



HAL
open science

Suivi de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer Cévenol et apport de la technique du Western Blot pour l'établissement d'un diagnostic précoce de la maladie

Léa Turcutti

► To cite this version:

Léa Turcutti. Suivi de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer Cévenol et apport de la technique du Western Blot pour l'établissement d'un diagnostic précoce de la maladie. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04168316

HAL Id: dumas-04168316

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04168316v1>

Submitted on 21 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2023 THESE : 2023 – TOU 3 – 4043

SUIVI DE LA SEROPREVALENCE DE LA LEISHMANIOSE CANINE DANS LE FOYER CEVENOL ET APPORT DE LA TECHNIQUE DU WESTERN BLOT POUR L'ETABLISSEMENT D'UN DIAGNOSTIC PRECOCE DE LA MALADIE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

TURCUTTI Léa, Eléna

Directrice de thèse : Mme Emilie

BOUHSIRA

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
Mme Emilie BOUHSIRA
M. Emmanuel LIENARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :
Mme Laurence LACHAUD

Professeure, service de Parasitologie - Mycologie au CHU 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. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} 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**, *Zootecnie*
- 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*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*

PROFESSEURS 2^{ème} 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*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

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*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

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 **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie Pathologique*

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*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

A Monsieur le Professeur Alexis Valentin

Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Zoologie et Parasitologie, Université Paul-Sabatier de Toulouse
Service de Parasitologie et de Mycologie, Institut Fédératif de Biologie, CHU de Toulouse

Merci d'avoir accepté de présider mon jury.

A Madame le Docteur Emilie Bouhsira

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie, Maladies Parasitaires

Merci de m'avoir proposé de prendre part à ce projet. Merci également pour votre encadrement et votre aide dans la rédaction de ce manuscrit. Par ailleurs, je vous remercie pour vos enseignements en Parasitologie vétérinaire.

A Madame le Professeur Laurence Lachaud

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Mycologie, Parasitologie

Merci infiniment de m'avoir accordée votre confiance pour mener à bien ce projet.
Merci également pour votre gentillesse mais aussi pour m'avoir intégrée à votre équipe de recherche qui s'est révélée être aussi bienveillante que vous.
Je vous remercie enfin pour votre aide dans la mise en place du projet, la réalisation des expérimentations mais aussi pour la rédaction du manuscrit.

A Monsieur le Docteur Emmanuel Liénard

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Zoologie, Parasitologie et Maladies Parasitaires.

Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Je vous remercie aussi pour vos enseignements de Zoologie et de Parasitologie.

Table des matières

I. Généralités sur le parasite	8
1) Le parasite : <i>Leishmania infantum</i>	8
A. Taxinomie	8
B. Morphologie et Biologie	10
2) Le vecteur biologique : le phlébotome	11
A. Taxinomie	11
B. Morphologie	12
C. Cycle évolutif	13
D. Mode de vie	14
E. Rôle pathogène	15
3) Cycle parasitaire de <i>L. infantum</i>	15
A. Cycle évolutif dans le phlébotome	16
B. Cycle évolutif dans l'hôte intermédiaire	18
4) Épidémiologie	19
A. Sources du parasite	19
B. Modalités de transmission de <i>L. infantum</i> au chien	21
1. Transmission vectorielle	21
2. Autres modalités de transmission	22
C. Répartition géographique et temporelle du vecteur	22
1. Dans le monde	22
2. En Europe	24
3. En France	26
D. Prévalence de la leishmaniose canine	26
1. Dans le monde et en Europe	26
2. En France	29
II. La leishmaniose canine	30
1) Importance de la maladie	30
A. Importance médicale chez le chien	30
B. Importance sanitaire chez l'Homme : une zoonose grave	30
2) Pathogénie	31
A. Réponse immunitaire de l'hôte	32
1. La réponse immunitaire innée	32
2. La réponse immunitaire adaptative	32
a. La réponse immunitaire humorale	33

b.	La réponse immunitaire cellulaire	34
c.	Profil immunitaire du chien infecté : sensible <i>versus</i> résistant.....	35
B.	Échappement parasitaire à la réponse immunitaire de l'hôte	36
1.	Echappement à la réponse immunitaire innée	36
2.	Échappement à la réponse immunitaire adaptative	37
3)	La clinique chez le chien.....	37
A.	Signes généraux.....	38
B.	Signes cutanéomuqueux.....	39
C.	Signes oculaires et péri-oculaires	40
D.	Autres signes cliniques	41
E.	Bilan sur les signes cliniques évocateurs.....	42
F.	Classification clinique	43
4)	Facteurs de prédisposition	44
A.	La race et le pelage	44
B.	Le sexe.....	45
C.	L'âge.....	45
D.	Le mode et le lieu de vie de l'animal.....	46
E.	L'état de santé de l'animal.....	46
5)	Méthodes de diagnostic.....	47
A.	Diagnostic épidémioclinique.....	47
1.	Critères épidémiologiques	47
2.	Critères cliniques	47
3.	Modifications sanguines et biologiques.....	48
B.	Diagnostic biologique.....	49
1.	Méthodes de diagnostic direct	51
b.	Histopathologie +/- immunohistochimie	53
c.	Mise en culture.....	53
d.	Diagnostic par biologie moléculaire	55
e.	Le xénodagnostic	59
2.	Méthodes de diagnostic indirect	59
a.	Le diagnostic sérologique	59
i.	Principe	59
ii.	L'IFAT	61
iii.	L'ELISA.....	63
iv.	Les tests rapides d'immunochromatographie.....	64
v.	Le test d'agglutination directe (DAT).....	66
vi.	Le Western Blot	67
vii.	La cytométrie en flux	68
b.	Méthodes reposant sur la mise en évidence d'une immunité cellulaire.....	69

i.	Le test de Montenegro (in vitro)	69
ii.	Test de prolifération des lymphocytes	70
iii.	Détection de l'interféron- γ	70
3.	Bilan : avantages et inconvénients des méthodes de diagnostic	71
4.	Bilan sur la démarche diagnostique à adopter en fonction de la situation.....	72
6)	Gestion médicale	74
A.	Traitements spécifiques	75
1.	L'antimoniote de méglumine	75
2.	L'allopurinol	75
3.	La miltéfosine	76
4.	Autres traitements décrits dans la littérature	77
B.	Traitements associés	77
C.	Bilan sur la stratégie thérapeutique à adopter.....	78
D.	Suivi de la réponse thérapeutique.....	79
7)	Mesures préventives/de contrôle	80
A.	Mesures protectrices contre le vecteur	80
B.	Immunoprophylaxie	83
1.	Les immunomodulateurs	83
2.	La vaccination.....	84
a.	Canileish®	84
b.	Letifend®	85
i.	Généralités.....	85
ii.	Efficacité	85
iii.	Sûreté.....	86
c.	Éradication des chiens parasités	86
D.	Recommandations sur les mesures préventives à adopter.....	87
III.	Travail personnel	88
A.	Données de séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer Cévenol et	
interférences de la vaccination anti-<i>Leishmania</i> avec les tests sérologiques	88	
1)	Séroprévalence et dynamique de l'infection dans les Cévennes	88
2)	Interférence de la vaccination avec les tests sérologiques.....	90
1.	Interférence avec Canileish®	91
2.	Interférence avec Letifend®	92
3.	Intérêt du Western blot	92
B.	Travail expérimental de thèse.....	93
1)	Introduction au travail	93
2)	Matériel et méthodes	93
1.	Accord du comité d'éthique.....	93

2.	Zone d'étude	93
3.	Recrutement de la population canine étudiée	95
4.	Recueil d'informations	96
5.	Prélèvement des échantillons.....	96
6.	Techniques sérologiques utilisées.....	97
•	Technique ELISA Bordier® :	97
•	Technique Western Blot LDBIO® :.....	98
7.	Analyses statistiques	98
3)	Résultats	99
1.	Description analytique de la population canine étudiée et des lieux de vie	99
2.	Séroprévalence globale en fonction de la méthode	103
3.	Suivi sur un an des 88 chiens par méthode ELISA	107
4.	Analyse des résultats du groupe « chiens vaccinés »	109
C.	Discussion.....	112
1)	Difficultés d'échantillonnage	112
2)	Effet « cluster »	112
3)	Évolution de la séroprévalence et de la prévalence de la maladie dans le foyer Cévenol.....	113
4)	Dynamique de l'infection chez les chiens suivis.....	116
5)	Apport de la technique Western Blot	117
D.	Conclusion	120
	<i>Bibliographie.....</i>	<i>122</i>
	<i>Annexes</i>	<i>131</i>

Table des annexes

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé signée par chaque propriétaire afin de s'assurer de leur volonté de participer à l'étude avec leurs chiens.	131
Annexe 2 : Questionnaire à destination des propriétaires afin d'obtenir des renseignements sur le lieu de vie des chiens et l'historique du chenil vis-à-vis de la leishmaniose canine.....	132
Annexe 3 : Questionnaire ayant été rempli pour chaque chien afin d'obtenir les informations pertinentes sur lui vis-à-vis de l'étude.	133
Annexe 4 : Description des lieux de vie des chiens de l'étude par chenil.	134
Annexe 5 : Poster présenté au congrès de l'European Veterinary Parasitology College, Paris (France), les 29 et 30 juin 2023	137

Table des figures

Figure 1 : Taxonomie du genre <i>Leishmania</i> . Source : Beugnet et al. (2021)	8
Figure 2 : Principales caractéristiques des deux formes sous lesquelles <i>L. infantum</i> peut être rencontré.	10
Figure 3 : Représentation schématique de la forme promastigote de <i>L. infantum</i>	11
Figure 4 : Représentation schématique de la forme amastigote de <i>L. infantum</i>	11
Figure 5 : Taxonomie simplifiée du phlébotome. Source : Akhoundi et al. (2016).	12
Figure 6 : Photographie d'un phlébotome. Source : https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html	13
Figure 7 : Photographie d'un potentiel lieu de repos pour les phlébotomes avec présence de murs de pierre à Saint-André-De-valborgne (30). Source : photographie originale.....	14
Figure 8 : Le cycle dixène de <i>L. infantum</i>	15
Figure 9 : Représentation schématique simplifiée des différentes formes de <i>L. infantum</i> et de leur localisation au sein du phlébotome. Source : Bates (2007)	17
Figure 10 : Cycle évolutif de <i>L. infantum</i> . Source : (Beugnet et al. 2021)	18
Figure 11 : Carte de la répartition de <i>P. perniciosus</i> en Europe basée sur 176 déclarations entre avril 2021 et février 2023.....	25
Figure 12 : Carte de la répartition de <i>P. arasi</i> en Europe basée sur 28 déclarations entre mars 2022 et février 2023.	25
Figure 13 : Distribution géographique approximative de la leishmaniose canine en Europe mise à jour le 12/10/2022. Source : https://www.esccap.org/guidelines-maps/	28
Figure 14 : Localisation de cas de leishmaniose canine recensés entre 1965 et 2007. Source : Chamailé et al. 2010	29
Figure 15 : Schéma simplifiée de la réponse immunitaire acquise mise en place suite à l'infection par <i>L. infantum</i> . Source : Solano-Gallego et al. (2011a).....	33
Figure 16 : Cachexie chez un chien atteint de leishmaniose. Source : Beugnet et al. (2021) .	38
Figure 17 : Signes cutanéomuqueux observables lors de leishmaniose canine : A) Alopecie péri-oculaire et blépharite, B) Lésion cutanéomuqueuse ulcérateuse nasale, C) Dermatite papuleuse, D) Lésions nodulaires ulcérateuses, E) Lésion érythémateuse et ulcérateuse, F) Onychogryphose.	39
Figure 18 : Uvéite antérieure avec œdème cornéen secondaire accompagnée d'une blépharite, d'une kératoconjunctivite et d'une méibomite. Source : Pena, Roura, Davidson (2000).....	40
Figure 19 : Blépharite ulcérateuse sévère avec exsudat purulent associée à une kératoconjunctivite.....	41

Figure 20 : Nodules cutanées multifocaux au niveau du canthus médial de l'œil, pouvant potentiellement constituer des chancres d'inoculations. Source : Pena, Roura, Davidson (2000).....	41
Figure 21 : Fonte des muscles masséters et crotaphytes chez un chien atteint de leishmaniose, avec dermatite alopécique exfoliative. Source : (Beugnet et al. 2021).....	42
Figure 22 : Signes cliniques évocateurs de leishmaniose canine les plus fréquemment observés.....	42
Figure 23 : Les principaux types de diagnostic de laboratoire disponibles pour la leishmaniose canine	50
Figure 24 : Formes amastigotes de <i>L. infantum</i> au sein d'un macrophage à partir d'une ponction de nœud lymphatique, après coloration au MGG. Observation au microscope optique x100 avec immersion.	52
Figure 25 : Formes promastigotes visibles sur un étalement sur lame d'une culture avec milieu NNN, observation au microscope optique x100 avec immersion. Source : Bourdoiseau, Chermette (2015)	54
Figure 26 : Démarche diagnostique recommandée pour un animal avec des signes cliniques et/ou anomalies clinico-pathologiques compatibles avec la leishmaniose canine.....	74
Figure 27 : Répartition et fréquence de <i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> et <i>S. minuta</i> en fonction de l'altitude et des étages de végétations dans le Languedoc. Source : Rioux et al., (1969)	89
Figure 28 : Photographie d'une zone géographique avec chênaie d'Yeuses (Saumane, 30125, 350 mètres d'altitude). La présence de chênes verts est ainsi notable. Source : photographie originale	90
Figure 29 : Carte représentant la situation géographique du foyer Cévenol (en rouge) en France.....	94
Figure 30 : Carte représentant les lieux d'échantillonnages avec en bleu les localités de l'hiver 2021-2022 et en vert celles de l'hiver 2022-2023 Source : Google Maps :(https://www.google.com/maps/@43.7916003,3.3577384,10z/data=!4m2!10m1!1e1 , consulté le 16/04/2023	95
Figure 31 : prise de sang effectuée à la veine céphalique chez l'un des chiens inclus dans l'étude. Source : photographie originale.....	97
Figure 32 : Effectifs par grand type de signes cliniques rencontrés dans l'étude.....	101
Figure 33 : Photographies de lésions cutanées de type ulcératives sur deux chiens de l'étude compatibles avec la leishmaniose canine. Source : photographies originales	101
Figure 34 : Effectifs par type de lieu de couchage des chiens de l'étude.	103
Figure 35 : Distribution des index ELISA par chenil.	104
Figure 36 : Résultats de tests réalisés en western-blot. Source : photographie originale	105
Figure 37 : Titres sérologiques en ELISA des chiens avec un résultat « 1 bande » en Western Blot (n=28).....	106
Figure 38 : Évolution du statut sérologique en ELISA des chiens suivis entre l'hiver 2021/2022 et l'hiver 2022/2023 (n=88).....	108
Figure 39 : Évolution des titres sérologiques en ELISA des chiens prélevés en 2021/2022 et en 2023 également	109
Figure 40 : Titres sérologiques en ELISA 2023 des chiens à jour de leur vaccination avec Letifend® (n=29). Les points rouges correspondent aux trois chiens avec un diagnostic de leishmaniose déjà établi.....	110
Figure 41 : Effectif selon le nombre de bandes révélées par Western Blot, parmi la population canine étudiée à jour de la vaccination avec Letifend® (n=29)	110

Table des tableaux

Tableau 1 : Principales espèces de leishmanies présentes dans l’Ancien et le Nouveau monde.	9
Tableau 2 : Principales sources du parasite pour différentes espèces de leishmanies. Source : Bates (2007).....	21
Tableau 3 : Distribution géographique des espèces de leishmanies et de phlébotomes avec rôle vectoriel dans le monde. Source : Solano-Gallego et al. (2009).....	23
Tableau 4 : 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. N.D = Non déterminé. Source : Solano-Gallego et al. (2009).....	27
Tableau 5 : Principales caractéristiques immunologiques rapportées dans la littérature chez un profil résistant et sensible. Source : García-Castro et al. (2022)	36
Tableau 6 : Classification clinique basée sur l’examen clinique, les analyses biologiques et le titre sérologique de l’animal. Source Solano-Gallego et al. (2011). RPCU : Rapport protéines/créatinine urinaires. IRIS : International Renal Interest Society (http://iris-kidney.com/guidelines/staging.html).	44
Tableau 7 : Diagnostic différentiel à considérer en cas de signes cutanés ou généraux évocateurs de leishmaniose. Source : Beugnet et al. (2021).....	48
Tableau 8 : Modifications clinico-pathologiques évocatrices de leishmaniose canine décelables par des analyses de routine. Source : Ettinger, Feldman, Côté (2017) et Solano-Gallego et al. (2011a).....	49
Tableau 9 : Sensibilité et spécificité de l’IFAT décrites dans la littérature	62
Tableau 10 : Sensibilité et spécificité de cinq tests d’immunochromatographie.....	65
Tableau 11: Avantages et inconvénients des principaux types de diagnostic de laboratoire. Source : Solano-Gallego et al. 2011a)	72
Tableau 12 : Principales indications des méthodes de diagnostic disponibles pour la leishmaniose canine. +++ : recommandé, ++ : recommandé mais avec précautions, + : possible avec précautions, - : non recommandé. Source : Organisation Mondiale de la Santé Animale.....	73
Tableau 13 Principaux protocoles de traitement contre la leishmaniose canine. Source : (Solano-Gallego et al. 2011a)	78
Tableau 14 : Paramètres à surveiller après l’établissement d’un diagnostic de leishmaniose canine, d’après (Solano-Gallego et al. 2011b). RPCU : Rapport protéines/créatinine urinaires	79
Tableau 15 : Comparaison des anti-parasitaires externes efficaces contre les phlébotomes disponibles sur le marché en France. Sources : Bourdoiseau, Chermette (2015) et Le Sueur-Almosni (2015).....	82
Tableau 16 : Avantages et inconvénients des deux formulations disponibles contre les phlébotomes.....	83
Tableau 17 : Effectifs par races représentées par les chiens de l’étude	100
Tableau 18 : Résultats en Western Blot en fonction du titre sérologique en ELISA.....	106
Tableau 19 : Performances du test ELISA par rapport au Western Blot (technique prise pour référence).	107
Tableau 20 : Performances des tests ELISA et Western Blot en l’absence de test sérologique de référence.	107
Tableau 21 : Comparaison des pourcentages de chiens séropositifs pour l’ensemble de la population canine, les chiens non vaccinés et les chiens vaccinés en ELISA et Western Blot en 2023.....	111

I. Généralités sur le parasite

1) Le parasite : *Leishmania infantum*

A. Taxinomie

Le parasite *Leishmania infantum* appartient au domaine des Eucaryotes et plus précisément au sous-règne des protozoaires (Bowman, Georgi 2014). La plupart des eucaryotes unicellulaires sont des organismes libres, mais certains comme *L. infantum* sont des parasites. Par définition, ces derniers vivent nécessairement aux dépens d'un autre être vivant. Plus précisément, *L. infantum* appartient à l'embranchement des Euglenozoa et à la classe des Kinetoplastea car il possède un flagelle locomoteur. Enfin, le parasite fait partie de l'ordre des Trypanosomatida et à la famille des Trypanosomatidae, qui est l'unique famille de cet ordre et qui contient également le genre *Trypanosoma*, en plus du genre *Leishmania* (Beugnet et al. 2021).

Règne	• Protista
Sous-règne	• Protozoa
Embranchement	• Euglenozoa
Classe	• Kinetoplastea
Ordre	• Trypanosomatida
Famille	• Trypanosomatidae
Genre	• <i>Leishmania</i>

Figure 1 : Taxinomie du genre *Leishmania*. Source : Beugnet et al. (2021)

Au sein du genre *Leishmania*, deux groupes peuvent être décrits : *Euleishmania*, avec les deux sous-genres *Leishmania* (présent dans l'Ancien et le Nouveau monde) et *Viannia* (Nouveau

monde uniquement) et Paraleishmania (Nouveau monde seulement). La différence entre les sous-genres reposerait sur la localisation préférentielle des leishmanies au sein du tube digestif du phlébotome, leur vecteur biologique. Par ailleurs, les parasites du groupe Euleishmania infectent les mammifères, alors que ceux du groupe Paraleishmania n’infectent que les reptiles (Akhoundi et al. 2016).

Les premiers cas d’infection humaine par des leishmanies remonteraient à 2500 ans avant JC, grâce au rapport de lésions cutanées évocatrices de leishmaniose cutanée. Notamment, des cas d’infection par *L. donovani* ont été mis en évidence environ 2000 ans avant JC en ancienne Egypte. C’est en 1901 que ces parasites sont identifiés comme apparentés à des trypanosomes et en 1903 que l’espèce *Leishmania donovani* est décrite pour la première fois. Cette dernière est alors rapidement attribuée à une maladie décrite chez l’humain comme le « Kala azar » indien. En 1908, une nouvelle espèce de leishmanie est isolée chez un enfant, ce qui est à l’origine de sa nomenclature : il s’agit de *Leishmania infantum*. A ce jour, environ cinquante-trois espèces de leishmanies sont décrites. Trente-et-une d’entre elles seraient pathogènes pour les mammifères (tableau 1). Environ vingt espèces de leishmanies seraient responsables de cas de leishmaniose humaine (Akhoundi et al. 2016). D’autres espèces non pathogènes pour l’Homme existent dans l’Ancien et le Nouveau monde, et infectent principalement les rongeurs. Les chiens sont la plupart du temps infectés par l’espèce *L. infantum*, mais peuvent aussi être atteints par d’autres espèces comme *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. tropica* ou encore *L. major* (Organisation mondiale de la santé animale).

Localisation Géographique	Ancien Monde	Nouveau Monde	
Espèces du genre <i>Leishmania</i>	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamenisis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i>	<i>L. venezuelensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. lindenvergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. mexicana</i>

Tableau 1 : Principales espèces de leishmanies présentes dans l’Ancien et le Nouveau monde.

Source : Bourdoiseau, Chermette (2015)

B. Morphologie et Biologie

Pour *L. infantum*, l'association avec un hôte est dite obligatoire, la parasite ne pouvant pas subsister sans ce dernier. *L. infantum* est un endoparasite et est donc présent dans les tissus de l'organisme de l'hôte. Il est dimorphe, c'est-à-dire qu'il peut se trouver sous deux formes biologiques différentes selon s'il est présent chez l'hôte vertébré ou son vecteur. Chez le phlébotome, *L. infantum* est sous sa forme dite promastigote et est capable de se déplacer grâce à son flagelle locomoteur. Chez son hôte, il s'agit de la forme amastigote qui est au contraire immobile mais intracellulaire (figure 2) (Beugnet et al. 2021).

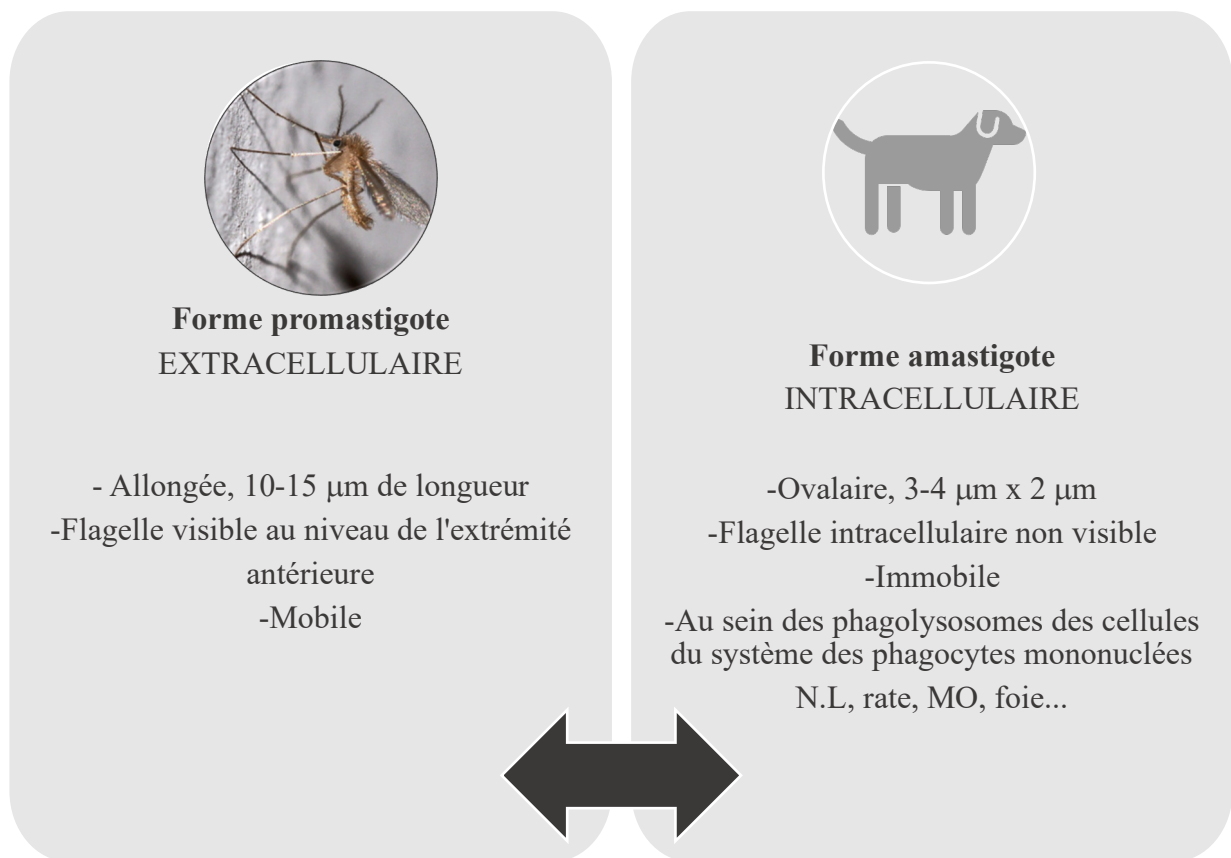


Figure 2 : Principales caractéristiques des deux formes sous lesquelles *L. infantum* peut être rencontré.

Source : Beugnet et al. (2021)

La forme promastigote est principalement retrouvée dans le tube digestif du phlébotome. C'est également celle qui peut être observée *in vitro* lors de la réalisation d'une culture. Elle est allongée et mesure entre 10 et 15 μm de longueur. Le kinétoplaste est une portion différenciée de

la mitochondrie qui contient une grande quantité d'ADN. Il se situe en position antérieure du promastigote, entre la sortie du flagelle et le noyau (figure 3).

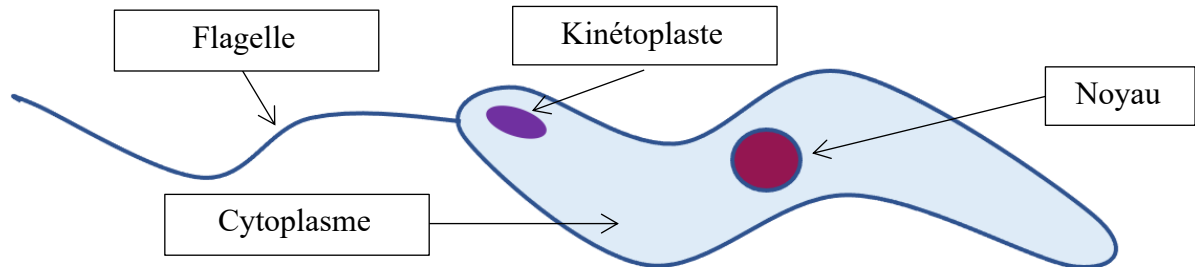


Figure 3 : Représentation schématique de la forme promastigote de *L. infantum*.

Les formes amastigotes, au contraire, sont intracellulaires et présentes au sein des phagolysosomes des cellules du système des phagocytes mononucléés de l'hôte : macrophages, monocytes, cellules dendritiques et parfois neutrophiles (figure 4).

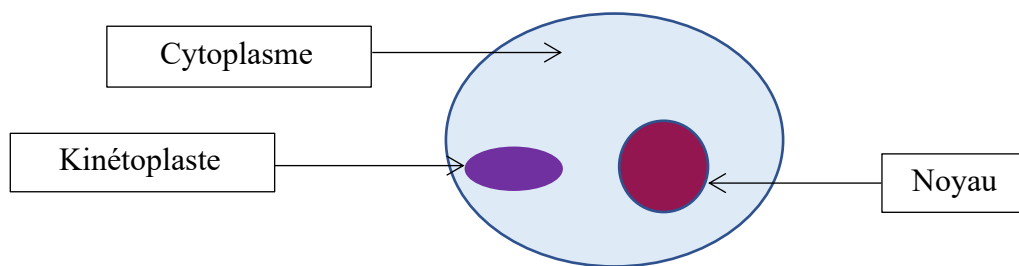


Figure 4 : Représentation schématique de la forme amastigote de *L. infantum*.

2) Le vecteur biologique : le phlébotome

A. Taxinomie

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes et à l'ordre des Diptères. Enfin, ils font partis du sous-ordre des Nématocères et de la famille des Psychochidés (figure 5) (Akhoundi et al. 2016).

Environ 900 espèces de phlébotomes sont actuellement décrites et réparties en six genres différents. Plus précisément, le genre *Phlebotomus*, uniquement présent dans l’Ancien monde, comprend treize sous-genres. Le genre *Lutzomya* au contraire est seulement retrouvé dans le Nouveau monde. Seuls ces deux genres sont d’importance médicale et sont des vecteurs biologiques de leishmanies (Bates 2007). Le rôle de vecteur biologique de leishmanies a été démontré pour 31 espèces appartenant au genre *Phlebotomus* et pour 47 du genre *Lutzomya* ((WHO)). Les espèces de phlébotomes vecteurs de *Leishmania infantum* dans le Sud de l’Europe et donc autour du bassin méditerranéen sont diverses : *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* principalement mais également *P. perfiliewi*, *P. eglectus*, *P. tobbi* et *P. langerosi* (<https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>).

Règne	• Animalia
Embranchement	• Arthropoda
Classe	• Insecta
Ordre	• Diptera
Famille	• Psychodidae

Figure 5 : Taxonomie simplifiée du phlébotome. Source : Akhoundi et al. (2016).

B. Morphologie

Les phlébotomes sont morphologiquement apparentés à tous les diptères nématocères : ils ont une seule paire d’ailes, leurs corps est fin et grêle, les antennes possèdent plus de six articles et enfin seules les femelles sont hématophages (figure 6). Ils ont un aspect de moucheron et leurs antennes restent relativement courtes. Ils sont de petite taille -leur longueur n’excédant généralement pas 3 mm- de couleur jaunâtre voire rougeâtre, avec des yeux noirs. Leur thorax est bossu et particulièrement velu et leurs ailes sont dressées en forme de « V » au repos. Les antennes et les trois paires de pattes sont longues. Les femelles possèdent un appareil buccal court de type piqueur avec des pièces courtes et abrasives.



Figure 6 : Photographie d'un phlébotome. Source : <https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>

La larve est terrestre, possède un corps vermiforme et est dépourvu de pattes. Enfin, elle ne possède pas d'antennes et sa tête est bien distincte du reste du corps avec une couleur noire (<https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>).

C. Cycle évolutif

La durée de vie des adultes varie de deux semaines à deux mois. Seuls les phlébotomes femelles sont hématophages : le repas sanguin étant nécessaire à la maturation et à la ponte des œufs après accouplement avec le mâle. Le développement de l'œuf à l'adulte dure généralement quatre à six semaines en conditions optimales, en passant par quatre stades larvaires et le stade pupal : il s'agit d'une métamorphose complète. La femelle pond entre 40 et 60 œufs dans des fissures ou terriers dans lesquels la température y est modérée, l'obscurité présente et l'humidité très élevée. Ces derniers éclosent au bout d'une à deux semaines. La larve se nourrit de matière organique et met deux semaines pour devenir une pupa. Enfin, les pupes se trouvent dans des fissures ou trous au niveau des murs et deviennent des phlébotomes adultes en une semaine (Bowman, Georgi 2014). Une diapause hivernale des œufs ou des larves (au stade 4 notamment) est décrite pour certaines espèces de phlébotome (<https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>).

D. Mode de vie

Les phlébotomes sont actifs au crépuscule et en début de soirée principalement : de 22 heures à minuit en général. La présence de vent et de pluie inhibe leur vol. Leur capacité de dispersion est faible et généralement limitée à un rayon de quatre kilomètres maximum, mais est plutôt de l'ordre de 100-200 m autour de leurs gîtes larvaires. La journée, les phlébotomes sont principalement retrouvés dans des environnements où la température est modérée avec environ 20°C et l'humidité relative élevée en avoisinant les 80%. Ils restent donc cachés dans des fissures, des granges ou encore dans des trous notamment présents au niveau de murs en pierre avant de sortir à la nuit tombée pour réaliser son repas sanguin (figure 7). *Phlebotomus arasi* serait principalement rencontré pendant l'été dans des zones plutôt rurales et donc à l'extérieur des habitations. *Phlebotomus perniciosus* a une activité plus intense au printemps et à l'automne. Il est présent sur tout le pourtour méditerranéen et vit proche des habitations donc dans des zones rurales à péri-urbaines (Bourdoiseau, Chermette 2015).



Figure 7 : Photographie d'un potentiel lieu de repos pour les phlébotomes avec présence de murs de pierre à Saint-André-De-valborgne (30). Source : photographie originale

E. Rôle pathogène

Les phlébotomes ont un rôle pathogène direct mineur : la piqûre peut se manifester par une petite papule pouvant mettre jusqu'à deux à trois mois pour disparaître. Cette dernière peut être relativement douloureuse. Une réaction d'hypersensibilité immédiate ou retardée peut survenir, tout comme la présence de prurit. Une surinfection bactérienne secondaire est également possible. Leur rôle pathogène indirect correspond principalement à la transmission de leishmanies aux mammifères. Cependant, ils pourraient également transmettre à l'Homme des virus, comme un Phlebovirus responsable de la fièvre des trois jours ou une bactérie nommée *Bartonella bacilliformis*- présente essentiellement en Amérique du Sud (<https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>).

3) Cycle parasitaire de *L. infantum*

Le cycle des leishmanies est dixène, c'est-à-dire qu'il fait successivement intervenir un hôte définitif jouant également le rôle de vecteur biologique et un hôte intermédiaire (figure 8). Ce dernier est nécessairement un mammifère et de nombreuses espèces peuvent ainsi jouer ce rôle. Il peut s'agir de l'Homme, d'un canidé domestique ou sauvage (renard notamment en France), de félins avec le chat, de chevaux, de lagomorphes (lièvres, lapins) ou encore de rongeurs (rat, souris, hamster) (Beugnet et al. 2021).

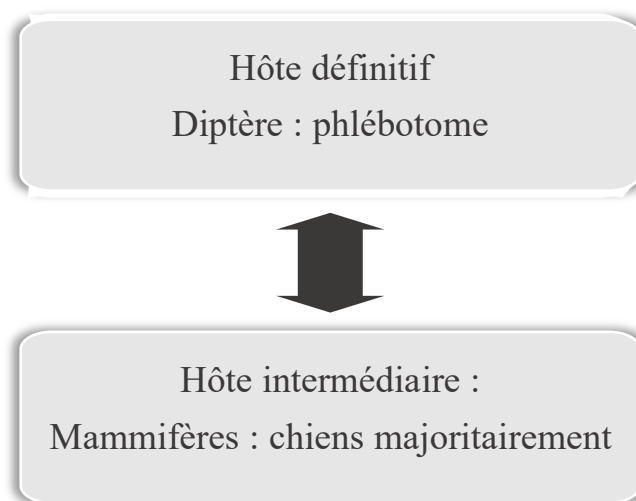


Figure 8 : Le cycle dixène de *L. infantum*.

A. Cycle évolutif dans le phlébotome

Lors du repas sanguin réalisé sur un mammifère infecté, les phlébotomes femelles ingèrent des leishmanies présentes sous la forme amastigote dans les phagolysosomes des macrophages. La piqûre au niveau du derme entraîne la création d'un petit « lac » hémolympatique provenant des capillaires superficiels. Les dommages tissulaires provoquent dès lors l'arrivée de macrophages sur le site (Bates 2007). La forme amastigote de *L. infantum* est d'abord présente dans l'intestin moyen du phlébotome et met 15 à 20 jours pour devenir un promastigote infectant (Beugnet et al. 2021). Sa survie au sein du tube digestif est conditionnée par des changements morphologiques et fonctionnels lui conférant une résistance aux enzymes digestives qui s'y trouvent et aux modifications de température et de pH (Kamhawi 2006).

Les amastigotes deviennent ainsi des promastigotes dits procycliques, capables de se déplacer avec un flagelle en position antérieure. Ces derniers ne seraient que faiblement mobiles mais dotés d'un pouvoir de multiplication élevé (forme répllicative). Après quelques jours, le nombre de réplifications diminue et les promastigotes procycliques deviennent des promastigotes nectonomades fortement mobiles (forme migratoire). Ils peuvent dès lors migrer vers la partie antérieure du tube digestif grâce à une remontée dans l'œsophage jusqu'à atteindre la valve stomodéale du phlébotome. La répllication se poursuit toujours pour donner naissance à des formes leptonomades capables de produire un gel sécrétoire. Une transformation en une forme dite haptomonade est aussi possible, cette dernière étant capable de s'attacher à la valve de l'insecte.

Enfin, les leptomonades deviennent des promastigotes métacycliques infectants (figure 9). Lors du repas sanguin réalisé sur un mammifère, le phlébotome femelle peut transmettre la maladie en déposant ces formes au niveau du site de la piqûre. Au cours de celle-ci, le gel précédemment produit mélangé à la salive du phlébotome sont aussi sécrétés. Ces deux éléments joueraient un rôle dans la transmission du parasite à l'hôte intermédiaire en facilitant cette dernière (Bates 2007).

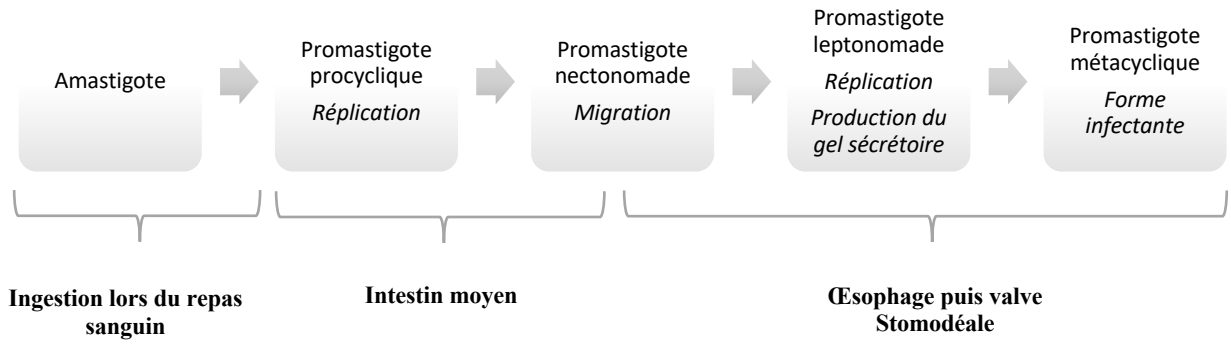


Figure 9 : Représentation schématique simplifiée des différentes formes de *L. infantum* et de leur localisation au sein du phlébotome. Source : Bates (2007)

B. Cycle évolutif dans l'hôte intermédiaire

Rapidement après leur dépôt sur un mammifère, les formes promastigotes sont phagocytées par des cellules du système des phagocytes monoclées. Contenues dans des phagolysosomes, elles deviennent donc intracellulaires pour se transformer en amastigotes incapables de se déplacer. Le flagelle est totalement intracellulaire et n'est donc pas visible au microscope optique. Pour *L. infantum*, il s'agit une fois de plus d'un environnement hostile avec un pH acide voisin de 5 et ont un contenu riche en enzymes. La survie des amastigotes à la phagocytose et au stress oxydatif subi est permise grâce à leur membrane qui maintient un pH intracellulaire proche de la neutralité. Ils peuvent alors commencer leur multiplication qui s'effectue par division binaire longitudinale (Beugnet et al. 2021). Le cycle évolutif au sein de l'hôte intermédiaire est représenté en figure 10 ci-contre.

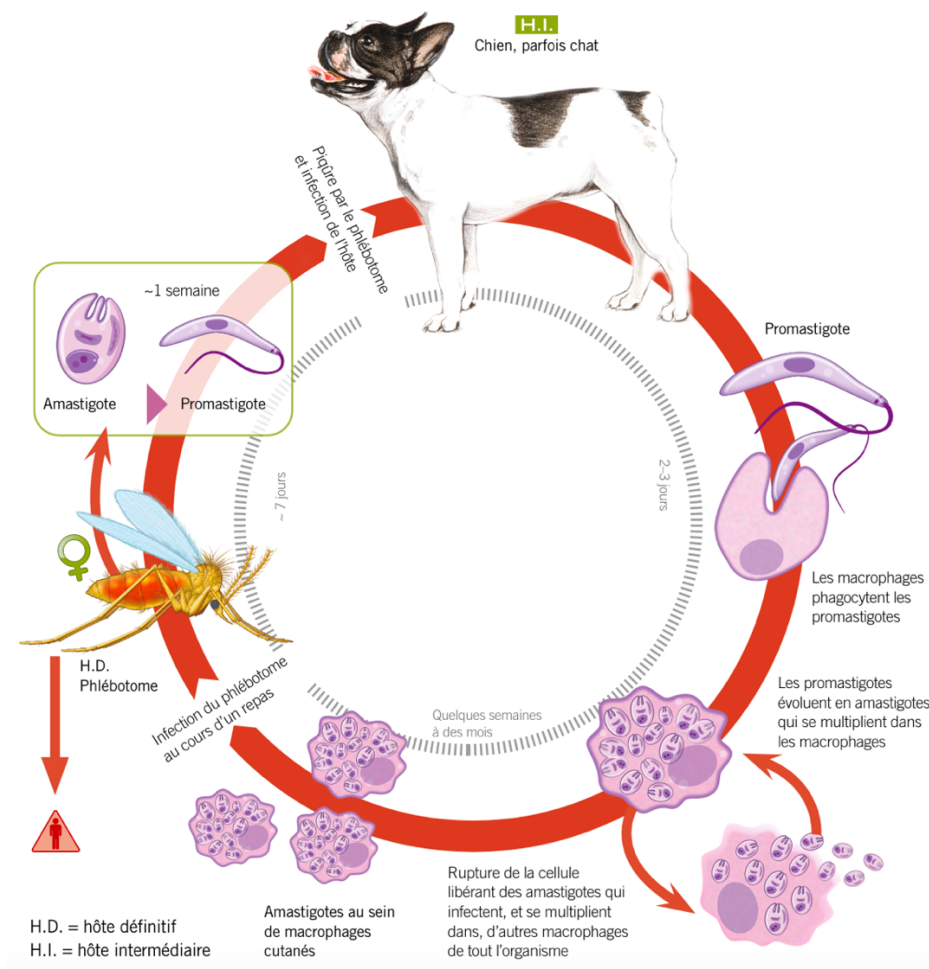


Figure 10 : Cycle évolutif de *L. infantum*. Source : (Beugnet et al. 2021)

4) Épidémiologie

A. Sources du parasite

Le R_0 , également appelé nombre de reproduction de base est défini comme le nombre moyen de nouveaux cas d'une maladie issus d'un seul cas infecté. Il permet d'évaluer l'effort nécessaire à fournir pour éradiquer la maladie. Il peut être évalué via des données de prévalence ou d'incidence en tenant compte de l'espérance de vie moyenne de la population étudiée. Cependant, ces dernières sont variables dans la littérature, selon les zones géographiques étudiées mais aussi la méthode de diagnostic employée pour détecter une éventuelle infection. Il est possible de classer les hôtes intermédiaires en réservoir primaire, secondaire ou accidentel selon le R_0 de la maladie au sein de la population du réservoir en question. Un réservoir dit primaire est capable de maintenir un R_0 supérieur à 1, c'est-à-dire qu'il peut offrir des conditions épidémiologiques favorables à la persistance du parasite en l'absence d'autres hôtes. Les réservoirs secondaires ne permettent pas la survie du parasite à eux seuls donc sans la présence d'hôtes primaires. Enfin, les hôtes accidentels peuvent être infectés mais jouent un faible rôle dans la transmission du parasite. La différenciation entre ces trois catégories pour une population et une maladie donnée peut cependant s'avérer difficile. En effet, la vraie détermination d'un réservoir primaire nécessite de prouver que le parasite peut persister en l'absence de tout autre hôte dans la population étudiée et que les méthodes de contrôle appliquées sur cette dernière sont efficaces dans l'interruption de la transmission de la maladie. Toutefois, les trois données suivantes peuvent permettre d'estimer si une population donnée joue un rôle important ou non dans la transmission de la maladie :

- La prévalence de l'infection au sein de cette population ;

- Les caractéristiques temporelles de la transmission de la maladie à cette population :

Un des critères pouvant qualifier un bon réservoir pourrait être la chronicité de l'infection et serait la preuve de l'établissement d'une association durable entre le parasite et l'hôte (affection asymptomatique). Cependant cet état pourrait aussi être associé à une plus faible charge parasitaire chez ces hôtes et à un niveau de transmission potentiellement moindre.

- La capacité de l'hôte infecté à transmettre le parasite au vecteur :

Cette dernière peut être estimée grâce à des études de xénodiagnostic. Il existe peu de résultats concernant les canidés sauvages mais des données existent pour les canidés domestiques. Il semblerait qu'une grande proportion de chiens malades soit capables de transmettre la maladie, et ce d'autant plus quand le chien est cliniquement sévèrement atteint (Quinnell, Courtenay 2009). Selon l'étude de (Gizzarelli et al. 2021), plus le taux en anticorps sériques est élevé chez un chien infecté, plus la charge en promastigotes prélevés sur ce chien lors du repas sanguin du phlébotome est élevée. Mais le rôle des chiens asymptomatiques dans la transmission de la maladie n'est pas à négliger. Cependant certains chiens qualifiés d'asymptomatiques sont potentiellement présymptomatiques dans le cadre d'une infection progressive : il est donc possible que le rôle des chiens véritablement et durablement asymptomatiques dans la transmission de la maladie soit surestimé. Par ailleurs, tous les chiens infectés ne sont pas nécessairement contagieux : il serait utile de pouvoir détecter ceux qui le sont grâce à une méthode pouvant être employée à l'échelle d'une population autre que le xénodiagnostic. Puisqu'une réponse immunitaire inadéquate serait corrélable à la sévérité clinique de la maladie, un test immunologique pourrait atteindre cet objectif mais aucun n'a fait ses preuves dans ce contexte. La détection de la charge parasitaire notamment par diagnostic moléculaire avec la PCR quantitative (Polymerase Chain Reaction) au sein du derme pourrait être utile à l'avenir (Quinnell, Courtenay 2009).

Selon ce raisonnement, les chiens sont de bons candidats pour transmettre le parasite : la prévalence dans la population canine est élevée et l'infection est chronique. Les chiens infectés sont pour la plupart asymptomatiques. En parallèle, les cas de leishmaniose viscérale humaine sont plus nombreux dans les environnements où se trouvent de nombreux canidés domestiques infectés. Il s'agit là d'un cycle de transmission qualifié de péri-domestique (Quinnell, Courtenay 2009). L'existence d'un cycle sylvatique ne peut donc être prouvée qu'en présence d'une transmission avérée du parasite en l'absence de tout chien dans la zone géographique, ce qui n'est pas réalisable à ce jour en raison d'un grand nombre de canidés domestiques présents dans le monde. Cependant, des études concernant une potentielle différenciation du génotype des souches retrouvées entre les canidés et les mammifères sauvages pourrait peut-être permettre de prouver l'existence de ce cycle (Quinnell, Courtenay 2009). Pour résumer, le chien « *Canis lupus familiaris* » est à l'heure actuelle considéré comme le principal réservoir du parasite, notamment dans les zones urbaines à péri-urbaines et joue un rôle clé dans la transmission de leishmanies à l'homme *via* les piqûres de phlébotomes. Dans les zones plus rurales, le rôle des renards et des lagomorphes n'est cependant pas à négliger. Chez le chat, l'infection est rare : il

ne semble pas avoir de véritable rôle épidémiologique. Les cas de leishmaniose humaine concernent essentiellement des personnes immunodéprimées ou des enfants. L'Homme n'est donc pas considéré comme source importante du parasite pour les phlébotomes, c'est pourquoi il est qualifié de « cul-de-sac » épidémiologique (Beugnet et al. 2021). Le tableau 2 recense les principales sources du parasite pour plusieurs espèces de leishmanies.

Espèces de <i>Leishmania</i>	Type de cycle de transmission	Réservoir animal
<i>L. infantum</i> (en Europe)	Péridomestique et zoonotique	Canidés domestiques
<i>L. major</i>	Rural et zoonotique	Gerbilles, rats
<i>L. tropica</i>	Urbain et anthroponotique	Hommes, damans
<i>L. aethiopica</i>	Rural et zoonotique	Damans
<i>L. donovani</i>	Anthroponotique	Hommes
<i>L. mexicana, L. amazonensis, L. braziliensis</i>	Sylvatique et zoonotique	Rongeurs
<i>L. peruviana</i>	Zoonotique	Inconnu (chiens ?)
<i>L. guyanensis, L. panamensis</i>	Sylvatique et zoonotique	Paresseux

Tableau 2 : Principales sources du parasite pour différentes espèces de leishmanies. Source : Bates (2007)

B. Modalités de transmission de *L. infantum* au chien

1. Transmission vectorielle

Par définition, un vecteur est un être vivant capable de transmettre un agent infectieux à un autre être vivant. Il s'agit généralement d'un arthropode, le plus souvent hématophage, qui peut transmettre l'agent notamment par piqûre. Parmi les vecteurs, on distingue les vecteurs mécaniques et les vecteurs biologiques. Dans le cadre de la transmission de leishmanies, les phlébotomes jouent le rôle de vecteur biologique c'est-à-dire que le parasite est capable de se multiplier au sein de celui-ci comme vu précédemment (Verwoerd 2015). Dans les conditions naturelles, le seul arthropode vecteur responsable de la transmission de la leishmaniose humaine et animale est le phlébotome (Bourdoiseau, Chermette 2015). D'après Giraud et al. (2019), les

inocula de phlébotomes infectés ne seraient pas tous équivalents en termes de capacité d'infection. Dans cette étude, il semblerait que les phlébotomes avec une charge parasitaire faible à intermédiaire auraient tendance à transmettre une plus faible dose d'*inocula* mais contenant cependant plus de formes de promastigotes infectants.

2. Autres modalités de transmission

L'existence de modalités de transmission non vectorielles a été démontrée dans la littérature : vénérienne, transplacentaire, par transfusion sanguine ou encore par morsure. En effet, des cas de transmission autochtone ont été rapportés dans le Nord de l'Europe dans des zones *a priori* dépourvues de vecteurs. Ce type de données oriente donc vers la potentielle existence d'autres modalités de transmission. En parallèle, la présence du parasite chez le chien a été mise en évidence dans le derme, la circulation périphérique mais aussi dans les voies génitales, le tissu conjonctival et dans des fluides divers (salive, semence). Concernant la voie transplacentaire, des cas ont été décrits pour des chiens en conditions expérimentales mais aussi chez l'Homme. Une transmission vénérienne n'est pas non plus à ce jour exclue, tout comme la transmission iatrogène via une transfusion sanguine. Cependant, ces trois modalités de transmission ne permettraient pas le maintien d'une endémicité de la maladie en l'absence de phlébotomes. Ces voies de transmission anecdotiques jouent probablement un rôle mineur, notamment dans les zones endémiques avec une forte densité de phlébotomes. Leur existence est difficile à prouver, d'autant plus que cela nécessite des études dans des zones géographiques dépourvues de phlébotomes (Quinnell, Courtenay 2009).

C. Répartition géographique et temporelle du vecteur

1. Dans le monde

La répartition de la leishmaniose se superpose à la répartition des phlébotomes puisqu'il n'y a pas de foyers pérennes de leishmaniose sans présence du vecteur, comme vu précédemment (Quinnell, Courtenay 2009). Ainsi ce sont les phlébotomes femelles des genres *Phlebotomus* et *Lutzomia* qui constituent les principaux vecteurs de leishmanies dans le monde. Les phlébotomes peuvent être considérés comme des espèces thermophiles qui nécessitent des températures moyennes à élevées pour survivre avec au moins 15,6°C pour plusieurs mois dans

l'année. La température est donc un facteur essentiel pour le développement et le déroulement du cycle de vie de l'insecte. Par ailleurs, une humidité relative élevée, une absence de vent et de pluies trop intenses sont des éléments favorables à l'installation de phlébotomes dans un biotope donné. Par conséquent, les phlébotomes sont principalement retrouvés dans des pays tropicaux ou tempérés durant les mois les plus chauds de l'année (Koch et al. 2017). Le tableau 3 évoque la répartition géographique des principales espèces de leishmanies dans le monde ainsi que des espèces de phlébotomes vectrices associées.

Espèces de <i>Leishmania</i>	Espèces de phlébotomes avec un rôle vectoriel avéré	Espèces de phlébotomes avec un rôle vectoriel suspecté	Localisation géographique
<i>L. infantum</i> (Ancien Monde)	- <i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobbi</i> - <i>P. kandelakii</i> - <i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	- <i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , <i>etc.</i> - <i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>etc.</i> - <i>P. smirnovi</i> , <i>P. transcaucasicus</i> , <i>P. Longiductus</i>	-Bassin Méditerranéen, Moyen-orient -Asie du Sud, Iran, Arménie, Afghanistan -Asie Centrale, Chine
<i>L. infantum</i> (Nouveau Monde)	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lu. evansi</i> , <i>Lu. olmeca olmeca</i>	<i>Lu. antunesi</i> , <i>Lu. shannoni</i>	Amérique Centrale et du sud
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. spinicrassa</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. umbratilis</i>	<i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. pessoai</i> , <i>etc.</i>	Amérique Centrale et du sud
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>	Afrique du Nord
<i>L. donovani</i>	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>	Afrique de l'Est
<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i> , <i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>Lu. noguchii</i> , <i>Lu. pescei</i>	Andes péruviennes
<i>L. panamensis</i>	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , <i>etc.</i>	Amérique Centrale

Tableau 3 : Distribution géographique des espèces de leishmanies et de phlébotomes avec rôle vectoriel dans le monde. Source : Solano-Gallego et al. (2009)

2. En Europe

Actuellement, huit espèces de phlébotomes du genre *Phlebotomus* sont considérées comme vecteurs de leishmanies en Europe : *P. alexandri*, *P. ariasi*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfi-
liewi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* et *P. tobbi*. Pour deux autres espèces, le rôle vectoriel est fortement suspecté mais non prouvé (*P. mascittii* et *P. similis*). En Europe, les phlébotomes sont principalement retrouvés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, Italie, Portugal, Grèce et Croatie où la température, notamment à la belle saison, y est élevée. Ainsi ils y sont principalement actifs pendant les mois les plus chauds de l'année : la période de transmission est donc saisonnière et s'étend généralement de mai à octobre. Il semblerait que certaines espèces comme *P. perniciosus*, *P. ariasi* et *P. mascittii* soient plus résistantes au froid. En effet, elles ont été retrouvées en Europe Centrale, dans le Nord de la France, en Suisse, Autriche, Belgique ou encore Allemagne (Koch et al. 2017). Une étude de modélisation réalisée en 2017, indique que les espèces *P. alexandri*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfi-
liewi* et *P. tobbi* pourraient être installées de façon pérenne dans les pays du Nord de l'Europe au cours des 30 prochaines années. Au contraire, les espèces *P. ariasi* et *P. mascittii* devraient voir leur population décliner. Si ces prévisions se révèlent justes dans le futur, le risque de transmission de leishmanies et donc la prévalence de la leishmaniose canine devraient augmenter en Europe du Nord.

Le Centre Européen pour la prévention et le contrôle des maladies recense régulièrement les espèces de phlébotomes déclarés en Europe selon leur localisation dans le cadre du projet VectorNet (figures 11 et 12). Cela permet une mise à jour annuelle des cartes de répartitions géographiques des phlébotomes en Europe.

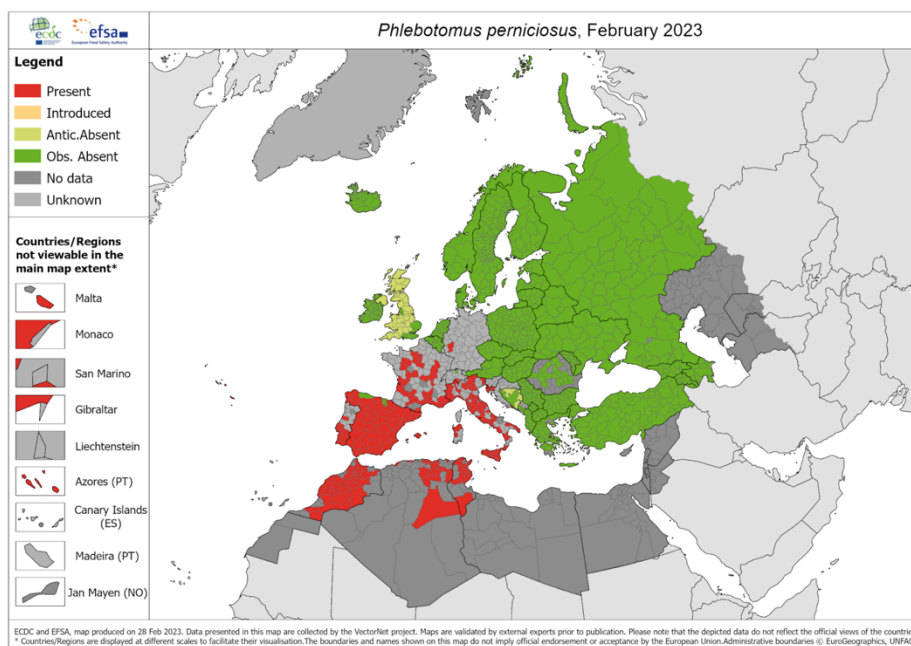


Figure 11 : Carte de la répartition de *P. perniciosus* en Europe basée sur 176 déclarations entre avril 2021 et février 2023.

Source : <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps>

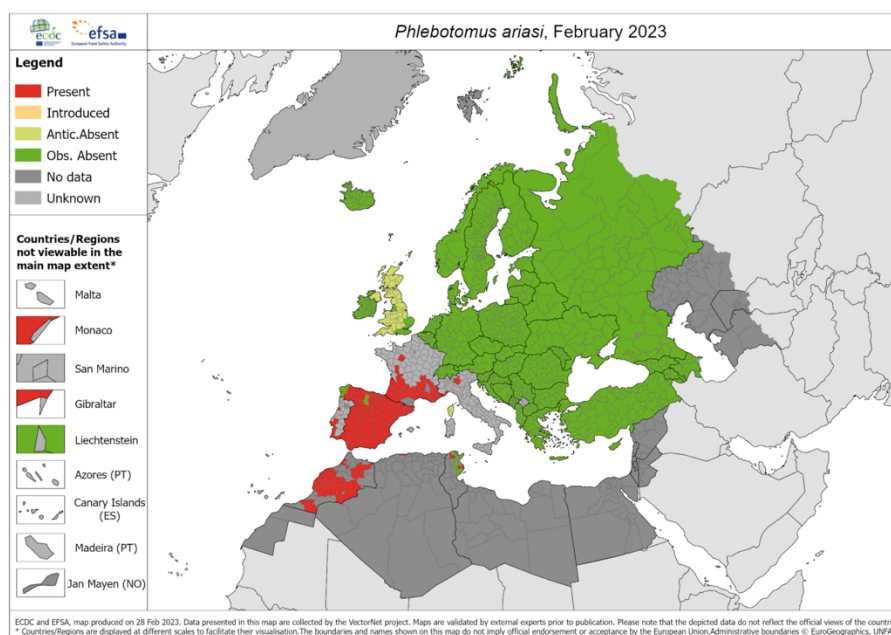


Figure 12 : Carte de la répartition de *P. ariasi* en Europe basée sur 28 déclarations entre mars 2022 et février 2023.

Source : <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps>

3. En France

En France, les principales espèces de phlébotomes responsables de la transmission de *L. infantum* sont *P. ariasi* et *P. perniciosus*. D'après (Dedet et al. 2013), *P. ariasi* serait plutôt retrouvé dans le Sud de la France, proche du bassin méditerranéen et lorsque la végétation correspond à une chênaie mixte. *P. perniciosus* aurait une répartition géographique plus vaste puisqu'il a été identifié en Haute-Marne, Seine-et-Marne et Val-d'Oise.

Une étude conduite à Céret (Pyrénées-Orientales) a permis de mettre en évidence une densité de *P. ariasi* significativement plus élevée que celle de *P. perniciosus*. A Vallespir (code postal), la répartition temporelle de *P. ariasi* s'est révélée être bimodale avec un premier pic en juillet et un second en automne. Au contraire, celle de *P. perniciosus* était unimodale avec un pic majoritaire en fin août-début septembre. D'après l'étude de Cotteaux-Lautard et al. (2016) menée sur 5 432 phlébotomes capturés à 24 km à l'Est de Marseille, 74% appartenaient à l'espèce *P. perniciosus*, 6% à *Sergentomyia minuta* et 1% à *P. ariasi*. Deux pics d'abondance ont pu être identifiés : l'un en début juin, l'autre en fin août avec une température moyenne entre 23,3 et 25,7°C. Selon Prudhomme et al. (2016), l'espèce de phlébotome majoritaire dans les Cévennes serait *P. ariasi*. Pour cette étude, un certain nombre de phlébotomes appartenant à cette espèce ont été capturés de Mai à Octobre 2011 entre les vallées de l'Hérault et de l'Arre. En parallèle, une analyse morphologique de ces derniers a été réalisée en plus de relevés sur les conditions environnementales des différents lieux de capture (climat, altitudes, pentes). Les résultats étaient en faveur d'une plasticité phénotypique en fonction de l'altitude, des pentes et des climats des stations, notamment durant les mois de juin et juillet. Cette étude démontre que la pression environnementale a donc un rôle majeur sur le cycle de vie du phlébotome et son installation pérenne dans une région.

D. Prévalence de la leishmaniose canine

1. Dans le monde et en Europe

D'après Otranto et Dantas-Torres (2013), la leishmaniose peut être rencontrée sur tous les continents hormis en Océanie. La leishmaniose canine serait endémique dans environ 50 pays d'Europe, d'Afrique, d'Asie, d'Amérique du Nord et du Sud. Le transport de chiens infectés depuis des zones endémiques vers des zones jusqu'ici indemnes a permis la propagation du

parasite. Dans les zones non-endémiques, les chiens infectés pourraient par ailleurs être responsables du maintien d'un réservoir du parasite dans la population canine via des voies de transmission non vectorielles bien que rares (Solano-Gallego et al. 2009). Selon (Beugnet et al. 2021), les zones d'enzootie de *L. infantum* sont le bassin méditerranéen, le Proche et le Moyen-Orient, l'Afrique subsaharienne, l'Asie Centrale et la Chine. En Amérique du Sud et centrale, cette espèce de leishmanie est également retrouvée sous le nom de *L. chagasi* qui est un synonyme de *L. infantum*. Solano-Gallego et al. (2009) ont recensé les prévalences de la leishmaniose et séroprévalences canines à travers le monde (tableau 4). Cependant, selon Baneth et al. (2008), ces données seraient à nuancer en fonction des tests utilisés diagnostiques (sérologie, biologie moléculaire), et la séroprévalence dans les zones endémiques serait probablement sous-estimée.

Pays	Nombre de chiens	Prévalence de la maladie	Séroprévalence	Prévalence de l'infestation (méthodes moléculaires)
Grèce (Athènes)	1638	Apparemment tous sains	22,4%	N.D
Grèce (Centre)	73		12,3%	65,8%
Grèce (Nord-Ouest)	1200		24,4	N.D
Israël (quelques zones)	122	8,2%	11,5%	N.D
Israël (Palestine)	148	N.D	6,8%	25% (pour n = 60)
Italie (nord-Ouest-	4456	N.D	26,4%	N.D
Portugal (nord)	294	3,1%	20,4%	N.D
Espagne (Majorque)	100	13%	26%	67%
Croatie	306	8,2%	15%	N.D
Chypre	301	>3,7%	10%	N.D
Turquie (Ouest)	490	1,1%	5,3%	N.D
Maroc (Nord)	1013	0,4%	8,6%	N.D
Tunisie (Sud et Centre)	250	Apparemment tous sains	6%	N.D
Brésil (Nord-Est)	1381	11%	24%	N.D

Tableau 4 : 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. N.D = Non déterminé.

Source : Solano-Gallego et al. (2009)

Les cas de leishmanioses canines seront probablement amenés à s'étendre vers les pays du nord de l'Europe, en suivant l'évolution de la répartition des vecteurs. Cette tendance est déjà notable à l'échelle des pays endémiques. Par exemple, le Nord de l'Italie était indemne de leishmaniose jusqu'au milieu des années 80. Cependant, on note une extension et une augmentation de la densité de *P. perniciosus* et *P. neglectus* vers le Nord de l'Italie continentale sur les 20 dernières années (Maroli et al. 2008). En parallèle, une augmentation des cas de leishmaniose canine et humaine a été observée dans les régions dites non-endémiques. Le site de l'ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) estime régulièrement la distribution de la leishmaniose canine en Europe. D'après leur dernière carte mise à jour (figure 13), seuls les pays du pourtour méditerranéen semblent endémiques à l'heure actuelle.

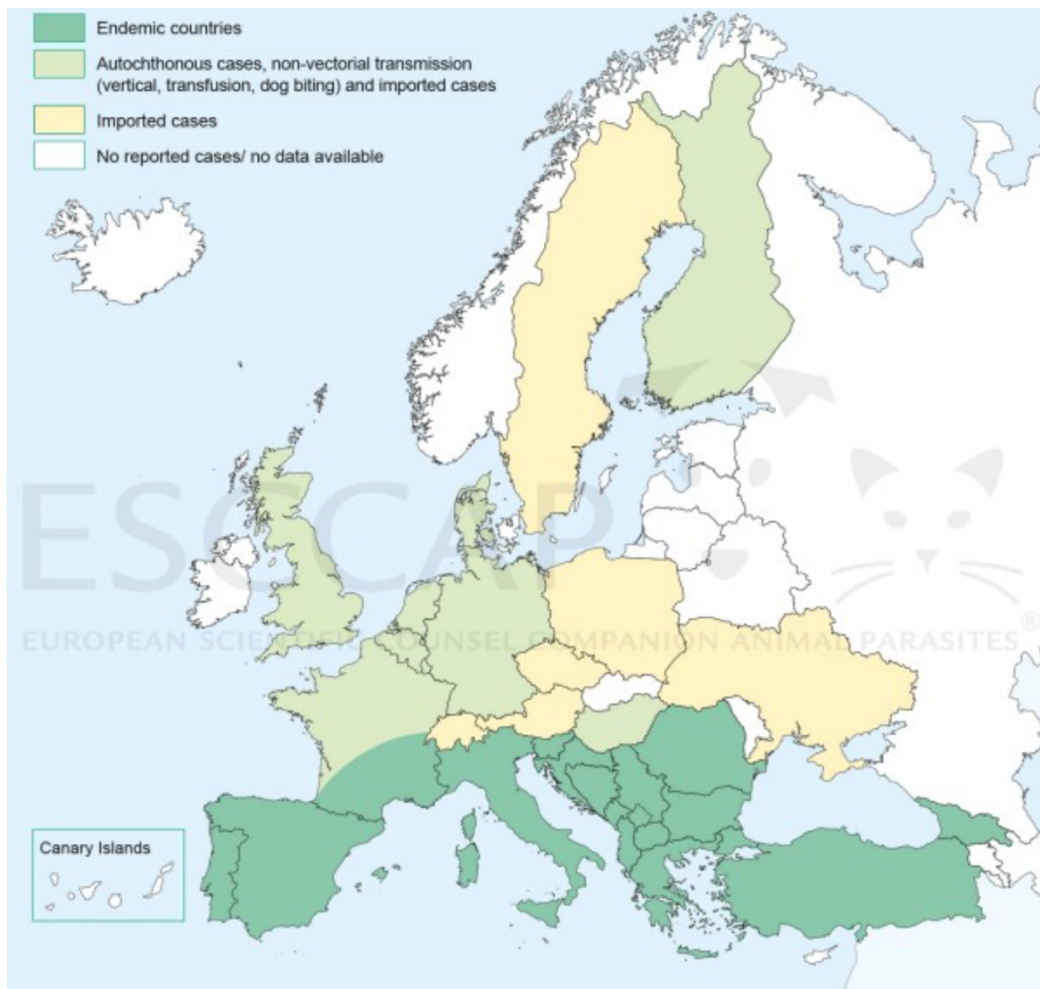


Figure 13 : Distribution géographique approximative de la leishmaniose canine en Europe mise à jour le 12/10/2022. Source : <https://www.esccap.org/guidelines-maps/>

2. En France

En France métropolitaine, les cas de leishmaniose canine sont pour la plupart regroupés dans les régions où le climat est de type méditerranéen : des Pyrénées-Orientales à la Côte d'Azur. Des foyers sont également présents dans les Cévennes, en Provence et en Corse (Dedet et al. 2013). D'après Dereure et al. (2009), la moyenne vallée de l'Ariège constituerait également un foyer ectopique. Dans des zones endémiques comme les Cévennes, les prévalences observées se situent entre 3 et 5,8% dans l'étage de la chênaie mixte et entre 3 et 28% dans les Alpes-Maritimes. Cependant, le nombre d'enquêtes épidémiologiques est relativement faible à l'échelle du territoire métropolitain (Dedet et al. 2013). Selon Chamaillé et al. (2010), il y aurait deux principaux foyers en France : le premier dans les Cévennes, avec des altitudes allant de 200 à 1000 m, des températures relativement faibles et une végétation plutôt dense. Il serait ainsi associé à la présence de *P. ariasi*. Le second foyer décrit est localisé au niveau des plaines de la côte Méditerranéenne, où les températures sont plus élevées avec une pluviométrie plus faible et une végétation moins importante. Le recensement de cas de leishmanioses canines entre 1965 et 2007 a permis l'établissement d'une carte démontrant l'importance de ces deux foyers (figure 14).

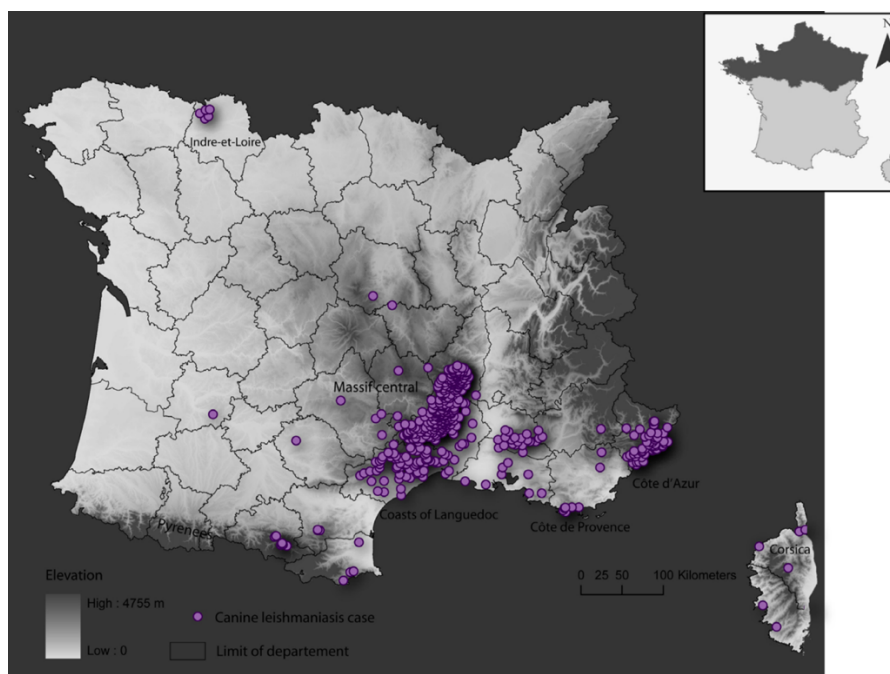


Figure 14 : Localisation de cas de leishmaniose canine recensés entre 1965 et 2007.

Source : Chamaillé et al. 2010

II. La leishmaniose canine

1) Importance de la maladie

A. Importance médicale chez le chien

La leishmaniose est une protozoose grave chez le chien. Bien que certains individus soient capables d'éliminer le parasite ou dans une moindre mesure d'être porteurs asymptomatiques, d'autres vont développer des signes cliniques plus ou moins graves pouvant mener à la mort de l'animal. Par ailleurs, il n'existe aucun traitement curatif à l'heure actuelle c'est-à-dire qu'aucune molécule ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le chien ne permet d'éliminer complètement le parasite (Beugnet et al. 2021)

B. Importance sanitaire chez l'Homme : une zoonose grave

En plus de son importance clinique chez le chien, la leishmaniose est surtout une zoonose qui fait partie des maladies tropicales négligées. L'Homme peut s'infecter par la piqûre de phlébotome et les canidés constituent un réservoir important du parasite. Une transmission transfusionnelle, vénérienne, congénitale ou par échanges de seringues entre toxicomanes reste possible mais très rare (Turchetti et al. 2014). Chez l'Homme, l'incidence annuelle varie 700 000 à 1 million de nouveaux cas par an avec plus de 100 pays endémiques dans le monde. De nombreuses espèces de leishmanies peuvent infecter l'Homme et être responsable de trois formes cliniques principales :

- La forme viscérale : aussi appelée Kala-azar, c'est la forme la plus grave avec un taux de mortalité de 95% en l'absence de traitement.
- La forme cutanée : c'est la plus fréquente et elle se caractérise le plus souvent par des ulcérations sur différentes parties du corps.
- La forme cutanéomuqueuse : une atteinte des muqueuses nasales ou buccales est ainsi rapportée.

Comme pour les chiens, l'infection par *Leishmania spp.* n'évolue pas toujours vers une maladie clinique. Les personnes immunodéprimées comme celles qui sont co-infectées par le Virus de

l'Immunodéficience Humaine ou encore les enfants sont plus à risques de développer une forme clinique grave. Des traitements relativement sûrs et efficaces, notamment pour la forme viscérale de la maladie, sont disponibles chez l'Homme. Cependant, l'accès à ces traitements n'est pas toujours aisé pour certaines populations soumises à des conditions socio-économiques difficiles comme l'indique l'Organisation Mondiale de la Santé : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

Concernant *L. infantum*, des formes cutanées, viscérales et cutanéomuqueuses peuvent survenir après infection chez l'Homme. Les pays les plus touchés sont la Chine, le Sud de l'Europe, le Brésil et l'Amérique du Sud. La forme viscérale se caractérise essentiellement par une fièvre persistante et une splénomégalie. Elle atteint principalement les enfants de moins de cinq ans et les personnes immunodéprimées. En l'absence de traitement, elle peut être fatale en deux ans. Entre 6200 et 12 000 nouveaux cas de leishmaniose viscérale à *L. infantum* seraient rapportés chaque année dans l'Ancien Monde, contre 4500 à 6800 dans le Nouveau. La forme cutanée comprend l'apparition de nodules isolés. Elle peut être auto-résolutive en un an et en conférant une immunité chez la personne atteinte. Elle touche plutôt les enfants et les jeunes adultes et son incidence n'est pas connue. Toutefois, cette forme est plutôt rencontrée en Amérique Centrale (Burza, Croft, Boelaert 2018).

En 2017, le Centre national de Références des leishmanioses a recensé 184 cas de leishmaniose humaine -toutes formes confondues- en France métropolitaine (<https://cnr-leish.edu.umontpellier.fr/declaration-de-cas/>). La forme viscérale est cependant prépondérante.

2) Pathogénie

Toute infection par un agent infectieux ou parasitaire provoque la mise en place d'une réponse immunitaire chez l'hôte. La pathogénie et l'évolution de cette infection sont la résultante d'interactions complexes entre la réponse immunitaire de l'hôte et celle des mécanismes mis en place par le parasite afin d'y échapper. La réponse immunitaire dite innée est la première mise en place. L'immunité adaptative, elle, ne survient que dans un second temps. Bien que mise en place un peu plus tardivement, elle est cependant plus spécifique que la réponse innée et c'est donc elle qui nous intéressera le plus ici.

A. Réponse immunitaire de l'hôte

1. La réponse immunitaire innée

Après inoculation du parasite via la piqûre du phlébotome, la réponse immunitaire innée est initiée par la phagocytose des formes promastigotes par les polynucléaires neutrophiles essentiellement. Cette étape permet d'une part la destruction d'un certain nombre de parasites grâce au stress oxydatif qu'ils provoquent et d'autre part au recrutement et à l'activation de macrophages sur le site de l'infection. Ce phénomène est permis grâce à la synthèse de cytokines TNF- α et IFN- γ et de chimiokines par les neutrophiles. Les macrophages se mettent ainsi à leur tour à participer à la phagocytose du parasite et sont les premières cellules hôtes pour ce dernier. La destruction du parasite est réalisée grâce à un « burst oxydatif » *via* la production d'oxyde nitrique principalement qui est dès lors libéré dans la vacuole parasitophore avec des hydrolases lysosomiales. Grâce à cette action, les macrophages produisent des IL12 qui stimulent la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire. Dès lors, les macrophages et neutrophiles se mettent à sécréter plus d'IFN- γ (Toepp, Petersen 2020).

2. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire acquise comporte principalement deux types de réponse. L'une est dite humorale et consiste en la production d'anticorps. Cette dernière est initiée via la synthèse de cytokines de type Th2 comme les interleukines IL10, IL13 et IL14 et le facteur TGF- β . Concernant la leishmaniose, cette réponse est précoce, intense mais peu protectrice contre le parasite. L'autre est cellulaire et principalement médiée par des lymphocytes T. Les cytokines produites sont de type Th1 avec l'interféron (IFN- γ), le facteur TNF- α et IL2. C'est elle qui jouerait un rôle clé dans le contrôle de l'infection (Beugnet et al. 2021). Lors de l'infection par *L. infantum*, c'est une réponse mixte à la fois humorale et cellulaire qui est généralement mise en place. Cette réponse peut être vue comme un équilibre pour laquelle une réponse cellulaire efficace conduirait au contrôle de la progression de la maladie alors qu'une réponse essentiellement humorale serait plutôt associée à une maladie clinique. Pour cette raison, il est courant de qualifier la leishmaniose de « maladie immunologique » (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Les lymphocytes Th17 ont ensuite un rôle pro-inflammatoires en sécrétant des IL17 qui favorisent le recrutement des neutrophiles et macrophages sur le site de

l'infection. Cependant, lorsque ce phénomène est exacerbé, ce phénomène peut être responsable de dommages tissulaires (Toepp, Petersen 2020). La figure 15 représente les deux principales réponses constituant la réponse immunitaire adaptative.

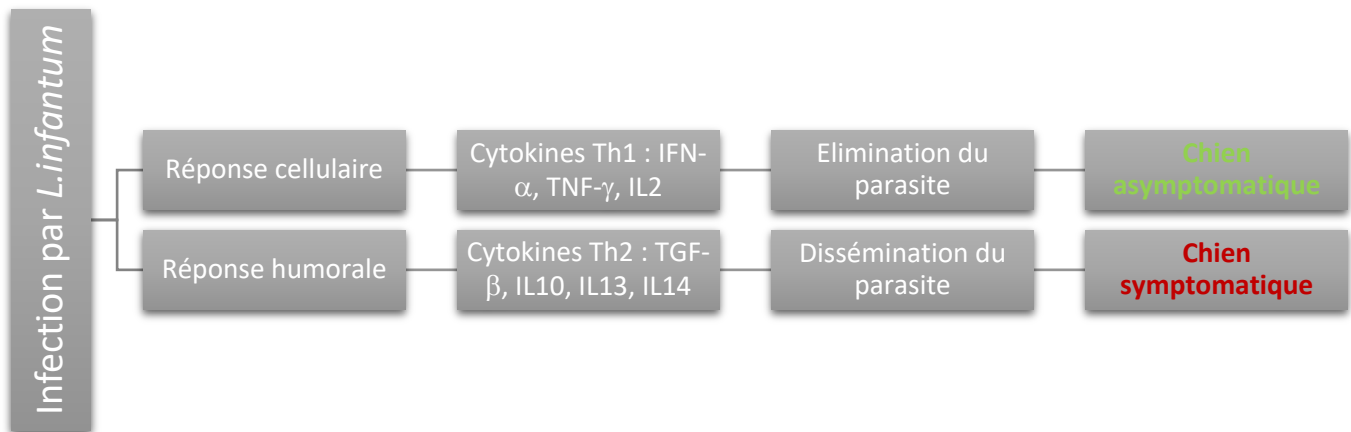


Figure 15 : Schéma simplifiée de la réponse immunitaire acquise mise en place suite à l'infection par *L. infantum*. Source : Solano-Gallego et al. (2011a)

a. La réponse immunitaire humorale

La réponse immunitaire humorale fait intervenir les lymphocytes B (LB). Au contraire des lymphocytes T (LT), les LB n'ont pas besoin d'autres cellules pour reconnaître le pathogène. Ainsi ce sont des antigènes dits natifs qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques du LB appelés B-Cell Receptor. Cette reconnaissance conduit à l'activation des LB et à leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène parasitaire appelés immunoglobulines. Les LT de la réponse cellulaire peuvent participer au phénomène en favorisant cette différenciation (LT fh). Les anticorps ainsi produits sont responsables du phénomène d'opsonisation ce qui entraîne une phagocytose accrue des cellules infectées par les macrophages. Ils jouent également un rôle dans la neutralisation des facteurs de virulence sécrétés par *L. infantum* (Toepp, Petersen 2020). Lors de leishmaniose sub-clinique, la production d'anticorps est généralement faible. Au contraire, une production de la maladie est généralement associée à une production plus accrue en immunoglobulines. Plusieurs classes sont produites avec des IgG principalement mais aussi des IgA et IgM (Rodríguez-Cortés et al. 2007).

Une réponse humorale exacerbée peut donc avoir des effets néfastes à cause de la formation d'un grand nombre de complexes immuns pouvant occasionner une glomérulonéphrite et des arthrites qui constituent donc des signes immunopathologiques. Cependant, ce sont les IgG sériques principalement qui sont la cible des méthodes de diagnostic sérologique. En plus de la production d'immunoglobulines, les cytokines Th2 produites avec notamment l'IL10 favorisent la prolifération du parasite en inhibant la phagocytose des macrophages et la prolifération des cellules de l'immunité cellulaire (Beugnet et al. 2021). Il semblerait que l'IL10 soit essentiellement produite par une population de lymphocytes B dits régulateurs (IdD^{hi}) (Toepp, Petersen 2020).

b. La réponse immunitaire cellulaire

En raison de la position obligatoirement intracellulaire du parasite après inoculation par le vecteur, la réponse immunitaire cellulaire est celle qui joue le rôle le plus important dans le contrôle de la maladie. Cette réponse débute par l'activation des lymphocytes T (LT). Les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques) migrent depuis le site d'inoculation jusque dans un organe lymphoïde secondaire (nœud lymphatique le plus proche) dans lequel elles exposent des fragments de parasites appelés antigènes aux LT via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De leur côté, les LT reconnaissant le fragment grâce à leur récepteur appelé TCR (T-Cell Receptor). Les LT CD4⁺ reconnaissent les antigènes présentés sur les CMH de classe II alors que les LT CD8⁺ s'associent aux CMH I. Grâce à cette présentation, le phénotype des LT évolue. Les LT CD8⁺ deviennent des lymphocytes dits cytotoxiques capables de provoquer l'apoptose des cellules infectées (macrophages essentiellement). Les LT CD4⁺ se différencient en LT helpers. Ces derniers ont plusieurs rôles généralement permis par la production de cytokines de type Th1 (IFN- α et TNF- γ essentiellement) :

- Stimulation de la différenciation des LB en plasmocytes (LTfh) via la production de cytokines ;
- Activation des LT cytotoxiques (LTh1) ;
- Régulation de la réponse immunitaire (LTreg).

Cependant, la réponse cellulaire a également besoin d'être régulée afin de limiter les dommages tissulaires qu'elle peut induire. Comme évoqué précédemment, l'IL10 produite par les LB régulateurs (IdD^{hi}) ont un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'action des LTCD4⁺ et LTDC8⁺. Les LTreg jouent aussi un rôle similaire en produisant des IL10.

c. Profil immunitaire du chien infecté : sensible versus résistant

Dans la littérature, de nombreuses études ont essayé de caractériser et comparer les profils immunologiques des chiens symptomatiques (profil sensible) et asymptomatiques (profil résistant). Les facteurs influençant la réponse immunitaire d'un chien infecté ne sont pas identifiés à ce jour. Toutefois, des facteurs génétiques sont suspectés puisque certaines races semblent plus à risque de développer une maladie clinique alors que d'autres seraient plus résistantes. Puisque la leishmaniose est une maladie immunologique, toute co-infection pourrait affecter la réponse immunitaire de l'hôte et donc favoriser la survenue de la maladie. Au début de l'infection et donc dans une phase sub-clinique, les lymphocytes cytotoxiques de la réponse cellulaire sont nombreux et permettent de contrôler la progression de la maladie. Si le système immunitaire perd sa capacité à maintenir la balance en faveur de la destruction du parasite, le chien peut dès lors commencer à présenter des signes cliniques. L'exposition prolongée aux antigènes du parasite conduit à une modification du profil des cytokines. Notamment, la production d'IL10 augmente, provoquant une diminution du nombre de LT et des cytokines Th1 produites par ces derniers (IFN- γ). Les LT CD4+ et CD8+ se mettent alors à exprimer un récepteur (PD-1) pour un ligand capable d'induire leur mort cellulaire programmée (PDL-1) et trouvé sur les cellules présentatrices d'antigènes. En parallèle, c'est la réponse humorale qui devient de plus en plus importante avec une production accrue d'IgG non spécifiques. Cette hypergammaglobulinémie provoque d'une part la surproduction d'IL10 par les macrophages et d'autre part l'apparition de complexes immuns par liaison aux antigènes du parasite et à une protéine du complément (C3) (Toepp, Petersen 2020). La persistance et la réplique intra-macrophagique du parasite permettent sa dissémination dans tous les organes du système des phagocytes mononucléés (rate, foie, nœuds lymphatiques, moelle osseuse) à l'origine d'une forme viscérale. Le tableau 5 décrit les principales caractéristiques immunologiques du chien infecté sensible et résistant.

Caractéristiques immunologiques	Profil résistant	Profil sensible
Population lymphocytaire	<ul style="list-style-type: none"> - LT et LB plus nombreux - Surexpression du CMH-II - Faible nombre de LT reg 	<ul style="list-style-type: none"> - LT et LB moins nombreux - LB régulateurs (IdD^{hi}) plus nombreux - LT reg nombreux
Activité leishmanicide des macrophages	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'oxyde nitrique accrue 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'oxyde nitrique diminuée
Profil des cytokines produites	<ul style="list-style-type: none"> - Faible production d'IL10 - Production accrue de IFN-γ, TNF-α, IL2, IL18 	<ul style="list-style-type: none"> - Production accrue d'IL10 - Diminution de IFN-γ, TNF-α, IL2, IL7
Profil des immunoglobulines produites	<ul style="list-style-type: none"> - Taux sérique global plus faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux sérique global plus élevé

Tableau 5 : Principales caractéristiques immunologiques rapportées dans la littérature chez un profil résistant et sensible. Source : García-Castro et al. (2022)

B. Échappement parasitaire à la réponse immunitaire de l'hôte

Outre les barrières immunologiques, tout agent infectieux ou parasitaire doit d'abord faire face aux barrières physiques de l'organisme qui sont les véritables premiers mécanismes de défense. Cependant, grâce à l'inoculation par le phlébotome, *L. infantum* n'a pas à franchir ces dernières.

1. Echappement à la réponse immunitaire innée

Après phagocytose par les neutrophiles qui sont les premières cellules intervenant dans l'immunité innée, *L. infantum* a développé plusieurs mécanismes pour échapper à la destruction par ces cellules. Parmi eux est rapportée une résistance au stress oxydatif engendré par la production de la NADPH oxydase. Un autre mécanisme est l'échappement aux pièges extracellulaires (neutrophil extracellular traps) en inhibant sa formation, en le digérant grâce à des endonucléases ou bien par résistance à sa toxicité grâce à l'expression de protéases. Ces mécanismes permettant la survie et la persistance des parasites au sein d'une vacuole parasitophore avant

d'être phagocytés par les macrophages, qui représentent leur cellule-hôte définitive (Regli et al. 2017). Par la suite, le parasite est également capable de contrer les effets du burst oxydatif engendré par les macrophages en produisant des antioxydants tels que la dismutase superoxyde (Toepp, Petersen 2020).

2. Échappement à la réponse immunitaire adaptative

Les principaux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire adaptative rapportés sont une stimulation d'une réponse humorale de type Th2 par stimulation des LT CD4⁺ de type LT fh. Le parasite pourrait aussi avoir un rôle dans la modification des cytokines produites par les macrophages en inhibant la synthèse d'IL12 par ces derniers ce qui a pour conséquence de diminuer la réponse immunitaire cellulaire. Un autre mécanisme peut être celui de la stimulation de la production de TGF- β qui est une cytokine anti-inflammatoire. Certaines espèces de leishmanies seraient également capables de recruter un plus grand nombre de LT reg ce qui constitue un moyen de plus pour orienter la réponse immunitaire adaptative vers une réponse humorale au détriment d'une réponse cellulaire (Mougneau, Bihl, Glaichenhaus 2011). Par ailleurs, au cours du passage de la forme promastigote à amastigote après la phagocytose, une variation des antigènes de surface et somatiques a lieu. Ce phénomène constitue une forme d'échappement à la reconnaissance du parasite par les cellules immunitaires (Beugnet et al. 2021).

3) La clinique chez le chien

D'un point de vue clinique, la leishmaniose canine est décrite comme une maladie protéiforme pouvant donc revêtir de nombreuses présentations atypiques.. Selon Beugnet et al. (2021), seulement 50% des chiens infectés seraient symptomatiques. Il s'agit d'une maladie chronique avec un temps d'incubation long mais variable. D'après Ettinger et al. (2017), il pourrait varier d'un mois à sept ans. Chez les chiens, il s'agit le plus souvent d'une leishmaniose « générale » appelée cutané-viscérale. En effet, *L. infantum* est viscérotrope et dermatrope et de nombreux tissus et organes contenant des macrophages sont généralement atteints. Il n'existe pas de signes cliniques pathognomoniques de la maladie. Par conséquent, un diagnostic uniquement clinique, bien que souvent évocateur, n'est pas envisageable.

A. Signes généraux

Les signes systémiques incluent le plus souvent un amaigrissement, une léthargie et une polyadénomégalie. Des troubles digestifs avec des vomissements et une diarrhée peuvent aussi être rapportés (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Dans l'étude de (Ciaramella et al. 1997) menée sur 150 chiens naturellement infectés par *L. infantum*, 56,7% d'entre eux ont développé une lymphadénopathie généralisée. Une pâleur des membranes et une splénomégalie ont été observés dans respectivement 58% et 53,3% des cas. Enfin, une perte de poids était notable pour 32% des chiens. En comparaison, une étude plus récente menée sur 96 chiens également naturellement infectés par *L. infantum* au Maroc a permis de mettre en évidence une lymphadénomégalie pour 81,2% d'entre eux, ainsi qu'une perte de poids et une diminution de l'appétit pour respectivement 59,3% et 43,7% des chiens (Idrissi et al. 2021).



Figure 16 : Cachexie chez un chien atteint de leishmaniose. Source : Beugnet et al. (2021)

B. Signes cutané-muqueux

Le premier type de lésion observable peut être un « chancre d'inoculation » : il s'agit de la lésion cutanée due à la piqûre du phlébotome, correspondant au lieu de phagocytose des leishmanies par les macrophages dermiques. Généralement située sur le chanfrein ou le pavillon de l'oreille externe, elle peut être ulcérate et mettre des mois à disparaître. Cependant, elle passe souvent inaperçue par les propriétaires (<https://www.esccap.fr/maladies-vecto-rielles/leishmaniose.html>). Par la suite, des lésions cutanées sont observées chez plus de 80% des chiens. Une alopecie péri-oculaire et une dermatite exfoliative caractérisée par la présence de squames sur la tête et les membres sont les signes les plus fréquemment rencontrés (Ettinger, Feldman, Côté 2017). Dans l'étude de Idrissi et al. (2021), 65,5% des cas ont présenté des troubles dermatologiques avec notamment une dermatite exfoliative. Lors d'ulcérations, elles se trouvent préférentiellement sur le plantum nasal, les oreilles, les coussinets, les jonctions muco-cutanées et les proéminences osseuses (Solano-Gallego et al. 2011).



Figure 17: Signes cutané-muqueux observables lors de leishmaniose canine : A) Alopecie péri-oculaire et blépharite, B) Lésion cutané-muqueuse ulcérate nasale, C) Dermatite papuleuse, D) Lésions nodulaires ulcérate, E) Lésion érythémateuse et ulcérate, F) Onychogryphose.

Source : Solano-Gallego et al. (2011a)

C. Signes oculaires et péri-oculaires

La prévalence des lésions oculaires lors de leishmaniose canine est variable selon les études, allant de 16 à 71,1%. Par exemple dans l'étude d'Idrissi et al. (2021) réalisée au Maroc, 28% des chiens présentaient des lésions oculaires. L'étude de Pietro et al. (2016) estime que deux-tiers des chiens atteints de leishmaniose présentent des signes oculaires. D'après Garcia-Alonso et al. (1996), la présence d'immunoglobulines G dans l'humeur aqueuse des chiens infectés favoriserait leur dépôt dans les différents compartiments oculaires et pourrait être à l'origine des lésions observées. L'infiltration de cellules inflammatoires participerait également au phénomène. Dans l'étude de Pena et al. (2000), l'uvéite antérieure était le signe le plus fréquemment observé, suivi d'une blépharite et d'une kératoconjonctivite. Les lésions péri-oculaires rapportées étaient une dermatite sèche avec alopecie, des ulcérations cutanées et des formations nodulaires granulomateuses. Au contraire, l'étude de Pietro et al. (2016) menée sur 45 chiens de refuge zone endémique de leishmaniose a montré qu'une blépharite était le signe oculaire le plus rencontré (50%) alors qu'une uvéite antérieure n'a été observée que dans 9,37% des cas. Pour la plupart des chiens, les lésions oculaires étaient bilatérales et atteignaient préférentiellement le segment antérieur de l'œil. Cependant, pour les chiens de l'étude appartenant à des propriétaires, la prévalence des uvéites antérieures étaient nettement supérieures avec 37,5%.



Figure 18 : Uvéite antérieure avec œdème cornéen secondaire accompagnée d'une blépharite, d'une kératoconjonctivite et d'une meibomite. Source : Pena, Roura, Davidson (2000)

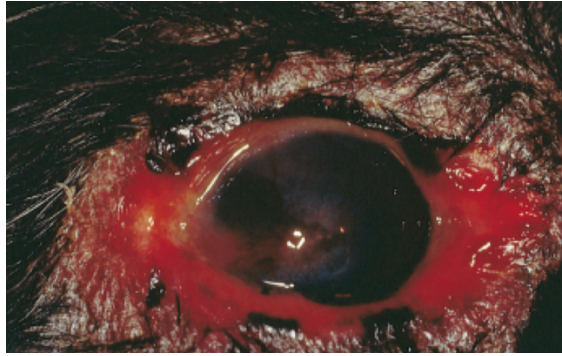


Figure 19 : Blépharite ulcéraire sévère avec exsudat purulent associée à une kératoconjonctivite.

Source : Pena, Roura, Davidson (2000)



Figure 20 : Nodules cutanées multifocaux au niveau du canthus médial de l'œil, pouvant potentiellement constituer des chancres d'inoculations. Source : Pena, Roura, Davidson (2000)

D. Autres signes cliniques

Le tableau clinique de la leishmaniose canine peut se complexifier avec la présence d'un ensemble d'autres signes divers et toujours non spécifiques. En effet, le dépôt de complexes immuns favorise la survenue d'une polyarthrite. Dans ce cas, une boiterie avec des articulations douloureuses et gonflées peuvent être observées. Toujours par ce même mécanisme, une glomérulonéphrite peut subvenir, engendrant possiblement une insuffisance rénale. La manifestation clinique la plus équivoque de cette dernière est une polyuro-polydipsie imputable à la perte de la capacité des reins à concentrer les urines (Idrissi et al. 2021). D'autres types de lésions comme une vasculite, une myosite atrophique des muscles masticateurs ou encore des signes comme de l'épistaxis sont également rapportés (Solano-Gallego et al. 2011). Enfin, des

infections subcliniques peuvent être associées à de l'infertilité et à une prostatite chronique (Ettinger, Feldman, Côté 2017).



Figure 21 : Fonte des muscles masséters et crotaphytes chez un chien atteint de leishmaniose, avec dermatite alopecique exfoliative. Source : (Beugnet et al. 2021)

E. Bilan sur les signes cliniques évocateurs

Signes généraux	Signes cutanés	Signes oculaires	Autres
<ul style="list-style-type: none"> • Amaigrissement, amyotrophie • Hyperthermie • Léthargie • Lymphadénopathie généralisée • Hépatosplénomégalie • Pâleur des muqueuses • Anorexie/hyporexie 	<ul style="list-style-type: none"> • Onychogryphose • Dépigmentations • Dermatite nodulaire, papuleuse ou pustuleuse • Lésions muco-cutanées ulcératives • Hyperkératose naso-plantaire • Dermatite exfoliative non prurigineuse 	<ul style="list-style-type: none"> • Alopecie péri-oculaire • Blépharite • Kérato-conjonctivite • Uvéite antérieure 	<ul style="list-style-type: none"> • Polyarthrite • Polyuri-polidipsie • Epistaxis • Hématurie • Vasculite • Atrophie des muscles masticateurs

Figure 22 : Signes cliniques évocateurs de leishmaniose canine les plus fréquemment observés.

Source : Solano-Gallego et al. (2011) et Ettinger, Feldman, Côté (2017)

F. Classification clinique

En 1988, Mancianti et al. ont établi une première classification reposant uniquement sur un examen clinique physique, sans prendre en compte d'éventuelles anomalies biologiques généralement évocatrices d'une ou plusieurs défaillance(s) organique(s). Cette dernière distingue les chiens asymptomatiques, les chiens oligosymptomatiques ayant un maximum de trois signes cliniques évocateurs (incluant un pelage terne, une alopecie localisée et une perte de poids) et les chiens fortement symptomatiques avec des signes cliniques plus nombreux et sévères tels qu'une onychogryphose, des lésions cutanées plus généralisées, un abattement... (García-Castro et al. 2022). Bien plus récemment, le groupe Leishvet (<https://www.leishvet.org/publications/canine-leishmaniosis-guidelines/>) a émis un ensemble de recommandations actualisées chaque année concernant la leishmaniose canine. Notamment, une classification de la maladie en quatre stades cliniques a été élaborée selon les signes cliniques observés sur l'animal, son statut sérologique (titre en anticorps déterminé par une méthode de diagnostic sérologique quantitatif) et la présence ou non d'anomalies biologiques mises en évidence par des analyses de laboratoire de routine (hématologie, biochimie, analyse d'urine) (tableau 6). Cette gradation permet au vétérinaire clinicien d'avoir une idée du pronostic de l'animal atteint mais aussi de la démarche thérapeutique à adopter. Le stade I correspond à une atteinte légère, le II à une atteinte modérée et le III à une atteinte plus grave. Enfin, le stade IV est associé à une progression très sévère de la maladie.

Stade clinique	Signes cliniques	Anomalies biochimiques et/ou hématologiques	Titre sérologique
I Atteinte légère	Signes peu graves comme une lymphadénopathie périphérique localisée ou une dermatite papuleuse	Pas d'anomalie et profil rénal normal : Créatininémie < 1,4 mg/dL, RPCU < 0,5	Négatif à faiblement positif
II Atteinte modérée	Lésions cutanées diffuses, onychogryphose, ulcérations, amaigrissement, perte d'appétit, lymphadénopathie généralisée	-Anémie non régénérative légère -Hypergammaglobulinémie -Hypoalbuminémie <i>Sous-stade :</i> -Profil rénal : (a) Normal (b) Protéïnurique : Créatininémie < 1,4 mg/dL, RPCU = 0,5-1	Faible à élevé
III Atteinte grave	Idem stade I + II avec signes dus au dépôt de complexes immuns : polyarthrite, glomérulonéphrite, uvéite	-Idem stade III <i>Sous-stade :</i> -Profil rénal : (a) IRIS MRC Stade 1 : RPCU > 1 (b) IRIS MRC Stade 2 : créatininémie = 1,4-2,8 mg/dL	Moyen à élevée
IV Atteinte très grave	Idem stade III avec signes très sévères : syndrome néphrotique, insuffisance rénale terminale, thromboembolie pulmonaire	-Idem stade II et III -Profil rénal : IRIS MRC Stade 3 (créatininémie = 2,9-5 mg/dL) ou 4 (créatininémie > 5 mg/dL) ou protéïnurie sévère (RPCU > 5)	Moyen à élevée

Tableau 6 : Classification clinique basée sur l'examen clinique, les analyses biologiques et le titre sérologique de l'animal. Source Solano-Gallego et al. (2011). RPCU : Rapport protéines/créatinine urinaires. IRIS : International Renal Interest Society (<http://iris-kidney.com/guidelines/staging.html>).

4) Facteurs de prédisposition

A. La race et le pelage

L'influence de la race est à ce jour discutable. Pour certains auteurs, il n'y aurait pas de prédisposition raciale concernant la leishmaniose canine (Beugnet et al. 2021 ; Xhekaj et al. 2023). D'après Álvarez, Marín-García, Llobat (2022), le lévrier d'Ibiza serait plus à risque d'être infecté par le parasite. Toutefois, il semblerait que cette race soit moins sujette à des formes cliniques sévères après infection. Pour Burnham et al. (2020), ce phénomène pourrait s'expliquer par une plus forte exposition aux piqûres de phlébotomes pouvant être à l'origine d'une réponse immunitaire humorale dirigée contre la salive de ces derniers et donc d'une forme d'immunocompétence. Dans certaines études, le Boxer, le Berger Allemand, le Cocker

et le Rottweiler pourraient aussi être plus susceptibles à la maladie ; Miranda et al. (2008). Les Beagles le seraient aussi également avec une plus forte prédisposition aux formes cliniques sévères (Bourdoiseau, Chermette 2015 ; Velez et al. 2019). D'après l'étude de Quilez et al. (2012), l'implication d'une composante génétique et donc raciale est indéniable et conditionnerait la progression de la maladie ou non dans certaines races. Pour différents auteurs (Cabré et al. 2021 ; Idrissi et al. 2021, Beugnet et al. 2021 et Rombolà et al. 2021), les chiens de pure race seraient plus à risque d'être infectés alors que d'autres études comme celle de Velez et al. (2019) rapportent un risque plus élevé pour les chiens n'appartenant pas à une race définie. Le fait d'être un chien de grande race (> 25 kg) pourrait être un facteur de protection contre l'infection (Rombolà et al. 2021). Cependant, cette information pourrait aussi s'expliquer par la plus courte durée de vie de ces chiens, qui traversent ainsi un nombre plus faible de saisons de transmission.

La longueur des poils ne semble pas non plus être un facteur de risque (Beugnet et al. 2021). En effet, les phlébotomes piquent préférentiellement le chien sur des zones glabres soit dépourvues de poils telles que la truffe, ou les pavillons auriculaires. Par conséquent, un pelage long ne constituerait pas une barrière de protection. Cependant, ce facteur semble controversé (Rombolà et al. 2021).

B. Le sexe

L'influence du sexe ne semble pas non plus faire consensus. Dans certaines études, les mâles seraient plus prédisposés à l'infection par le parasite (Miranda et al. 2008 ; Cabré et al. 2021 ; Idrissi et al. 2021 ; Rombolà et al. 2021), tandis que dans d'autre, notamment une menée sur 1803 chiens vivant aux alentours de Madrid en Espagne, semble démontrer le contraire. D'après celle de (Miró et al. 2007) menée sur 1803 chiens vivant autour de Madrid en Espagne, le sexe ne serait pas un facteur de prédisposition.

C. L'âge

Dans la littérature, les données s'accordent pour dire que la prévalence de la leishmaniose dans la population canine augmente avec l'âge. Cependant, c'est aussi le risque d'exposition au parasite qui croît avec ce paramètre (Beugnet et al. 2021). Selon l'étude de Rombolà et al.

(2021), le risque de séropositivité serait significativement plus élevé après deux ans d'âge. D'après Miranda et al. (2008), l'âge des chiens infectés aurait une répartition bimodale avec donc deux pics de prévalence plus élevée : le premier entre deux et quatre ans et le second vers sept ans ou plus. Selon l'étude de Cabré et al. (2021), les chiens adultes à âgés présenteraient des signes cliniques plus sévères après infection. Au contraire, les jeunes chiens auraient moins de signes systémiques imputables à la maladie mais seraient plus prédisposés à des signes dermatologiques.

D. Le mode et le lieu de vie de l'animal

Le temps passé en extérieur par l'animal augmente le risque d'être infecté. C'est notamment le cas des chiens de chasse, de berger ou de garde qui vivent généralement à l'extérieur. Les chiens de chasse notamment seraient deux fois plus à risque d'être séropositifs que les chiens de compagnie. Cependant, les mesures préventives disponibles à ce jour (antiparasitaires externes, vaccination) sont généralement moins utilisées sur ce type de chien, ce qui pourrait surestimer le rôle du temps passé en extérieur. Par ailleurs, le fait de vivre avec d'autres chiens pourrait également être un facteur de risque pour l'animal. Un lieu de vie ou un séjour -même bref- situés dans une zone endémique de leishmaniose canine constitue bien évidemment un facteur de risque (Rombolà et al. 2021).

E. L'état de santé de l'animal

Un mauvais état général de l'animal et notamment un état de dénutrition pourrait être un facteur de prédisposition (Beugnet et al. 2021). Comme vu précédemment, la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle considérable dans l'établissement et la progression éventuelle de la maladie, tout état dysimmunitaire serait ainsi susceptible de prédisposer l'animal à cette dernière. D'après l'étude de Apostolidis et al. (2023), une séropositivité à *Neospora caninum* ou à *Babesia canis* serait un facteur de risque pour le passage d'une forme subclinique à clinique de leishmaniose. Selon Baxarias et al. (2018), la prévalence des co-infections avec d'autres pathogènes vectorisés est plus élevée chez les chiens symptomatiques de leishmaniose (*Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Bartonella henselae*). Lorsqu'une co-infection est avérée, les signes cliniques de la leishmaniose seraient plus sévères.

5) Méthodes de diagnostic

A. Diagnostic épidémioclinique

1. Critères épidémiologiques

Des éléments épidémiologiques peuvent permettre de faciliter le diagnostic de leishmaniose chez un chien comme notamment un lieu de résidence ou de séjour, même bref, dans une zone géographique endémique de leishmaniose lors d'une période où la transmission est favorable (Bourdoiseau et Chermette 2015). Le relevé de l'ensemble des données concernant le signalement de l'animal est donc essentiel, avec notamment :

- La race de l'animal ;
- L'âge ;
- Le mode de vie : extérieur strict ou intérieur et extérieur ;
- Lieu de couchage la nuit en été ;
- L'utilisation de mesures préventives : antiparasitaires externes efficaces contre les phlébotomes et vaccination notamment ;
- La présence de vecteurs ou de cas de leishmaniose dans l'environnement de l'animal.
-

2. Critères cliniques

Le diagnostic clinique est difficile, car comme vu précédemment, la leishmaniose est une maladie pour laquelle de nombreux signes cliniques non spécifiques peuvent être associés. Ainsi le diagnostic différentiel doit être établi selon les signes observés. La plupart du temps, il s'agit de signes cliniques cutanés (présents chez plus de 80% des chiens avec une forme viscérale) et généraux non spécifiques, notamment avec un amaigrissement et une lymphadénopathie généralisée (Ettinger, Feldman, Côté 2017) (tableau 7).

Signes cliniques	Diagnostic différentiel
Signes cutanés	Pyodermite, dermatophytose, démodécie, dermatoses auto-immunes (pemphigus foliacé notamment)
Signes généraux	Carences alimentaires, malassimilation, processus néoplasiques, ehrlichiose monocytaire canine, lupus érythémateux systémique

Tableau 7 : Diagnostic différentiel à considérer en cas de signes cutanés ou généraux évocateurs de leishmaniose. Source : Beugnet et al. (2021)

3. Modifications sanguines et biologiques

Généralement, la leishmaniose s'exprime par un grand nombre de modifications hématologiques et biochimiques. L'hyperprotéïnémie est fréquente et généralement marquée : 70% des chiens malades auraient une concentration sérique en protéines totales supérieure ou égale à 80 g/L. Une hyperglobulinémie est aussi souvent présente, à l'origine d'une inversion du rapport albumine/globulines qui devient alors inférieur à 1. Enfin, les marqueurs rénaux sont souvent augmentés et évocateurs d'une dysfonction rénale (Ettinger, Feldman, Côté 2017).

Type d'analyse	Modifications biologiques possibles
Hémogramme	Anémie modérée peu régénérative ou arégénérative Leucocytose avec neutrophilie, monocytose et lymphopénie (formule de stress) ou leucopénie dans les formes plus avancées Thrombocytopénie
Profil biochimique	Hyperprotéïnémie, hyperglobulinémie, diminution du rapport Albumine/Globulines, hypoalbuminémie, hyperurémie, hypercréatinémie Augmentation des marqueurs de cholestase et cytolysé hépatique (PAL, ALAT) Hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie Hyperfibrinogénémie avec prolongation des temps de coagulation
Analyse d'urine	Diminution de la densité urinaire (urines possiblement isosthénuriques) Protéinurie avec Rapport protéines/créatinine urinaires élevé
Électrophorèse des protéines sériques	Hypoalbuminémie, hypergammaglobulinémie : gammopathie polyclonale avec pic large en β - δ (et pic en α 2 possible)
Dosage protéines de la phase aigue	Augmentation de la Protéine C-réactive (CRP)

Tableau 8 : Modifications clinico-pathologiques évocatrices de leishmaniose canine décelables par des analyses de routine. Source : Ettinger, Feldman, Côté (2017) et Solano-Gallego et al. (2011a)

B. Diagnostic biologique

Il existe différentes méthodes de laboratoire permettant de diagnostiquer la leishmaniose chez un chien. Toutes ne présentent pas une sensibilité et spécificité équivalentes selon la situation. Ces dernières peuvent par ailleurs être combinées chez un même animal pour augmenter ces deux caractéristiques essentielles d'un test diagnostique.

La valeur intrinsèque d'un test est ainsi définie par sa sensibilité et sa spécificité. La sensibilité est la capacité d'un test à identifier des sujets réellement infectés, alors que la spécificité est celle qui conditionne sa capacité à fournir une réponse négative pour un sujet réellement non infecté. Plus précisément, la sensibilité est le nombre de résultats vrai-positifs divisé par le nombre total de résultats positifs. A l'inverse, la spécificité est le nombre de vrai-négatifs divisé par le nombre total de résultats négatifs. Une sensibilité élevée est nécessaire pour éviter les faux négatifs qui pourraient sous-estimer la prévalence de la leishmaniose et donc contribuer à la maintenance d'un réservoir dans la population canine. C'est cette dernière qui conditionne

notamment la détection ou non des animaux infectés mais non malades dits « porteurs asymptomatiques ». Une spécificité élevée permet de diminuer le nombre de faux positifs qui peuvent conduire dans certaines situations à l'euthanasie d'animaux non infectés.

Enfin, il faut également prendre en compte le coût de réalisation de ces tests, leur facilité de mise en œuvre et leur rapidité. Par ailleurs certains d'entre eux permettent, en plus de l'établissement d'un diagnostic, le suivi thérapeutique de l'animal infecté.

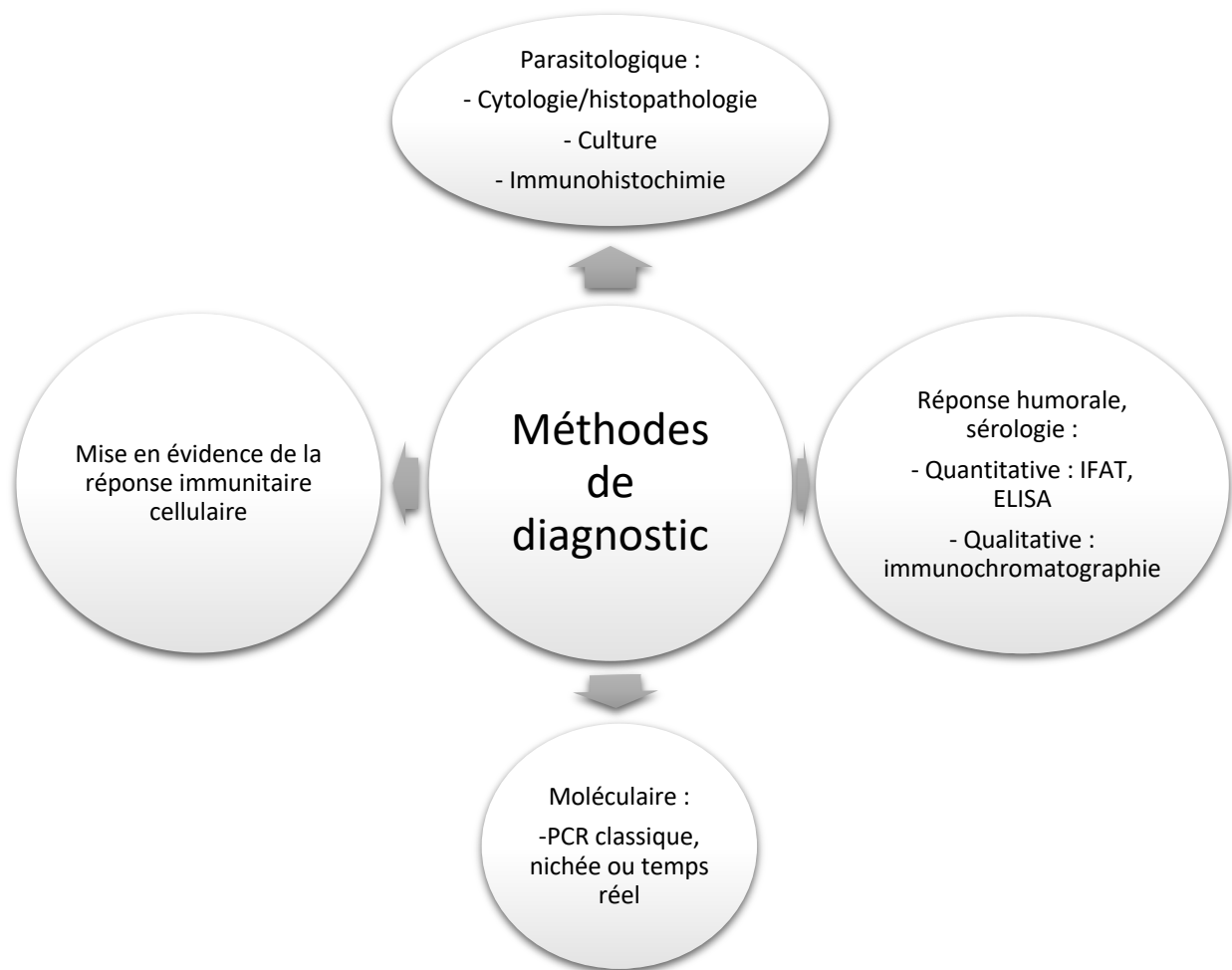


Figure 23 : Les principaux types de diagnostic de laboratoire disponibles pour la leishmaniose canine

1. Méthodes de diagnostic direct

a. Examen direct

L'examen direct est une méthode de diagnostique permettant la mise en évidence directe du parasite sur un prélèvement mais aussi les modifications pathologiques à l'échelle cellulaire évocatrices d'un processus inflammatoire infectieux (Solano-Gallego et al. 2011a).

Le prélèvement utilisé est généralement obtenu à partir du produit de ponction d'un nœud lymphatique (adénogramme) ou de moelle osseuse (myélogramme). En effet, la dissémination des leishmanies au sein de l'organisme fait principalement intervenir les tissus lymphoïdes, ainsi la charge parasitaire est plus élevée dans ces organes (Bourdoiseau, Chermette 2015). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, concernant la sensibilité des prélèvements issus de cytoponction d'organe, elle serait décroissante selon cet ordre : rate – moelle osseuse – nœud lymphatique. Les nœuds lymphatiques les plus accessibles sont généralement les poplités ou pré-scapulaires, et la ponction de moelle osseuse est plutôt réalisée au niveau du sternum, de la crête iliaque, d'une côte ou de l'humérus. L'examen direct à partir d'un prélèvement sanguin est encore moins sensible. Il est aussi possible de mettre en évidence le parasite sur une cytoponction de nodule cutané ou *via* un calque appliqué sur une lésion ulcérate cutanée ou cutanéomuqueuse humide. En cas de signes cliniques particuliers comme une arthrite/polyarthrite ou des signes d'atteintes du système nerveux central, un prélèvement de liquide synovial ou de liquide cérébro-spinal respectivement est également réalisable pour mettre en évidence le parasite (Bourdoiseau et Chermette, 2015). Concernant les nœuds lymphatiques, des modifications cellulaires peuvent être présentes sans modification morphologique : ainsi il ne faut pas hésiter à les ponctionner même lorsqu'une adénomégalie n'est pas présente (Rivière et Lanoire, 2007).

Les prélèvements sont étalés sur lame et après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG), sont observés au microscope à immersion (x1000) par le praticien lui-même ou par un spécialiste travaillant dans un laboratoire.

L'hyperplasie lymphocytaire fait partie des modifications cytologiques pouvant être observées. Il s'agit d'une augmentation de la population de lymphocytes. Elle peut s'accompagner d'une augmentation de celle des macrophages : on parle alors d'adénite granulomateuse. Les

plasmocytes peuvent également être retrouvés en plus grand nombre (hyperplasie plasmocytaire) en raison de l'activation polyclonale. Enfin, des leishmanies peuvent être directement visualisées au sein des macrophages parasités.

Les formes amastigotes sont généralement intracellulaires (cellules du système réticulo-histocytaire) mais peuvent exceptionnellement être retrouvées libres dans le milieu extra-cellulaire. Elles sont ovales à rondes avec un diamètre d'environ 2 à 4 μm . Leur cytoplasme apparaît bleu pâle après coloration au MGG, tandis que le noyau est plutôt rouge et le kinétoplaste rouge foncé à violet (Maia et Campino, 2008) (figure 24).

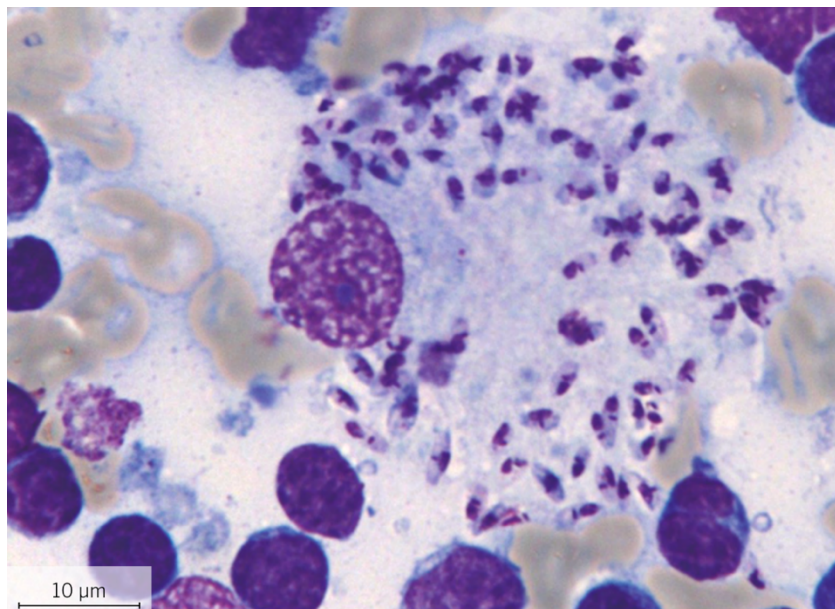


Figure 24 : Formes amastigotes de *L. infantum* au sein d'un macrophage à partir d'une ponction de nœud lymphatique, après coloration au MGG. Observation au microscope optique x100 avec immersion.

Source : Beugnet et al. (2021)

L'examen direct est rapide, peu coûteux et très spécifique lorsqu'il permet de mettre en évidence la présence de leishmanies, d'où son rôle déterminant lors de suspicion de leishmaniose. Chez les chiens avec des signes cliniques marqués, les leishmanies sont généralement présentes en quantité suffisante.

Cependant, il présente une faible sensibilité car les formes amastigotes ne sont pas toujours visualisables, notamment dans les tissus ou les fluides corporels. De plus, l'interprétation

requiert une expertise en cytologie mais aussi un certain temps pour permettre une observation adéquate du prélèvement. Ainsi d'après les études la sensibilité serait de 52 à 85% pour un prélèvement de moelle osseuse et de 52 à 58% lorsqu'il est issu d'une ponction de nœud lymphatique (Morales-Yuste et al., 2022). En cas de résultat négatif, le matériel utilisé pour l'analyse peut toutefois être stocké dans le but de réaliser une PCR par la suite (Organisation mondiale de la santé animale).

b. Histopathologie +/- immunohistochimie

L'histologie est effectuée à partir de biopsies d'organes potentiellement infectés par des leishmanies. Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine est généralement employée. Les biopsies sont réalisées sur des nœuds lymphatiques, de la moelle osseuse ou encore sur de la rate.

En plus de permettre la mise en évidence du parasite dans certains cas, l'histologie apporte des informations sur le type de lésions présentes à l'échelle tissulaire. Il peut s'agir notamment d'une inflammation granulomateuse, d'une vascularite, d'une hyperplasie lymphoïde ou encore d'une dermatite lymphoplasmocytaire en cas de biopsie cutanée (Organisation mondiale de la santé animale). Cependant, elle requiert là encore une expertise et du temps pour l'interprétation du résultat. Sa sensibilité serait même inférieure à la cytologie avec une variation allant de 39,13 à 43,9% pour une biopsie de nœud lymphatique poplité. Des faux-positifs sont aussi possibles lors de la confusion du parasite avec un artéfact quelconque (Maia et Campino 2008).

L'immunohistochimie est une méthode biochimique qui peut être conduite lorsque des modifications histologiques évocatrices de leishmaniose sont présentes sans que le parasite n'ait été directement visualisable. Elle peut donc être utilisée sur le prélèvement histologique afin d'augmenter la sensibilité de la méthode. Plusieurs techniques sont décrites afin de mettre en évidence des antigènes de *L. infantum* (Maia et Campino 2008).

c. Mise en culture

La culture *in vitro* est possible pour mettre en évidence la présence du parasite, notamment à partir de matériel isolé depuis le nœud lymphatique poplité qui est très accessible. Différents

milieux de culture peuvent être utilisés comme par exemple celui Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022).

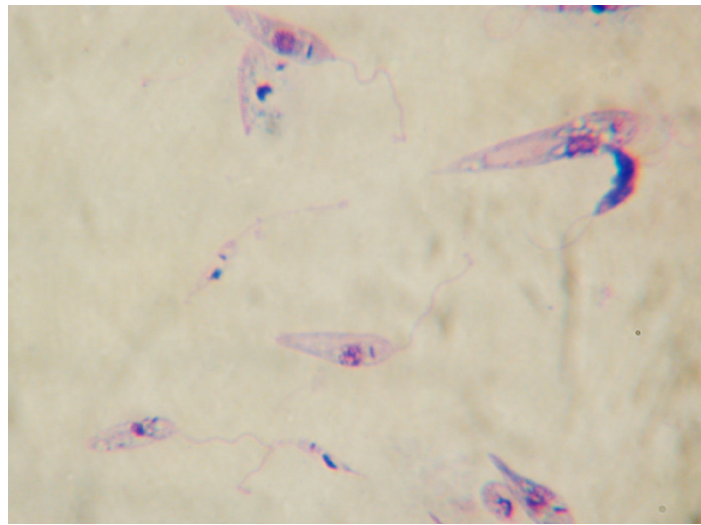


Figure 25 : Formes promastigotes visibles sur un étalement sur lame d'une culture avec milieu NNN, observation au microscope optique x100 avec immersion. Source : Bourdoiseau, Chermette (2015)

Après prélèvement et ensemencement du milieu, une incubation entre 22 et 26°C est nécessaire. Les cultures sont ensuite examinées chaque semaine afin de rechercher des formes promastigotes de *L. infantum*. Il est possible d'augmenter la sensibilité de cette méthode en prélevant plusieurs organes, la charge parasitaire pouvant être différente selon le type de prélèvement (Maia, Campino 2008). D'après l'étude réalisée par Maia et al. (2009), les échantillons de moelle osseuse et de nœuds lymphatiques seraient les prélèvements de choix. Ceux de rate peuvent aussi convenir mais sont rarement choisis en raison du risque de saignement associé notamment chez un chien avec un profil hypocoagulable. Toujours dans cette étude, 77,1% des cultures sont devenues positives après une semaine, alors que les 23% restantes sont devenues positives après seulement deux ou trois semaines. Ainsi il faut généralement attendre un mois pour confirmer la négativité d'une culture.

Bien que d'une spécificité égale à 100%, la mise en culture n'est plus utilisée à ce jour pour le diagnostic de leishmaniose canine en raison du temps considérable que cette méthode nécessite et de sa sensibilité très variable en fonction de la charge parasitaire de l'organe prélevé. Toutefois, elle reste utile pour la recherche, dans des études nécessitant une isolation du parasite. Notamment, une résistance du parasite à l'allopurinol a récemment été mise en évidence, et la

culture pourrait permettre d'évaluer la réponse thérapeutique du parasite chez un chien pour qui le traitement a échoué (Yasur-Landau et al. 2016).

d. Diagnostic par biologie moléculaire

La PCR, ou Polymerase Chain Reaction, est un outil de biologie moléculaire permettant de détecter une partie du génome d'un agent infectieux à partir d'une amplification de celui-ci. Cette méthode peut ainsi établir un diagnostic de leishmaniose et être utile pour le suivi du traitement chez un animal malade. Enfin, l'identification de l'espèce de leishmanie est généralement possible.

- **Echantillons**

D'après Solano-Gallego et al. (2011), les échantillons pour lesquels la sensibilité par PCR serait élevée sont ceux qui proviennent de ponction de moelle osseuse, de nœud lymphatique, de rate, ou encore de prélèvements cutanés et conjonctivaux. Au contraire, les prélèvements sanguins ou d'urine diminuent la sensibilité de la technique. Selon la situation clinique, la pertinence des prélèvements peut varier. Ainsi en cas de suspicion clinique, ils dépendent des signes cliniques observés : il peut s'agir de sang EDTA et/ou de raclage cutané et/ou de ponction ganglionnaire et/ou de cellules conjonctivales. Il est possible d'envoyer à l'analyse plusieurs échantillons différents qui seront mélangés afin d'augmenter la sensibilité de la méthode.

La parasitémie est généralement faible lors de leishmaniose, et même en cas d'atteinte clinique sévère, ainsi de nombreux faux négatifs peuvent être présents lors d'un diagnostic par PCR à partir d'un prélèvement sanguin. L'utilisation de sang total est donc possible mais doit être complétée par un test sérologique dans le cadre d'études épidémiologiques (Morales-Yuste et al. 2022).

L'ADN de leishmanies a également été retrouvé dans d'autres échantillons biologiques comme dans le lait, l'urine, le sperme ou encore dans des organes divers (utérus, reins, intestins...) (Maia, Campino 2008). D'après l'étude de Belinchón-Lorenzo et al. (2013), l'ADN du parasite serait même présent dans les poils des animaux infectés, permettant d'établir un diagnostic par PCR via un prélèvement totalement non invasif. La sensibilité d'un prélèvement de poil serait

similaire à celle sur sang total lors de la réalisation d'une PCR temps-réel, mais toutefois inférieure à celle obtenue depuis un prélèvement de nœud lymphatique.

- **Cibles génomiques :**

La cible du génome de l'espèce de leishmanie recherchée conditionne la spécificité de la technique. L'ADN à amplifier peut-être spécifique du genre *Leishmania* en général ou de l'espèce *Leishmania infantum* (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022).

Le génome des leishmanies comporte 34 à 36 chromosomes. Les gènes codant pour les protéines ne comportent pas d'introns et leur expression est régulée après la transcription. Le génome mitochondrial est appelé kinétoplaste (Galluzzi et al. 2018). Ce dernier contient des milliers de molécules d'ADN circulaires. Parmi elles, les maxi-cercles sont similaires à l'ADN mitochondrial d'autres eucaryotes et seraient un marqueur moléculaire important pour les études phylogénétiques mais aussi l'identification précise de l'espèce de leishmanie. Ces maxi-cercles sont présents en faible nombre et varient entre 20 et 40 kb selon les espèces. Les mini-cercles sont présents par milliers et se situent entre 0,5 et 2 kb. Ces derniers sont plus hétérogènes en termes de séquence et de nombre de copies au sein du kinétoplaste (Solana et al. 2022).

L'ADN ribosomal peut aussi servir de cible car des centaines de copies peuvent être présentes au sein du parasite ce qui permet l'obtention d'une sensibilité suffisante (Galluzzi et al. 2018). Le plus souvent, les amorces utilisées pour la PCR ciblent un mini-cercle appartenant à l'ADN du kinétoplaste ou encore un ADN ribosomal (ITS-1). D'après certaines études, la sensibilité de la PCR serait meilleure lorsque l'ADN du kinétoplaste est ciblé (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Les mini-cercles étant présents en grand nombre dans la mitochondrie (environ 95% de l'ADN du kinétoplaste), ce sont des cibles idéales permettant une haute sensibilité de détection du génome de leishmanie (Galluzzi et al. 2018).

- **Types de PCR : avantages et inconvénients**

La PCR est une technique très rapide qui permet un diagnostic précoce de l'infection. De manière générale, la PCR présente une sensibilité très élevée et une spécificité élevée, mais ces deux caractéristiques dépendent du type de PCR employé, de la cible du génome parasitaire

recherché, de la méthode d'extraction de l'ADN et du prélèvement utilisé. Il existe plusieurs types de PCR, les plus utilisées étant la PCR dite conventionnelle, la PCR temps-réel encore appelée quantitative et la PCR nichée (Solano-Gallego et al. 2011).

Lors de PCR conventionnelle, l'ADN du parasite est amplifié en utilisant une paire d'amorces. Les produits d'amplification de la PCR sont révélés sous UV après migration des fragments d'ADN chargés négativement sous un champ électrique : c'est l'électrophorèse.

Avec la PCR temps réel ou encore appelée quantitative, il est ainsi possible de quantifier le nombre de copies d'ADN parasite initialement présent dans l'échantillon. Au cours de la procédure, une mesure de la fluorescence émise est effectuée à chaque instant grâce à la détection d'une molécule (par exemple SYBR Green) ou d'une sonde fluorescente (TaqMan®). Une corrélation de la fluorescence en fonction de la quantité d'ADN amplifiée est établie via une courbe. Ainsi il est possible de déterminer la charge parasite initialement présente dans l'échantillon. Cette quantification permet d'évaluer la réponse thérapeutique d'un animal malade en effectuant son suivi mais aussi de prédire la survenue d'une récurrence (Maia, Campino 2008). La PCR quantitative est parfois estimée plus sensible que la PCR nichée. Elle comporte aussi un risque de contamination de l'échantillon moins important car elle se déroule uniquement en système fermé du début à la fin, au contraire de la PCR conventionnelle qui nécessite des manipulations supplémentaires à l'issue de l'amplification pour la révélation de l'ADN ou de la PCR nichée (Organisation Mondiale de la Santé Animale). La PCR temps réel aurait un taux de détection limite de 0,0125 parasites par millilitre de sang (Galluzzi et al. 2018). Toutefois, la sensibilité de cette méthode peut aussi varier selon la technique utilisée pour détecter le signal fluorescent. L'étude réalisée par (Gomes et al. 2017) compare les techniques SYBR Green (agent intercalant) et TaqMan® (sonde) en termes de sensibilité. Dans cette dernière, c'est la technique SYBR Green qui permettrait une meilleure détection des patients infectés.

La PCR nichée est une PCR conventionnelle modifiée : elle est constituée de deux étapes successives et requiert deux couples d'amorces différents au lieu d'un seul. Le premier couple d'amorces est spécifique d'une partie du génome parasite qui est stable et très conservé alors que le deuxième se lie à une partie plus spécifique. D'après l'étude réalisée par (Yimam Ayene et al. 2021), la PCR nichée permettrait de détecter le parasite chez des animaux symptomatiques et asymptomatiques, même lorsque que le test d'agglutination directe, une autre méthode de diagnostic indirect, n'a pas pu permettre cette détection. D'après l'étude de Bia et al. (2022)

réalisée sur 161 chiens vivant en Algérie, la sensibilité obtenue avec une PCR nichée à partir d'un adénogramme était supérieure aux autres tests sérologiques comme l'IFAT et l'ELISA. Ainsi sa sensibilité est plus élevée, mais cette technique est plus sujette aux contaminations extérieures en raison du plus grand nombre d'étapes nécessaires pour sa réalisation. Pour cette raison, la spécificité peut être plus faible qu'avec les autres types de PCR (Organisation Mondiale de la Santé Animale). Cependant, d'après l'étude de Bia et al. (2022) réalisée sur 161 chiens vivant en Algérie, la sensibilité obtenue avec une PCR nichée à partir d'un adénogramme était supérieure aux autres tests sérologiques comme l'IFAT et l'ELISA.

La PCR multiplex, en utilisant au moins trois couples d'amorces différentes, permet d'identifier plusieurs espèces en même temps mais cette technique est ainsi plus coûteuse. Couplée à la PCR quantitative, la HRM pour « High Resolution Melt », ou Courbe de fusion à haute-résolution permet de distinguer les amplicons obtenus par PCR, même si ces derniers ont seulement des séquences ADN qui n'ont que quelques bases comme différences. Avec cette technique, chaque courbe obtenue correspond à une espèce de *Leishmania spp.* L'étude de Najafzadeh et al. (2022) montre qu'elle permet bien de mettre en évidence des infections mixtes par plusieurs espèces de leishmanies chez un mammifère, en plus de permettre un diagnostic précoce chez des animaux asymptomatiques. Ces variantes de la PCR sont des méthodes très utiles dans des zones géographiques où plusieurs espèces de leishmanies coexistent, afin de différencier les espèces.

Enfin, la PCR couplée à la méthode ELISA ciblant l'ADN du kinétoplaste a également montré une excellente sensibilité. Dans l'étude de Medeiros et al. (2017), réalisée chez l'Homme à partir de prélèvements sanguins, la sensibilité obtenue était de 100%. Cette méthode pourrait donc être prometteuse en permettant la détection de cas asymptomatiques.

- **Une variante de la PCR : le méthode « LAMP »**

La LAMP pour « Loop-Mediated Isothermal Amplification » est très rarement utilisée en routine. C'est une technique d'amplification de matériel génétique qui s'apparente à la PCR mais qui se réalise à une même température au contraire de cette dernière et qui ne nécessite donc pas de thermocycleur. Comme elle utilise quatre couples d'amorces et permet l'amplification de six régions différentes du parasite, sa spécificité est très élevée même si le risque de contamination extérieure reste possible. Sa sensibilité serait aussi très élevée et potentiellement

supérieure à celle de la PCR. Enfin, c'est une méthode qui nécessite peu d'équipement et qui s'avère relativement peu coûteuse. Son rôle dans le diagnostic de la leishmaniose canine comme humaine est ainsi prometteur (Erber et al. 2022). D'après Nzelu, Kato et Peters (2019), les études utilisant la méthode LAMP pour le diagnostic de la leishmaniose humaine ont rapporté des sensibilités allant de 80 à 100% et des spécificités variant de 94 à 100%.

e. Le xénodiagnostic

Le xénodiagnostic est une méthode de détection du parasite chez un animal infecté utilisant le vecteur: le phlébotome. Il ne peut avoir lieu que dans des laboratoires spécialisés dans lesquels des colonies de phlébotomes sont disponibles. L'animal à tester est ainsi exposé à des phlébotomes non porteurs de leishmanies. Après cette exposition, une recherche du parasite est effectuée chez le vecteur afin de déterminer si le chien était porteur du parasite mais aussi capable de le transmettre. Le taux d'infection du vecteur *Phlebotomus* par les chiens infectés varie entre 21,9 et 92%. Cette méthode ne peut être envisagée pour un diagnostic de routine, en raison de sa difficulté de réalisation,. Toutefois elle est utile pour des études épidémiologiques et pour mieux caractériser la transmission du parasite (Maia, Campino 2008).

2. Méthodes de diagnostic indirect

a. Le diagnostic sérologique

i. Principe

La sérologie est une méthode de diagnostic reposant sur la détection des immunoglobulines spécifiques produites par l'hôte lors de l'infection par le parasite *L. infantum* via la réponse immunitaire humorale. Elle ne permet donc pas une mise en évidence directe de l'agent pathogène comme les méthodes décrites ci-dessus mais permet seulement celle d'anticorps anti-leishmanies, qui ne sont pas à eux-seuls le signe que la maladie est bien présente et installée chez l'animal. Comme vu en II-A, la leishmaniose est capable d'engendrer chez l'animal infecté une réponse humorale forte, caractérisée par des taux croissants d'anticorps sériques avec la progression de la maladie, notamment si ce dernier est symptomatique. La séroconversion pourrait survenir dès trois semaines post-infection (Beugnet et al. 2021). D'après Moreno,

Alvar (2002), elle surviendrait en moyenne cinq mois après une infection naturelle contre trois mois pour une infection expérimentale. Par conséquent, les titres sériques peuvent être faibles en tout début d'infection, lorsque l'animal est asymptomatique ou encore lorsque ce dernier est sous traitement (Maia, Campino 2008).

La classe d'immunoglobulines la plus représentée lors d'une élévation du taux d'anticorps anti-leishmanies après infection est les IgG. Les sous-classes IgG1 et IgG2 seraient selon la littérature les marqueurs les plus fiables afin de caractériser la réponse immunitaire humorale d'un chien. D'après Cardoso et al. (2007), IgG2 serait un marqueur actif de la maladie et aurait une concentration sérique significativement plus élevée chez les chiens symptomatiques, en comparaison avec les chiens asymptomatiques infectés. Cependant, tous les auteurs ne s'accordent pas sur ce résultat. Par ailleurs, d'après l'étude de Rodríguez-Cortés et al. (2007), les chiens infectés seraient aussi capables de produire des IgA et IgM anti-leishmanies. Une élévation de la concentration sérique d'IgA seraient le signe d'une stimulation de l'immunité muqueuse et par conséquent d'une dissémination du parasite dans une ou plusieurs muqueuses de l'organisme. Les IgM seraient plutôt décelables lors d'une infection chronique, et persisteraient d'ailleurs longtemps dans le sérum après infection. Ainsi ces deux autres classes d'immunoglobulines sont plutôt retrouvées lorsque la maladie est déjà installée, et non dans une phase précoce.

Parmi les méthodes disponibles certaines sont qualitatives c'est-à-dire qu'elles permettent seulement d'indiquer la présence ou l'absence d'anticorps dans l'échantillon. D'autres sont quantitatives : elles fournissent pour chaque sérum testé un titre associé. Cette caractéristique représente un avantage car elle permet d'établir un suivi biologique de l'animal avec un intérêt pronostique mais aussi de surveiller la réponse thérapeutique si un traitement est initié. Afin de détecter les anticorps dans le sérum de l'animal à tester, chaque test repose sur l'utilisation d'antigènes du parasite. Il peut s'agir de la forme promastigote ou amastigote en entier ou bien de fragments de *L. infantum*. Il semblerait que les méthodes utilisant le parasite en entier permettraient d'obtenir de meilleurs résultats (Maia, Campino 2008).

Les tests sérologiques les plus couramment utilisés pour établir un diagnostic de leishmaniose sont l'IFAT « indirect immunofluorescent antibody test », l'ELISA « enzyme-linked immunosorbent assay » et les tests rapides d'immunochromatographie.

ii. L'IFAT

- **Principe**

L'IFAT est une méthode de diagnostic sérologique quantitative, souvent considérée comme une méthode de référence dans les études et très utilisée pour établir un diagnostic individuel ou encore lors d'enquêtes épidémiologiques. L'échantillon à prélever est du sang sur tube sec afin d'en extraire le sérum. Elle utilise des promastigotes entiers obtenus après culture afin de détecter les immunoglobulines spécifiques du parasite dans le sérum prélevé à tester. Dans un premier temps, l'antigène est fixé sur une lame de verre. Le sérum est dilué avant d'être ajouté à la préparation. Si des anticorps spécifiques sont présents dans ce dernier, une fixation anticorps-antigène du parasite a lieu. Un lavage est alors effectué pour éliminer les autres anticorps non spécifiques. D'autres anticorps anti-immunoglobulines spécifiques de leishmanies conjuguées à un fluorochrome sont également ajoutés. La dernière étape consiste en l'examen de la lame sous un microscope à fluorescence : si une fluorescence verte et homogène apparaît, l'échantillon de sérum est ainsi considéré comme positif. La plus grande dilution montrant une fluorescence est considérée comme le titre sérique en anticorps. Le laboratoire réalisant cette méthode doit donc déterminer au préalable un seuil afin de déterminer si le titre est le signe d'une infection par la leishmaniose ou non. Il n'existe pas de seuil standard à l'heure actuelle. Généralement, ce dernier est compris entre 1/40 et 1/160 alors qu'une dilution de 1/320 ou plus serait fortement indicative de la maladie chez les chiens présentant des signes cliniques compatibles (Organisation Mondiale de la Santé Animale).

- **Caractéristiques du test**

Source	Sensibilité	Spécificité	Commentaires
(Maia et al. 2009)	87,5%	94%	/
Organisation mondiale de la santé animale	96%	98%	Dans des zones dépourvues de la maladie de Chagas
(Adel et al. 2016)	89,86% chez les chiens symptomatiques 31,25% chez les chiens asymptomatiques	98,12% dans les zones non endémiques 96,57% dans les zones endémiques	Méta-analyse d'études réalisées dans le bassin méditerranéen

Tableau 9 : Sensibilité et spécificité de l'IFAT décrites dans la littérature

- **Avantages**

L'IFAT est relativement simple à réaliser. Par ailleurs, il s'agit d'un test très spécifique, notamment dans des zones non endémiques de leishmaniose (Adel et al. 2016). C'est également une méthode ayant un intérêt pronostic et permettant de réaliser un suivi thérapeutique grâce au suivi du titre sérologique obtenu (Maia, Campino 2008). On estime que si le traitement est efficace, le titre devrait chuter d'au moins deux dilutions.

- **Inconvénients**

Cependant, ce test doit nécessairement être réalisé dans des laboratoires équipés d'un microscope à fluorescence. L'interprétation de la fluorescence reste subjective et donc dépendante de l'opérateur. Le titre seuil standard à adopter n'est pas défini dans la littérature et chaque laboratoire doit déterminer celui qui lui convient. La sensibilité et la spécificité du test peuvent être très variables comme le démontre l'étude d'Adel et al. (2016). En effet, de nombreux paramètres peuvent influencer ces deux caractéristiques, comme le titre seuil par exemple ou l'existence de réactions croisées. En effet, l'IFAT est une technique genre-spécifique et des faux-positifs peuvent survenir dans des cas d'infection par *Trypanosoma cruzi*, qui est l'agent responsable de la maladie de Chagas chez l'Homme (Organisation Mondiale de la Santé Animale).

iii. L'ELISA

- **Principe**

L'ELISA est une méthode de laboratoire classique très fréquemment utilisée permettant la recherche d'anticorps ou d'antigènes au sein d'un échantillon. Ce dernier peut être du sérum ou du plasma. L'ELISA indirect, qui permet justement de mettre en évidence des anticorps spécifiques, est celle qui nous intéresse ici. Divers types antigènes peuvent être utilisés. Dans l'étude de Velez et al. (2019), la forme promastigote en entier est utilisée pour une enquête épidémiologique. La plupart du temps, des extraits solubles du parasite sont utilisés en tant que tels ou bien après une purification. Cependant, l'utilisation d'antigènes natifs limitent la spécificité de la méthode. Récemment, des méthodes de biologie moléculaires ont permis l'utilisation de protéines recombinées de *Leishmania spp.* comme rK-26, rK-39 ou encore rKDDR. Bien que les auteurs ne s'accordent pas toujours sur le réel intérêt de ce type d'antigène, il semblerait qu'il permette toutefois de diminuer le risque de réactions croisées avec d'autres parasites (Maia, Campino 2008).

Le principe est similaire à celui de l'IFAT et le résultat est également quantitatif. Cependant pour cette méthode, le système révélateur des complexes antigènes de leishmanies-immunoglobulines spécifiques n'est pas un fluorochrome mais une enzyme catalysant la transformation d'un substrat chromogène en un produit de couleur différente. Le sérum à tester est dilué à des titres différents afin d'obtenir par la suite une courbe d'étalonnage. Ainsi, lorsque les anticorps secondaires préalablement couplés à une enzyme sont ajoutés et se lient aux anticorps primaires, l'intensité de la coloration peut être lue au spectrophotomètre : cette dernière est proportionnelle à la concentration sérique en anticorps.

- **Caractéristiques du test**

La sensibilité et la spécificité du test dépendent fortement du type d'antigène utilisé. Lorsqu'une seule dilution du sérum est réalisée, la sensibilité de la technique ELISA serait comprise entre 86 et 99%. L'utilisation des protéines recombinées rKDDR-plus, fKDDR et rK39 permettrait d'obtenir une sensibilité de 98%, avec des spécificités égales 98%, 91% et 83% respectivement (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). L'étude de Siqueira et al. (2023) réalisée sur 25 chiens symptomatiques, 34 asymptomatiques et 36 chiens non-infectés a permis de

comparer la protéine recombinée Dyn-1 aux protéines rK-39, K26 et à un antigène soluble natif. L'utilisation de Dyn-1 comme antigène a ainsi montré la plus haute spécificité mais aussi la sensibilité la plus élevée avec 94% et 97% respectivement, contre 81 et 88% pour rK-39, 87 et 86% pour K26 et enfin 77 et 95% pour l'antigène soluble natif.

- **Avantages**

Cette méthode peut être réalisée facilement et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps. Le titrage en anticorps est ici relié à la densité optique lue : cette méthode n'a donc pas le biais de l'opérateur. Elle est également très sensible puisque plus d'un anticorps secondaire marqué peut se lier à un anticorps primaire car il possède plusieurs épitopes. L'utilisation de protéines recombinées permet d'augmenter la spécificité.

- **Inconvénients**

Cette méthode possède aussi un potentiel de réactivité croisée notamment avec les protozoaires *Babesia canis* et *Trypanosoma spp.* (Organisation mondiale de la santé animale). En effet, c'est l'utilisation d'extraits solubles du parasite en tant qu'antigènes qui limite la spécificité de la méthode.

iv. Les tests rapides d'immunochromatographie

- **Principe**

L'immunochromatographie est une autre méthode de diagnostic sérologique commercialisée sous la forme de tests rapides qualitatifs. L'apparition de deux barres, l'une correspondant au contrôle et l'autre au sérum à tester, indique un résultat positif. Divers types d'antigènes peuvent être utilisés, comme notamment des protéines recombinées telles que rK39 (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022).

- **Caractéristiques du test**

La spécificité et la sensibilité du test sont variables et dépendent également de l'antigène cible choisi. D'après Villanueva-Saz et al. (2019), sur 244 sérums analysés, 232 d'entre eux ont montré des résultats concordants entre le test rapide d'immunochromatographie FASTest LEISH et des méthodes sérologiques standards (IFAT et ELISA). Ainsi, la sensibilité du test était dans cette étude de 100% et la spécificité de 99%. L'étude de Villanueva-Saz et al. (2022) a permis de comparer les caractéristiques de cinq tests d'immunochromatographie commercialisés en Espagne avec des techniques comme l'IFAT et l'ELISA. Alors que les cinq tests ont montré des sensibilités très variables, la spécificité de ces derniers s'est révélée très élevée (tableau 10).

Test	Sensibilité	Spécificité
FASTest LEISH	100%	98%
Uranotest <i>Leishmania</i> 2.0	97%	98%
Speed Leish K	97%	98%
Uranotest <i>Leishmania</i>	96%	100%
Witness <i>Leishmania</i>	84%	95%
DFV Test <i>Leishmania</i>	59%	100%

Tableau 10 : Sensibilité et spécificité de cinq tests d'immunochromatographie.

Source : Villanueva-Saz et al. (2022)

Toujours d'après cette étude, les résultats des tests d'immunochromatographie seraient d'autant plus corrélés à ceux obtenus avec l'IFAT et l'ELISA que le titre sérologique du chien est élevé. Proverbio et al. (2016) ont comparé le test rapide Anigen Rapid *Leishmania* Ab test kit avec le test IFAT sur le sérum de 66 chiens incluant 20 chiens sains et 40 chiens suspects de leishmaniose ou avec une infection déjà confirmée. L'étude a ainsi montré une excellente corrélation entre ces deux tests puisque 35 échantillons sont revenus positifs avec l'IFAT contre 31 avec le test rapide. Avec un titre seuil de 1/40 pour l'IFAT, la sensibilité du test rapide était de 75% contre 100% avec un seuil de 1/80.

- **Avantages**

Ces tests sont très faciles d'utilisation et ne nécessitent pas de matériel spécifique. Ils peuvent être réalisés directement par le vétérinaire, d'où l'obtention d'un résultat facile à lire dans de très courts délais (quelques minutes seulement sont nécessaires). Lorsque l'animal à tester est symptomatique, la spécificité du test augmente et celle-ci est alors suffisamment élevée (Maia, Campino 2008).

- **Inconvénients**

La sensibilité du test est souvent insuffisante (entre 30 et 70%) et les résultats faux-négatifs sont fréquents. Ainsi, utilisés seuls, ces tests pourraient conduire à une sous-estimation de la prévalence de la leishmaniose dans la population canine. La spécificité est généralement moyenne à élevée. Enfin, ce test ne permet pas d'avoir une idée du pronostic ni d'effectuer le suivi de la progression de la maladie chez l'animal car il ne permet pas d'obtenir un titre sérologique (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Pour résumer, si le résultat du test est positif, un deuxième test sérologique quantitatif devra être réalisé afin d'obtenir un titre sérologique. S'il est négatif, et notamment si la suspicion clinique du clinicien est forte, un autre test diagnostic devra également être conduit afin de confirmer ou infirmer ce résultat (Solano-Gallego et al. 2011a).

v. ***Le test d'agglutination directe (DAT)***

Le test d'agglutination directe est une méthode sérologique utilisant la forme promastigote entière de *L. infantum*, obtenue après culture, afin de mettre en évidence directement des anticorps dirigés contre le parasite. Le prélèvement à analyser peut-être du sérum ou du plasma. L'échantillon doit subir deux dilutions avant d'y ajouter la préparation contenant l'antigène. Après incubation à température ambiante pendant 18h, les résultats du test sont lus visuellement : il est positif si des agrégats bleu-clair sont visibles et négatif en leur absence (Organisation mondiale de la santé animale).

Cette méthode est très peu coûteuse et facile à réaliser, elle ne requiert donc aucune expertise. Par ailleurs, ce test a été validé pour une utilisation dans des études épidémiologiques grâce à

sa sensibilité et spécificité élevées. L'étude de Yimam Ayene et al. (2021) a permis d'établir une comparaison entre les performances du test d'agglutination directe et la PCR nichée, à partir de prélèvements sanguins de 30 chiens sains et de 35 chiens avec signes cliniques évocateurs de la leishmaniose. La sensibilité du test était de 96,43% et 96,67% chez les chiens symptomatiques et asymptomatiques respectivement, contre 100% et 60% concernant sa spécificité. Par ailleurs, la concordance entre les résultats des deux méthodes était très satisfaisante. Dans l'étude de Oliveira et al. (2016), les performances d'un prototype du test d'agglutination directe utilisant des antigènes lyophilisés étaient de 97,1% pour la sensibilité et de 97% pour la spécificité. L'utilisation de ce type d'antigène est un avantage puisque qu'elle permet la conservation du kit à des températures ambiantes. Cependant, le test requiert un certain temps d'incubation (18h). Le résultat fournit n'est par ailleurs que qualitatif.

vi. Le Western Blot

- **Principe**

Le Western Blot est un test sérologique qualitatif permettant de détecter les IgG par immunoblot. Les antigènes utilisés sont des formes promastigotes de *L. infantum*, qui ont été séparés par électrophorèse avant d'être fixés sur une feuille de nitrocellulose. Cette dernière est ensuite découpée en plusieurs bandelettes identifiées. Chaque sérum à tester est incubé séparément avec une bandelette. Si des anticorps spécifiques d'un antigène de leishmanie sont présents dans l'échantillon sérique, ces derniers sont alors capables de se lier à eux. Un conjugué dirigé contre les immunoglobulines sériques est ajouté et les immunocomplexes ainsi formés peuvent réagir avec un substrat. Enfin, les anticorps spécifiques de classe IgG liés aux antigènes et au conjugué sont révélés sous forme de bandes transversales colorées.

- **Interprétation des résultats**

Actuellement, il n'y a pas d'accord global dans la littérature concernant la/les bande(s) qui indiquent précisément une infection ou une maladie (Maia, Campino 2008). L'étude de Fernández-Pérez et al. (2003) a montré que chez les chiens symptomatiques, les IgG1 étaient principalement dirigées contre le peptide à 67 kDa. Les IgG2 ont cependant réagit avec un plus grand nombre de peptides différents. Au contraire, les chiens symptomatiques avec une bonne

réponse thérapeutique et ayant des taux sériques plus faibles en IgG1 et IgG2 ont eu une réaction moindre contre le peptide à 67 kDa : ce dernier pourrait donc avoir un intérêt pronostique. D'après l'étude de Iniesta et al. (2007) réalisée sur 109 sérums de chien, ce sont des polypeptides de bas poids moléculaires qui sont reconnus en début d'infection, avec des IgG1 dirigées contre les fractions 14, 16 et 18 kDa et des IgG2 se liant aux fractions 14 et 16 kDa. Talmi-Frank et al. (2006) ont mis au point une méthode de Western Blot quantitative et informatisée à partir du suivi de six chiens Beagle infectés pendant 75 semaines post-infection. Dans cette étude, les bandes antigéniques 12, 14, 24, 29, 48 et 68 kDa étaient d'une intensité significativement plus augmentée. Alors qu'une réaction avec les bandes 14, 48 et 68 kDa étaient associées à un début d'infection, une augmentation de l'intensité des bandes 14, 24 et 29 kDa était plutôt retrouvée lors d'un échec thérapeutique et correspondait donc à un pronostic plutôt négatif. D'après Riera et al. (1998), ce sont les bandes 12 et 14kDa qui permettraient d'obtenir la meilleure sensibilité lorsqu'il s'agit de détecter précocement la maladie. Enfin, une mise en évidence de la protéine antigénique 26 kDa serait révélatrice d'une infection active (Fernández-Pérez et al. 1999).

- **Caractéristiques, avantages et inconvénients du test**

Le Western Blot serait une technique plus sensible que l'IFAT (Ferroglia et al. 2007) mais aussi très spécifique (Gomes et al. 2008). D'après Iniesta et al. (2007), la sensibilité de la méthode augmente lorsqu'une combinaison de polypeptide est utilisée. Dans cette étude, le Western Blot s'est également montré plus sensible que la méthode ELISA employée, notamment pour les chiens symptomatiques avec des taux sériques faibles en IgG1. Toutefois, il existe peu de données dans la littérature sur les caractéristiques de cette méthode. Ce test est aussi difficile à mettre en œuvre puisqu'il requiert de l'expertise et du temps. C'est également une technique très coûteuse, qui la rend plutôt utile dans le secteur de la recherche plutôt que pour des analyses de routine réalisées par les vétérinaires. Par ailleurs, elle fournit seulement un résultat qualitatif (Maia, Campino 2008).

vii. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'identification individuelle, qualitative et quantitative de particules en suspension dans un liquide. Grâce à une méthode de détection propre à l'appareil, les caractéristiques physiques et/ou chimiques d'un grand nombre de cellules peuvent être

analysées simultanément (Maia, Campino 2008). En combinant plusieurs antigènes, l'étude de Ker et al. (2019) menée sur 140 sérums de chiens a démontré que cette méthode pouvait atteindre 95,0% de sensibilité contre 91,2% de spécificité. Bien qu'elle ne soit pas utilisée à l'heure actuelle pour le diagnostic de leishmaniose canine, cette technique reste prometteuse mais aussi très utile quant à la caractérisation de la réponse immunitaire de l'hôte.

b. Méthodes reposant sur la mise en évidence d'une immunité cellulaire

Les méthodes de diagnostic qui reposent sur la réponse immunitaire cellulaire du chien infecté sont moins nombreuses et standardisées que celles détectant une réponse humorale (sérologie) : ainsi elles ne sont pas utilisées en pratique. Alors que la réponse humorale post-infection par le parasite est plutôt associée à une progression de la maladie, la réponse cellulaire est celle qui est la plus apte pour le contrôle de la maladie via la destruction du parasite.

i. Le test de Montenegro (in vitro)

Il correspond à l'inoculation d'antigènes de *Leishmania infantum* (suspension de promastigotes inactivés) dans le derme du chien suspecté d'être infecté. Si ce dernier l'est, son système immunitaire cellulaire déjà sensibilisé au parasite va s'activer et stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron- γ produites par des cellules de l'immunité cellulaire. En parallèle, une administration d'une solution de dilution est réalisée dans une autre région anatomique et sert de témoin négatif. Ainsi dans les 48h à 72h post-inoculation, une papule cutanée apparaît dans ce cas au niveau du site d'injection, d'environ 5 mm de diamètre. Il s'agit du phénomène d'hypersensibilité retardée. Généralement, ce test revient positif lors d'infections subcliniques, au début de l'infection par le parasite et avant que la maladie ne progresse ou encore pendant ou après le traitement, lorsque la maladie est alors mieux contrôlée. Un résultat positif signifie donc que l'animal possède une réponse immunitaire cellulaire adaptée contre *Leishmania infantum*, en plus d'avoir simplement été infecté par le parasite. Durant la phase progressive de la maladie, ce test peut se révéler négatif, alors que le chien est bien infecté par le parasite. Malgré son faible coût et sa facilité de réalisation, ce test n'est pas utilisé en pratique à cause du délai de lecture nécessaire mais aussi des possibles faux négatifs et faux positifs que ce dernier peut mettre en évidence (Maia, Campino 2008). D'après l'étude de Rodríguez-Cortés et al. (2007), il n'y aurait pas de corrélation entre le taux d'anticorps

détectés par sérologie ou encore le type d'immunoglobuline la plus présente chez un chien infecté et le résultat du test de Montenegro (positif ou négatif). Ce test peut ainsi être utilisé dans des études épidémiologiques pour mettre en évidence une exposition de l'animal au parasite (actuelle ou antérieure) mais aussi évaluer sa réponse immunitaire cellulaire. Il est donc utile aux études de vaccinologie.

ii. Test de prolifération des lymphocytes

Pour sa réalisation, ce dernier nécessite d'abord une isolation des cellules mononuclées depuis le sang périphérique prélevé chez le chien à tester. Les cellules isolées sont ensuite incubées avec une substance stimulant la prolifération cellulaire et un antigène soluble de *L. infantum*. Après quelques jours, la prolifération cellulaire est estimée via l'index de stimulation. Dans la littérature, différentes valeurs seuils sont retenues pour juger de la positivité d'un chien (Maia, Campino 2008). Quinnell et al. (2001) soutiennent que la spécificité d'un test basé sur la réponse immunitaire cellulaire est assez faible : l'index de stimulation a donc été augmenté dans son étude (5 contre 2,5 habituellement trouvé dans la littérature). Par ailleurs, la sensibilité du test chez les chiens asymptomatiques était de seulement 75,8%. D'après l'étude de Rodríguez-Cortés et al. (2007), le taux d'IgA serait inversement proportionnel à l'index de stimulation du test. Les chiens avec un test de prolifération positif produisent moins d'IgA que ceux qui ont un test négatif. D'où l'idée que les chiens asymptomatiques, capables de mettre en place une réponse immunitaire cellulaire efficace, ont une réponse humorale IgA-spécifique moindre.

iii. Détection de l'interféron- γ

L'interféron- γ serait la molécule pro-inflammatoire qui contribuerait le plus à la réponse immunitaire cellulaire. Une incubation est réalisée avec cette molécule et un antigène soluble de *L. infantum* pendant 72h. à partir des cellules mononuclées isolées depuis le sang périphérique. Le taux d'interféron- γ est ensuite mesuré à partir du surnageant ensuite prélevé. Cette méthode est complexe et difficile à réaliser (Maia, Campino 2008). Tout comme pour le test de Montenegro, aucune corrélation entre le résultat du dosage de l'interféron- γ et le taux/type d'immunoglobulines produites n'a été mise en évidence dans l'étude de Rodríguez-Cortés et al. (2007). D'après cette dernière étude, le profil immunitaire des chiens asymptomatiques semblait pouvoir se révéler très hétérogène, que ce soit au niveau de la réponse immunitaire cellulaire ou

humorale, avec des corrélations entre les deux très variables. Par ailleurs, les résultats des trois tests basés sur la réponse cellulaire (à savoir test de Monténégro, de prolifération cellulaire ou dosage de l'interféron- γ) ne coïncident pas toujours, ce qui soutient l'idée qu'ils évaluent des composantes différentes de ce type d'immunité.

3. Bilan : avantages et inconvénients des méthodes de diagnostic

Dans l'étude de Baxarias et al. (2022), sont analysées les méthodes de diagnostic et les mesures préventives utilisées dans les pays européens endémiques (principalement Espagne, Italie puis Portugal) de 2012 à 2018 dans l'espèce canine (3762 chiens). Cette dernière révèle que parmi les méthodes de diagnostic sérologiques, les tests rapides sont les plus utilisés par les vétérinaires (56,7%), suivis de la technique ELISA (34,1%) et de l'IFAT (7,4%). Ces données sont problématiques car les tests rapides peuvent, comme vu précédemment, mener à des résultats faussement négatifs notamment dans des zones géographiques où la prévalence est élevée.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Parasitologique	-Spécificité très élevée -Faible coût -Mise en évidence directe du parasite	-Manque de sensibilité : charge parasitaire généralement faible dans les échantillons prélevés
Sérologique quantitative	-Intérêt pronostique avec la sérologie quantitative (suivi du titre en anticorps) avec détermination du stade clinique -Sensibilité très élevée	-Sous-estimation de la séroprévalence dans les zones endémiques -Interférence possible avec la vaccination, les anticorps d'origine maternelle, réactions croisées avec les trypanosomes (faux positifs) -Non détection des cas encore en séroconversion lors de début d'infection (faux négatifs) -Mise en évidence de la réaction immunitaire uniquement -Grande variabilité de la technique selon le laboratoire
Sérologie qualitative	-Existence de tests rapides et faciles à utiliser	-Fournit seulement un résultat négatif ou positif -Sensibilité variable avec valeur prédictive discutable dans les zones de prévalence élevée -En cas de résultat positif, une sérologie quantitative doit être réalisée
Moléculaire	-Spécificité et sensibilité élevées -Intérêt pronostique avec la PCR quantitative (suivi de la charge parasitaire)	-Meilleure sensibilité sur des prélèvements nécessitant des mesures invasives -Coût assez élevé -Pas d'indication sur la réponse immunitaire de l'individu -Contamination extérieure possible (faux positifs)
Immuno-phénotypage	-Intérêt pronostique	-Pas de techniques standardisées -Sensibilité et spécificité insuffisantes

Tableau 11: Avantages et inconvénients des principaux types de diagnostic de laboratoire.
Source : Solano-Gallego et al. 2011a)

4. Bilan sur la démarche diagnostique à adopter en fonction de la situation

Le diagnostic de leishmaniose chez un chien est complexe puisqu'il s'agit d'une maladie avec un grand polymorphisme clinique. D'autre part, l'existence d'infections subcliniques et d'une interférence possible des tests sérologiques avec la vaccination ajoutent de la difficulté. La démarche diagnostique à adopter doit nécessairement tenir compte de l'objectif initial du diagnostic (Solano-Gallego et al. 2017) :

- Confirmation ou non la maladie en présence de signes cliniques évocateurs de leishmaniose ;
- Dépistage :

- de chiens cliniquement sains pour des enquêtes épidémiologiques,
- de reproducteurs
- avant la vaccination
- ou encore avant un don de sang.

Comme un vaccin est disponible en Europe, il est conseillé de réaliser un test sérologique avant de vacciner un chien. Par ailleurs, un test annuel pourrait être utilisé chez les chiens vivant en zone endémique afin de différencier une infection progressant vers une maladie clinique d'une infection subclinique.

Méthode	Objectif	
	Individu avec signes cliniques compatibles	Études de prévalence (épidémiologie-surveillance)
Cytologie	++	-
Histologie	++	-
Culture	++	-
Méthodes moléculaires	++	++
IFAT	++	+++
ELISA	++	+++
Tests Rapides d'immunochromatographie	++	++
DAT	++	+

Tableau 12 : Principales indications des méthodes de diagnostic disponibles pour la leishmaniose canine. +++ : recommandé, ++ : recommandé mais avec précautions, + : possible avec précautions, - : non recommandé.

Source : Organisation Mondiale de la Santé Animale

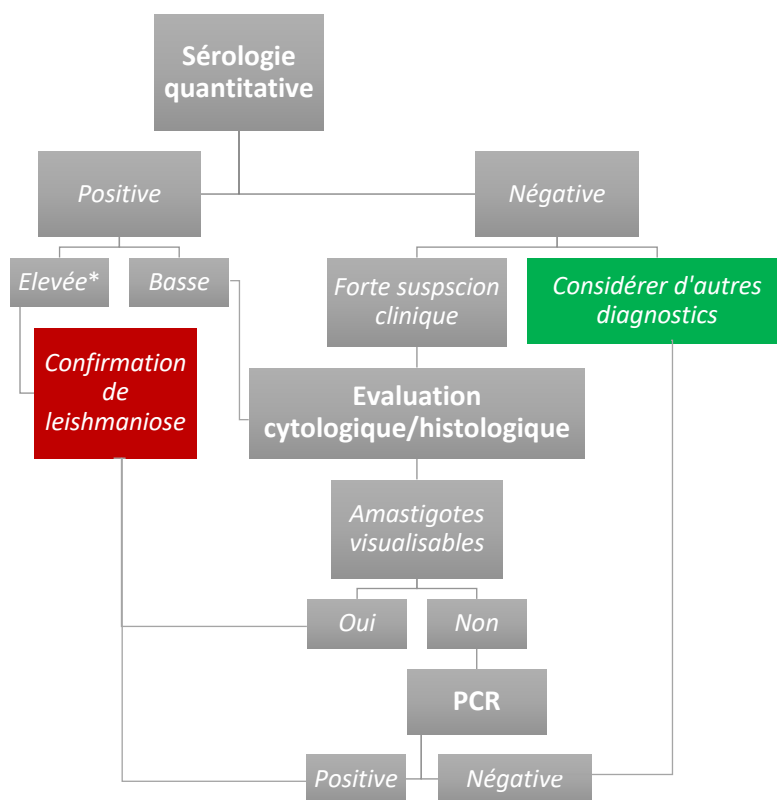


Figure 26 : Démarche diagnostique recommandée pour un animal avec des signes cliniques et/ou anomalies clinico-pathologiques compatibles avec la leishmaniose canine.

*Taux sérologique 3 à 4 fois supérieur au seuil de référence établi par le laboratoire. Source : (Solano-Gallego et al. 2011a)

6) Gestion médicale

Les traitements actuellement disponibles pour la leishmaniose canine ne permettent pas d'éliminer le parasite mais peuvent seulement réduire le nombre et la sévérité des signes cliniques. Dans certains cas, l'animal peut devenir infecté asymptomatique avec une charge parasitaire moindre et ainsi une diminution du risque de transmission de leishmanies au vecteur. Cependant, les rechutes sont possibles et les traitements, en plus d'être coûteux, sont à administrer sur du long terme voire à vie pour certaines molécules (Beugnet et al. 2021). En plus du risque zoonotique, le propriétaire de l'animal doit donc prendre connaissance de ces différents aspects avant la mise en place d'un traitement.

A. Traitements spécifiques

1. L'antimoniote de méglumine

L'antimoniote de méglumine est la molécule de choix dans le traitement de la leishmaniose canine, et ce notamment dans le bassin méditerranéen. Pendant plus de cinquante ans, elle a également été utilisée dans le traitement de la leishmaniose humaine (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Commercialisée sous le nom de Glucantime® en France, elle aurait un rôle leishmanicide en améliorant la capacité phagocytaire des macrophages (Segarra 2021). Elle dispose donc d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) vétérinaire et s'utilise par cure de trente jours à raison d'une injection sous-cutanée par jour à la dose de 100 mg/kg. L'administration de deux injections à la dose de 50 mg/kg deux fois par jour est également possible. Pour les chiens de grande taille, la dose est limitée à 5 grammes par jour et par animal. Son utilisation est contre-indiquée en cas d'insuffisance rénale, cardiaque ou hépatique. En effet, cette molécule possède une néphrotoxicité potentielle. Cependant, en raison de son utilisation très répandue dans le monde entier pour des cas de leishmaniose canine, un phénomène de résistance de certaines souches de *Leishmania* spp. est désormais très fortement suspecté (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Cette molécule est la plupart du temps combinée à l'allopurinol pendant le premier mois de traitement. Cette association permet de diminuer le risque de rechute clinique ce qui lui confère une efficacité clinique supérieure à la monothérapie (Beugnet et al. 2021).

2. L'allopurinol

Malgré l'absence d'AMM vétérinaire disponible, l'allopurinol est également une molécule très couramment employée dans le traitement de la leishmaniose canine. En médecine humaine, elle est utilisée dans le traitement de la goutte mais très peu lors de leishmaniose. Elle possède une activité leishmaniostatique via l'inhibition d'une enzyme parasite provoquant le blocage de la synthèse d'ARN chez le parasite (Segarra 2021). L'allopurinol est administré par voie orale à la dose de 15 mg/kg deux fois par jour pendant six à douze mois. Au contraire de l'antimoniote de méglumine, il peut être utilisé même en cas d'insuffisance rénale avérée (Beugnet et al. 2021). Ainsi il est généralement administré avec cette dernière ou encore avec la miltéfosine, mais l'allopurinol peut être utilisé seul notamment lors de cas asymptomatiques. Bien qu'il soit

généralement bien toléré par l'organisme, cette molécule peut favoriser l'apparition d'uroli-thiases. En effet, elle entraîne le blocage d'une enzyme chez le chien, la xanthine oxydase, ayant pour conséquence d'empêcher la formation d'acide urique à partir d'hypoxanthine (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Il faut donc surveiller l'apparition d'une telle cristallurie chez le chien recevant ce traitement et adapter le dosage en fonction. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'existence de résistances de certaines souches de leishmanies à l'allopurinol. L'étude de Yasur-Landau et al. (2016) a permis de mettre en évidence une forme de résistance du parasite à l'allopurinol après isolation depuis des chiens ayant déjà reçu le traitement mais présentant une rechute clinique.

3. La miltéfosine

Également dépourvue d'AMM vétérinaire en France, la miltéfosine peut être utilisée à la place de l'antimoniote de méglumine, seule ou en association avec l'allopurinol. Cette molécule a cependant une AMM pour le chien dans d'autres pays Européens (Espagne, Italie et Portugal). Ainsi, il est possible de faire une demande d'importation depuis la France provenant du vétérinaire praticien. Cependant, cette action ne peut se faire que dans des cas bien précis en respectant le principe de la cascade. Le vétérinaire doit donc d'abord envisager le traitement de consensus à base d'antimoniote de méglumine associé à l'allopurinol. En cas d'impossibilité d'utilisation (insuffisance rénale aigue) ou d'échec thérapeutique, ce dernier peut faire une demande argumentée auprès de l'Agence Nationale du Médicament (ANSES) pour une importation de miltéfosine. En médecine humaine, elle est couramment employée dans le traitement des formes viscérales. En plus d'être toxique pour le parasite, la miltéfosine permettrait de stimuler la réponse immunitaire de l'hôte favorablement (Manna et al. 2009). Elle est dans ce cas administrée par voie orale à la dose de 2 mg/kg par jour pendant trente jours (Beugnet et al. 2021). Elle peut être utilisée même en cas d'insuffisance rénale avérée et permettrait même une diminution de la protéinurie. Toutefois des effets secondaires tels que des troubles digestifs avec essentiellement des vomissements et de la diarrhée sont rapportés dans l'espèce canine. Par ailleurs, elle posséderait un effet tératogène et abortif. D'après l'étude de Iarussi et al. (2020), l'emploi de la miltéfosine à la dose de 1,2 mg/kg pendant cinq jours puis à celle de 2,5 mg/kg pendant 25 jours permettrait de diminuer ces effets secondaires tout en offrant une meilleure efficacité clinique associée à une plus forte réduction de la charge parasitaire. Des phénomènes de résistance chez le chien sont aussi fortement suspectés pour cette molécule (Morales-Yuste et al. 2022).

4. Autres traitements décrits dans la littérature

D'autres molécules sont mentionnées dans la littérature mais leur efficacité clinique reste encore à démontrer : elles ne bénéficient donc pas d'AMM en France. La paromycine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides avec une activité anti-leishmanie qui pourrait être aussi efficace que l'antimoniote de méglumine lorsqu'utilisée en association avec l'allopurinol. L'amphotéricine B est un autre antibiotique de la famille des macrolides utilisé dans le traitement des cas de leishmanioses humaines. Cependant, son utilisation n'est pas conseillée à l'heure actuelle. En effet, son index thérapeutique est étroit et il est difficile de juger de la juste dose à administrer entre 0,5 et 0,8 mg/kg deux à trois fois par semaine jusqu'à atteindre une dose totale administrée de 6 à 16 mg/kg au total. Son administration exclusive par voie intraveineuse rend complexe son utilisation. Par ailleurs, des résistances sont suspectées pour cette molécule c'est pourquoi elle doit être réservée à la médecine humaine. D'autres molécules comme la marbofloxacin, le kétoconazole, l'enrofloxacin ou le métronidazole (Morales-Yuste et al. 2022). La dompéridone, commercialisée dans certains européens comme l'Espagne (Leishguard[®]) peut aussi être utilisée à la dose de 0,5 mg/kg une fois par jour par voie orale et pendant un mois pourraient être utiles lors de leishmaniose canine. L'emploi d'une supplémentation quotidienne en nucléotides pourrait également avoir un rôle thérapeutique. Notamment, elle pourrait remplacer l'allopurinol chez les chiens infectés en recevant déjà et souffrant d'une xanthinurie (Segarra 2021).

B. Traitements associés

Les traitements utilisables à associer aux traitements spécifiques précédemment décrits peuvent avoir comme objectif de mieux maîtriser la réponse immunitaire humorale mise en place suite à l'infection. En effet, les complexes immuns formés sont à l'origine de lésions organiques graves, c'est pourquoi leur diminution est souhaitable. Pour cela, une corticothérapie à base de prednisolone administrée à la dose d'1 mg/kg pendant 15-20 jours peut être employée (Beugnet et al. 2021). En cas d'insuffisance rénale associée, il est conseillé de suivre les recommandations de l'International Renal Interest Society (<http://iris-kidney.com/guidelines/recommendations.html>).

C. Bilan sur la stratégie thérapeutique à adopter

Le traitement spécifique à adopter chez le chien dépend du stade clinique de l'animal comme décrit en II-3)-F. Les animaux en stade I (maladie légère) peuvent ne pas être traités ou recevoir seulement de l'allopurinol. Il reste cependant recommandé de ne pas prescrire de traitements pour ces animaux en raison du risque d'émergence de nouvelles résistances. Lorsque le vétérinaire traitant décide de ne pas instaurer de traitement, un monitoring doit toutefois être réalisé pour suivre la progression de la maladie. Pour les stades II et III (atteinte modérée à grave), l'emploi d'antimoniote de méglumine par voie sous-cutanée pendant quatre à six semaines, associé à l'administration d'allopurinol pendant au moins six mois est recommandé. Comme vu ci-dessus, la miltéfosine peut aussi être utilisée comme alternative à l'antimoniote de méglumine dans certains cas particuliers (en cas d'insuffisance rénale avancée, ou en cas de mauvaise réponse au traitement spécifique). Enfin, les animaux en stade IV présentant des signes d'insuffisances rénales sévères ne doivent pas recevoir d'antimoniote de méglumine en raison de sa néphrotoxicité. Généralement, l'allopurinol est donc utilisé seul pour ces derniers. Enfin, une décision de fin de vie peut être prise par les propriétaires et exécutée par le vétérinaire praticien, notamment pour des individus en insuffisance rénale avancée. Les raisons pouvant motiver l'euthanasie de l'animal sont principalement la présence d'une personne immunodéprimée dans l'entourage de l'animal, un animal atteint avec des signes d'insuffisance rénale terminale ou de syndrome néphrotique (stade IV) ou bien un animal avec des rechutes importantes malgré le traitement déjà mis en place.

Principe actif	Voie d'administration	Dosage	Principaux effets secondaires
Antimoniote de méglumine	Sous-cutanée	100 mg/kg une fois par jour ou 50 mg/kg deux fois par jour, pendant 4 semaines	Néphrotoxicité, abcès cutanés, cellulite
Miltéfosine	Voie orale	2 mg/kg une fois par jour, pendant 28 jours	Vomissements, diarrhée
Allopurinol	Voie orale	10 à 15 mg/kg deux fois par jour pendant 6 mois minimum	Xanthinurie

Tableau 13 Principaux protocoles de traitement contre la leishmaniose canine.
Source : (Solano-Gallego et al. 2011a)

D. Suivi de la réponse thérapeutique

Afin d'évaluer la réponse au traitement, différents éléments peuvent être contrôlés. La réalisation d'un examen clinique complet et d'analyses de laboratoire classiques (numération-formule sanguine, analyses biochimiques et d'urine) sont utiles après la mise en place du traitement. La sérologie quantitative, associée ou non à la PCR quantitative, permet de suivre la progression ou la régression de la maladie via le suivi du titre en anticorps. Dans les six à douze mois suivant l'initiation du traitement, une nette réduction de ce dernier (environ deux à trois dilutions d'écart avec le titre sérologique initial) peut être observée et être le signe d'une bonne réponse thérapeutique. Au contraire, une augmentation du titre peut être considérée comme un marqueur de rechute, notamment si le traitement vient d'être arrêté. Dans ce cas, il faut alors envisager sa reprise (Solano-Gallego et al. 2011b).

Paramètres à contrôler	Chien infecté symptoma- tique	Chien infecté asymptomatique
Examen clinique, hémogramme, pro- fil biochimique +/- électrophorèse des protéines sériques, analyse d'urine +/- RPCU	Après le premier mois de traitement puis tous les 3-4 mois la première année	Tous les 3-6 mois
Sérologie quantitative	Pas avant les 6 mois sui- vant la mise en place du traitement, puis tous les 6- 12 mois	
PCR quantitative	Optionnel, à réaliser simul- tanément avec la sérologie	

Tableau 14 : Paramètres à surveiller après l'établissement d'un diagnostic de leishmaniose canine, d'après (Solano-Gallego et al. 2011b). RPCU : Rapport protéines/créatinine urinaires

7) Mesures préventives/de contrôle

La prévention de la maladie est possible grâce à l'établissement de plans de contrôles pouvant associer une ou plusieurs méthodes de lutte . Le contrôle du réservoir primaire est ici la priorité afin d'espérer obtenir un taux de reproduction de base inférieur à 1 : il s'agit des mesures préventives appliquées aux canidés domestiques, qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques. Le contrôle des réservoirs secondaires ne permettra pas d'éradiquer la maladie mais il peut contribuer à diminuer ce taux. Enfin, celui des réservoirs accidentels comme l'Homme n'aura aucun effet sur ce dernier.

Pour la leishmaniose canine, il existe ainsi deux grands types de mesures protectrices afin d'empêcher la transmission de la maladie entre le phlébotome et le chien :

- Celles permettant de protéger le chien du vecteur ;
- Celles permettant de le protéger du parasite.

A. Mesures protectrices contre le vecteur

Les mesures protectrices contre le vecteur comprennent trois catégories :

- L'emploi de barrières physiques ;
- L'application d'insecticides dans l'environnement ;
- L'application d'insecticides sur les chiens.

Concernant les barrières physiques, les moustiquaires imprégnées d'insecticides pourraient être efficaces pour empêcher le vecteur de piquer l'Homme mais pas pour réduire le taux de transmission entre chiens. Le fait d'empêcher les chiens de sortir durant la nuit et à l'aube permettrait également de limiter leur exposition aux phlébotomes. Il est donc recommandé de les garder à l'intérieur des habitations ou dans des niches fermées pendant les périodes d'activité du vecteur en zone d'endémie (Baxarias et al. 2022).

L'utilisation d'insecticides dans l'environnement par application sur des zones adjacentes aux habitations humaines comme sur les murs et les toits ou au sein de celui-ci a une efficacité très discutée. En effet cette méthode n'a pas fait ses preuves dans les zones où la densité de vecteurs est élevée. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'impossibilité de couvrir entièrement une

zone donnée et la relative courte de durée de vie des molécules employées (pyréthrinoïdes, au contraire du DDT autrefois utilisé et désormais interdit) (Quinnell, Courtenay 2009). L'utilisation de « foggers » pour éliminer les formes adultes est à ce jour inefficace et non réalisable sur du long terme pour des raisons économiques, techniques et environnementales. Par ailleurs, les habitats dans lesquels les phlébotomes se trouvent au cours de la journée sont relativement variés et difficiles à mettre en évidence. C'est notamment le cas pour les formes immatures du parasite (œufs, larves, nymphes). Cependant il est possible de détruire ces potentiels microhabitats pour phlébotomes : fissures, zones humides et ombragées... même si cette méthode ne semble pas réellement efficace (Otranto, Dantas-Torres 2013).

Enfin, l'utilisation d'antiparasitaires externes à base de pyréthrinoïdes sur le chien semble faire ses preuves avec des résultats en faveur d'une protection avérée contre l'infection. En effet, ces molécules ont un effet à la fois répulsif mais aussi létal sur le vecteur et permettent donc bien d'empêcher la piqure. Il peut s'agir de perméthrine, de deltaméthrine ou de fluméthrine (Baxarias et al. 2022). Les formulations disponibles sont le collier ou la pipette. Ces deux options ont cependant des inconvénients et avantages différents qu'il est important de prendre en compte afin de choisir la formulation la plus adaptée à l'animal et à son mode de vie. Pour le collier, il est recommandé de l'appliquer une à deux semaines avant une période à risque, contre deux jours pour une pipette (Solano-Gallego et al. 2011a). D'après l'étude de Silva et al. (2019) menée sur 1020 chiens au Brésil, l'emploi de colliers imprégnés de delthamétrhine serait un moyen efficace de protéger les chiens avec une efficacité estimée à 70,27%.

Molécule(s)	Nom commercial	Forme galénique	Durée d'action	Minimum d'âge/poids	Emploi sur femelle gestante/en lactation
Deltaméthrine	Scalibor®	Collier	12 mois	7 semaines	Gestation : non Lactation : oui
Imidaclopride, fluméthrine	Seresto®	Collier	8 mois	7 semaines	Gestation : non Lactation : non
Perméthrine, imidaclopride	Advantix®	Spot-on	2-3 semaines	1,5 kg et 7 semaines	Gestation : oui Lactation : oui
Perméthrine, fipronil	Effitix®	Spot-on	4 semaines	1,5 kg et 12 semaines	Gestation : +/- Lactation : +/-
Perméthrine, fipronil	Frontline Tri-Act®	Spot-on	3 semaines	2 kg et 8 semaines	Gestation : non Lactation : oui
Perméthrine	Pulvex spot sol cut Dognet®	Spot-on	1 semaine		Gestation : +/- Lactation : +/-
Perméthrine, dinotéfurane, pyriproxyfène	Vectra 3D®	Spot-on	4 semaines	1,5 kg et 7 semaines	Gestation : oui Lactation : oui

Tableau 15 : Comparaison des anti-parasitaires externes efficaces contre les phlébotomes disponibles sur le marché en France. Sources : Bourdoiseau, Chermette (2015) et Le Sueur-Almosni (2015)

Forme galénique	Avantages	Inconvénients
Collier	-Protection de longue durée	-Nécessite d'être correctement ajusté au cou -Peu adapté pour animal à poils longs -Risque de perte -Risque de léchage par un autre animal du foyer -Risque de manipulation par des enfants en bas âge
Spot-on	-Faciles à appliquer	-Toxicité pour les organismes aquatiques : ne pas baigner dans les 48h post-application -Durée d'action courte (généralement 1 mois)

Tableau 16 : Avantages et inconvénients des deux formulations disponibles contre les phlébotomes.

Source : Le Sueur-Almosni (2015)

B. Immunoprophylaxie

1. Les immunomodulateurs

L'immunothérapie pourrait jouer un rôle dans la prévention et le contrôle de la leishmaniose canine. En effet, en modulant la réponse immunitaire de l'hôte envers le parasite, elle pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la vaccination mais aussi des traitements disponibles. Parmi les immunomodulateurs disponibles, la dompéridone peut être citée. Commercialisée sous le nom de Leishguard[®] depuis 2016, il s'agit d'un antagoniste du récepteur à la dopamine 2. D'après Segarra (2021), cette substance active permettrait de diminuer la sévérité des signes cliniques et le taux sérique en anticorps chez les chiens infectés symptomatiques. Chez les chiens infectés asymptomatiques, elle pourrait aussi diminuer la séroconversion en stimulant la réponse immunitaire Th1. Selon Cavalera et al. (2021), la dompéridone serait bénéfique pour la fonction rénale chez les chiens infectés présentant une maladie rénale chronique. Les effets secondaires rapportés sont une galactorrhée, des troubles digestifs et une potentielle perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cependant, il existe peu d'études soutenant la réelle efficacité des immunomodulateurs, que ce soit pour une utilisation prophylactique ou thérapeutique (Segarra 2021).

2. La vaccination

La vaccination est une méthode préventive prometteuse et de nombreuses études ont fait l'objet de recherches sur l'élaboration d'un vaccin efficace. Bien que mettre au point un vaccin empêchant l'infection soit illusoire, ce dernier peut toutefois être capable de diminuer significativement la progression de la maladie mais aussi de diminuer la prévalence dans la population canine. En effet, en favorisant une réponse immunitaire cellulaire chez le chien, la vaccination peut ainsi permettre de réduire la charge parasitaire chez les chiens vaccinés infectés qui auraient ainsi une infectivité moindre pour le vecteur (Morales-Yuste, Martín-Sánchez, Corpas-Lopez 2022). Deux vaccins ont été développés en Europe : Canileish[®] mis sur le marché en 2011 mais retiré en 2021 et Letifend[®] introduit en 2016 et toujours disponible. Ce sont des vaccins dits de seconde génération car ils sont composés de fractions purifiées d'antigènes parasitaires ou de protéines recombinées de *L. infantum*. En effet, les vaccins de première génération (vivant atténué ou inactivé) n'ont pas fait leur preuve pour cette maladie (Morales-Yuste et al. 2022). Dans le reste du monde, seulement deux autres vaccins ont été commercialisés au Brésil : Leishimmune[®] et Leish-tec[®]. Face à des doutes concernant son efficacité, le vaccin Leishimmune[®] a également été retiré du marché en 2014 (Baxarias et al. 2022). Attester de la réelle efficacité d'un vaccin nécessite des études de terrain menées sur un grand nombre d'individus sur une longue période dans des zones endémiques. Toutefois, l'infection naturelle des chiens par le parasite reste difficile à contrôler même dans ces conditions c'est pourquoi ce type d'étude est particulièrement difficile à mettre en œuvre.

a. Canileish[®]

Il s'agit du premier vaccin contre la leishmaniose canine commercialisé en Europe. Il a été élaboré par Virbac (France) avec une autorisation de mise sur le marché accordée en mars 2011. Il fait parti des vaccins parasitaires inactivés et est composé de protéines purifiées et excrétées par *L. infantum* (LiESP) ainsi que d'un adjuvant (extrait purifié de *Quillaja saponaria*).

b. Letifend®

i. Généralités

Ce deuxième vaccin a été commercialisé en février 2016 par le laboratoire Leti (Espagne). Il s'agit d'un vaccin recombinant non adjuvé contenant une protéine chimérique Q. Cette dernière a été obtenue par génie génétique à partir de cinq fragments antigéniques issus de quatre protéines de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP0, H2A). Le schéma de primovaccination consiste en une seule injection par voie sous-cutanée à partir de six mois d'âge. Un rappel doit ensuite être effectué chaque année. Il est également recommandé pour ce vaccin de réaliser un test de dépistage sur tous les chiens avant de les vacciner.

ii. Efficacité

Avant la commercialisation du Letifend®, une étude préliminaire a permis d'évaluer l'immunogénicité induite par l'administration de 100 µg de la protéine Q sans adjuvant (Carcelén et al. 2009). 21 Beagles ont été répartis en trois groupes : 7 n'ont pas reçu d'injection (groupe T), 7 ont reçu seulement une dose de protéine Q (groupe Q) et les 7 derniers ont reçu une double dose à 21 jours d'intervalle (groupe Q+Q). 60 jours après l'injection, les chiens ont été infectés expérimentalement par des formes promastigotes de *L. infantum* par voie intraveineuse. Le suivi de ces chiens sur 330 jours a permis de mettre en évidence une protection contre le risque de développer des signes cliniques induite par la vaccination puisque 6/7 chiens du groupe T ont développé des signes compatibles avec la leishmaniose contre 1 pour le groupe Q et 2 pour le Q+Q. Par ailleurs, les groupes Q et Q+Q n'ont pratiquement pas montré d'anomalies hématobiochimiques et de lésions histologiques au niveau de la rate, du foie et des reins au contraire du groupe T. En parallèle, les groupes Q et Q+Q avaient une charge parasitaire moindre après réalisation de cultures et de PCR. Les tests sérologiques ELISA et IFAT ont révélé un taux sériques an IgG2 anti-antigènes solubles de leishmanies bien plus élevé pour le groupe contrôle que pour les chiens vaccinés, notamment à J-330 post-infection. Le Western Blotting a également montré que les chiens du groupe Q avaient des IgG2 dirigés contre quelques antigènes parasitaires seulement au contraire du groupe T. La quantification de d'oxyde nitrique et le test de Montenegro étaient en faveur d'une réponse immunitaire cellulaire bien plus présente chez les chiens vaccinés. Ainsi, l'administration de protéines Q sans adjuvant (équivalente à la

composition du Letifend®) s'est révélée efficace dans cette étude et d'autant plus pour les chiens qui n'ont reçu qu'une seule dose (groupe Q).

L'étude de Fernández Cotrina et al. (2018) menée sur 549 chiens vivant dans des zones endémiques de leishmaniose (en France et en Espagne) et sur deux ans a servi d'étude de terrain pour la phase III du vaccin. Les chiens étaient d'âge et de races différents, appartenaient à des propriétaires et ont été exposés naturellement aux parasites en étant gardés à l'extérieur. Un chien était considéré comme positif lors de présence de signes cliniques compatibles avec la leishmaniose, une sérologie positive et si le parasite était détectable dans des échantillons de moelle osseuse ou de nœuds lymphatiques. A la fin de l'étude, 4,7% des chiens vaccinés (n=8) et 10,2% des chiens du groupe contrôle (n=19) étaient positifs à la leishmaniose avec une différence significative ($p=0,048$). Ainsi, l'efficacité du vaccin a été estimée à 72%.

Une étude plus récente menée sur 44 Beagles a également montré une diminution de la présence d'immuns complexes après détection par ELISA suite à l'infection chez les chiens vaccinés par Letifend®, en comparaison avec les chiens non vaccinés (Cacheiro-Llaguno et al. 2020).

iii. Sûreté

D'après le résumé des caractéristiques du produit (RCP), seul un prurit localisé au niveau du site d'injection survenant juste après l'injection et auto-résolutif dans les 4 heures est mentionné. En parallèle, certaines études ne rapportent pas la survenue d'effets secondaires suite à la vaccination (Carcelén et al. 2009 ;Fernández Cotrina et al. 2018). D'après le RCP, la vaccination des chiens infectés ne présenterait aucun risque mais n'induirait pas pour autant de bénéfices. Comme pour Canileish®, il n'est pas non plus recommandé de vacciner les chiennes gestantes ou en lactation.

c. Éradication des chiens parasités

Dans certaines régions au Brésil ou en Chine, l'abattage des chiens atteints de leishmaniose a été pratiqué dans le cadre de la politique gouvernementale de ces pays même si cette méthode n'est ni éthique, ni d'efficacité réellement prouvée dans certaines zones de forte endémicité. En effet, elle ne semble efficace que si un grand nombre de chiens positifs est abattu mais cette

efficacité serait inférieure à la pratique de la vaccination d'après la littérature (Quinnell, Courtenay 2009). Notamment, l'étude de Dantas-Torres et al. (2019) soutient l'idée que l'abattage des chiens infectés, qu'ils soient symptomatiques ou asymptomatiques, ne doit plus être employée comme méthode de lutte. Désormais, cette pratique n'est plus réalisée au Brésil.

D. Recommandations sur les mesures préventives à adopter

Comme vu précédemment, il peut être utile de rentrer les chiens dans un espace clos au crépuscule pour limiter leur exposition aux phlébotomes. Face à une lutte chimique dans l'environnement très difficilement réalisable, les seules mesures de protection contre le vecteur qui sont réellement efficaces sont les antiparasitaires externes adaptés chez le chien. Ces derniers doivent être utilisés pendant toute la saison de transmission tout en tenant compte les particularités de la formulation choisie (mode d'application, durée d'action, ...). Concernant l'efficacité des immunomodulateurs chez le chien, des études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux l'évaluer. Un seul vaccin contre la leishmaniose est disponible à l'heure actuelle en Europe. Il permet de réduire le risque de développement d'une maladie clinique. Cependant, ce dernier n'empêche pas l'infection. Pour conclure, la prévention contre la leishmaniose canine doit toujours comprendre l'application d'antiparasitaires externes topiques *a minima*. Dans l'idéal, une approche multimodale en combinant ces derniers à la vaccination doit être adoptée pour les chiens vivant ou voyageant en zones d'endémie. La vaccination est d'autant plus recommandée si le chien passe la plupart de son temps en extérieur. Enfin, elle ne l'est pas si une séropositivité a déjà été mise en évidence (Solano-Gallego et al. 2011a).

D'après l'étude de Baxarias et al. (2022) menée sur 3762 chiens entre 2012 et 2018 dans certains pays d'Europe endémiques de leishmaniose canine, la mesure préventive la plus employée est l'utilisation d'antiparasitaires externes à effet répulsif. Plus de 90% des chiens inclus dans l'étude ont reçu un antiparasitaire et/ou un vaccin et/ou un immunomodulateur. La vaccination serait la deuxième mesure la plus employée alors que les immunomodulateurs sont moins utilisés. Ces derniers le sont surtout pour des chiens de petite taille dans l'idée que ces derniers seraient de moins bons candidats à la vaccination en raison d'un risque moins négligeable d'effets secondaires. Ainsi ces données montrent que les vétérinaires des pays endémiques d'Europe suivent les recommandations actuelles en privilégiant les antiparasitaires externes en priorité, suivis de la vaccination.

III. Travail personnel

A. Données de séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer Cévenol et interférences de la vaccination anti-*Leishmania* avec les tests sérologiques

1) Séroprévalence et dynamique de l'infection dans les Cévennes

Alors que l'étude de Le Rutte et al. (2021) rapporte la présence d'un foyer de leishmaniose canine dans les Cévennes avec une incidence plus élevée par rapport au reste du Sud de la France, l'absence de données précises empêche une estimation récente de la prévalence de la maladie dans cette région. Grâce à l'étude d'Anaïs Bossa (thèse d'exercice soutenue en 2022), la séroprévalence a été évaluée à 10,9% en utilisant une méthode ELISA (*Leishmania infantum* IgG ELISA[®], Bordier[®]).

Le foyer cévenol est une zone géographique favorable à la présence des phlébotomes ce qui favorise ainsi la transmission du parasite au sein de la population canine. D'après l'étude de Prudhomme et al. (2015) menée dans une commune du Gard nommée Roquedur (30440), la densité et la diversité des espèces de phlébotomes n'auraient pas évolué entre 1977 et 2013. Dans cette zone du foyer cévenol, les espèces majoritaires étaient *P. ariasi* et *S. minuta* devant *P. perniciosus*. Il est rapporté que l'activité des phlébotomes est maximale en juillet-août. L'étude des facteurs environnementaux ont mis en évidence un effet positif de la température et un effet négatif de l'humidité relative sur la présence de *P. ariasi*. Concernant l'altitude optimale pour *P. ariasi* et *P. perniciosus*, elle se situerait entre 300 et 400 m avec une densité de vecteurs décroissante au-delà de 500 mètres. Rioux & Golvan ont réalisé en 1969 un graphique décrivant la répartition des trois espèces de phlébotomes les plus rencontrées dans le foyer cévenol en fonction du biotope et de l'altitude (figure 27). Selon Keck & Dereure (2003) qui ont mené une étude de séroprévalence menée dans les Cévennes et donc dans des localités étudiées proches de ce travail et de celui de Bossa (2022), la prévalence de la leishmaniose canine serait dépendante du type de végétation. Elle serait plus élevée dans l'étage de la chênaie d'Yeuse (présence de chênes verts) que dans celui de la chênaie mixte (où plusieurs espèces de chênes sont présentes).

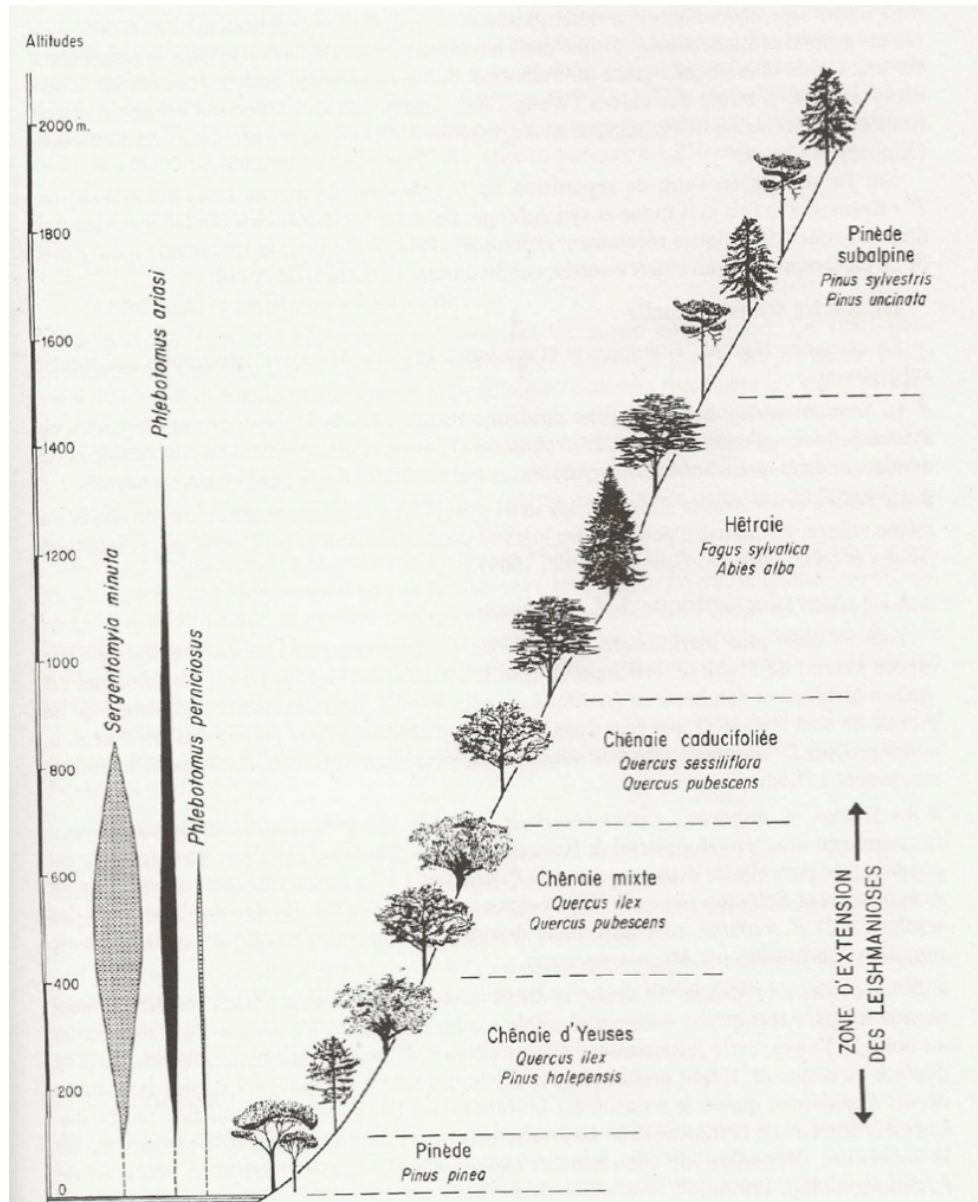


Figure 27 : Répartition et fréquence de *P. perniciosus*, *P. ariasi* et *S. minuta* en fonction de l'altitude et des étages de végétations dans le Languedoc. Source : Rioux et al., (1969)



Figure 28 : Photographie d'une zone géographique avec chênaie d'Yeuses (Saumane, 30125, 350 mètres d'altitude). La présence de chênes verts est ainsi notable. Source : photographie originale

2) Interférence de la vaccination avec les tests sérologiques

La vaccination est une méthode prometteuse dans l'objectif de contrôler la maladie au sein de la population canine en limitant sa progression après infection. Elle peut cependant induire une possible interférence avec les tests sérologiques standards du fait d'une réaction croisée avec les anticorps produits. Les vaccins disponibles (Letifend[®]) ou ayant été disponibles en Europe (Canileish[®], retiré du marché en 2021) sont susceptibles de générer une séroconversion détectable par les tests sérologiques couramment employés. Ainsi, les recommandations à l'heure actuelle sont de ne vacciner que les chiens séronégatifs et d'utiliser un test de dépistage avant la primovaccination. Toutefois, aucun consensus n'indique quel test utiliser. Dans l'étude de Bossa en 2022, cette potentielle interférence avec la vaccination a mis en évidence les limites de la sérologie lorsqu'utilisée comme seule méthode de dépistage. Ainsi, l'interprétation des tests sérologiques positifs chez les chiens vaccinés s'est avérée délicate avec une détection d'anticorps présente pour 17,2 à 44,8% des chiens vaccinés (en fonction du test utilisé).

1. Interférence avec Canileish®

D'après le résumé des caractéristiques du produit, une interférence du vaccin Canileish® avec la technique IFAT est possible. Selon Solano-Gallego et al. (2017), le taux sérique en anticorps induits atteindrait un pic environ deux semaines après la troisième injection de primo-vaccination, avec une persistance allant de 4 à 12 mois. Plusieurs études ont obtenu des résultats en accord avec ce constat (Martin et al. 2014). Dans l'étude de Montoya et al. (2021), des anticorps anti-leishmanies ont été détectés par IFAT pour 31,9 à 40,3% des chiens de l'étude un mois après vaccination et pour 3,2% des chiens au bout d'un an. Selon Velez et al. (2020), une interférence avec les tests ELISA utilisant des antigènes entiers de *L. infantum* est aussi avérée. Dans cette étude, 74,1% des chiens vaccinés étaient séropositifs avec cette méthode à un mois post-vaccination, moment où le pic en anticorps vaccinaux serait présent. Les recommandations du fabricant soutiennent qu'il est possible d'utiliser des tests sérologiques rapides comme le Speed Leish K™ afin de diagnostiquer la maladie même si le chien est vacciné avec Canileish®. Cependant, d'après Solano-Gallego et al. (2017), ce test ne serait pas capable de différencier les anticorps vaccinaux de ceux induits après une infection. Par ailleurs, il fournit seulement un résultat qualitatif et la sensibilité pourrait s'avérer insuffisante. L'utilisation de ce test afin de s'assurer de la séronégativité d'un chien avant de le vacciner pourrait donc conduire à la vaccination d'animaux séropositifs (Solano-Gallego et al. 2014). Il n'est donc pas envisageable de se limiter à leur utilisation au détriment des tests sérologiques quantitatifs, comme l'ELISA ou l'IFAT. Enfin, il semblerait que le taux d'anticorps vaccinaux à l'origine de réactions croisées avec les tests sérologiques soit moindre un an après la vaccination avec une nette décroissance au cours du temps. Pour autant, aucune étude ne porte sur leur évolution après le rappel annuel (Solano-Gallego et al. 2017). D'après Lima et al. (2019), il n'est donc pas possible de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés avec les techniques IFAT, ELISA utilisant des antigènes entiers et le test d'agglutination directe. Dans cette étude, la comparaison de deux séro-réactivités envers une protéine recombinante du parasite (rK39) et les antigènes de promastigotes entiers de *L. infantum* aurait montré une sensibilité de 92,3% et une spécificité de 95,4% pour la distinction des chiens vaccinés non-infectés des chiens infectés et non-infectés.

2. Interférence avec Letifend®

A l'heure actuelle, il existe peu d'études dans la littérature portant sur la possible interférence du vaccin Letifend® avec les tests sérologiques. Le résumé des caractéristiques du produit ne fait pas non plus part de cette problématique et recommande seulement de ne vacciner que les chiens séronégatifs. Selon Carcelén et al. (2009), les chiens vaccinés avec Letifend® possèderaient un pic sérique d'anticorps IgG2 anti-protéine Q environ 2 semaines après la primovaccination avec une décroissance au-delà. Cependant, l'étude n'a été réalisée que sur 60 jours. Aucune autre étude ayant pour objectif de mieux caractériser cette réponse humorale au cours du temps et notamment suite au rappel annuel n'est disponible. Toujours d'après Carcelén et al. (2009), il semblerait que le vaccin ne puisse pas interférer avec les tests sérologiques comme l'IFAT et l'ELISA sur antigène soluble de *L. infantum*. Selon Solano-Gallego et al. (2017), les tests sérologiques couramment utilisés seraient bien capables de différencier les chiens vaccinés non infectés des chiens non vaccinés non infectés. Letifend® pourrait donc être considéré comme un vaccin « DIVA » pour Differentiating between Infected and Vaccinated Animals. L'étude de Iniesta et al. (2016) a en effet mis en évidence l'absence de détection des anticorps vaccinaux par les techniques IFAT, ELISA et par différents tests rapides après vaccination. Toutefois, ces résultats sont à considérer avec précautions puisque le groupe des chiens vaccinés ne comportait que 10 chiens et que l'étude a été menée par le laboratoire ayant mis au point le vaccin.

3. Intérêt du Western blot

Selon Olías-Molero et al. (2019), la technique Western Blot serait une méthode de diagnostic sérologique particulièrement sensible et précoce. Bien qu'il n'existe pas de consensus sur le pattern des bandes pouvant être caractéristique d'une infection par *L. infantum* chez le chien contrairement à la maladie chez l'Homme. Il semblerait que la combinaison de plusieurs bandes indicatrices d'une immunoréactivité contre certains antigènes du parasite puisse augmenter la sensibilité et la spécificité de la technique. Dans la littérature, plusieurs études ont tenté de caractériser le pattern évocateur d'une infection. D'après Riera et al. (1998), la détection de bandes de bas poids moléculaires permettrait d'obtenir des sensibilité et spécificité très élevées. Notamment, les bandes de poids moléculaires 12 et 14 kDa permettraient d'établir un diagnostic précoce de la maladie. Selon Iniesta et al. (2007) et Talmi-Frank et al. (2006), ce sont les bandes 14 et 16 kDa qui indiqueraient de façon fiable une infection précoce chez le chien.

B. Travail expérimental de thèse

1) Introduction au travail

Le projet expérimental de cette thèse a été réalisé en collaboration avec le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNRL) de Montpellier, sous la direction du Professeur Laurence Lachaud, en collaboration avec le Dr Emilie Bouhsira, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Il s'inscrit dans la continuité du travail effectué entre décembre 2021 et février 2022 par le Docteur Anaïs Bossa qui a ainsi constitué sa thèse d'exercice. Ce dernier avait pour but (i) d'évaluer la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes, (ii) de connaître l'utilisation des mesures préventives par les propriétaires et leurs connaissances de la maladie, et (iii) de comparer les performances diagnostiques de quatre tests sérologiques.

L'objectif de l'étude actuelle, détaillée dans ce manuscrit, était (i) d'étudier la dynamique de l'infection en suivant l'évolution du statut sérologique des chiens prélevés lors des deux enquêtes et (ii) d'évaluer l'apport de la technique western-blot, en particulier pour la distinction entre les chiens vaccinés et non vaccinés.

2) Matériel et méthodes

1. 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 des chiens prélevés ont été informés du protocole de recherche et de ses objectifs, des conditions de prélèvements et de l'accord du comité d'éthique par téléphone avant notre venue. Un consentement éclairé écrit a été recueilli avant chaque début de prélèvement (annexe 1).

2. Zone d'étude

La zone d'étude était localisée dans les Cévennes et recouvrait une superficie totale d'environ 1200 km² (figure 29). Les localités concernées sont représentées par des points sur la carte ci-dessous (figure 30). En bleu sont représentées les 11 localités ayant déjà fait l'objet de

prélèvements l’an dernier avec : Lauroux (34700), Trèves (30750), L’Estréchure (30124), Sou-dorgues (30460), Boisset-et-Gaujac (30140), Cardet (30350), Agonès (34190), Causse-de-la-Selle (34380), Puéchabon (34150), Aniane (34150) et Saint-Jean-de-Fos (34150). Les symboles verts correspondent aux quatre nouvelles localités incluses dans l’étude 2022 et comprennent : Sauclières (12230), Saint-André-de-Valborgne (30940), Saint-Bauzille-de-Putois (34190) et Teyran (34820). Ainsi huit localités sont situées dans le département de l’Hérault (34), six dans le Gard (30) et une dans l’Aveyron (12).



Figure 29 : Carte représentant la situation géographique du foyer Cévenol (en rouge) en France.

(Source : Google Maps).

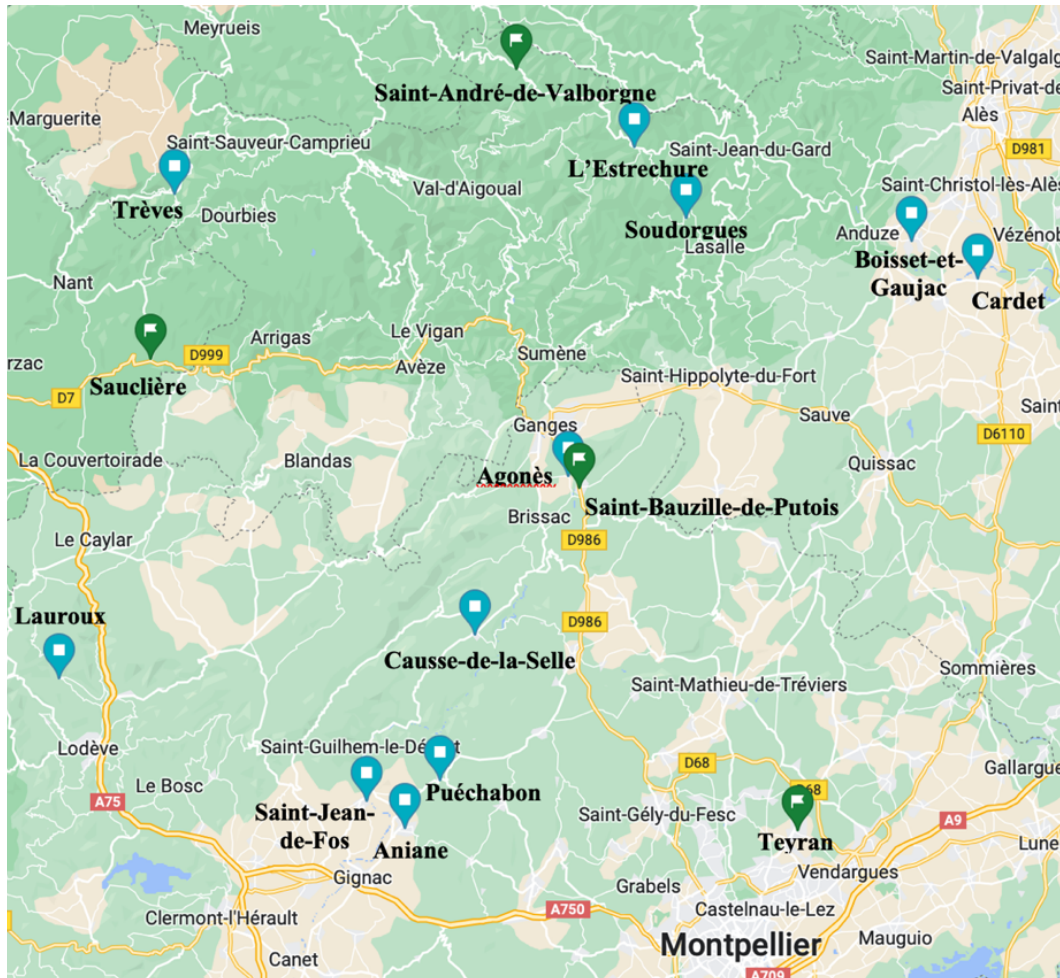


Figure 30 : Carte représentant les lieux d'échantillonnages avec en bleu les localités de l'hiver 2021-2022 et en vert celles de l'hiver 2022-2023

Source : Google Maps : (<https://www.google.com/maps/@43.7916003,3.3577384,10z/data=!4m2!10m1!1e1>, consulté le 16/04/2023

3. Recrutement de la population canine étudiée

Les propriétaires des chiens participant à l'étude ont été recrutés grâce à des appels téléphoniques passés entre décembre 2022 et janvier 2023. Tous les propriétaires ayant accepté de participer à l'étude de l'année précédente ont ainsi été recontactés et la grande majorité d'entre eux ont souhaité maintenir leur participation à l'étude (n = 13/16). De nouveaux contacts ont été obtenus grâce à des connaissances provenant de ces propriétaires mais aussi par appels téléphoniques et mails envoyés auprès des présidents de différentes sociétés de chasse de la région (Société communale de chasse de Puéchabon et Fédération de Chasse de l'Hérault notamment). Au total, 20 propriétaires ont souhaité participer à notre étude sur la base du volontariat.

Les chiens inclus 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 janvier à février 2023, en dehors de la période d'activité des phlébotomes, donc hors saison de transmission de *L. infantum*.

4. Recueil d'informations

Les informations relatives aux chiens prélevés et à leur milieu de vie ont été collectées grâce à des questionnaires fournis (cf. Annexe 2). 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 (par exemple 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. Le questionnaire est consultable en Annexe 3. Enfin, un examen clinique a été réalisé sur chaque animal avant prélèvement afin de détecter des signes cliniques compatibles avec la leishmaniose ou bien de constater ceux déjà connus et rapportés par le propriétaire.

5. Prélèvement des échantillons

Grâce à une contention adéquate, la prise de sang a été réalisée au niveau des veines céphaliques ou jugulaires selon le format et la conformation de l'animal, son tempérament ou encore la

longueur de ses poils : environ cinq millilitres de sang ont été prélevés dans un tube sec (figure 31). Les échantillons, stockés à température ambiante, ont été 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 a été extrait depuis les tubes secs et placé dans des tubes à hémolyse. Tous les échantillons ont par la suite été conservés dans un congélateur à -80°C en attendant les analyses.



Figure 31 : prise de sang effectuée à la veine céphalique chez l'un des chiens inclus dans l'étude.
Source : photographie originale

6. Techniques sérologiques utilisées

- **Technique ELISA Bordier®** :

La première technique de laboratoire utilisée pour détecter des anticorps spécifiques anti-*Leishmania* potentiellement présents dans le sérum des chiens prélevés était *Leishmania infantum* IgG ELISA® (Bordier® Affinity Products, Suisse). Il s'agit d'une méthode commerciale de diagnostic sérologique quantitatif utilisant comme antigènes des promastigotes entiers et solubles de *L. infantum*. Il a été conçu pour déceler les anticorps anti-leishmanies présents dans le sérum d'humains et de chiens, avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 95%. Le kit a été

utilisé selon les recommandations du fabricant. Ce dernier mentionne qu'un échantillon est considéré comme positif si le titre en anticorps est supérieur à 1. Il s'agit donc du seuil qui a été choisi pour cette étude.

- **Technique Western Blot LDBIO®** :

La seconde technique employée est une autre méthode de diagnostic sérologique qualitatif appelée western blot et réalisée grâce au kit *Leishmania Western Blot IgG®* (LDBIO®). Ce test comporte la présence des antigènes 14 kDa et 16 kDa spécifiques de *L. infantum*. Ces derniers ont été fixés par électro-transfert sur des feuilles de nitrocelluloses qui ont ensuite été découpées en 24 bandelettes identifiées de 1 à 24. Le kit a également été utilisé selon les recommandations du fabricant : chaque échantillon sérique à tester a été incubé séparément avec une bandelette. Après l'ajout d'un conjugué spécifique (Phosphatase alcaline anti-IgG), les antigènes reconnus par les anticorps spécifiques éventuellement présents dans les échantillons ont ainsi pu être révélés grâce à l'observation directe de bandes transversales violettes.

7. Analyses statistiques

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

Les résultats des deux tests sérologiques ont été analysés afin de calculer les pourcentages de résultats positifs et négatifs sur la population totale, sur celles des chiens non vaccinés et celle des vaccinés. La comparaison des moyennes des titres sérologiques en ELISA a été réalisée grâce à un test T de student. Pour les comparaisons des pourcentages, un test exact de Fisher a été utilisé pour la méthode ELISA en raison d'un effectif faible et un test du χ^2 a été choisi pour le Western Blot. Afin de comparer les performances des tests et en l'absence de gold standard clairement défini, ces dernières ont été calculées grâce à la méthode « Bayesian latent class analysis ». Par ailleurs, les performances du test *Leishmania infantum* IgG ELISA® de Bordier® ont aussi été comparées avec le test *Leishmania Western Blot IgG®* de LDBIO® qui a dès lors été choisi comme référence. Nous avons également déterminé le coefficient de Kappa de Cohen entre les deux tests afin d'apprécier la concordance de leurs résultats. Sa valeur est comprise entre -1 et 1, et plus elle est proche de 1, meilleure est la concordance entre les

résultats des deux tests. Si elle 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.

Enfin, les pourcentages de chiens séropositifs ont été comparés entre 2022 et 2023 avec un test de Mac Nemar. Une incidence annuelle a également pu être calculée.

3) Résultats

1. Description analytique de la population canine étudiée et des lieux de vie

- **Caractéristiques de la population canine étudiée**

Dans cette étude, 192 chiens ont été prélevés. Parmi eux, 88 avait déjà été prélevés lors de la campagne précédente. 104 individus supplémentaires provenant de nouvelles localités ont pu être inclus. La population canine étudiée était majoritairement composée de chiens de chasse (96% (186/192)). Ainsi seulement 4% des chiens inclus dans l'étude étaient des chiens de compagnie (8/192). Le *sex ratio* mâle/femelle était de 1,04 avec 98 mâles pour 94 femelles. Parmi les 192 chiens, 81% (156/192) étaient des chiens de race et 19% (36/192) était croisés avec deux ou plusieurs races différentes. Le tableau 17 présente les effectifs par races représentées dans cette étude. L'âge moyen était de 4 ans et 2 mois et l'âge médian de 4 ans. 25% des chiens (48/192) possédaient des poils mi-longs et 75% (144/192) des poils courts. Seulement deux chiens avaient des poils jugés « longs ».

Races	Effectif
Races croisées	36
Bruno du Jura	27
Petit Bleu de Gascogne	20
Griffon bleu de Gascogne	18
Grand Gascon Saintongeois	13
Beagle	11
Bruno Saint-hubert	11
Griffon Vendéen	9
Fauve de Bretagne	6
Ariégeois	4
Fox terrier	4
Anglo-français de petite vénerie	4
Chien courant bernois	3
Porcelaine	3
Teckel	2
Dogue Argentin	2
Griffon Nivernais	2
Malinois	2
Cursinu	2
Jagdterrier	2
Braque Allemand	1
Chien courant slovaque	1
Griffon Nivernais	1
Épagneul Breton	1
Ours de Carélie	1
Setter anglais	1
Courant suisse	1
Pointer	1
Border Collie	1
Springer Anglais	1
American Bully	1

Tableau 17 : Effectifs par races représentées par les chiens de l'étude

Sur les 20 propriétaires qui ont accepté de participer à l'étude, 14 ont rapporté posséder ou avoir possédé un chien atteint de leishmaniose canine. Au moment des prélèvements, 7% (13/192)

des chiens avaient été diagnostiqués comme atteints de leishmaniose par leur vétérinaire traitant ou au cours de l'étude de l'année précédente. 13,5% (26/192) présentaient des signes cliniques compatibles avec la maladie au moment du prélèvement. La figure 32 montre les effectifs correspondant aux principaux signes cliniques rencontrés. Les signes les plus fréquents étaient cutanés avec 7 chiens présentant des lésions compatibles avec la leishmaniose canine avec par exemple des lésions de type ulcérateur (figure 33).

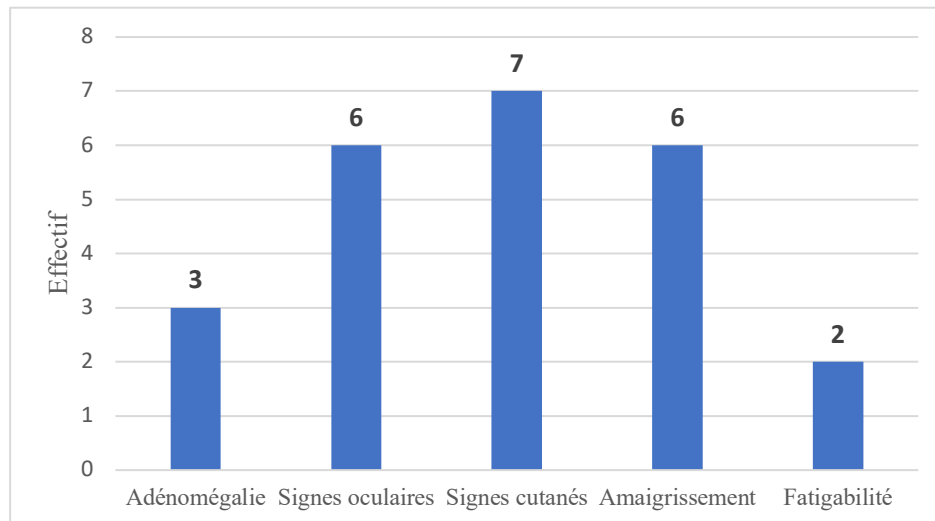


Figure 32 : Effectifs par grand type de signes cliniques rencontrés dans l'étude



Figure 33 : Photographies de lésions cutanées de type ulcérateur sur deux chiens de l'étude compatibles avec la leishmaniose canine. Source : photographies originales

7,2% (14/193) recevaient ou avaient déjà reçu un traitement contre la leishmaniose canine (à base d'antimoniote de méglumine et/ou allopurinol et/ou miltéfosine).

Concernant les mesures préventives appliquées, elles étaient considérées comme adaptées à la lutte contre les phlébotomes si elles consistaient 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. Dans notre étude, 25% chiens (48/192) recevaient des antiparasitaires externes adaptés pendant la période d'activité des phlébotomes. Parmi eux, 38% (18/48) avaient un collier à base de deltaméthrine (Scalibor®) ou de fluméthrine/imidaclopride (Seresto®). 62% (30/48) recevaient des pipettes à base d'imidaclopride et de perméthrine. 34 chiens étaient vaccinés et avaient donc reçu au moins une injection du vaccin Letifend® et/ou Canileish® au cours de leur vie. 85% d'entre eux étaient à jour de leur vaccination au moment du prélèvement (29/34). Tous ces chiens ont donc reçu une injection *a minima* du vaccin Letifend® dans l'année précédant la prise de sang effectuée, et 45% d'entre eux (13/29) avaient en plus reçu une ou plusieurs injections de Canileish® dans le passé, lorsque ce dernier était encore commercialisé. Par ailleurs, 15% des chiens (5/34) n'étaient pas à jour de leur vaccination et avaient reçu plusieurs injections de Canileish® auparavant. Enfin, 4,7% (9/192) de l'ensemble de la population canine étudiée possédait une protection antiparasitaire externe adaptée avec un schéma vaccinal complet à jour.

- **Description des lieux de vie des chiens**

Au total, 15 localités différentes ont été incluses dans l'étude. Dix des sites étaient dans des zones pouvant être qualifiées de rurales et cinq dans des zones périurbaines. Les altitudes étaient de 0 à 200 mètres pour cinq lieux de prélèvement, alors que sept étaient situés entre 200 et 400 mètres, trois entre 400 et 600 mètres et enfin un seul au-dessus de 600 mètres. Les caractéristiques des différents lieux de vie des chiens sont présentées en annexe 4. Concernant leur mode de vie, 65% (126/192) vivaient en extérieur strict, 4% (8/192) à la fois en intérieur et extérieur à temps égal, 30% (57/192) en extérieur la plupart du temps et un seul en intérieur la plupart du temps. Leur lieu de couchage a également été étudié (figure 34). 6% (12/192) des chiens dormaient en intérieur strict, 67% (128/192) dehors avec une niche ouverte, 23% (45/192) dehors avec une niche fermée, et 9% (18/192) dehors sans niche.

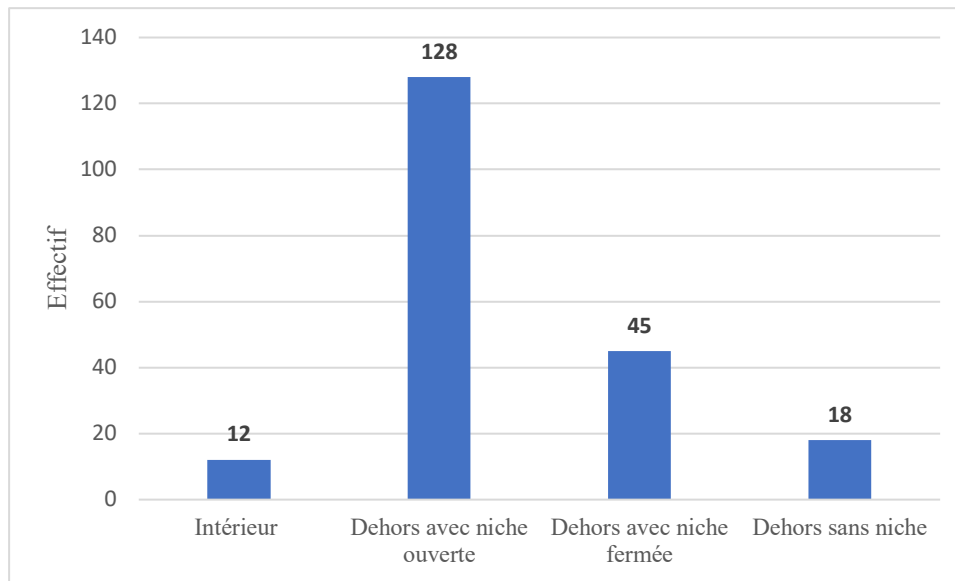


Figure 34 : Effectifs par type de lieu de couchage des chiens de l'étude.

2. Séroprévalence globale en fonction de la méthode

a. Méthode ELISA

Parmi les 193 chiens inclus dans l'étude, 192 ont été testés avec la technique *Leishmania infantum* IgG ELISA Bordier®. Cette dernière a permis d'estimer **une séroprévalence de 10,9%** avec 21 chiens sur 192 ayant un index supérieur à 1. La représentation graphique des index ELISA obtenus par chenil et selon les localités est présentée dans la figure 35. Dans cette dernière, la hauteur du graphe est proportionnelle au nombre d'individus dans chaque chenil. Chaque barre transversale correspond à un individu, la couleur étant proportionnelle à son titre sérologique. Cette dernière varie du vert (titre le plus faible) au rouge (titre le plus élevé).

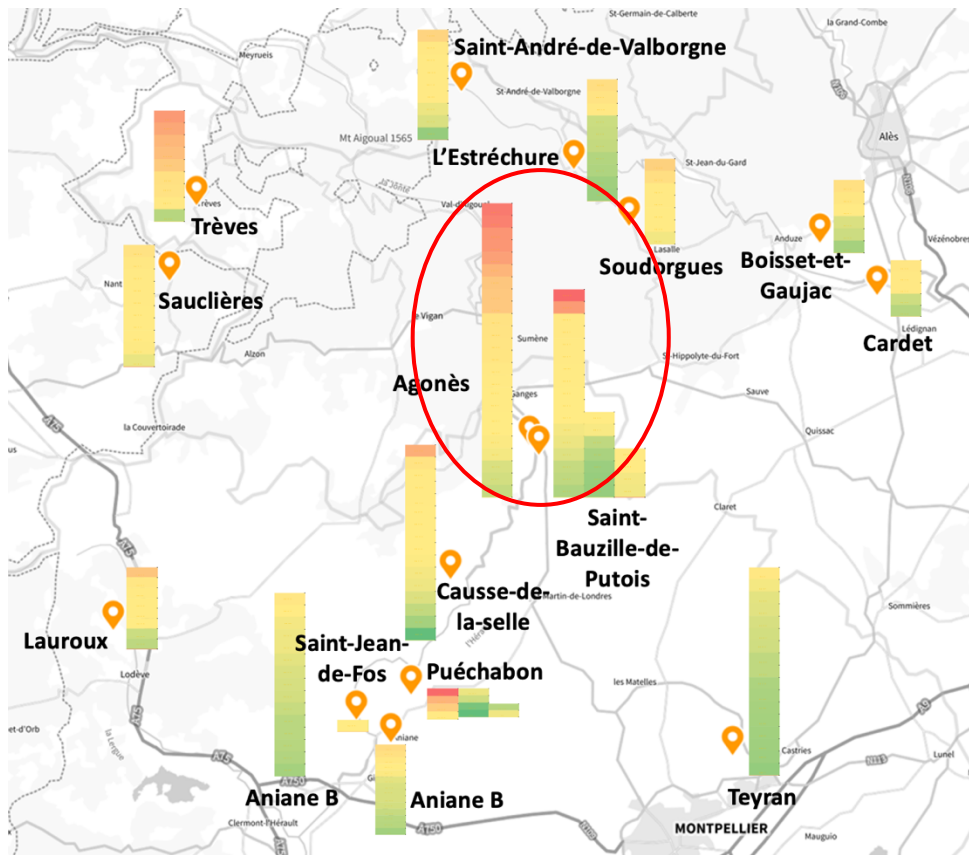


Figure 35 : Distribution des index ELISA par chenil.

b. Méthode Western-blot

Avec la seconde méthode sérologique employée soit *Leishmania* Western Blot IgG LDBIO[®], **la séroprévalence retrouvée était de 21,8%**. Dans notre étude, un chien était considéré comme séropositif par cette méthode si et seulement si les deux bandes antigéniques 14 et 16 kDa étaient présentes sur la bandelette de l'animal, comme indiqué dans la littérature chez le chien (Iniesta et al. 2007), le chat (Persichetti et al. 2017) mais aussi chez l'Homme. La figure 36 montre le résultat de quelques bandelettes. Sur les photographies, la première bandelette (numérotée par un « 1 ») correspond à un échantillon positif (témoin positif) avec la visualisation de deux bandes. La bandelette numéro « 5 » ci-dessous présente une seule bande colorée associée à l'antigène 16 kDa et correspond donc à un animal séronégatif d'après nos considérations. Les autres bandelettes sont négatives.

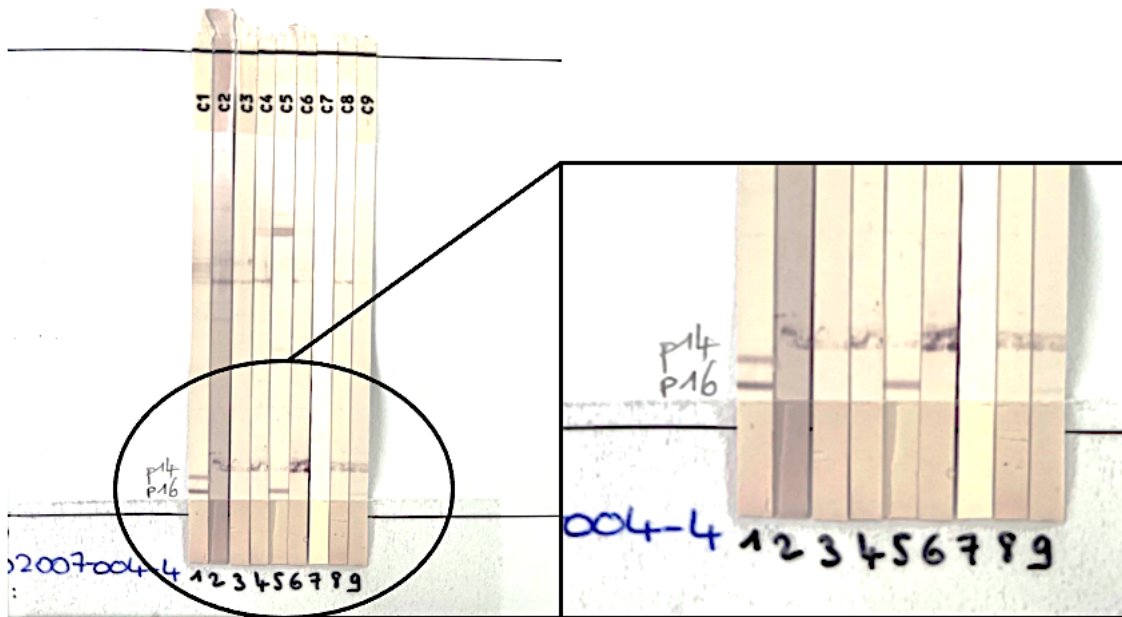


Figure 36 : Résultats de tests réalisés en western-blot. Source : photographie originale

c. Corrélation entre ELISA et Western blot

Les chiens dont la bandelette a révélé la présence d'une seule bande caractéristique seulement (correspondant à l'antigène 14 ou 16 kDa de *L. infantum*) représentaient 15% de la population canine testée en Western Blot (28/192). Par ailleurs, 100% d'entre eux ont obtenu un titre sérologique inférieur à 1 avec la technique ELISA (figure 37). 21,5% des chiens avaient des signes cliniques compatibles avec la maladie lors du prélèvement (6/28). Un seul chien a obtenu un titre pouvant être considéré comme douteux (0,773 en ELISA) alors que la présence de signes cliniques n'a pas été rapportée chez lui. Toutefois, il est à noter que cet individu avait reçu une injection de Letifend® dans l'année précédant le prélèvement.

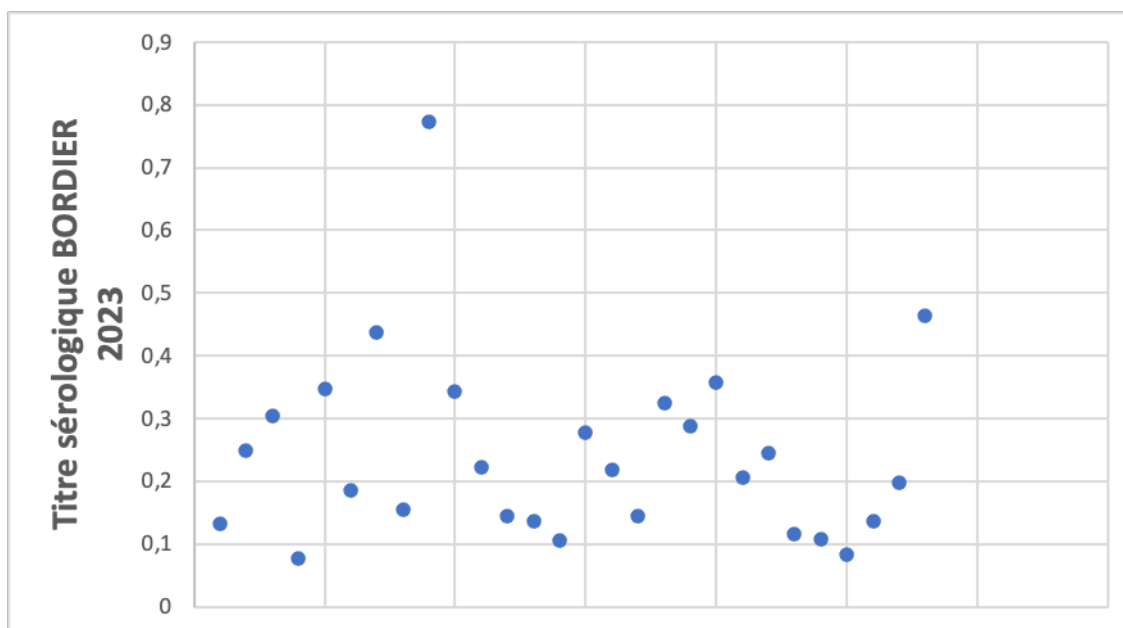


Figure 37 : Titres sérologiques en ELISA des chiens avec un résultat « 1 bande » en Western Blot (n=28).

Le tableau 18 ci-dessous permet de comparer les résultats obtenus entre les deux techniques sérologiques employées pour un même chien.

Titre sérologique en ELISA	WB « 0 bande »	WB « 1 bande »	WB « 2 bandes »
Inférieur à 1	70% (119/169)	16% (28/169)	14% (23/169)
Supérieur à 1	10% (2/21)	0%	90% (19/21)

Tableau 18 : Résultats en Western Blot en fonction du titre sérologique en ELISA.

Dans un premier temps, le Western Blot a été choisi comme test de référence afin d'estimer les performances de la méthode ELISA. Deux situations différentes ont été étudiées : la première considère un WB positif si et seulement si les deux bandes antigéniques caractéristiques étaient présentes sur la bandelette (14 et 16 kDa). La seconde estime un résultat positif par WB si une ou deux bandes sont présentes sur la bandelette (14 et/ou 16 kDa). Les résultats sont présentés dans le tableau 19 ci-dessous.

Performances du test ELISA	Western Blot « au moins une bande »	Western Blot « deux bandes »
Sensibilité	27,54%	46,34%
Spécificité	98,35%	98,66%
Valeur prédictive positive	90,48%	70,41%
Valeur prédictive négative	90,48%	86,98%

Tableau 19 : Performances du test ELISA par rapport au Western Blot (technique prise pour référence).

Cependant, en l'absence de test de référence clairement défini dans la littérature, une comparaison des deux tests en utilisant le modèle « Bayesian latent class analysis » sans gold standard a également été effectuée. Les performances estimées des deux tests sont présentées ci-dessous (tableau 20).

Test sérologique	ELISA	Western Blot
Sensibilité	45,41%	90,93%
Spécificité	99,91%	81,11%

Tableau 20 : Performances des tests ELISA et Western Blot en l'absence de test sérologique de référence.

Enfin, le coefficient de Kappa de Cohen a été déterminé. Dans notre cas, la concordance entre les deux tests était de 0,304 avec le Western Blot « au moins une bande » et de 0,547 pour le « deux bandes ». Elle peut donc être qualifiée de « faible » pour le premier cas de figure et de « modérée » pour le second.

3. Suivi sur un an des 88 chiens par méthode ELISA

Afin de réaliser le suivi des chiens déjà prélevés en 2021-2022 qui ont été à nouveau étudiés en 2023, une comparaison entre les résultats obtenus avec la technique ELISA Bordier® a été établie. Ainsi, 88 chiens ont pu faire l'objet de ce suivi (figure 38).

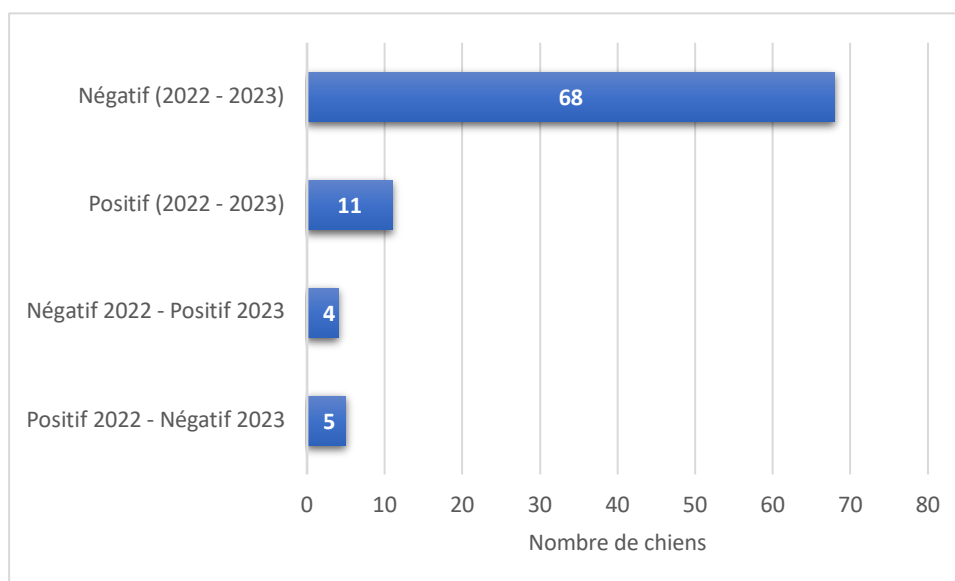


Figure 38 : Évolution du statut sérologique en ELISA des chiens suivis entre l'hiver 2021/2022 et l'hiver 2022/2023 (n=88)

Concernant les 11 chiens restés séropositifs entre 2021/2022 et 2023, 82% (9/11) ont montré un titre sérologique stable. Le titre sérologique d'un chien a diminué de moitié alors qu'un traitement à base d'allopurinol a été initié entre temps. Enfin, le titre sérologique d'un autre chien a été multiplié par deux, tandis que l'apparition de signes cliniques évocateurs de leishmaniose a été observée en cours d'année et le jour du prélèvement avec notamment une hypertrophie des nœuds lymphatiques mandibulaires. Parmi les cinq chiens séropositifs en 2021/2022 et devenus séronégatifs en 2023, aucun ne présentait de signes cliniques compatibles avec la maladie au premier prélèvement et au second, ainsi une comparaison entre la clinique et la sérologie de ces animaux n'a pas pu être réalisée. Enfin, quatre chiens étaient séronégatifs en 2021/2022 et sont devenus séropositifs en 2023. Des signes cliniques évocateurs étaient apparus entre 2022 et 2023 pour trois de ces quatre chiens. Enfin, 100% de ces chiens vivaient dans un chenil où d'autres chiens séropositifs étaient présents.

En considérant l'évolution des titres sérologiques des 88 chiens ayant fait l'objet d'un suivi par la méthode ELISA, une p-value de 0,79 a été estimée concernant la comparaison des résultats positifs entre 2022 et 2023 par le test de Mac Nemar (figure 39). Cette dernière est supérieure à 0,05, ainsi aucune différence significative n'a été observée concernant le nombre de chiens séropositifs entre les deux études.

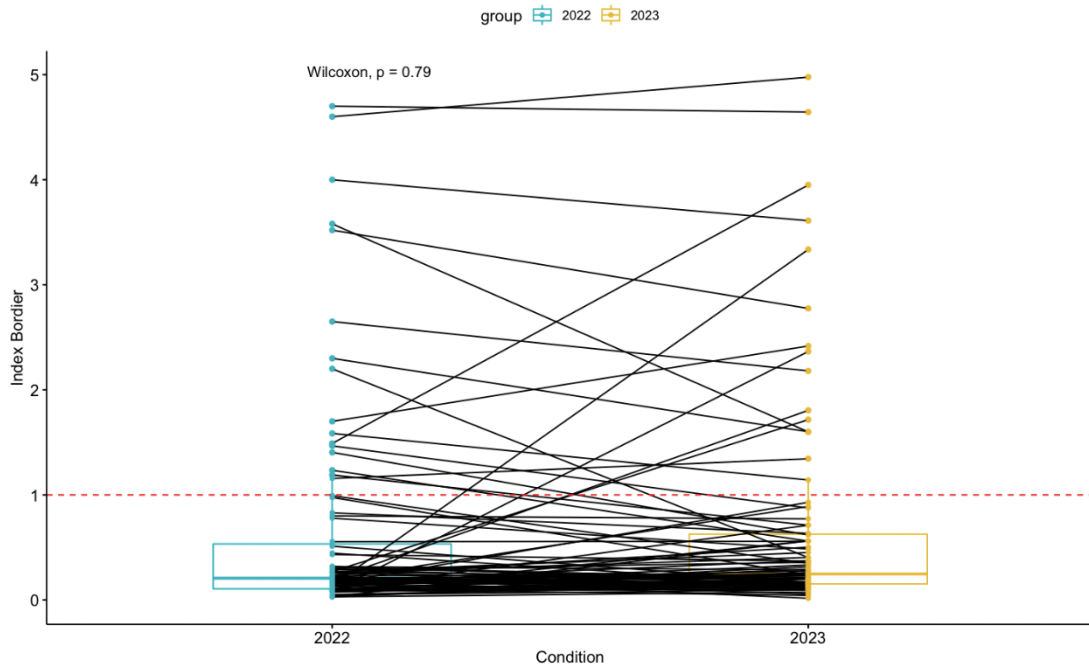


Figure 39 : Évolution des titres sérologiques en ELISA des chiens prélevés en 2021/2022 et en 2023 également

4. Analyse des résultats du groupe « chiens vaccinés »

Concernant les 29 chiens à jour de leur vaccination avec Letifend[®], 86% d'entre eux (25/29) ont obtenu un titre sérologique inférieur à 1 en ELISA cette année (figure 40). Trois chiens avaient des titres supérieurs au seuil (1,206, 2,331 et 3,61). Ces derniers avaient toutefois déjà obtenu un diagnostic clinique et de laboratoire de leishmaniose au cours de l'année précédente, et ce malgré la vaccination. Par ailleurs, un seul chien a présenté un titre sérologique supérieur à 1 (1,345) en l'absence de signes cliniques compatibles. Au cours de l'étude de l'année dernière, ce dernier avait obtenu un résultat similaire (1,157) alors qu'une injection de Letifend[®] avait également été réalisée dans l'année précédant le prélèvement. Il est à noter que ce chien fait partie de ceux qui ont aussi reçu des injections de Canileish[®] au cours des années précédentes. Enfin, parmi les 5 chiens non à jour de leur vaccination et ayant reçu des injections de Canileish[®] dans le passé, 100% d'entre eux (5/5) ont présenté un titre sérologique nettement inférieur à 1 en ELISA Bordier.

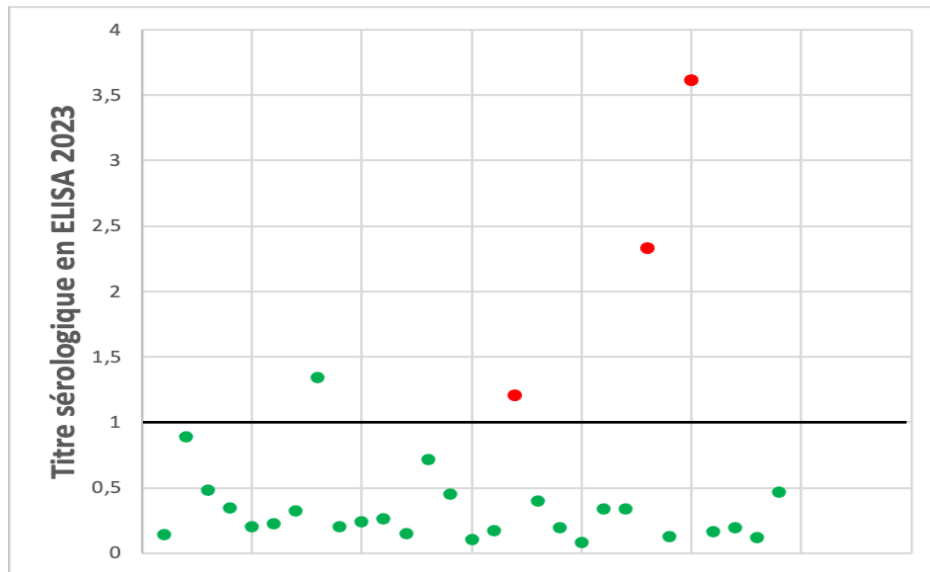


Figure 40 : Titres sérologiques en ELISA 2023 des chiens à jour de leur vaccination avec Letifend® (n=29). Les points rouges correspondent aux trois chiens avec un diagnostic de leishmaniose déjà établi

Parmi les 29 chiens à jour de la vaccination Letifend®, 62% d’entre eux (18/29) n’ont pas eu de bande apparue en Western Blot. 14% (4/29) ont présenté une seule bande tandis que les 24% restants (7/29) ont obtenu deux bandes. Ces résultats sont présentés en figure 35 ci-dessous.

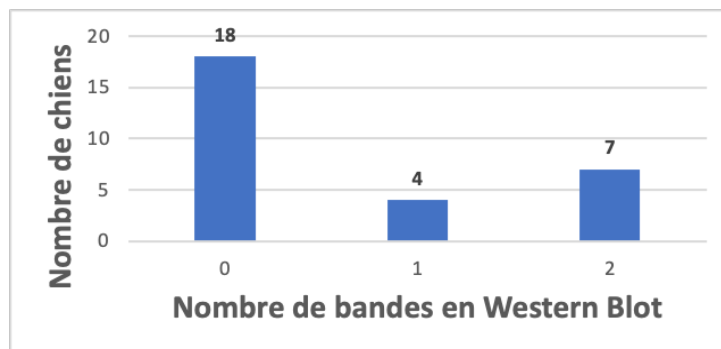


Figure 41 : Effectif selon le nombre de bandes révélées par Western Blot, parmi la population canine étudiée à jour de la vaccination avec Letifend® (n=29)

Lors que les résultats en Western Blot sont considérés pour les 5 chiens vaccinés avec Canileish® dans le passé mais non à jour de leur vaccination contre la leishmaniose, trois d’entre eux ont présenté la révélation d’une bande sur leur bandelette alors que les deux autres chiens n’ont eu aucune bande de visible.

Un test exact de Fisher a été utilisé pour comparer les pourcentages de chiens séropositifs en ELISA entre l'ensemble de la population, celle des chiens non vaccinés et celles des vaccinés. Un test T de student a été appliqué afin de comparer les moyennes de leur titre sérologique. Pour ces deux paramètres, aucune différence significative n'a été observée entre ces trois groupes (p-value de 0,54 et 0,9 respectivement, toutes deux supérieures à 0,05). Un test du khi² a été utilisé pour comparer les pourcentages de chiens ayant obtenu un résultat « au moins une bande » et « deux bandes » en Western Blot. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une influence significative de la vaccination pour ce test (p-value de 0,52 et de 0,88 respectivement, toutes deux supérieures à 0,05). L'ensemble de ces résultats apparaissent dans le tableau 21.

	Total	Non vaccinés	Vaccinés	p value	Test statistique utilisé
Effectifs	190	156	34	/	/
ELISA positifs n (%)	21 (11)	16 (10,2)	5 (14,7)	0,54	Test exact de Fisher
ELISA moyenne (SD)	0,539 (0,912)	0,535 (0,951)	0,553 (0,716)	0,9	Test T de Student
Western Blot 0 bande (%)	121 (63,7)	101 (64,7)	20 (58,8)	/	/
Western Blot Au moins 1 bande (%)	69 (36,3)	55 (35,3)	14 (41,2)	0,52	Test du khi²
Western Blot 2 bandes (%)	41 (21,6)	34 (21,8)	7 (20,6)	0,88	Test du khi²

Tableau 21 : Comparaison des pourcentages de chiens séropositifs pour l'ensemble de la population canine, les chiens non vaccinés et les chiens vaccinés en ELISA et Western Blot en 2023

C. Discussion

1) Difficultés d'échantillonnage

Comme évoqué précédemment, la population canine étudiée en 2023 est en partie composée des chiens déjà prélevés en 2021/2022 à un taux de 46% (88/193) ce qui a permis un suivi longitudinal de ce groupe. Les nouveaux chiens représentent 54% de la population (105/193) et appartiennent soit à des propriétaires déjà connus et ayant participé l'année précédente soit à de nouveaux propriétaires. Le contact avec ces derniers a généralement été permis grâce aux propriétaires déjà connus qui ont accepté de communiquer leurs coordonnées. Dans ce contexte, la grande majorité des chiens prélevés sont des chiens de chasse (96% ; 185/196). Ces chiens ont des caractéristiques qui leurs sont propres et ont notamment un mode de vie très différent des chiens avec une utilité de compagnie seulement. En effet, ces derniers passent la majorité de leur temps en extérieur et vivent pour la plupart dans des zones rurales. La nuit, ils dorment généralement dans des chenils non cloisonnés avec un intérieur ainsi facile d'accès pour les phlébotomes. Ces chiens vivent également à plusieurs et un effet « cluster » peut être suspecté pour un même chenil. Enfin, ils ont tendance à être moins médicalisés que les chiens de compagnie et sont peu nombreux à être à jour de leur traitement contre les parasites externes (25% des chiens pour notre étude). Pour toutes ces raisons, la séroprévalence de la leishmaniose canine est possiblement surestimée dans cette étude avec une incidence de la maladie probablement plus faible pour les chiens de compagnie vivant dans des zones plutôt péri-urbaines à urbaines. Enfin, bien que la région des Cévennes puisse être considérée comme un foyer de leishmaniose canine avec une séroprévalence supérieure à la plupart des régions de France métropolitaine (Le Rutte et al. 2021), seulement 15% des chiens étaient correctement vaccinés contre la leishmaniose (29/193).

2) Effet « cluster »

Dans la littérature, la prévalence de l'infection serait plus importante chez les chiens vivant avec d'autres chiens infectés, en raison d'un risque de transmission potentiellement plus élevé (Alonso et al. 2009). Sur la figure 28, la présence d'une zone géographique autour des localités d'Agonès et de Saint-Bauzille-de-Putois où le nombre de chiens séropositifs est particulièrement élevé a été mise en évidence par un cercle rouge.

Dans l'étude de l'an dernier, un effet « cluster » était fortement suspecté, notamment pour le chenil situé dans la localité d'Agonès. Dans ce dernier, la séroprévalence en ELISA était de 30% (8/27) en 2021/2022 et de 36% (9/25) en 2023. Cinq individus n'ont pas pu être prélevés : trois chiens sont morts suite à des blessures de sanglier et deux chiens n'ont pu être contenus pour la prise de sang. Trois nouveaux chiens ont été introduits dans le chenil au cours de l'année et l'un d'entre eux s'est révélé être séropositif. Ainsi, si seuls les chiens déjà prélevés l'an dernier sont considérés, la séroprévalence en ELISA de ce chenil est relativement stable avec une valeur de 32% en 2023 (8/25). Cependant, les résultats en Western Blot sur ces mêmes chiens indiquent une séroprévalence bien plus élevée à 44% (11/25). Selon (Fernández-Pérez et al. 1999), le Western Blot serait une méthode de diagnostic hautement sensible et spécifique. D'après (Riera et al. 1998), elle permettrait de détecter les chiens infectés dans des phases précoces de la maladie, même avec un taux sérique en anticorps anti-*Leishmania* faible. Si les chiens positifs en Western Blot et négatifs en ELISA sont réellement infectés, alors la séroprévalence de ce chenil est vraisemblablement plus élevée cette année que l'année dernière (30% en 2021/2022 contre 44% cette année). Dans ce contexte, un effet « cluster » peut être supposé. Cependant, d'autres facteurs peuvent expliquer une augmentation de l'incidence au sein d'un même chenil comme par exemple une densité de vecteurs plus importante d'une année à l'autre.

3) Évolution de la séroprévalence et de la prévalence de la maladie dans le foyer Cévenol

Parmi les 193 chiens prélevés, 26 d'entre eux soit 13,4% de la population présentaient des signes cliniques compatibles avec la leishmaniose au moment du prélèvement (amaigrissement, polyadénomégalie, signes oculaires ou cutanés principalement). Seulement 38% (10/26) d'entre eux sont revenus séropositifs en ELISA contre 50% en Western Blot (13/26). Ces données sont comparables avec celles de l'étude de Velez et al. (2019). Dans cette dernière, seulement plus de la moitié des chiens symptomatiques inclus dans l'étude avait un titre sérologique faible en ELISA. L'observation de chiens séronégatifs malgré la présence de signes cliniques évocateurs de la maladie peut s'expliquer par un stade précoce de l'infection et une séroconversion trop peu avancée pour permettre une détection par les tests sérologiques utilisés. Une autre hypothèse est la présence d'un profil immunologique résistant chez ces chiens leur permettant de limiter la réponse humorale après infection et donc la production d'anticorps. Enfin, certains des chiens symptomatiques de notre étude recevaient de l'allopurinol suite à la décision

des propriétaires d'administrer ce dernier sans qu'un diagnostic n'ait été établi par leur vétérinaire traitant. Ils disposaient du traitement pour d'autres chiens de leur chenil pour lesquels le diagnostic avait été établi. Ce traitement a donc pu interférer avec les résultats de la sérologie et conduire à de faux négatifs.

L'une des deux techniques sérologiques utilisées dans cette étude afin de quantifier le titre sérique en anticorps anti-leishmanies des chiens prélevés était une technique ELISA utilisant des antigènes solubles provenant de cultures de promastigotes. D'après l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale, il s'agit d'une méthode adaptée et recommandée pour la réalisation d'enquêtes épidémiologiques offrant des performances très satisfaisantes avec une sensibilité et une spécificité suffisantes (Organisation mondiale de la santé animale). Cette technique permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons et ne présente pas de biais lié à l'expérimentateur concernant la lecture du résultat, au contraire de l'IFAT. Au cours des travaux précédents réalisés l'année dernière qui ont permis de comparer les performances de plusieurs méthodes diagnostiques, le test *Leishmania infantum* IgG Elisa commercialisé par Bordier® s'est révélé être celui avec la sensibilité et la spécificité les plus élevées, en prenant pour référence le test ELISA ID Screen Leishmaniasis Indirect®. Sa sensibilité a ainsi été estimée à 68% avec une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 90% et une valeur prédictive négative de 91%. Ainsi, ce test a été choisi pour suivre l'évolution de l'endémicité de la leishmaniose canine au sein du foyer Cévenol.

Par ailleurs, nous avons souhaité utiliser une deuxième méthode de diagnostic sérologique dans notre étude. Il s'agit de la technique Western Blot, qui ne permet pas d'estimer le titre sérique en anticorps des chiens prélevés mais qui fournit un résultat seulement qualitatif. Cependant, cette technique est relativement chronophage et ne peut être effectuée que dans des laboratoires de recherche en raison de son coût élevé. Pour ces raisons, cette méthode n'est pas employée à ce jour pour des diagnostics de routine mais seulement pour des travaux de recherche. Comme évoqué précédemment, elle offre toutefois une sensibilité et spécificité très élevées. D'après Riera et al. (1998), elle permettrait de diagnostiquer précocement les chiens infectés lorsque des bandes de bas poids moléculaires sont utilisées pour identifier un pattern séropositif. A l'heure actuelle, les données présentes dans la littérature ne s'accordent pas sur le pattern des bandes évocateur d'une séropositivité. Dans notre étude, nous avons utilisé le kit *Leishmania* Western Blot IgG commercialisé par LDBio®. Les recommandations fournies considèrent le test positif si la bandelette associée présente la bande antigénique 14 kDa et/ou 16 kDa. Dans

ce cas, il est donc possible de conclure en la présence d'anticorps IgG anti-*Leishmania* l'échantillon sérique testé. Cependant, certains auteurs s'accordent pour dire que l'association de plusieurs bandes pour diagnostiquer une leishmaniose chez un chien permet d'augmenter la sensibilité du test (Riera et al. 1998), (Fernández-Pérez et al. 1999). Dans l'étude de Iniesta et al. (2007), les fractions antigéniques 14 et 16 kDa ont permis de détecter de façon précoce des chiens infectés. Nous avons choisi de considérer un chien séropositif si et seulement si les deux bandes 14 et 16 kDa étaient visibles sur la bandelette.

Dans l'étude de l'année précédente, la séoprévalence a été estimée entre 11 et 19% selon le test utilisé. Ces données étaient comparables aux données de la littérature qui portaient également sur des chiens vivant dans des localités proches de celles étudiées (Keck, Dereure 2003). Au cours de la présente étude, la séoprévalence par ELISA pour l'ensemble de la population étudiée était de 10,9% (n =192) et de 14% en 2021/2022 (n =169). Les analyses statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative des pourcentages de séopositivité par ELISA entre les deux études (p-value de 0,79, supérieure à 0,05).

La méthode Western Blot, non utilisée l'année dernière, a montré une séoprévalence de 21,8% (n =192). Cette dernière est donc deux fois supérieure à la séoprévalence par ELISA. D'après l'étude de Iniesta et al. (2007), la technique Western Blot aurait une sensibilité supérieure à l'ELISA. Il est donc possible de considérer que les chiens de notre étude positifs en Western Blot mais séronégatifs en ELISA étaient infectés au moment du prélèvement et en début de séroconversion. Ainsi, le Western Blot pourrait permettre la détection d'infections précoces, même dans les stades asymptomatiques de la maladie chez les chiens infectés. En effet, 12% (23/192) des chiens étaient séronégatifs en ELISA (titre sérologique inférieur à 1) mais séropositifs en WB (deux bandes antigéniques révélées). Dans ce contexte, la séoprévalence en Western Blot serait plus proche de la séoprévalence réelle du foyer cévenol que celle estimée par ELISA. Par ailleurs, elle est peut-être sous-estimée car les chiens dont la bandelette ne présentait qu'une seule des deux bandes caractéristiques ont été considérés comme négatifs alors que le fabricant du test indique qu'un tel résultat serait déjà évocateur d'une séopositivité. L'interprétation des résultats « une bande » s'est donc révélée délicate dans notre étude. Pour les chiens avec de tels résultats, nous avons supposé que ces derniers étaient peut être en cours de séroconversion, avec donc avec un titre sérologique encore trop faible pour être considérés comme séropositifs en Western Blot.

Dans notre étude, nous avons d'abord souhaité estimer les performances du test ELISA utilisé en prenant pour référence le Western Blot avec les résultats « au moins une bande » considérés comme positifs mais aussi ceux « deux bandes ». Les valeurs de spécificité obtenues sont très satisfaisantes (98,35% et 98,66% respectivement). Cependant, les valeurs de sensibilité sont inférieures à celles attendues et retrouvées dans la littérature (27,54% et 46,34% respectivement). En effet, d'après l'Organisation mondiale de la santé animale, la sensibilité en ELISA serait de 86 à 99% selon les études. Ces résultats issus de nos analyses statistiques montrent ainsi que dans le cadre de notre étude, le nombre de chiens faux-négatifs en ELISA est probablement important et que cette méthode sous-estime certainement la séroprévalence réelle de la leishmaniose canine dans les Cévennes.

Il est important de rappeler qu'aucun test ne présente une sensibilité et une spécificité parfaite. Lorsque des enquêtes épidémiologiques sont réalisées dans des zones endémiques de leishmaniose, les techniques sérologiques peuvent notamment présenter une sensibilité plus faible que pour d'autres populations (Velez et al. 2019). Dans ce contexte, il est préférable de coupler à la sérologie d'autres méthodes de diagnostic comme la PCR car cette dernière peut s'avérer insuffisante pour la détection de certains chiens infectés. Enfin, il faut mentionner que les tests utilisés peuvent mener au diagnostic de faux-positifs. Les techniques sérologiques utilisées peuvent occasionner des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre d'autres espèces de *Leishmania infantum* ou même contre *Trypanozoma cruzi* (Organisation mondiale de la santé animale). Cependant, ces parasites sont non endémiques dans le foyer Cévenol c'est pourquoi les chiens de notre étude n'ont pas été testés pour ces derniers.

4) Dynamique de l'infection chez les chiens suivis

Les prélèvements des 88 chiens suivis dans les deux études ont été analysés par ELISA, permettant ainsi de suivre l'évolution de leur titre sérologique au cours du temps. La majorité d'entre eux sont restés séronégatifs dans les deux études (77% ; (67/88)).

13% (11/88) sont restés séropositifs. Parmi ces derniers, les titres sérologiques se sont montrés stables sauf pour deux d'entre eux. Le titre du premier chien a diminué de moitié suite à la mise en place d'un traitement à base d'Antimoniote de méglumine et d'Allopurinol initié dans l'année 2022 : la réponse thérapeutique a donc été satisfaisante d'autant plus qu'aucun signe

clinique n'était présent au moment du prélèvement. En effet, d'après Beugnet et al. (2021), le traitement doit réduire le titre d'au moins deux dilutions pour être considéré comme efficace. Au contraire, le titre du deuxième a été multiplié par deux en l'absence de mise en place de traitement. En parallèle, des signes cliniques évocateurs sont apparus chez ce dernier (amaigrissement, polyadénomégalie périphérique), d'où l'augmentation du titre sérologique entre les deux études.

5,7% des chiens suivis (5/87) étaient séropositifs en 2022 et séronégatifs en 2023. Aucun de ces chiens ne présentait de signes cliniques au moment des deux prélèvements.. En 2022, leur titre sérologique était compris entre 1,4 et 2,2 et était donc significativement supérieur à 1. En 2023, les cinq chiens avaient un titre sérologique inférieur à 0,9. Les hypothèses pour expliquer leur négativation en ELISA sont multiples. Il est possible de mettre en cause le manque de sensibilité de la technique ELISA dans notre étude et donc de supposer que ces chiens soient de faux-négatifs en 2023. En considérant les résultats 2023 en Western Blot, nous avons constaté que trois de ces chiens étaient séronégatifs en ELISA mais séropositifs en Western Blot. Les deux autres étaient donc séronégatifs pour les deux tests. Face à ces données, cette première hypothèse est donc plausible avec de possibles résultats faux-négatifs en ELISA pour les trois premiers chiens. Une autre explication peut être celle de la vaccination. En effet, trois chiens sur les cinq ont été vaccinés en cours d'année avec le vaccin Letifend®. Bien qu'aucune étude ne porte sur les effets de la vaccination des chiens séropositifs, il est possible qu'elle ait eu une incidence sur la réponse immunitaire de ces animaux face à l'infection et en stimulant la réponse immunitaire cellulaire aux dépens de la réponse humorale. Dans ce contexte, le phénomène de séroconversion aurait pu être limité.

Enfin, 4,6% des chiens suivis (4/87) étaient séronégatifs en 2021/2022 et sont devenus séropositifs en 2023. Pour trois d'entre eux, des signes cliniques évocateurs sont apparus entre les deux prélèvements ce qui est bien corrélé à l'augmentation de leur titre sérologique. Une incidence annuelle de 4,6% (4/87) a ainsi pu être calculée pour la population des chiens suivis.

5) Apport de la technique Western Blot

L'utilisation de la technique Western Blot a permis d'apporter de nouvelles perspectives pour les enquêtes épidémiologiques portant sur l'estimation de la séoprévalence de la

leishmaniose canine. En effet, nous avons vu précédemment que la sensibilité de certaines méthodes de diagnostic sérologiques, comme la méthode ELISA utilisée dans notre étude, pouvait avoir une sensibilité insuffisante et mener à des résultats faux-négatifs. Nous avons souhaité comparer les performances des deux techniques. En considérant les résultats « deux bandes » seulement comme évocateurs d'un résultat positif en Western Blot, nous avons observé des performances très différentes. Notamment, la sensibilité en ELISA était de 45,41% contre 90,93% en Western Blot. Dans ce contexte, il serait donc intéressant de réitérer ces analyses sur la même population canine dans une étude ultérieure, afin de savoir si les chiens séronégatifs en ELISA et séropositifs en Western Blot sont devenus séropositifs en ELISA par la suite. De tels résultats pourraient en plus soutenir l'idée que le Western Blot soit une technique prometteuse pour la détection des chiens dans des stades précoces de la maladie, avec une séroconversion encore insuffisante pour permettre une détection des anticorps par ELISA.

Au cours de l'étude précédente, l'une des difficultés rencontrées fût l'interprétation de résultats sérologiques positifs chez les chiens vaccinés. Dans la présente étude, nous avons souhaité mieux prendre en compte cette problématique grâce à l'apport du Western Blot. Le vaccin Canileish® est un vaccin multi-antigénique et composé de plusieurs protéines excrétées et sécrétées par *L. infantum*. Bien que ce dernier ait été retiré du marché Européen récemment, certains chiens de notre étude ont reçu au moins une dose de ce vaccin avant d'être inclus dans l'étude. Les données disponibles dans la littérature indiquent que ce vaccin est fortement susceptible d'interférer avec les tests sérologiques standards (Solano-Gallego et al. 2017). L'étude de Velez et al. (2020) a suivi le titre sérologique par ELISA de 85 chiens vaccinés avec Canileish® pendant un an. Un pic en anticorps induits par la vaccination a été mis en évidence environ 1 mois après la dernière injection de primovaccination. Au contraire, il n'y avait pas de différences significatives chez les chiens vaccinés et non vaccinés dans les quatre à huit mois suivant cette administration. Bien qu'aucune étude ne porte sur la cinétique en anticorps induits par Canileish® plus d'un an après la primovaccination ou le dernier rappel, il est peu probable que ce vaccin puisse encore interférer avec les tests sérologiques dans ces délais post-vaccination. Dans notre étude, les 5 chiens ayant reçu une injection de Canileish® dans leur vie n'étaient pas à jour de leur vaccination, avec une dernière injection remontant à plus d'un an avant le moment du prélèvement. 100% d'entre eux (5/5) ont obtenu un titre sérologique négatif en ELISA. En Western Blot, trois de ces chiens ont présenté un résultat « une bande » et les deux autres « deux bandes ». Parmi ces trois, un seul présentait des signes cliniques compatibles avec la leishmaniose au moment du prélèvement (polyadénomégalie périphérique). Cependant, il n'a pas été

possible pour ces trois chiens de savoir si le résultat « une bande » était évocateur d'une séropositivité ou bien d'une interférence vaccinale. L'analyse du pattern de leur bandelette n'a pas non plus permis de mettre en évidence la présence de bandes évocatrices d'une hypothèse ou de l'autre.

Le vaccin Letifend[®] présente une composition très différente de Canileish[®] : il est constitué d'une protéine Q chimérique recombinante, elle-même formée de quatre fragments protéiques différents de *L. infantum* . D'après Iniesta et al. (2016), son injection induit une augmentation transitoire du titre sérique en anticorps anti-protéine Q, avec un pic à 14 jours suivant l'administration. Aucune autre étude ne porte sur la cinétique en anticorps de ce vaccin plus de 60 jours après primovaccination, et il est à noter que seulement 10 chiens ont composé le groupe « Vaccinés » de l'étude. D'après Solano-Gallego et al. (2017), Letifend[®] ne semble pas interférer avec les tests sérologiques standards, notamment avec la méthode ELISA utilisant des antigènes solubles de *L. infantum*, comme c'est le cas pour l'ELISA de notre étude. Dans la population étudiée, 29 chiens étaient à jour de leur vaccination avec Letifend[®]. 86% d'entre eux (25/29) étaient séronégatifs en ELISA, contre 76% (22/29) par Western Blot. Trois des quatre chiens séropositifs en ELISA présentaient des signes cliniques compatibles avec la leishmaniose en plus de présenter deux bandes en Western blot : il est donc possible de considérer ces chiens comme réellement infectés sans attribuer leur séropositivité au vaccin. Cependant, quatre chiens étaient séropositifs en Western Blot sans signes cliniques évocateurs. Là encore, il n'a pas été possible de distinguer une possible infection d'une interférence vaccinale grâce au pattern de leur bandelette. Par ailleurs, trois de ces quatre chiens étaient à jour avec Letifend[®] mais avaient reçu des injections de Canileish[®] auparavant. Il est donc impossible de savoir, dans l'hypothèse d'une interférence vaccinale avec le Western Blot, quel vaccin est à l'origine de cette dernière.

Enfin, les analyses statistiques réalisées n'ont pas montré d'influence significative de la vaccination sur les deux tests sérologiques utilisés. Ces résultats sont donc en accord avec la littérature pour le vaccin Letifend[®]. Concernant Canileish[®], une absence globale d'interférence était attendue du fait du long délai entre la dernière administration reçue par les chiens et le moment du prélèvement.

D. Conclusion

La leishmaniose canine est une maladie chronique avec une symptomatologie très polymorphe rendant son diagnostic difficile. L'élaboration de nouveaux vaccins est prometteuse pour le contrôle de la maladie mais a également modifié la démarche diagnostique à adopter en la rendant plus complexe. *Leishmania infantum* est enzootique dans le Sud de la France, là où la densité de vecteurs est plus élevée. Dans le futur, certaines études projettent une expansion de la maladie vers le nord de l'Europe, relative aux changements climatiques observés. Face au risque zoonotique que représente cette maladie, la réalisation d'enquêtes épidémiologiques au sein de la population canine et l'élaboration de techniques de diagnostic fiables font partie des enjeux actuels.

Cette étude s'inscrit dans la continuité du travail précédemment effectué en 2022. Dans un premier temps, elle a permis d'actualiser les données de séroprévalence dans le foyer Cévenol pour l'année 2023, avec l'inclusion de nouveaux chiens et de nouvelles localités et donc une population plus importante. Elle a ainsi été estimée à 21,8% en Western Blot et à 10,9% par ELISA. En considérant le résultat de cette dernière méthode également réalisée l'année précédente, la séroprévalence de la leishmaniose canine est considérée comme stable dans ce foyer géographique. Malgré la mention d'un possible « effet cluster » pour cette maladie, là où la densité de vecteurs et le nombre de chiens infectés sont élevés, ce dernier n'a pas été mis en évidence dans notre étude. Le suivi des chiens prélevés l'an dernier et reprélevés cette année avec la même méthode sérologique (ELISA) s'est avéré intéressant et a permis de s'apercevoir d'une bonne corrélation du titre sérologique de ces animaux avec leur évolution clinique et/ou une éventuelle réponse thérapeutique.

Par ailleurs, ce travail a bénéficié des apports de la technique Western Blot. Dans la littérature, ses performances sont souvent décrites comme excellentes. Malgré l'absence de test gold standard clairement défini, le modèle Bayésien utilisé dans notre étude a en effet montré une sensibilité nettement supérieure du Western Blot par rapport à l'ELISA. Cette méthode est très rarement utilisée en routine en raison de son coût important. Pourtant, elle serait potentiellement apte à détecter des cas à des stades précoces de la maladie, tandis que d'autres tests sérologiques comme l'ELISA ne seraient pas capables de détecter une séroconversion significative chez ces chiens. Dans notre étude, de nombreux chiens étaient séronégatifs en ELISA mais séropositifs

en Western Blot. Il serait donc intéressant de suivre l'évolution de leur statut sérologique avec ces mêmes méthodes, parallèlement à leur clinique, afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Cependant, il n'existe pas de consensus concernant le pattern des bandes d'une bandelette évocateur de la maladie par Western Blot. Les données de la littérature s'accordent pour dire que l'association de plusieurs bandes évocatrices augmente les performances du test. Dans notre étude, il a été difficile d'interpréter le résultat des chiens pour lesquels une seule bande spécifique était présente sur la bandelette. Là encore, le suivi par Western Blot de ces animaux pourrait constituer le point de départ d'une autre étude afin de mieux cerner cette problématique et notamment de savoir si ces derniers étaient séropositifs ou non au moment de notre étude. Par ailleurs, une analyse plus fine du pattern des bandelettes obtenu pour chaque chien, corrélée à leur statut clinique ou vaccinal aurait peut-être permis d'améliorer certains points concernant la compréhension de la maladie.

De plus, ce projet met en évidence les limites de la sérologie. En effet, elle ne permet qu'une mise en évidence indirecte du parasite et ne peut donc pas démontrer qu'un animal est véritablement porteur de *L. infantum*. Par ailleurs, une possible interférence de la vaccination avec les tests employés est toujours difficile à exclure. Notre étude n'a pas mis en évidence d'influence de la vaccination que ce soit avec Letifend® ou Canileish®. Cependant, il serait utile de réitérer ces analyses sérologiques sur un plus grand nombre de chiens vaccinés afin d'obtenir des résultats plus significatifs. La mise en place d'un vaccin utilisant la méthode DIVA pourrait être une solution prometteuse pour contrôler la progression de la maladie sans entraver les tests sérologiques couramment employés.

Enfin, ce travail a permis de mieux appréhender la dynamique de la leishmaniose canine dans les Cévennes, grâce à deux tests sérologiques différents couplés aux données anamnestico-cliniques des chiens prélevés. Elle appartient à un projet plus large qui a pour but d'être conduit sur cinq ans. L'inclusion de nouveaux individus, de méthodes de diagnostic direct comme la PCR, l'analyse ultérieure du biotope et une meilleure caractérisation des vecteurs dans le foyer Cévenol permettront certainement d'approfondir les connaissances sur la leishmaniose canine.

Bibliographie

ADEL, Amel, BERKVENS, Dirk, ABATIH, Emmanuel, SOUKEHAL, Abdelkrim, BIANCHINI, Juana et SAEGERMAN, Claude, 2016. Evaluation of Immunofluorescence Antibody Test Used for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Mediterranean Basin: A Systematic Review and Meta-Analysis. CALDERARO, Adriana (éd.), *PLOS ONE*. 18 août 2016. Vol. 11, n° 8, pp. e0161051. DOI 10.1371/journal.pone.0161051.

ÁLVAREZ, Luis, MARÍN-GARCÍA, Pablo-Jesús et LLOBAT, Lola, 2022. Immunological and genomic characterization of Ibiza Hound dogs in an endemic *Leishmania infantum* region. *Parasites & Vectors*. 28 novembre 2022. Vol. 15, n° 1, pp. 445. DOI 10.1186/s13071-022-05504-3.

APOSTOLIDIS, Kosmas N., CHATZIS, Manolis K., KASABALIS, Dimitris, MATA-RAGKA, Antonia, IKONOMOPOULOS, John, SKAMPARDONIS, Vassilis, ATHANASSIOU, Labrini V., MYLONAKIS, Mathios E., LEONTIDES, Leonidas S. et SARIDOMICHELAKIS, Manolis N., 2023. Investigation of comorbidities in dogs with leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. avril 2023. Vol. 39, pp. 100844. DOI 10.1016/j.vprsr.2023.100844.

BATES, Paul A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. août 2007. Vol. 37, n° 10, pp. 1097-1106. DOI 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.

BAXARIAS, Marta, ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, Alejandra, MARTÍNEZ-ORELLANA, Pamela, MONTSERRAT-SANGRÀ, Sara, ORDEIX, Laura, ROJAS, Alicia, NACHUM-BIALA, Yaarit, BANETH, Gad et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2018. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniasis? *Parasites & Vectors*. décembre 2018. Vol. 11, n° 1, pp. 135. DOI 10.1186/s13071-018-2724-9.

BELINCHÓN-LORENZO, Silvia, INIESTA, Virginia, PAREJO, Juan Carlos, FERNÁNDEZ-COTRINA, Javier, MUÑOZ-MADRID, Rubén, SOTO, Manuel, ALONSO, Carlos et GÓMEZ NIETO, Luis Carlos, 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. février 2013. Vol. 192, n° 1-3, pp. 43-50. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.11.007.

BEUGNET, Frédéric, MIRO, Guadalupe, HALOS, Lénaïg et GUILLOT, Jacques, 2021. *Abrégé de parasitologie clinique du chien et du chat*. ISBN 978-2-9550805-4-2.

BIA, Taha, SANCHEZ, Carmen, ZAIT, Houria, KOUIDRI, Mokhtaria, MABROUK, Slimani Khaled, NIETO, Javier, AMMAR, Selles Sidi Mohammed, MORENO, Javier et AHLEM, Benmouhoub Nouara, 2022. Diagnosis and prevalence of canine leishmaniasis in the Atlas shepherd dog. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. novembre 2022. Vol. 36, pp. 100787. DOI 10.1016/j.vprsr.2022.100787.

BOURDOISEAU, Gilles et CHERMETTE, René, 2015. La leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : données actuelles sur une zoonose négligée. *Revue Francophone des Laboratoires*. décembre 2015. Vol. 2015, n° 477, pp. 25-34. DOI 10.1016/S1773-035X(15)30314-2.

BOWMAN, Dwight D. et GEORGI, Jay R., 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 10.

ed. St. Louis, Mo : Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4557-4006-2.

BURNHAM, Alexis C., ORDEIX, Laura, ALCOVER, M. Magdalena, MARTÍNEZ-ORELLANA, Pamela, MONTSERRAT-SANGRÀ, Sara, WILLEN, Laura, SPITZOVA, Tatiana, VOLF, Petr et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2020. Exploring the relationship between susceptibility to canine leishmaniosis and anti-Phlebotomus perniciosus saliva antibodies in Ibiza hounds and dogs of other breeds in Mallorca, Spain. *Parasites & Vectors*. décembre 2020. Vol. 13, n° 1, pp. 129. DOI 10.1186/s13071-020-3992-8.

BURZA, Sakib, CROFT, Simon L et BOELAERT, Marleen, 2018. Leishmaniasis. *The Lancet*. septembre 2018. Vol. 392, n° 10151, pp. 951-970. DOI 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

CABRÉ, Maria, PLANELLAS, Marta, ORDEIX, Laura et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2021. Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? *Veterinary Record* [en ligne]. novembre 2021. Vol. 189, n° 10. [Consulté le 14 mars 2023]. DOI 10.1002/vetr.451. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/vetr.451>

CARDOSO, L., SCHALLIG, H.D.F.H., CORDEIRO-DA-SILVA, A., CABRAL, M., ALUNDA, J.M. et RODRIGUES, M., 2007. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. mai 2007. Vol. 117, n° 1-2, pp. 35-41. DOI 10.1016/j.vetimm.2007.01.014.

CAVALERA, Maria Alfonsa, GERNONE, Floriana, UVA, Annamaria, D'IPPOLITO, Paola, ROURA, Xavier, PALTRINIERI, Saverio et ZATELLI, Andrea, 2021. Effect of domperidone (leisguard®) on antibody titers, inflammatory markers and creatinine in dogs with leishmaniosis and chronic kidney disease. *Parasites & Vectors*. décembre 2021. Vol. 14, n° 1, pp. 525. DOI 10.1186/s13071-021-05030-8.

ERBER, Astrid Christine, SANDLER, Peter Julian, DE AVELAR, Daniel Moreira, SWOBODA, Ines, COTA, Gláucia et WALOCHNIK, Julia, 2022. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 24 janvier 2022. Vol. 15, n° 1, pp. 34. DOI 10.1186/s13071-021-05133-2.

ETTINGER, Stephen J., FELDMAN, Edward C. et CÔTÉ, Etienne (éd.), 2017. *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Eighth edition. St. Louis, Missouri : Elsevier. ISBN 978-0-323-31211-0. SF991 .T48 2017

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.J, GÓMEZ-MUÑOZ, Ma.T, MÉNDEZ, S et ALUNDA, J.M, 2003. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Tropica*. avril 2003. Vol. 86, n° 1, pp. 83-91. DOI 10.1016/S0001-706X(03)00004-4.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, Francisco J., MÉNDEZ, Susana, DE LA FUENTE, Concepción, CUQUERELLA, Montserrat, GÓMEZ, M. Teresa et ALUNDA, José M., 1999. Value of Western Blotting in the Clinical Follow-Up of Canine Leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. mars 1999. Vol. 11, n° 2, pp. 170-173. DOI 10.1177/104063879901100211.

FERROGLIO, E., CENTARO, E., MIGNONE, W. et TRISCIUOGLIO, A., 2007. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology*. mars 2007. Vol. 144, n° 1-2, pp. 162-166. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.09.017.

GALLUZZI, Luca, CECCARELLI, Marcello, DIOTALLEVI, Aurora, MENOTTA, Michele et MAGNANI, Mauro, 2018. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. décembre 2018. Vol. 11, n° 1, pp. 273. DOI 10.1186/s13071-018-2859-8.

GARCÍA-CASTRO, Ana, EGUI, Adriana, THOMAS, María Carmen et LÓPEZ, Manuel Carlos, 2022. Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. *Vaccines*. 14 juin 2022. Vol. 10, n° 6, pp. 947. DOI 10.3390/vaccines10060947.

GIRAUD, Emilie, MARTIN, Oihane, YAKOB, Laith et ROGERS, Matthew, 2019. Quantifying *Leishmania* Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. *Communications Biology*. 28 février 2019. Vol. 2, n° 1, pp. 84. DOI 10.1038/s42003-019-0323-8.

GIZZARELLI, Manuela, BOSCO, Antonio, FOGLIA MANZILLO, Valentina, BONGIORNO, Gioia, BIANCHI, Riccardo, GIAQUINTO, Daniela, BEN FAYALA, Nour El Houda, VARLOUD, Marie, CRIPPA, Alessia, GRADONI, Luigi, CRINGOLI, Giuseppe, MAURELLI, Maria Paola, RINALDI, Laura et OLIVA, Gaetano, 2021. Examining the Relationship of Clinical and Laboratory Parameters With Infectiousness to *Phlebotomus perniciosus* and Its Potential Infectivity in Dogs With Overt Clinical Leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*. 4 mai 2021. Vol. 8, pp. 667290. DOI 10.3389/fvets.2021.667290.

GOMES, Ciro Martins, CESETTI, Mariana Vicente, DE PAULA, Natália Aparecida, VERNAL, Sebastián, GUPTA, Gaurav, SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro et ROSELINO, Ana Maria, 2017. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. FENWICK, Brad (éd.), *Journal of Clinical Microbiology*. février 2017. Vol. 55, n° 2, pp. 526-534. DOI 10.1128/JCM.01954-16.

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*. janvier 2008. Vol. 175, n° 1, pp. 45-52. DOI 10.1016/j.tvjl.2006.10.019.

IARUSSI, Fabrizio, PARADIES, Paola, FOGLIA MANZILLO, Valentina, GIZZARELLI, Manuela, CARATOZZOLO, Mariano Francesco, NAVARRO, Christelle, GRECO, Beatrice, RUBINO, Giuseppe Tommaso Roberto, OLIVA, Gaetano et SASANELLI, Mariateresa, 2020. Comparison of Two Dosing Regimens of Miltefosine, Both in Combination With Allopurinol, on Clinical and Parasitological Findings of Dogs With Leishmaniosis: A Pilot Study. *Frontiers in Veterinary Science*. 14 décembre 2020. Vol. 7, pp. 577395. DOI 10.3389/fvets.2020.577395.

IDRISSI, Houda, HAKKOUR, Maryam, DUCHATEAU, Luc, ZANATTA, Renato, KACHANI, Malika, AZRIB, Rahma, DAMINET, Sylvie, KICHOU, Faouzi, EL ASATEY, Sabrina, TAZI, Noureddine, SAHIBI, Hamid et EL HAMIANI KHATAT, Sarah, 2021. Canine Leishmaniasis in Morocco: A Descriptive Prospective Clinical Study. ORTEGA-PACHECO, Antonio (éd.), *Veterinary Medicine International*. 6 septembre 2021. Vol. 2021, pp. 1-12. DOI 10.1155/2021/6304127.

INIESTA, Laura, GÁLLEGO, Montserrat et PORTÚS, Montserrat, 2007. Idiotypic expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. octobre 2007. Vol. 119, n° 3-4, pp. 189-197. DOI 10.1016/j.vetimm.2007.05.006.

KER, Henrique Gama, COURA-VITAL, Wendel, VALADARES, Diogo Garcia, AGUIAR-SOARES, Rodrigo Dian Oliveira, DE BRITO, Rory Cristiane Fortes, VERAS, Patrícia Sampaio Tavares, FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé, MARTINS-FILHO, Olindo Assis, TEIXEIRA-CARVALHO, Andréa et REIS, Alexandre Barbosa, 2019. Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. octobre 2019. Vol. 103, n° 19, pp. 8179-8190. DOI 10.1007/s00253-019-10068-x.

MAIA, C. et CAMPINO, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. décembre 2008. Vol. 158, n° 4, pp. 274-287. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.

MAIA, Carla, RAMADA, João, CRISTÓVÃO, José M., GONÇALVES, Luzia et CAMPINO, Lenea, 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*. janvier 2009. Vol. 179, n° 1, pp. 142-144. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.08.009.

MANNA, Laura, VITALE, Fabrizio, REALE, Stefano, PICILLO, Esther, NEGLIA, Gianluca, VESCIO, Francesco et GRAVINO, Angelo Elio, 2009. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Journal*. décembre 2009. Vol. 182, n° 3, pp. 441-445. DOI 10.1016/j.tvjl.2008.08.009.

MEDEIROS, Fernanda Alvarenga Cardoso, GOMES, Luciana Inácia, OLIVEIRA, Edward, DE SOUZA, Carolina Senra Alves, MOURÃO, Maria Vitória, COTA, Gláucia Fernandes, MARQUES, Letícia Helena dos Santos, CARNEIRO, Mariângela et RABELLO, Ana, 2017. Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Journal of Tropical Medicine*. 2017. Vol. 2017, pp. 1-10. DOI 10.1155/2017/7364854.

MIRANDA, Sonia, ROURA, Xavier, PICADO, Albert, FERRER, Lluís et RAMIS, Antonio, 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*. août 2008. Vol. 85, n° 1, pp. 35-38. DOI 10.1016/j.rvsc.2007.09.003.

MIRÓ, G., MONTOYA, A., MATEO, M., ALONSO, A., GARCÍA, S., GARCÍA, A., CABALLERO, M. J. et MOLINA, R., 2007. A leishmaniasis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitology Research*. juillet 2007. Vol. 101, n° 2, pp. 253-257. DOI 10.1007/s00436-007-0497-8.

MORALES-YUSTE, Manuel, MARTÍN-SÁNCHEZ, Joaquina et CORPAS-LOPEZ, Victoriano, 2022. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*. 27 juillet 2022. Vol. 9, n° 8, pp. 387. DOI 10.3390/vetsci9080387.

MORENO, Javier et ALVAR, Jorge, 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*. septembre 2002. Vol. 18, n° 9, pp. 399-405.

DOI 10.1016/S1471-4922(02)02347-4.

MOUGNEAU, Evelyne, BIHL, Franck et GLAICHENHAUS, Nicolas, 2011. Cell biology and immunology of Leishmania: Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological Reviews*. mars 2011. Vol. 240, n° 1, pp. 286-296. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x.

NAJAFZADEH, N., TASLIMIAN, R., FOTOUHI-ARDAKANI, R., SPOTIN, A. et PARVIZI, P., 2022. Detection and differentiation of Leishmania parasites in asymptomatic canine by High-Resolution Melting analysis of microsatellite fragment in ITS gene. *Microbial Pathogenesis*. janvier 2022. Vol. 162, pp. 105300. DOI 10.1016/j.micpath.2021.105300.

NZELU, Chukwunonso O., KATO, Hiroto et PETERS, Nathan C., 2019. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. RAFATI, Sima (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7 novembre 2019. Vol. 13, n° 11, pp. e0007698. DOI 10.1371/journal.pntd.0007698.

OIE, 2022. Chapter 3.1.11 Leishmaniosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021* [en ligne]. 29 juin 2022. Disponible à l'adresse : https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm

OLIVEIRA, Edward, SALIBA, Juliana Wilke, OLIVEIRA, Diana, DIAS, Edelberto Santos et PAZ, Gustavo Fontes, 2016. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. mai 2016. Vol. 221, pp. 9-13. DOI 10.1016/j.vetpar.2016.02.006.

PENA, M.T., ROURA, X. et DAVIDSON, M.G., 2000. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*. mars 2000. Vol. 3, n° 1, pp. 35-41. DOI 10.1046/j.1463-5224.2000.00106.x.

PROVERBIO, Daniela, SPADA, Eva, PEREGO, Roberta, BAGGIANI, Luciana, BAGNAGATTI DE GIORGI, Giada, MIGLIAZZO, Antonella et VITALE, Fabrizio, 2016. Comparison of a rapid immunochromatographic assay with an immunofluorescent antibody test for detection of *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. décembre 2016. Vol. 45, n° 4, pp. 623-626. DOI 10.1111/vcp.12408.

QUILEZ, Javier, MARTÍNEZ, Verónica, WOOLLIAMS, John A., SANCHEZ, Armand, PONG-WONG, Ricardo, KENNEDY, Lorna J., QUINNELL, Rupert J., OLLIER, William E. R., ROURA, Xavier, FERRER, Lluís, ALTET, Laura et FRANCINO, Olga, 2012. Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis. TOLAND, Amanda Ewart (éd.), *PLoS ONE*. 25 avril 2012. Vol. 7, n° 4, pp. e35349. DOI 10.1371/journal.pone.0035349.

QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., DAVIDSON, S., GARCEZ, L., LAMBSON, B., RAMOS, P., SHAW, J.J., SHAW, M.-A. et DYE, C., 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* [en ligne]. mars 2001. Vol. 122, n° 03. [Consulté le 4 janvier 2023]. DOI 10.1017/S0031182001007363. Disponible à l'adresse : http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182001007363

REGLI, Ivo B., PASSELLI, Katuska, HURRELL, Benjamin P. et TACCHINI-COTTIER,

Fabienne, 2017. Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing. *Frontiers in Immunology*. 16 novembre 2017. Vol. 8, pp. 1558. DOI 10.3389/fimmu.2017.01558.

RIERA, M C, AISA, M J, DE COLMENARES, M, PORTUS, M, ROURA, X, TORRAS, S, CASTILLEJO, S, SENTIS, J, FISA, R et GALLEGO, M, 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1 février 1998. Vol. 58, n° 2, pp. 154-159. DOI 10.4269/ajtmh.1998.58.154.

RIVIÈRE, Delphine et LANORE, Didier, 2007. Suspicion de leishmaniose en zone indemne Les analyses importantes pour asseoir le diagnostic. *L'Essentiel*. 2007. Vol. 76, n° 22 au 28 novembre.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, Alhelí, FERNÁNDEZ-BELLÓN, Hugo, RAMIS, Antonio, FERRER, Lluís, ALBEROLA, Jordi et SOLANO-GALLEGO, Laia, 2007. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. avril 2007. Vol. 116, n° 3-4, pp. 190-198. DOI 10.1016/j.vetimm.2007.01.015.

ROMBOLÀ, Pasquale, BARLOZZARI, Giulia, CARVELLI, Andrea, SCARPULLA, Manuela, IACOPONI, Francesca et MACRÌ, Gladia, 2021. Seroprevalence and risk factors associated with exposure to *Leishmania infantum* in dogs, in an endemic Mediterranean region. YURCHENKO, Vyacheslav (éd.), *PLOS ONE*. 4 janvier 2021. Vol. 16, n° 1, pp. e0244923. DOI 10.1371/journal.pone.0244923.

SEGARRA, Sergi, 2021. Nutritional Modulation of the Immune Response Mediated by Nucleotides in Canine Leishmaniasis. *Microorganisms*. 16 décembre 2021. Vol. 9, n° 12, pp. 2601. DOI 10.3390/microorganisms9122601.

SILVA, Sara Clemente Paulino Ferreira e, GOMES, Laiza Bonela, CARVALHO, Paloma Carla Fonte Boa, SANTOS, Aline Gabriele Ribeiro Cerqueira, BORGES, Luiz Felipe Nunes Menezes, OLIVEIRA, Camila Stefanie Fonseca, MORAIS, Maria Helena Franco, PEREIRA, Pedro Lúcio Lithg, AMARAL HADDAD, João Paulo et SOARES, Danielle Ferreira de Magalhães, 2019. Effectiveness of the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars for preventing transmission of canine leishmaniasis by *Lutzomyia* spp.: A cluster randomized controlled trial. *Preventive Veterinary Medicine*. novembre 2019. Vol. 171, pp. 104770. DOI 10.1016/j.prevetmed.2019.104770.

SIQUEIRA, Williane Fernanda, CARDOSO, Mariana Santos, CLÍMACO, Marianna de Carvalho, SILVA, Ana Luiza Teixeira, HEIDT, Benjamin, EERSELS, Kasper, VAN GRINSVEN, Bart, BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira, BUENO, Lilian Lacerda, CLEIJ, Thomas et FUJIWARA, Ricardo Toshio, 2023. Serodiagnosis of leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic dogs by use of the recombinant dynamin-1-like protein from *Leishmania infantum*: A preliminary study. *Acta Tropica*. mars 2023. Vol. 239, pp. 106827. DOI 10.1016/j.actatropica.2023.106827.

SOLANA, Jose Carlos, CHICHARRO, Carmen, GARCÍA, Emilia, AGUADO, Begoña, MORENO, Javier et REQUENA, Jose M., 2022. Assembly of a Large Collection of Maxicircle Sequences and Their Usefulness for *Leishmania* Taxonomy and Strain Typing. *Genes*. 15 juin

2022. Vol. 13, n° 6, pp. 1070. DOI 10.3390/genes13061070.

SOLANO-GALLEGO, Laia, MIRÓ, Guadalupe, KOUTINAS, Alek, CARDOSO, Luis, PENNISI, Maria Grazia, FERRER, Luis, BOURDEAU, Patrick, OLIVA, Gaetano et BANETH, Gad, 2011a. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. décembre 2011. Vol. 4, n° 1, pp. 86. DOI 10.1186/1756-3305-4-86.

SOLANO-GALLEGO, Laia, MIRÓ, Guadalupe, KOUTINAS, Alek, CARDOSO, Luis, PENNISI, Maria Grazia, FERRER, Luis, BOURDEAU, Patrick, OLIVA, Gaetano et BANETH, Gad, 2011b. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. décembre 2011. Vol. 4, n° 1, pp. 86. DOI 10.1186/1756-3305-4-86.

TALMI-FRANK, D., STRAUSS-AYALI, D., JAFFE, C. L. et BANETH, G., 2006. Kinetics and Diagnostic and Prognostic Potential of Quantitative Western Blot Analysis and Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Experimental Canine Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*. février 2006. Vol. 13, n° 2, pp. 271-276. DOI 10.1128/CFI.13.2.271-276.2006.

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

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*. janvier 2019. Vol. 162, pp. 67-75. DOI 10.1016/j.prevetmed.2018.10.015.

VILLANUEVA-SAZ, Sergio, BASURCO, Asier, MARTÍN, Víctor, FERNÁNDEZ, Antonio, LOSTE, Araceli et VERDE, María Teresa, 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*. décembre 2019. Vol. 61, n° 1, pp. 38. DOI 10.1186/s13028-019-0473-1.

VILLANUEVA-SAZ, Sergio, MARTÍNEZ, Marivi, RAMIREZ, Juan David, HERRERA, Giovanni, MARTELES, Diana, SERVIÁN, Marina, VERDE, Maite, GINER, Jacobo, LACASTA, Delia, RUÍZ, Héctor, YZUEL, Andrés et FERNÁNDEZ, Antonio, 2022. Evaluation of five different rapid immunochromatographic tests for canine leishmaniosis in Spain. *Acta Tropica*. mai 2022. Vol. 229, pp. 106371. DOI 10.1016/j.actatropica.2022.106371.

WHO, [sans date]. Leishmaniose. [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

XHEKAJ, Betim, STEFANOVSKA, Jovana, SHERIFI, Kurtesh, REXHEPI, Agim, BIZHGA, Bejo, RASHIKJ, Ljubica, NIKOLOVSKI, Martin, KNIHA, Edwin et CVETKOVIKJ, Aleksandar, 2023. Seroprevalence of canine leishmaniosis in asymptomatic dogs in Kosovo. *Parasitology Research*. février 2023. Vol. 122, n° 2, pp. 607-614. DOI 10.1007/s00436-022-07762-7.

YASUR-LANDAU, Daniel, JAFFE, Charles L., DAVID, Lior et BANETH, Gad, 2016.

Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. DUMONTEIL, Eric (éd.), *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6 janvier 2016. Vol. 10, n° 1, pp. e0004341. DOI 10.1371/journal.pntd.0004341.

YIMAM AYENE, Yonas, MOHEBALI, Mehdi, HAJJARAN, Homa, AKHOUNDI, Behnaz, SHOJAEI, Saeedeh, RAHIMI-FOROUSHANI, Abbas, AFSHAR, Mohammad Javad Abbaszadeh et ZAREI, Z., 2021. A comparative study of nested-PCR and direct agglutination test (DAT) for the detection of *Leishmania infantum* infection in symptomatic and asymptomatic domestic dogs. *BMC Research Notes*. décembre 2021. Vol. 14, n° 1, pp. 270. DOI 10.1186/s13104-021-05654-0.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé signée par chaque propriétaire afin de s'assurer de leur volonté de participer à l'étude avec leurs chiens.

Fiche de consentement éclairé ***Thèse vétérinaire sur la leishmaniose canine dans les Cévennes***

Je déclare avoir pris connaissance des informations suivantes :

- L'étude actuelle vise à évaluer la **dynamique de l'infection dans les Cévennes**, suite à une étude réalisée l'an dernier qui a confirmé la circulation active du parasite dans cette zone géographique. Elle a aussi pour objectif d'essayer de mettre au point un **test diagnostique** permettant de différencier les chiens vaccinés non infectés des chiens infectés.
- Les analyses proposées reposent sur un prélèvement sanguin effectué sur chaque chien participant à l'étude.
- Ma participation n'est nullement obligatoire et les analyses qui seront réalisées sont gratuites.
- Les prélèvements seront réalisés par un vétérinaire impliqué dans l'étude.
- Les analyses seront effectuées par le Centre National de Référence des leishmanioses.
- Les résultats de cette étude seront anonymes.

Je consens que le prélèvement sanguin et les analyses sérologiques permettant de mettre en évidence une infection par le parasite responsable de la leishmaniose soient réalisés chez le ou les chien(s) dont je suis propriétaire.

Date :

Nom du propriétaire : _____

Signature :

Précédée de la mention « lu et approuvé »

Nom du vétérinaire responsable : _____

Signature du vétérinaire :

Nom du responsable de l'étude : _____

Signature du responsable :

Annexe 2 : Questionnaire à destination des propriétaires afin d'obtenir des renseignements sur le lieu de vie des chiens et l'historique du chenil vis-à-vis de la leishmaniose canine.

Nom du propriétaire :

Questionnaire à destination des 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 les poser.

1) Information sur votre lieu de vie

- Adresse :

- Type d'habitat (entourer une réponse) :

- Urbain
- Périurbain
- Rural

- Description du biotope (environnement du milieu de vie) des chiens :

- Présence d'autres animaux domestiques ? Si oui, lesquels :

- Présence d'animaux de ferme près du lieu de vie ?

2) Information sur l'ensemble de vos chiens

- Avez-vous déjà eu des cas de leishmaniose canine avérés dans le passé ?
- Si vous avez des voisins (rayon d'un km environ) qui possèdent un ou des chiens, en ont-ils eu de leur côté ?
- Avez-vous actuellement des chiens atteints de leishmaniose canine ?
- Estimez-vous avoir besoin de plus de renseignements vis-à-vis de la leishmaniose en général ?

Si oui, sur quels sujets en particulier :

Annexe 3 : Questionnaire ayant été rempli pour chaque chien afin d'obtenir les informations pertinentes sur lui vis-à-vis de l'étude.

Nom du propriétaire :

Caractéristiques de chaque chien

Nom de l'animal :	
Sexe :	Age :
Race :	Provenance :
Participation à l'étude de l'année dernière : Oui / Non	
Si oui, résultats aux tests sérologiques :	

- **Longueur des poils :**
 - Court
 - Long
 - Mi-long

- **Utilité :**
 - Chasse
 - Compagnie
 - Garde
 - Autre :

- **Mode de vie :**
 - Intérieur strict
 - Intérieur et extérieur
 - Extérieur strict
 - Intérieur la plupart du temps
 - Extérieur la plupart du temps

- **Lieu de couchage pour la nuit en été :**
 - Intérieur
 - Dehors
 - Niche/chenil ouvert(e)
 - Niche/chenil fermé(e)

- **Votre chien est-il vacciné contre la leishmaniose ?**
 - Non
 - Oui :
 - Si oui, quel est le nom du vaccin et quel est le protocole vaccinal réalisé ?

- **Votre chien a-t-il été malade au cours de l'année précédente ?**
 - Non
 - Oui
 - Si oui, quels sont les signes observés et quel traitement ?

- **Administrez-vous des antiparasitaires externes à votre chien ?**
 - Non
 - Oui
 - Si oui, le(s)quel(s) et à quelle fréquence ?

- **Votre chien a-t-il déjà voyagé hors de la France ?**
 - Non
 - Oui
 - Si oui, quelle était la ou les destination(s) ?

Annexe 4 : Description des lieux de vie des chiens de l'étude par chenil.

Cardet

- Date de prélèvement : 23/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 5
- Altitude : 124 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chênes verts et blancs, chenil proche de la maison

Causse-de-la-Selle

- Date de prélèvement : 27/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 16
- Altitude : 300 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil isolé dans une chênerai mixte avec oliviers, murs de pierre

Agonès

- Date de prélèvement : 26/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 26
- Altitude : 201 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenils avec chênes verts et habitations proches

Trèves

- Date de prélèvement : 25/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 9
- Altitude : 550 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil isolé, chênes verts, sapins, pins noirs, murs en pierre, sol en terre

Lauroux

- Date de prélèvement : 14/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 8
- Altitude : 350 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil proche d'une habitation, pas de chênes ni de murs de pierre

Amiane A

- Date de prélèvement : 18/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 14
- Altitude : 250 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil à proximité de chênes verts et de murs de pierre

Puéchabon A

- Date de prélèvement : 17/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 4
- Altitude : 230 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil à proximité de chênes verts et de murs de pierre

Puéchabon B

- Date de prélèvement : 17/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 4
- Altitude : 230 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil avec murs de pierre, vignes

Puéchabon C

- Date de prélèvement : 17/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 2
- Altitude : 230 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Jardin avec murs de pierre et figuier

Saint-Jean-de-Fos

- Date de prélèvement : 16/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 1
- Altitude : 200 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Accès à un jardin sans chênes ni murs de pierre

Aniane B

- Date de prélèvement : 23/02/2023
- Nombre de chiens prélevés : 15
- Altitude : 250 m
- Type d'habitat : Périurbain
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil proche des habitations, assez ombragé, pas de chênes verts mais murs en pierre présents

Soudorgues

- Date de prélèvement : 23/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 7
- Altitude : 540 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil isolé, chênes verts, sapins, pins noirs, murs en pierre, sol en terre

Lauroux

- Date de prélèvement : 14/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 8
- Altitude : 350 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil proche d'une habitation, pas de chênes ni de murs de pierre

L'Estrechure

- Date de prélèvement : 23/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 11
- Altitude : 332 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil à proximité de l'habitation, ruisseau, chênes verts et murs de pierre autour

Boisset-et-Gaujac

- Date de prélèvement : 23/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 6
- Altitude : 160 m
- Type d'habitat : Périurbain
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil bétonné, à côté de la maison, pas de murs de pierre ni de chênes verts

Saint-André-de-Valborgne

- Date de prélèvement : 23/01/2023
- Nombre de chiens prélevés : 9
- Altitude : 460 m
- Type d'habitat : Rural
- Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Pins, châtaigniers, quelques chênes verts, nombreux murs de pierre, ombre très présente, rivière à proximité

<p>Sauclères</p> <ul style="list-style-type: none"> • Date de prélèvement : 25/01/2023 • Nombre de chiens prélevés : 9 • Altitude : 740 m • Type d'habitat : Rural • Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil bétonné, ombragé, quelques chênes verts
<p>Teyran</p> <ul style="list-style-type: none"> • Date de prélèvement : 26/02/2023 • Nombre de chiens prélevés : 17 • Altitude : 93 m • Type d'habitat : Périurbain • Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil bétonné, ensoleillé avec peu d'ombre, pas de murs et de chênes verts, seulement oliviers et pins
<p>Saint-Bauzille-de-Putois A</p> <ul style="list-style-type: none"> • Date de prélèvement : 23/02/2023 • Nombre de chiens prélevés : 21 • Altitude : 118 m • Type d'habitat : Périurbain • Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil non bétonné, un peu ombragé, niches ouvertes, sans chêne verts ni murs de pierre
<p>Saint-Bauzille-de-Putois B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Date de prélèvement : 23/02/2023 • Nombre de chiens prélevés : 7 • Altitude : 118 m • Type d'habitat : Rural • Description du biotope (dans un rayon de 100 m) : Chenil bétonné non ombragé proche de la maison, pas de chêne ni de murs en pierre

Prevalence of canine leishmaniosis in the Cévennes Mediterranean region, France

L. Turcutti¹, E. Bouhsira¹, A. Bossa¹, C. Ravel^{2,3}, C. Hammami², L. Mery-Bordes², P. Bousquet^{2,3}, G. Pasquier^{2,3}, L. Lachaud²

¹École Nationale Vétérinaire de Toulouse, InTheres, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence des Leishmanioses, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Université de Montpellier, UMR MIVEGEC, Montpellier France

Introduction

Canine leishmaniasis is a vector-borne disease highly prevalent in southern France and in Mediterranean countries. Despite this significance, seroprevalence studies are lacking in France. A seroprevalence study was carried out in an enzootic area, the Cévennes, in January 2022. This first sampling campaign estimated a seroprevalence in dogs at around 14% (ELISA kit Bordier®). A follow-up survey was carried out during winter 2023. The aim of the current work was: (i) to study the dynamics of the infection by monitoring changes in the serological status of dogs sampled during the two surveys, (ii) to assess the contribution of the western-blot (WB) technique, in particular in distinguishing between vaccinated and unvaccinated dogs.

Material & Methods

- Study area : Cévenol region, France (Figure 1)
- Population of 2023 survey : 192 dogs
- Samples: 5mL of blood on EDTA
- Serological tests:
 - ELISA : *Leishmania infantum* IgG ELISA® (Bordier®)
 - Western Blot (WB) : *Leishmania* Western Blot IgG® (LDBIO®)
- Statistical analyses: Excel® software. The degree of agreement between tests was evaluated by Cohen's Kappa coefficient. Their performances were compared using a Bayesian latent class analysis.
- Ethical approval N° 2021070114534565

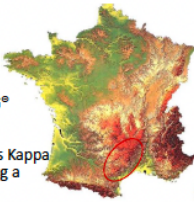


Figure 1. Cévennes region and sampling sites



Figure 2. Sampling method

Results

1. Endemicity of canine leishmaniosis

- 15 different places in the Cévennes region were investigated
 - ✓ areas covered: 1200 km² area
 - ✓ 11 areas studied in 2022 and 2023
 - ✓ 4 new sampling sites in 2023 (Figure 3)
- Seroprevalence :
 - ✓ 10,9% by ELISA, showing comparable results to the 2022 survey (14%)
 - ✓ 21,8% by Western-Blot (Figure 4)

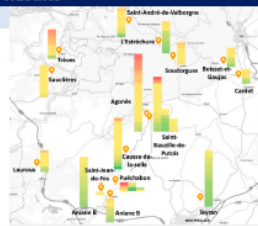
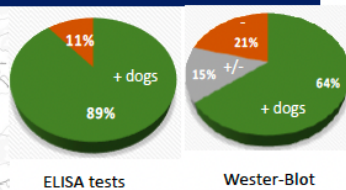


Figure 3. Sampling sites and seroprevalence of each kennel



ELISA tests

Western-Blot

2. Dynamics of infection between 2022 and 2023

- An incidence of 4.6% was calculated in the population of dogs followed since 2022 (n = 88). Their serological status' evolution is shown in figure 4
- 5 dogs became seronegative; 3/5 dogs were vaccinated with Letifend® in 2023
- 4 dogs became seropositive and 3 dogs had clinical signs compatible with leishmaniosis

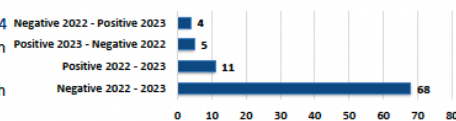


Figure 5. Serological status evolution of the dogs between 2022 and 2023

3. Contribution of the Western Blot technique

- Tests performance was established by a Bayesian approach in the absence of gold standard (Figure 6)
- The agreement between the 2 techniques was qualified « moderate » considering the Cohen's Kappa coefficient (0,547)
- Figure 6 shows the WB results according to the serological status by ELISA for the whole canine population (n = 192)
- Among the 192 dogs sampled during 2023, 26 presented clinical signs; 38% (10/26) and 50% (13/26) were seropositives by ELISA and WB respectively
- 29 dogs were correctly vaccinated with Letifend® and 86% (25/29) were seronegative by ELISA versus 76% (22/29) by WB

Serological technique	ELISA	Western Blot
Sensitivity	45,41%	90,93%
Specificity	99,91%	81,11%

Figure 5. Comparison of the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the two different serological methods used for the whole canine population (n=192)

Antibodies titers	WB « 0 strip » (-)	WB « 1 strip » (+/-)	WB « 2 strips » (+)
ELISA			
< 1	70% (119/169)	16% (28/169)	14% (23/169)
> 1	10% (2/21)	0%	90% (19/21)

Figure 6. WB results according to the titer of antibodies estimated by ELISA

Conclusion / Perspectives

The seroprevalence in the sampled population (n= 192 dogs) was estimated at 21.8% by WB and at 10.9% by ELISA, showing comparable results to the 2022 study. An incidence of 4.6% was calculated in this population of dogs. This work highlights the lower sensitivity of ELISA method compared to Western Blot (45.41% and 90.93% respectively). Western Blot allowed to detect early infections, even before the appearance of clinical signs of leishmaniosis. A further complementary study is planned to better understand the significance of the WB pattern, especially when only one antigenic band (14 or 16 kDa) is observed. No vaccine interference was observed, particularly with Letifend® vaccine. However the distinction between vaccinated and non vaccinated dogs remains difficult using WB patterns.

Nom : Turcutti Prénom : Léa

Suivi de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans le foyer Cévenol et apport de la technique du Western Blot pour l'établissement d'un diagnostic précoce de la maladie

La leishmaniose canine est une maladie vectorisée fortement prévalente dans le sud de la France et dans les pays du pourtour méditerranéen. Cependant des données de séroprévalence récentes sont manquantes en France métropolitaine. Une étude de séroprévalence a été initiée chez des chiens de chasse (n=169) dans une zone enzootique, les Cévennes, en 2022. Cette première campagne de prélèvements a estimé une séroprévalence chez le chien de l'ordre de 14% en utilisant le kit ELISA Bordier®. Une nouvelle enquête a été réalisée durant l'hiver 2023. L'objectif de ce travail était : (i) d'étudier la dynamique de l'infection en suivant l'évolution du statut sérologique des chiens prélevés lors des deux enquêtes, (ii) d'évaluer l'apport de la technique de western-blot (WB), en particulier pour distinguer les chiens vaccinés des non vaccinés. Pour cela, la détection d'anticorps a été réalisée par méthode ELISA (Bordier®) et par western-blot (LDBio®). 192 chiens ont été inclus dans l'étude en 2023 (dont 87 suivis depuis 2022). La séroprévalence a été estimée à 21,8% par WB et à 10,9% par méthode ELISA, montrant des valeurs équivalentes à celles obtenues lors de la campagne précédente. Une incidence de 4,6% a été calculée dans la population des chiens suivis. Ce travail met en évidence la sensibilité insuffisante de la méthode ELISA par rapport à celle obtenue par Western Blot avec 45,41% contre 90,93% respectivement. Le Western Blot semble de plus capable de détecter des infections précoces, avant l'apparition de signes cliniques. Aucune interférence vaccinale n'a été mise en évidence dans notre étude, notamment avec le vaccin Letifend®.

Mots-clés : *Leishmania infantum* ; Leishmaniose canine ; Séroprévalence ; Cévennes ; ELISA ; Western Blot

Seroprevalence follow-up of canine leishmaniasis in the Cevennes area and contribution of the Western Blot technique for an early diagnostic of the disease

Canine leishmaniasis is a vector-borne disease highly prevalent in the south of France and in Mediterranean countries. Despite this significance seroprevalence studies are lacking in France. A seroprevalence study was carried out in an enzootic area, the Cévennes, in January 2022. This first sampling campaign estimated a seroprevalence in dogs at around 14% (ELISA kit Bordier®). A follow-up survey was carried out during winter 2023. The aim of this work was: (i) to study the dynamics of the infection by monitoring changes in the serological status of dogs sampled during the two surveys, (ii) to assess the contribution of the western-blot (WB) technique, in particular in distinguishing between vaccinated and unvaccinated dogs. Antibody detection was carried out by ELISA (Bordier®) and western-blot (LDBio®). 192 dogs were included in the study in 2023 (including 87 followed up since 2022). Seroprevalence was estimated at 21.8% by WB and at 10.9% by ELISA, showing comparable results to the 2022 study. An incidence of 4.6% was calculated in the population of dogs included in the study. This work highlights the insufficient sensitivity of ELISA method compared to Western Blot (45.41% and 90.93% respectively). The Western Blot allowed to detect early infections, before the appearance of clinical signs. No vaccine interference was observed in our study, particularly with Letifend® vaccine.

Key-words : *Leishmania infantum* ; Canine leishmaniasis ; Seroprevalence ; Cevennes ; ELISA ; Western Blot