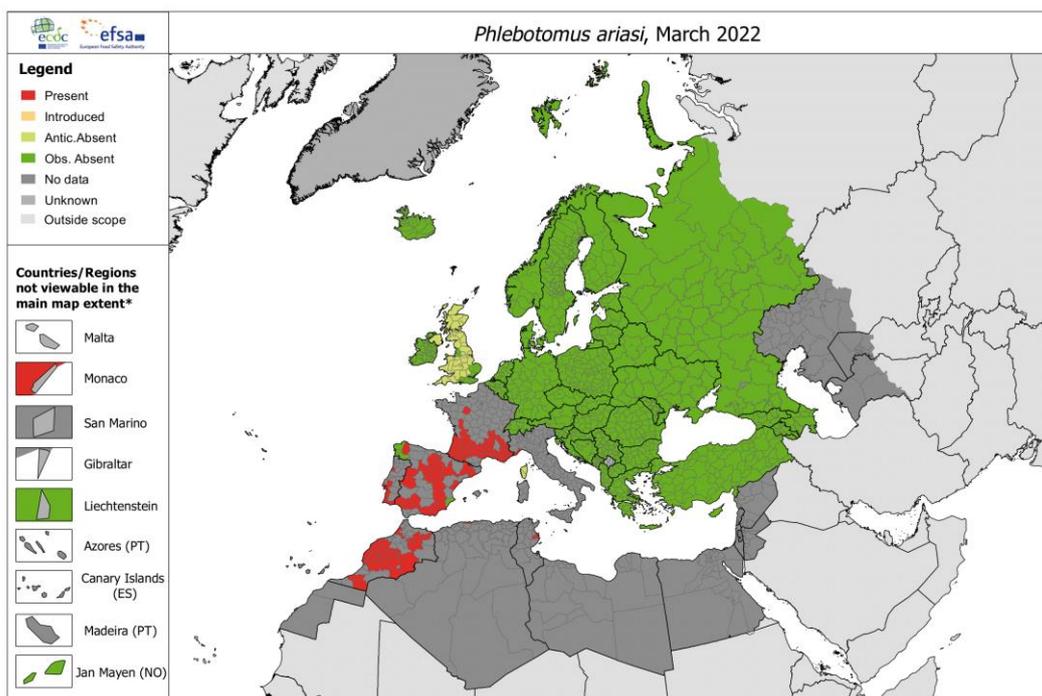
Pays	Nombre de chiens	Prévalence de la maladie	Séroprévalence	Prévalence de l'infestation
Grèce (Athènes)	1638	Chiens apparemment sains	22.4%	ND
Grèce (nord-ouest)	1200	Chiens apparemment sains	24.4%	ND
Italie	4456	ND	26.4%	ND
Portugal	294	3.1%	20.4%	ND
Chypre	301	≥ 3.7%	10%	ND
Croatie	306	8.2%	15%	ND
Grèce (Centre)	73	Chiens apparemment sains	12.3%	65.8%
Chypre	301	≥3.7%	10%	ND
Majorque	100	13%	26%	67%
Majorque (autre étude)	79	8-29%	8-20%	64-73%

Peu de données sont disponibles pour déterminer la prévalence de la maladie dans le bassin méditerranéen. Néanmoins, d'après l'étude de Mattin *et al.*, (2014), à partir de questionnaires envoyés aux vétérinaires dans certains pays européens, le taux de chiens atteints de leishmaniose serait de 0.71 % en France, 7.8 % en Grèce et 3 à 4% en Espagne, Italie et Portugal. L'étude de Baneth *et al.*, (2008), estime que près de 2.5 millions de chiens seraient atteints de leishmaniose dans la partie Sud-Ouest de l'Europe. Des cas d'épidémie de leishmaniose humaine sont parfois décrits, avec notamment le cas de l'épidémie de Madrid de 2009 à 2012 ; des lièvres sauvages ayant joué le rôle de réservoirs de la maladie (Martin-Sanchez *et al.*, 2021).

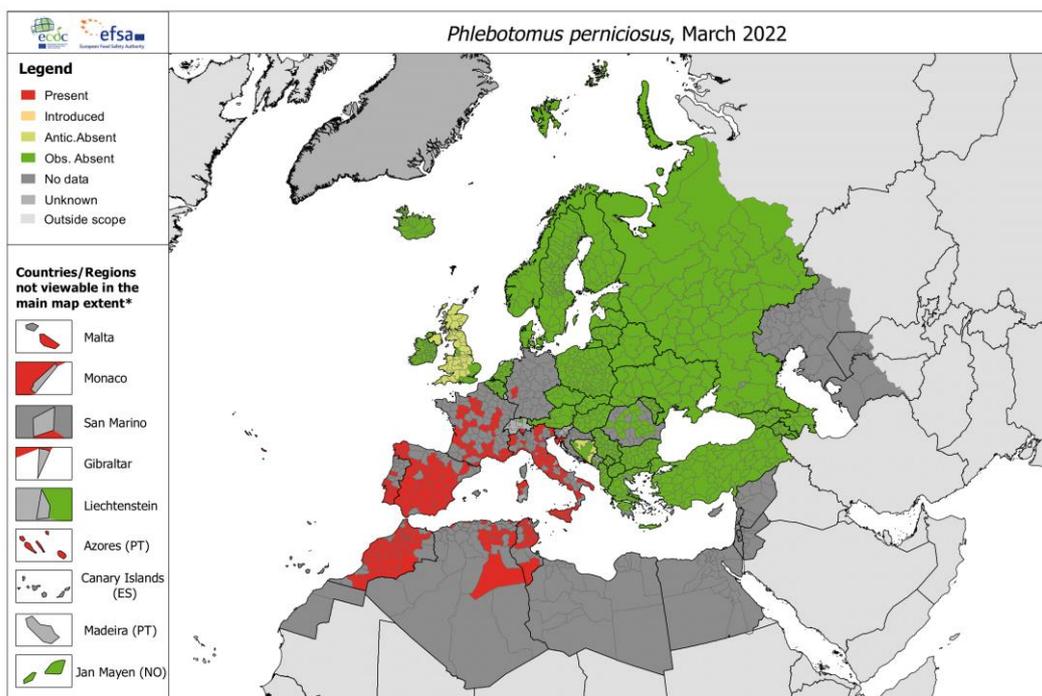
Des cas sont sporadiquement rapportés dans des régions non endémiques du nord de l'Europe, pour lesquels il s'agirait de cas importés depuis le bassin méditerranéen. Ce phénomène serait de plus en plus important, compte tenu de l'accroissement des voyages et migrations de chiens et d'Hommes depuis les régions endémiques. Près de 58 000 chiens sont emmenés chaque année en vacances en Europe du sud, avec un risque de 0.027% à 0.23% d'être infestés (Teske *et al.*, 2002). Des cas importés ont ainsi été décrits au Royaume-Uni, en Hongrie, en Serbie et en Hollande. Au Royaume-Uni, près de 257 chiens ont été diagnostiqués entre avril 2005 et décembre 2007 ; en Suède, 24 chiens en 2011 et 23 en 2012 (EFSA, 2015).

### c) Distribution géographique des phlébotomes

En Europe, au moins huit espèces de phlébotomes sont des vecteurs biologiques de *L. infantum* : *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. langeroni*, *P. balcanicus*, *P. kandelakii* et *P. tobbi* (Alten *et al.*, 2016). De plus, d'autres espèces sont suspectées d'être vectrices telles : *P. mascittii*, largement répandu dans les pays tempérés de l'ouest de l'Europe, *P. alexandri* et *P. syriacus*, suspects dans certains pays du Moyen-Orient, et également présents dans les pays de l'Est du bassin méditerranéen. Jusqu'à présent, les phlébotomes n'ont pas été mis en évidence en République Tchèque, aux Pays-Bas, en Pologne, dans les pays nordiques, en Slovaquie et en Irlande. *P. mascittii* et *P. perniciosus* ont été identifiés dans le sud-ouest de l'Allemagne. *P. mascittii* a également été capturé en Belgique et en Autriche. *P. neglectus* et *P. perfiliewi* ont été décrits en Hongrie. Les deux cartes ci-dessous montrent la répartition de *P. ariasi* (Carte 2) et *P. perniciosus* (Carte 3), les deux principales espèces de phlébotomes en Europe. On remarque que les régions endémiques concernent le pourtour méditerranéen avec le sud de la France, l'Espagne, l'Afrique du Nord et l'Italie.

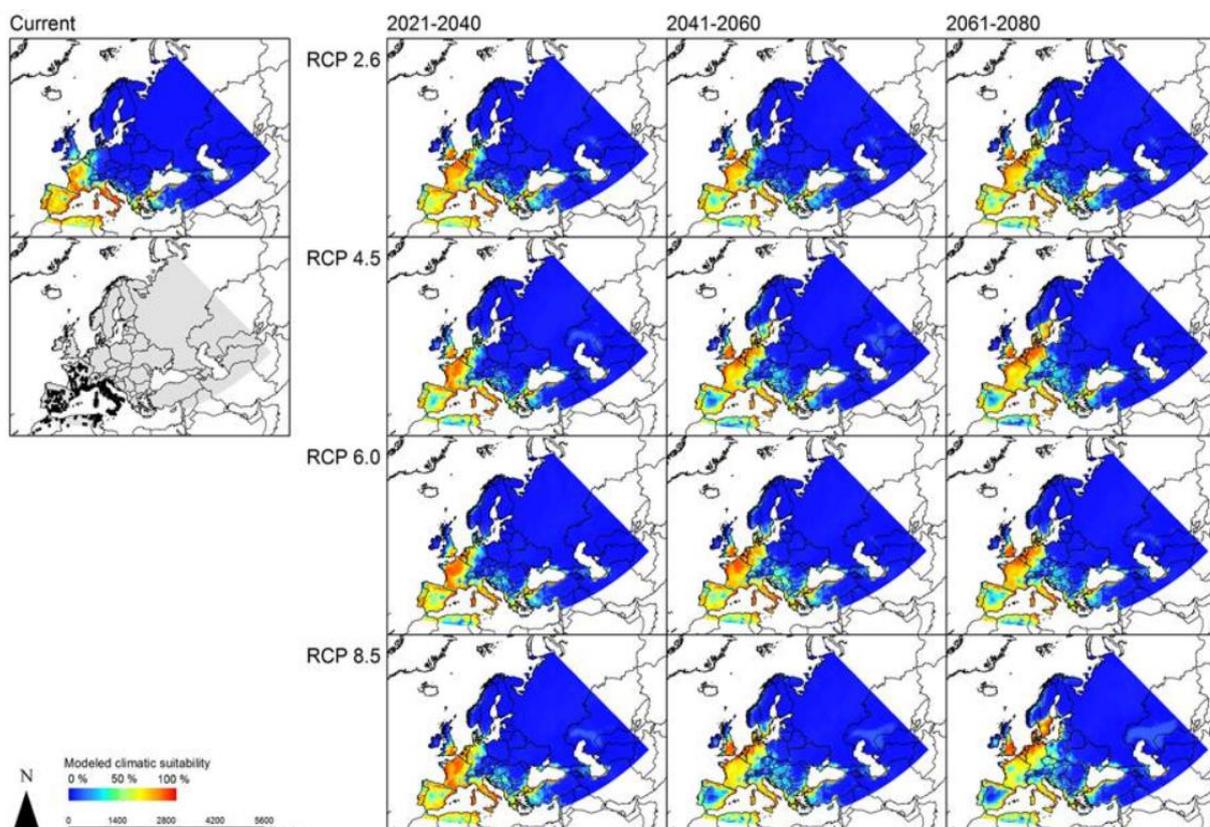


**Carte 3.** Carte représentant la distribution géographique de *Phlebotomus ariasi* en Europe et Asie Occidentale en mars 2022. Source : European Centre for Disease Prevention and Control (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-ariasi-current-know>, consulté le 12/08/22).



**Carte 2.** Carte représentant la distribution géographique de *Phlebotomus perniciosus* en Europe et Asie Occidentale en mars 2022. Source : European Centre for Disease Prevention and Control (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perniciosus-c>, consulté le 12/08/22).

Par ailleurs, d'après les modélisations des futures niches écologiques favorables à l'installation des phlébotomes (Carte 4), ces derniers pourraient être retrouvés jusqu'au nord de l'Europe et la Scandinavie (Koch *et al.*, 2017).



**Carte 4.** Modélisation des futures dispersions géographiques de *P. perniciosus* selon différents scénarios de réchauffement climatique. Source : Koch. *et al.*, 2017. « Current » : actuel. Les RCP correspondent à différents scénarios de réchauffement climatique où le réchauffement global croît avec le chiffre du RCP.

#### d) Abondance saisonnière des phlébotomes dans le bassin méditerranéen

En Europe, la période d'activité des femelles phlébotomes est saisonnière. Les adultes émergent en avril, mai ou juin selon les lieux et disparaissent en octobre ou novembre. Les courbes d'abondance des phlébotomes en fonction du temps diffèrent avec les latitudes (Alten *et al.*, 2016). En effet, en France par exemple, cette courbe montre une répartition unimodale avec un pic d'abondance en juillet, alors qu'à des latitudes moins élevées, comme à Tunis, l'abondance présente une allure bimodale avec un pic d'abondance en mai et en juillet. En effet, les températures moyennes y sont plus élevées et ainsi, les larves de stade IV sortent de diapause plus précocement.

### 3. La leishmaniose canine en France métropolitaine

Les premières observations de leishmaniose canine en France métropolitaine remontent au début du XX<sup>ème</sup> siècle à Marseille, où Pringault rapporte le premier cas en 1914.

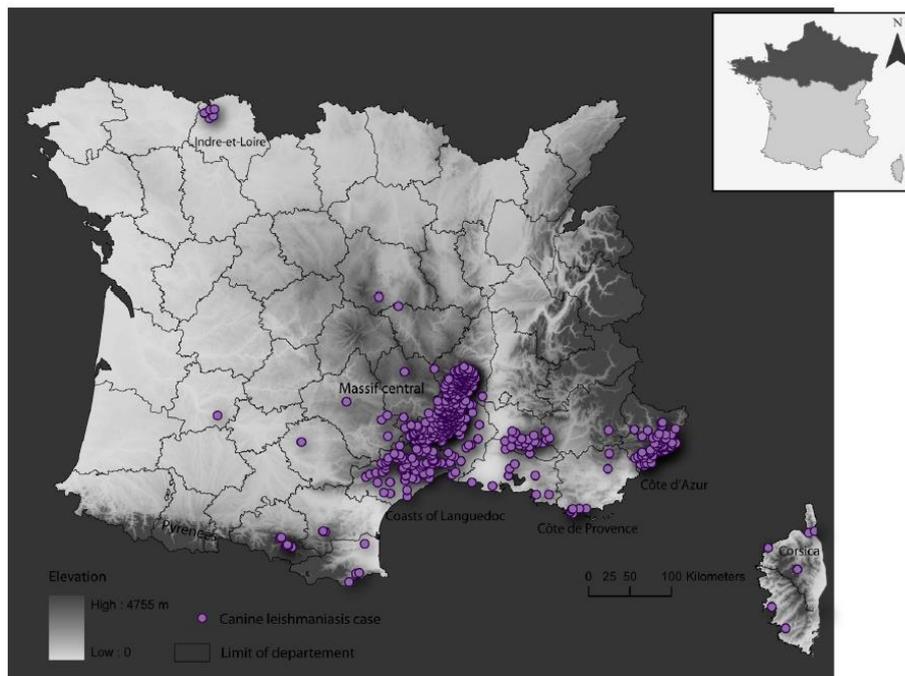
Deux espèces de phlébotomes sont décrites comme vecteurs biologiques de *L. infantum* en France : *P. ariasi* et *P. perniciosus*. L'aire de répartition de *P. perniciosus* dépasse largement le pourtour méditerranéen ; cette espèce a été décrite jusqu'en Haute-Marne, en Seine-et-Marne et dans le Val-d'Oise. L'aire de distribution de *P. ariasi* est plus restreinte, elle se limite au pourtour méditerranéen, où elle est présente dans l'étage de la chênaie mixte (Dedet *et al.*, 2013), et au Sud-Ouest.

La distribution géographique des cas de leishmaniose canine en France est très hétérogène (Chamaillé *et al.*, 2010). En effet, des foyers d'endémicité sont décrits, notamment dans les Cévennes, les Alpes-Maritimes, les Pyrénées-Orientales, la Corse et la Provence (Dedet *et al.*, 2013). Par ailleurs, des foyers ectopiques sont également décrits, comme celui de la Moyenne vallée de l'Ariège, au sein d'un micro-climat de végétation méditerranéenne.

Selon les enquêtes, les prévalences observées se situent entre 3 et 5.8% dans l'étage de la chênaie mixte des Cévennes et entre 3 et 28% dans les Alpes-Maritimes. Un questionnaire rempli en ligne par des vétérinaires français, semble suggérer que le nombre de cas de leishmaniose canine en France serait en augmentation (Le Rutte *et al.*, 2021). En effet, il était d'environ six cas pour 1000 chiens en 2016 et 2017, alors, qu'il atteignait 4.6 cas pour 1000 chiens en 2014. Des cas sont également décrits dans des départements non endémiques du Nord et de l'Ouest de la France comme le Nord-Pas-de-Calais, l'Eure, l'Orne, le Morbihan et la Loire-Atlantique. Par ailleurs, d'après Bourdeau en 2008, le nombre de départements français où les vétérinaires diagnostiquent plus de 50 cas de leishmaniose canine par an a doublé entre 1988 et 2004.

La carte 5 ci-dessous décrit le nombre de cas de leishmaniose canine rapportés par les vétérinaires français entre 1965 et 2007, d'après une synthèse des données de la littérature

réalisée par Chamailé *et al.*, (2010). Les foyers des Cévennes, de Provence et des Alpes-Maritimes sont clairement identifiables. Néanmoins, ceux de Corse et des Pyrénées-Orientales le sont moins. Ceci est dû au fait que les villes de Montpellier, Marseille et Nice ont des laboratoires qui effectuent des recherches actives des cas de leishmaniose canine, ce qui permet de les identifier plus facilement. On note cependant un manque drastique d'études récentes de prévalence chez le chien en France Métropolitaine.



**Carte 5.** Localisation des cas de leishmaniose canine rapportés entre 1965 et 2007. Source : Chamailé *et al.*, 2010.

« *Elevation* » : altitude. « *Canine leishmaniasis case* » : cas de leishmaniose canine.

« *Kilometers* » : kilomètres. « *Coast* » : côte.

## **B. Etats des lieux des connaissances sur le foyer cévenol de la leishmaniose canine**

Les Cévennes forment un massif montagneux faisant partie du sud-est du Massif Central (Carte 6). Le parc national des Cévennes comprend cinq massifs : le Mont Lozère, le Mont Aigoual, le Causse Méjean, les vallées cévenoles et le piémont cévenol. La dénomination des Cévennes au sens large comprend donc les vallées cévenoles, le piémont cévenol, une partie du massif du Mont Aigoual, mais également les plaines méridionales situées plus au sud, dans la partie nord des départements de l'Hérault et du Gard.



**Carte 6.** Carte des reliefs de France. Source : cartesfrance.fr, consulté le 05/01/22.

Le territoire des Cévennes au sens large est entouré en jaune sur la carte.

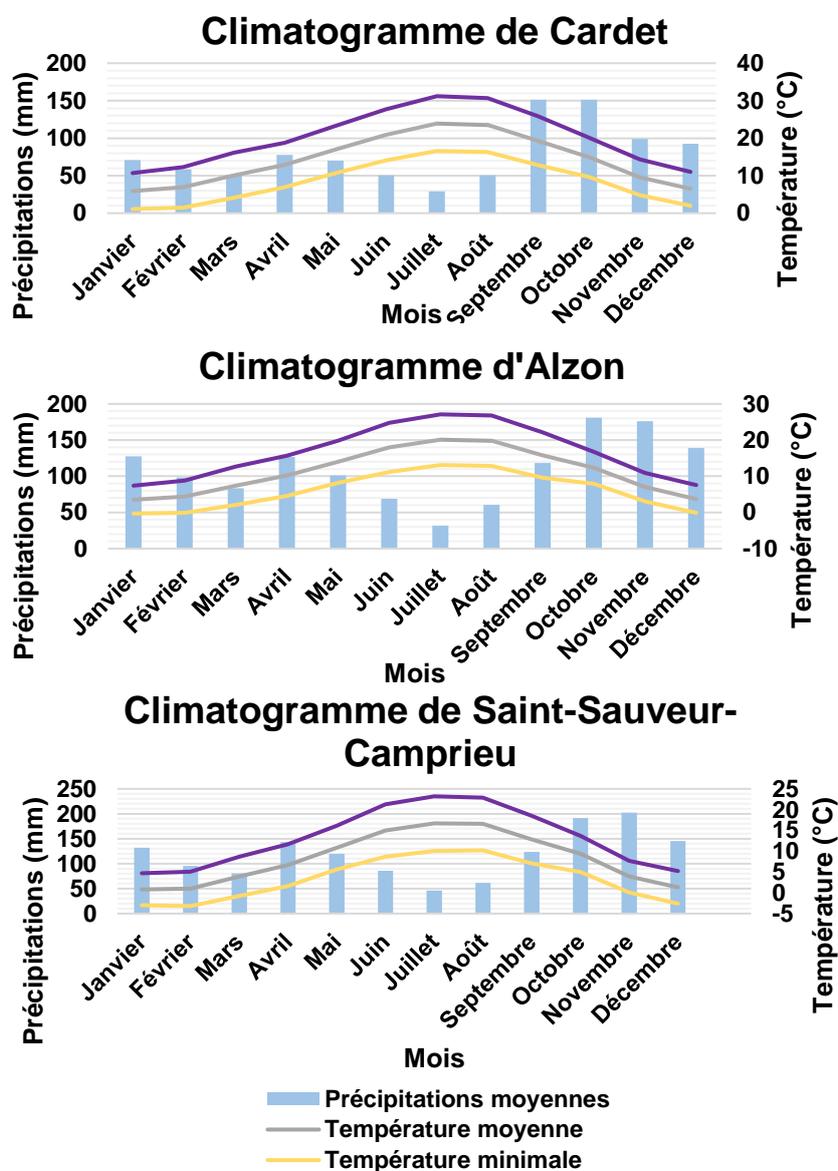
## 1. Caractéristiques du biotope cévenol

### a) Données climatiques

Les Cévennes présentent une grande diversité de paysages et de topographies. En effet, on y trouve des vallées étroites, des gorges, des plateaux voire des massifs montagneux pouvant culminer jusqu'à 1567 mètres pour le Mont Aigoual. La région cévenole est caractérisée par sa multitude de microclimats. Les plaines méridionales des Cévennes sont soumises à un climat de type méditerranéen, alors que plus en altitude, le climat devient continental voire montagnard. Pour illustrer cela, les climatogrammes de trois villes des Cévennes soumises à des conditions climatiques différentes : Cardet (109 mètres d'altitude),

Alzon (611 mètres d'altitude) et Saint-Sauveur-Camprieu (1107 mètres d'altitude) sont présentées dans le Diagramme 1.

La température moyenne annuelle à Cardet est de 14.3 °C contre 11.4 °C pour Alzon et 8.3°C pour Saint-Sauveur-Camprieu. Ceci illustre la diversité climatique des Cévennes. Ces climatogrammes mettent également en évidence un phénomène climatique caractéristique de cette région : les épisodes cévenols. Il s'agit d'importantes pluies orageuses, qui ont lieu de fin août à octobre, à l'origine d'inondations et crues.



**Diagramme 1.** Climatogrammes des villes de Cardet, Alzon et Saint-Sauveur-Camprieu. Source des données : Météo France (<https://meteofrance.com/>, consulté le 10/02/22)

## **b) Types de végétation**

D'après le rapport du GREC-SUD et du RECO de 2020, les forêts représentent aujourd'hui 72 % du territoire du parc national des Cévennes et reflètent la diversité des climats et paysages cévenols. Le sud-est du parc est principalement couvert par des forêts sous forte influence méditerranéenne avec une majorité de chênes verts et de chênes pubescents alors que dans le centre et le nord-ouest du parc, on retrouve des forêts typiques de l'étage montagnard, comme la hêtraie sapinière. Dans leur étude de 2011, Leguëdois *et al.*, ont réalisé une carte de couverture vectorielle harmonisée à 1/1 000 000 de la France qui décrit plus précisément les types de végétations rencontrées dans les différentes zones des Cévennes.

## **c) Conséquences du réchauffement climatique sur le biotope cévenol**

Le réchauffement climatique a des répercussions sur le biotope cévenol. En effet, les températures annuelles moyennes, minimale et maximale sont significativement plus élevées dans le parc national des Cévennes que quelques années auparavant. Ainsi, en 60 ans, les températures minimales ont augmenté de 1.2 °C et les maximales de 1.5°C. L'écart est d'autant plus marqué au printemps et en été, où, pour la ville de Salindres par exemple, la hausse atteint 2.3°C. Le réchauffement printanier des températures maximales est indépendant de l'altitude et est estimé à 1,05 °C par décennie. Le réchauffement printanier des températures minimales est dépendant de l'altitude et est évalué à 0.57 °C par décennie pour l'altitude de 500 mètres et 0,89 °C par décennie pour 1500 mètres d'altitude. Le nombre de jours de gel est en baisse avec une perte de 13 jours à Saint-du-Gard depuis 1989 et de 10 jours à Saint-Christol-les-Alès depuis 1959. En basse altitude, avec l'exemple de Saint-Christol-les-Alès et Salindres, les nuits tropicales, pour lesquelles la température minimale est supérieure ou égale à 20 °C, et le nombre de jours très chauds, où la température maximale excède 30°C, augmentent.

Le réchauffement climatique impacte également la pluviométrie. En effet, les cumuls de précipitations sont à la baisse en hiver et en été alors qu'ils sont plutôt stables pour les mois d'automne et de printemps.

Les forêts subissent également le réchauffement climatique, mais ne présentent pas toutes la même vulnérabilité face à celui-ci. Ainsi, les forêts sous influence méditerranéenne y sont plus sensibles, avec des signes de dépérissement plus marqués (notamment chez le chêne pubescent et le châtaignier) et une exposition plus forte au risque d'incendie.

## **2. Connaissances actuelles sur les populations de phlébotomes des Cévennes**

### **a) Les populations présentes dans les Cévennes**

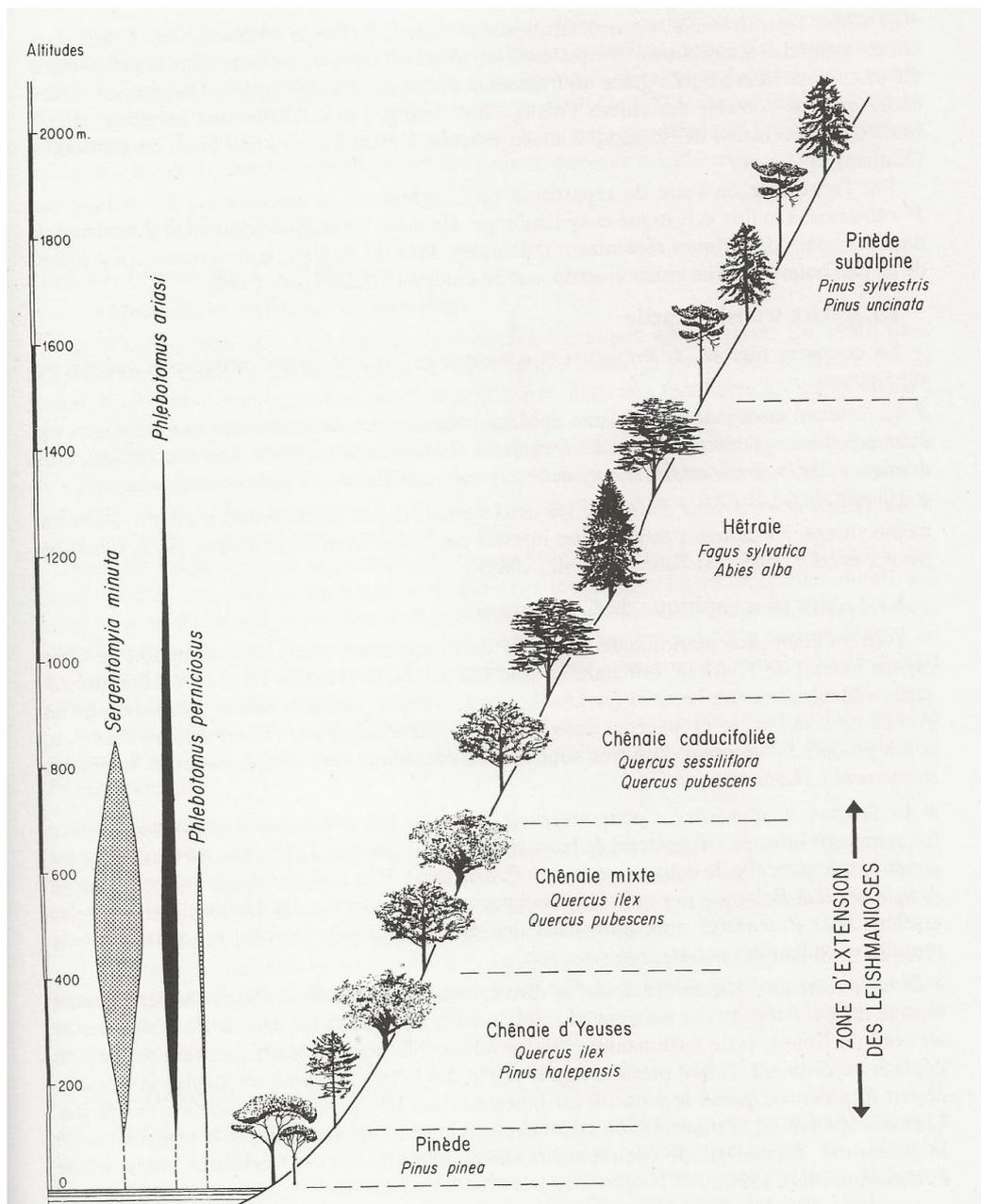
Dans les Cévennes, six espèces de phlébotomes ont été capturées (Prudhomme *et al.*, 2015). Il s'agit de *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. mascittii*, *P. sergenti*, *P. papatasi* et *Sergentomyia minuta*. Cette étude a été menée dans un transect de 14 kilomètres, dans le massif de l'Oiselette, situé au cœur des Cévennes. La végétation qui s'y trouve est composée d'une majorité de chênes verts (*Quercus ilex*) et de chênes pubescents (*Quercus pubescens*), typique des paysages de Garrigue des plaines cévenoles. Dans cette zone d'étude, l'espèce de phlébotomes majoritaire est *P. ariasi*, à 93.23 %, suivie par *S. minuta* à 6.18 %, *P. perniciosus* à 0.48 % et *P. mascittii* à 0.11 %. La prédominance de *P. ariasi* dans le biotope cévenol est souvent décrite dans la littérature et explique qu'il soit le vecteur majeur de *L. infantum* dans cette région.

### **b) Distribution des phlébotomes en fonction de l'altitude**

Toutes les espèces de phlébotomes identifiées sont présentes jusqu'à des altitudes atteignant 500 à 600 mètres (Prudhomme *et al.*, 2015). *P. ariasi* a été décrit à des altitudes supérieures à 800 mètres, voire dans des climats subalpins à montagnard. Néanmoins, le pic d'abondance de cette espèce et de *P. perniciosus* se situe à des altitudes de 300 à 400 mètres.

De plus, la densité de *P. ariasi* augmente jusqu'à un palier entre 400 et 500 mètres à partir duquel elle diminue.

L'altitude n'est pas un facteur écologique en tant que telle mais les températures et les biotopes associés ont une influence significative sur les populations de vecteurs. En 1969, Rioux *et al.*, ont réalisé un graphique (Figure 20) décrivant la fréquence et la répartition altitudinales de *P. perniciosus*, *P. ariasi* et *Sergentomyia minuta*, qui rejoint ce que Prudhomme *et al.*, ont mis en évidence en 2015.



**Figure 20.** Répartition et fréquence de *P. perniciosus*, *P. ariasi* et *S. minuta* en fonction de l'altitude et des étages de végétation en Languedoc. Source : Rioux *et al.*, 1969.

### c) **Influence des conditions climatiques**

La densité de *P. ariasi* est dépendante de la température et de l'humidité (Prudhomme *et al.*, 2015). Ainsi, la température minimale d'activité des phlébotomes adultes serait autour de 11-12°C, pour une maximale autour de 35°C et une température nocturne idéale autour de 19 à 21 °C. L'abondance de la population de *P. ariasi* s'accroît jusqu'à la température moyenne de 20°C pour ensuite diminuer. Néanmoins, la relation entre l'abondance des phlébotomes et la température n'est pas linéaire. En effet, dans l'étude de Alten *et al.*, (2016), alors que les températures étaient plus élevées qu'à la même période l'année passée, les populations de phlébotomes capturées étaient moins importantes. Par ailleurs, l'installation des phlébotomes serait favorisée dans des milieux où l'humidité est relativement peu élevée.

Les larves de stade IV entrent en diapause hivernale lorsque les températures ne leur sont pas favorables, et la période d'apparition des adultes est liée à l'augmentation des températures au printemps. Les larves de stade IV sont plus sensibles à la température moyenne du milieu que les adultes (Alten *et al.*, 2016). Ainsi, la température moyenne annuelle, avec notamment les températures hivernales, influence le taux de survie de ces larves et a donc une incidence significative sur le nombre d'adultes émergents au printemps. De plus, la fin de période d'activités des adultes est moins dépendante de la température moyenne que leur émergence. La baisse de température ralentirait le métabolisme des femelles, augmenterait le temps de survie des femelles de phlébotomes ayant fait un repas de sang et la durée de certains stades du cycle comme l'oviposition et l'éclosion des œufs.

Par ailleurs, la population de *P. ariasi* serait également influencée par l'orientation géographique du lieu (Prudhomme *et al.*, 2015). Ainsi, les populations de phlébotomes seraient plus abondantes dans des murs ou flancs orientés vers le sud. Ceci est très certainement corrélé à des conditions de température et d'humidité favorables au vecteur.

L'abondance des phlébotomes est parfois très différente d'un lieu à l'autre dans une zone géographique pourtant relativement restreinte. Ainsi, en plus des conditions phytoécologiques moyennes de chaque biotope, des épisodes locaux de courte durée comme

de fortes rafales de vent ou des pluies abondantes peuvent influencer le devenir des phlébotomes (Alten *et al.*, 2016). Ainsi, chaque lieu présente un microclimat influençant la survie des vecteurs.

**d) Distribution saisonnière des populations de phlébotomes dans les Cévennes**

Alors que dans les régions tropicales les phlébotomes sont présents toute l'année, en France et plus particulièrement dans les Cévennes, la période d'activité des adultes est saisonnière et s'étend de mai à octobre avec un pic pendant les mois de juillet et d'août. L'abondance des populations de phlébotomes en fonction des mois de l'année suit une courbe de type monomodal. La période de décembre à mars semblerait sans risque pour la transmission de *L. infantum* (Alten *et al.*, 2016).

**e) Abondance des femelles phlébotomes au cours de la journée**

En région méditerranéenne, la période d'activité des femelles de phlébotomes est nocturne. En effet, elle est tributaire du rythme circadien sur lequel sont réglées les heures de repas des femelles. Elle débute entre 19 et 22 heures et se termine entre quatre et sept heures du matin. Les pics d'activité décrits sont entre 23 heures et deux heures du matin.

**f) Évolution de la population cévenole des phlébotomes en 35 ans**

Prudhomme *et al.*, ont mené en 2015 une étude comparable dans un transect similaire à celui de l'étude de Rioux *et al.*, en 1980. Ceci nous permet de comparer les données afin de déterminer l'évolution des populations de phlébotomes dans les Cévennes. Les études montrent des populations de phlébotomes dont l'abondance relative est similaire. Ainsi, celle de Rioux *et al.*, de 1980 comptait 86.36 % de *P. ariasi*, 13.27% de *S. minuta*, 0.26% de *P. perniciosus* et 0.12% de *P. mascittii*. La distribution spatio-temporelle était également très fortement similaire. Néanmoins, les densités de phlébotomes ne peuvent pas être comparées en raison des différences de méthodologies utilisées.

### g) La population canine

D'après l'ICAD, les départements de l'Hérault et du Gard compteraient respectivement 176 720 et 141 506 chiens identifiés de moins de 13 ans et demi. En 2016, 38.5% des chiens vivaient dans des zones à moins de 2000 habitants. Ainsi, la population canine serait davantage présente en zone rurale à périurbaine (Tableau 10). En 20 ans, la population canine est restée relativement stable voire en légère baisse avec 9.04 millions de chiens en 2000 contre 7.5 millions en 2020 (FACCO/KANTER-TNS, 2020).

**Tableau 10.** Taux de possession de chiens en fonctions du type d'habitats. Source : enquête FACCO/KANTAR-TNS, 2020.

	
- de 2 000 habitants	38,5 %
2 000 à 20 000 habitants	20,8 %
20 000 à 100 000 habitants	11,8 %
+ de 100 000 habitants	21,6 %
Agglomération parisienne	7,4 %

### h) Les autres hôtes identifiés

Rioux *et al.*, (1969), ont mené une étude sur le comportement trophique des phlébotomes dans les Cévennes et notamment sur l'attraction exercée par différents hôtes potentiels. Ils ont ainsi montré que *P. ariasi* avait une préférence trophique majoritaire pour le chien. Néanmoins, le renard, le poulet et le lapin joueraient un rôle non négligeable pour les repas sanguins de ces vecteurs. Au contraire, les reptiles et rongeurs sauvages seraient très peu concernés par les repas sanguins de cette espèce de phlébotomes.

### i) Données sur la prévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes

Des études s'intéressant à la séroprévalence de la leishmaniose canine ont déjà été réalisées en 1993 par Dereure et par Keck *et al.*, en 2003. Dans les deux études, un chien

était considéré comme positif si son titre sérologique était supérieur ou égal à 1/80 en IFAT. Ainsi, en 1993, Dereure a montré que la séroprévalence de la leishmaniose canine était de 5.51% dans l'étage de la chênaie d'Yeuses contre 9.6% dans l'étude de Keck *et al.*, (2003). De plus, la séroprévalence dans l'étage de la chênaie mixte était de 16.52% en 1993 contre 17.9% en 2003. La séroprévalence de la leishmaniose canine entre les deux études est restée relativement stable, notamment pour l'étage de la chênaie mixte (Keck *et al.*, 2003). Ceci est reflété par une valeur de  $R_0$  proche de 1, caractéristique d'une maladie endémique. La séroprévalence de la leishmaniose canine a néanmoins augmenté dans l'étage de la chênaie d'Yeuses en 10 ans, ce qui peut être expliqué, selon ces mêmes auteurs, par le fait que la leishmaniose canine devienne une maladie plus périurbaine. En 2003, l'étude a également mis en évidence la disparité de séroprévalence de cette maladie au sein d'une même zone bioclimatique, montrant l'importance des microclimats dans la transmission du pathogène. La distribution des titres en anticorps était unimodale, ce qui d'après les auteurs est caractéristique d'une maladie endémique. Ils ont également montré que les chiens vivant dans la chênaie mixte présentaient plus de titres sérologiques faibles, car plus fréquemment en contact avec le parasite, produisant de faibles quantités d'anticorps, tout en restant asymptomatiques.

Néanmoins, bien que le taux de séroprévalence soit relativement stable entre les deux études, la population canine avait augmenté de 2 millions d'individus de 1971 à 2000 et le nombre absolu de cas de chiens séropositifs devait donc être plus important en 2003 qu'en 1993.

#### j) **Quelle peut-être la prévalence de la leishmaniose canine de nos jours ?**

D'après Prudhomme *et al.*, (2015), les changements climatiques et socioculturels qui ont eu lieu dans les Cévennes au cours des dernières décennies ont pu modifier la transmission de *L. infantum*.

Si les températures tendent à s'élever, les phlébotomes pourraient s'installer de façon pérenne dans des régions plus au nord ou à des altitudes plus élevées. Le réchauffement

climatique semble en effet favoriser l'installation des phlébotomes dans des territoires du nord de l'Europe, comme la Belgique ou encore l'Allemagne (Giancetti *et al.*, 2020). Ainsi, la zone d'endémicité de leishmaniose canine dans le foyer cévenol pourrait être aujourd'hui plus étendue, en longitude et latitude, que ce qui a été précédemment décrit.

Bien que le réchauffement climatique ne semble pas influencer le rythme circadien des repas des femelles phlébotomes, son influence sur l'abondance des populations est discutée. Des températures extrêmes (inférieures à 15°C ou supérieures à 32°C) sont en effet défavorables pour la fécondité des phlébotomes (Kasap *et al.*, 2006), comme cela est d'ailleurs le cas pour d'autres insectes vecteurs comme les moustiques (Mordecai *et al.*, 2016).

De plus, le réchauffement climatique pourra s'accompagner de modifications météorologiques, telles que les pluies cévenoles, épisodes défavorables à la dispersion active des phlébotomes (Chalghaf *et al.*, 2018). Ainsi, bien que contribuant à l'extension des aires géographiques favorables aux phlébotomes, le réchauffement climatique ne peut être systématiquement associé à une augmentation des populations de phlébotomes (Prudhomme *et al.*, en 2015).

La population canine, réservoir majeur de *L. infantum*, a également subi des modifications sur les 20 dernières années. Elle est passée de 9 millions de chiens en 2003, à 7.5 millions en 2020 (enquête FACCO et KANTAR-TNS de 2020). Néanmoins, les propriétaires des chiens vivaient toujours majoritairement en zone rurale ou péri-urbaine, proche des biotopes des vecteurs.

Enfin, la prévention de la leishmaniose canine a connu des innovations majeures sur les dernières décennies, avec notamment la mise sur le marché de vaccins (CanisLeish® et Letifend®), et la multiplication des produits à base de pyréthriinoïdes.

Ainsi, il est possible que la séroprévalence de la leishmaniose canine dans la région des Cévennes ait été modifiée au cours des vingt dernières années. Aucune étude de terrain n'a été réalisée depuis 2003, d'où l'objectif de ce travail, qui a été notamment d'actualiser les connaissances sur l'épidémiologie de cette maladie dans le foyer cévenol.

## **C. Travail personnel : Étude de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer cévenol en 2022**

Le projet expérimental de cette thèse a été réalisé en collaboration avec le Centre National de Référence des Leishmanies (CNR) de Montpellier, sous la direction du Professeur Laurence Lachaud. Le but de cette étude transversale était : (i) d'évaluer la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes, (ii) de connaître l'utilisation des mesures préventives par les propriétaires et (iii) de comparer les performances diagnostiques de quatre tests sérologiques.

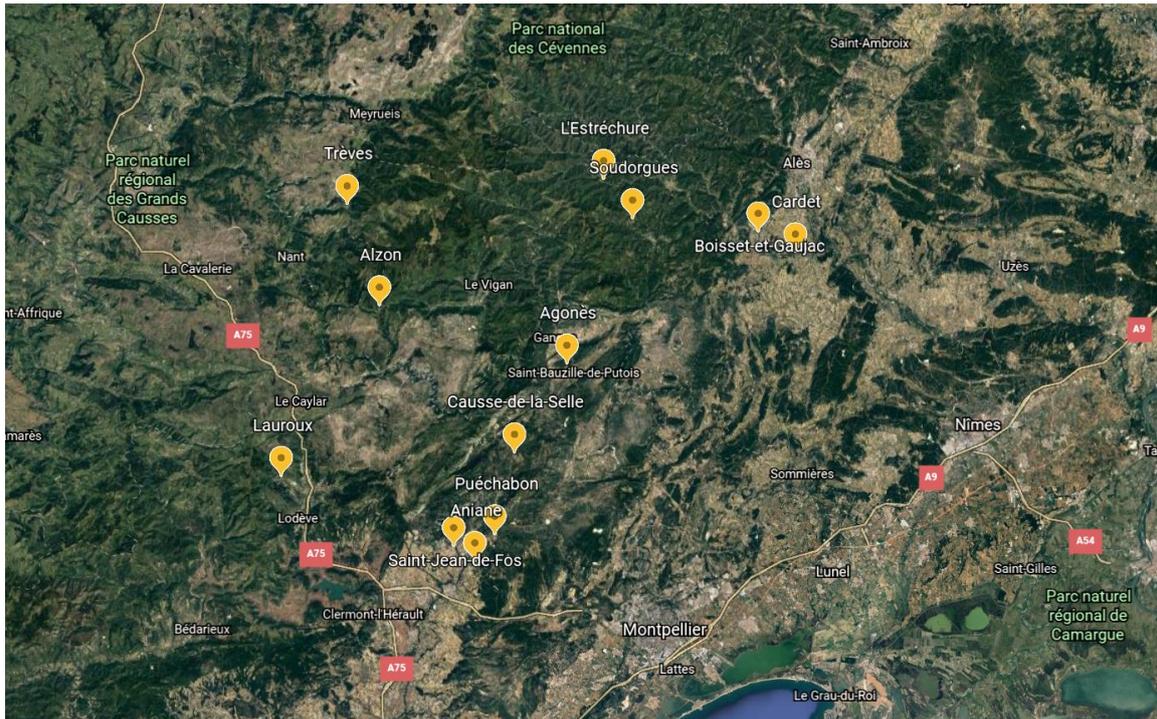
### **1. Matériel et méthodes**

#### **a) Accord du comité d'éthique**

Ce protocole d'expérimentation a été approuvé par le comité d'éthique en expérimentation animale numéro 036 sous le numéro APAFIS #33307-2021070114534565 v4. Les propriétaires étaient informés du protocole de recherche, des prélèvements souhaités et de l'accord du comité d'éthique par téléphone avant notre venue. Leur consentement éclairé a été recueilli oralement.

#### **b) Zone d'étude**

La zone d'étude était localisée dans les Cévennes et recouvrait une superficie totale d'environ 1200 km<sup>2</sup>. Les localités concernées sont représentées par un point jaune sur la carte ci-dessous (Carte 7), et étaient Cardet (30350), Causse-de-la-Selle (34380), Agonès (34190), Trèves (30750), Alzon (30770), Aniane (34150), Lauroux (34700), Puéchabon (34150), Saint-Jean-de-Fos (34150), Soudorgues (30460), l'Estréchure (30124) et Boisset-et-Gaujac (30140). Ainsi, six étaient dans le département du Gard et six dans l'Hérault.



**Carte 7.** Carte représentant les lieux d'échantillonnage. Source : Google Earth (<https://earth.google.com/web/@43.89043694,3.81265885,283.09191692a,173928.14700566d,30y,0h,0t,0r>, consulté le 22/01/22).

### c) La population canine ciblée

Les propriétaires participant à l'étude ont été recrutés grâce à des appels téléphoniques de septembre 2021 à janvier 2022. Leur contact a été obtenu grâce à des connaissances des membres du laboratoire ou après appels téléphoniques auprès des présidents de différentes sociétés de chasse (société communale de chasse de Puéchabon, société de chasse d'Anduze). Les chiens inclus dans l'étude devaient avoir au moins six mois, afin d'avoir passé au moins une saison de transmission, et résider dans les Cévennes. Après les avoir informés du déroulé de l'étude et des techniques réalisées, nous avons donné rendez-vous aux propriétaires dans le lieu de leur convenance afin de réaliser les prélèvements. La période d'échantillonnage s'est déroulée de décembre 2021 à janvier 2022, en dehors de la saison de transmission de *L. infantum*. La participation à l'étude s'est donc faite sur la base du volontariat.

Le groupe témoin était constitué de 28 chiens diagnostiqués comme atteints de leishmaniose canine par l'association de signes cliniques compatibles, d'une sérologie

positive et d'une PCR positive. 25 chiens vivaient en Tunisie et trois dans les Cévennes. De précédentes études réalisées par le Centre National de Référence *Leishmania* de Montpellier ou l'Institut Pasteur de Tunis (Tunisie) avaient permis leur échantillonnage. Ces chiens avaient par ailleurs reçu un traitement contre cette maladie après avoir été diagnostiqués.

#### **d) Prélèvement des échantillons**

Une contention adéquate était réalisée par un technicien expérimenté. Une prise de sang était faite au niveau des veines céphaliques : cinq millilitres de sang ont été prélevés dans un tube EDTA et cinq millilitres dans un tube sec. Les échantillons, stockés à température ambiante, étaient identifiés grâce à un code attribué à chaque chien et inscrit sur les tubes. Une fois de retour au laboratoire, les tubes étaient centrifugés pendant dix minutes à 2500 tours par minute. Après centrifugation, le sérum était prélevé depuis les tubes secs et placé dans des tubes Eppendorf d'un millilitre, le plasma et le buffy-coat depuis les tubes EDTA et placés également dans ces tubes Eppendorf pour la réalisation d'une autre étude. Tous les échantillons étaient par la suite conservés dans un congélateur à -80°C en attendant les analyses.

#### **e) Techniques sérologiques**

La recherche d'anticorps spécifiques anti-*Leishmania* a été réalisée par des méthodes commerciales quantitatives ELISA (« *enzyme-linked immunosorbent assay* ») et qualitatives (immunochromatographie sur membrane). Les troussees commerciales utilisées pour la méthode ELISA étaient (i) ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test (VET-Innovate ID Diagnostics®, France), et (ii) *Leishmania infantum* IgG ELISA® (Bordier® Affinity Products, Suisse). Pour ces deux ELISA, les antigènes étaient des extraits solubles de *Leishmania infantum*. Les deux techniques d'immunochromatographie testées étaient (i) Speed Leish K® (Virbac®, France) et (ii) FASTest® LEISH (Megacor®, Autriche) et permettent respectivement la recherche des anticorps circulants dirigés contre les kinésines de *L. infantum* et des antigènes recombinants de ce parasite. Les kits ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

#### **f) Collecte d'informations**

Les informations relatives au milieu de vie et aux chiens étaient collectées grâce à des questionnaires fournis en Annexe I. La description du biotope avec notamment le type de végétation, la présence de murs de pierre à proximité du chenil, l'altitude, le type d'habitat (rural, périurbain, urbain) et la présence d'autres animaux domestiques ou d'élevage à proximité ont été notés. Cette description a été réalisée par les expérimentateurs eux-mêmes lorsque les prélèvements étaient réalisés sur le lieu de vie des chiens ou après questionnement des propriétaires dans le cas où le lieu de prélèvement ne correspondait pas au lieu de vie. Les informations recueillies pour chaque chien étaient : son nom, son sexe, sa race, la longueur de ses poils, son activité (chasse, garde, compagnie, élevage), son environnement (extérieur strict, extérieur la plupart du temps, extérieur et intérieur, intérieur la plupart du temps ou intérieur strict), son lieu de couchage pour la nuit en été (extérieur sans niche, extérieur avec niche ouverte, extérieur avec niche fermée ou intérieur), son statut vaccinal vis-à-vis de la leishmaniose canine, la présence de signes cliniques évocateurs de la maladie (amaigrissement, fatigabilité, onychogryphose, adénomégalie périphérique, alopecies palpébrale ou diffuse, lésions oculaires) et les traitements mis en place le cas échéant, les traitements antiparasitaires externes reçus, son historique de voyage en France ou à l'étranger et sa provenance. Des questions relatives aux connaissances des propriétaires sur la leishmaniose étaient également posées, comme sur l'existence de la maladie, son caractère zoonotique et l'évocation du vaccin disponible par leur vétérinaire.

#### **g) Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Excel® associé à son extension XLSTAT®.

Les résultats des différents tests sérologiques ont été analysés afin de calculer des pourcentages de résultats positifs et négatifs sur la population totale, sur celle des chiens non vaccinés et celle des vaccinés.

Afin de comparer les performances des quatre tests et en l'absence de gold standard clairement défini, le kit ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test a été choisi comme référence suite à une précédente étude qui avait déjà déterminé ses performances. Elle avait montré une sensibilité de 95.3% et une spécificité de 100% (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Le degré de concordance entre les résultats des quatre tests a été évalué par le coefficient Kappa de Cohen.

L'influence de l'utilisation d'antiparasitaires externes et de certaines caractéristiques des chiens ou de leur mode de vie sur la positivité au test du kit ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test a été analysée sur la population de chiens non vaccinés (n=140) afin de ne pas avoir de biais lié à la vaccination. Pour cela, un test du khi<sup>2</sup> a d'abord été réalisé. Cependant, la taille des effectifs théoriques ne permettait pas de vérifier les conditions de validité du test. Dans ce contexte, afin de ne plus avoir de contraintes liées à la taille des échantillons, un test de Fisher a été effectué.

## **2. Résultats**

### **a) Description de la population canine étudiée et des lieux de vie**

Au total, 169 chiens appartenant à 17 propriétaires et vivant dans 12 localités ont été inclus dans l'étude. Dix des sites de prélèvements étaient en campagne et deux en zone périurbaine. Trois des sites étaient à des altitudes de 0 à 200 mètres, six de 200 à 400 mètres, deux de 400 à 600 mètres, un de 600 à 800 mètres et aucun au de-là de 800 mètres. Les caractéristiques des différents lieux de vie des chiens sont présentées dans la Figure 21.

149 de ces chiens étaient des chiens de chasse (88.2%), dix de compagnie et dix d'élevage. Les chiens d'élevage appartenaient à une éleveuse professionnelle de Cockers Spaniel Anglais et de Teckels. Les chiens étudiés appartenaient à 24 races ou étaient des chiens de races croisées. Le tableau 11 présente les effectifs de chiens par races représentées dans cette étude.

**Figure 21.** Description des lieux de vie des chiens.

**Cardet**

Date de visite : 13/12/2021  
Altitude : 124 m  
Type d'habitat : périurbain  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênaie mixte, habitation, champ de cultures  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Causse-de-la-Selle A**

Date de visite : 14/12/2021  
Altitude : 300 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênaie mixte, murs de pierres  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Causse-de-la-Selle B**

Date de visite : 14/12/2021  
Altitude : 300 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, murs de pierres, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Agonès**

Date de visite : 14/12/2021  
Altitude : 27 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Trèves**

Date de visite : 15/12/2021  
Altitude : 550 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, sapins, pins noirs, murs de pierres, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Alzon**

Date de visite : 17/12/2021  
Altitude : 700 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes blancs, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

**Lauroux**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 350 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

**Aniane**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 250 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, murs de pierres  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

#### **Puéchabon A**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 230 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênaie verts, murs de pierres  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

#### **Puéchabon B**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 230 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : vigne vierge, murs de pierres  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

#### **Puéchabon C**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 230 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

#### **Puéchabon D**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 230 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : figuier, murs de pierres  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

#### **Puéchabon E**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 230 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênaie mixte, murs de pierres, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

#### **Saint-Jean-de-Fos**

Date de visite : 14/01/2022  
Altitude : 200 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

#### **Soudorgues**

Date de visite : 17/01/2022  
Altitude : 543 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : habitation, murs de pierres, chênes verts  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

#### **L'Estréchure**

Date de visite : 17/01/2022  
Altitude : 332 m  
Type d'habitat : campagne  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : chênes verts, murs de pierres, habitation, ruisseau  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : oui

#### **Boisset-et-Gaujac**

Date de visite : 17/01/2022  
Altitude : 160 m  
Type d'habitat : périurbain  
Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : olivier, habitation  
Mammifères ou volailles (dans un rayon d'1 km) : non

**Tableau 11.** Effectifs par races représentées par les chiens de l'étude.

Race	Effectif
Courant Suisse	27
Petit Gascon Saintongeois	24
Grand Gascon Saintongeois	16
Races croisées	16
Griffon Bleu de Gascogne	14
Cocker Spaniel Anglais	11
Petit Bleu de Gascogne	10
Grand Griffon Vendéen	8
Anglo-Français	7
Bruno Saint-Hubert	7
Ariégeois	5
Teckel	5
Beagle	3
Dogue Argentin	2
Fauve de Bretagne	2
Fox Terrier	2
Patou	2
Border Collie	1
Braque allemand	1
Cursinu	1
Griffon Khortals	1
Jack Russel Terrier	1
Ours de Carélie	1
Porcelaine	1
Setter Anglais	1

88 étaient des femelles et 81 des mâles. Le sex-ratio mâle/femelle était de 0.92. 119 des chiens avaient des poils courts (70.4%), contre 35 avec des poils mi-longs (20.7%) et 15 (8.9%) avec des poils longs. 150 vivaient en extérieur strict (88.8%), dix en extérieur la plupart du temps (5.9%), sept en intérieur et extérieur (4.1%), un en intérieur la plupart du temps et un en intérieur strict.

Lors de l'étude, six chiens (3.6%) présentaient des signes cliniques compatibles avec une leishmaniose clinique et neuf chiens (5.3%) avaient eu un diagnostic préalable de leishmaniose canine par leurs vétérinaires traitants. Parmi les chiens avec des signes cliniques compatibles, tous présentaient de la fatigabilité, deux de l'amaigrissement, un une polyadénomégalie périphérique, un des dépilations péri-oculaires et un une hyperkératose de la truffe. Parmi les chiens diagnostiqués par leur vétérinaire traitant, huit chiens, soit

88,9% ont reçu ou reçoivent un traitement contre la maladie à base d'antimoniote de méglumine et/ou d'allopurinol.

**b) Connaissances des propriétaires sur la leishmaniose canine et mesures préventives appliquées**

Lors de l'étude, nous avons pu interroger les 17 propriétaires. Tous connaissaient l'existence de la leishmaniose canine. Cinq d'entre eux, soit 29.4%, ne connaissaient pas son caractère zoonotique. Cinq d'entre eux n'avaient pas été informés par leur vétérinaire de la vaccination. Sur les 17 propriétaires, 14 soit 82.4% ont ou ont eu des cas de leishmaniose dans leur chenil.

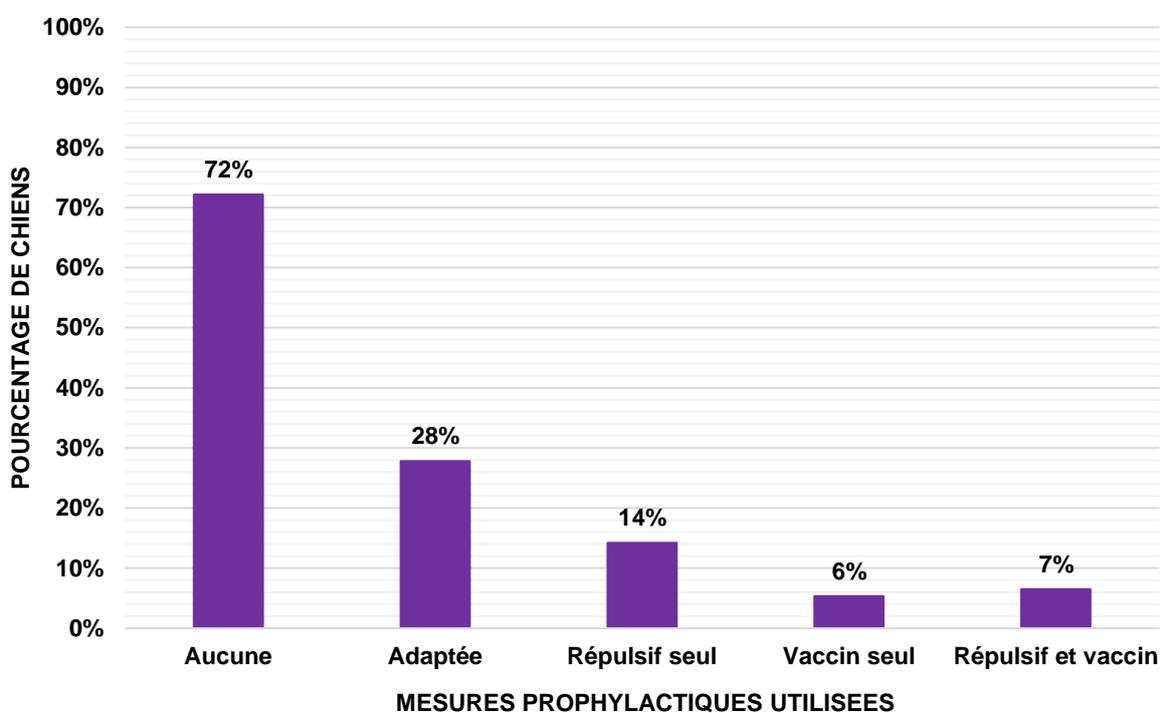
Concernant la prévention de la maladie par des mesures appropriées, il s'est avéré que :

- 96 des chiens dormaient dehors sans niche l'été (56.8%), 63 dehors avec une niche ouverte (37.3%) et dix en intérieur (5.9%). Aucun ne dormait dehors avec une niche fermée.
- 93 chiens recevaient des antiparasitaires externes, mais seuls 29 avaient un collier de deltaméthrine pendant la période d'activités des phlébotomes et 17 des pipettes à base de perméthrine appliquées conformément aux données des fabricants. Seuls 21.9% des chiens étudiés recevaient une protection antiparasitaire externe adaptée contre les phlébotomes pendant leur période d'activité, en termes de molécule et de fréquence d'application. Sur la totalité des chiens recevant une protection antiparasitaire externe, 39.8% avaient une protection efficace contre les phlébotomes. Les autres utilisaient des molécules inactives contre les phlébotomes dont 10.8% avec des pipettes, 20.4% une protection antiparasitaire hors AMM (Butox® : solution de deltaméthrine pour bovins, ovins et chevaux), 7.5% de la poudre, 21.5% des comprimés et 1% un collier. Un seul propriétaire appliquait de la deltaméthrine dans l'environnement des chiens et deux avaient mis de la citronnelle en bordure de chenil. Par ailleurs, sur les cinq propriétaires ayant actuellement des cas avérés de leishmaniose canine, seul un d'entre eux envisageait de séparer les chiens atteints des autres lors de la période de transmission. Ainsi, seuls trois

propriétaires avaient inclus la gestion du chenil, qu'elle soit adaptée ou non, dans la prévention de la maladie.

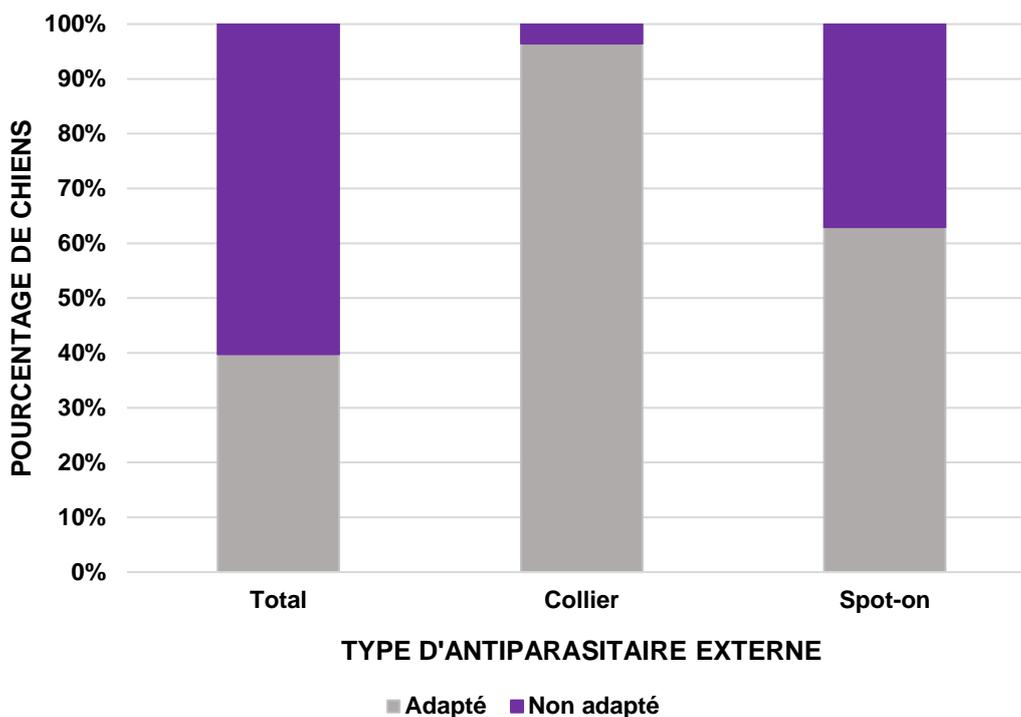
- 29 chiens avaient reçu une vaccination bien que seuls 22, soit 13% de la totalité des chiens, présentaient un schéma vaccinal complet et à jour. Huit chiens avaient eu du Canileish<sup>®</sup>, huit chiens du Letifend<sup>®</sup> et six chiens les deux. Sept chiens n'avaient pas eu une primo-vaccination complète ou de rappels.

Au total, 122 chiens, soit 72%, ne recevaient aucune mesure préventive adaptée contre la leishmaniose canine (Diagramme 2 et 3). 23 ont reçu un antiparasitaire externe seul, 12 un antiparasitaire externe et une vaccination et 10 la vaccination seule.



**Diagramme 2.** Bilan des mesures prophylactiques utilisées par les propriétaires.

La mesure préventive était considérée comme adaptée à la lutte contre les phlébotomes si elle consiste à appliquer un antiparasitaire externe de molécule et fréquence d'application efficaces contre les phlébotomes selon les Résumés des Caractéristiques du Produit (RCP) des spécialités en association ou pas d'un schéma vaccinal complet et à jour.



**Diagramme 3.** Pourcentage de chiens recevant un antiparasitaire externe conformément aux RCP des spécialités dans le cadre de la lutte contre les phlébotomes.

L'utilisation était considérée comme adaptée si la spécialité utilisée avait une indication contre les phlébotomes et si la fréquence d'administration était conforme aux RCP.

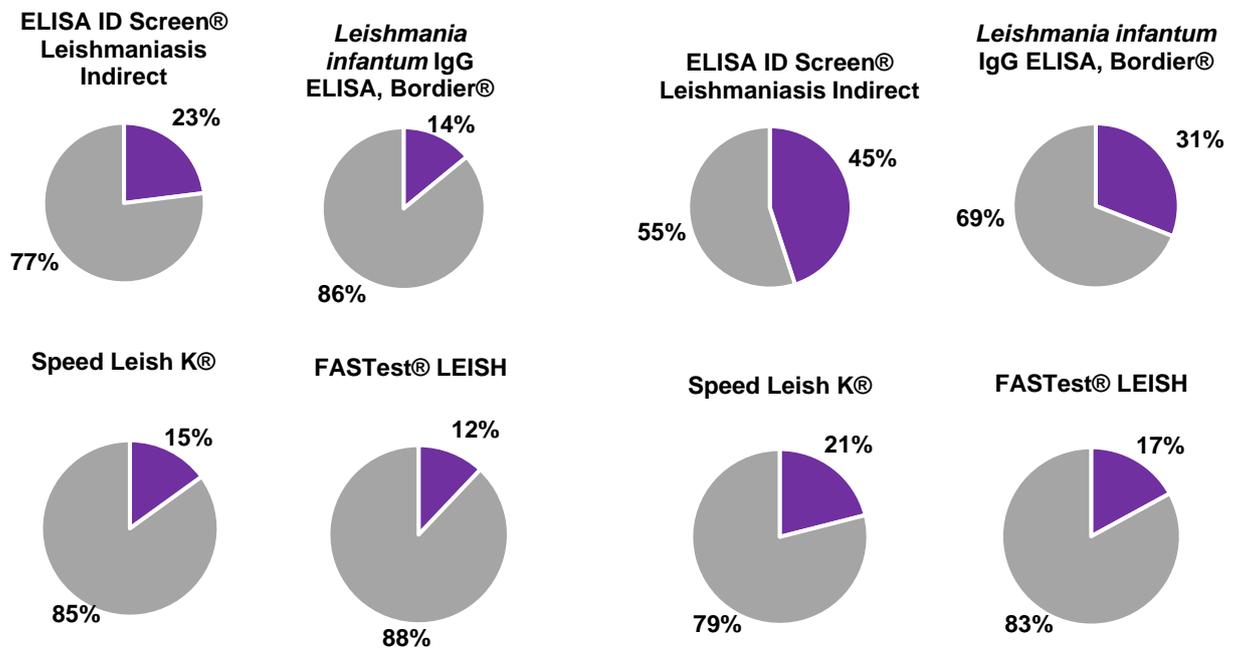
### c) Séroprévalence dans la population étudiée

Les diagrammes circulaires ci-après présentent les pourcentages de chiens séropositifs (en violet) et séronégatifs (en gris) pour chaque test, dans la population totale (n=169, Diagramme 4), la population de chiens vaccinés (n=29, Diagramme 5) et la population de chiens non vaccinés (n=140, Diagramme 6).

Ainsi, sur la population de chiens non vaccinés, l'ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test, donne un pourcentage de séropositifs de 19%, contre 11% pour le *Leishmania infantum* IgG ELISA®, 14% pour le test rapide Speed Leish K® et 11% pour le FASTest® LEISH. Ceci nous permet d'estimer une séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes comprise entre 11 et 19%.

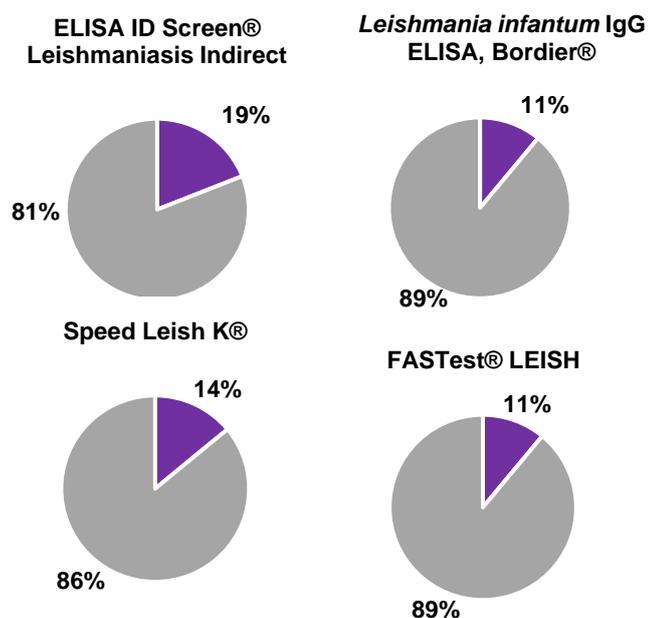
**Diagramme 4.** Pourcentage de chiens séropositifs et séronégatifs pour chaque test sur l'ensemble de la population (n=169).

Gris : pourcentage de séronégatif. Violet : pourcentage de séropositif.



**Diagramme 4.** Pourcentage de chiens séropositifs et séronégatifs pour chaque test sur la population de chiens non vaccinés (n=140).

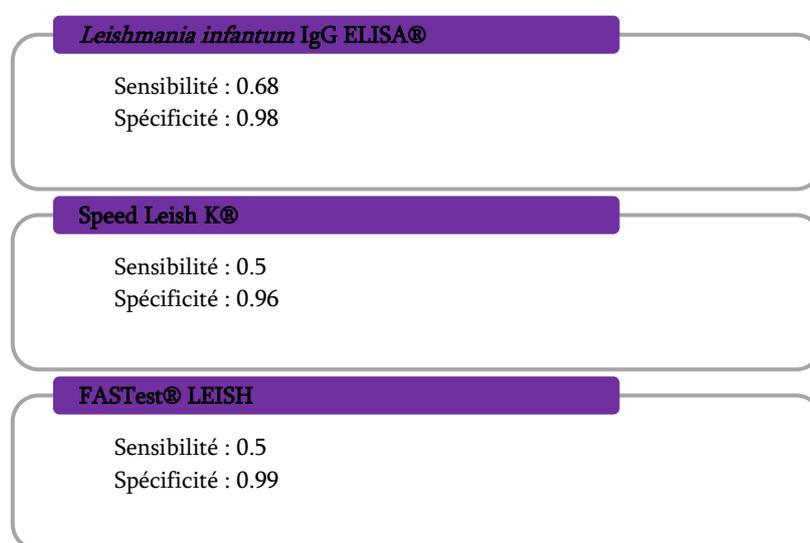
Gris : pourcentage de séronégatifs. Violet : pourcentage de séropositifs.



#### d) Performances comparées des différents tests sérologiques et concordance des tests

Pour le groupe témoin positif « chiens infestés » (n=28), la sensibilité des techniques sérologiques était de 100% pour les deux techniques ELISA, de 96.5% pour le test rapide FASTest® LEISH et de 82,7% pour le test rapide Speed Leish K®.

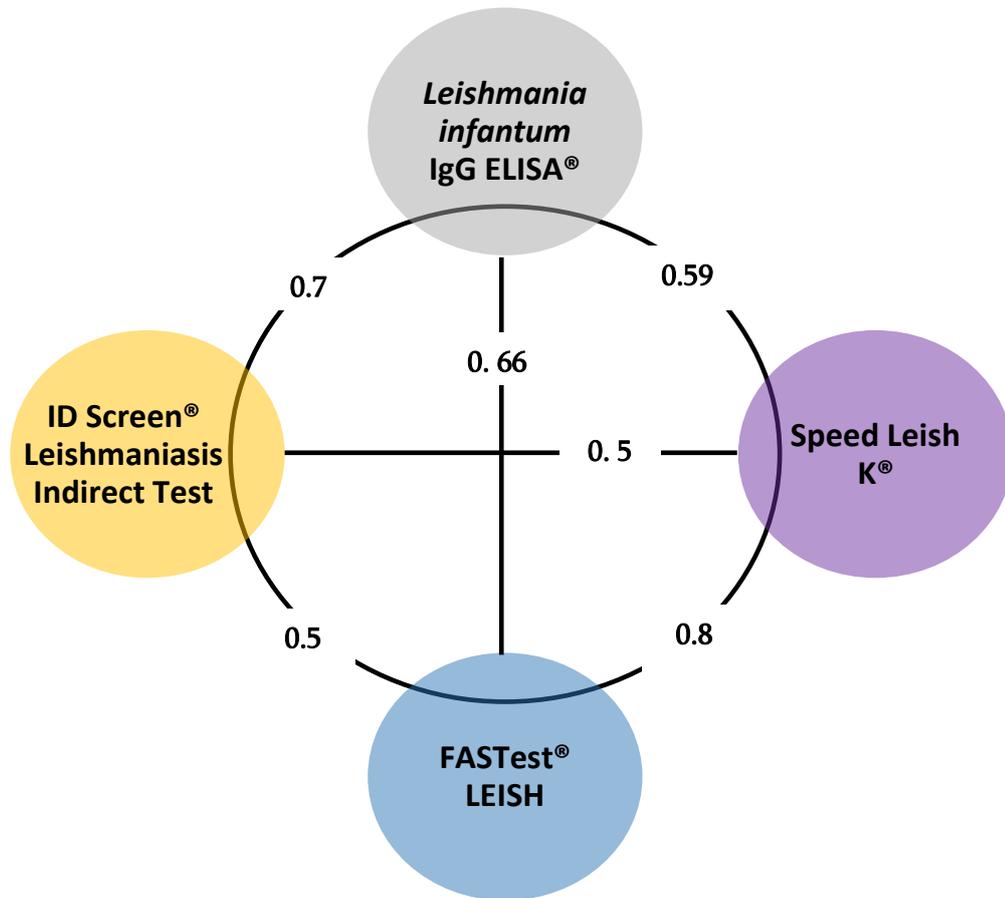
La figure ci-dessous (Figure 22) présente les résultats pour le *Leishmania infantum* IgG ELISA® et les deux tests d'immunochromatographie sur membrane.



**Figure 22.** Valeurs de sensibilité et de spécificité de chaque test.

Par ailleurs, nous avons déterminé le coefficient Kappa de Cohen entre chaque combinaison de deux tests afin d'apprécier la concordance de leurs résultats (Figure 23). Le graphique ci-après présente les différentes valeurs obtenues. Cette valeur de Kappa est comprise entre -1 et 1, et plus elle est proche de 1, meilleure est la concordance entre les résultats des deux tests. Si la valeur de Kappa est inférieure à 0, la concordance est dite « médiocre », entre 0.01 et 0.2 elle est « légère », entre 0.21 et 0.4 « passable », entre 0.41 et 0.6 « modérée », entre 0.61 et 0.8 « substantielle » et entre 0.81 et 1 « presque parfaite ». L'adjectif « substantiel » fait référence à une concordance relativement importante. Dans notre cas, la concordance entre les deux tests ELISA est « substantielle ». Celles entre les tests d'immunochromatographies sur membrane est

également substantielle. La concordance entre les tests ELISA et les immunochromatographies est « modérée » à « substantielle » selon les tests.



**Figure 23.** Valeurs du Kappa de Cohen entre différents tests de l'étude.

**e) Analyses des facteurs de risque : sexe, âge, longueur des poils, autres mammifères ou volailles dans un rayon d'un kilomètre**

Le test de Fisher a été réalisé afin d'évaluer l'influence de certains facteurs de risques sur la positivité au test ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test que nous avons choisi comme référence. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une influence significative de la présence de volailles ou autres mammifères à moins d'un kilomètre (p-value de  $0.26 > 0.05$ ), du sexe (p-value de  $0.65 > 0.05$ ), de l'âge (p-value de  $0.94 > 0.05$ ) ou encore de la longueur des poils (p-value de  $0.09 > 0.05$ ).

#### **f) Influence de l'utilisation des traitements répulsifs**

Le test de Fisher réalisé afin d'évaluer l'influence de l'administration de traitements parasitaires externes efficaces sur la positivité au test a montré une p-value de  $0.70 > 0.05$  pour l'ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test. Nous ne pouvons donc pas montrer de façon significative que l'application d'un traitement antiparasitaire externe adapté ou non a eu un effet sur la séropositivité des chiens de l'étude.

### **3. Discussion**

#### **a) Revue des données récentes**

Jusqu'à maintenant, très peu de données relatives à l'épidémiologie de la leishmaniose canine dans les Cévennes étaient disponibles dans la littérature. En effet, les informations les plus récentes sur la prévalence de la maladie concernent la totalité de la France et ont été obtenues grâce à des questionnaires remplis par des vétérinaires. Ainsi, Bourdeau *et al.*, (2014), et Le Rutte *et al.*, (2018), ont montré que la leishmaniose canine était toujours endémique dans le sud de la France et que, la prévalence de la maladie serait en augmentation. Néanmoins, ces études ne permettent pas d'avoir des données isolées sur le foyer cévenol et ne s'appuient pas sur des expérimentations menées sur le terrain, avec des prélèvements réalisés sur des populations de chiens, mais, sur des cas rapportés par les vétérinaires. Ce type de projet mené dans les Cévennes remonte à l'année 2003, où l'endémicité de la leishmaniose canine a été évaluée par Keck *et al.*, (2003). L'étude menée ici permet d'actualiser les données relatives à la séroprévalence dans le foyer cévenol du sud de la France. Elle permet également de s'intéresser aux différents facteurs de risque relatifs aux caractéristiques des chiens et de leur milieu de vie. En s'appuyant sur l'utilisation de quatre tests sérologiques différents, elle permet de comparer leurs performances diagnostiques. Enfin, notre travail donne un aperçu des mesures préventives pratiquées aujourd'hui sur les chiens de chasse vivant dans les Cévennes et sur la connaissance des propriétaires de chiens sur la leishmaniose et ses mesures préventives. Une étude préliminaire réalisée par Prudhomme *et al.*, (2015), confirme la présence de *P. ariasi* et *P.*

*pernicius* dans un transect proche des localités de cette étude. Ainsi, les conditions décrites dans la zone étudiée sont favorables à la réalisation du cycle biologique de *L. infantum*. Par ailleurs, afin de pouvoir mener une étude comparative avec les dernières données sur la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes, les localités étudiées étaient proches de celles décrites par Keck *et al.*, dans leur projet de 2003.

#### **b) Difficultés d'échantillonnage**

Comme nous l'avons décrit précédemment, les propriétaires ont été recrutés sur la base du volontariat et par appel téléphonique, à partir d'une liste de propriétaires obtenue auprès des sociétés de chasse ou grâce à des contacts des membres du laboratoire CNR *Leishmania* de Montpellier. Il a cependant été très difficile de recruter des volontaires pour cette étude. En effet, malgré de multiples appels téléphoniques, peu de propriétaires ont eu la volonté de participer. Les chasseurs ont très souvent plusieurs chiens ce qui nous a permis d'obtenir un nombre plus conséquent d'animaux en un nombre restreint de participants. Par ailleurs, les chiens de chasse sont souvent décrits comme d'excellentes sentinelles car leur mode de vie est favorable à l'exposition au vecteur et donc au parasite (Velez *et al.*, 2018). En effet, ils vivent fréquemment en région rurale voire péri-urbaine, passent la plupart de leur temps en extérieur, et ce même pour la nuit en période de transmission, vivent en meute et sont parfois peu/pas traités avec des antiparasitaires externes. Cependant, la séroprévalence obtenue dans notre étude peut être surestimée, car la population d'étude regroupe des animaux fortement à risque. Il aurait ainsi été intéressant de pouvoir comparer cette population à une autre population de chiens, avec des modes de vie différents. Cela pourra faire l'objet d'une étude future.

Par ailleurs, les altitudes des localités étudiées ne dépassaient pas les 700 mètres. Ceci est lié aux multiples contraintes de recrutements, nécessitant la disponibilité de propriétaires et la présence d'analyses antérieures relatives à l'abondance des phlébotomes et la séroprévalence canine. Il aurait été intéressant d'étudier des localités à des altitudes plus élevées pour déterminer si la tendance observée à l'échelle mondiale à l'expansion de la leishmaniose canine à des altitudes plus importantes se retrouvait également dans les

Cévennes. Ainsi, un cas de leishmaniose canine a été rapporté par Ballart *et al.*, en 2012 au sein des Pyrénées du nord de la Catalogne. De plus, en France, une étude réalisée dans les contreforts des Pyrénées ariégeoises a mis en évidence une augmentation du taux de séroprévalence en 13 ans, passant de 1.43% en 1994 à 11.32% en 2007 (Dereure *et al.*, 2009). Néanmoins, comme l'ont montrés Prudhomme *et al.*, (2015), les phlébotomes, avec notamment *P. ariasi*, sont majoritairement présents à des altitudes comprises entre 300 et 500 mètres, ce qui correspond aux localités étudiées.

### **c) Effets « cluster »**

Un effet « cluster » est probable dans cette étude dans la mesure où de nombreux chiens prélevés provenaient du même village ou parfois du même chenil. Ceci peut avoir influencé les valeurs de prévalences décrites dans la mesure, où, le fait de vivre en meute est un facteur de risque pour les chiens, car une plus grande densité peut favoriser la transmission vectorielle du parasite. Ceci est d'autant plus vrai dans les chenils où les chiens sont infestés (Alonso *et al.*, 2010). Ainsi, à Agonès, près de 63% des 27 chiens prélevés étaient positifs à au moins un des quatre tests, alors que des cas de leishmaniose avérée étaient présents dans le chenil. Néanmoins, ceci permet aussi d'envisager une étude ultérieure plus approfondie de ce foyer, en identifiant les espèces de phlébotomes présentes dans ce biotope et en tentant d'en rechercher les gîtes larvaires.

### **d) Résultats de séroprévalence et de prévalence de la maladie en comparaison avec d'autres pays et d'anciennes données**

Notre étude a montré une séroprévalence chez les chiens non vaccinés comprise entre 11 et 19%. Ces valeurs sont comparables à des données d'études ultérieures, estimant la séroprévalence dans le bassin méditerranéen à 10% (EFSA, 2015) ; une étude menée dans le Nord-Est de l'Espagne rapporte une séroprévalence par ELISA de 19.5% parmi lesquels 6.8% étaient symptomatiques (Velez *et al.*, 2019).

Des études s'intéressant à la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes ont été menées en 1993 par Dereure *et al.*, et en 2003 par Keck *et al.*,. Dans les deux études,

un chien était considéré comme positif si son titre sérologique était supérieur ou égal à 1/80 en IFAT. Ainsi, en 1993, la séroprévalence de la leishmaniose canine évaluée par IFAT était de 5.51% dans l'étage de la chênaie d'Yeuses contre 9.6% en 2003. De plus, la séroprévalence dans l'étage de la chênaie mixte était de 16.52% en 1993 contre 17.9% en 2003. Ainsi, d'après Keck *et al.*, (2003), la séroprévalence de la leishmaniose canine entre les deux études était restée relativement stable, notamment pour l'étage de la chênaie mixte. La séroprévalence de la leishmaniose canine avait néanmoins augmenté dans l'étage de la chênaie d'Yeuses en 10 ans, ce qui pouvait être expliqué, selon ces mêmes auteurs, par le fait que celle-ci devenait une maladie plus périurbaine. La distribution des titres en anticorps était unimodale, ce qui était caractéristique d'une maladie endémique. Ils ont également montré que les chiens vivant dans la chênaie mixte présentaient plus de titres sérologiques faibles, car plus fréquemment en contact avec le parasite, produisant de faibles quantités d'anticorps tout en restant asymptomatiques.

Les résultats obtenus dans notre étude, une vingtaine d'années plus tard, sont comparables à ceux obtenus en 2003 dans l'étage de la chênaie mixte. Prudhomme *et al.*, (2015), ont montré la stabilité de l'abondance relative des populations des différentes espèces de phlébotomes entre 1977 et 2015 dans un transect de la région cévenole. De plus, l'utilisation des mesures prophylactiques a vraisemblablement permis de stabiliser l'évolution de la leishmaniose canine au sein du foyer cévenol. Dans l'étude de 2003, aucun chien ne recevait de traitements antiparasitaires externes. Néanmoins, nous ne pouvons pas faire la même dichotomie entre étage de chênaie mixte et chênaie d'Yeuses, dans la mesure où notre échantillonnage s'est porté sur des chiens vivants dans 67% des cas en chênaie d'Yeuses et 25% en chênaie mixte. En 2003, l'étude avait déjà mis en évidence la disparité de séroprévalence de cette maladie au sein d'une même zone bioclimatique, montrant l'importance des microclimats dans la transmission du pathogène.

Néanmoins, il est parfois difficile de réaliser une comparaison entre les différentes études disponibles dans la littérature, en raison d'échantillonnage, de populations de chiens et de méthodes diagnostiques différents.

Enfin, d'après le rapport de l'EFSA de 2015, les tests sérologiques peuvent présenter des réactions croisées avec d'autres espèces de *Leishmania* spp. ou avec *Trypanosoma cruzi*. Dans cette étude, nous n'avons pas testé les chiens pour ces autres parasites car aucun des chiens n'avait voyagé hors Europe.

**e) Comparaison des résultats des ELISA et des tests d'immunochromatographie sur membrane**

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des techniques de diagnostics sérologiques indirects avec l'ELISA et l'immunochromatographie sur membrane. Dans la littérature, bien que cela soit discuté, l'IFAT est souvent considérée comme le gold standard pour les analyses sérologiques dans le cadre de la leishmaniose canine (EFSA, 2015). D'après Francino *et al.*, (2006), sa sensibilité et sa spécificité chez les chiens symptomatiques sont proches de 100%. Cependant, cette technique peut présenter de moins bonnes performances lorsqu'il s'agit d'établir un diagnostic chez des chiens asymptomatiques, ce qui représente la grande majorité de la population étudiée dans une étude épidémiologique comme la nôtre (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Par ailleurs, cette technique nécessite la présence de personnels qualifiés et est soumise à un biais lié à l'opérateur. La technique ELISA présente aussi l'avantage de pouvoir analyser plusieurs échantillons simultanément et la lecture au spectrophotomètre limite le biais lié à l'opérateur. L'ELISA sur antigènes solubles de promastigotes entiers présente une bonne sensibilité chez des chiens asymptomatiques et symptomatiques (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Les tests étudiés ici présentent tous une bonne spécificité, avec des valeurs supérieures ou égales à 0.96. Ainsi, ils ont une bonne valeur prédictive positive mais une moins bonne valeur prédictive négative. De ce fait, leur utilisation peut conduire à des risques d'avoir des faux-négatifs.

Par ailleurs, nous avons souhaité comparer les performances des tests rapides d'immunochromatographie Speed Leish K® et FASTest Leish®. Ces kits rapides sont utilisés en routine par les vétérinaires praticiens pour confirmer un statut séronégatif avant une vaccination, ou lors d'un début de démarche diagnostique chez des animaux symptomatiques. L'inconvénient de ces kits est qu'ils ne donnent qu'un résultat qualitatif et

non pas quantitatif. Dans leur guideline, le groupe LeishVet préconise d'interpréter les résultats des tests qualitatifs avec précaution et de les faire confirmer par une sérologie quantitative réalisée en laboratoire (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous avons trouvé que la sensibilité des tests d'immunochromatographie sur membrane était moins bonne que celle des tests ELISA, et notamment pour le test Speed Leish K<sup>®</sup>, pour qui la sensibilité sur la population de témoins positifs était de 82.7%. Ainsi, le coefficient Kappa de Cohen entre les tests ELISA et les tests rapides n'étaient que « modéré » à « substantiel » pour des valeurs comprises entre 0.53 et 0.66. Peu de données relatives aux performances diagnostiques des kits rapides étaient disponibles alors que ces techniques d'immunochromatographie sur membrane présentent l'avantage d'être rapides et faciles à mettre en œuvre, deux critères importants pour des tests diagnostiques utilisés dans des études épidémiologiques. Ainsi, selon les études, le Speed Leish K<sup>®</sup> présente une sensibilité de 63.6 à 96.3% pour une spécificité de 100% (Ferroglia *et al.*, 2013 ; Solano-Gallego *et al.*, 2014). Les résultats des performances de ces tests dans notre étude sont moins bons, avec respectivement une sensibilité de 50% et une spécificité de 98% sur la totalité de la population étudiée et en comparaison avec l'ID Screen<sup>®</sup> Leishmaniasis Indirect Test. Par ailleurs, selon les précédentes études, le FASTest Leish<sup>®</sup> présente une sensibilité de 99.38 à 100% pour une spécificité de 98.43 à 99.1% (Villanueva *et al.*, 2019 ; Basurco *et al.*, 2020). Les résultats de notre étude sont un peu plus décevants en termes de performances. En effet, nous avons obtenu une sensibilité de 50% pour une spécificité de 99%.

Il aurait pu être intéressant d'étudier un kit de diagnostic rapide d'immunochromatographie destiné au diagnostic des leishmanioses humaines : l'IT LEISH<sup>®</sup> (Bio-Rad<sup>®</sup>, Etats-Unis). Celui-ci s'appuie sur l'utilisation de l'antigène rK39. Or, depuis quelques années, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'utilisation de cet antigène pour le diagnostic des leishmanioses humaines et canines. Les kits rapides avec rK39 sont largement distribués en médecine humaine, contrairement à la médecine vétérinaire. Pourtant, des ELISA détectant la présence d'anticorps canins anti-rK39 ont montré de bonnes performances diagnostiques, d'autant plus que ces anticorps seraient plus nombreux chez des chiens asymptomatiques que chez des patients humains ayant une leishmaniose

viscérale subclinique (Scalone *et al.*, 2002). Les performances du test IT LEISH® ont été étudiées sur des patients humains, pour lesquels la sensibilité était de 99% et la spécificité de 100% (Sundar *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'étude menée par Otranto *et al.*, (2005), montre qu'un test d'immunochromatographie avec rK39 classiquement utilisé en humaine présente de bonnes performances chez le chien, avec des valeurs de sensibilité et de spécificité respectivement de 97.06% et 100%.

#### f) Évaluation de l'efficacité des mesures préventives

Dans notre étude, près de 72% des chiens ne recevaient de prophylaxie contre la leishmaniose canine. Ainsi, 14% des chiens ont reçu un antiparasitaire externe seul, 7% un antiparasitaire externe et une vaccination et 6% la vaccination seule. En comparaison, une étude similaire réalisée en Espagne, en Italie et au Portugal par a montré que seuls 10.7% des chiens ne recevaient aucune mesure préventive, 45.7% que des antiparasitaires externes, 4.2% la vaccination seule et 23% la combinaison de la vaccination et des répulsifs (Fernandez *et al.*, en 2018). Néanmoins, dans cette étude, ils n'ont pas mentionné les spécialités utilisées comme antiparasitaires ainsi que leur fréquence de renouvellement, alors que tous les principes actifs ne sont pas efficaces contre les phlébotomes, ce qui peut expliquer la différence constatée avec nos données.

Le questionnaire réalisé au cours de notre étude nous permet de connaître l'opinion des propriétaires sur la vaccination contre cette maladie. Ces derniers justifiaient l'absence de vaccination pour raisons économiques, ou par réticence depuis le retrait du marché du vaccin Canileish® ou encore car de leurs chiens avaient déclaré la maladie malgré une vaccination. Ainsi, les vétérinaires devraient informer davantage les propriétaires de l'utilité de la vaccination et rappeler que celle-ci ne protège pas de l'infestation, mais qu'elle permet, entre autres, de diminuer la sévérité des signes cliniques, et qu'une protection efficace nécessite son association à une prévention régulière contre la piqûre des phlébotomes

Par ailleurs, en ne s'intéressant qu'à la population de chiens non vaccinés (n=140), nous pouvons étudier l'intérêt de l'utilisation des antiparasitaires externes dans la protection

contre la leishmaniose canine. 55% des chiens recevaient un antiparasitaire externe lors de la période d'activité des phlébotomes, mais seuls 40% d'entre eux avaient un répulsif ayant une indication contre les phlébotomes et/ou administré conformément aux Résumés des Caractéristiques du Produit (RCP). Ceux qui n'utilisaient pas d'antiparasitaires externes le justifiaient par des raisons budgétaires, par manque de temps ou, dans le cas de colliers, parce que les chiens avaient tendance à les perdre. Ceci souligne l'importance de l'information des propriétaires sur les antiparasitaires externes efficaces et sur les modalités de leur utilisation. Une étude menée dans un foyer d'épidémie de leishmaniose canine sur l'île de Lampedusa, en Italie, a montré des taux de séroprévalence similaires chez les chiens recevant ou non des antiparasitaires externes (Foglia *et al.*, 2018). Néanmoins, les principes actifs n'étaient pas discriminés alors que tous ne sont pas efficaces contre les phlébotomes. L'étude de Simonato *et al.*, (2020), montre, au contraire, que l'utilisation de topiques est efficace pour la prévention de l'infestation, à conditions que les principes actifs utilisés soient adaptés à la lutte contre les phlébotomes et que la fréquence d'administration du produit soit conforme aux recommandations des fabricants. Dans notre étude, nous avons trouvé des taux de séroprévalence étonnamment plus élevés chez les chiens recevant une protection antiparasitaire externe adaptée contre les phlébotomes par rapport aux autres, sans que cette différence ne soit statistiquement significative. D'autres paramètres peuvent avoir influencé ces résultats, comme la présence de chiens atteints de leishmaniose canine dans le chenil, les différentes caractéristiques des chiens et de leurs lieux de vie.

Par ailleurs, très peu de propriétaires utilisaient des moyens mécaniques afin d'éviter le contact entre les phlébotomes et leurs chiens. Ainsi, aucun n'utilisait de moustiquaires et seuls dix chiens étaient gardés à l'intérieur la nuit lors de la période de transmission des phlébotomes. Parmi eux, six étaient des chiens de compagnie. Cependant, il est très difficile de préconiser un hébergement en intérieur pour des chiens de chasse, vivant souvent en meute. Il peut cependant être conseillé à ces propriétaires d'installer des moustiquaires au niveau des chenils ou bien de traiter les murs avec des pyréthrinoïdes. En effet, l'étude de Bray *et al.*, (2013), a montré l'efficacité de moustiquaires imprégnées d'insecticides contre les phlébotomes.

Notre étude souligne bien que l'éducation et l'information des propriétaires sur les mesures préventives disponibles contre la leishmaniose canine est indispensable, et doit être assurée par les vétérinaires et les acteurs de la santé publique. La prévention de la leishmaniose canine en zone d'endémie doit être multimodale et notamment associer la vaccination à l'utilisation de topiques insecticides répulsifs.

#### **g) Étude des facteurs de risque**

Notre étude n'a pas permis de montrer de lien entre l'âge et la séropositivité car nos tests statistiques ne montrent pas de résultat significatif. Les effectifs d'échantillonnage sont par ailleurs très hétérogènes, avec 29 chiens de moins de deux ans, 63 chiens entre deux et cinq ans et 48 chiens de plus de cinq ans.

Dans notre étude, les chiens séropositifs sont plus souvent des mâles que des femelles, avec un sex-ratio sur les chiens non-vaccinés de 1.1. Ceci est en accord avec les résultats de Rombolà *et al.*, en 2021. D'après l'étude statistique, nous ne pouvons pas déterminer si le sexe a eu une influence significative sur la séropositivité.

D'après la littérature, les chiens à pelage court ou mi-long semblent plus à risque d'être séropositifs (Cortes *et al.*, 2012 ; Rombolà *et al.*, 2021). Cette tendance n'a pas été retrouvée dans notre étude. Cependant, les effectifs par classe sont à nouveau très hétérogènes, avec une grande majorité de chiens à poils longs, et rendent l'interprétation difficile. En effet, 108 chiens ont des poils courts, contre 23 à poils mi-longs et neuf à poils longs.

Les chiens vivant à proximité d'autres mammifères (cheval, chat, âne) ou volailles semblent avoir tendance à être davantage séropositifs que les autres. L'impact de la présence des volailles à proximité des chiens a déjà été étudié par Belo *et al.*, en 2013. Le rôle du chat en tant que potentiel réservoir est par ailleurs de plus en plus décrit (Pennisi *et al.*, 2014). Enfin, le rôle des équidés dans l'épidémiologie de la maladie est encore incertain (Lopes *et al.*, 2021). Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution car les tests statistiques n'ont pas montré d'influence significative, et les effectifs de chaque échantillon étaient très hétérogènes. En effet, 113/140 chiens vivaient à proximité d'autres animaux.

De nombreux auteurs ont montré que des chiens vivant en extérieur ou avec un accès important à l'extérieur avaient plus de chance d'être séropositifs (De Almeida Ado *et al.*, 2012 ; Belo *et al.*, 2013). Dans notre étude, près de 95% des chiens vivaient en majorité en extérieur, ce qui a pu majorer les valeurs de séroprévalence obtenues.

Toutes les races de chiens peuvent être atteintes par la leishmaniose, cependant certaines races semblent plus sensibles que d'autres (*cf.* Partie II.A.1.e. de notre introduction). Dans notre étude, beaucoup de races sont représentées et les effectifs par races sont trop hétérogènes pour qu'une analyse statistique représentative soit effectuée.

#### **h) Données relatives aux propriétaires**

La totalité des propriétaires interrogés connaissaient l'existence de la leishmaniose et 82.4% ont déjà eu un cas de leishmaniose canine dans leur chenil. Les propriétaires ont participé sur la base du volontariat et ont pu être motivés par un antécédent de leishmaniose dans leur chenil, se sentant donc particulièrement concernés par cette étude. Néanmoins, une étude similaire réalisée en Espagne avait obtenu le même taux de connaissance sur l'existence de la maladie (Velez *et al.*, 2018). Ainsi, la leishmaniose canine semble être désormais bien connue des propriétaires, notamment en zone d'endémie.

Cinq propriétaires ignoraient le caractère zoonotique de la maladie, alors que trois d'entre eux avaient eu des chiens atteints de leishmaniose. Cette méconnaissance souligne l'importance de l'information des propriétaires sur cette maladie par le vétérinaire. Nous avons effectivement noté que cinq personnes interrogées n'avaient pas été informées de l'existence d'un vaccin pour leur chien. Cependant, ces informations proviennent des retours des propriétaires et non des vétérinaires. Une étude conduite en France en zone endémique auprès de praticiens rapporte que 94.8% d'entre eux recommanderaient l'utilisation de topiques insecticides, 98.7% la vaccination et 92.9% la combinaison de la vaccination et de l'utilisation d'antiparasitaires externes. Selon cette étude, 88.9% des vétérinaires informeraient les propriétaires sur l'implication de la leishmaniose canine en

termes de santé publique, bien que seuls 4% savent qu'une potentielle transmission à l'Homme est possible (Bourdeau *et al.*, 2014).

#### **i) Difficultés pour diagnostiquer des chiens vaccinés**

Une des principales difficultés de cette étude de terrain a été d'interpréter les résultats de sérologie positive chez les chiens vaccinés. Après avoir été infesté par *Leishmania* spp., le chien peut éliminer le parasite, être porteur asymptomatique ou symptomatique. L'expression de la maladie est très polymorphe. Le diagnostic s'appuie généralement sur plusieurs tests directs et indirects associés à la symptomatologie de l'animal. Dans le contexte d'une étude épidémiologique, incluant également des animaux asymptomatiques, le choix du bon test diagnostique peut être un véritable challenge, notamment si des chiens vaccinés sont inclus (Velez *et al.*, 2019).

En effet, le vaccin peut stimuler l'immunité à médiation humorale et par conséquent la production d'anticorps (Solano-Gallego *et al.*, 2017a). Ces derniers peuvent être spécifiques des antigènes utilisés pour le vaccin ou non et entraîner des réactions croisées lors des tests de diagnostics sérologiques (Marcondes *et al.*, 2013). Par ailleurs, les vaccins actuellement disponibles, ne permettent pas d'empêcher complètement l'infestation, ce qui rendrait difficile la détection des chiens porteurs asymptomatiques vaccinés (Velez *et al.*, 2019). La difficulté pour faire la différence entre les chiens vaccinés et naturellement infestés posent un véritable problème, tant pour les études épidémiologiques de terrain en zone d'endémie que pour le diagnostic de chien suspect de maladie clinique. D'après les auteurs, un test sérologique de terrain doit être facile à mettre en œuvre, à interpréter, présenter une bonne sensibilité et spécificité et être peu cher. L'utilisation d'antigènes entiers permet d'avoir une meilleure sensibilité dans la mesure où cela permet de détecter un plus grand panel de réponse immunitaire. Ainsi, l'utilisation d'une méthode quantitative telle que l'ELISA avec des antigènes entiers reste la technique conseillée pour les études épidémiologiques (OIE, 2018). Les deux méthodes ELISA utilisées ici s'appuient sur la recherche d'antigènes entiers. Mais les auteurs ne s'accordent pas quant à la pertinence de son utilisation chez des chiens vaccinés. Dans notre étude, la séroprévalence chez les chiens vaccinés allait de 17 à 45%

selon les tests, sans que l'on puisse dire s'il s'agissait d'anticorps induits par le vaccin ou liés à la présence asymptomatique du parasite. Pour cela, une analyse par PCR aurait pu permettre de faire la différence.

En médecine vétérinaire, il existe le concept de vaccin DIVA « *Differentiating between infected and vaccinated animals* ». Le développement de ce type de vaccin permettrait de faire la différence entre des chiens vaccinés et des chiens infestés, en n'interférant pas dans les tests diagnostiques sérologiques classiquement utilisés ou en développant des outils diagnostiques avec de bonnes sensibilité et spécificité (Solano-Gallego *et al.*, 2017a). Néanmoins, Canileish® et Letifend®, utilisés en France, ne sont pas des vaccins DIVA et ceci a pu interférer avec nos résultats.

Le Canileish® utilise des protéines excrétées-sécrétées purifiées de *L. infantum* associées à un adjuvant (QA-21) (Velez *et al.*, 2019). Selon l'étude de Solano-Gallego *et al.*, (2017 a), le pic du titre sérologique post-vaccinal après primo-vaccination serait atteint 21 jours après la deuxième dose et le titre serait en diminution à partir du sixième mois. Cette composition avec de multiples antigènes rend le diagnostic des chiens vaccinés particulièrement difficile avec les outils disponibles. Dans la littérature, les auteurs ne préconisent pas l'utilisation de l'IFAT chez les chiens vaccinés avec le Canileish®, dans la mesure où ils étaient à l'origine de nombreux faux-positifs avec cette technique de diagnostic sérologique (Velez *et al.*, 2019). L'étude de Velez *et al.*, menée en 2019 a également montré que ce vaccin était à l'origine de réactions croisées lors de tests ELISA utilisant des antigènes entiers solubles de *L. infantum*, et leur étude de 2020 déconseille l'utilisation de tests ELISA pour le diagnostic sérologique de chiens vaccinés avec Canileish® (Velez *et al.*, 2020). D'après Solano-Gallego *et al.*, (2017a), ce vaccin entraîne la production d'anticorps interférant avec les tests sérologiques quantitatifs de type IFAT et ELISA, mais les anticorps vaccinaux seraient rarement détectés par le test immunochromatographique Speed Leish K®. Cependant, les auteurs ne s'accordent pas sur la pertinence de l'utilisation de cet outil de diagnostic rapide par immunochromatographie chez les chiens vaccinés. Selon Velez *et al.*, (2019), les études sur les performances de ce test chez des chiens montrent des résultats très inconstants et peu encourageants. Ainsi, même s'il distinguerait les chiens vaccinés des non vaccinés, sa

faible sensibilité empêcherait son utilisation comme seul outil diagnostique de terrain. Dans notre étude sur le groupe témoins positifs « chiens infestés », la sensibilité de ce test rapide a été la moins bonne des quatre tests, avec une valeur de 82.7%. Par ailleurs, d'après l'étude de Lima *et al.*, (2019), le vaccin entraîne une réponse sérologique significative contre les antigènes solubles entiers mais pas contre les antigènes rK39, rK28, LicTXNPx et Rkddr. Ainsi, la séroréactivité comparée entre les antigènes solubles de promastigotes et rK39 permettrait de distinguer les chiens vaccinés avec Canileish® et infestés, des vaccinés non infestés, des non vaccinés infestés et des non vaccinés non infestés.

Le vaccin Letifend® utilise la protéine Q, une protéine chimérique recombinante constituée de quatre fragments de protéines de *L. infantum* : l'histone H2A, LiP2a, LiP2b et LiPo. Après la primo-vaccination, le pic du titre sérologique serait atteint au bout de 14 jours puis la protection serait efficace au moins 60 jours (aucune étude n'a réalisé des tests plus tardivement) (Solano-Gallego *et al.*, 2017a). Les anticorps vaccinaux ne seraient pas détectés par IFAT, ELISA sur antigène soluble, ELISA sur promastigote entier, Leiscan® ELISA (Ecuphar®, Belgium), Ingezim® ELISA (Ingenasa®, Spain), et les tests sérologiques quantitatifs Kalazar Detect® (InBios®, Etats-Unis), SNAP® *Leishmania* (IDEXX®, Etats-Unis), Speed Leish K® (Virbac®, France) et WITNESS® *Leishmania* (Zoetis®, Etats-Unis). Dans notre étude, le snap test Speed Leish K® est revenu positif pour six chiens vaccinés, soit 21% de la population vaccinée. Mais, avec les résultats dont nous disposons, nous ne pouvons pas déterminer s'il s'agissait des anticorps vaccinaux ou des anticorps liés à une réelle infestation. Ceci sera l'objet d'une étude ultérieure réalisée par le CNR *Leishmania* de Montpellier.

## **Conclusion**

Cette étude a permis d'actualiser des données relatives au foyer de leishmaniose canine dans les Cévennes. Il s'agit de la première étude conduite sur des chiens de cette région depuis 2003.

Ainsi, la séoprévalence dans la population étudiée variait de 11 à 19% selon les tests, ce qui est comparable aux données obtenues dans de récentes études réalisées dans des pays

voisins, au sein du bassin méditerranéen. L'utilisation de la prophylaxie semble insuffisante, par manque de moyens ou par méconnaissance de leurs existences (notamment pour la vaccination). Enfin, la comparaison des quatre tests sérologiques utilisés dans cette étude semble montrer une supériorité des sensibilités des méthodes ELISA par rapport aux immunochromatographies sur membrane. Ainsi, les kits rapides, bien que très utiles en pratique vétérinaire courante, ne peuvent suffire pour établir un diagnostic de leishmaniose canine. Ils permettent d'orienter le diagnostic, mais une confirmation par une autre technique de sérologie, notamment quantitative et/ou par méthode de diagnostic direct est nécessaire. Néanmoins, il reste difficile d'établir des comparaisons de performances de différents tests sans gold standard établi. Dans ce contexte, une étude statistique utilisant le modèle Bayésien pourrait être menée, afin de s'affranchir de cette contrainte.

De plus, les difficultés rencontrées lors de la démarche diagnostique appliquée à la leishmaniose canine sont nombreuses. En effet, la multitude de profils de réponse immunitaire rend l'interprétation des résultats de sérologie complexe, notamment chez un chien vacciné, dont l'origine des anticorps peut être consécutive à la vaccination ou à une infestation par le parasite. La mise en place d'un vaccin utilisant la méthode DIVA pourrait être une des solutions à ce problème rencontré en pratique courante.

Enfin, ce projet met également en évidence les limites de la sérologie comme seule technique de diagnostic. Elle est utile pour les études épidémiologiques, où elle permet de savoir si les chiens ont rencontré le parasite, mais ne permet pas de déterminer s'ils sont toujours porteurs et donc réservoirs de *Leishmania infantum*. Les méthodes de diagnostic direct présentent l'avantage d'être plus précises sur le statut infectieux du chien et sur sa potentielle implication dans le cycle de vie du parasite. Néanmoins, cette étude transversale permet de connaître la séoprévalence de la leishmaniose canine, dans une population donnée et sur une période relativement courte. Elle constitue le point de départ d'un projet plus global, comprenant des tests de diagnostic direct par PCR et un suivi des sérologies et PCR sur les chiens étudiés pendant cinq ans, afin d'estimer l'incidence de la leishmaniose canine dans les Cévennes. Cette étude longitudinale permettra également de s'intéresser aux variations du biotope et aux méthodes de prophylaxie utilisées par les propriétaires au cours

des années. Le suivi à long terme de ces chiens permettra d'obtenir une analyse plus fine de la circulation du parasite au sein du foyer cévenol.

**THESE : 2022- TOU 3 - 4057**

## Bibliographie

ABBEHUSEN, M.M.C., ALMEIDA, V.A., SOLCÀ, M.S., PEREIRA, L.S., COSTA, D.J., GIL-SANTANA, L., BOZZA, P.T., FRAGA, D.B.M., VERAS, P.S.T., DOS-SANTOS, W.L.C., ANDRADE, B.B., et BRODSKY, C.I., 2017. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. Scientific Reports. 2017. Vol. 7, no. 1, pp. 15914. DOI 10.1038/s41598-017-15651-8.

ALEMAYEHU, B. et ALEMAYEHU, M., 2017. Leishmaniasis : a review on parasite, vector and reservoir host. Health Science Journal. 2017. Vol. 11, no. 4. DOI 10.21767/1791-809X.1000519.

ALEXANDER, B., LOPES DE CARVALHO, R., MCCALLUM, H. et PEREIRA, M.H., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2002. Vol. 8, no. 12, pp. 1480-1485. DOI 10.3201/eid0812.010485.

ALMEIDA, A.B.P.F., SOUSA, V.R.F., CRUZ, F.A.C.S., DAHROUG, M.A.A., FIGUEIREDO, F.B. et MADEIRA, M.F., 2012. Canine visceral leishmaniasis : seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2012. Vol. 21, no. 4, pp. 359-365. DOI 10.1590/S1984-29612012005000005.

ALONSO, F.D., GIMÉNEZ FONT, P., MANCHÓN, M., RUIZ DE YBÁÑEZ, R., SEGOVIA, M. et BERRIATUA, E., 2009. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean area. Zoonoses and Public Health. 2009. DOI 10.1111/j.1863-2378.2008.01228.x.

ALTEN, B., MAIA, C., AFONSO, M.O., CAMPINO, L., JIMÉNEZ, M., GONZÁLEZ, E., MOLINA, R., BAÑULS, A.L., PRUDHOMME, J., VERGNES, B., TOTY, C., CASSAN, C., RAHOLA, N., THIERRY, M., SERENO, D., BONGIORNO, G., BIANCHI, R., KHOURY, C., TSIRIGOTAKIS, N., DOKIANAKIS, E., ANTONIOU, M., CHRISTODOULOU, V., MAZERIS, A., KARAKUS, M., OZBEL, Y., ARSERIM, S. K., ERISOZ KASAP, O., GUNAY, F., OGUZ, G., KAYNAS, S., TSERTSVADZE, N., TSKHVARADZE, L., GIORGOBIANI, E.,

GRAMICCIA, M., VOLF, P. et GRADONI, L., 2016. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. BATES, Paul Andrew (éd.), PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016. Vol. 10, no. 2, pp. e0004458. DOI 10.1371/journal.pntd.0004458.

ANTOINE, J.C., LANG, T. et PRINA, E., 1999. Biologie cellulaire de *Leishmania*. In : DEDET JP. *Les leishmanioses*. Paris : Ellipses. pp. 41-62.

ASFARAM, S., FAKHAR, M. et TESHNIZI, S.H., 2019. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis ? A systematic review with meta-analysis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2019. Vol. 25, pp. e20190012. DOI 10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0012.

ATHANASIOU, L.V., PETANIDES, T.A., CHATZIS, M.K., KASABALIS, D., APOSTOLIDIS, K.N. et SARIDOMICHELAKIS, M.N., 2014. Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against *Leishmania* spp. in dogs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2014. Vol. 26, no. 2, pp. 286-290. DOI 10.1177/1040638714523614.

BALLART, C., ALCOVER, M.M., PORTÚS, M. et GÁLLEGO, M., 2012. Is leishmaniasis widespread in Spain ? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2012. Vol. 106, no. 2, pp. 134-136. DOI 10.1016/j.trstmh.2011.11.001.

BANETH, G., KOUTINAS, A.F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P. et FERRER, L., 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part one. Trends in Parasitology. 2008. Vol. 24, no. 7, pp. 324-330. DOI 10.1016/j.pt.2008.04.001.

BATES, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology. 2007. Vol. 37, no. 10, pp. 1097-1106. DOI 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

BELO, V.S., STRUCHINER, C.J., WERNECK, G.L., BARBOSA, D.S., DE OLIVEIRA, R.B., NETO, R.G.T. et DA SILVA, E.S., 2013. A systematic review and meta-analysis of the factors

associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2013. Vol. 195, no. 1-2, pp. 1-13. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.03.010.

BONGIORNO, G., HABLUETZEL, A., KHOURY, C. et MAROLI, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*. 2003. Vol. 88, no. 2, pp. 109-116. DOI 10.1016/S0001-706X(03)00190-6.

BOURDEAU, P., 2008. Canine vector-borne diseases in France : information obtained from veterinary clinics in national surveys. In : *Compagnion Vector-Born diseases Symposium*. 2008. « *CHANCES* », April 16-19, 2008, Wiesbaden, Germany. pp. 78-84.

BOURDEAU, P., SARIDOMICHELAKIS, M.N., OLIVEIRA, A., OLIVA, G., KOTNIK, T., GÁLVEZ, R., FOGLIA MANZILLO, V., KOUTINAS, A.F., PEREIRA DA FONSECA, I. et MIRÓ, G., 2014. Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions : a questionnaire-based multinational survey. *Parasites & Vectors*. 2014. Vol. 7, no. 1, pp. 110. DOI 10.1186/1756-3305-7-110.

BRAGA, Eveline Tozzi, LEITE, João Henrique Artero de Carvalho, ROSA, Fernando Azadinho, TIVELLI, Patrícia, ARAÚJO, Amanda Mariano, ALMEIDA, Breno Fernando Martins de, FERRARI, Heitor Flávio, CIARLINI, Paulo César, MACHADO, Gisele Fabrino et MARCONDES, Mary, 2015. Hypertension and its correlation with renal lesions in dogs with leishmaniosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2015. Vol. 24, no. 1, pp. 45-5. DOI 10.1590/S1984-29612015007.

BRAY, D.P. et HAMILTON, J.G.C., 2013. Insecticide-impregnated netting as a potential tool for long-lasting control of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in animal shelters. *Parasites & Vectors*. 2013. Vol. 6, no. 1, pp. 133. DOI 10.1186/1756-3305-6-133.

CARSTENS-KASS, J., PAULINI, K., LYPACZEWSKI, P. et MATLASHEWSKI, G., 2021. A review of the leishmanin skin test : a neglected test for a neglected disease. GUIZANI, Ikram (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2021. Vol. 15, no. 7, pp. e0009531. DOI 10.1371/journal.pntd.0009531.

CHALGHAF, B., CHEMKHI, J., MAYALA, B., HARRABI, M., BENIE, G.B., MICHAEL, E. et BEN SALAH, A., 2018. Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin : impact of climate change. *Parasites & Vectors*. 2018. Vol. 11, no. 1, pp. 461. DOI 10.1186/s13071-018-3019-x.

CHAMAILLÉ, L., TRAN, A., MEUNIER, A., BOURDOISEAU, G., READY, P. et DEDET, J.P., 2010. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors*. 2010. Vol. 3, no. 1, pp. 31. DOI 10.1186/1756-3305-3-31.

CHIKU, V.M., SILVA, K.L.O., DE ALMEIDA, B.F.M., VENTURIN, G.L., LEAL, A.A.C., DE MARTINI, C.C., DE REZENDE EUGÊNIO, F., DOS SANTOS, P.S.P. et DE LIMA, V.M.F., 2016. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016. Vol. 221, no. 8, pp. 879888. DOI 10.1016/j.imbio.2016.03.007.

CORTES, S., VAZ, Y., NEVES, R., MAIA, C., CARDOSO, L. et CAMPINO, L., 2012. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*. 2012. Vol. 189, no. 2-4, pp. 189-196. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.04.028.

DANTAS-TORRES, F., SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G., RIBEIRO, V.M., DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et OTRANTO, D., 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds : unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*. Décembre 2012. Vol. 28, no. 12, pp. 531-538. DOI 10.1016/j.pt.2012.08.007.

DA SILVA, L.G., COSTA-JÚNIOR, C.R.L., FIGUEIREDO-JÚNIOR, C.A.S., LEAL-BALBINO, T.C., CROVELLA, S., OTRANTO, D., BALBINO, V.Q. et DANTAS-TORRES, F., 2017. Canine  $\beta$ -defensin-1 (CBD1) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs. *Parasites & Vectors*. 2017. Vol. 10, no. 1, pp. 199. DOI 10.1186/s13071-017-2130-8.

DA SILVA, S.M., AMORIM, I.F.G., RIBEIRO, R.R., AZEVEDO, E.G., DEMICHELI, C., MELO, M.N., TAFURI, W.L., GONTIJO, N.F., MICHALICK, M.S. M. et FRÉZARD, F., 2012. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate

and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. Vol. 56, no. 6, pp. 2858-2867. DOI 10.1128/AAC.00208-12.

DE ALMEIDA LEAL, G.G., ROATT, B.M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D., CARNEIRO, C.M., GIUNCHETTI, R.C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., FRANCISCO, A.F., CARDOSO, J.M., MATHIAS, F.A.S., CORREA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, M., COURA-VITAL, W. et REIS, A.B., 2014. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 2014. Vol. 205, no. 3-4, pp. 472-482. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.08.022.

DE CARVALHO, F.L.N., RIBOLDI, E.O., BELLO, G.L., RAMOS, R.R., BARCELLOS, R.B., GEHLEN, M., HALON, M.L., ROMÃO, P.R.T., DALLEGRAVE, E. et ROSSETTI, M.L.R., 2018. Canine visceral leishmaniasis diagnosis : a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection*. 2018. Vol. 146, no. 5, pp. 571-576. DOI 10.1017/S0950268818000225.

DEDET, J.P., CARME, B., DESBOIS, N., BOURDOISEAU, G., LACHAUD, L. et PRATLONG, F., 2013. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *La Presse Médicale*. 2013. Vol. 42, no. 11, pp. 1469-1481. DOI 10.1016/j.lpm.2013.03.010.

DE FREITAS, E., MELO, M.N., DA COSTA-VAL, A.P. et MICHALICK, M.S.M., 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs : potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 137, no 1-2, pp. 159-167. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.12.011.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M., DE MORAIS, R.C.S., PESSOA-E-SILVA, R., TRAJANO-SILVA, L.A.M., GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C., TAVARES, D.H.C., BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.A., SILVA, R.F. et PEREIRA, V.R.A., 2015. Leishmaniasis diagnosis : an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*. 2015. Vol. 5, no. 1, pp. 31. DOI 10.1186/s13578-015-0021-2.

DEPAQUIT, J. et LÉGER, N., 2017. Chapitre 12. Les phlébotomes (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae). In : DUVALLET, G., FONTENILLE, D. et ROBERT, V., (éd.), Entomologie médicale et vétérinaire. IRD Éditions. pp. 295-320. ISBN 9782709923767.

DEREURE, J., 1993. *Place du chien dans les complexes pathogènes leishmaniens des pays du pourtour méditerranéen et du Moyen-Orient (Algérie, Egypte, France, Syrie, Yémen)*. Thèse de Doctorat. Parasitologie. Montpellier, France.

DEREURE, J., VANWAMBEKE, S.O., MALÉ, P., MARTINEZ, S., PRATLONG, F., BALARD, Y. et DEDET, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in Southern France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2009. Vol. 9, no. 6, pp. 687-694. DOI 10.1089/vbz.2008.0126.

DESJEUX, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001. Vol. 95, no. 3, pp. 239-243. DOI 10.1016/S0035-9203(01)90223-8.

DE MASSIS, F., IPPOLITI, C., IANNETTI, S., TITTARELLI, M., PELINI, S., GIANSANTE, D. et CIARROCCHI, A., 2020. Canine leishmaniasis : serological results in private and kennel dogs tested over a six-year period (2009–2014) in Abruzzo and Molise Regions, Italy. *Microorganisms*. 1 2020. Vol. 8, no. 12, pp. 1915. DOI 10.3390/microorganisms8121915.

DE VASCONCELOS, T.C.B., FURTADO, M.C., BELO, V.S., MORGADO, F.N. et FIGUEIREDO, F.B., 2019. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis : a systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019. Vol. 74, pp. 103293. DOI 10.1016/j.meegid.2017.10.005.

DOLMATOVA, A.V. et DEMINA, N.A., 1971. *Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent*. In : *Cah. ORSTOM Documentation tech*. Paris : ORSTOM.

DUTHIE, M.S., LISON, A. et COURTENAY, O., 2018. Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 2018. Vol. 34, no. 10, pp. 881-890. DOI 10.1016/j.pt.2018.07.012.

EFSA PANEL ANIMAL HEALTH AND WELFARE, 2015. Scientific opinion on canine leishmaniosis. *EFSA Journal*. 2015. Vol. 13, no. 4. DOI 10.2903/j.efsa.2015.4075.

FACCO, 2020. «*Le détail de l'enquête FACCO/KANTAR-TNS (2020)*». [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.facco.fr/population-animale/>

FERNÁNDEZ COTRINA, J., INIESTA, V., MONROY, I., BAZ, V., HUGNET, C., MARAÑÓN, F., FABRA, M., GÓMEZ-NIETO, L.C. et ALONSO, C., 2018. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. *Vaccine*. 2018. Vol. 36, no. 15, pp. 1972-1982. DOI 10.1016/j.vaccine.2018.02.111.

FERNANDEZ, M., TABAR, M.D., ARCAS, A., MATEU, C., HOMEDES, J. et ROURA, X., 2018. Comparison of efficacy and safety of preventive measures used against canine leishmaniasis in southern European countries : longitudinal retrospective study in 1647 client-owned dogs (2012–2016). *Veterinary Parasitology*. 2018. Vol. 263, pp. 10-17. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.09.014.

FERREIRA, S.A., ALMEIDA, G.G., SILVA, S.O., VOGAS, G.P., FUJIWARA, R.T., DE ANDRADE, A.S.R. et MELO, M.N., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis : new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. KELLY, Ben L. (éd.), *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013. Vol. 7, no. 4, pp. e2150. DOI 10.1371/journal.pntd.0002150.

FERROGLIO, E., ZANET, S., MIGNONE, W., POGGI, M., TRISCIUOGLIO, A. et BIANCIARDI, P., 2013. Evaluation of a rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as an alternative to immunofluorescence assay and western blotting. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013. Vol. 20, no. 5, pp. 657-659. DOI 10.1128/CVI.00719-12.

FOGLIA MANZILLO, V., GIZZARELLI, M., VITALE, F., MONTAGNARO, S., TORINA, A., SOTERA, S. et OLIVA, G., 2018. Serological and entomological survey of canine leishmaniasis in Lampedusa island, Italy. *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14, no. 1, pp. 286. DOI 10.1186/s12917-018-1606-x

FRANCINO, O., ALTET, L., SÁNCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SÁNCHEZ, A. et ROURA, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 137, no. 3-4, pp. 214-221. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.01.011.

FREITAS, J.C.C., NUNES-PINHEIRO, D.C.S., LOPES NETO, B.E., SANTOS, G.J.L., ABREU, C.R.A., BRAGA, R.R., CAMPOS, R.M. et OLIVEIRA, L.F., 2012. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012. Vol. 45, no. 1, pp. 24-29. DOI 10.1590/S0037-86822012000100006.

FUJIMORI, M., DE ALMEIDA, A.B.P.F., BARROUIN-MELO, S.M., CORTEZ, R.L.P.B., DUTHIE, M.S., HIRAMOTO, R.M., DE PINHO, F.A., REED, S.G., SOUSA, V.R.F., SOUZA, N.F., SOARES, R.M., TOLEZANO, J.E., SANCHEZ, M.C.A. et GOTO, H., 2021. Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis of canine *Leishmania infantum* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2021. Vol. 116, pp. e200428. DOI 10.1590/0074-02760200428.

GALLUZZI, L., CECCARELLI, M., DIOTALLEVI, A., MENOTTA, M. et MAGNANI, M., 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2018. Vol. 11, no. 1, pp. 273. DOI 10.1186/s13071-018-2859-8.

GÁLVEZ, R., MIRÓ, G., DESCALZO, M.A., NIETO, J., DADO, D., MARTÍN, O., CUBERO, E. et MOLINA, R., 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 169, no. 3-4, pp. 327-334. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.11.025.

GHARBI, M., MHADHBI, M., REJEB, A., JAOUADI, K., ROUATBI, M. et DARGHOUTH, M.A., 2015. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. Revue Scientifique et Technique de l'OIE. 2015. Vol. 34, no. 2, pp. 613-626. DOI 10.20506/rst.34.2.2384.

GIANCHECCHI, E. et MONTOMOLI, E., 2020. The enemy at home : leishmaniasis in the Mediterranean basin, Italy on the focus. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2020. Vol. 18, no. 6, pp. 563-577. DOI 10.1080/14787210.2020.1751611.

GIAPITZOGLU, S., SARIDOMICHELAKIS, M.N., LEONTIDES, L.S., KASABALIS, D., CHATZIS, M., APOSTOLIDIS, K., THEODOROU, K., ROUMPEAS, E. et MYLONAKIS, M.E., 2020. Evaluation of serum symmetric dimethylarginine as a biomarker of kidney disease in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology. 2020. Vol. 277, pp. 109015. DOI 10.1016/j.vetpar.2019.109015.

GIRAUD, E., MARTIN, O., YAKOB, L. et ROGERS, M., 2019. Quantifying *Leishmania* metacyclic promastigotes from individual sandfly bites reveals the efficiency of vector transmission. Communications Biology. 2019. Vol. 2, no. 1, pp. 84. DOI 10.1038/s42003-019-0323-8.

GOGGS, R., JEFFERY, U., LEVINE, D.N. et LI, R.H.L., 2020. Neutrophil-Extracellular Traps, cell-free DNA, and immunothrombosis in companion animals : a review. Veterinary Pathology. 2020. Vol. 57, no. 1, pp. 6-23. DOI 10.1177/0300985819861721.

GOMES, Y.M., PAIVA CAVALCANTI, M., LIRA, R.A., ABATH, F.G.C. et ALVES, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis : biotechnological advances. The Veterinary Journal. 2008. Vol. 175, no. 1, pp. 45-52. DOI 10.1016/j.tvjl.2006.10.019.

HAN, S., WU, W.P., CHEN, K., OSMAN, I., KIYIM, K., ZHAO, J., HOU, Y.Y., WANG, Y., WANG, L.Y. et ZHENG, C.J., 2018. Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China. BMC Veterinary Research. 2018. Vol. 14, no. 1, pp. 378. DOI 10.1186/s12917-018-1701-z.

HERRERA, G., CASTILLO, A., AYALA, M.S., FLÓREZ, C., CANTILLO-BARRAZA, O. et RAMIREZ, J.D., 2019. Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human

visceral Leishmaniasis in Colombia. BMC Infectious Diseases. 2019. Vol. 19, no. 1, pp. 747. DOI 10.1186/s12879-019-4353-0.

HOSEIN, S., BLAKE, D.P. et SOLANO-GALLEGO, L., 2017. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. Parasitology. 2017. Vol. 144, no. 1, pp. 95-115. DOI 10.1017/S003118201600055X.

ICAD, 2020. « *Chiffres des populations des chiens et chats en 2020 par régions et départements* ». [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.icad.fr/articles/populations-2020-chiens-chats>

IDRISSI, H., HAKKOUR, M., DUCHATEAU, L., ZANATTA, R., KACHANI, M., AZRIB, R., DAMINET, S., KICHOU, F., EL ASATEY, S., TAZI, N., SAHIBI, H. et EL HAMIANI KHATAT, S., 2021. Canine leishmaniasis in Morocco : a descriptive prospective clinical study. ORTEGA-PACHECO, Antonio (éd.), Veterinary Medicine International. 2021. Vol. 2021, pp. 1-12. DOI 10.1155/2021/6304127.

KASAP, O.E. et ALTEN, B., 2006. Comparative demography of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera : Psychodidae) at constant temperatures. Journal of Vector Ecology. 2006. Vol. 31, no. 2, pp. 378-385. DOI 10.3376/1081-1710(2006)31[378:CDOTSF]2.0.CO;2.

KAYE, P. et SCOTT, P., 2011. Leishmaniasis : complexity at the host–pathogen interface. Nature Reviews Microbiology. 2011. Vol. 9, no. 8, pp. 604-615. DOI 10.1038/nrmicro2608.

KECK, N. et DEREURE, J., 2003. Epidemiology of canine leishmaniasis by cross-sectional study in the French focus of Cévennes. Revue de Médecine Vétérinaire. 2003. Vol. 150, no. 10, pp. 599-604.

KOCH, L.K., KOCHMANN, J., KLIMPEL, S. et CUNZE, S., 2017. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. Scientific Reports. 2017. Vol. 7, no. 1, pp. 13325. DOI 10.1038/s41598-017-13822-1.

KOUTINAS, A. F. et KOUTINAS, C. K., 2014. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Veterinary Pathology. 2014. Vol. 51, no. 2, pp. 527-538. DOI 10.1177/0300985814521248.

KUHLS, K., ALAM, M.Z., CUPOLILLO, E., FERREIRA, G.E.M., MAURICIO, I.L., ODDONE, R., FELICIANGELI, M.D., WIRTH, T., MILES, M.A. et SCHÖNIAN, G., 2011. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. KAMHAWI, Shaden (éd.), PLoS Neglected Tropical Diseases. 2011. Vol. 5, no. 6, pp. e1155. DOI 10.1371/journal.pntd.0001155.

LAMOUREUX, A., GUYONNET, A., BENCHEKROUN, G., GUILLOT, J. et MAUREY, C., 2016. Traitement et prévention de la leishmaniose canine. *Le Point Vétérinaire*. Vol. 364, pp. 28-32.

LE RUTTE, E.A., VAN DER WILT, L.S., BULSTRA, C.A., NIEBOER, D., KONTOROUPI, P., DE VLAS, S.J. et RICHARDUS, J.H., 2021. Incidence and geographical distribution of canine leishmaniosis in 2016—2017 in Spain and France. *Veterinary Parasitology : Regional Studies and Reports*. Juillet 2021. Vol. 25, pp. 100613. DOI 10.1016/j.vprsr.2021.100613.

LEGER, N. et DEPAQUIT, J., 1999. *Les leishmanioses*. Paris : Ellipses. Les phlébotomes. pp. 89-108.

LEGUÉDOIS, S., PARTY, J.P., DUPOUEY, J.M., GAUQUELIN, T., GÉGOUT, J.C., LECAREUX, C., BADEAU, V. et PROBST, A., 2011. La carte de végétation du CNRS à l'ère du numérique : La base de données géographique de la végétation de la France. Couverture vectorielle harmonisée à 1/1 000 000 et scan géoréférencé à 1/200 000. Cybergeogeo. 2011. DOI 10.4000/cybergeogeo.24688.

LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, L.J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. et WALLACE, F.G., 1980. A Newly revised classification of the protozoa\* : THE COMMITTEE ON SYSTEMATICS EVOLUTION OF THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGISTS. *The Journal of Protozoology*. 1980. Vol. 27, no. 1, pp. 37-58. DOI 10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.

LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N. et TAFURI, W.L., 2004. Canine visceral leishmaniasis : a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*. 2004. Vol. 92, no. 1, pp. 43-53. DOI 10.1016/j.actatropica.2004.04.007.

LIMA, C., SANTARÉM, N., NIETO, J., MORENO, J., CARRILLO, E., BARTHOLOMEU, D.C., BUENO, L.L., FUJIWARA, R., AMORIM, C. et CORDEIRO-DA-SILVA, A., 2019. The use of specific serological biomarkers to detect CaniLeish® vaccination in dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019. Vol. 6, pp. 373. DOI 10.3389/fvets.2019.00373.

LOMBARDO, G., PENNISI, M.G., LUPO, T., CHICHARRO, C. et SOLANO-GALLEGO, L., 2014. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs : diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasites & Vectors*. 2014. Vol. 7, no. 1, pp. 120. DOI 10.1186/1756-3305-7-120.

LOPES, K.F.C., DELAI, R.M., FAZOLI, K.G.Z., REY, L.M.R., LOPES-MORI, F.M.R., BENITEZ, A.N., BORGES NETO, A., BERNARDES, J.C., CALDART, E.T., MITSUKA-BREGANÓ, R., NAVARRO, I.T., SANTOS, I.C., LOURENÇO, E.L.B., ALBERTON, L.R. et GONÇALVES, D.D., 2021. Urban horses as environmental bioindicators for leishmaniasis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2021. Vol. 21, no. 7, pp. 534-538. DOI 10.1089/vbz.2020.2760.

MARCONDES, M., DE LIMA, V.M.F., DE ARAÚJO, M.F.L., HIRAMOTO, R.M., TOLEZANO, J.E., VIEIRA, R.F.C. et BIONDO, A.W., 2013. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Veterinary Parasitology*. 2013. Vol. 197, no. 3-4, pp. 649-652. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.07.013.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J., TORRES-MEDINA, N., MORILLAS-MÁRQUEZ, F., CORPAS-LÓPEZ, V. et DÍAZ-SÁEZ, V., 2021. Role of wild rabbits as reservoirs of leishmaniasis in a non-epidemic Mediterranean hot spot in Spain. *Acta Tropica*. 2021. Vol. 222, pp. 106036. DOI 10.1016/j.actatropica.2021.106036.

MATTIN, M., BRODBELT, D., WYLIE, C., CARBONELL ANTOÑANZAS, M., SOLANO GALLEGU, L., ESPEJO, L., COSTARD, S. et ZAGMUTT, F., 2014. Data collection to characterise the impact of canine leishmaniosis and modelling of the role of animals in spreading *Leishmania infantum* within the European Union. EFSA Supporting Publications. 2014. Vol. 11, no. 4. DOI 10.2903/sp.efsa.2014.EN-466.

MIRÓ, G. et LÓPEZ-VÉLEZ, R., 2018. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary Parasitology*. 2018. Vol. 254, pp. 151-159. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.03.002.

MOMO, C., JACINTHO, A.P.P., MOREIRA, P.R.R., MUNARI, D.P., MACHADO, G.F. et VASCONCELOS, R.O., 2014. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Medicine International*. 2014. Vol. 2014, pp. 1-5. DOI 10.1155/2014/150582.

MORDECAI, E.A., PAAIJMANS, K.P., JOHNSON, L.R., BALZER, C., BEN-HORIN, T., DE MOOR, E., MCNALLY, A., PAWAR, S., RYAN, S.J., SMITH, T.C. et LAFFERTY, K.D., 2013. Optimal temperature for malaria transmission is dramatically lower than previously predicted. THRALL, Peter (éd.), *Ecology Letters*. 2013. Vol. 16, no. 1, pp. 22-30. DOI 10.1111/ele.12015.

MOREIRA, M.A.B., LUVIZOTTO, M.C.R., GARCIA, J.F., CORBETT, C.E.P. et LAURENTI, M.D., 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*. 2007. Vol. 145, no. 3-4, pp. 245-252. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.12.012.

MORENO, J. et ALVAR, J., 2002. Canine leishmaniasis : epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*. 2002. Vol. 18, no. 9, pp. 399-405. DOI 10.1016/S1471-4922(02)02347-4.

NAUCKE, T.J., AMELUNG, S. et LORENTZ, S., 2016. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*. 2016. Vol. 9, no. 1, pp. 256. DOI 10.1186/s13071-016-1551-0.

OIE, 2018. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2018. Chapter 3.1.11. Leishmaniosis (version adopted in May 2014)* [en ligne]. Disponible à l'adresse : [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.11\\_LEISHMANIOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf)

OLIVA, G., DVM, X.R., CROTTI, A., MAROLI, M., CASTAGNARO, M., GRADONI, L., LUBAS, G., PALTRINIERI, S., ZATELLI, A. et ZINI, E., 2010. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010. Vol. 236, no. 11, pp. 1192-1198. DOI 10.2460/javma.236.11.1192.

OTRANTO, D., PARADIES, P., SASANELLI, M., LEONE, N., DE CAPRARIIS, D., CHIRICO, J., SPINELLI, R., CAPELLI, G. et BRANDONISIO, O., 2005. Recombinant K39 Dipstick Immunochromatographic Test : a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005. Vol. 17, no. 1, pp. 32-37. DOI 10.1177/104063870501700107.

PALTRINIERI, S., GRADONI, L., ROURA, X., ZATELLI, A. et ZINI, E., 2016. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016. Vol. 45, no. 4, pp. 552-578. DOI 10.1111/vcp.12413.

PAPADOGIANNAKIS, E.I. et KOUTINAS, A.F., 2015. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2015. Vol. 163, no. 3 4, pp. 94-102. DOI 10.1016/j.vetimm.2014.11.011.

PENNISI, M.G., 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe : an update. *Veterinary Parasitology*. 2015. Vol. 208, no. 1-2, pp. 35-47. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.12.023.

PEREIRA, M., VALÉRIO-BOLAS, A., SANTOS-MATEUS, D., ALEXANDRE-PIRES, G., SANTOS, M., RODRIGUES, A., ROCHA, H., SANTOS, A., MARTINS, C., TOMAS, A.,

PASSERO, F., DA FONSECA, I.P. et SANTOS-GOMES, G., 2017. Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 2017. Vol. 248, pp. 10-20. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.10.008.

PEREIRA, M., SANTOS, R., OLIVEIRA, R., COSTA, L., PRATA, A., GONÇALVES, V., ROQUETTE, M., VALA, H. et SANTOS-GOMES, G., 2020. Prognostic factors and life expectancy in canine leishmaniosis. *Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 7, no. 3, pp. 128. DOI 10.3390/vetsci7030128.

PETANIDES, T.A., KOUTINAS, A.F., MYLONAKIS, M.E., DAY, M.J., SARIDOMICHELAKIS, M.N., LEONTIDES, L.S., MISCHKE, R., DINIZ, P., BREITSCHWERDT, E.B., KRITSEPI, M., GARIPIDOU, V.A., KOUTINAS, C.K. et LEKKAS, S., 2008. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008. Vol. 22, no. 4, pp. 866-872. DOI 10.1111/j.1939-1676.2008.0129.x.

PINTO, A.J.W., FIGUEIREDO, M.M., SILVA, F.L., MARTINS, T., MICHALICK, M.S.M., TAFURI, W.L. et TAFURI, W.L., 2011. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011. Vol. 53, no. 1, pp. 67. DOI 10.1186/1751-0147-53-67.

PORROZZI, R., SANTOS DA COSTA, M.V., TEVA, A., FALQUETO, A., FERREIRA, A.L., DOS SANTOS, C.D., FERNANDES, A.P., GAZZINELLI, R.T., CAMPOS-NETO, A. et GRIMALDI, G., 2007. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007. Vol. 14, no. 5, pp. 544-548. DOI 10.1128/CVI.00420-06.

PROVERBIO, D., SPADA, E., PEREGO, R., BAGGIANI, L., BAGNAGATTI DE GIORGI, G., MIGLIAZZO, A. et VITALE, F., 2016. Comparison of a rapid immunochromatographic assay with an immunofluorescent antibody test for detection of *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016. Vol. 45, no. 4, pp. 623-626. DOI 10.1111/vcp.12408.

PRUDHOMME, J., RAHOLA, N., TOTY, C., CASSAN, C., ROIZ, D., VERGNES, B., THIERRY, M., RIOUX, J.A., ALTEN, B., SERENO, D. et BAÑULS, A.L., 2015. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasites & Vectors*. 2015. Vol. 8, no. 1, pp. 642. DOI 10.1186/s13071-015-1250-2.

PRUDHOMME, J., TOTY, C., KASAP, O.E., RAHOLA, N., VERGNES, B., MAIA, C., CAMPINO, L., ANTONIOU, M., JIMENEZ, M., MOLINA, R., CANNET, A., ALTEN, B., SERENO, D. et BAÑULS, A.L., 2015. New microsatellite markers for multi-scale genetic studies on *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, vector of *Leishmania infantum* in the Mediterranean area. *Acta Tropica*. 2015. Vol. 142, pp. 79-85. DOI 10.1016/j.actatropica.2014.10.016.

QUINNELL, R. J. et COURTENAY, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009. Vol. 136, no. 14, pp. 1915-1934. DOI 10.1017/S0031182009991156.

RALLIS, T., DAY, M.J., SARIDOMICHELAKIS, M.N., ADAMAMA-MORAITOU, K.K., PAPAZOGLU, L., FYTIANOU, A. et KOUTINAS, A.F., 2005. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) : a clinicopathological study of 26 Cases. *Journal of Comparative Pathology*. 2005. Vol. 132, no. 2 3, pp. 145-152. DOI 10.1016/j.jcpa.2004.09.004.

READY, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*. 2013. Vol. 58, no. 1, pp. 227-250. DOI 10.1146/annurev-ento-120811-153557.

REMADI, L., CHARGUI, N., JIMÉNEZ, M., MOLINA, R., HAOUAS, N., GONZÁLEZ, E., CHAABANE-BANAOUAS, R., BEN SALAH, E., HADDAJI, M., CHAABOUNI, Y. et BABBA, H., 2020. Molecular detection and identification of *Leishmania* DNA and blood meal analysis in *Phlebotomus (Larroussius)* species. SAMY, Abdallah M. (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020. Vol. 14, no. 3, pp. e0008077. DOI 10.1371/journal.pntd.0008077.

RIBEIRO, R.R., MICHALICK, M.S.M., DA SILVA, M.E., DOS SANTOS, C.C.P., FRÉZARD, F.J.G., et DA SILVA, S.M., 2018. Canine leishmaniasis : an overview of the current status and strategies for control. *BioMed Research International*. 2018. Vol. 2018, pp. 1-12. DOI 10.1155/2018/3296893.

RIBEIRO, R.R., SILVA, S.M., FULGÊNCIO, G.O., MICHALICK, M.S.M., et FRÉZARD, F.J.G., 2013. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2013. Vol. 22, no. 3, pp. 373-378. DOI 10.1590/S1984-29612013000300009.

RIOUX, J.A., KILLICK-KENDRICK, R., PERIERES, J., TURNER, D.P. et LANOTTE, G., 1980. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France*. Paris : Éd. Masson. Chapitre 13 : Les sites de « flanc de coteau », biotopes de transmission privilégiés de la leishmaniose viscérale en Cévennes. ISBN ISSN/ISBN : 0003-4150.

RIOUX, J.A. et GOLVAN, Y.J., 1969. *Épidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France*. Paris : Institut national de la santé et de la recherche médicale.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A., OJEDA, A., TODOLÍ, F. et ALBEROLA, J., 2013. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 2013. Vol. 191, no. 3 4, pp. 363-366. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.09.009.

ROMBOLÀ, P., BARLOZZARI, G., CARVELLI, A., SCARPULLA, M., IACOPONI, F. et MACRÌ, G., 2021. Seroprevalence and risk factors associated with exposure to *Leishmania infantum* in dogs, in an endemic Mediterranean region. YURCHENKO, Vyacheslav (éd.), PLOS ONE. 2021. Vol. 16, no. 1, pp. e0244923. DOI 10.1371/journal.pone.0244923.

ROQUE, A.L.R., et JANSEN, A.M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology : Parasites and Wildlife*. 2014. Vol. 3, no. 3, pp. 251-262. DOI 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004.

ROSYPAL, A. C., TROY, G.C., ZAJAC, A.M., FRANK, G. et LINDSAY, D.S., 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected Beagle. *Journal of Parasitology*. 2005. Vol. 91, no. 4, pp. 970-972. DOI 10.1645/GE-483R.1.

ROURA, X., FONDATI, A., LUBAS, G., GRADONI, L., MAROLI, M., OLIVA, G., PALTRINIERI, S., ZATELLI, A. et ZINI, E., 2013. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs : a working group report. *The Veterinary Journal*. 2013. Vol. 198, no. 1, pp. 43-47. DOI 10.1016/j.tvjl.2013.04.001.

SARIDOMICHELAKIS, M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis : epidemiologic and diagnostic implications. *Pathogenesis of canine leishmaniosis. Veterinary Dermatology*. 2009. Vol. 20, no. 5-6, pp. 471-489. DOI 10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. et KOUTINAS, A.F., 2014. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Dermatology*. 2014. Vol. 25, no. 2, pp. 61-e22. DOI 10.1111/vde.12105.

SCALONE, A., DE LUNA, R., OLIVA, G., BALDI, L., SATTA, G., VESCO, G., MIGNONE, W., TURILLI, C., MONDESIRE, R.R., SIMPSON, D., DONOGHUE, A.R., FRANK, G.R. et GRADONI, L., 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*. 2002. Vol. 104, no. 4, pp. 275-285. DOI 10.1016/S0304-4017(01)00643-4.

SCOTTI-SAINTAGNE, C. et SCOTTI, I., 2020. Le Parc national des Cévennes et l'adaptation des forêts au changement climatique. In : GREC-SUD & RECO, *Adaptation du Parc national des Cévennes au changement climatique et à ses impacts*. Ouvrage collectif co-édité par l'Association pour l'innovation et la recherche au service du climat (AIR Climat) et le Réseau d'expertise sur les changements climatiques en Occitanie (RECO). ISBN : 978-2-491380-00-7.

SILVA, F.L., OLIVEIRA, R.G., SILVA, T.M.A., XAVIER, M.N., NASCIMENTO, E.F. et SANTOS, R.L., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2009. Vol. 160, no. 1-2, pp. 55-59. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

SIMONATO, G., MARCHIORI, E., MARCER, F., RAVAGNAN, S., DANESI, P., MONTARSI, F., BONONI, C., CAPELLI, G., PIETROBELLI, M. et CASSINI, R., 2020. Canine leishmaniosis control through the promotion of preventive measures appropriately adopted by citizens. *Journal of Parasitology Research*. 2020. Vol. 2020, pp. 1-7. DOI 10.1155/2020/8837367.

SOLANO-GALLEGO, L., FERNÁNDEZ-BELLON, H., MORELL, P., FONDEVILA, D., ALBEROLA, J., RAMIS, A. et FERRER, L., 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 2004. Vol. 130, no. 1, pp. 7-12. DOI 10.1016/S0021-9975(03)00063-X.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G. et BANETH, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 2009. Vol. 165, no. 1-2, pp. 1-18. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SOLANO-GALLEGO, L., LLULL, J., RAMOS, G., RIERA, C., ARBOIX, M., ALBEROLA, J. et FERRER, L., 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*. 2000. Vol. 90, no. 1-2, pp. 37-45. DOI 10.1016/S0304-4017(00)00223-5.

SOLANO-GALLEGO, L., MIRÓ, G., KOUTINAS, A., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G. et BANETH, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 2011. Vol. 4, no. 1, pp. 86. DOI 10.1186/1756-3305-4-86.

SOLANO-GALLEGO, L., VILLANUEVA-SAZ, S., CARBONELL, M., TROTTA, M., FURLANELLO, T. et NATALE, A., 2014. Serological diagnosis of canine leishmaniosis :

comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*. 2014. Vol. 7, no. 1, pp. 111. DOI 10.1186/1756-3305-7-111.

SOLANO-GALLEGO, L., CARDOSO, L., PENNISI, M.G., PETERSEN, C., BOURDEAU, P., OLIVA, G., MIRÓ, G., FERRER, L. et BANETH, G., 2017. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends in Parasitology*. 2017. Vol. 33, no. 9, pp. 706-717. DOI 10.1016/j.pt.2017.06.004.

SOUZA, C.S.F., SILVA, V.L. et LABARTHE, N., 2019. Evaluation of DPP® and SNAP® Rapid Tests for diagnosis of *Leishmania infantum* canine infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2019. Vol. 52, pp. e20190154. DOI 10.1590/0037-8682-0154-2019.

SOUZA, T.D., TURCHETTI, A.P., FUJIWARA, R.T., PAIXÃO, T.A. et SANTOS, R.L., 2014. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Veterinary Parasitology*. 2014. Vol. 200, no. 3-4, pp. 233-241. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.12.025.

SUNDAR S. *et al.*, 2003. Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (IT LEISH) for indian visceral leishmaniasis and PKDL. In : American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2003. *ASTMH 52nd Annual Meeting*, 3 Décembre 2003, Philadelphie (USA).

TESKE, E., VAN KNAPEN, F., BEIJER, E. et SLAPPENDEL, R.J., 2002. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2002. Vol. 43, no. 4, pp. 195. DOI 10.1186/1751-0147-43-195.

TIRADO, T.C., BAVIA, L., AMBROSIO, A.R., CAMPOS, M.P., DE ALMEIDA SANTIAGO, M., MESSIAS-REASON, I.J. et FIGUEIREDO, F.B., 2021. A comparative approach on the activation of the three complement system pathways in different hosts of Visceral Leishmaniasis after stimulation with *Leishmania infantum*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2021. Vol. 120, pp. 104061. DOI 10.1016/j.dci.2021.104061.

TOEPP, A.J. et PETERSEN, C.A., 2020. The balancing act : immunology of leishmaniosis. *Research in Veterinary Science*. 2020. Vol. 130, pp. 19-25. DOI 10.1016/j.rvsc.2020.02.004.

TORRECILHA, R.B.P., UTSUNOMIYA, Y.T., BOSCO, A.M., ALMEIDA, B.F., PEREIRA, P.P., NARCISO, L.G., PEREIRA, D.C.M., BAPTISTIOLLI, L., CALVO-BADO, L., COURTENAY, O., NUNES, C.M. et CIARLINI, P.C., 2016. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Preventive Veterinary Medicine*. 2016. Vol. 132, pp. 83-87. DOI 10.1016/j.prevetmed.2016.08.006.

TORRENT, E., PLANELLAS, M., ORDEIX, L., PASTOR, J., RODON, J. et SOLANO-GALLEGO, L., 2018. Serum Symmetric Dimethylarginine as an early marker of excretory dysfunction in canine leishmaniosis (*L. infantum*) induced nephropathy. *Veterinary Medicine International*. 2018. Vol. 2018, pp. 1-8. DOI 10.1155/2018/7517359.

TRAVI, B.L., CORDEIRO-DA-SILVA, A., DANTAS-TORRES, F. et MIRÓ, G., 2018. Canine visceral leishmaniasis : diagnosis and management of the reservoir living among us. BÜSCHER, Philippe (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018. Vol. 12, no. 1, pp. e0006082. DOI 10.1371/journal.pntd.0006082.

TSAKMAKIDIS, I., ANGELOPOULOU, K., DOVAS, C.I., DOKIANAKIS, E., TAMVAKIS, A., SYMEONIDOU, I., ANTONIOU, M. et DIAKOU, A., 2017. *Leishmania* infection in rodents in Greece. *Tropical Medicine & International Health*. 2017. Vol. 22, no. 12, pp. 1523-1532. DOI 10.1111/tmi.12982.

VAMVAKIDIS, C.D., KOUTINAS, A.E., SARIDOMICHELAKIS, M., KANAKOUDIS, G. et GEORGIADIS, G., 2000. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record*. 2000. Vol. 146, no. 24, pp. 698-703. DOI 10.1136/vr.146.24.698.

VELEZ, R., BALLART, C., DOMENECH, E., ABRAS, A., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A., GÓMEZ, S.A., TEBAR, S., MUÑOZ, C., CAIRÓ, J. et GÁLLEGO, M., 2019. 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. *Preventive Veterinary Medicine*. 2019. Vol. 162, pp. 67-75. DOI 10.1016/j.prevetmed.2018.10.015.

VELEZ, R., DOMENECH, E., CAIRÓ, J. et GÁLLEGO, M., 2020. The impact of canine leishmaniosis vaccination with Canileish® in *Leishmania infantum* infection seroprevalence studies. *Acta Tropica*. 2020. Vol. 202, pp. 105259. DOI 10.1016/j.actatropica.2019.105259.

VELEZ, R., GÁLLEGO, M., 2020. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis : a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine & International Health*. 2020. Vol. 25, no. 5, pp. 540-557. DOI 10.1111/tmi.13382.

VILLANUEVA-SAZ, S., BASURCO, A., MARTÍN, V., FERNÁNDEZ, A., LOSTE, A. et VERDE, M.T., 2019. Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2019. Vol. 61, no. 1, pp. 38. DOI 10.1186/s13028-019-0473-1.

VOLF, P. et VOLFOVA, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*. 2011. Vol. 36, pp. S1-S9. DOI 10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x.

## Annexes

**Annexe I : Questionnaires distribués aux propriétaires.**

**Annexe II : Poster présenté au congrès annuel de la Société Française de Parasitologie et de Mycologie médicale, Rouen (France), du 21 au 24 Juin 2022**

**Annexe III : Poster présenté au congrès WorldLeish 7, Carthagène (Colombie), du 1<sup>er</sup> au 6 Août 2022.**

## Annexe I : Questionnaires distribués aux propriétaires

Afin de pouvoir analyser les prélèvements, il est important que nous ayons des informations supplémentaires sur votre lieu de vie, sur votre chien et sur vos connaissances sur la leishmaniose. Merci de remplir ce questionnaire, en ne donnant qu'**UNE REPONSE PAR QUESTION**. Si vous avez des questions n'hésitez pas à nous demander.

NOM :

Prénom :

Lieu de vie :

### 1. Informations sur votre lieu de vie

❖ Type d'habitat

- Urbain
- Périurbain
- Campagne

❖ Description du biotope du lieu de vie des chiens

---

---

---

❖ Présence d'autres animaux domestiques

- Oui
- Non

❖ Présence d'animaux de ferme près du lieu de vie

- Oui
- Non

### 2. Connaissances sur la leishmaniose

❖ Avez-vous déjà entendu parler de leishmaniose ?

- Oui
- Non

❖ Savez-vous que c'est une maladie transmissible à l'Homme ?

- Oui
- Non

❖ Votre vétérinaire vous a-t-il parlé du vaccin contre la Leishmaniose ?

- Oui
- Non

❖ Avez-vous eu des cas de leishmaniose canine avérée dans le passé ?

- Oui
- Non

## Caractéristiques de l'animal

Nom :

Sexe : \_\_\_\_\_ Âge : \_\_\_\_\_ Race : \_\_\_\_\_

Provenance : \_\_\_\_\_

- ❖ Longueur des poils
  - Court
  - Mi-long
  - Long
- ❖ Utilité
  - Chasse
  - Garde
  - Compagnie
  - Autres : \_\_\_\_\_
- ❖ Environnement
  - Intérieur strict
  - Intérieur la plupart du temps
  - Intérieur et extérieur
  - Extérieur la plupart du temps
  - Extérieur strict
- ❖ Lieu de couchage pour la nuit en été
  - Intérieur
  - Dehors
  - Avec niche ouverte
  - Avec niche fermée
- ❖ Votre chien est-il vacciné contre la leishmaniose ?
  - Oui
  - Non
  - Si oui, avec quel vaccin et selon quel protocole ? \_\_\_\_\_
- ❖ Votre chien est-il malade ? Si oui, quels sont les signes cliniques et le traitement mis en place ?
  - Oui : \_\_\_\_\_
  - Non
- ❖ Appliquez-vous des antiparasitaires externes à votre chien ?
  - Oui
  - Non
- ❖ Si oui, lesquels et à quelle fréquence ? Renseignez le nom si vous le connaissez.
  - Pipette : \_\_\_\_\_
  - Collier : \_\_\_\_\_
  - Spray : \_\_\_\_\_
  - Comprimé : \_\_\_\_\_
- ❖ Voyage à l'étranger, si oui, où ?
  - Oui : \_\_\_\_\_
  - Non

## Annexe II : Poster présenté au congrès annuel de la Société Française de Parasitologie et de Mycologie médicale, Rouen (France), du 21 au 24 Juin 2022.

### Prévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes

Anaïs Bossa<sup>1</sup>, Grégoire Pasquier<sup>2</sup>, Lilia Zribi<sup>3</sup>, Emilie Bouhsira<sup>1</sup>, Patrick Lami<sup>2</sup>, Siwar Boufares<sup>2</sup>, Hela Hansen<sup>2</sup>, Karim Aoun<sup>3</sup>, Christophe Ravel<sup>2</sup>, Laurence Lachaud<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France. <sup>2</sup> Centre National de Référence des Leishmanioses, CHU de Montpellier, France. <sup>3</sup> Institut Pasteur de Tunis, Tunisie

#### Introduction

D'après les dernières études épidémiologiques, la prévalence de la leishmaniose canine et du portage asymptomatique de *Leishmania infantum* dans certaines zones endémiques du Monde peut atteindre 80%. Dans le Sud-Ouest de l'Europe, près de 2.5 millions de chiens seraient infestés. En France, l'un des principaux foyers est situé dans les Cévennes, où la séroprévalence des chiens varie de 5.51% à 17.9% selon les précédentes données, dont la dernière a été réalisée en 2003. L'objectif de ce travail était : (i) d'estimer l'endémicité actuelle de la leishmaniose canine dans ce foyer, (ii) d'évaluer l'utilisation des mesures prophylactiques mises en place (protection antivectorielle et vaccination) et de (iii) de comparer les performances de quatre tests sérologiques commerciaux.

#### Matériel et méthodes

Entre décembre 2021 et janvier 2022, 169 chiens vivant dans 12 localités différentes de la région des Cévennes ont été échantillonnés. Un prélèvement sanguin sur tube sec a été réalisé et un questionnaire complété par les propriétaires. Quatre dispositifs de tests sérologiques ont été évalués et comparés : 2 méthodes ELISA (ID Screen® Leishmaniasis Indirect, Innovative Diagnosis et *Leishmania infantum* IgG ELISA, Bordier Affinity products) et 2 tests rapides d'immunochromatographie (Speed Leish K®, Virbac ; FASTest® Leish, Megacor). Un groupe de témoins positifs a été ajouté, constitué de 29 chiens malades (présence de signes cliniques et PCR positive) vivant dans les Cévennes ou en Tunisie.



Localités des Cévennes sélectionnées pour l'enquête.  
Source : Google Earth.

#### Résultats

La séroprévalence, selon les techniques, pour l'ensemble des chiens de l'étude (n=169) et pour les chiens non vaccinés (n=141) variait respectivement de 12.4% à 23.5%, et de 11.3% à 19.1%. Pour le groupe « vaccinés », la détection d'anticorps allait de 17.2% à 44.8% selon la technique.

#### Séroprévalence dans les Cévennes

Test	Nombre de chiens positifs	Pourcentage de séropositifs	Nombre de chiens négatifs	Pourcentage de séronégatifs
ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect	40	24	129	76
<i>Leishmania infantum</i> IgG ELISA, Bordier®	30	18	139	82
Speed Leish K®	25	15	144	85
FasTest® LEISH	21	12	148	88

Figure 1 – Tableau représentant le nombre de chiens positifs, négatifs et les pourcentages associés pour chaque test sur la totalité des chiens de l'étude (n=169)

#### Utilisation des mesures prophylactiques

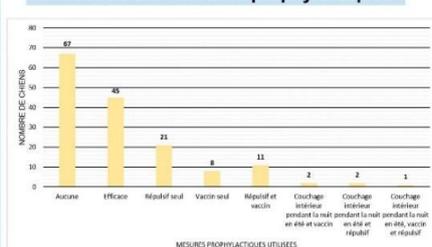


Figure 2 – Mesures de prophylaxie appliquées par les propriétaires aux 169 chiens inclus dans l'étude

#### Performances des quatre tests de diagnostic sérologique

- Pour le groupe témoin « chiens malades » (n=29), la sensibilité des techniques sérologiques était de 100% pour les deux techniques ELISA, de 96.5% pour le test rapide FASTest® Leish (Megacor) et de 82,7% pour le test rapide Speed Leish K® (Virbac).
- Les performances des tests ont été comparées en prenant pour méthode de référence l'ELISA ID Screen Leishmaniasis indirect®, dont les performances ont déjà été étudiées dans de précédents travaux,.

ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect					
	Positif	Négatif	Total	VPP/VPN	
Leishmania infantum IgG ELISA, Bordier®	Positif	27	3	30	0,9
	Négatif	13	126	139	0,91
Total	40	129	169		
Se/Sp	0,68	0,98			

ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect					
	Positif	Négatif	Total	VPP/VPN	
Speed Leish K®	Positif	20	5	25	0,8
	Négatif	20	124	144	0,86
Total	40	129	169		
Se/Sp	0,5	0,96			

ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect					
	Positif	Négatif	Total	VPP/VPN	
FasTest® LEISH	Positif	20	1	21	0,95
	Négatif	20	128	148	0,86
Total	40	129	169		
Se/Sp	0,5	0,99			

Figure 3 – Tableau comparant les valeurs de sensibilité, de spécificité, ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives des différents tests, avec pour référence l'ELISA ID Screen Leishmaniasis indirect®.

#### Conclusion

- L. infantum* continue de circuler activement dans le foyer cévenol avec au moins 11% des chiens ayant été en contact avec le parasite.
- La prophylaxie contre la leishmaniose canine (antiparasitaires à base de pyréthrinoides et vaccination) en zone d'endémie est faible, même si la plupart des propriétaires semblent sensibilisés à ces méthodes de protection.
- La sensibilité diagnostique de la leishmaniose maladie des tests rapides Speed Leish K® (Virbac) et FASTest® Leish (Megacor) apparaît insuffisante. Concernant la séroprévalence, il reste difficile de déterminer quel est le meilleur test pour détecter l'ensemble des chiens porteurs du parasite en l'absence de technique de référence.
- L'interprétation des tests sérologiques positifs chez les chiens vaccinés est par ailleurs un véritable challenge. La comparaison avec les données cliniques, les études par PCR et le suivi à long terme de ces chiens devraient permettre une meilleure estimation des performances de ces tests.

# Annexe III : Poster présenté au congrès WorldLeish 7, Carthagène (Colombie), du 1<sup>er</sup> au 6 Août 2022.



## EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF CANINE LEISHMANIASIS IN AN AREA OF SOUTHERN FRANCE

A Bossa<sup>1</sup>, P Lam<sup>2</sup>, N Kuk<sup>2</sup>, E Bouhsira<sup>1</sup>, B Barckmann<sup>2</sup>, G Pasquier<sup>2</sup>, Y Sterkers<sup>2</sup>, C Rave<sup>2</sup> & L Lachaud<sup>2</sup>

<sup>1</sup>École Nationale Vétérinaire de Toulouse, INTheres, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

<sup>2</sup>Département de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence des Leishmanioses, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Université de Montpellier, UMR MIVEGEC, Montpellier France

### Introduction

The prevalence of canine leishmaniasis and asymptomatic carriage of *Leishmania infantum* in endemic areas around the world is up to 80% depending on the tests used PCR or serology. In southwestern Europe, nearly 2.5 million dogs are thought to be infested. In the south of France, one of the major focus is located in the Cévennes region, and seroprevalence in dogs varies from 5.51% to 17.9% according to previous studies, last of which was carried out in 2003. The objectives of this work were (i) to evaluate the current endemicity of canine leishmaniasis in this area using serology and PCR on blood (ii) to assess the use of the prophylactic measures implemented (anti-vectorial protection and vaccination) (iii) to compare different serological tests.

### Material & Methods

- **Study area** : Situation of the Cévenol region in France - Sampling sites (Figure 1)
- **Population** : between December 2021 and January 2022, 169 dogs were sampled
- **Samples** : 5mL of blood was sampling for serology and PCR
- **Serological tests** : four kits were evaluated. Two ELISA methods: ID Screen® Leishmaniasis Indirect, Innovative Diagnosis & Leishmania infantum IgG ELISA, Bordier Affinity products Immundiagnostica GmbH. Two immunochromatography tests Speed Leish K™ Virbac; FASTest® Leish Megacor.
- **PCR** : buffy coat was extracted using Promega precipitation solution. PCR *Leishmania* targeted the kDNA as described in Mary et al. J Clin Microbiol. 2004. Control was a PCR targeting albumin gene with a TaqMan probe specific for dogs.
- **Statistical analyses** were performed using Excel® software. The degree of agreement between tests was evaluated by Cohen's Kappa coefficient.
- **Ethical approval** N° 2021070114534565



Figure 1. Situation of the Cévennes region in France - Sampling sites. Source : Google Earth. <https://earth.google.com/web/@43.89043694,3.81265885,283.091916913,173928.147005660,consulte%20le%2022/01/22>

### Results

#### 1. Endemicity of canine leishmaniasis

- 12 different places in the Cévennes region were sampled, covering a 1200 km<sup>2</sup> area
- **Seroprevalence**, according to technique, for all dogs in the study (n=169) and for unvaccinated dogs (n=141) ranged respectively from 12.4% to 23.5%, and from 11.3% to 19.1%. For the vaccinated group, antibody detection ranged from 17.2% to 44.8% depending on the technique.
- **DNA detection by PCR on blood** : only 11 dogs were found positive by PCR.
- In one village (Agonès), 18/27 (66.6%) dogs had antibodies and 6 were PCR positive.

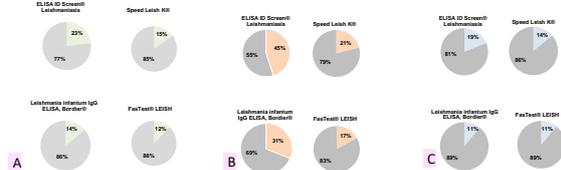


Figure 2. Seroprevalence according to the method for all dogs (n=169) [A]; for the vaccinated dogs (n=29) [B]; for the non-vaccinated dogs (n=140)[C].

#### 2. Use of the prophylactic measures implemented (anti-vectorial protection and vaccination)

- **72.2%** (122 dogs) were not receiving any effective preventive measures against leishmaniasis.
- **14%** received only an external antiparasitic, **7%** received an external antiparasitic and were vaccinated
- Surprisingly, we found higher seroprevalence rates in dogs receiving effective external antiparasitic protection against sandflies, this may be related to sampling bias.

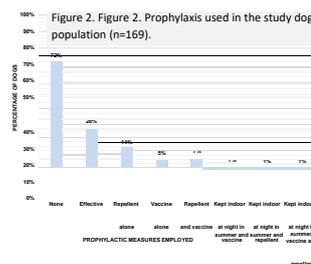


Figure 2. Prophylaxis used in the study dog population (n=169).

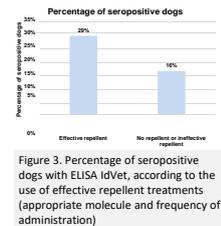


Figure 3. Percentage of seropositive dogs with ELISA IdVet, according to the use of effective repellent treatments (appropriate molecule and frequency of administration)

#### 3. Assessment of performances of serological tests

- A control group of "sick dogs" (n=29), had been tested with the 4 tests before started the study. Sensitivity was 100% for the two ELISA techniques, 96.5% for the FASTest® Leish rapid test (Megacor) and 82.7% for the Speed Leish K® rapid test (Virbac).
- For this study, the performance of the tests was compared using the ID Screen® ELISA as the reference method, whose performance has been validated in previous study (Solano-Gallego et al. Parasites & Vectors. 2014).
- Figure 4 shows the sensitivity and specificity results of the 3 techniques versus the ID Screen® ELISA technique that we used as the reference technique. The results include all 169 dogs

	ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect				ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect				ELISA ID Screen® Leishmaniasis Indirect		
	Positif	Négatif	Total		Positif	Négatif	Total		Positif	Négatif	Total
Leishmania Infantum IgG ELISA Bordier®	27	3	30	Speed Leish K®	20	5	25	FASTest® Leish	20	1	21
	13	126	139		20	124	144		20	128	148
	40	129	169		40	129	169		40	129	169
Se/Sp	0,88	0,98		Se/Sp	0,5	0,96		Se/Sp	0,5	0,99	

Figure 4. Comparison of the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the different serological methods used for the totale canine population (n=169).

### Conclusion / Perspectives

- *L. infantum* continues to circulate actively in the Cévennes region with up to 23% of dogs having been in contact with the parasite (seroprevalence in unvaccinated dogs with the ID Screen® Leishmaniasis Indirect, Innovative Diagnosis technique).

### Prévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes

D'après les dernières études épidémiologiques, la prévalence de la leishmaniose canine dans certaines zones endémiques du monde peut atteindre 80%. En France, l'un des principaux foyers est situé dans les Cévennes, où la dernière étude réalisée date de 2003. Les objectifs de ce travail étaient d'estimer l'endémicité actuelle de la leishmaniose canine dans ce foyer, d'évaluer l'utilisation des mesures prophylactiques et de comparer les performances de quatre tests sérologiques, deux méthodes ELISA et deux tests rapides d'immunochromatographie. De décembre 2021 à janvier 2022, un prélèvement sanguin a été réalisé sur 169 chiens vivant dans les Cévennes et un questionnaire a été rempli par leurs propriétaires. Cette étude montre que *L. infantum* continue de circuler activement, avec au moins 11% des chiens ayant été en contact avec le parasite, que la prophylaxie contre la leishmaniose canine y est faible et que la sensibilité des tests rapides semble insuffisante.

**Mots-clés :** *Leishmania infantum* ; Leishmaniose canine ; Séroprévalence ; Chien ; Cévennes ; France

---

### Canine leishmaniasis prevalence in the Cevennes

According to the latest epidemiological studies, the canine leishmaniasis prevalence in some endemic areas of the world can reach 80%. In France, one of the main foci is located in the Cevennes, where the last study was conducted in 2003. The aims of this work were to estimate the current canine leishmaniasis endemicity in this focus, to evaluate the use of prophylactic measures and to compare the performance of four serological tests, two ELISA methods and two rapid immunochromatographic tests. From December 2021 to January 2022, a blood sample was taken from 169 dogs living in the Cevennes and their owners completed a questionnaire. This study shows that *L. infantum* continues to circulate actively, with at least 11% of the dogs having been in contact with the parasite, that prophylaxis against canine leishmaniasis is low and that the rapid test sensitivity seems insufficient.

**Keywords :** *Leishmania infantum*; Canine leishmaniasis; Seroprevalence; Dog; Cevennes ; France