



**HAL**  
open science

# Recherche de marqueurs biologiques d'intérêt au cours du suivi de la leishmaniose canine : étude d'une cohorte de 33 chiens

Baptiste Dubreuil

## ► To cite this version:

Baptiste Dubreuil. Recherche de marqueurs biologiques d'intérêt au cours du suivi de la leishmaniose canine : étude d'une cohorte de 33 chiens. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04873769

**HAL Id: dumas-04873769**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04873769v1>**

Submitted on 8 Jan 2025

**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 2024. - Thèse n° 104

**RECHERCHE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES  
D'INTERET AU COURS DU SUIVI DE LA  
LEISHMANIOSE CANINE :  
ETUDE D'UNE COHORTE DE 33 CHIENS**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de

Nantes, le 25 octobre 2024

Par

**Baptiste, François-Xavier DUBREUIL**

Sous la direction de

**Nicolas SOETART**

Président du jury : Monsieur Florent MORIO, Professeur et praticien hospitalier en parasitologie au CHU de Nantes

Membres du jury : Monsieur Jacques GUILLOT, Professeur en parasitologie vétérinaire à Oniris - VetAgroBio Nantes

Monsieur Nicolas SOETART, Praticien hospitalier à LabOniris



ANNEE 2024. - Thèse n° 104

**RECHERCHE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES  
D'INTERET AU COURS DU SUIVI DE LA  
LEISHMANIOSE CANINE :  
ETUDE D'UNE COHORTE DE 33 CHIENS**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de

Nantes, le 25 octobre 2024

Par

**Baptiste, François-Xavier DUBREUIL**

Sous la direction de

**Nicolas SOETART**

Président du jury : Monsieur Florent MORIO, Professeur et praticien hospitalier en parasitologie au CHU de Nantes

Membres du jury : Monsieur Jacques GUILLOT, Professeur en parasitologie vétérinaire à Oniris – VetAgroBio Nantes

Monsieur Nicolas SOETART, Praticien hospitalier à LabOniris

## Liste des membres du corps enseignant

<b>Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment</b>		
Responsable : <b>Emmanuel JAFFRES</b> – Adjointe : <b>Frédérique NGUYEN</b>		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solemn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Pierre CORDIER (CERC) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
<u>Microbiotech</u>	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
<b>Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique</b>		
Responsable : <b>Raphaël GUATTEO</b> – Adjoint : <b>Jean-Michel CAPPELIER</b>		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Milly LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC) Fanny RENOIS-MEURENS (MC HDR)

<b>Département DSC Sciences cliniques</b>		
Responsable : <b>Catherine IBISCH</b> – Adjoint : <b>Marion FUSELLIER</b>		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVILLE (Pr)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMESTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (CERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
<b>Département GPA Génie des procédés alimentaires</b>		
Responsable : <b>Vanessa JURY</b> – Adjointe : <b>Cyril TOUBLANC</b>		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
<b>Département MSC Management, statistiques et communication</b>		
Responsable : <b>Samira ROUSSELIERE</b> – Adjointe : <b>Véronique CARIOU</b>		
Mathématiques, statistiques, informatique	Chantal THORIN (PRAG) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

## Protection des droits d'auteur et plagiat

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Baptiste DUBREUIL
- Année de soutenance : 2024
- Titre de la thèse : Recherche de marqueurs biologiques d'intérêt au cours du suivi de la leishmaniose canine : Etude d'une cohorte de 33 chiens.
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- Ecole de soutenance : Oniris VetAgroBio Nantes
- Nombre de pages : 88

# **TABLE DES MATIERES :**

Table des illustrations (Tableaux et Figures) : .....	8
Table des abréviations : .....	11
INTRODUCTION : .....	12
PARTIE I ) CONTEXTE SCIENTIFIQUE : LA LEISHMANIOSE CANINE .....	13
A. Le parasite et la réaction immunitaire de l'hôte : .....	14
1) Le parasite .....	14
2) Le vecteur (hôte définitif du parasite) : .....	17
3) Pénétration du parasite et résistance aux défenses immunitaires locales : .....	19
4) La réaction immunitaire de l'hôte : pivot de la pathogénicité du parasite : .....	20
B. Signes clinico-biologiques et diagnostic .....	24
1) Signes cliniques de la leishmaniose canine : .....	24
a) Signes généraux : .....	24
b) Signes cutanéomuqueux : .....	25
c) Signes cliniques associés à l'atteinte du système phagocytaire mononucléé : .....	29
d) Signes secondaires aux dépôts de complexes immuns : .....	29
e) Signes digestifs : .....	30
2) Anomalies biologiques : .....	31
a) Analyses hématologiques : .....	31
b) Biochimie sanguine et urinaire : .....	32
c) Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation .....	35
d) La vitamine B12 .....	35
3) Les outils diagnostiques spécifiques : .....	36
a) Les tests sérologiques : .....	36
b) Mise en évidence directe par PCR .....	37
c) Examen direct des lésions .....	37
C. Classification, traitement et suivi de la leishmaniose .....	39
1) Classification LeishVet : .....	39
2) Traitements .....	39
a) Traitements spécifiques de l'affection .....	39
b) Traitement des complications : .....	41
3) Suivi clinique et biologique .....	42
PARTIE II) ETUDE PERSONNELLE .....	44



A. Matériels et méthodes :	45
1) Conception de l'étude :	45
a) Critères d'inclusion des animaux :	45
b) Critères d'exclusion de certains sérums :	45
c) Données recueillies :	45
2) Choix des critères de progression de la maladie :	45
a) Présence de signes cliniques :	46
b) Diminution du rapport albumine/globulines :	46
c) Présence d'une anémie :	46
d) Stade LeishVET :	46
3) Choix des biomarqueurs étudiés :	46
a) La CRP Canine (Protéine-C Réactive):	47
b) L'haptoglobine :	47
c) Protéines totales, albumine et globulines sanguines :	48
d) Le titre sérologique :	48
e) Vitamine B12 et Vitamine B9 :	48
f) Homocystéine :	49
4) Analyse statistique :	50
B. Résultats :	51
1) Présentation de la population :	51
a) Données épidémiologiques :	51
b) Données cliniques :	52
c) Données sérologiques :	53
d) Données biologiques :	53
e) Stade Leishvet :	54
2) Etude des biomarqueurs sériques :	55
a) Statistiques descriptives :	55
b) Corrélation entre les différentes variables biologiques :	56
3) Influence des variables épidémiologiques, cliniques, biologiques :	58
a) Influence du sexe et de l'âge :	58
b) Influence de la présence de signes cliniques :	58
c) Selon la présence d'une anémie :	63
d) Présence d'un rapport A/G diminué :	66
e) Stade LeishVet :	68
C. Discussion :	71

1) Protéines de l'inflammation.....	72
a) Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation.....	72
b) Albumine, globulines et rapport A/G :.....	74
2) Métabolisme de la vitamine B12.....	75
a) Vitamine B12 :.....	75
b) Homocystéine : .....	76
c) Vitamine B9 :.....	78
D. Limites de l'Etude :.....	79
CONCLUSION :.....	80
Bibliographie :.....	81

# Table des illustrations (Tableaux et Figures) :

Tableau 1 : Distribution géographiques des leishmanies et espèces vectrices principales (Solano-Gallego et al., 2009).....	13
Tableau 2 : Présentation de la classification des différents stades LeishVet. (Groupe LEISHVET, 2024).....	39
Tableau 3 : Résumé des traitements spécifiques de l'affection disponible, d'après (Groupe LEISHVET, 2024; Segarra et al., 2018) .....	40
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de la CRP Canine .....	47
Tableau 5 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de l'haptoglobine canine. ....	47
Tableau 6 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de la vitamine B12 et B9. ....	48
Tableau 7 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de l'homocystéine canine. ....	49
Tableau 8 : Récapitulatif des différentes valeurs obtenues lors du dosage des différents biomarqueurs sanguins.....	55
Tableau 9 : Récapitulatif des variations des biomarqueurs en fonction des différents paramètres. ....	70
Figure 1 : Formes promastigotes de <i>L. infantum</i> . Culture. Microscopie optique, x1000. (Laboniris) .....	14
Figure 2 : Formes amastigotes de <i>leishmania</i> phagocytées par un macrophage dans une ponction de nœud lymphatique poplité. Microscopie optique x1000. (Laboniris). ....	15
Figure 3 : Schéma du cycle de vie du parasite responsable de la leishmaniose. (ESCCAP FRANCE, 2024) .....	16
Figure 4 : Zone de présence de <i>Phlebotomus perniciosus</i> en mars 2022. (ECDC Europe, 2022) .....	17
Figure 5 : Carte représentant les différents cas répertoriés de leishmaniose canine en France. (Canonne, 2023) .....	18
Figure 6 : Représentation de la contamination d'un hôte par des leishmanies. (Filippi et al., 2001) .....	20
Figure 7 : Schéma des paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T selon la voie Th1 ou Th2. (Filippi et al., 2001) .....	21
Figure 8 : Représentation des différentes réponses cellulaires en cas d'infection leishmanienne. (Costa-da-Silva et al., 2022) .....	22
Figure 9 : Amyotrophie marquée des muscles masséters : aspect de "tête de vieux chien". (Beugnet et al., 2021, Blaise Hubert) .....	24
Figure 10 : Squamosis psoriasiforme avec alopecie chez un chien leishmanien. Transmise par le Dr Guaquiere Xavier.....	25

Figure 11 : Squamosis psoriasiforme visible sur les poids d'un chien leishmanien. Transmise par Dr Guaquiere Xavier .....	26
Figure 12 : Alopécie péri-orbitaire avec squamosis psoriasiforme chez un chien leishmanien. DUBREUIL Baptiste .....	26
Figure 13 : Ulcération de la truffe chez un chien leishmanien (Bourdoiseau et Chermette, 2015) .....	27
Figure 14 : Nombreux nodules sur les lèvres et le menton d'un chien leishmanien (Dr Cadiergues pour Pro.dermavet.fr).....	27
Figure 15 : Onychogryphose chez un chien. ( <a href="https://pro.dermavet.fr/">https://pro.dermavet.fr/</a> ).....	28
Figure 16 : "Chancre d'inoculation au niveau de la face interne du pavillon auriculaire ( <a href="http://www.cliniquedelaltagna.fr">www.cliniquedelaltagna.fr</a> ) .....	28
Figure 17 : Splénogramme d'un chien atteint de leishmaniose. Coloration MGG, Microscopie optique, x1000. (Laboniris).....	29
Figure 18 : Myélogramme de chien leishmanien. Coloration MGG x400. (Paltrinieri et al., 2016) .....	32
Figure 19 : Protéinogramme chez deux chiens atteints de leishmaniose. (SOETART, 2020) ..	33
Figure 20 : Classification IRIS de la maladie rénale chronique. (IDEXX d'après (IRIS, 2023)) ..	34
Figure 21 : Immunofluorescence indirecte : la fluorescence des promastigotes indique la présence d'anticorps anti-leishmania dans le sérum testé. (LabOniris).....	36
Figure 22 : Démarche diagnostique en cas de suspicion de leishmaniose canine. (d'après (Groupe LEISHVET, 2024)) .....	38
Figure 23 : Frise chronologique pour le suivi des chiens selon leur situation. D'après (Groupe LEISHVET, 2024) .....	43
Figure 24 : Représentation schématique du métabolisme de la vitamine B12 (Surligné en rouge : les molécules étudiées). (Patterson et al., 2013) .....	44
Figure 25 : Répartition des 33 chiens recrutés selon le nombre d'analyses par animal .....	51
Figure 26 : Distribution de la valeur des titres sérologiques .....	53
Figure 27 : Nombre de prélèvements associés à une anémie. ....	53
Figure 28 : Répartition des différents échantillons selon le stade LeishVet des chiens au moment de l'analyse. ....	54
Figure 29 : Corrélogramme des différents biomarqueurs étudiés dans une cohorte de 33 chiens leishmaniens au cours de 76 suivis sérologiques. ....	57
Figure 30 : Boîte à moustache représentant le titre sérologique selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	59
Figure 31 : Boîte à moustache représentant l'haptoglobulinémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	59
Figure 32 : Boîte à moustache représentant la protéinémie totale selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	60
Figure 33 : Boîte à moustache représentant la globulinémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	60
Figure 34 : Boîte à moustache représentant la folatémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=42 dosages) .....	61
Figure 35 : Boîte à moustache représentant l'albuminémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	61

Figure 36 : Boite à moustache représentant le rapport A/G selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages).....	62
Figure 37 : Boite à moustache représentant l'homocystéinémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=60 dosages).....	62
Figure 38 : Boite à moustache représentant l'haptoglobulinémie selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages).....	63
Figure 39 : Boite à moustache représentant la protéinémie totale selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages).....	63
Figure 40 : Boite à moustache représentant la globulinémie selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages) .....	64
Figure 41 : Boite à moustache représentant le rapport A/G selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages) .....	64
Figure 42 : Boite à moustache représentant cobalaminémie selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=31 dosages) .....	65
Figure 43 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages) .....	66
Figure 44 : Boite à moustache représentant l'haptoglobulinémie selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages) .....	66
Figure 45 : Boite à moustache représentant le titre sérologique selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages) .....	67
Figure 46 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages) .....	68
Figure 47 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages) .....	68
Figure 48 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages) .....	69
Figure 49 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=68 dosages) .....	69
Figure 50 : Elaboration de la cystéine en utilisant l'homocystéine chez leishmania major. (Williams et al., 2009).....	77

# Table des abréviations :

*ADN : Acide désoxyribo-nucléique*

*ALAT : Alanine aminotransférase*

*AT2 : Antagoniste de l'angiotensine 2.*

*CAM : Complexe d'attaque membranaire*

*CMH : complexe majeur d'histocompatibilité*

*CRP : Protéine C-réactive*

*DFHR-TS : Dihydrofolate réductase et Thymidylate sulfatase*

*ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies*

*ESCCAP : Comité Scientifique Européen d'études des Parasites des Animaux de Compagnie*

*FITC : Isothiocyanate de fluorescéine*

*gp63 : Glycoprotéine 63*

*Gpx : Glutathion peroxydase*

*HO-1 : Hème oxygénase de type 1*

*HRP : horse radish peroxydase*

*IECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine*

*IFI : Immunofluorescence indirecte*

*IgG : Immunoglobulines G*

*IFN- $\gamma$  : Interféron Gamma*

*IL - ... : Interleukine de type ...*

*iNOS : Monoxyde d'azote synthase*

*IRIS : International Renal Interest Society*

*Lu. Longipalpis : lutzomyia Longipalpis*

*NFS : Numération et formule sanguine*

*PCR : Réaction de polymérase en chaîne*

*P.perniciosus : Phlebotomus perniciosus*

*Rapport A/G : Rapport Albumine sur Globulines*

*RPCU : rapport protéines sur créatinine urinaire*

*SAA : Sérum amyloïde A*

*SDMA : Diméthyl Arginine Symétrique*

*TGF- $\beta$  : Facteur de croissance transformant Beta*

*Lymphocytes Th... : Lymphocytes T helper*

*TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha*

*Lymphocytes T-reg : Lymphocytes T - régulateur*

# INTRODUCTION :

La leishmaniose est une maladie zoonotique à transmission vectorisée causée par un protozoaire du genre *Leishmania*. Dans l'espèce canine, espèce domestique la plus touchée, cette maladie est due à l'espèce *Leishmania infantum* qui est transmise par des phlébotomes, insectes diptères nématocères de la famille des Psychodidés.

Les manifestations cliniques de la leishmaniose canine, qui peuvent être à la fois cutanées et systémiques, résultent en partie de l'interaction entre le parasite et le système immunitaire de l'hôte. Cette interaction entraîne notamment la production de complexes immuns, ayant des effets néfastes sur l'organisme parasité.

Le suivi de la leishmaniose canine est parfois complexe. En effet certains animaux présentent des rechutes caractérisées par la réapparition de signes clinico-biologiques. Actuellement le suivi spécifique de la maladie repose notamment sur une sérologique quantitative. Cette dernière reflète la production d'anticorps du patient. Ce marqueur est cependant tardif. Ainsi il est actuellement étudié d'autres marqueurs qui pourrait présenter une cinétique plus intéressante pour le suivi.

Dans cette étude, nous avons étudié :

- Les protéines de phase aiguë de l'inflammation, qui présentent des variations rapides en réponse à l'inflammation chez les chiens leishmaniens.
- Des marqueurs associés au métabolisme de la vitamines B12 (vitamines B12 et B9 et homocystéine).

Ce manuscrit est composé d'une première partie bibliographique présentant le contexte scientifique de l'études qui sera détaillée dans la seconde partie.

# PARTIE I ) CONTEXTE SCIENTIFIQUE : LA LEISHMANIOSE CANINE

L'espèce principalement responsable de la leishmaniose canine en Europe est *Leishmania infantum*. D'autres espèces peuvent infecter le chien en fonction des zones géographiques. Ces dernières sont présentées dans le *Tableau 1* (Solano-Gallego et al., 2009).

*Tableau 1 : Distribution géographiques des leishmanies et espèces vectrices principales (Solano-Gallego et al., 2009)*

Espèces de Leishmanies	Distribution géographique	Insecte vecteur démontré	Insecte vecteur suspecté
<i>L.infantum</i>	Bassin méditerranéen	<i>Phlebotomus perniciosus, P.ariasii</i>	<i>P.longicuspis</i>
	Moyen Orient	<i>P.perfiliewi, P.neglectus</i> <i>P.langeroni, P.tobbi</i>	
	Asie du Sud-Est, Iran, Arménie, Afghanistan	<i>P.kandelakii</i>	<i>P.brevis, P.halapensis, etc.</i>
	Asie Central, Chine	<i>P.chinensis, P.alexandri</i>	<i>P.smirnovi, P.transcaucasicus</i> <i>P.longiductus</i>
<i>L.infantum</i> - <i>L.chagasi</i>	Amérique du Sud et Central	<i>Lutzomyia longipalpais, Lu.evansi,</i> <i>Lu.olmea olmea</i>	<i>Lu.antunesi, Lu.shannoni</i>
<i>L.donovani</i>	Afrique de l'est	<i>P.orientalis, P.martini</i>	<i>P.rodhaini</i>
<i>L.tropica</i>	Afrique du Nord	<i>P.sergenti, P.arabicus</i>	<i>P.chabaudi, P.saevus</i>
<i>L.braziliensis</i>	Amérique du Sud et Centrale	<i>Lu.wellcomei, Lu.spinicrassa</i>	<i>Lu. Amazonensis, Lu. Migonei</i> <i>Lu. Panamensis, Lu. Paraensis</i> <i>Lu.complexis, Lu.pessoai, etc</i>
		<i>Lu.whitmani, Lu.yucumensis</i>	
		<i>Lu.carrerai carrerae, Lu.llanosmartinsi</i>	
		<i>Lu.ovallesi, Lu.intermedia, Lu.gomezi</i>	
		<i>Lu.trapidoi, Lu.ylephiletor, Lu.umbratilis</i>	
<i>L.peruviana</i>	Andes péruviennes	<i>Lu.peruensis, Lu.verrucarum, Lu. Ayacuchensis</i>	<i>Lu.noguchii, Lu.pescei</i>
<i>L.panamensis</i>	Amérique Centrale	<i>Lu.trapidoi, Lu.ylephiletor, Lu.gomezi,</i> <i>Lu.panamensis, Lu.hartmanni</i>	<i>Lu.shannoni, Lu ovallesi, etc.</i>

P=*Phelobotomus* Lu=*Lutzomyia*

Ce parasite est un protozoaire flagellé appartenant à la famille des *Trypanosomatidae*. De nombreuses espèces de mammifères sont réceptives (caractéristique décrivant le fait que le parasite peut infecter et se multiplier dans l'hôte) et sensibles (caractéristique décrivant le fait que les hôtes vont développer des signes cliniques suite à l'infestation). C'est le cas des canidés domestiques (chiens) et sauvages (renards). Les humains sont également réceptifs et sensibles au parasite. Les lagomorphes et les rongeurs sont eux aussi des hôtes du parasite. Les chevaux et les chats sont réceptifs au parasite mais généralement peu sensibles, l'apparition de signes cliniques étant rare (Mhadhbi et Sassi, 2020; Pennisi et Persichetti, 2018).



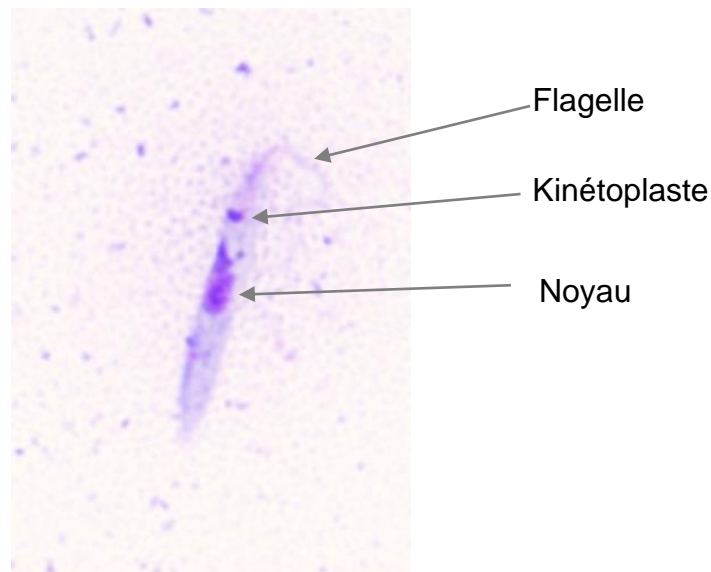
Ce parasite se développe au sein des cellules de la lignée des phagocytes mononucléés (comprenant notamment les monocytes et les macrophages).

## **A. Le parasite et la réaction immunitaire de l'hôte :**

### **1) Le parasite**

Les leishmanies prennent deux formes morphologiques différentes au cours de leur cycle parasitaire.

Chez le vecteur (hôte définitif) et en culture *in vitro*, ils se trouvent sous une forme appelée promastigote visible sur la figure 1. Ils sont fusiformes, mesurent de 15 à 20  $\mu\text{m}$  et possèdent un flagelle de grande taille, leur permettant de se déplacer. On note aussi la présence d'un kinétoplaste en région postérieure au noyau. Ce dernier est une région spécialisée de l'unique mitochondrie



*Figure 1 : Formes promastigotes de L. infantum. Culture. Microscopie optique, x1000. (Laboniris)*

Chez l'hôte intermédiaire tel que l'espèce canine, le parasite évolue sous la forme amastigote visible dans la figure 2. Présent à l'intérieur des cellules, l'amastigote est de forme ovoïde et mesure de 2 à 6  $\mu\text{m}$  (pour son grand axe). Il contient un noyau de grande taille et un kinétoplaste. Ce stade est dépourvu de flagelle, leur déplacement s'effectue uniquement par l'intermédiaire des cellules du système des phagocytes mononucléés.

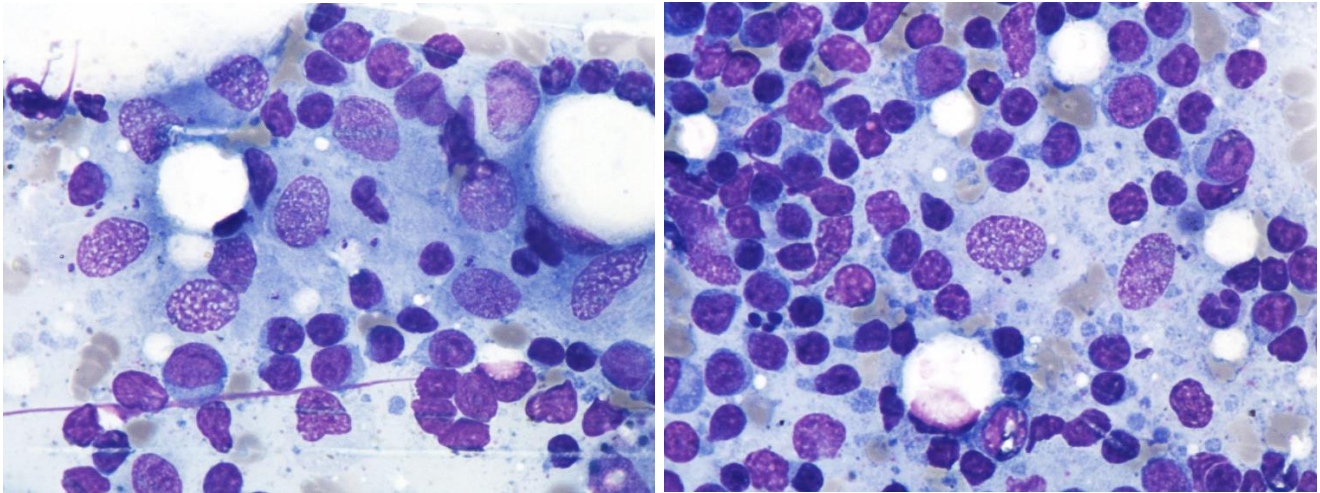


Figure 2 : Formes amastigotes de *leishmania* phagocytées par un macrophage dans une ponction de nœud lymphatique poplité. Microscopie optique x1000. (Laboniris).

*Leishmania infantum* est donc un parasite avec un cycle dixène (cycle nécessitant deux hôtes) présenté dans la Figure 3. Après un repas de sang contaminant, les amastigotes ingérés vont se transformer en promastigote et se reproduire par division binaire longitudinale et reproduction sexuée chez l'hôte définitif (i.e. le phlébotome). (Shaik et al., 2021).

Le phlébotome parasité va ensuite pouvoir injecter des promastigotes à l'hôte intermédiaire au cours de ses repas sanguins suivants. Chez le chien, les principaux lieux d'injections sont le pavillon de l'oreille et le chanfrein. (ESCCAP FRANCE, 2024).

Les promastigotes pénètrent donc dans l'organisme et sont phagocytés par les macrophages (voir PARTIE I) A) 3)). Ils vont se transformer en amastigotes, ces derniers vont se multiplier par division simple (DPDx, 2024). Leur grand nombre va provoquer la rupture du macrophage. Les amastigotes vont donc être libérés dans l'organisme et se diffuser en étant de nouveau phagocytés. Ils pourront notamment être phagocytés par les macrophages cutanés. Ces derniers permettront ensuite la contamination d'un nouveau phlébotome lors de sa prise de repas.

Trois autres modes de contamination ont été étudiés :

- La transmission *in utero* : très étudiée aux Etats-Unis, car suspectée d'être la principale voie de transmission (Vida et al., 2016).  
En effet, la transmission vectorielle a été démontrée comme possible par l'intermédiaire notamment de *Lutzomyia longipalpis*, (vecteur présent aux Etats-Unis) mais jamais mis en évidence sur le terrain (Toepp et al., 2017). A noter que plus récemment d'autres vecteurs proches de la frontière mexicaine ont été mis en évidence comme porteur de *Leishmania* par PCR. (Curtin et Aronson, 2021). Ainsi on peut craindre que la contamination vectorielle progresse aux Etats-Unis.
- La transmission sanguine démontrée chez le chien lors de transfusion sanguine (de Freitas et al., 2006; Owens et al., 2001)
- La transmission par le lait est suspectée mais pas encore prouvée. Il a en effet été retrouvé de l'ADN de *L. infantum* dans le lait d'une chienne naturellement infecté. (Ribeiro et al., 2022)

Le cycle parasitaire de *L. infantum* est schématisée dans la figure 3.

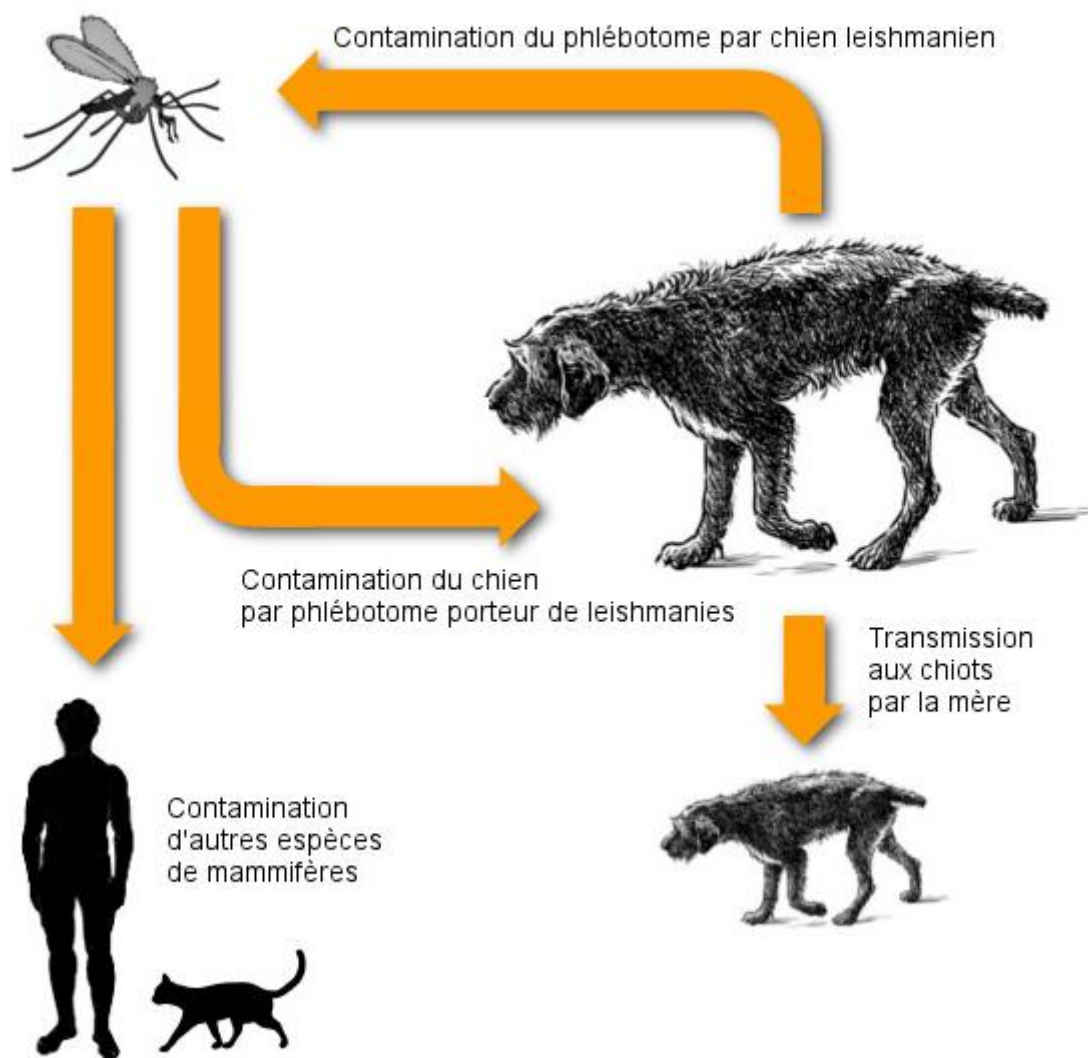


Figure 3 : Schéma du cycle de vie du parasite responsable de la leishmaniose.  
(ESCCAP FRANCE, 2024)

## 2) Le vecteur (hôte définitif du parasite) :

Les phlébotomes sont des insectes de l'ordre des diptères du sous ordre des nématocères (insectes avec des antennes en forme de fil, les ailes longues), appartenant à la famille des *Psychodidae* et à la sous-famille des *Phlebotominae*. On retrouve enfin dans cette sous-famille deux genres : *Phlebotomus* et *Lutzomyia*.

En Europe, seul le premier genre a un intérêt en médecine vétérinaire notamment en région méditerranéenne (ESCCAP FRANCE, 2023). L'autre genre, *Lutzomyia*, ne se trouvant pas proche du bassin méditerranéen (Solano-Gallego et al., 2009).

Les deux principales espèces de phlébotomes responsables de la transmission de la leishmaniose sont *P. perniciosus* et *P. ariasi*.

Le premier est responsable de la majorité des cas de leishmaniose en France, sa zone d'action s'étendant de la zone méditerranéenne à une partie du nord de l'Italie (cf. *figure 4*). Cependant, cette zone a encore progressé vers le nord ces dernières années.

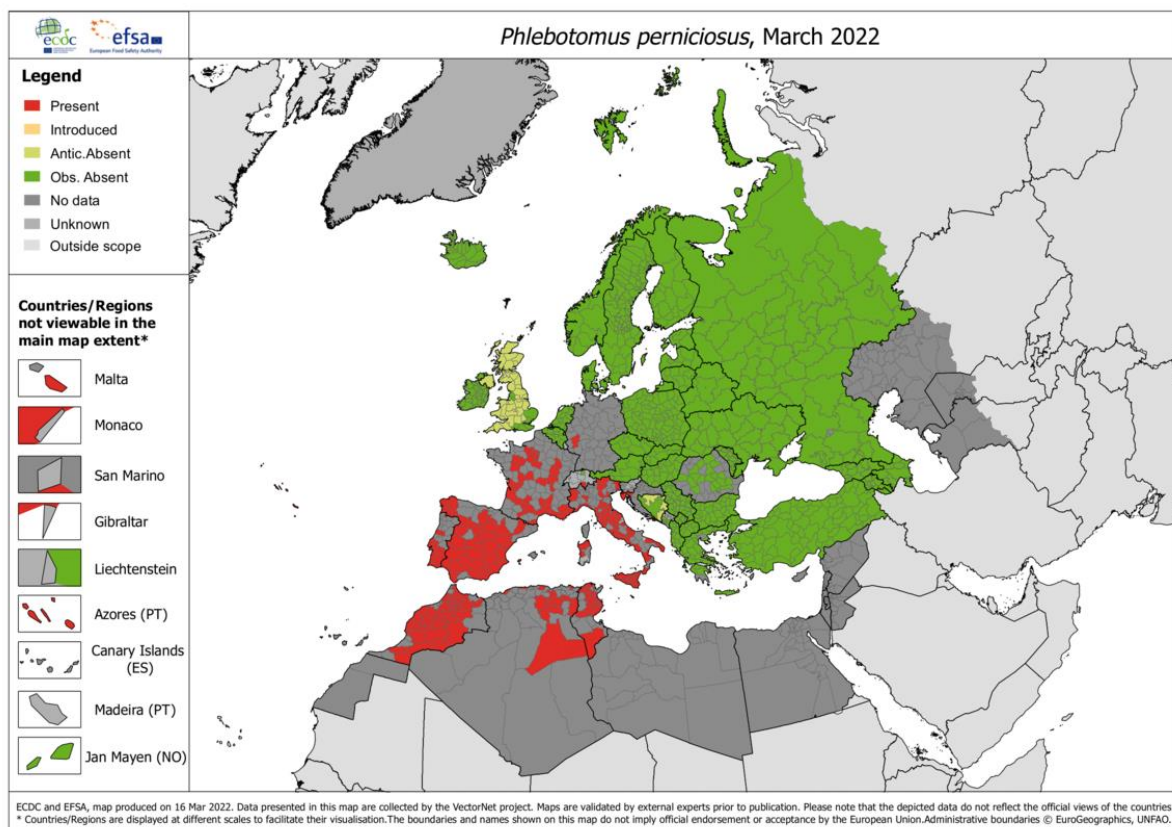


Figure 4 : Zone de présence de *Phlebotomus perniciosus* en mars 2022. (ECDC Europe, 2022)

*P. ariasi* est quant à lui présent dans le nord de l'Espagne et le sud-ouest de la France, ce dernier vit dans espaces plus ruraux que le premier, car il vit hors des habitations (Beugnet et al., 2021). A noter que *Lutzomyia* est présente aux Etats-Unis et est suspectée de pouvoir être un vecteur de la maladie outre-Atlantique (ESCCAP, 2024 ; Beugnet et al., 2021).

Le cycle du phlébotome commence dans des sols riches en matière organiques. Puis, lorsque les conditions sont propices, les larves deviennent des adultes en 4 à 6 semaines. Les adultes



ont une activité qui commence à la tombée du soleil. En journée, ils se trouvent dans des endroits frais à l'abri du soleil (mur de pierre, bâtiments d'élevages...).

Les phlébotomes n'ont pas une capacité de vol très importante, leur rayon d'action est donc limité. Il peut arriver cependant qu'ils se déplacent sur des grandes distances, notamment lorsqu'ils sont portés par les vents dominants. Cela pourrait expliquer leur extension vers de nouvelles régions auparavant épargnées de leishmaniose (ESCCAP FRANCE, 2023).

La nutrition du phlébotome se fait par telmophagie. Après piqûre, la destruction des vaisseaux sanguins et lymphatiques présents dans la zone lésée crée une mare de sang et de lymphes, où seront déposés les promastigotes qui pourront ensuite être phagocytés par les macrophages (GIRAUD et MILON, 2023).

La transmission vectorielle est la voie majoritaire de transmission de la leishmaniose en France et en Europe. Un animal malade a donc été dans l'immense majorité des cas en contact avec un phlébotome (Baneth et Solano-Gallego, 2022). Il est aussi important de noter qu'aujourd'hui, la zone de présence de ces arthropodes tend à croître notamment à cause du changement climatique (ESCCAP FRANCE, 2023 ; Tazerji et al., 2022).

L'aire de répartition des cas répertoriés en 2022 est représentée dans la *figure 5* (Canonne, 2023).

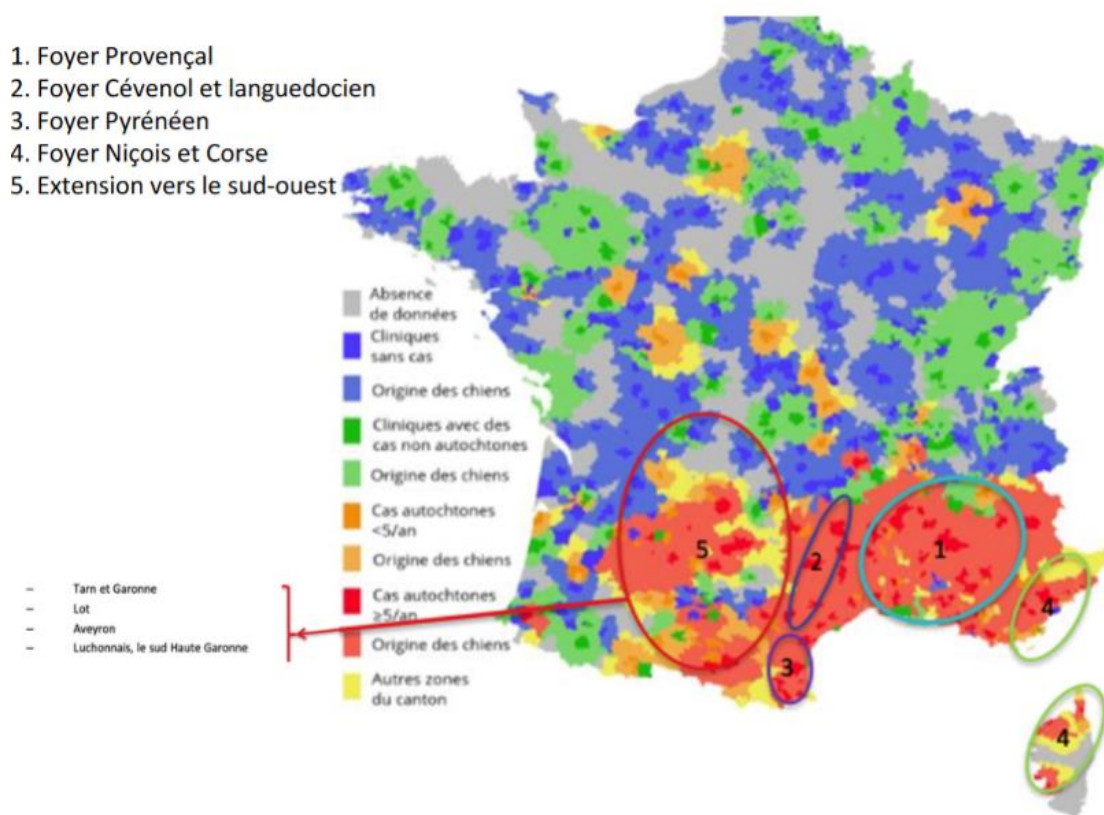


Figure 5 : Carte représentant les différents cas répertoriés de leishmaniose canine en France. (Canonne, 2023)

### 3) Pénétration du parasite et résistance aux défenses immunitaires locales :

Chez le chien, les parasites sont donc dans les cellules du système des phagocytes mononucléés.

Ce système regroupe l'ensemble des cellules capables de phagocytose et ayant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles proches. Il regroupe donc : les monocytes sanguins, les macrophages se trouvant dans différents tissus (cellules de Kupffer dans le foie, cellules de Langerhans dans la peau, macrophages alvéolaires dans les poumons, ...) mais aussi leurs précurseurs et les cellules dendritiques (van Furth et al., 1972). Ces cellules sont ubiquitaires, retrouvées dans la moelle osseuse, le sang, la rate, le foie, les poumons, le derme et les ganglions lymphatiques, expliquant la diversité des manifestations cliniques de la maladie (voir PARTIE I) B) 1)).

Les formes promastigotes pénètrent donc dans l'organisme en étant injectées dans le derme par les insectes vecteurs au moment d'un repas sanguin. La première défense contre le parasite est le système du complément. Il permet la destruction des parasites par formation du complexe d'attaque membranaire (CAM). Cependant les promastigotes ont différents moyens de résistance : ils peuvent grâce à leur protéine gp63, rendre la protéine C3b (précurseur du CAM) en une forme inactive C3bi. Ils sont également résistants au CAM grâce à une protéine de surface : le lipophosphoglycane. La seconde barrière défensive implique les granulocytes neutrophiles. Ces derniers permettent de limiter la multiplication des parasites sans cependant totalement les éradiquer. De plus, cette activation des neutrophiles provoque des dégâts importants au niveau des tissus adjacents, pouvant provoquer l'apparition de signes cutanés (Filippi et al., 2001).

Lorsque les leishmanies entrent en contact avec les macrophages, attirés par la réponse inflammatoire provoquée par la présence d'un agent étranger, ces derniers vont phagocyter les formes promastigotes du parasite. Une fois phagocytés, les promastigotes sont enfermés dans des vacuoles parasitophores au pH acide. Ces vacuoles contiennent de nombreuses protéines lysosomales et des protéases, enzymes qui, normalement, dégradent les antigènes phagocytés pour les éliminer. Cependant, cela est peu efficace contre les promastigotes de *Leishmania*. En effet, ces derniers résistent aux pH acides et aux protéases du lysosome (les protéines de surfaces seraient masquées par des glyco-inositol-phospholipides) (Filippi et al., 2001).

Cette étape d'entrée du parasite dans l'organisme et les macrophages est représentée dans la *figure 6*.

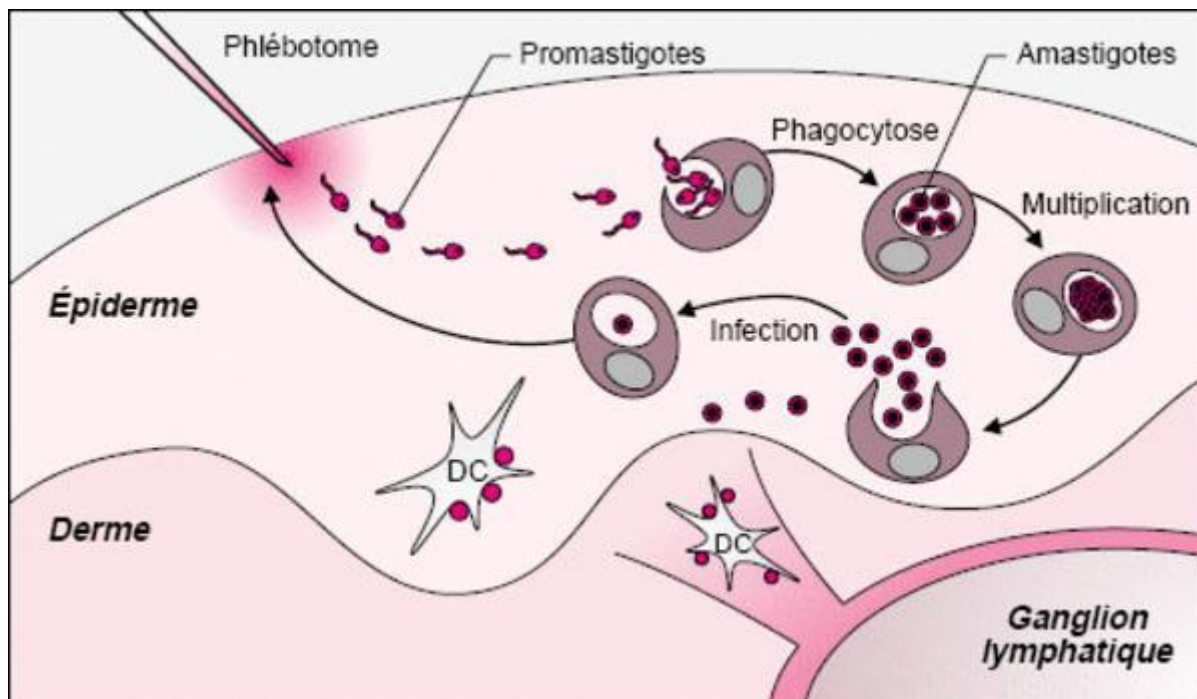


Figure 6 : Représentation de la contamination d'un hôte par des leishmanies. (Filippi et al., 2001)

#### 4) La réaction immunitaire de l'hôte : pivot de la pathogénicité du parasite :

Une fois le parasite inoculé par le phlébotome dans l'organisme, une partie des éléments parasitaires sont détruits par le système du complément et les granulocytes neutrophiles dans le derme. La réaction inflammatoire induite par la présence du parasite, via les cytokines, va permettre la migration des lymphocytes T naïfs de la lymphe vers le ganglion lymphatique drainant le site inflammatoire. Les cellules dendritiques, vont emprunter la même voie vers le ganglion, après avoir ingéré les antigènes parasitaires dans le derme. Elles subissent alors une maturation, dégradant l'antigène en peptides qu'elles exposent à leur surface via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Filippi et al., 2001).

Le contact entre les lymphocytes T naïfs (CD4+) et les cellules dendritiques présentant les peptides parasitaires permet l'activation et la prolifération des lymphocytes spécifiques à cet antigène. Après leur activation, les lymphocytes T (CD4+) se différencient en lymphocytes de type Th (T-helper) ou T-reg (T-régulateur). La différenciation en lymphocyte T helper 1 (Th1) ou 2 (Th2) dépend de l'environnement cytokinique (Filippi et al., 2001).

Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement de l'**IFN- $\gamma$** , du **TNF- $\alpha$**  et de l'**IL-2**. Leur différenciation est promue par l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ . Ils favorisent une réponse cellulaire permettant de détruire les pathogènes intracellulaires comme *Leishmania*, par coopération avec des cellules NK (Natural Killer) et des lymphocytes T-CD8+. Ces cellules ont un pouvoir cytotoxique sur les cellules parasitées. Ainsi il peut alors y avoir une destruction des macrophages infectés et une libération des amastigotes (ayant résisté à la destruction cf PARTIE I) A),3)) dans le milieu extracellulaire. Cette voie permettra aussi l'activation des macrophages et favorisera leurs propriétés leishmanicides par synthèse de monoxyde d'azote par la NO-synthase (iNOS) grâce à l'IFN- $\gamma$ . (Filippi et al., 2001).

Les lymphocytes Th2, quant à eux, sécrètent principalement **IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10**. Leur différenciation est promue par l'IL-4 et entraîne la synthèse par les plasmocytes d'anticorps de type IgG, inefficaces contre le parasite, mais aussi l'inactivation des macrophages. Des études ont montré que chez des souris infectées par *L. major*, la sélection de la voie Th2, induite par injection d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  ou par mutation du gène de l'IFN- $\gamma$ , augmente la charge parasitaire et les lésions (Reiner et Locksley, 1995).

Les paramètres influençant la différenciation des lymphocytes sont représentés dans la *figure 7*

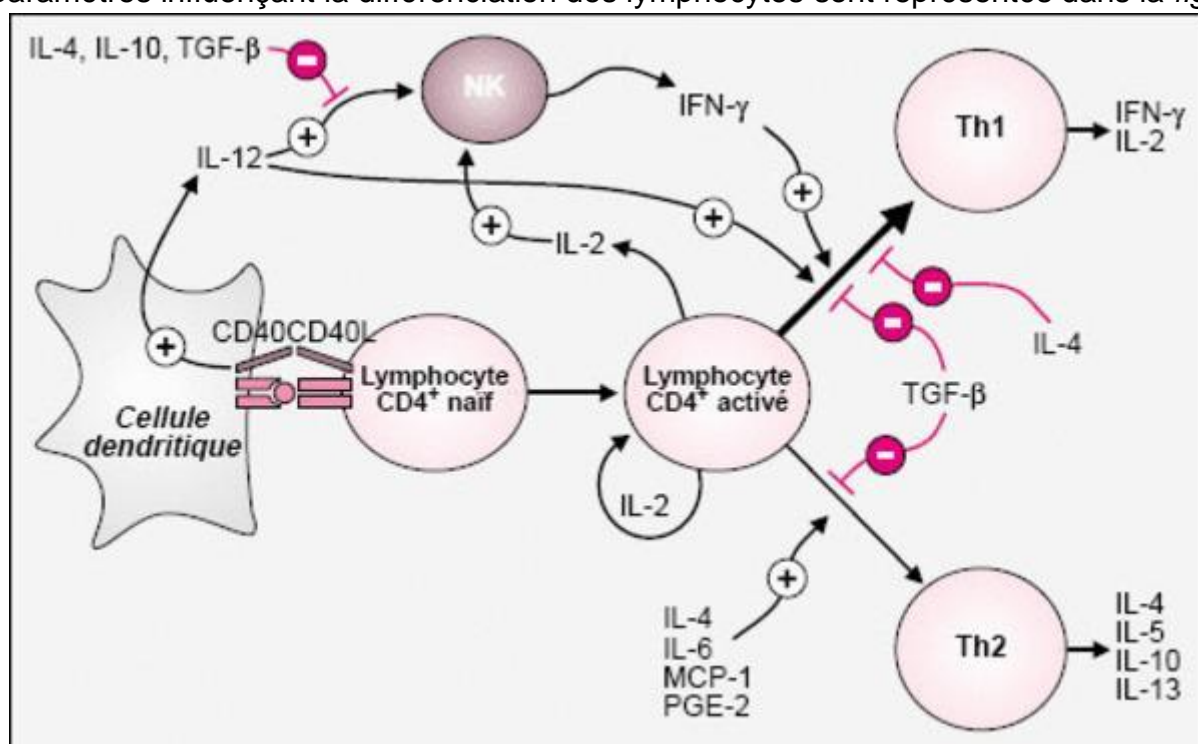


Figure 7 : Schéma des paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T selon la voie Th1 ou Th2. (Filippi et al., 2001)

La sélection de la voie Th1 ou Th2 est donc déterminante pour le contrôle de la maladie. Elle repose sur les cytokines produites par les différentes cellules effectrices du système immunitaire (Costa et al., 2023).

Les macrophages sécrètent des cytokines différentes selon leur voie d'activation (Costa et al., 2023).

- Les **macrophages M1**, activés par des cytokines pro-Th1, produisent de l'IL-12 favorisant la voie Th1, et donc la production d'IFN- $\gamma$ .
- Les **macrophages M2**, activés par des cytokines pro-Th2, **favorisent la survie du parasite** en inhibant le pouvoir oxydatif de l'hôte et en augmentant la synthèse d'IL-10, une cytokine qui réduit la réponse immunitaire.

Les mastocytes sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13, favorisant la voie Th2 et augmentant l'inflammation locale par le relargage d'histamine.

Les neutrophiles, s'ils peuvent contribuer à détruire le parasite grâce à leur pouvoir oxydatif et la phagocytose, sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ , activant ainsi les macrophages. Toutefois, ceux qui échouent à détruire les parasites deviennent source de contamination par recrutement



d'autres cellules phagocytaires. Elles aussi sont incapables de détruire les parasites, et deviennent alors des lieux de survie de ce dernier. (Toepp et Petersen, 2020). Les cellules NK sécrètent également de l'IFN- $\gamma$ , crucial pour la différenciation vers la voie Th1. Les différentes réponses cellulaires en cas d'infection leishmanienne sont représentées dans la figure 8.

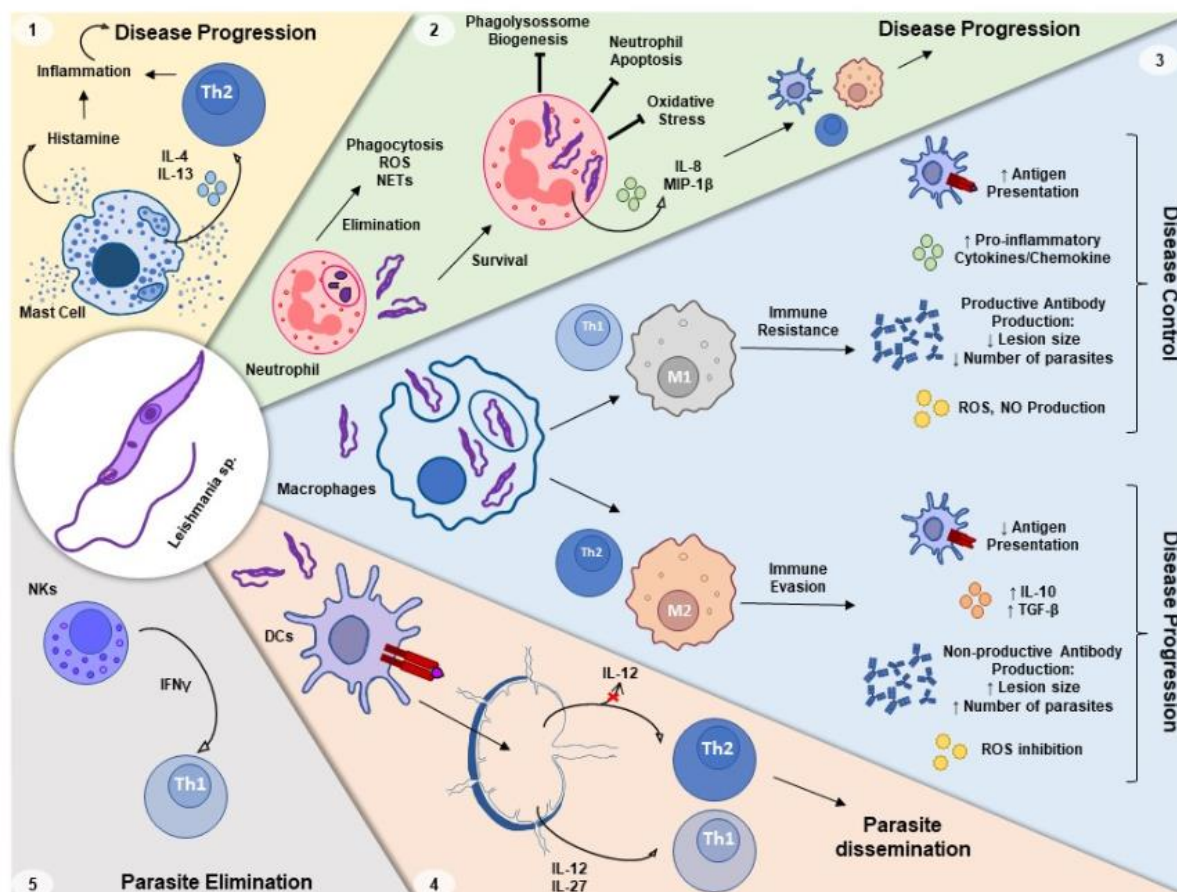


Figure 8 : Représentation des différentes réponses cellulaires en cas d'infection leishmanienne. (Costa-da-Silva et al., 2022)

Les parasites jouent eux aussi un rôle dans la sélection de la voie Th2, voie inefficace pour la défense de l'hôte. Ils induisent en effet la synthèse d'IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 par les macrophages parasités et inhibent le relargage d'IFN- $\gamma$  (Costa et al., 2023).

Il y a de plus une inhibition des voies entre elles par l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 qui inhibent leurs voies opposées (Fanfano, 2024).

A noter qu'une composante génétique héréditaire est suspectée pour la sélection de la voie des lymphocytes T helper chez l'animal infecté. C'est notamment le cas chez le Podenco d'Ibiza, où certaines études montrent une prédominance de la voie Th1, associée à une certaine résistance à la progression de la maladie dans cette race (Álvarez et al., 2022 ; Burnham et al., 2020).

Ainsi, la réponse immunitaire de l'hôte est déterminante pour l'expression clinique de la maladie. Les signes cliniques sont notamment secondaires à la synthèse et à la persistance des cytokines pro-inflammatoires dans l'organisme (Beugnet et al., 2021). Ces cytokines génèrent des signes généraux (amyotrophie, fièvre, amaigrissement...) et une surproduction des protéines de la

phase aiguë de l'inflammation comme la CRP ou l'haptoglobine (Moreau, 2024). Enfin, la réponse immunitaire lorsqu'elle est de type humorale (voie Th2) a pour conséquence la synthèse d'IgG à l'origine de complexes immuns. Ces complexes vont se déposer en grandes quantités au niveau de différents organes provoquant ainsi des manifestations à médiation immune (glomérulonéphrite, uvéite, polyarthrite...) (Beugnet et al., 2021).

Ainsi, la sélection de la voie Th1 ou Th2 de la réponse immunitaire est donc une des principales causes de l'apparition ou non d'une leishmaniose clinique. Les recherches sont encore en cours afin de totalement élucider la mise en place de l'immunité et de pouvoir l'utiliser afin d'orienter une réponse immunitaire efficace notamment avec de l'immunothérapie (Gonçalves et al., 2019).

## **B. Signes clinico-biologiques et diagnostic**

### **1) Signes cliniques de la leishmaniose canine :**

La leishmaniose est caractérisée par des signes cliniques polymorphes (cutanés, généraux, urinaires, oculaires, locomoteurs, ganglionnaires, ...). De nombreux chiens, parce qu'ils développent et maintiennent une réaction immunitaire efficace, ne présentent aucun signe clinique pendant de nombreux mois après leur infestation.

#### **a) Signes généraux :**

Un abattement est présent chez environ 50 à 60% des animaux (Gharbi et al., 2018; Silvestrini et al., 2016). Cela peut s'exprimer par de la fatigue en début d'évolution et aller jusqu'à la prostration.

Les chiens (environ 73%) présentent également un amaigrissement avec une amyotrophie (Gharbi et al., 2018). Cette dernière commence généralement au niveau de la tête (muscles temporaux) donnant un aspect de "vieux chien" au patient (cf *figure 9*). En fin d'évolution, cette amyotrophie est généralisée. Elle est notamment due à la sécrétion de cytokines inflammatoires (dont le  $TNF\alpha$ ) qui augmente le catabolisme protéique, à la production d'auto-anticorps anti-myofibrilles et à un dépôt de complexes immuns au niveau des muscles (Bornet, 2002). De plus, les animaux peuvent présenter une anorexie (possiblement associée à un syndrome fébrile), favorisant également l'amyotrophie et l'amaigrissement (Morales-Yuste et al., 2022).

Une légère hyperthermie peut aussi être mise en évidence, cette dernière est cependant fluctuante. Elle serait surtout observée sur les jeunes chiens de moins de 2 ans (Beugnet et al., 2021).



*Figure 9 : Amyotrophie marquée des muscles masséters : aspect de "tête de vieux chien".  
(Beugnet et al., 2021, Blaise Hubert)*

## b) Signes cutané-muqueux :

Les signes cutané-muqueux constituent une des manifestations de la leishmaniose les plus rencontrées par les praticiens (Koutinas et al., 1999) Ils ne sont (sauf surinfections) pas prurigineux.

On peut ainsi observer :

- **Une dermatite exfoliative non prurigineuse** (Solano-Gallego et al., 2009) avec un important squamosis secondaire à de la parakératose, définie comme un état de kératinisation excessive de l'épiderme. Les squames produites sont de grandes tailles (dits psoriasiformes), et brillantes. Cette desquamation se retrouve sur l'ensemble du corps mais plus souvent au niveau dorso-lombaire et de la pointe du pavillon auriculaire. Une prévalence de 55 à 60% est mise en évidence (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). Ce squamosis est visible sur les *figures 10 et 11*.
- Une alopecie généralisée peut-être mise en évidence (observée chez 14% des chiens (Ciaramella et al., 1997)), avec des dépilations particulièrement au niveau de la tête (péri-oculaire, auriculaire), des membres voire de la queue. Une alopecie péri-oculaire est visible sur la *figure 12*.
- Un épaissement cutané secondaire à une hyperkératose au niveau du chanfrein, des coussinets, ou de la truffe donnant un aspect craquelé à cet épiderme.



*Figure 10 : Squamosis psoriasiforme avec alopecie chez un chien leishmanien. Transmise par le Dr Guaquiere Xavier*





*Figure 11 : Squamous psoriasiforme visible sur les poidis d'un chien leishmanien. Transmise par Dr Guaquiere Xavier*



*Figure 12 : Alopécie péri-orbitaire avec squamous psoriasiforme chez un chien leishmanien. DUBREUIL Baptiste*

- **Une dermatite ulcération** (Solano-Gallego et al., 2009). Les lésions peuvent se retrouver sur l'ensemble du corps et plus particulièrement dans les zones de saillies osseuses, les régions interdigitées et la truffe (Bornet, 2002) comme illustré sur la *figure 13*. Ce signe clinique est mis en évidence chez 24 à 34% des chiens (Ciaramella et al., 1997 ; Koutinas et al., 1999).

Il a été suspecté une possible contamination directe de l'homme au contact de ces dernières (Bourdoiseau et Chermette, 2015) mais elle est finalement remise en question aujourd'hui (Beugnet et al., 2021).



*Figure 13 : Ulcération de la truffe chez un chien leishmanien (Bourdoiseau et Chermette, 2015)*

- Une dermatite focale nodulaire ou multinodulaires (voir *figure 15*) correspondant à la présence de nodules sous-cutanés de type granulome secondaires à la multiplication des macrophages dans le derme (Beugnet et al., 2021 ; Solano-Gallego et al., 2009). Cette atteinte concerne 6% des chiens (Ciaramella et al., 1997 ; Koutinas et al., 1999).



*Figure 14 : Nombreux nodules sur les lèvres et le menton d'un chien leishmanien (Dr Cadiergues pour Pro.dermavet.fr)*

- Une onychogryphose (pousse rapide des griffes), symptôme rare mais assez pathognomonique de la maladie, (cf *figure 15*). Ce symptôme a tout de même été remarqué chez 20 à 30% des chiens dans différentes études (Ciaramella et al., 1997 ; Koutinas et al., 1999)



Figure 15 : Onychogryphose chez un chien. (<https://pro.dermavet.fr/>)

- Un chancre d'inoculation, correspondant à la piqûre infestante du phlébotome peut aussi être mise en évidence notamment au niveau du chanfrein, de la truffe et dans la zone interne du pavillon auriculaire (voir figure 16) (Beugnet et al., 2021).



Figure 16 : "Chancre d'inoculation au niveau de la face interne du pavillon auriculaire ([www.cliniquedelaltagna.fr](http://www.cliniquedelaltagna.fr))

Des saignements muqueux (épistaxis, méléna, ulcères buccaux) sont également rapportés, ils semblent être majoritairement secondaires à des ulcérations.



### c) Signes cliniques associés à l'atteinte du système phagocytaire mononucléé :

En raison de la dissémination du parasite via les cellules du système immunitaire, les organes lymphoïdes palpables à l'examen clinique (nœuds lymphatiques, rate) peuvent présenter des modifications.

Une adénomégalie (isolée ou généralisée) est mise en évidence chez environ 90% des chiens leishmaniens (Ciaramella et al., 1997). Les nœuds lymphatiques les plus fréquemment atteints sont les pré-scapulaires. Cela est probablement liée à leur zone de drainage qui est celle présentant les lésions les plus sévères (Ciaramella et al., 1997).

L'atteinte splénique se manifeste par une splénomégalie décelable à la palpation, cette dernière a été mise en évidence chez 10 à 50 % des chiens selon les études (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). Ce signe est inconstant chez le chien contrairement à l'homme (Bornet, 2002) Cette splénomégalie serait tardive et pourrait être douloureuse (Beugnet et al., 2021).

Ces organomégalies sont secondaires à une infiltration inflammatoire (macrophagique et neutrophilique) et à une hyperplasie lympho-plasmocytaire (voir figure 17).

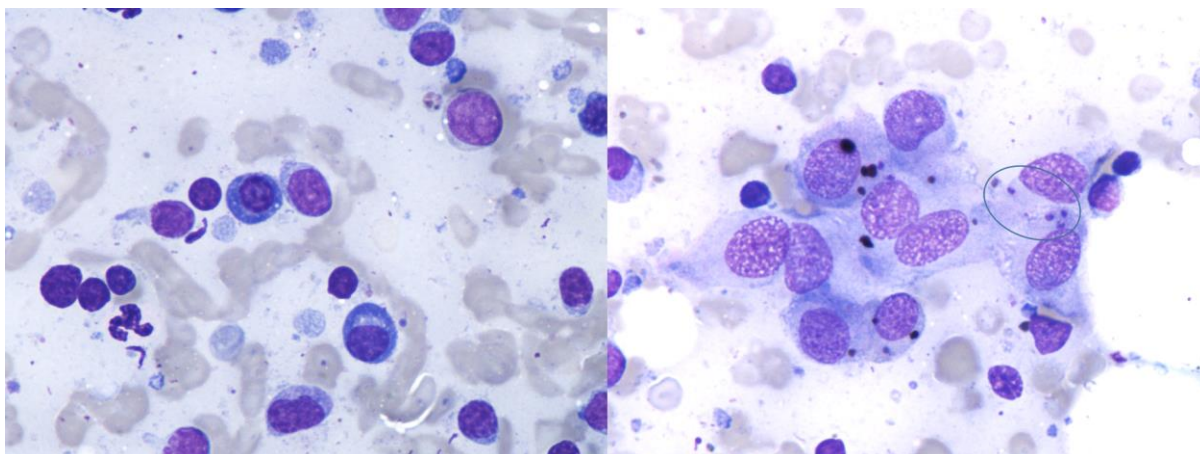


Figure 17 : Splénogramme d'un chien atteint de leishmaniose. Coloration MGG, Microscopie optique, x1000. (Laboniris)

Noter l'hyperplasie lymphoplasmocytaire (à gauche) et inflammation macrophagique (à droite). Certains macrophages contiennent des amastigotes phagocytés (entourés en vert).

### d) Signes secondaires aux dépôts de complexes immuns :

La formation et le dépôt de complexes immuns entre les anticorps produits par l'animal et les antigènes parasitaires (en excès) entraîne des lésions au niveau de différents organes.

Ce sont souvent ces lésions qui péjorent le pronostic car associées à des dysfonctions organiques.

Une glomérulonéphrite secondaire aux dépôts de complexes immuns peut se développer et induire une insuffisance rénale chronique, se manifestant notamment par une PUPD.

Des conjonctivites bilatérales, des kératites et des uvéites majoritairement antérieure (caractérisée par un myosis, une humeur aqueuse trouble, de la photophobie, un blépharospasme, et une néovascularisation cornéenne profonde) sont également rapportées. Une atteinte oculaire est présente chez environ 15% à 20% des chiens (Ciaramella et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2009).



Une polyarthrite peut également se développer, cette dernière peut être accompagnée d'une synovite (avec possible mise en évidence des leishmanies dans le liquide synovial). Ces symptômes locomoteurs se manifestent par une boiterie avec gonflements articulaires, entraînant des difficultés à se lever (Bornet, 2002).

#### e) Signes digestifs :

Une inflammation digestive pyogranulomateuse avec présence d'éléments parasitaires dans les lésions (avec une atteinte caecocolique plus marquée) est rapportée (López et al., 2022; Pinto et al., 2011). Elle peut s'accompagner de diarrhée, qui répond généralement bien aux traitements leishmanicide et (Adamama-Moraitou et al., 2007; López et al., 2022).

## 2) Anomalies biologiques :

Ce tableau clinique polymorphe et inconstant s'accompagne d'anomalies biologiques, qui justifient la réalisation d'examen complémentaires de biologie médicale.

### a) Analyses hématologiques :

#### - Numération et formule sanguine (NFS) :

Une anémie est parfois observée, cette dernière est le plus souvent non régénérative normochrome, normocytaire et elle peut participer au syndrome de fatigabilité. Elle est secondaire à une baisse de l'érythropoïèse médullaire (liée au processus inflammatoire généralisé et médullaire), voire à une baisse de production de l'érythropoïétine lors de la maladie rénale chronique concomitante. Les hémorragies répétées (lors de thrombopénie ou d'ulcérations hémorragiques) pourraient aussi jouer un rôle dans le développement d'une anémie (Bornet, 2002; Maia et Campino, 2018). Cette anémie est en lien avec la pâleur des muqueuses rencontrées chez 60% des chiens (Ciaramella et al., 1997).

Les anomalies de la lignée blanche sont majoritairement représentées par une leucocytose neutrophilique mature, s'accompagnant parfois d'une lymphopénie et/ou d'une monocytose, témoin du processus inflammatoire (Maia et Campino, 2018 ; Meléndez-Lazo et al., 2018).

Une thrombopénie peut être observée, possiblement due à une destruction auto-immune, des anticorps anti-plaquettaire ayant été mis en évidence lors de leishmaniose canine (Paltrinieri et al., 2016). Une co-infection, notamment par un agent infectieux transmis par les tiques, peut être recherchée en cas de thrombopénie majeure ou ne rétrocedant pas au traitement de la leishmaniose (Paltrinieri et al., 2016).

#### - Evaluation de la moelle osseuse hématopoïétique :

L'examen du myélogramme met généralement en évidence une hyperplasie myéloïde (Paltrinieri et al., 2016). Cette dernière est notamment secondaire à une inflammation granulomateuse. Les macrophages peuvent être visualisés en train de phagocyter des amastigotes (cf *figure 18*) ou des cellules comme les globules rouges (erythrophagie). Une hyperplasie lymphoplasmocytaire avec présence, parfois importante, de cellules de Mott (plasmocytes avec des cristaux d'immunoglobulines visibles dans le cytoplasme) est également fréquemment observée ainsi qu'une hyperplasie mégacaryocytaire (plus ou moins associé à une dysplasie de la lignée), surtout en cas de consommation plaquettaire périphérique.

En lien avec l'anémie décrite précédemment, une hypoplasie érythroïde d'intensité variable est présente.

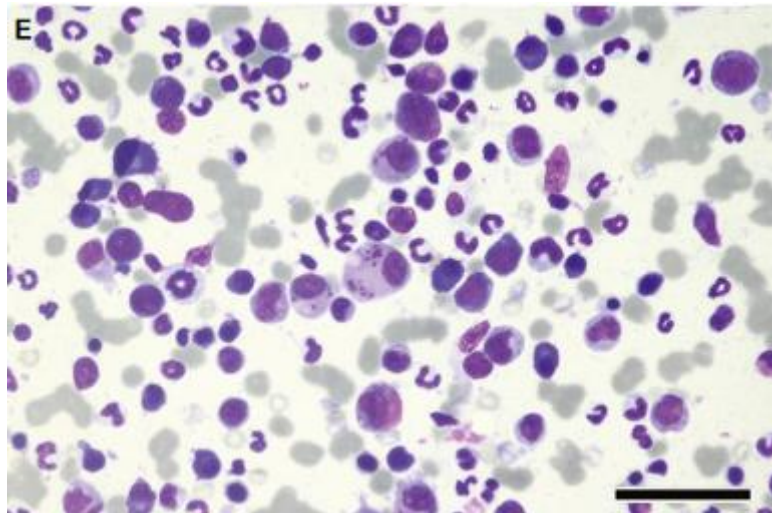


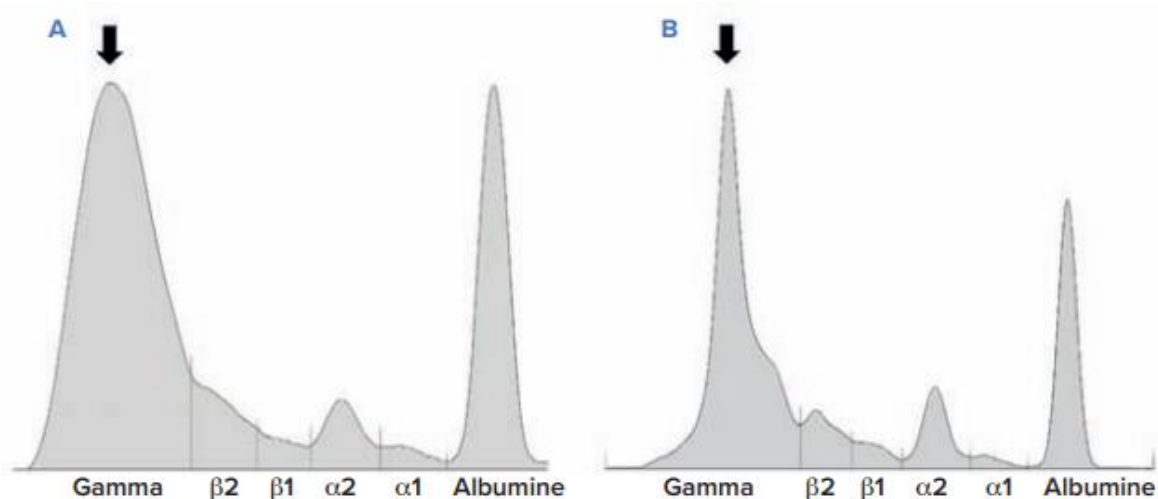
Figure 18 : Myelogramme de chien leishmanien. Coloration MGG x400. (Paltrinieri et al., 2016)

Noter l'hyperplasie myéloïde, l'hypoplasie érythroïde ainsi que la présence de macrophage phagocytant des amastigotes de leishmanies.

### b) Biochimie sanguine et urinaire :

Une hyperprotéïnémie est rapportée dans 65-70% des cas selon les études (Ciaramella et al., 1997 ; Silvestrini et al., 2016), cette dernière est importante lors de la phase d'état de la maladie (signes cliniques présents). Chez plus de 70% des chiens touchés, elle est supérieure à 80 g/L (Bornet, 2002). On observe aussi fréquemment une hypoalbuminémie, consécutive à l'inflammation (l'albumine étant une protéine négative de l'inflammation) et/ou à la protéinurie lors de glomérulopathie. Ces deux anomalies se traduisent logiquement par une baisse du rapport Albumine/Globulines.

Devant cette hyperprotéïnémie, une électrophorèse des protéines sériques est indiquée. Cette dernière met en évidence le plus souvent un pic polyclonal dans la région des beta et gammaglobulines secondaire à la production importante d'anticorps et de protéines inflammatoires. (Koutinas et al., 1999). Cette production importante d'anticorps est un témoin de la réaction immunitaire de type Th2, qui est favorisée par le parasite (Voir PARTIE I) A) 4)). Il est possible dans de rares cas d'avoir un pic oligo-/monoclonal dans la zone des gamma-globulines (Ciaramella et al., 1997). Les deux types de protéinogramme sont présentés dans la *figure 19*.



Ces examens montrent une gammadopathie polyclonale marquée (flèche en A) et une gammadopathie oligoclonale (flèche en B) où un pic étroit se surajoute à une base large en région gamma. Les titres sérologiques sont respectivement de 1/1280 et de 1/10 240 (seuil de spécificité de 1/80).

**A.** Albumine: 28,3 g/l,  $\alpha_1$ : 2,2 g/l,  $\alpha_2$ : 6,3 g/l,  $\beta_1 + \beta_2$ : 11,9 g/l, gamma: 73,3 g/l.

**B.** Albumine: 23,8 g/l,  $\alpha_1$ : 1,8 g/l,  $\alpha_2$ : 10 g/l,  $\beta_1 + \beta_2$ : 13,4 g/l, gamma: 66 g/l.

Figure 19 : Protéinogramme chez deux chiens atteints de leishmaniose. (SOETART, 2020)

Noter que sur cette figure on retrouve à gauche un pic polyclonal en gamma, le plus typique. Et à droite un pic oligoclonal en gamma.

L'évaluation de la fonction rénale est importante car elle est un élément pronostique essentiel de la maladie. Des experts vétérinaires ont créé le groupe IRIS (pour International Renal Interest Society) qui a publié des critères permettant de classer les maladies rénales chroniques, afin d'établir un pronostic, et de proposer des démarches diagnostiques et thérapeutiques standardisées. Les maladies rénales chroniques sont ainsi classés selon 4 stades. Ces derniers reposent sur la valeur de la créatininémie (ou de la concentration en Diméthyl Arginine Symétrique (SDMA)). Ces stades sont présentés dans la *figure 20*. Chaque stade peut ensuite être précisé selon la présence d'une protéinurie (par mesure du rapport protéines sur créatinine urinaire (RPCU)) et/ou d'une hypertension artérielle systémique (IRIS, 2023).

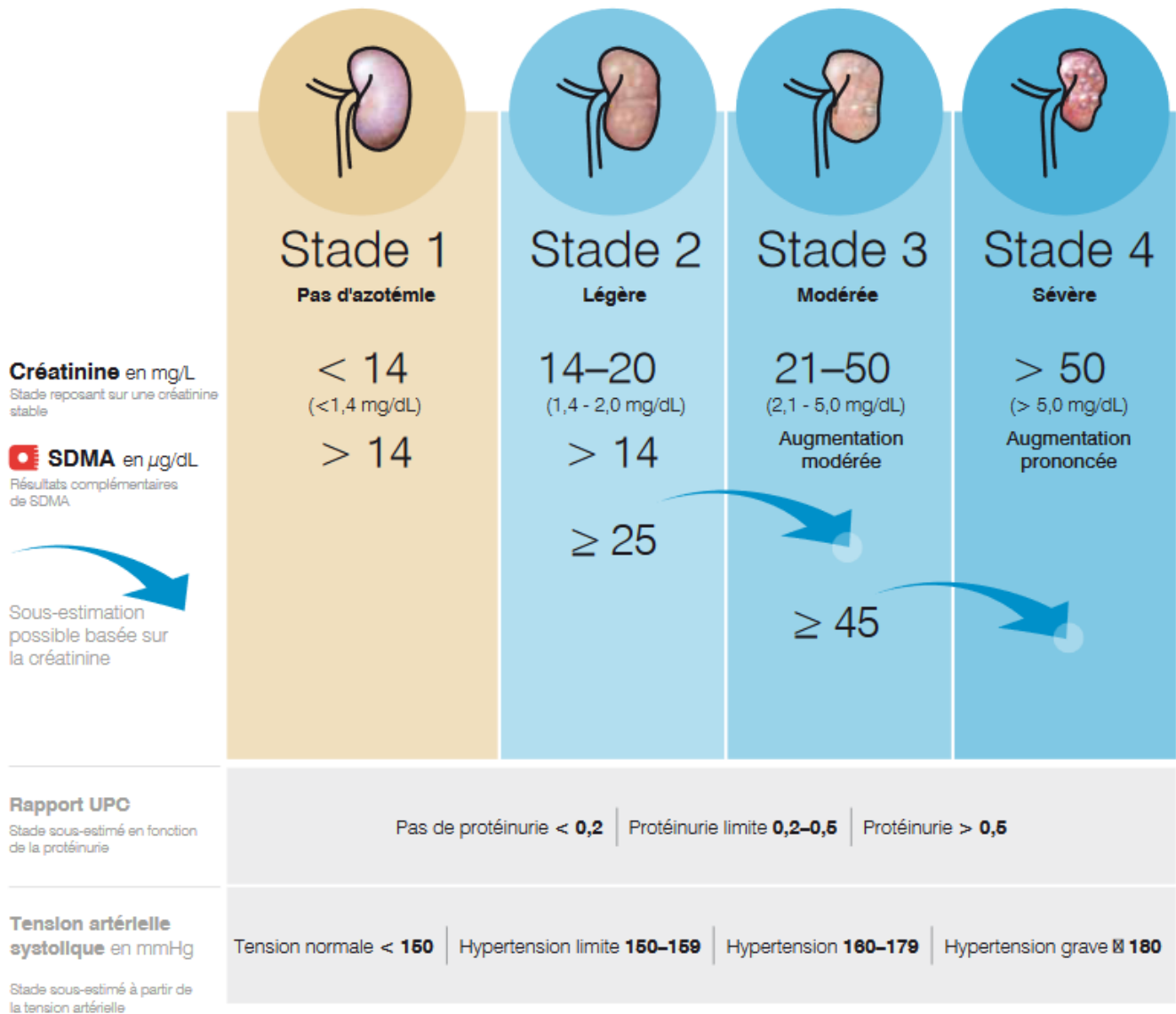


Figure 20 : Classification IRIS de la maladie rénale chronique. (IDEXX d'après (IRIS, 2023))

Les chiens atteints de leishmaniose peuvent développer une glomérulonéphrite due aux dépôts de complexes immuns (Bornet, 2002). Cette atteinte rénale provoque une baisse du débit de filtration glomérulaire entraînant une augmentation de l'urémie et de la créatininémie. Cette azotémie serait présente chez environ 25% des animaux selon les différentes études (Ciaramella et al., 1997 ; Koutinas et al., 1999 ; Slappendel, 1988). Enfin concernant les sous-stades de la classification, le RPCU présente une valeur augmentée (>0.5) chez environ 50% des malades (Meléndez-Lazo et al., 2018). La pression artérielle systémique est augmentée chez environ 30 à 60% des chiens leishmaniens (Roura et al., 2021).

Enfin, d'autres anomalies biochimiques sont citées comme ayant été observées dans de rares cas comme une hypercholestérolémie et une augmentation de l'activité ALAT (Meléndez-Lazo et al., 2018)

### c) Les protéines de la phase aigüe de l'inflammation

La leishmaniose entraîne une inflammation systémique. Ainsi on peut observer chez ces chiens une augmentation de la concentration des différentes protéines spécifiques de l'inflammation.

Il a ainsi été mis en évidence dans la littérature l'augmentation de la protéine C-Réactive (CRP), de l'haptoglobine, du sérum amyloïde-A (SAA) et de la ferritine chez les chiens leishmaniens (Maia et Campino, 2018 ; Martinez-Subiela et al., 2014 ; Paltrinieri et al., 2016).

A noter que ces dernières ont aussi été étudiées lors du suivi à court terme des animaux. Il a été mis en évidence que la CRP et le SAA diminuait dans les deux semaines après la mise en place d'un traitement leishmanicide. Ces derniers revenaient dans leur intervalle de référence un mois après le début du traitement (Martínez-Subiela et al., 2003).

La concentration en CRP et en haptoglobine diminue également de façon significative après un traitement au long terme avec de l'allopurinol (Sasanelli et al., 2007).

### d) La vitamine B12

Une récente publication a étudié la concentration en vitamine B12 chez les chiens leishmaniens en la comparant à celle de chiens sains (Chatzis et al., 2021). Il a ainsi été mis en évidence une cobalaminémie plus faible chez les chiens leishmaniens que chez les témoins (médiane à 362 ng/L contre 470 ng/L) et un pourcentage de chien en hypocobalaminémie de 18.2% contre 8.5% pour le groupe témoin (valeurs de référence : 251 - 908 ng/L). Il a aussi été mis en évidence une augmentation significative de la cobalaminémie après la mise en place du traitement (+50% en 14 jours).

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence : une augmentation de l'excrétion urinaire de la B12, une utilisation de cette dernière par le parasite, une insuffisance d'apport alimentaire ou encore une modification du métabolisme de cette dernière à cause du mauvais état général du chien.

A noter, dans cette étude, seule la concentration en vitamine B12 a été étudiée, sans mesure de marqueurs estimant les niveaux cellulaires en cobalamine (comme l'acide méthylmalonique ou l'homocystéine qui augmente en cas de carence en vitamine B12) (Kather et al., 2020).

Ainsi, chez un chien ayant séjourné en zone endémique présentant un ou plusieurs des signes cliniques et/ou biologiques rapportés dans les paragraphes précédents, le diagnostic de leishmaniose doit être évoqué. La confirmation diagnostique repose sur la mise en évidence (directe ou indirecte) du parasite.



### 3) Les outils diagnostiques spécifiques :

#### a) Les tests sérologiques :

La mise en évidence d'anticorps (IgG) anti-*Leishmania* (par un test sérologique) en quantité significative permet de conclure à une infection leishmanienne (Solano-Gallego et al., 2009).

Deux méthodes principales sont utilisées pour cela :

- La méthode par immunofluorescence indirecte (IFI) : elle consiste à incuber des dilutions en série du sérum avec des promastigotes, puis observer la fluorescence des promastigotes, après ajout d'anticorps anti-IgG canins couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (cf. figure 21). Le résultat s'exprime sous la forme d'un titre sérologique, correspondant au facteur de dilution le plus élevé donnant lieu à une réaction positive. Il s'agit de la méthode de référence (Groupe LEISHVET, 2024), et le seuil de spécificité admis est fixé à 80.

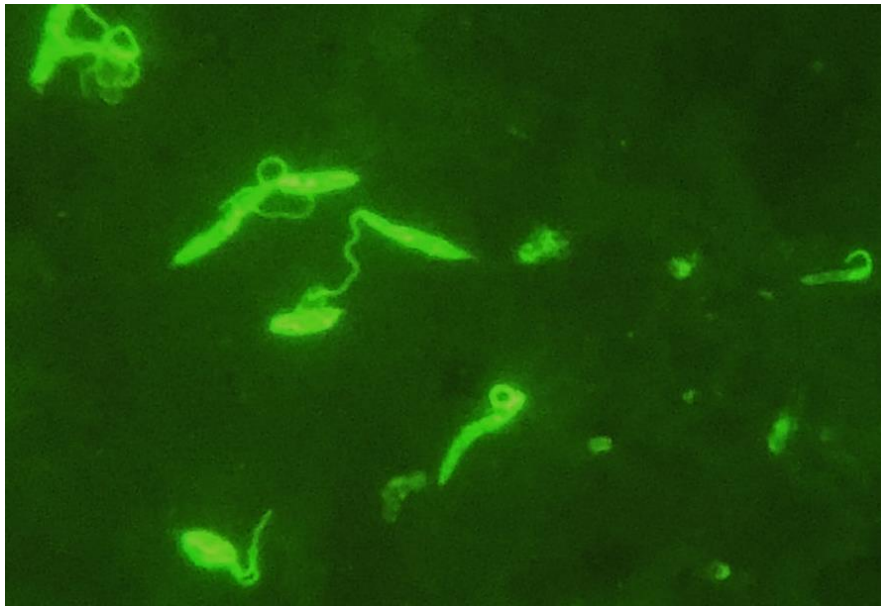


Figure 21 : Immunofluorescence indirecte : la fluorescence des promastigotes indique la présence d'anticorps anti-leishmania dans le sérum testé. (LabOniris)

- La méthode ELISA-indirecte : un antigène de *Leishmania* est fixé dans des puits. Le sérum du patient est incubé avec cet antigène. Si des anticorps anti-*leishmania* sont présents, alors ils viendront se fixer sur l'antigène. Des anticorps anti-IgG canins conjugués à la protéines HRP (horse radish peroxydase) sont ajoutés et, après lavage, l'ajout d'un substrat spécifique de la HRP (le TMB, 3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine) va permettre la coloration de la solution dans les puits. Une densité optique (DO) est mesurée et comparée à un seuil de positivité. Les valeurs supérieures de 10% à la DO seuil sont considérées positives.

Ces méthodes quantitatives peuvent également être utilisées en dépistages, chez des chiens voyageurs ou des donneurs de sang (Groupe LEISHVET, 2024).

D'autres méthodes, notamment basées sur l'immunochromatographie (tests rapides) sont également disponibles et fournissent un résultat qualitatif, utile pour le diagnostic mais insuffisant pour le suivi de l'animal.

## b) Mise en évidence directe par PCR

La sérologie peut parfois manquer de sensibilité. Il peut donc être important de rechercher directement la présence du parasite. Les analyses de biologie moléculaire, en particulier basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR), sont à cet effet très utiles.

Les prélèvements utilisables pour la PCR sont nombreux mais ils n'aboutissent pas tous aux mêmes performances diagnostiques :

- La moelle osseuse hématopoïétique est un des tissus permettant d'obtenir la plus forte sensibilité. Un résultat négatif permet donc d'exclure avec un fort niveau de confiance une infection (Canonne, 2023).
- Un test PCR réalisé sur des lésions cutanées, la rate ou un nœud lymphatique hypertrophié, est également associé à une très grande sensibilité (Solano-Gallego et al., 2009)
- La recherche par PCR à partir d'un écouvillon conjonctival, prélèvement peu invasif, est associée à une sensibilité de 45,5 à 92 % selon les études (Magalhães et al., 2021; Strauss-Ayali et al., 2004)
- Le sang et l'urine ne sont en revanche pas des prélèvements de choix car la charge parasitaire dans ces matrices est très faible voire inexistante. (Solano-Gallego et al., 2009)

La recherche par PCR peut également être utilisée dans un contexte de dépistage, en particulier chez des individus séronégatifs (Groupe LEISHVET, 2024).

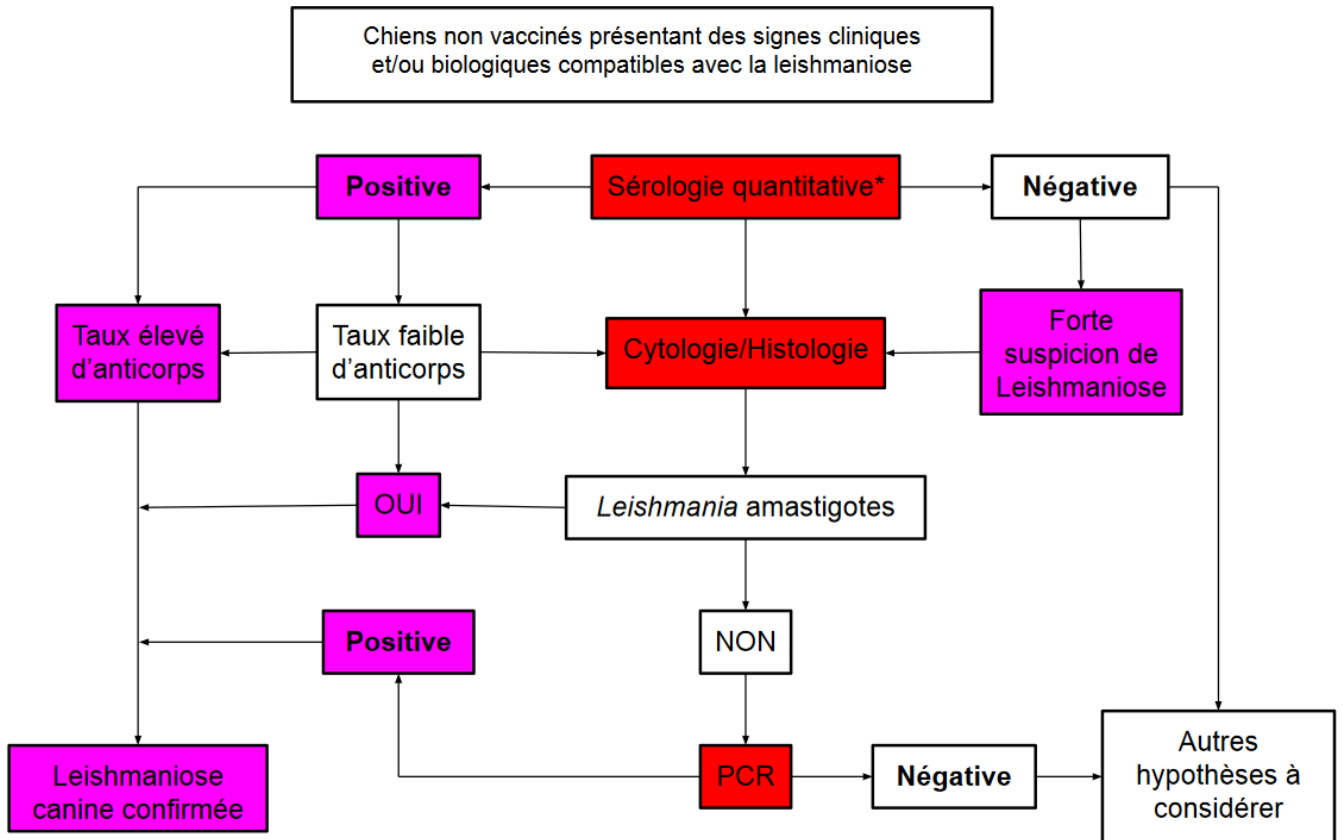
## c) Examen direct des lésions

Les examens cytologiques ou histologiques des lésions (calque cutané, cytoponctions des nodules, frottis conjonctival, adénogrammes, splénogramme, myélogrammes, biopsies, ...) peuvent également établir le diagnostic car ils permettent la visualisation des promastigotes au microscope.

A noter que dans une étude menée en 2007, les prélèvements de nœuds lymphatiques périphériques étaient les plus intéressants à réaliser pour l'examen histologique (en comparaison avec la rate, la moelle osseuse hématopoïétique et le foie) (Moreira et al., 2007).

La démarche diagnostique complète en cas de suspicion est résumée dans la figure 22.





\*Possible de réaliser une cytologie de façon concomitante (Noeuds lymphatiques, rate, lésions cutanées...)

Figure 22 : Démarche diagnostique en cas de suspicion de leishmaniose canine. (d'après (Groupe LEISHVET, 2024))

# C. Classification, traitement et suivi de la leishmaniose

## 1) Classification LeishVet :

Comme indiqué précédemment, les manifestations clinico-biologiques des chiens atteints de leishmaniose peuvent varier d'un individu à l'autre. Ainsi, pour standardiser la prise en charge thérapeutique, le groupe d'experts LeishVet, a établi une classification basée sur des signes cliniques et biologiques, permettant de classer les animaux malades selon 4 stades (détaillés dans le tableau 2). Il est important de remarquer que la progression clinique s'accompagne d'une dégradation de la fonction rénale, impliquant un pronostic de plus en plus sombre.

Tableau 2 : Présentation de la classification des différents stades LeishVet. (Groupe LEISHVET, 2024)

STADES CLINIQUES	SEROLOGIE*	SIGNES CLINIQUES	RESULTATS D'ANALYSES
STADE I Maladie légère	Titres en anticorps négatifs à faiblement positifs	Chiens à signes cliniques modérés tels que lymphadénomégalie isolée ou dermatite papuleuse	Habituellement aucune anomalie clinico-pathologique observée. Profil rénal normal: créatinine < 1.4 mg/dl; pas de protéinurie: UPC < 0.2
STADE II Maladie moyenne	Titres en anticorps faibles à très élevés	Chiens qui, hormis les signes listés du stade I, peuvent présenter d'autres signes cliniques tels que: lésions cutanées diffuses ou parfois symétriques comme: Une dermatite exfoliative, onychogryphose, ulcérations (truffe, coussinets, saillies osseuses, jonctions muco-cutanées), lymphadénomégalie généralisée, perte d'appétit et perte de poids	Anomalies clinico-pathologiques telles qu'une légère anémie non régénérative, hypergammaglobulinémie, hypoalbuminémie, syndrome d'hyperviscosité sanguine.  <b>Sous stade</b> a) Profil rénal normal: créatinine < 1.4 mg/dl; pas de protéinurie: UPC < 0.5 b) Créatinine <1.4 mg/dl; UPC= 0.5-1
STADE III Maladie grave	Titres en anticorps moyens à élevés	Chiens qui, hormis les signes listés au stades I et II, peuvent présenter des signes de lésions à immuns-complexes (ex: uvéite ou glomérulonéphrite)	Anomalies clinico-pathologiques listées au Stade II Maladie rénale chronique (IRC) Stade IRIS I avec UPC= 1-5 ou stade II (créatinine 1.4-2 mg/dl) ***
STADE IV Maladie très grave	Titres en anticorps moyens à élevés	Chiens avec les signes cliniques du stade III. Thromboembolie pulmonaire ou syndrome néphrotique et stade final de maladie rénale chronique	Anomalies clinico-pathologiques du Stade II IRC IRIS Stade III (créatinine 2.1-5 mg/dl) et stade IV (créatinine > 5mg/dl)*** ou syndrome néphrotique: protéinurie marquée UPC> 5

## 2) Traitements

### a) Traitements spécifiques de l'affection

Les traitements agissant sur l'affection spécifiquement sont résumés dans le tableau 3.

Le stade LeishVet I ne nécessite pas nécessairement de traitement (leishmanicide ou Leishmaniostatique) mais nécessite surtout un suivi régulier de l'animal.

Le stade LeishVet IV nécessite un traitement leishmanicide adapté à chaque individu et notamment en fonction de l'importance de son atteinte rénale. (Groupe LEISHVET, 2024; Lamoureux et al., 2016)

Tableau 3 : Résumé des traitements spécifiques de l'affection disponible, d'après (Groupe LEISHVET, 2024; Segarra et al., 2018)

Classe médicament	Nom du principe actif	Nom déposé Législation	Mécanisme d'action	Stade Leishvet d'utilisation	Posologie	Effets secondaires
Leishmanicide	Antimoniote de méglumine	GLUCANTIME AMM	Inhibition enzyme oxydante du parasite	Stade II, III, (IV)	100 mg/kg SC SID pendant 4-6 semaines	Néphrotoxicité Douleur point d'injection
	Miltefosine	MILTEFORAN AMM (depuis février 2024)	Interférence biosynthèse des phospholipides ...	Stade 2, 3, (4)	2 mg/kg PO SID pendant 28 jours	Signes digestifs
Leishmanio- statique	Allopurinol	ALLOPURINOL Spécialité humaine	Inhibiteur de la xanthine oxydase	Stade (1), 2, 3, (4)	10 mg/kg PO SID pendant au moins 6-12 mois	Urolithiase (xanthine)
Molécule agissant sur l'immunité	Dompéridone	LEISGUARD Hors AMM	Effet prolactinique (Sélection de la voie Th1 suspectée)	Stade 1	0.5 mg/kg PO, SID pendant 1 mois	Galactorrhée
	Nucléotides alimentaires et AHCC	IMPROMUNE Complément alimentaire	Action anti-oxydante et sélection voie Th1 suspectée	/	32 mg/kg de nucléotides et 17 mg/kg d'AHCC PO SID	/

AHCC : composés corrélés à l'hexose actif ; SID = 1 fois par jour ; SC = Injection Sous-cutanée ; PO = Par voie orale

AMM = Autorisation de mise sur le marché

## **b) Traitement des complications :**

La principale complication de la leishmaniose est la maladie rénale chronique secondaire à la glomérulonéphrite. Il est donc conseillé de suivre les recommandations adaptées au stade IRIS de l'animal. Ces dernières préconisent notamment un changement d'alimentation en utilisant les aliments diététiques adaptés (limités en protéines et phosphates notamment).

La prise en charge de la protéinurie peut être réalisée à l'aide d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IECA) comme le bénazépril (0.5 mg/kg PO SID), ou avec un antagoniste de l'angiotensine II (ATII) tel que le telmisartan (1 mg/kg PO SID) (IRIS et al., 2013). Il faut cependant faire attention à la possible augmentation de la créatinine (par baisse du débit de filtration glomérulaire).

La prise en charge de l'hypertension artérielle est également importante. Il s'agit d'une complication fréquente en cas de maladie rénale chronique, qui concerne également les animaux atteints de leishmaniose. Selon Braga et al., sur 66 chiens atteints de leishmaniose et présentant des lésions rénales, 29% présentaient une hypertension artérielle systémique. La prévalence de cette dernière était plus marquée dans le groupe de stade IRIS 2 et 3 (composé de 12 chiens) que dans celui de stade IRIS 1 (composé de 54 chiens) (Braga et al., 2015). Cette prise en charge repose aussi sur la prescription d'un IECA (ex : benazepril 0.5 mg/kg PO SID ou BID), d'un ATII (Telmisartan 1 mg/kg PO SID) ou encore d'un antagoniste des canaux calciques comme l'amlodipine (0.1-0.25 mg/kg PO SID) (Acierno et al., 2018). En cas de protéinurie massive, l'ajout de clopidogrel (1,1 - 3 mg/kg PO SID) ou d'aspirine (1 - 5 mg/kg PO SID), permet de limiter le risque thrombotique secondaires à la perte d'anti-thrombine 3 par voie urinaire (IRIS et al., 2013)

### 3) Suivi clinique et biologique

La leishmaniose étant une maladie chronique, il est important de réaliser un suivi régulier du patient. La fréquence des suivis dépend de l'atteinte clinique de l'animal.

Les recommandations présentées dans ce paragraphe sont celles du Groupe LeishVet (Groupe LEISHVET, 2024).

Un animal infecté mais cliniquement sain devra être suivi tous les 3 à 6 mois afin de rechercher une possible progression de la maladie. Cette fréquence élevée du suivi peut se substituer à un traitement leishmanicide ou leishmaniostatique.

Chez les animaux présentant des signes cliniques et/ou biologiques, un suivi est conseillé un mois après la mise en place du traitement avec réalisation d'un bilan sanguin comprenant : une numération et formule sanguine, un bilan biochimique complet, et une analyse d'urine avec un RPCU. Ce bilan est ensuite à réaliser tous les 3-4 mois chez ces patients et peut-être espacé à tous les 6 à 12 mois chez l'animal ayant répondu cliniquement après un an de traitement.

Les bilans sérologiques sont à réaliser tous les 6 à 12 mois après la mise en place du traitement. Ces derniers sont particulièrement importants car ils sont considérés aujourd'hui comme le marqueur de référence pour évaluer l'évolution de la maladie : une forte diminution (voire une disparition) des anticorps après la mise en place des traitements est associée à une amélioration clinique. Une augmentation du taux d'anticorps de deux titres minimums doit être interprété comme une rechute, même si les signes cliniques ne sont pas observés de nouveau.

L'ensemble de ces recommandations sont illustrés dans la *figure 23*.

Le suivi biologique de la leishmaniose canine se base donc essentiellement sur des marqueurs permettant de constater une dégradation de la maladie. Certains auteurs ont également étudié leur capacité à prédire la réponse thérapeutique. Ainsi, chez 26 chiens suivis pendant 1 an, la numération érythrocytaire et la phosphatémie étaient les variables les plus prédictives de la réponse thérapeutique, et dans une moindre mesure les autres variables de l'hémogramme rouge, l'albuminémie et la kaliémie (De Sousa Gonçalves et al., 2020). Toutefois, jusqu'à très récemment, aucune étude n'avait évalué de potentielles variables cliniques ou biologiques prédictives d'une rechute clinique.

D'après Sarquis et al., qui ont étudié rétrospectivement une cohorte de 54 chiens (291 suivis cliniques) et qui ont pris comme issue la nécessité de mettre en place un nouveau traitement (pour qualifier une récurrence). Les auteurs ont mis en évidence une association significative entre les modifications du bilan protéique (protéines totales, albumines, rapport A/G, bêta-globulines), de l'hémogramme, l'augmentation du titre sérologique et du score clinique et le besoin de recourir à un nouveau traitement (Sarquis et al., 2024).

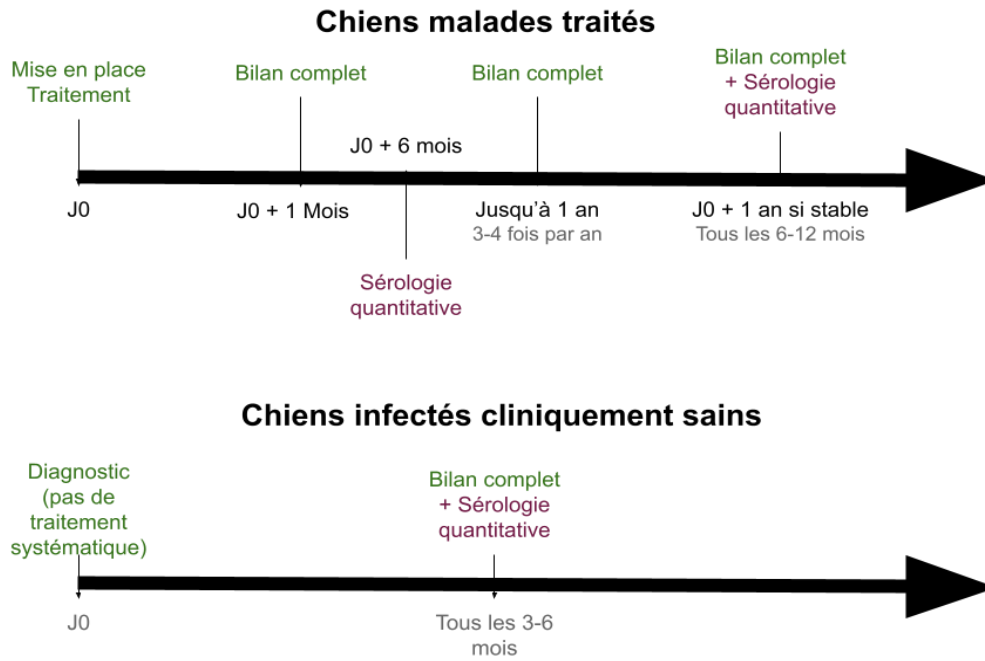


Figure 23 : Frise chronologique pour le suivi des chiens selon leur situation. D'après (Groupe LEISHVET, 2024)

*Bilan complet : Examen clinique + Numération et Formule sanguine + Biochimie +/- Electrophorèse des protéines sériques +Analyse urine +/- RPCU (selon bandelette)*

## PARTIE II) ETUDE PERSONNELLE

La leishmaniose est une maladie infectieuse chronique. Les conséquences cliniques de cette dernière dépendent d'une relation complexe entre l'immunité de l'animal et le parasite.

La prise en charge de cette maladie repose sur un traitement long, voire à vie, pour l'animal et il n'est pas rare d'observer des rechutes.

De nombreux biomarqueurs ont été étudiés au moment du diagnostic. C'est particulièrement le cas des protéines de la phase aiguë de l'inflammation ou plus récemment de la vitamine B12.

Les études ont toutefois rarement été réalisées sur des animaux au cours du suivi de cette maladie chronique. Ainsi, les marqueurs pronostiques et en particulier ceux éventuellement prédictifs d'une rechute clinique sont peu nombreux.

L'objectif de notre étude est donc de réaliser le suivi de biomarqueurs sanguins chez des chiens atteints de leishmaniose et de les mettre en lien avec des éléments cliniques et biologiques de la progression de la maladie. Au vu des données bibliographiques mentionnées dans la partie précédente, nous avons sélectionnés des protéines positives et négatives de la phase aiguë de l'inflammation (protéines totales, albumine, rapport albumine/globulines, protéine C réactive, haptoglobine). Mais nous avons aussi voulu étudier le métabolisme de la vitamine B12. Ainsi en plus de cette dernière nous avons mesuré les concentrations sanguines en vitamine B9 et homocystéine. Leur lien métabolique est illustré dans la *figure 24*.

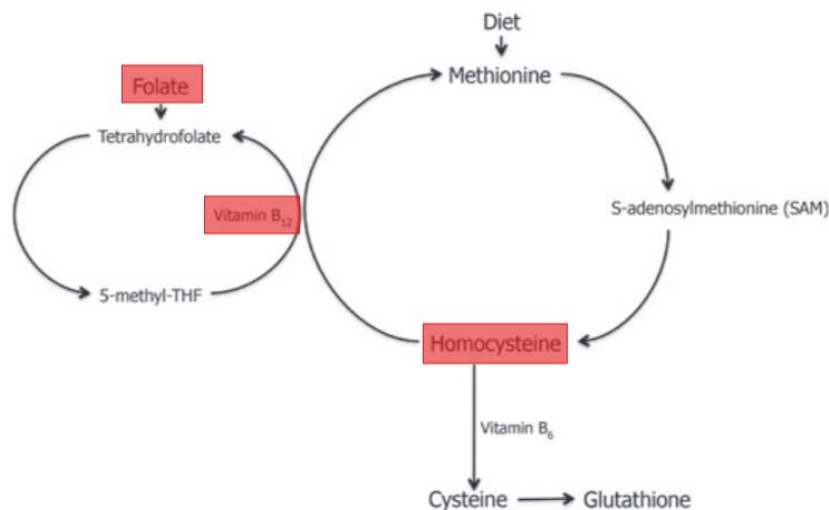


Figure 24 : Représentation schématique du métabolisme de la vitamine B12 (Surligné en rouge : les molécules étudiées). (Patterson et al., 2013)

## A. Matériels et méthodes :

### 1) Conception de l'étude :

#### a) Critères d'inclusion des animaux :

Nous avons mené une étude rétrospective à partir de sérums de chiens conservés par le secteur parasitologie-mycologie de LabOniris (Oniris VetAgroBio Nantes). Ces sérums ont été envoyés par des praticiens dans le cadre d'un diagnostic ou d'un suivi sérologique de leishmaniose. Un sérum était sélectionné s'il s'agissait de celui ayant permis le diagnostic sérologique de la maladie ou bien s'il provenait d'un chien ayant précédemment été testé positif (titre  $\geq 80$ ).

#### b) Critères d'exclusion de certains sérums :

Une fois la sélection opérée, la principale contrainte aboutissant à l'exclusion de certains échantillons a été la présence d'un volume insuffisant. En effet, un volume minimal de 400  $\mu\text{L}$  était nécessaire pour la réalisation des nouvelles analyses. Nous avons choisi lorsque le volume d'échantillon était limité (entre 200 et 400  $\mu\text{L}$ ) de prioriser la mesure des protéines de l'inflammation et l'homocystéine au dépend de la vitamine B12 et B9. Ces premières mesures se réalisant sur un automate demandant un volume plus faible.

#### c) Données recueillies :

Pour tous les échantillons qui correspondaient aux critères d'inclusions et qui permettaient de réaliser les analyses nous avons recueilli différentes informations :

- Les données **épidémiologiques** (sexe, race notamment)
- Les données **cliniques**, correspondant aux signes cliniques visibles à l'examen clinique par les vétérinaires praticiens, le jour de la prise de sang.
- Les données **biologiques**, correspondant aux résultats des examens complémentaires réalisés par les vétérinaires traitants concomitamment à la sérologie (comme une NFS, une biochimie plasmatique...).

Ces données ont d'abord été extraites des fiches commémoratives et dossiers médicaux envoyés au laboratoire avec l'échantillon. Lorsqu'incomplètes, elles ont été précisées par un appel téléphonique au vétérinaire traitant.

L'ensemble de ces données ont ensuite été renseignées dans un tableur.

### 2) Choix des critères de progression de la maladie :

D'après les informations acquises auprès des vétérinaires concernant l'état de l'animal au moment de l'analyse, nous avons classé les échantillons en différentes catégories pour évaluer la progression de la maladie.



### a) Présence de signes cliniques :

C'est le premier critère utilisé, regroupant tous les signes cliniques observés, qu'ils soient cutanés, lymphatiques, ou rapportés par les propriétaires lors de l'anamnèse (par exemple, polyuro-polydipsie ou perte de poids chronique). D'autres signes cliniques attribuables à la leishmaniose (comme des problèmes oculaires ou locomoteurs) ont été inclus, en l'absence d'autres causes identifiées. Ce critère est facile à observer par les propriétaires et les vétérinaires et sert de marqueur simple pour détecter une rechute de la maladie.

### b) Diminution du rapport albumine/globulines :

Cette catégorie repose sur les valeurs de protéines totales et d'albumine. Une baisse du rapport albumine/globulines (A/G) peut indiquer une inflammation (l'albumine étant une protéine négative de l'inflammation, et les globulines étant produites lors d'inflammation (comme les APP) ou en réponse à l'immunité Th2 (IgG)). Deux critères ont été utilisés pour attester cette diminution : une hyperprotéinémie totale (>80 g/L) avec un rapport A/G < 1 ou un rapport A/G < 0.8 avec des protéines totales dans les normes (60-80 g/L).

Les données d'électrophorèse des protéines sériques n'ont pas été utilisées, car non disponibles pour tous les échantillons et par manque de temps pour réitérer ces tests.

### c) Présence d'une anémie :

La présence d'une anémie a été évaluée par observation des résultats d'une NFS effectuée par le vétérinaire. Elle est définie par une concentration en hémoglobine inférieure à l'intervalle de référence. L'anémie a été utilisée comme marqueur car elle peut être un signe d'une inflammation chronique chez les chiens affectés, et pourrait expliquer une fatigue accrue.

En l'absence de NFS les échantillons n'ont pas été évalués pour ce critère.

### d) Stade LeishVET :

Sur la base des observations cliniques, des analyses biochimiques, et des résultats de NFS, les échantillons ont été classés selon le stade LeishVet (voir PARTIE I)C)1)). Compte tenu de la construction de ce score, un même chien peut être classé à différents stades LeishVet au fil du temps. Les échantillons des animaux asymptomatiques ont été classés comme "Stade 0". Pour les analyses statistiques, le seuil de 2 a été utilisé : les scores 0 et 1 représentant un groupe « LOW » et les scores supérieurs ou égaux à 2 représentant un groupe « HIGH ».

## 3) Choix des biomarqueurs étudiés

Dans chaque échantillon disponible en quantité suffisante, la CRP, l'haptoglobine, les vitamines B12 et B9 ainsi que l'homocystéine ont été mesurées. Lorsque les valeurs n'étaient pas disponibles dans l'historique des animaux, la protéinémie totale et l'albuminémie ont également été déterminées.

### a) La CRP Canine (Protéine-C Réactive):

La CRP canine a été mesurée à l'aide du kit immunoturbidimétrique Canine C-Reactive Protein développé par TriDelta Développement, utilisé sur l'automate Randox Daytona +, dont les caractéristiques sont précisées dans le *Tableau 4*.

*Tableau 4 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de la CRP Canine*

Protéine C Réactive Canine	
Fournisseur	TriDelta Développement
Méthode	Immunoturbidimétrie
Intervalle de mesure	0-60 mg/L
Précision (Coefficients de variation)	12% (10.8 mg/L) - 9.6% (22.6 mg/L)
Automate	Randox Daytona +

### b) L'haptoglobine :

La mesure de l'haptoglobine par dosage colorimétrique, a été réalisée par le kit PHASE™ RANGE Haptoglobin, développé par TriDelta Développement, utilisé sur l'automate Randox Daytona +. Les caractéristiques et performances du dosage sont précisées dans le *tableau 5*.

*Tableau 5 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de l'haptoglobine canine.*

Haptoglobine	
Fournisseur	TriDelta Développement
Méthode	Colorimétrie
Intervalle de mesure	0-2.5 g/L
Précision (Coefficients de variation)	5% (0.6 g/L) - 6.3% (1.3 g/L)
Automate	Randox Daytona +

Pour les valeurs >2.5 g/L, lorsque la quantité d'échantillon résiduelle était suffisante, une dilution au 1/5<sup>ème</sup> a été effectuée pour obtenir la valeur finale.

### c) Protéines totales, albumine et globulines sanguines :

Les protéines totales ont été mesurées par la méthode de Biuret. L'albumine a été mesurée avec une mesure d'absorbance utilisant le vert de bromocrésol. Ces deux dosages ont été réalisés sur l'automate Randox Daytona +, avec des kits fournis par le même laboratoire. La différence entre les protéines totales et l'albumine a permis d'obtenir la globulinémie.

### d) Le titre sérologique :

Les analyses sérologiques (technique IFI, voir PARTIE I)B)3)a) ) ont été réalisées dès la réception des sérums, car elles constituaient la demande initiale des vétérinaires.

### e) Vitamine B12 et Vitamine B9 :

La cobalamine et l'acide folique ont été mesurés par chimiluminescence sur l'automate Immulite 2000 Xpi (Siemens), lorsque la quantité d'échantillon était suffisante, à l'aide de kits préalablement validés chez le chien. Les caractéristiques des dosages sont précisées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de la vitamine B12 et B9.

	Vitamine B12	Vitamine B9
Fournisseur	Siemens	
Méthode	Chimiluminescence	
Intervalle de mesure	150-1000 ng/L	1-24 µg/L
Précision (Coefficients de variation)	7% (173 pg/mL) - 3% (860 pg/mL)	5% (4 ng/mL) - 6% (21.5 ng/mL)
Automate	Immulite 2000 Xpi (Siemens)	

## f) Homocystéine :

La mesure de l'homocystéine a été réalisée par dosage colorimétrique à l'aide d'un kit développé par Randox Laboratories sur l'automate Randox Daytona +. Ce kit n'ayant pas été validé dans l'espèce canine, une étude préalable a permis de déterminer ses performances et valider son usage chez le chien. Les caractéristiques du test sont présentées dans le *tableau 7*.

*Tableau 7 : Résumé des caractéristiques et performances du dosage de l'homocystéine canine.*

Homocystéine	
Fournisseur	Randox Laboratories
Méthode	Colorimétrie
Intervalle de mesure	1.8 - 47.9 $\mu\text{mol/L}$
Coefficients de variation	11.5% (6.1 $\mu\text{mol/L}$ ) - 9.7% (16.2 $\mu\text{mol/L}$ )
Automate	Randox Daytona +

## 4) Analyse statistique :

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel RStudio.

Pour certaines mesures, la valeur exacte n'a pu être obtenue lorsqu'après un premier dosage dont le résultat dépassait la valeur supérieure de l'intervalle de mesure, la quantité résiduelle d'échantillon ne permettait pas de le réitérer après dilution.

Dans ce cas, pour l'analyse statistique, nous avons attribué :

- Pour l'haptoglobine : la valeur moyenne des résultats des cas pour lesquels la valeur exacte a pu être déterminée, soit 4.98 g/L
- Pour l'homocystéine : les valeurs supérieures à 48  $\mu\text{mol/L}$  se sont vu attribuer une valeur de 50  $\mu\text{mol/L}$ .
- Pour la folatémie : les valeurs supérieures à 24 ng/mL se sont vu attribuer une valeur de 25 ng/mL.

Le lien entre les paramètres cliniques et biologiques reflétant la gravité de la maladie (cf. paragraphe PARTIE II) A2)) et les marqueurs d'intérêts (cf. paragraphe PARTIE II) A3)) a été évaluée grâce à des modèles linéaires à effets mixtes, permettant de prendre en compte le caractère répété des mesures chez un même individu. Seule une analyse univariée a été réalisée à l'heure de l'écriture du manuscrit.

Pour chaque modèle, la variable expliquée était le biomarqueur et les variables explicatives sont séparées en 2 catégories : les facteurs fixes dont on veut déterminer statistiquement l'effet (dans notre cas il s'agit des paramètres détaillés au paragraphe PARTIE II) A3) et les facteurs aléatoires, dont l'effet sera pris en compte sans être quantifié (dans notre cas, il s'agit de l'effet « individu »).

Par soucis de simplification, les variables explicatives testées sont toutes bimodales (un seuil a été fixé pour les variables quantitatives, cf. PARTIE II) A2)).

Les modèles permettent ainsi d'obtenir pour chaque effet fixe, un coefficient dont la valeur donne une estimation de la différence de concentration entre les 2 groupes comparés, associé à une valeur p, permettant d'évaluer la significativité.

De plus, les corrélations entre les différentes variables numériques étudiées ont été estimées par calcul du coefficient de corrélation de Spearman.

Les données associées à une valeur p inférieure à 0,05 ont été interprétées comme significatives.

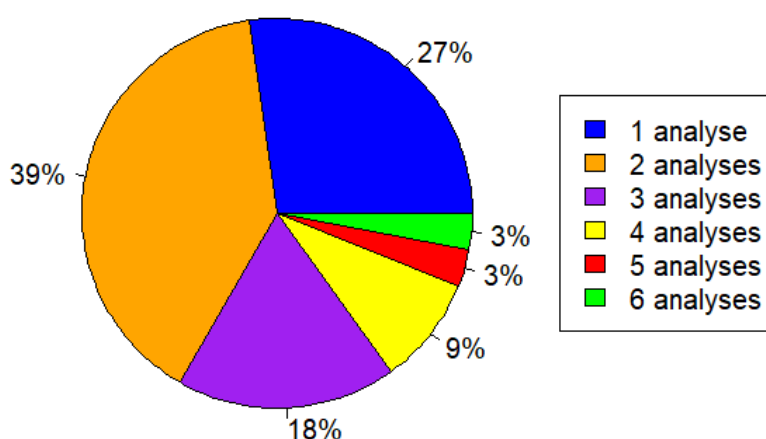
## B. Résultats :

### 1) Présentation de la population

Trente-trois chiens ont été recrutés avec un nombre de suivis (donc d'échantillons disponibles) par chien allant de 1 à 6 (cf. *figure 25*). Au total 76 échantillons étaient disponibles pour notre étude.

La majorité des animaux possèdent au moins deux échantillons répertoriés dans les archives du laboratoire. Environ un quart des animaux ne possèdent qu'une seule analyse. Deux raisons à cela : soit les autres tubes présélectionnés ne possédaient pas le volume requis pour les analyses (n=7 chiens), soit nous attendions un tube de suivi qui ne nous aient pas parvenus dans les temps (n=2 chiens).

**Nombre d'analyses par individu**



*Figure 25 : Répartition des 33 chiens recrutés selon le nombre d'analyses par animal*

#### a) Données épidémiologiques :

Parmi ces 33 chiens, 20 sont des mâles, et 13 des femelles. Le statut stérilisé ou non n'a pas été étudié, car nous n'avons pas l'information.

La race la plus représentée est la race Galgo (lévrier espagnol) avec 7 individus.

Il y a ensuite 3 chiens de race Bouledogues Anglais, 2 individus de race Border Collie, Chihuahua, Podenco d'Ibiza et croisé (sans précision). Enfin d'autres races comptant 1 individu sont également représentées (Alano espagnol, American Bully, American Staffordshire Terrier, Beagle, Cane Corso, Epagneul Breton, Jack Russell Terrier, Malinois, Podenco d'Ibiza, Rottweiler, Setter Anglais, Shiba Inu, Spitz, Staffordshire Bull Terrier, Whippet).

Les âges des animaux lors des dosages vont de 14 mois à 123 mois. L'âge moyen est de 69 mois avec un âge médian de 74 mois.

Les sujets de cette étude vivaient pour 11 d'entre eux en zone endémique de leishmaniose (présence de phlébotomes et de cas autochtones décrits dans cette région). Les 22 autres provenaient de départements indemnes de leishmaniose.

Parmi les 76 dosages, 9 ont été réalisées lors du diagnostic des animaux. Ces derniers n'avaient donc jamais eu un traitement quelconque contre la leishmaniose. Au vu de leur faible nombre, ils ont été ajoutés à la cohorte mais pas traités de façon particulière car l'échantillon n'aurait pas été assez important.

### **b) Données cliniques :**

La moitié des échantillons (n=38) ont été collectés lorsque les chiens présentaient des signes cliniques. Les signes cliniques observés étaient les suivants :

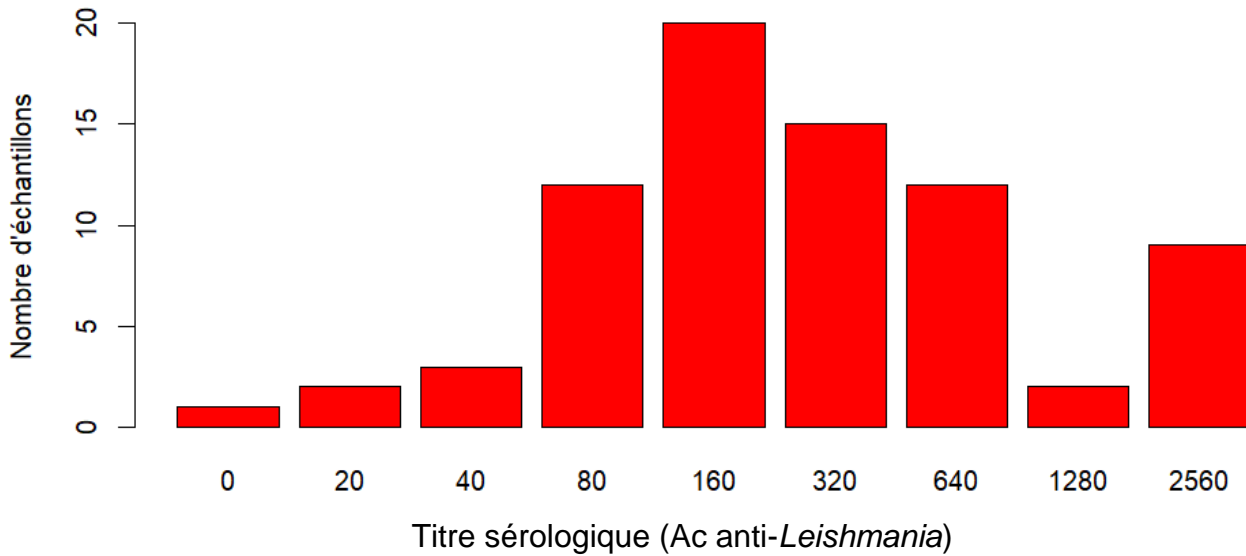
- Problèmes dermatologiques (17 chiens / 26 échantillons).
- Une augmentation de la taille d'au moins un ganglion lymphatique (7 chiens / 8 échantillons).
- Perte de poids (7 chiens / 7 échantillons)
- Diarrhée (5 chiens / 6 échantillons)
- Boiterie (4 chiens / 4 échantillons)
- Atteintes oculaires (5 chiens, 7 échantillons).

Tous ces signes cliniques sont compatibles avec la leishmaniose et n'ont pas été directement liés à d'éventuelles maladies concomitantes chez les chiens de notre cohorte. À noter que certains signes cliniques, tels que la polyuro-polydipsie, n'ont pas été inclus car leur détection par les propriétaires n'a pas été jugée suffisamment fiable, et que nous ne disposions pas d'éléments biologiques pour la confirmer (analyse de la densité urinaire notamment).



### c) Données sérologiques :

Les titres sérologiques mesurés sur les 76 échantillons se répartissent selon le diagramme présenté par la *figure 26*.

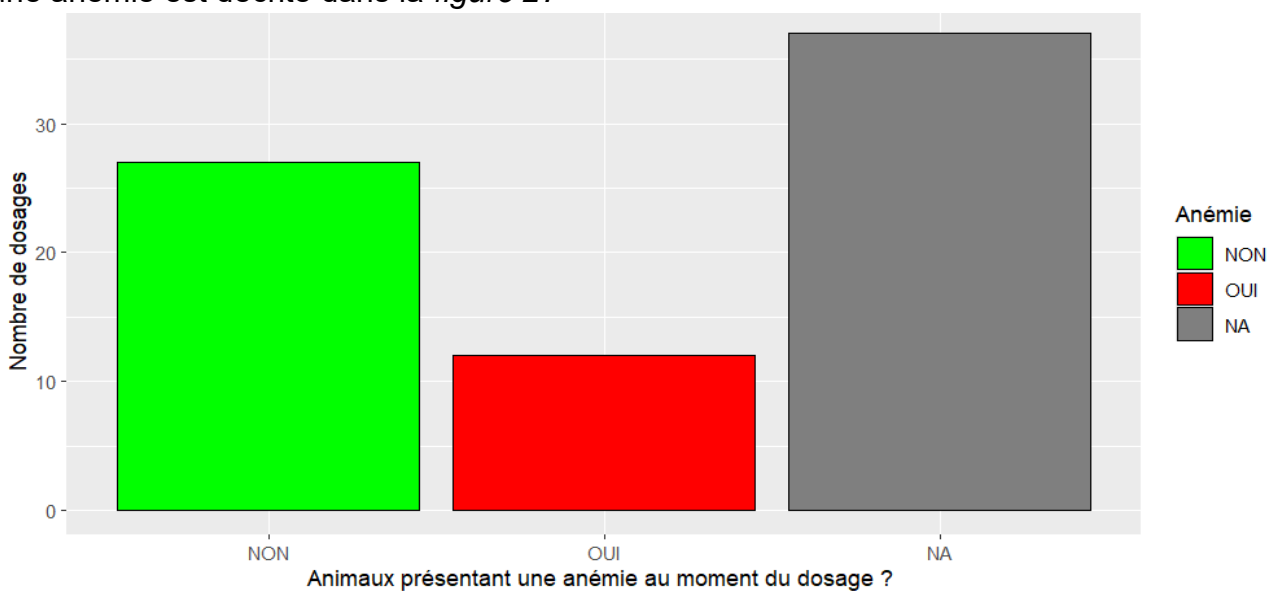


*Figure 26 : Distribution de la valeur des titres sérologiques*

### d) Données biologiques :

#### - Anémie :

Sur les 76 échantillons, 39 ont été récoltés de façon concomitante à la réalisation d'une NFS. Une anémie a été détectée pour 12 d'entre eux. La répartition des dosages selon la présence ou non d'une anémie est décrite dans la *figure 27*



*Figure 27 : Nombre de prélèvements associés à une anémie.*

\*NA = information non disponible

- Diminution du rapport A/G :

Trente-huit échantillons présentait une des deux conditions afin d'être classés comme possédant un rapport A/G abaissé. A noter que cette caractéristique était présente à 11 reprises sans association à des signes cliniques (27 échantillons présentait une diminution du rapport A/G et des signes cliniques).

e) Stade Leishvet :

Parmi les échantillons réalisés en présence de signes cliniques (n=38), 12% (n=9/76) relevaient du stade 3, 24% (18/76) du stade 2 et 14% (11/76) du stade 1. La proportion des échantillons dans chaque stade LeishVet est représentée par la *figure 28*.

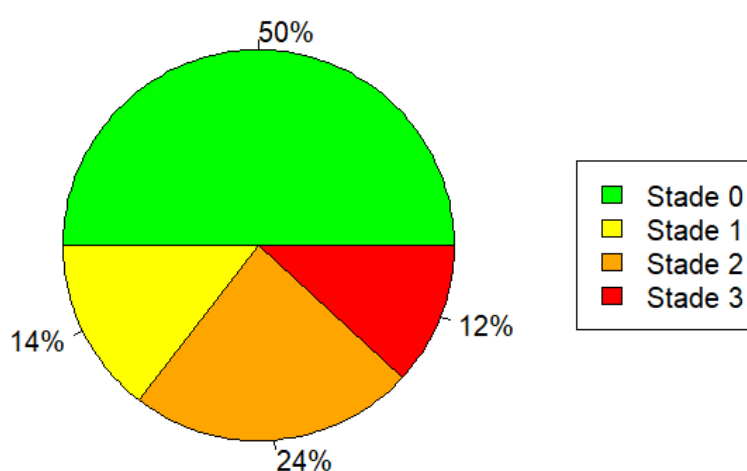


Figure 28 : Répartition des différents échantillons selon le stade LeishVet des chiens au moment de l'analyse.

## 2) Etude des biomarqueurs sériques :

### a) Statistiques descriptives :

Les résultats obtenus pour les dosages des échantillons disponibles sont indiqués dans le tableau suivant (*Tableau 8*) :

*Tableau 8 : Récapitulatif des différentes valeurs obtenues lors du dosage des différents biomarqueurs sanguins*

Variables mesurées (nombre d'échantillons mesurés)	Valeurs de référence	Valeur Médiane	Minimum	Maximum	Nombre de résultats en dehors de l'intervalle de référence
Sérologie (n=76)	<80	240	0	2560	68
Protéines totales (n=76)	60-80 g/L	69.50	49.07	126	28 (9< ; 19>)
Albumine (n=76)	26-40 g/L	29.63	12.6	47.9	20 (17 < ; 3 >)
Globuline (n=76)	20-40 g/L	36.42	21	101.60	33 (33 >)
A/G (n=76)	> 1 (ou >0.8 si PT>80g/L)	0.81	0.15	2.07	50
CRP (n=76)	< 10 mg/L	3.08	0	97.55	23
Haptoglobine (n=76)	0.3-3.5 g/L	2.41	0.07	13.5	26 (26 >)
Vitamine B12 (n=60)	350-850 pg/mL	645	220	1619	16 (4 <; 12 >)
Vitamine B9 (n=42)	3-12 ng/mL	7.94	1.71	25	14 (3< ; 11>)
Homocystéine (n=68)	ND (µmol/L)	13.175	1.880	50	/

ND : Intervalle de référence non disponible chez le chien

## b) Corrélation entre les différentes variables biologiques :

Les **protéines totales** présentent une forte corrélation significative positive avec les **globulines** (cor=0,89 ; p<0,001), une corrélation positive modérée avec l'**haptoglobine** (0,52 ; p<0,001), la **CRP** (0,49 ; p<0,001), et avec le **titre sérologique** (0,55 ; p<0,001), et une corrélation modérée négative avec l'**albumine** (cor = -0,38 ; p <0,001).

L'**albumine** présente une corrélation modérée négative avec les **globulines** (cor = -0,66 ; p<0.001), l'**haptoglobine** (-0,43 ; p<0.001), et la **CRP** (-0,58 ; p<0,001) et avec le **titre sérologique** (cor = -0,54 ; p<0.001). Elle présente cependant une légère corrélation positive avec l'**homocystéine** (0,27 ; p = 0.026).

Les **globulines** présentent une corrélation positive modérée avec l'**haptoglobine** (0,59 ; p<0.001), avec la **CRP** (0,62 ; p<0.001) et avec le **titre sérologique** (0,62 ; p<0.001).

L'**haptoglobine** présente une corrélation modérée positive avec la **CRP** (0.45 ; p<0.001), et avec le **titre sérologique** (0,46 ; p<0.001).

Enfin, la **CRP** présente une corrélation négative légère avec l'**homocystéine** (-0,25 ; p =0.040) et positive modérée avec le **titre sérologique** (0,44 ; p<0.001)

L'ensemble des corrélations significatives est représenté sur la figure 29.

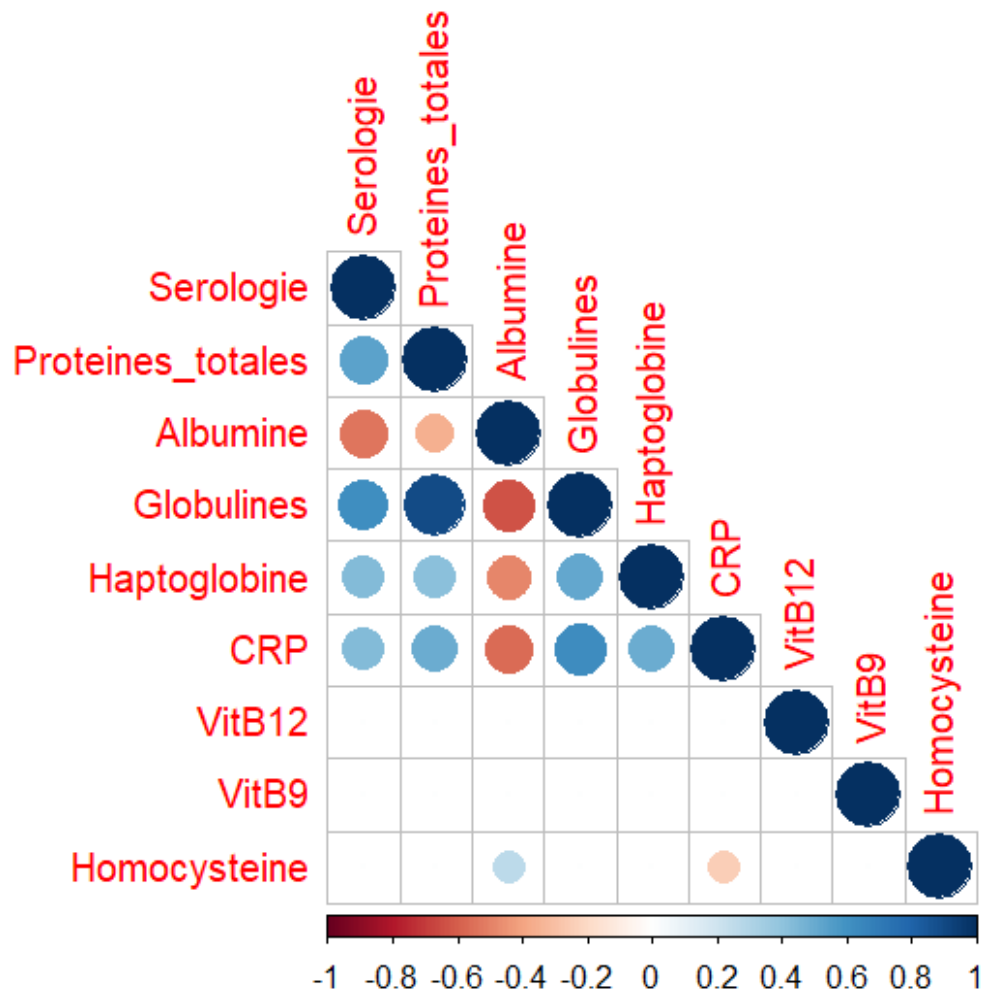


Figure 29 : Corrélogramme des différents biomarqueurs étudiés dans une cohorte de 33 chiens leishmaniens au cours de 76 suivis sérologiques.

L'intensité de la corrélation est représentée par la taille des cercles et l'intensité de la couleur selon l'échelle indiquée (coefficient de corrélation de Spearman). L'absence de cercle dans une case correspond à l'absence de corrélation significative.

### 3) Influence des variables épidémiologiques, cliniques, biologiques :

#### a) Influence du sexe et de l'âge

Aucun effet du sexe des animaux n'est mis en évidence : en prenant comme référence les chiens mâles, la différence de concentrations en CRP ( $-7,46 \pm 5,24$  ;  $p = 0,2$ ), haptoglobine ( $+0,14 \pm 0,80$  g/L ;  $p = 0,9$ ), albumine ( $-0,06 \pm 0,11$  g/L ;  $p = 0,6$ ), globulines ( $+3,99 \pm 5,91$  g/L ;  $p = 0,5$ ), protéines totales ( $+3,77 \pm 4,99$  g/L ;  $p = 0,5$ ), homocystéine ( $+6,47 \pm 3,44$  ;  $p = 0,0715$ ), vitamine B12 ( $+70,67 \pm 83,72$  ;  $p = 0,4$ ), vitamine B9 ( $0,69 \pm 2,56$  ng/mL ;  $p = 0,8$ ), la différence entre les titres sérologiques ( $+235,43 \pm 202,77$  ;  $p = 0,3$ ) et le rapport A/G ( $-0,06 \pm 0,11$ ,  $p = 0,6$ ) n'étaient pas significativement différentes chez les femelles.

Il est noté une **diminution** significative du **titre sérologique en fonction de l'âge de l'animal au moment du test** ( $-8,36 \pm 3,08$  /an ;  $p = 0,01$ ) et de la **protéïnémie totale** ( $-0,19 \pm 0,07$  g/L/an,  $p = 0,01$ )

Les autres biomarqueurs ne sont pas significativement influencés par l'âge des animaux : CRP ( $-0,01 \pm 0,08$  mg/L/an ;  $p = 0,9$ ), haptoglobine ( $+0,01 \pm 0,01$  g/L/an ;  $p = 0,5$ ), albumine ( $-0,02 \pm 0,03$  g/L/an ;  $p = 0,9$ ), globulines ( $-0,17 \pm 0,09$  g/L/an,  $p = 0,1$ ), homocystéine ( $+0,04 \pm 0,05$   $\mu$ mol/L/an ;  $p = 0,4224$ ), vitamine B12 ( $-2,39 \pm 1,33$  pg/mL/an ;  $p = 0,083$ ), la vitamine B9 ( $+0,03 \pm 0,04$  ng/mL/an ;  $p = 0,4741$ ), rapport A/G ( $-0,06 \pm 0,11$ /an ;  $p = 0,5629$ ).

#### b) Influence de la présence de signes cliniques :

La présence de signes cliniques au moment du prélèvement est associée à une **augmentation** significative du **titre sérologique** ( $573 \pm 165$  ;  $p = 0,001$ ) (voir *figure 30*), de **l'haptoglobinémie** ( $+2,03 \pm 0,47$  g/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 31*), de la **protidémie** ( $+13,8 \pm 2,57$  g/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 32*), de la **globulinémie** ( $16,84 \pm 3,10$  g/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 33*) et de la **folatémie** ( $+3,58 \pm 1,47$  ng/mL ;  $p = 0,025$ ) (voir *figure 34*).

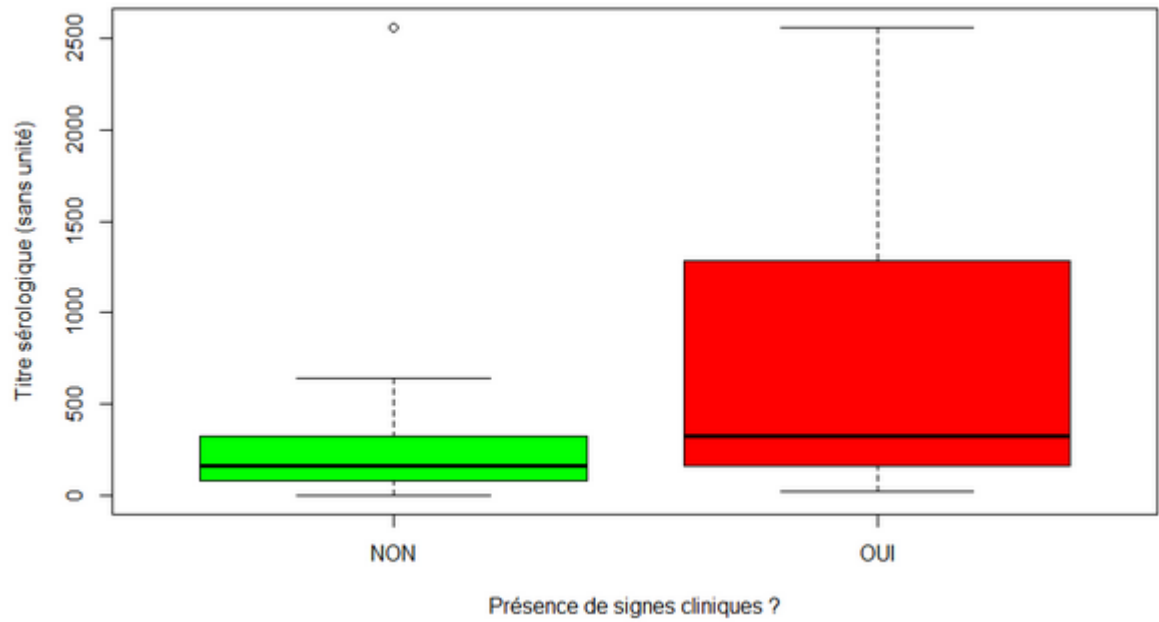


Figure 30 : Boite à moustache représentant le titre sérologique selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)

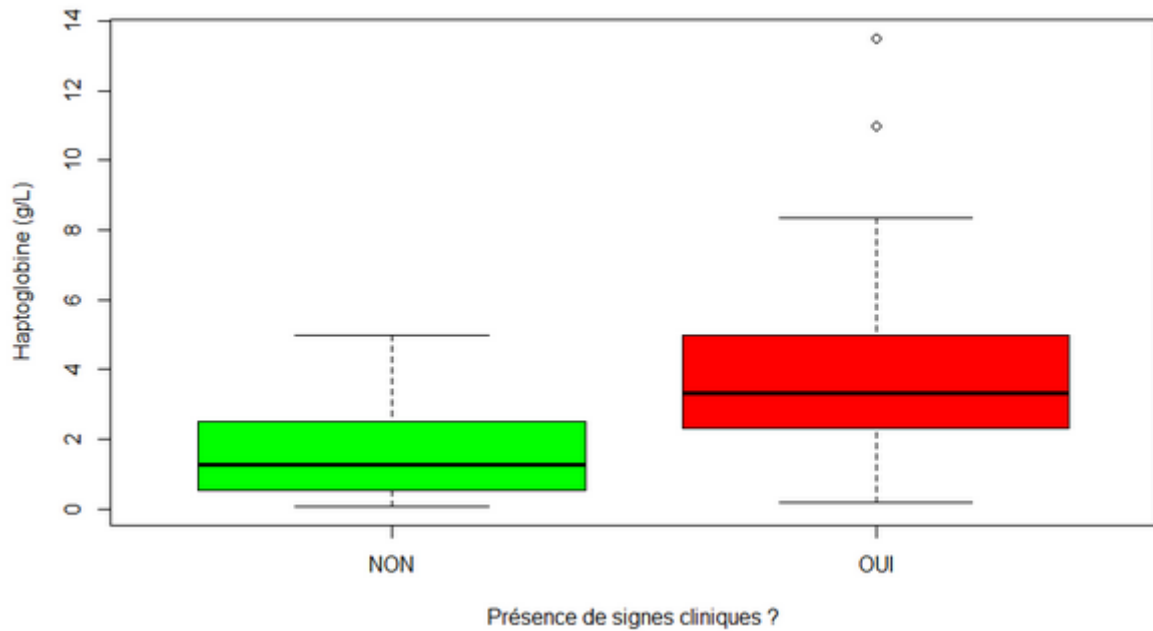


Figure 31 : Boite à moustache représentant l'haptoglobine selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)



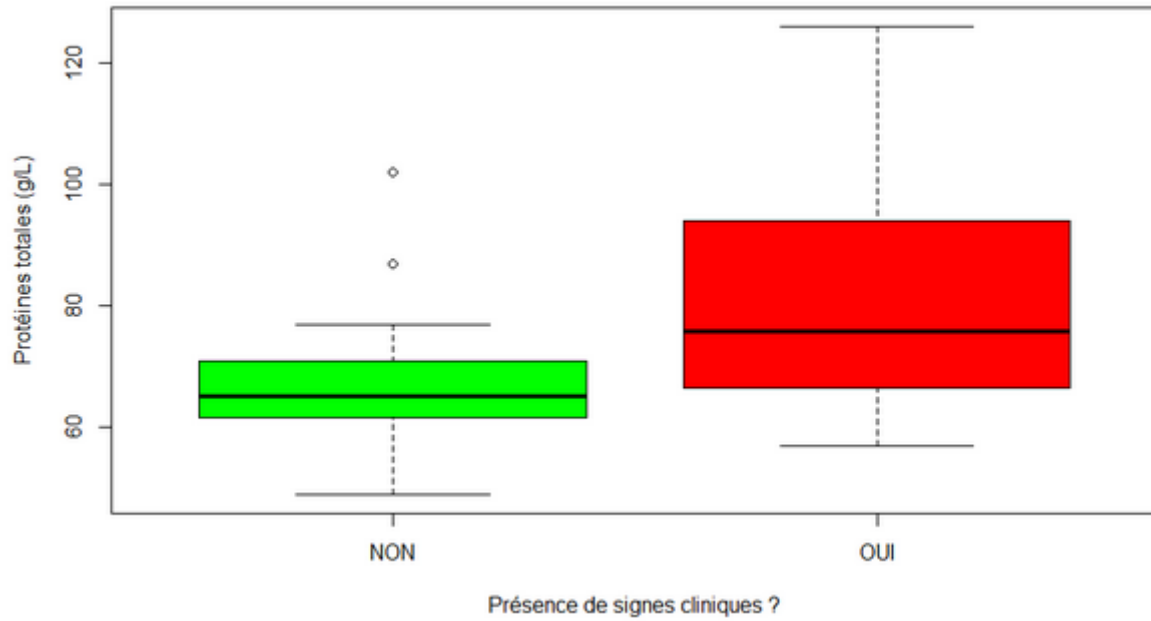


Figure 32 : Boite à moustache représentant la protéinémie totale selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)

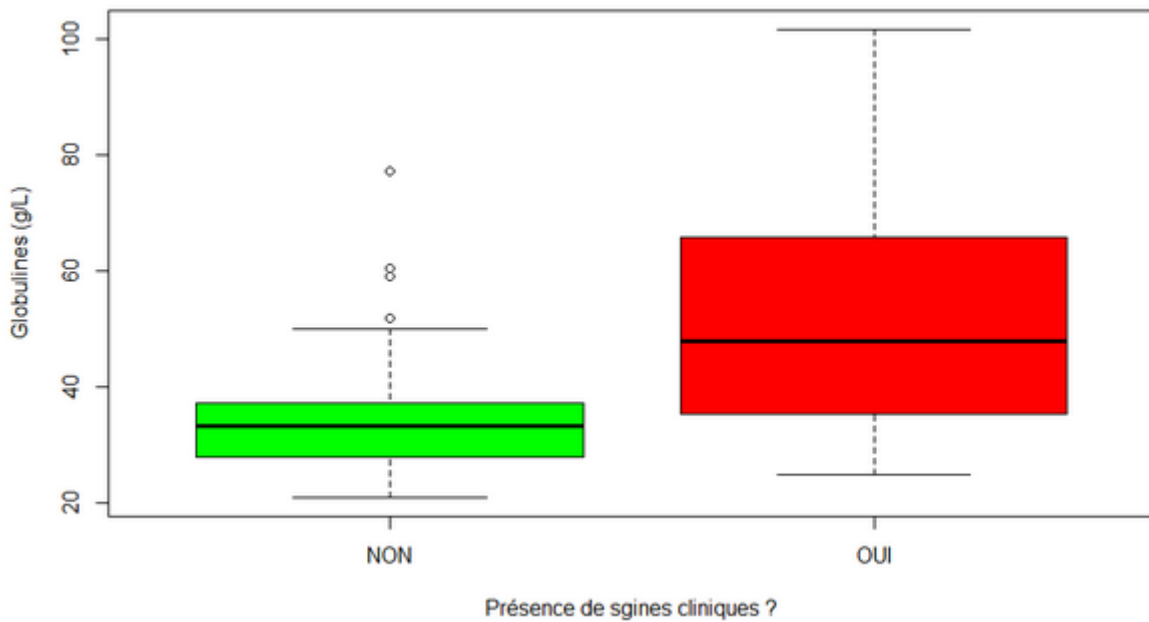


Figure 33 : Boite à moustache représentant la globulinémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)

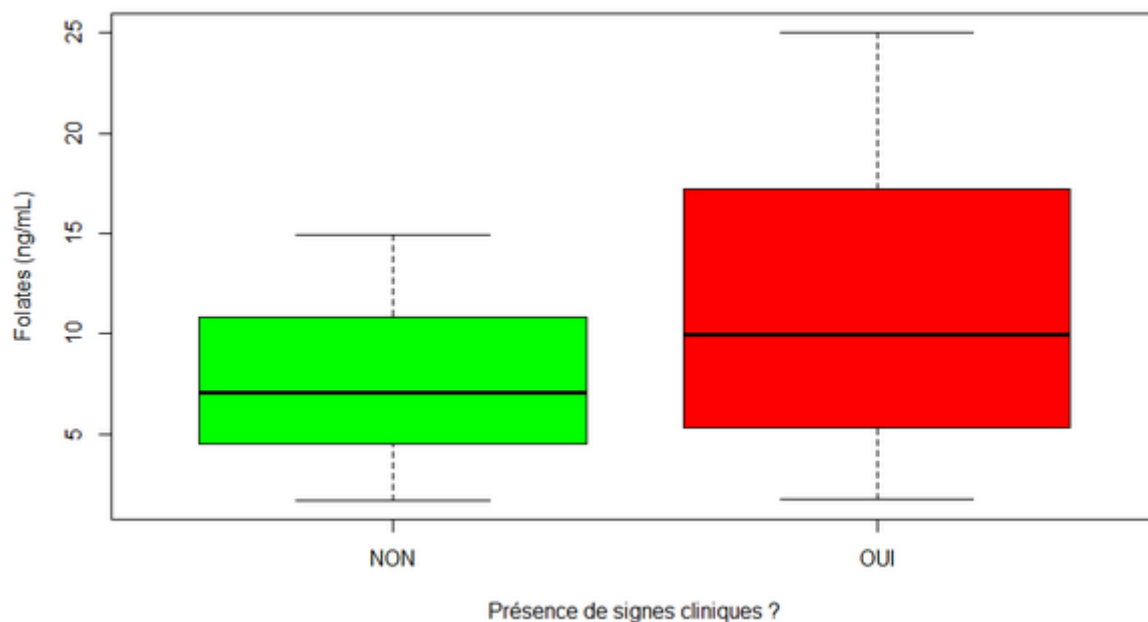


Figure 34 : Boite à moustache représentant la folatémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=42 dosages)

A l'inverse, la présence de signes cliniques est associée à une **diminution significative** de l'**albuminémie** ( $-3,04 \pm 1,24$  g/L ;  $p = 0,019$ ) (voir figure 35), du **rapport A/G** ( $-0,34 \pm 0,07$  ;  $p < 0,001$ ) (voir figure 36) et de l'**homocystéinémie** ( $-5,6 \pm 1,7$   $\mu\text{mol/L}$  ;  $p = 0,0022$ ) (voir figure 37)

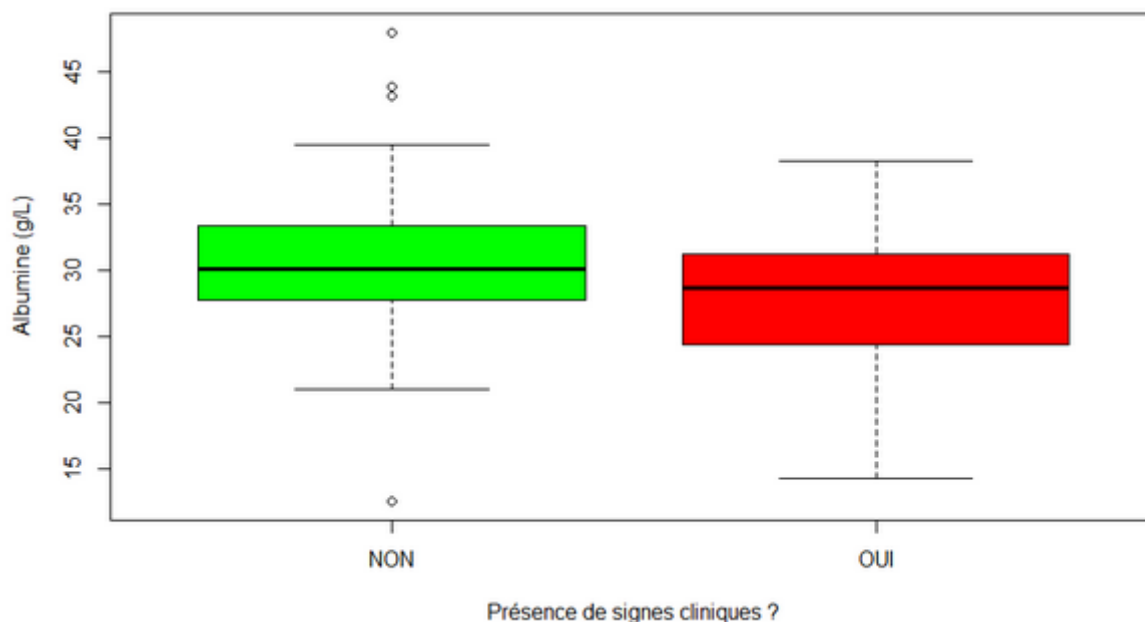


Figure 35 : Boite à moustache représentant l'albuminémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)

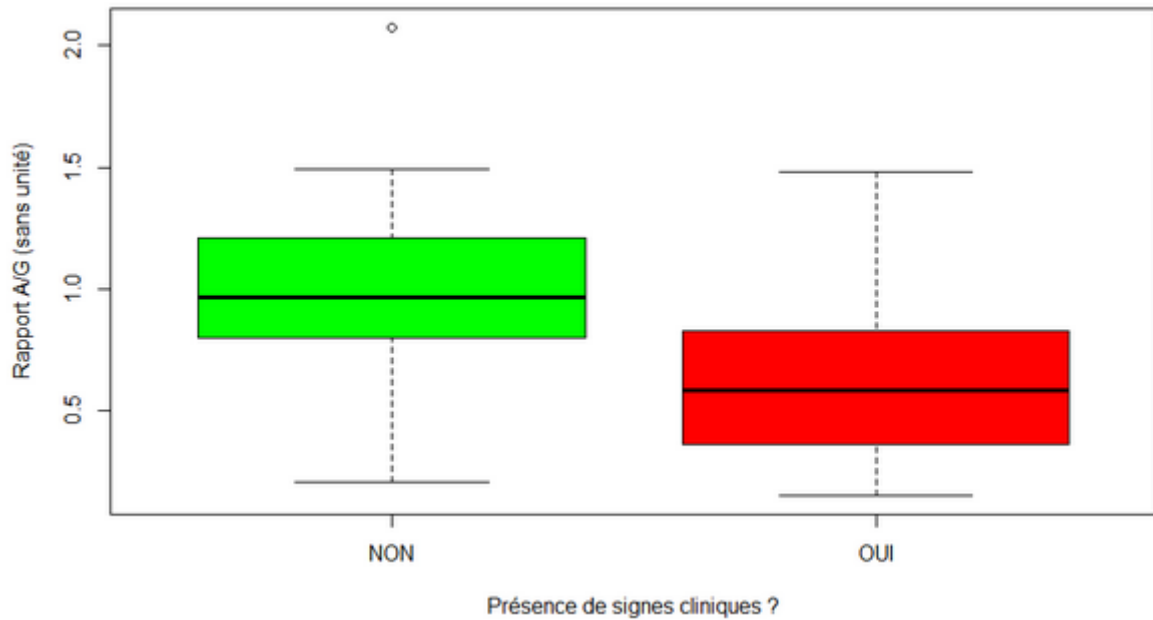


Figure 36 : Boite à moustache représentant le rapport A/G selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=76 dosages)

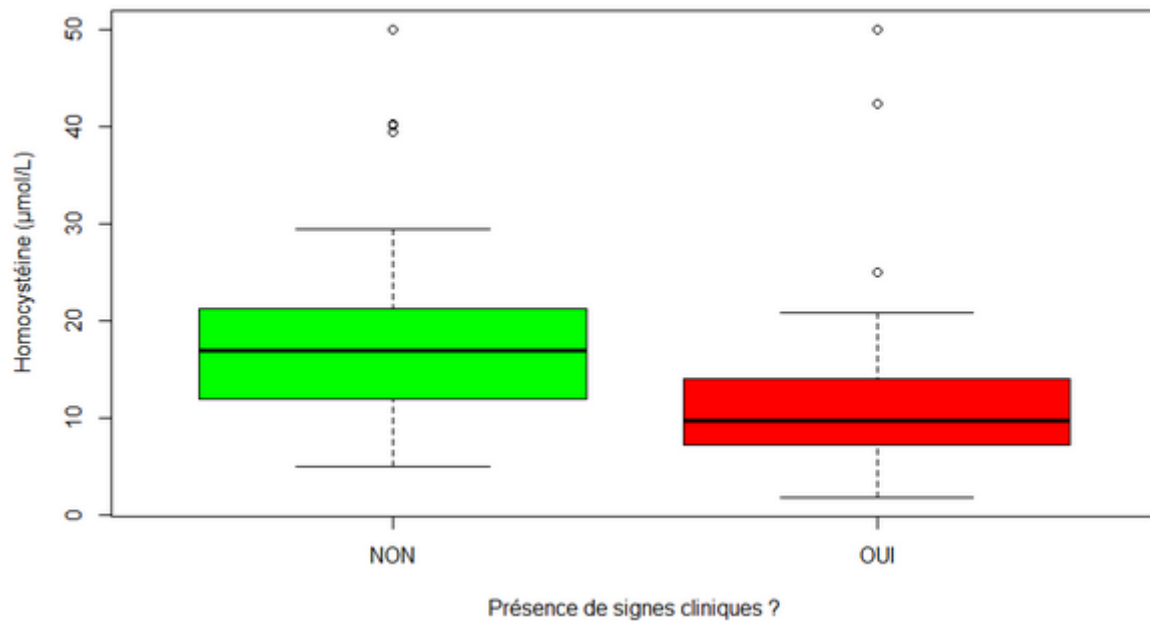


Figure 37 : Boite à moustache représentant l'homocystéinémie selon la présence ou l'absence de signes cliniques (n=60 dosages)

Les concentrations en CRP ( $+4,24 \pm 2,74$  mg/L ;  $p = 0,1294$ ), vitamine B12 ( $+64,0 \pm 57,7$  pg/mL ;  $p = 0,2773$ ), ne sont pas significativement influencées par la présence de signes cliniques.

### c) Selon la présence d'une anémie

La présence d'une **anémie** est liée à une **augmentation significative** de l'**haptoglobine** ( $+3,17 \pm 0,78$  g/L ;  $p= 0,001$ ) (voir *figure 38*), de la **protéinémie totale** ( $+13,66 \pm 4,17$  g/L ;  $p=0,005$ ) (voir *figure 39*) et de la **globulinémie** ( $+13,64 \pm 4,92$  g/L ;  $p=0.01$ ) (voir *figure 40*).

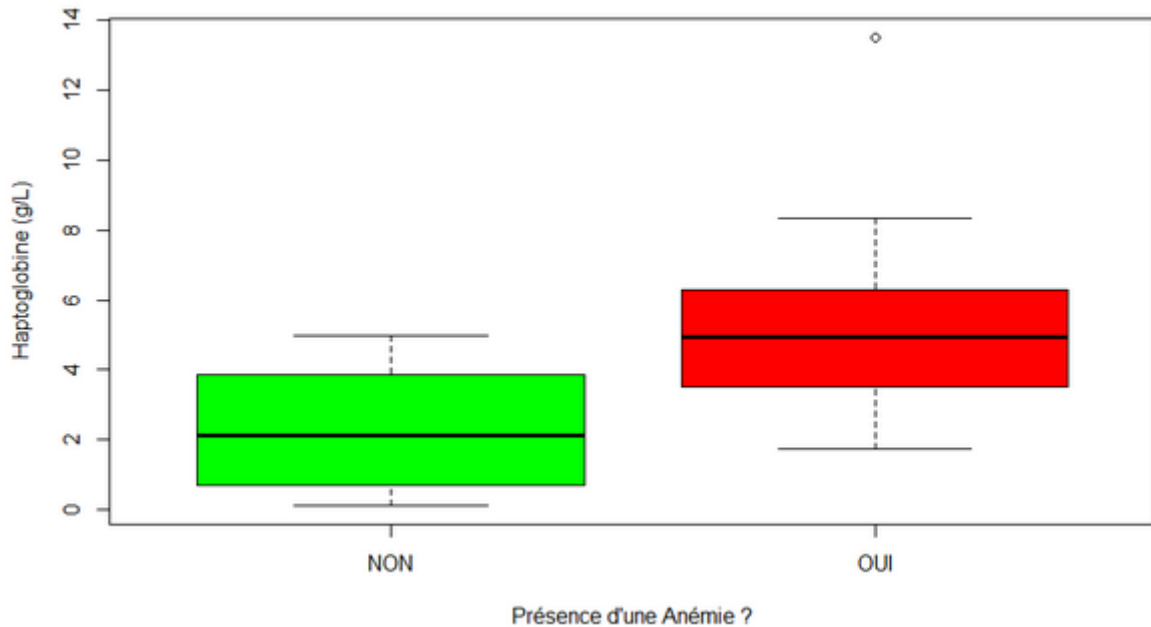


Figure 38 : Boite à moustache représentant l'haptoglobine selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages)

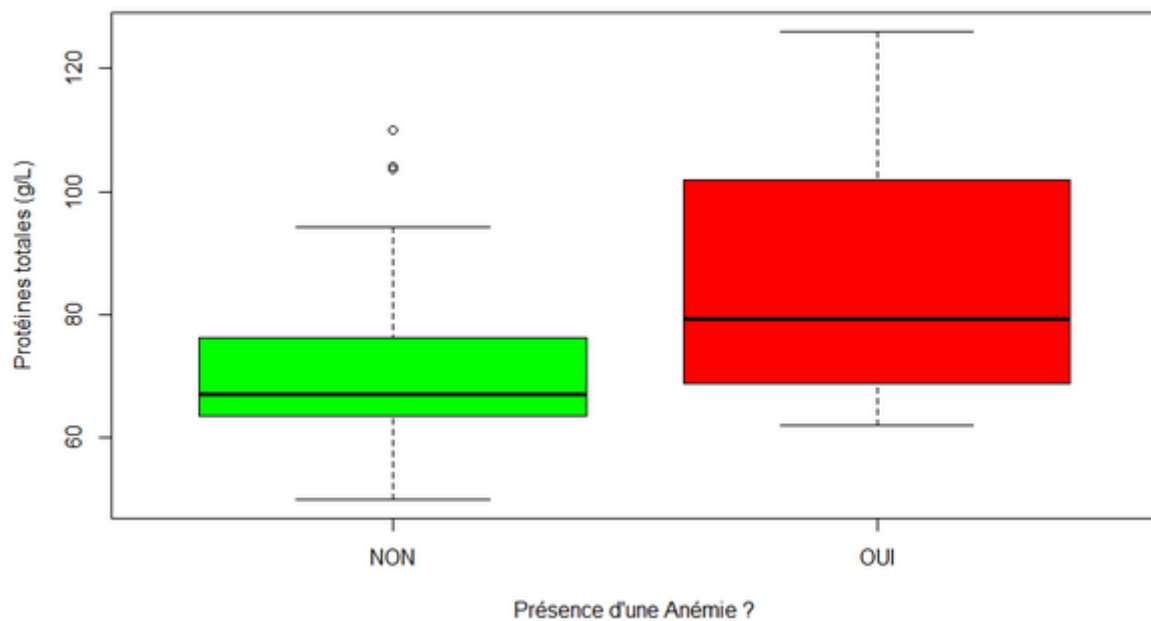


Figure 39 : Boite à moustache représentant la protéinémie totale selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages)

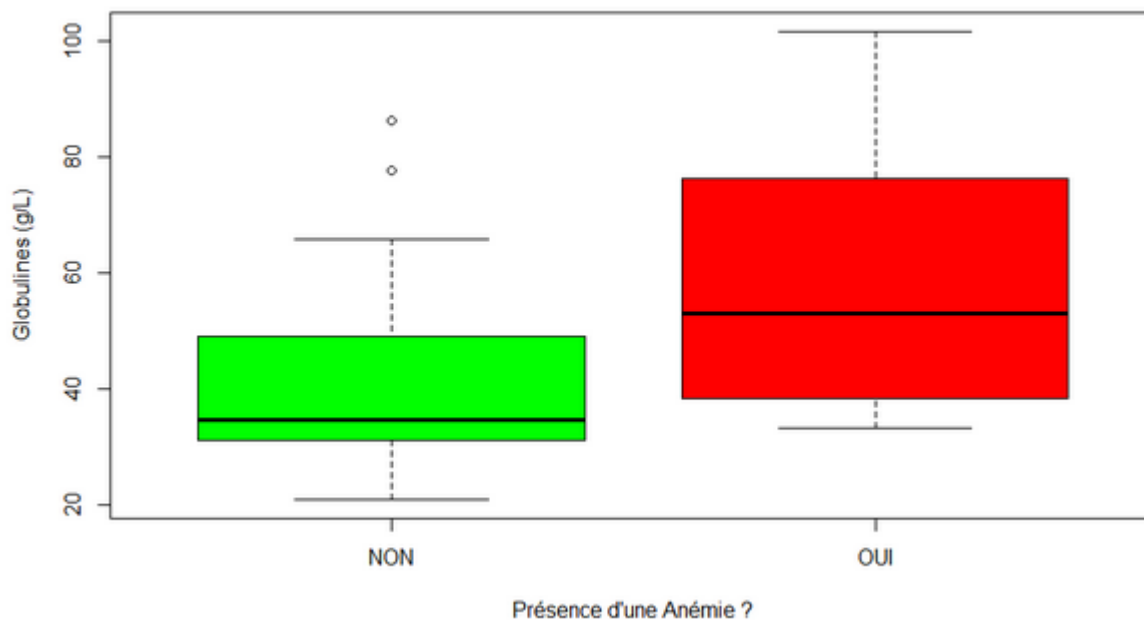


Figure 40 : Boite à moustache représentant la globulinémie selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages)

A l'inverse, lorsqu'une anémie est présente on observe une **diminution significative du rapport A/G** ( $-0,28 \pm 0,13$  ;  $p = 0,04$ ) (voir figure 41), et de la **cobalaminémie** ( $-216,64 \pm 85,89$  pg/mL ;  $p = 0,03$ ) (voir figure 42)

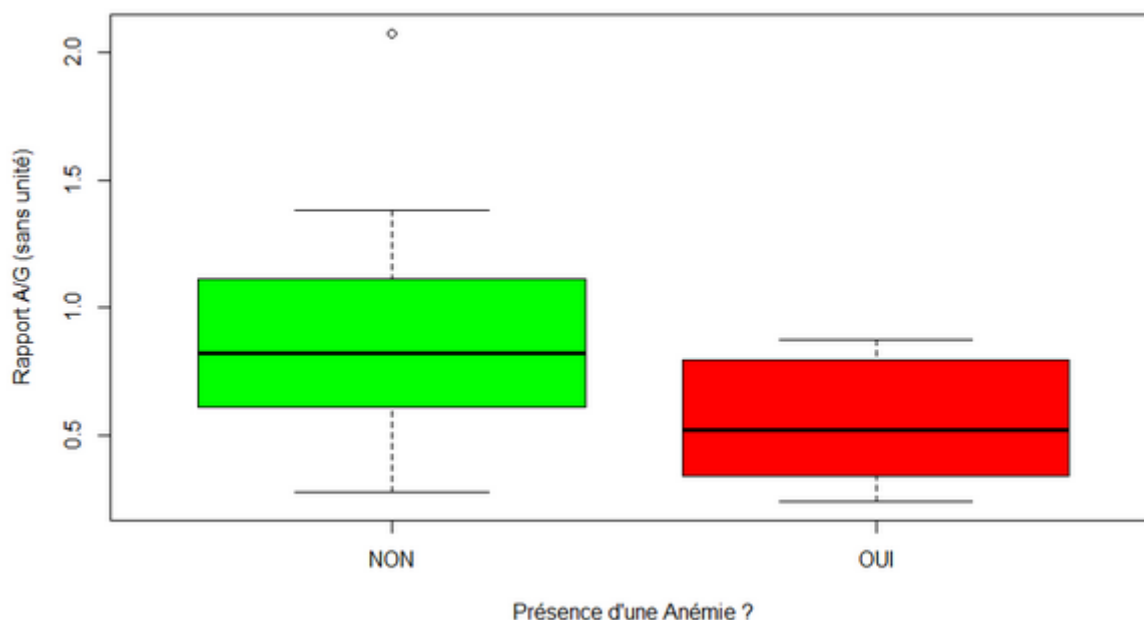


Figure 41 : Boite à moustache représentant le rapport A/G selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=39 dosages)

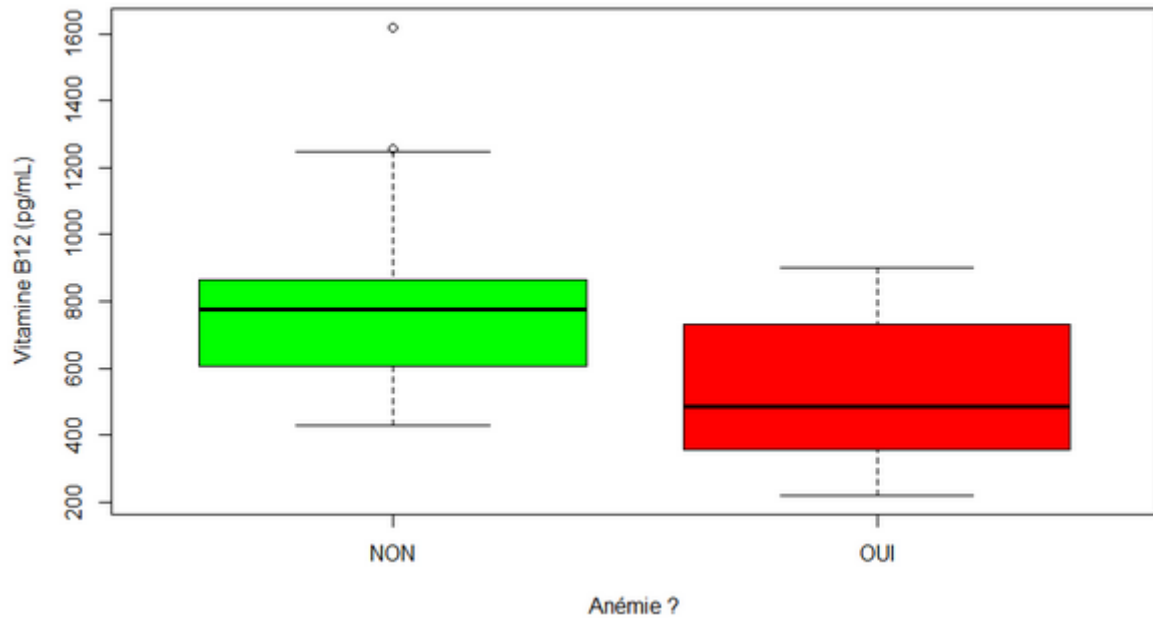


Figure 42 : Boîte à moustache représentant cobalaminémie selon la présence ou l'absence d'une anémie (n=31 dosages)

La présence de cette anomalie biologique n'était pas associée à des différences significatives pour la CRP ( $+4,67 \pm 2,85$  mg/L ;  $p = 0,12$ ), le titre sérologique ( $+493 \pm 248$  ;  $p = 0,06$ ) l'albuminémie ( $-2,69 \pm 1,93$ g/L ;  $p = 0,18$ ), l'homocystéinémie ( $0,84 \pm 3,43$   $\mu$ mol/L ;  $p = 0,81$ ), la folatémie ( $+2,72 \pm 2,16$  ;  $p = 0,25$ ).

#### d) Présence d'un rapport A/G diminué :

La présence d'un rapport A/G diminué au cours du suivi est associée à une **augmentation significative** de la **CRP** ( $+10,83 \pm 2,78$  mg/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 43*), de **l'haptoglobinémie** ( $+2,47 \pm 0,49$  g/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 44*) et du **titre sérologique** ( $+775 \pm 156$  ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 45*).

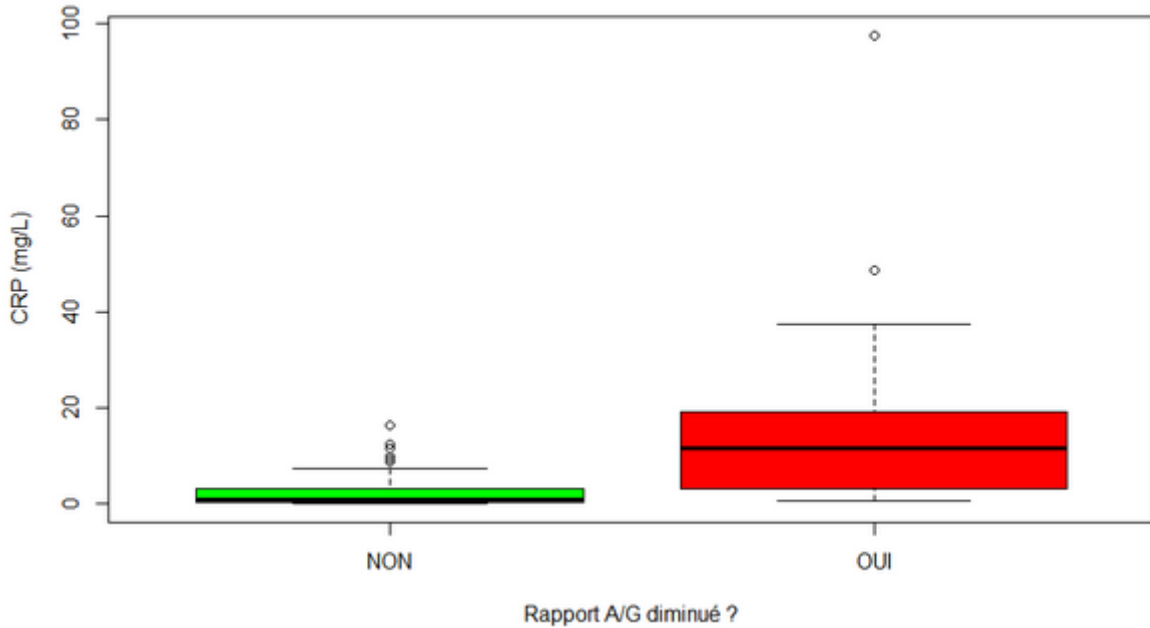


Figure 43 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages)

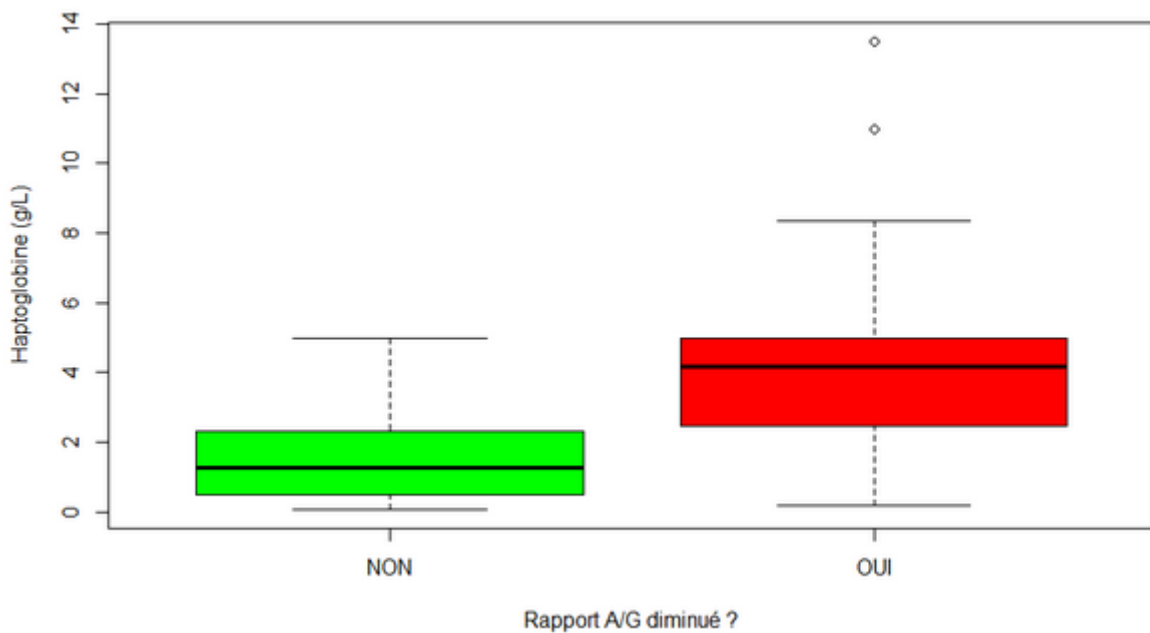


Figure 44 : Boite à moustache représentant l'haptoglobinémie selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages)



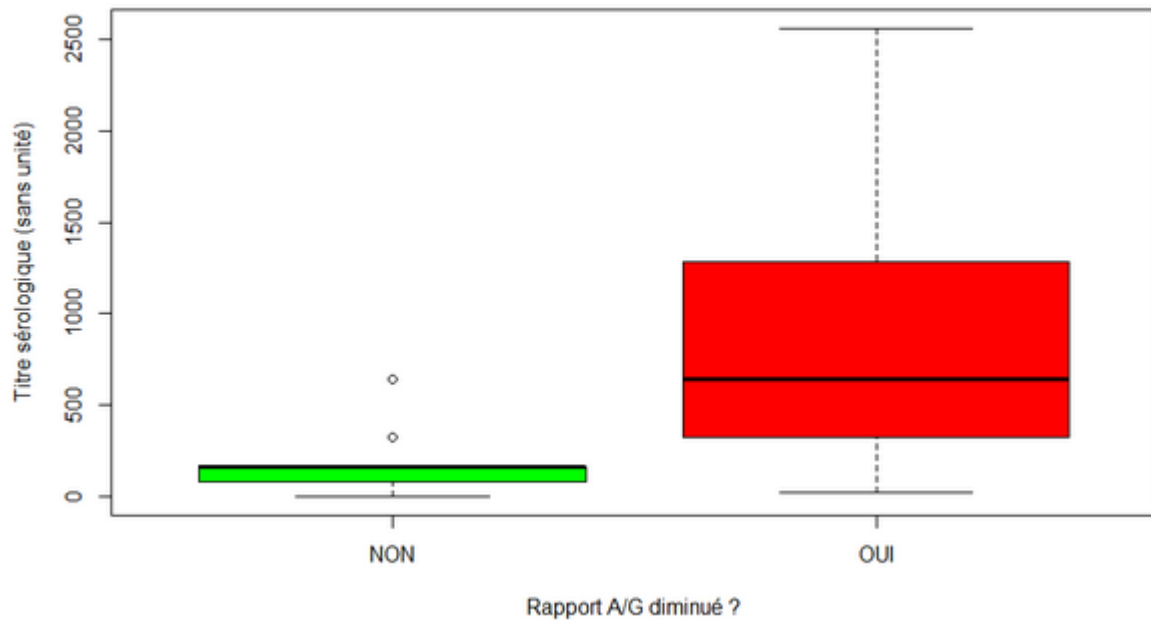


Figure 45 : Boite à moustache représentant le titre sérologique selon la présence ou l'absence d'un rapport A/G diminué (n=76 dosages)

On ne met pas en évidence de différence significative de l'homocystéinémie ( $-2,16 \pm 2,07 \mu\text{mol/L}$ ,  $p=0,30$ ), de la cobalaminémie ( $+100,97 \pm 58,36 \text{ pg/mL}$  ;  $p=0,09$ ), et de la folatémie ( $-0,43 \pm 1,53 \text{ ng/mL}$  ;  $p=0,78$ ) en présence d'un rapport A/G abaissé.

### e) Stade LeishVet :

Les animaux présentant au moment du dosage un **stade LeishVet  $\geq 2$** , présentent une **augmentation significative** de la **CRP** ( $+6,2 \pm 2,7$  mg/L ;  $p=0,025$ ) (voir *figure 46*), de **l'haptoglobinémie** ( $+2,36 \pm 0,44$  g/L ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 47*), et du **titre sérologique** ( $+758,45 \pm 159,26$  ;  $p < 0,001$ ) (voir *figure 48*).

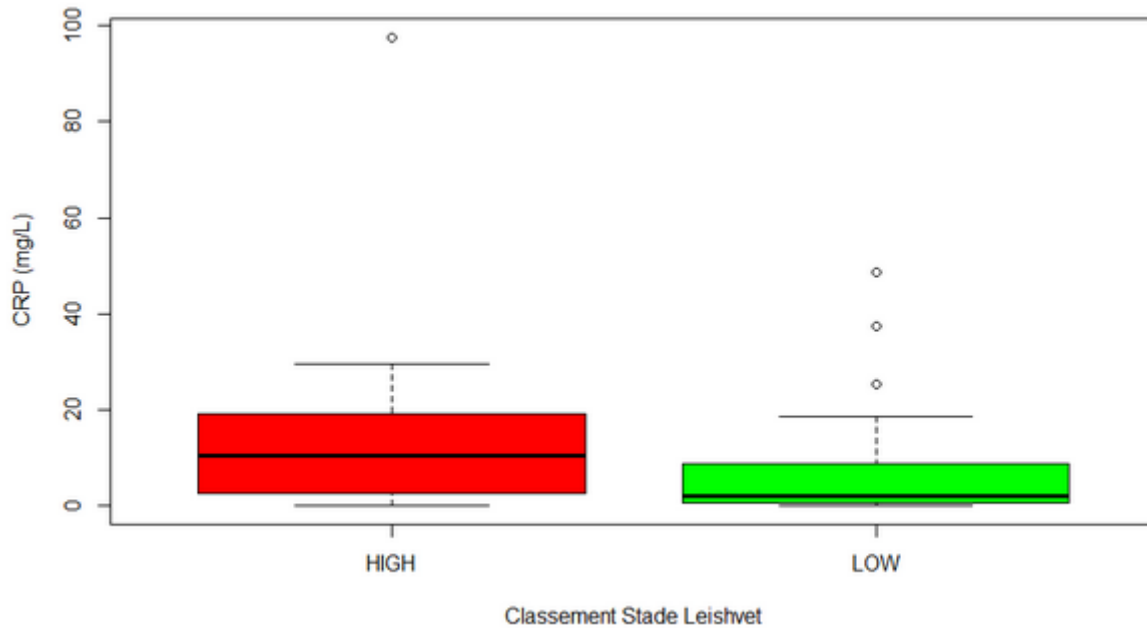


Figure 46 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages)

Rappel : LOW : stade  $< 2$  et HIGH : stade  $\geq 2$

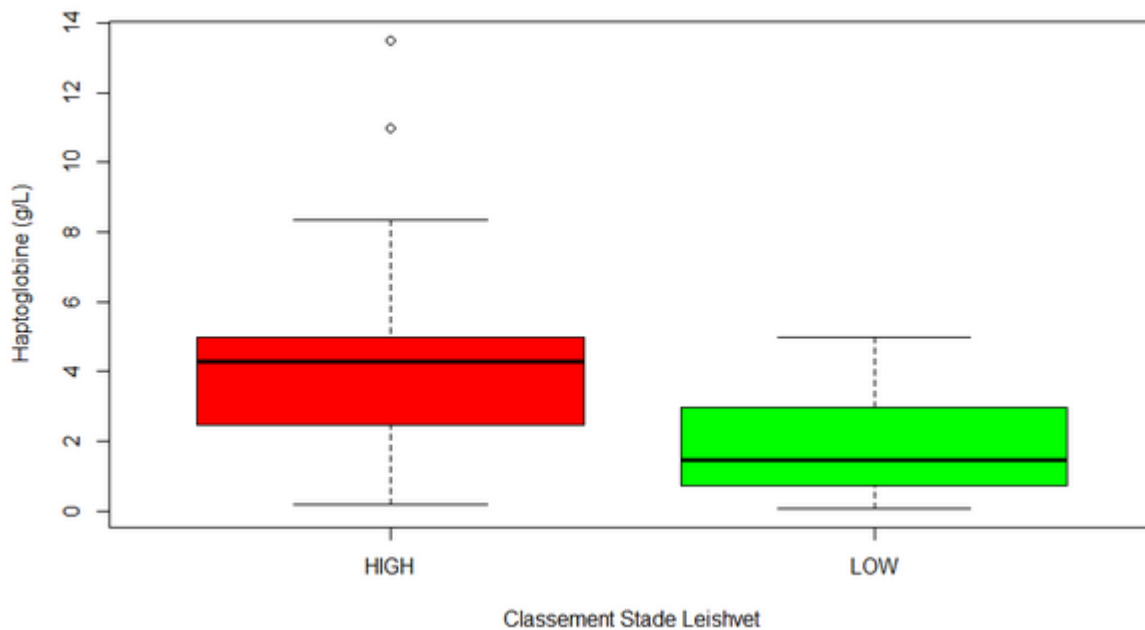


Figure 47 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages)

Rappel : LOW : stade LeishVet  $< 2$  et HIGH : stade LeishVet  $\geq 2$

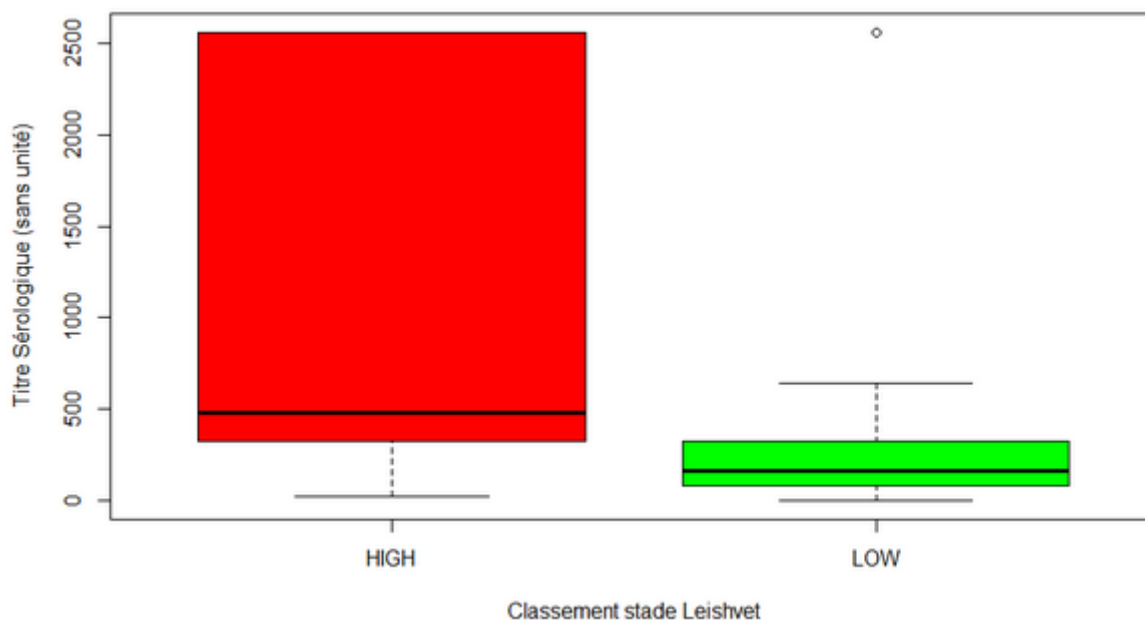


Figure 48 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=76 dosages)

Rappel : LOW : stade LeishVet < 2 et HIGH : stade LeishVet ≥ 2

A l'inverse, un stade LeishVet élevé est associé à une **diminution significative** de l'**homocystéinémie** ( $-4,09 \pm 1,81 \mu\text{mol/L}$  ;  $p=0,03$ ) (voir figure 49).

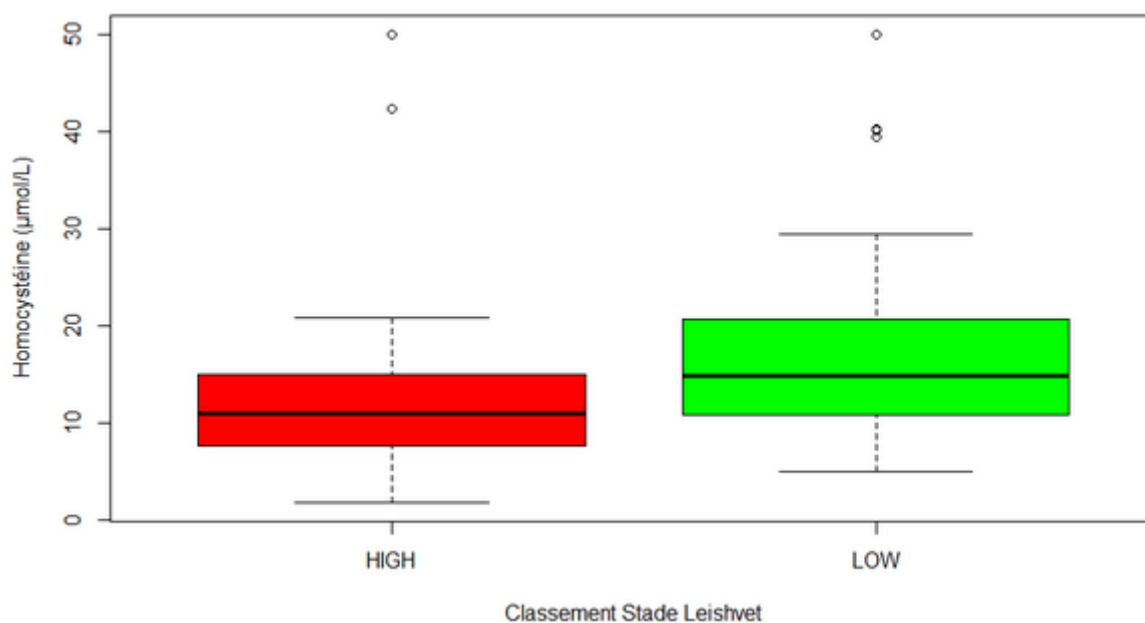


Figure 49 : Boite à moustache représentant la concentration en CRP selon le classement du stade LeishVet (n=68 dosages)

Rappel : LOW : stade LeishVet < 2 et HIGH : stade LeishVet ≥ 2

On n'observe pas de différence significative concernant la vitamine B12 ( $+60,13 \pm 57,82 \text{ pg/mL}$ ,  $p = 0,3072$ ) et la folatémie ( $+ 2,35 \pm 1,47$ ,  $p = 0,1263$ ), en fonction du stade LeishVet. L'ensemble des variations des biomarqueurs en fonction des critères d'évolution de la maladie est résumé dans le *Tableau 9*

Tableau 9 : Récapitulatif des variations des biomarqueurs en fonction des différents paramètres. Les variations significatives sont en couleurs.

Critères de progression de la maladie Biomarqueurs étudiés	Présence de signes cliniques	Présence d'une anémie	A/G diminué (<1 si PT >80 g/L, <0.8 sinon)	Stade LeishVet ≥ 2
<b>Titre Sérologique</b>	↗	(↗)	↗	↗
<b>Protéines totales</b>	↗	↗	*	*
<b>Albumine</b>	↘	(↘)	*	*
<b>Globulines</b>	↗	↗	*	*
<b>Rapport A/G</b>	↘	↘	*	*
<b>CRP</b>	(↗)	(↗)	↗	↗
<b>Haptoglobine</b>	↗	↗	↗	↗
<b>Vitamine B12</b>	(↗)	↘	(↗)	(↗)
<b>Vitamine B9</b>	↗	(↗)	(↘)	(↗)
<b>Homocystéine</b>	↘	(↗)	(↘)	↘

\* : Marqueurs servant à la construction du critère de progression de la maladie. Leur utilisation est donc non réalisable.

## **C. Discussion :**

Notre étude visait à identifier des marqueurs associés à la dégradation clinico-biologiques des chiens atteints de leishmaniose. Tous les critères de progression de la maladie que nous avons évalués ont permis de mettre en évidence des variations significatives d'un ou plusieurs biomarqueurs.

Parmi eux, l'haptoglobine s'est révélée particulièrement intéressante, avec des variations significatives pour tous les critères testés.

A l'inverse, les marqueurs du métabolisme de la vitamine B12 ont montré des variations plus limitées.

Dans cette partie nous décrivons nos hypothèses concernant les causes et les éventuelles conséquences des variations biologiques mises en évidence.

# 1) Protéines de l'inflammation

## a) Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation

### La CRP :

Dans notre étude la CRP augmente de façon significative chez les chiens ayant un stade Leishvet supérieur ou égale à 2 (donc chez les chiens ayant des signes cliniques généralisés avec ou sans variation de paramètres biochimiques). Cette différence de concentration sanguine en CRP en fonction du stade LeishVet a déjà été mise en évidence dans une étude portant sur 77 chiens (Pardo-Marin et al., 2020). La concentration en CRP était significativement plus faible pour les animaux du stade 1 (3 chiens) en comparaison aux trois autres stades et ceux du stade 2 (21 chiens) en comparaison avec le stade 3 (12 chiens) et 4 (9 chiens).

La CRP est probablement la protéine de la phase aiguë de l'inflammation la plus étudiée dans la leishmaniose canine. Il a ainsi été mis en évidence une augmentation majeure en cas de leishmaniose (Martinez-Subiela et al., 2011)), avec en particulier des concentrations en CRP significativement plus importantes chez les animaux symptomatiques par rapport aux asymptomatiques (Martínez-Subiela et al., 2002). Ce marqueur a également été associé au pronostic. La concentration sanguine en CRP était en effet plus élevée chez les chiens qui sont morts dans les 30 jours suivant le diagnostic, comparée à celle des chiens restés en vie (Silvestrini et al., 2014).

Nos résultats suggèrent également que la CRP pourrait être un marqueur de gravité

**L'augmentation de la CRP chez les chiens atteints de leishmaniose semble être un témoin de la progression biologique de la maladie, plus que de la progression clinique. Cette information pourrait être intéressante à intégrer aux critères de classification de la maladie. L'impact pronostique de cette augmentation nécessiterait d'être investigué pour juger la pertinence d'inclure ce marqueur lors du suivi de la maladie.**

### L'haptoglobine :

Les résultats concernant l'haptoglobine dans la littérature sont moins nombreux. Une absence de corrélation avec le titre sérologique (Cantos-Barreda et al., 2018), le stade LeishVet (Pardo-Marin et al., 2020), ainsi que l'absence de diminution du niveau sérique suite à la mise en place du traitement (contrairement à la CRP) (Martínez-Subiela et al., 2003) sont rapportés.

Ces résultats sont discordants avec ceux que nous présentons (alors que la même technique de dosage était réalisée dans l'étude de Cantos-Barreda et al. et Martinez Subiela et al.). En effet, l'haptoglobine est le seul marqueur dont la concentration a été significativement modifiée pour tous les critères de progression de la maladie évalués.

L'augmentation de l'haptoglobine semble ainsi plus sensible pour détecter la présence de signes cliniques que l'augmentation de la CRP notamment.

L'haptoglobine est une protéine sérique, produite par le foie, qui se complexe avec l'hémoglobine libre circulante. Une fois ce complexe formé, il sera internalisé par des macrophages par l'intermédiaire du récepteur CD163. Dans le macrophage, cette hémoglobine sera décomposée en hème et en globines. L'hème sera dégradé par l'Hème oxygénase de type 1 (HO-1) en biliverdine (rapidement convertie en bilirubine), monoxyde de carbone et fer. Ce fer libre dans le macrophage augmentera la production de ferritine (protéine fixant le fer).

Dans une étude s'intéressant à la concentration en HO-1, il a été mis en évidence une concentration enzymatique plus élevée dans le sang périphérique des chiens atteints de leishmaniose (animaux avec signes clinico-biologiques, sérologie ELISA et PCR rate et moelle osseuse positives) par rapport à des chiens sains (absence d'anomalie clinico-biologiques et sérologie Leishmaniose négative) (Almeida et al., 2017a). A noter qu'HO-1 a été démontré comme inhibant la lymphoprolifération. De plus, la concentration en IL-10 (cytokine anti-inflammatoire réduisant la réponse Th1, efficace contre le parasite) était elle aussi augmentée et corrélée positivement avec HO-1. Enfin, les autres éléments de la voie enzymatique de dégradation de l'hémoglobine (l'haptoglobine, la ferritine et le récepteur soluble CD163) étaient également en concentration plus importante chez les chiens malades.

De plus, selon une étude du même auteur, l'augmentation de la concentration en HO-1 est associée à une augmentation de la charge parasitaire dans les macrophages (Almeida et al., 2017b). Ainsi, l'augmentation de la concentration en haptoglobine chez les animaux les plus atteints (présence de signes cliniques, avec diminution du rapport A/G, présentant une anémie, ...) pourrait être un témoin de la balance cytokinique et de la diminution de l'immunité cellulaire (corroborer dans notre étude par la forte corrélation positive entre l'haptoglobine et le titre sérologique, témoignant d'une augmentation de la réponse Th2).

De plus, l'haptoglobine est une protéine qui intervient dans les systèmes antioxydants de l'organisme. En effet, l'hémoglobine extra-corporelle peut initier une réaction radicalaire en libérant du fer hémique, qui agit comme un puissant agent oxydant (réaction de Fenton). Cette réaction entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant des dommages sur les tissus. La liaison de l'hémoglobine à l'haptoglobine empêche cette cascade en protégeant le fer hémique. Or, il a été mis en évidence un niveau de stress oxydant plus important chez les chiens atteints de leishmaniose, en particulier ceux présentant des signes cliniques (Souza et al., 2014). Ainsi l'augmentation de la production d'haptoglobine pourrait être un témoin de l'augmentation du niveau de stress oxydant.

**L'haptoglobine est la protéine de la phase aiguë de l'inflammation dont la concentration sanguine s'est révélée significativement augmentée pour tous les critères d'évaluation de la maladie testés. Cette augmentation pourrait être un témoin du type de réponse immunitaire mise en jeu et de l'augmentation du stress oxydant chez les chiens leishmaniens présentant des signes cliniques.**



## b) Albumine, globulines et rapport A/G :

Les concentrations sanguines en albumine et globulines (et ainsi le rapport A/G) sont des biomarqueurs facilement réalisables au chevet du patient par le vétérinaire praticien.

Leur intérêt a été prouvé au diagnostic et nos résultats confirment leur importance au cours du suivi des animaux. Nos résultats corroborent ceux d'une récente étude ayant mis en évidence que l'augmentation du rapport A/G, l'augmentation de l'albuminémie et la diminution de la concentration en bêta-globulines, diminuaient le risque de devoir réinstaurer un nouveau traitement leishmanicide chez des chiens suivis pour une leishmaniose (Sarquis et al., 2024).

L'utilité de ces marqueurs s'expliquent probablement par leur capacité à évaluer la réponse inflammatoire systémique (l'albumine est une protéine négative de l'inflammation et les protéines positives sont des globulines), la réponse immunitaire mise en jeu (la production d'anticorps lors de stimulation de la réponse Th2 se traduit par une très forte augmentation en gamma-globulines) et les conséquences organiques de la maladie (en particulier l'atteinte rénale : une forte protéinurie majeure l'hypoalbuminémie).

**Les résultats de notre étude confirment et renforcent l'intérêt de mesurer l'albuminémie et la protéinémie totale, permettant de calculer la globulinémie et le rapport A/G, au diagnostic et lors du suivi des chiens atteints de leishmaniose.**

## 2) Métabolisme de la vitamine B12

L'une des originalités de notre travail est que nous nous sommes intéressés aux marqueurs du métabolisme de la vitamine B12 dans le contexte de leishmaniose canine, suite aux résultats d'une récente étude ayant rapporté une diminution de la cobalaminémie au diagnostic (Chatzis et al., 2021).

### a) Vitamine B12 :

Dans notre étude, seuls 4/60 prélèvements (issus de 3 animaux différents) ont mis en évidence une hypovitaminose B12 (concentration <350 pg/mL).

La prévalence de l'hypocobalaminémie est donc inférieure à celle détecté par l'étude de Chatzis et al., où 18% des chiens leishmaniens avaient une concentration sérique en vitamine B12 inférieure à la norme basse de l'intervalle de référence. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la cohorte recrutée pour ce travail est majoritairement constituée de chiens déjà traités, et non au moment du diagnostic de la maladie. Les résultats de l'étude de Chatzis et al. indiquent en effet que la cobalaminémie se normalise après mis en place du traitement de la leishmaniose, sans supplémentation en vitamine B12.

En revanche, nos résultats mettent en avant une cobalaminémie plus faible chez les animaux présentant une anémie. Cette anémie pourrait ainsi être multifactorielle, liée à un état inflammatoire chronique, comme en témoigne l'augmentation de l'haptoglobulinémie et la diminution de rapport A/G, mais également favorisée voire aggravée par une diminution des réserves en cobalamine. En effet, la vitamine B12 est un cofacteur indispensable à l'érythropoïèse (Koury et Ponka, 2004) et l'hypocobalaminémie peut être responsable d'une anémie macrocytaire (exemple de l'anémie pernicieuse chez l'homme), bien que le lien entre développement de cette anémie et l'hypocobalaminémie ne soit pas établi dans l'espèce canine (Stanley et al., 2019). L'intérêt de supplémenter en vitamine B12 les chiens atteints de leishmaniose présentant une anémie devrait faire l'objet d'études complémentaires.

**L'hypocobalaminémie semble être une anomalie marginale au cours du suivi des chiens atteints de leishmaniose. Il est probablement injustifié d'inclure systématiquement ce marqueur au suivi biologique. En revanche, lorsqu'une anémie est présente, la diminution des réserves en vitamine B12 pourrait avoir un effet aggravant.**

## b) Homocystéine :

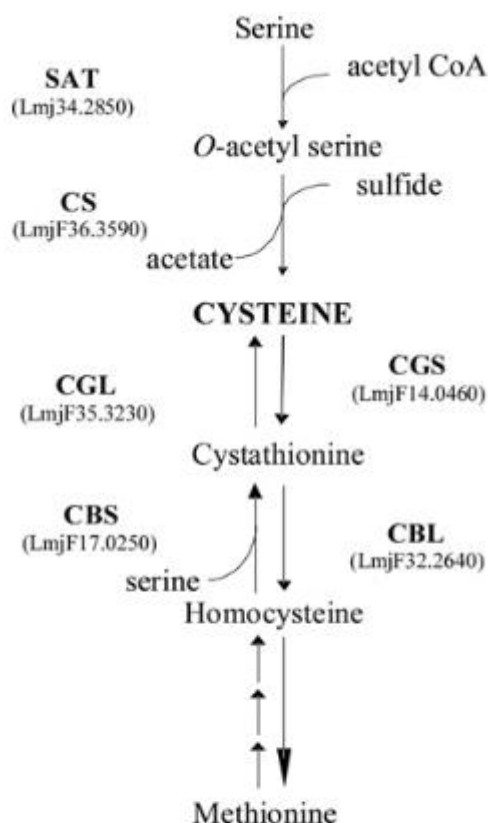
Pour rappel, la vitamine B12 sérique est un marqueur de la concentration en vitamine B12 extracellulaire. Sa seule mesure ne permet pas d'estimer fiablement la concentration totale en vitamine B12 de l'organisme, qui dépend notamment des réserves cellulaires (hépatiques et contenues dans les globules rouges). Ainsi, il est intéressant de mesurer d'autres marqueurs pour mettre en évidence un déficit cellulaire en vitamine B12, c'est le cas de l'holotranscobalamine (vitamine B12 liée à son transporteur sérique la rendant disponible pour les cellules), de l'acide méthylmalonique et de l'homocystéine, dont les concentrations augmentent en cas de déficit cellulaire (cf. PARTIE I) B)2)d)) (Ulloque-Badaracco et al., 2023).

Nous avons choisi l'homocystéine pour des raisons pratiques (méthode colorimétrique adaptable à l'automate de biochimie du laboratoire), économiques (le dosage de l'acide méthyl malonique nécessite l'utilisation de la spectrométrie de masse, ressource beaucoup plus couteuse) et parce qu'une validation analytique avait pu préalablement être réalisée.

Il est tout d'abord intéressant de remarquer qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'homocystéinémie et la cobalaminémie (ni avec la folatémie), suggérant que dans ce contexte, ce n'est probablement pas le meilleur marqueur pour évaluer les ressources en vitamine B12 de l'organisme. La mesure des autres marqueurs cités devrait probablement être privilégiée dans les futures études. Il faut toutefois noter que l'absence d'intervalle de référence dans l'espèce canine ne permettait pas une interprétation complète des résultats.

Contrairement à l'augmentation d'homocystéine attendue lors de déficit cellulaire en vitamine B12, c'est une diminution de l'homocystéinémie qui a été mise en évidence, associée à la présence de signes cliniques et en cas de stade LeishVet avancé, ce dernier traduisant également la corrélation positive avec l'albumine et la corrélation négative avec la CRP. Ces résultats sont inédits, sans mention dans la littérature que nous avons pu consulter.

La cause de cette diminution n'est pas clairement établie. Une hypothèse serait l'utilisation de cet acide aminé par le parasite. Une étude menée chez l'espèce *Leishmania major*, a démontré que le parasite peut mobiliser deux voies de synthèse de la cystéine (Williams et al., 2009). Une des deux voies utilise l'homocystéine comme molécule de départ afin de synthétiser la cystathionine grâce à la cystathionine bêta-synthase). Cette voie est représentée par la figure 50. Cette production de cystéine pourrait contribuer à celle du glutathion, qui pourrait participer aux mécanismes de défense du parasite contre l'action oxydante des enzymes du phagolysosome.



**Figure 1 Cysteine biosynthesis pathways in *L. major***

Enzymes present in *L. major* (Lmj), and the reactions they catalysed, identified by *in silico* analysis using BLAST algorithm are given with their geneDB systematic name.

Figure 50 : Elaboration de la cystéine en utilisant l'homocystéine chez leishmania major. (Williams et al., 2009)

Par ailleurs, cette diminution de l'homocystéinémie pourrait avoir des conséquences chez le chien, en impactant négativement les capacités anti-oxydantes. En effet, comme indiquée ci-avant, l'homocystéine est nécessaire à la formation de Glutathion (cf figure 24), puissant capteur de radicaux oxygénés grâce à l'activité de la Glutathion peroxydase (Gpx) (Kharbanda, 2013).

Il a également été rapporté que les chiens atteints de leishmaniose présentaient une activité sanguine en Gpx inférieures à celles de chiens sains (Souza et al., 2014) et que les chiens symptomatiques (signes cutanés, amaigrissement, polyadénomégalie) avaient une activité Gpx moindre que les chiens asymptomatiques.

D'autre part, l'activité pro-oxydante est probablement favorisée par l'activité des macrophages (stimulée lorsque le parasite se multiplie en leur sein), qui synthétisent dans leur phagolysosome des molécules oxydantes de façon importante, qui peuvent être relâchées lors de la lyse cellulaire et provoquer des dégâts tissulaires, aggravant les signes cliniques (Reverte et al., 2022).

Tout cela peut donc concourir à un niveau de stress oxydant beaucoup plus important chez les chiens leishmaniens symptomatiques. On peut dès lors se demander si la prise en charge thérapeutique de ce stress oxydant pourrait être pertinente.

Dans une étude, l'administration à des souris infectées par *Leishmania amazonensis* de n-acétyl-cystéine (NAC), un précurseur du glutathion, a permis l'augmentation de la concentration sanguine en glutathion, la diminution des cytokines inflammatoires (TNF-alpha, IL-1, IL-6) et la baisse de l'activation des mastocytes (qui provoquent de la douleur) en comparaison à un groupe contrôle non traité (Crupi et al., 2020). Aussi, une telle étude pourrait également être menée dans l'espèce canine.

**La diminution de l'homocystéinémie chez les chiens symptomatiques pourrait avoir des conséquences négatives, notamment en réduisant les capacités anti-oxydantes, favorisant un niveau de stress oxydant élevé chez ces animaux, dont la prise en charge pourrait être bénéfique.**

### c) Vitamine B9 :

La folatémie a été évaluée car elle joue un rôle proche de la vitamine B12 pour la synthèse d'ADN. Dans notre cohorte, les animaux présentant des signes cliniques ont une concentration en folates significativement supérieure aux animaux asymptomatiques.

La vitamine B9 étant absorbée par voie digestive et produite par les bactéries du microbiote intestinal, une cause majeure de l'augmentation de sa concentration sanguine est la présence d'une dysbiose intestinale (Quigley et al., 2020). Le microbiote des chiens atteints de leishmaniose clinique a été comparé à celui de chiens sains et à celui de chiens asymptomatiques (Meazzi et al., 2022). Il a été noté une différence entre les chiens sains et les chiens leishmaniens (qu'ils soient symptomatiques ou non) avec une présence de *Proteobacteria* plus importante chez les animaux atteints.

Concernant les conséquences éventuelles de cette augmentation de la folatémie il est intéressant d'étudier le métabolisme des folates chez les parasites du genre *Leishmania* qui spolient les folates de leurs hôtes. Ces derniers étant nécessaires à de nombreuses voies métaboliques chez ce parasite. Il a été démontré que des souches mutées de *Leishmania* dépourvus du transporteur DHFR-TS (Dihydrofolate réductase et Thymidylate sulfatase), donc d'une des voies métaboliques des folates, étaient moins virulentes chez la souris (Titus et al., 1995). Ainsi, on peut éventuellement faire l'extrapolation qu'une ressource en folates plus importantes (i.e. une folatémie plus importante) pourrait contribuer à augmenter (ou au moins maintenir) la virulence du parasite, et donc favoriser la présence de signes cliniques.

**L'augmentation de la folatémie chez les animaux présentant des signes cliniques pourrait s'expliquer par une modification du microbiote intestinal, et la question se pose de savoir dans quelle mesure cela pourrait contribuer à la virulence du parasite.**

## **D. Limites de l'Etude :**

Les principales limites de notre étude viennent de son caractère rétrospectif. Les informations récoltées à partir des feuilles de commémoratif et des contacts téléphoniques n'ont pas pu être complètes pour tous les cas, en particulier dans la description des signes cliniques. Le suivi ayant été propre à chaque cas, cela explique le manque de quelques données (notamment biologiques). Les traitements et leur chronologie n'ont pas pu être établis avec précision, empêchant de prendre en compte cette donnée dans les analyses. De plus, nous avons voulu initialement nous intéresser à l'intérêt de l'analyse d'urine dans le suivi de la maladie mais cela n'a été possible au vu du faible nombre de données récoltées auprès des praticiens, qui semblent ne pas l'inclure systématiquement au diagnostic ou lors du suivi de la maladie.

Le nombre total de chiens de la cohorte était lui semblable à celui des cohortes rapportées dans la littérature, cependant le nombre total d'échantillons disponibles n'étaient pas le même pour tous les chiens, ce qui a pu limiter la performance des outils statistiques mobilisés. De plus, il peut y avoir des différences entre des chiens suivis dès le début de la maladie et d'autres où seuls des prélèvements tardifs étaient disponibles.

Concernant les échantillons, leur durée et mode de conservation n'a pas été homogène. La plupart étaient conservés à -20°C tandis quelques-uns ont été conservés à -80°C. La durée de conservation allait de 1 semaine à 5 ans. Cela a pu avoir un impact sur les résultats des analytes mesurés a posteriori. De plus, le manque de volume résiduel dans certains prélèvements nous a amené à les écarter ou bien à prioriser les analytes mesurés, et à ne pas pouvoir déterminer certaines valeurs avec précision (haptoglobine par exemple).

C'est pourquoi l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail nécessitent d'être confirmé au cours d'une étude prospective, où les marqueurs seraient mesurés sur les échantillons frais, et où les informations pourraient être récoltées au fur et à mesure, tout en imposant un mode de suivi standardisé (écart entre les suivis, bilans biologiques, ...).

# **CONCLUSION :**

La leishmaniose canine est une maladie vectorielle transmise principalement par les phlébotomes en Europe. Elle est causée par un protozoaire appelé *Leishmania infantum*, qui infeste l'hôte. La maladie est très répandue dans les régions endémiques, notamment le sud de l'Europe et particulièrement toute la zone méditerranéenne. Avec le réchauffement climatique, la zone endémique tend à s'étendre vers le nord, en raison de conditions plus favorables à la présence de l'insecte vecteur.

La diversité des manifestations cliniques rend parfois le diagnostic délicat. Les symptômes les plus fréquents sont d'ordre dermatologique (alopécie, squames psoriasiformes, ulcérations...), on note aussi une altération de l'état général (amaigrissement, cachexie...), et des symptômes secondaires à une immunité de l'hôte inefficace. En effet, le contrôle ou l'apparition des signes cliniques de la maladie dépend de la capacité de l'hôte à favoriser une réponse immunitaire cellulaire (type TH1) plutôt qu'humorale (type TH2). La voie humorale est responsable, par dépôts d'immuns complexes, d'atteintes organiques graves telles qu'une glomérulonéphrite, une polyarthrite ou une uvéite...

Le diagnostic repose sur la mise en évidence de signes clinico-biologiques compatibles, couplés à une sérologie mettant en évidence des anticorps anti-leishmania.

Le traitement, bien que coûteux, est relativement efficace. Cependant, il ne peut empêcher les rechutes cliniques chez certains animaux. Actuellement, la sérologie et l'électrophorèse des protéines sériques sont les principaux outils de suivi, mais ces marqueurs peuvent être d'évolution tardive.

Notre étude visait à identifier d'autres marqueurs associés aux rechutes cliniques. Nous avons analysé, à partir d'une collection rétrospective de sérums de chiens atteints de leishmaniose, plusieurs marqueurs et nous les avons confrontés aux anomalies cliniques et biologiques présentes au moment du prélèvement. Le rapport albumine/globulines et l'haptoglobine se sont révélés fortement corrélés à ces anomalies, avec des éléments qui suggèrent un intérêt supérieur par rapport à la protéine C réactive (CRP), une des protéines de la phase aiguë de l'inflammation les plus étudiées dans la littérature scientifique. Nos résultats ont souligné également l'importance de continuer à utiliser la sérologie quantitative, qui a montré une bonne corrélation avec l'état clinique et biologique des patients.

Nous avons également exploré le métabolisme de la vitamine B12 chez les chiens affectés. Nous n'avons pas pu confirmer les résultats d'une récente étude ayant mis en évidence une diminution de la cobalaminémie au diagnostic de la leishmaniose canine. Toutefois, une diminution de l'homocystéine, mesurée initialement comme marqueur de la concentration cellulaire en vitamine B12, était corrélée à la présence de signes cliniques dans notre cohorte, possiblement liée à l'implication de cet acide aminé dans la production d'antioxydant.

Ce travail pourrait se poursuivre en étudiant de manière prospective, les marqueurs identifiés comme les plus intéressants, afin de juger de la pertinence de préconiser leur mesure au cours du suivi des chiens atteints de leishmaniose.

# **Bibliographie :**

Abbehussen, M.M.C., Almeida, V.D.A., Solcà, M.D.S., Pereira, L.D.S., Costa, D.J., Gil-Santana, L., Bozza, P.T., Fraga, D.B.M., Veras, P.S.T., dos-Santos, W.L.C., Andrade, B.B., Brodskyn, C.I., 2017. Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Sci Rep* 7, 15914. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8>

Acierno, M.J., Brown, S., Coleman, A.E., Jepson, R.E., Papich, M., Stepien, R.L., Syme, H.M., 2018. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32, 1803–1822. <https://doi.org/10.1111/jvim.15331>

Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koytinas, A.F., Tontis, D., Plevraki, K., Kritsepi, M., 2007. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 53–57. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.53>

Almeida, B.F.M.D., Silva, K.L.O., Chiku, V.M., Leal, A.A.C., Venturin, G.L., Narciso, L.G., Fink, M.F.C.B., Eugênio, F.D.R., Santos, P.S.P.D., Ciarlini, P.C., Lima, V.M.F.D., 2017a. The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. *Immunobiology* 222, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.12.006>

Almeida, B.F.M.D., Silva, K.L.O., Venturin, G.L., Chiku, V.M., Leal, A.A.C., Bosco, A.M., Ciarlini, P.C., Lima, V.M.F.D., 2017b. Induction of haem oxygenase-1 increases infection of dog macrophages by *L. infantum*. *Parasite Immunology* 39, e12494. <https://doi.org/10.1111/pim.12494>

Baneth, G., Solano-Gallego, L., 2022. Leishmaniasis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 52, 1359–1375. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>

Beugnet, F., Miro, G., Halos, L., Guillot, J., 2021. Abrégé de parasitologie clinique du chien et du chat. Grupo asis. ISBN: 978-2-9550805-4-2

Bornet, J.-P., Bourdoiseau G., 2002 Parasitologie clinique du chien. Les Nouvelles Éditions du Point Vétérinaire -Créteil -Val-de-Marne. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 155, 357–358.

Bourdoiseau, G., Chermette, R., 2015. La leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : données actuelles sur une zoonose négligée. *Revue Francophone des Laboratoires, Animaux réservoirs de pathogènes pour l'homme* (2) 2015, 25–34. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)30314-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)30314-2)



Braga, E.T., Leite, J.H.A. de C., Rosa, F.A., Tivelli, P., Araújo, A.M., de Almeida, B.F.M., Ferrari, H.F., Ciarlini, P.C., Machado, G.F., Marcondes, M., 2015. Hypertension and its correlation with renal lesions in dogs with leishmaniosis. *Rev Bras Parasitol Vet* 24, 45–51. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015007>

Burnham, A.C., Ordeix, L., Alcover, M.M., Martínez-Orellana, P., Montserrat-Sangrà, S., Willen, L., Spitzova, T., Volf, P., Solano-Gallego, L., 2020. Exploring the relationship between susceptibility to canine leishmaniosis and anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in Ibizan hounds and dogs of other breeds in Mallorca, Spain. *Parasit Vectors* 13, 129. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3992-8>

Canonne, A.M., 2023. Leishmaniose : Conférence pour SCIL VET. Disponible à l'adresse : <https://www.scilvet.fr/formations/portail-des-replays-sva>

Cantos-Barreda, A., Escribano, D., Cerón, J.J., Bernal, L.J., Furlanello, T., Tecles, F., Pardo-Marín, L., Martínez-Subiela, S., 2018. Relationship between serum anti-*Leishmania* antibody levels and acute phase proteins in dogs with canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 260, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.08.010>

Chatzis, M.K., Kasabalis, D., Steiner, J.M., Saridomichelakis, M.N., Suchodolski, J.S., Xenoulis, P.G., 2021. Serum cobalamin concentrations in dogs with leishmaniosis before and during treatment. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 78, 101686. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101686>

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Ambrosio, R., Cortese, L., Persechino, A., Gradoni, L., Scalone, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 141, 539–543. <https://doi.org/10.1136/vr.141.21.539>

Costa, C.H.N., Chang, K.-P., Costa, D.L., Cunha, F.V.M., 2023. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Pathogens* 12, 969. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>

Crupi, R., Gugliandolo, E., Siracusa, R., Impellizzeri, D., Cordaro, M., Di Paola, R., Britti, D., Cuzzocrea, S., 2020. N-acetyl-L-cysteine reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in BALB/c mice. *BMC Veterinary Research* 16, 13. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2234-9>

Curtin, J.M., Aronson, N.E., 2021. Leishmaniasis in the United States: Emerging Issues in a Region of Low Endemicity. *Microorganisms* 9, 578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030578>

de Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., Michalick, M.S.M., 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.011>

De Sousa Gonçalves, R., Alves De Pinho, F., Dinis-Oliveira, R.J., Azevedo, R., Gaifem, J., Farias Lorangeira, D., Ramos-Sanchez, E.M., Goto, H., Silvestre, R., Barrouin-Melo, S.M., 2020. Mathematical Modelling Using Predictive Biomarkers for the Outcome of Canine Leishmaniasis upon Chemotherapy. *Microorganisms* 8, 745.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050745>

DPDx, C., 2024. Leishmaniasis. Disponible à l'adresse :

<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

ESCCAP FRANCE, 2024. La leishmaniose chez le chien - *Leishmania infantum* - Phlébotome - ESCCAP France. Disponible à l'adresse : <https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html#ancre1>

ESCCAP FRANCE, 2023. Les phlébotomes - Transmission de la leishmaniose du chien et de l'homme. Disponible à l'adresse : <https://www.esccap.fr/arthropodes/phlebotomes-leishmaniose.html>

Fanfano, S., 2024. Les cellules dendritiques et l'orientation de la réponse adaptative

Disponible à l'adresse : <https://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/reponse-immunitaire/comprendre/immunité-innée/cd-et-orientation-de-la-reponse-adaptative-version-bis>.

Filippi, C., Malherbe, L., Julia, V., Glaichenhaus, N., 2001. L'immunité contre les leishmanies. *Med Sci (Paris)* 17, 1120–1128.

<https://doi.org/10.1051/medsci/200117111120>

Gharbi, M., Jaouadi, K., Mezghani, D., Darghouth, M.A., 2018. Symptoms of Canine Leishmaniosis in Tunisian Dogs. *Bull Soc Pathol Exot* 111, 51–55.

<https://doi.org/10.3166/bspe-2018-0017>

GIRAUD, É., MILON, G., 2023. Décrypter et caractériser les processus biologiques dynamiques qui rendent compte de la pérennité des populations de *Leishmania*. *Med Trop Sante Int* 3, mtsi.v3i2.2023.384. <https://doi.org/10.48327/mtsi.v3i2.2023.384>

Gonçalves, A.A.M., Leite, J.C., Resende, L.A., Mariano, R.M. da S., Silveira, P., Melo-Júnior, O.A. de O., Ribeiro, H.S., de Oliveira, D.S., Soares, D.F., Santos, T.A.P., Marques, A.F., Galdino, A.S., Martins-Filho, O.A., Dutra, W.O., da Silveira-Lemos, D., Giunchetti, R.C., 2019. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 427.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>

Groupe LEISHVET, 2024. Fact Sheet. CANINE LEISHMANIOSIS LeishVet. Disponible à l'adresse : <https://www.leishvet.org/fact-sheet/>

IRIS, 2023. Guidelines CKD IRIS Society International renal interest society. Disponible à l'adresse : <http://www.iris-kidney.com/education/guidelines/index.html>

IRIS, Brown, S., Elliott, J., Francey, T., Polzin, D., Vaden, S., 2013. Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, S27–S43. <https://doi.org/10.1111/jvim.12230>

Kather, S., Grützner, N., Kook, P.H., Dengler, F., Heilmann, R.M., 2020. Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs. *Veterinary Internal Medicine* 34, 13–28. <https://doi.org/10.1111/jvim.15638>

Kharbanda, K.K., 2013. Methionine metabolic pathway in alcoholic liver injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 89–95. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835a892a>

Koury, M.J., Ponka, P., 2004. NEW INSIGHTS INTO ERYTHROPOIESIS: The Roles of Folate, Vitamin B12, and Iron\*1. *Annual Review of Nutrition* 24, 105–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306>

Koutinas, A., Polizopoulou, Z., Saridomichelakis, M., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K., 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 35, 376–383. <https://doi.org/10.5326/15473317-35-5-376>

Lamoureux, A., Guyonnet, A., Benchrekroun, G., Guillot, J., Maurey, C., 2016. Traitement et prévention de la leishmaniose canine. *Le Point Vétérinaire*. 1 avril 2016. n° 364, pp 28-32.

López, M.C., Bertolani, C., Sainz, A., Tabar, M.D., Roura, X., 2022. Chronic diarrhea secondary to canine leishmaniosis: Case series. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 90–91, 101897. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101897>

Magalhães, K.A., Pussi, K.F., Araújo, H.K. de, Carmo, S.B. do, Friozi, E., Branquinho, L.S., Lima Junior, M.S. da C., Neitzke-Abreu, H.C., 2021. Polymerase chain reaction using conjunctival swab samples for detecting *Leishmania* DNA in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet* 30, e009121. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021061>

Maia, C., Campino, L., 2018. Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 302. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>

Martínez-Subiela, S., Bernal, L.J., Cerón, J.J., 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 64, 1021–1026. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1021>

- Martinez-Subiela, S., Cerón, J.J., Strauss-Ayali, D., Garcia-Martinez, J.D., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M., Baneth, G., 2014. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 37, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.10.004>
- Martinez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J., Baneth, G., 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 180, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.032>
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D., Cerón, J.J., 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150, 241–244. <https://doi.org/10.1136/vr.150.8.241>
- Meazzi, S., Lauzi, S., Martini, V., Ferriani, R., Peri, M., Zanzani, S.A., Giordano, A., 2022. Gut Microbiota and Lymphocyte Subsets in Canine Leishmaniasis. *Front Vet Sci* 9, 868967. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.868967>
- Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J., Solano-Gallego, L., 2018. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum* : Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science* 117, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.10.011>
- Mhadhbi, M., Sassi, A., 2020. Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. *Equine Vet J* 52, 28–33. <https://doi.org/10.1111/evj.13178>
- Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., Corpas-Lopez, V., 2022. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet Sci* 9, 387. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>
- Moreau, E., 2024. Coopération cellulaire et cytokines. UE 041, Nantes : ONIRIS, 25p.
- Moreira, M. a. B., Luvizotto, M.C.R., Garcia, J.F., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>
- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P., Giger, U., 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 219, 1076–1083. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.1076>
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E., 2016. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol* 45, 552–578. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>

Pardo-Marin, L., Ceron, J.J., Tecles, F., Baneth, G., Martínez-Subiela, S., 2020.

Comparison of acute phase proteins in different clinical classification systems for canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 219, 109958.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109958>

Patterson, B.E., Barr, J.W., Fosgate, G.T., Berghoff, N., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., Black, D.M., 2013. Homocysteine in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J. Small Anim. Pract.* 54, 620–624.

<https://doi.org/10.1111/jsap.12144>

Pennisi, M.G., Persichetti, M.F., 2018. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet Parasitol* 251, 131–137.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>

Pinto, A.J.W., Figueiredo, M.M., Silva, F.L., Martins, T., Michalick, M.S.M., Tafuri, Washington L., Tafuri, Wagner L., 2011. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand* 53, 67.

<https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-67>

Quigley, E.M.M., Murray, J.A., Pimentel, M., 2020. AGA Clinical Practice Update on Small Intestinal Bacterial Overgrowth: Expert Review. *Gastroenterology* 159, 1526–1532.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.090>

Reiner, S.L., Locksley, R.M., 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13, 151–177. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001055>

Reverte, M., Snäkä, T., Fasel, N., 2022. The Dangerous Liaisons in the Oxidative Stress Response to *Leishmania* Infection. *Pathogens* 11, 409.

<https://doi.org/10.3390/pathogens11040409>

Ribeiro, V.M., Júnior, D.M.G., Ottino, J., Valle, G.R., de Miranda Estevam, L.G.T., de Carvalho, O.V., Paz, G.F., 2022. Report of the presence of *Leishmania infantum* in the milk of a naturally infected female dog in Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 36, 100795.

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100795>

Roura, X., Cortadellas, O., Day, M.J., Benali, S.L., Canine Leishmaniosis Working Group, Zatelli, A., 2021. Canine leishmaniosis and kidney disease: Q&A for an overall management in clinical practice. *J of Small Animal Practice* 62.

<https://doi.org/10.1111/jsap.13237>

Sarquis, J., Raposo, L.M., Sanz, C.R., Montoya, A., Barrera, J.P., Checa, R., Perez-Montero, B., Rodríguez, M.L.F., Miró, G., 2024. Relapses in canine leishmaniosis: risk factors identified through mixed-effects logistic regression. *Parasites & Vectors* 17, 357.

<https://doi.org/10.1186/s13071-024-06423-1>

Sasanelli, M., Paradies, P., de Caprariis, D., Greco, B., De Palo, P., Palmisano, D., Carelli, G., 2007. Acute-Phase Proteins in Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum* During and After Long-term Therapy with Allopurinol. *Vet Res Commun* 31, 335–338. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0060-1>

Segarra, S., Miró, G., Montoya, A., Pardo-Marín, L., Teichenné, J., Ferrer, L., Cerón, J.J., 2018. Prevention of disease progression in *Leishmania infantum*-infected dogs with dietary nucleotides and active hexose correlated compound. *Parasites & Vectors* 11, 103. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2705-z>

Shaik, J.S., Dobson, D.E., Sacks, D.L., Beverley, S.M., 2021. *Leishmania* Sexual Reproductive Strategies as Resolved through Computational Methods Designed for Aneuploid Genomes. *Genes (Basel)* 12, 167. <https://doi.org/10.3390/genes12020167>

Silvestrini, P., Batchelor, D., Allenspach, K., Maunder, C., Seth, M., Mas, A., Hill, T., Serrano, G., Roura, X., Planellas, M., German, A.J., Pastor, J., 2016. Clinical leishmaniasis in dogs living in the UK. *J of Small Animal Practice* 57, 453–458. <https://doi.org/10.1111/jsap.12503>

Silvestrini, P., Zoia, A., Planellas, M., Roura, X., Pastor, J., Cerón, J.J., Caldin, M., 2014. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 55, 95–101. <https://doi.org/10.1111/jsap.12172>

Slappendel, R.J., 1988. Prize-winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands <sup>1</sup>. *Veterinary Quarterly* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1080/01652176.1988.9694140>

Soetart, N., 2020. Electrophorèse : Indications et usages. *Le Point Vétérinaire*. Octobre 2020. n°410, pp 16-20. Disponible à l'adresse : <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article/n-410/etape-6-electrophorese-indications-et-usages.html>

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 165, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>

Souza, C.C., Barreto, T. de O., da Silva, S.M., Pinto, A.W.J., Figueiredo, M.M., Ferreira Rocha, O.G., Cangussú, S.D., Tafuri, W.L., 2014. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 95, 260–270. <https://doi.org/10.1111/iep.12080>



Stanley, E., Appleman, E., Schlag, A., Siegel, A., 2019. Relationship between cobalamin and folate deficiencies and anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 33, 106–113.

<https://doi.org/10.1111/jvim.15348>

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 189, 1729–1733. <https://doi.org/10.1086/383281>

Tazerji, S.S., Nardini, R., Safdar, M., Shehata, A.A., Duarte, P.M., 2022. An Overview of Anthropogenic Actions as Drivers for Emerging and Re-Emerging Zoonotic Diseases. *Pathogens* 11, 1376. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111376>

Titus, R.G., Gueiros-Filho, F.J., De Freitas, L.A., Beverley, S.M., 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10267–10271. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10267>

Toepp, A.J., Petersen, C.A., 2020. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Res Vet Sci* 130, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>

Toepp, A.J., Schaut, R.G., Scott, B.D., Mathur, D., Berens, A.J., Petersen, C.A., 2017. *Leishmania* incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 10, 75–81.

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.011>

Ulloque-Badaracco, J.R., Hernandez-Bustamante, E.A., Alarcon-Braga, E.A., Al-kassab-Córdova, A., Cabrera-Guzmán, J.C., Herrera-Añazco, P., Benites-Zapata, V.A., 2023. Vitamin B12, folate, and homocysteine in metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14, 1221259.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1221259>

Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L., 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46, 845–852.

Vida, B., Toepp, A., Schaut, R.G., Esch, K.J., Juelsgaard, R., Shimak, R.M., Petersen, C.A., 2016. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 169, 34–38.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.008>

Williams, R.A.M., Westrop, G.D., Coombs, G.H., 2009. Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochemical Journal* 420, 451–462.

<https://doi.org/10.1042/BJ20082441>

**Baptiste François-Xavier DUBREUIL**

**RECHERCHE DE MARQUEURS BIOLOGIQUES D'INTERET AU COURS DU SUIVI DE LA  
LEISHMANIOSE CANINE : ETUDE D'UNE COHORTE DE 33 CHIENS**

**SEARCH FOR BIOLOGICAL MARKERS OF INTEREST DURING THE FOLLOW-UP OF CANINE  
LEISHMANIASIS : STUDY OF A COHORT OF 33 DOGS.**

**Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 25 octobre 2024**

**RESUME**

La leishmaniose canine est une maladie parasitaire transmise par des insectes vecteurs, dont la zone endémique s'étend progressivement au nord du bassin méditerranéen en raison notamment du changement climatique. Cette maladie chronique présente une grande diversité d'expressions cliniques, allant de la phase asymptomatique jusqu'au décès des animaux malades par défaillance organique (insuffisance rénale notamment). La réponse thérapeutique initiale est généralement favorable, néanmoins, un grand nombre de chien malade subissent des rechutes, obligeant un suivi clinico-biologique attentif.

L'objectif de ce travail était d'identifier des marqueurs sanguins associés aux anomalies clinico-biologiques observées au cours de la leishmaniose canine. Pour cela, nous avons eu accès aux prélèvements sanguins de 33 chiens atteints de leishmaniose, récoltés à plusieurs moments du suivi de leur maladie. Les résultats montrent une association significative entre l'haptoglobulinémie, le rapport albumine/globulines, et le titre sérologique, et la présence de signes cliniques.

Dans cette cohorte, l'étude de la concentration en protéine C réactive a révélé une association moindre avec les différentes variables clinico-biologiques d'intérêt, que ce que les données de la littérature rapportent. En revanche, l'homocystéinémie, variable biologique encore peu étudiée pour la maladie, pourrait être un marqueur pertinent. Sa diminution lors de la phase clinique de la maladie pourrait être associée à un stress oxydant favorisant ou aggravant les signes cliniques et les insuffisances organiques. Le contrôle de ce stress pourrait offrir une piste thérapeutique à investiguer.

L'exploration de la dynamique de ces marqueurs lors d'un suivi prospectif permettrait de confirmer leur utilité potentielle dans le suivi de la maladie, notamment pour la mise en évidence précoce des rechutes. Cela constitue les principales perspectives de ce travail.

**MOTS CLES :**

- LEISHMANIOSE CANINE
- BIOMARQUEUR
- SEROLOGIE
- STRESS OXYDATIF
- RECIDIVE
- BIOCHIMIE CLINIQUE
- PROTEINE DE LA PHASE AIGUE

**DATE DE SOUTENANCE : 25 octobre 2024**