

## **La recherche de nouveaux outils de diagnostic pour la leishmaniose canine, un enjeu « One Health »**

**Auteur :** Annequin, Lucile

**Promoteur(s) :** Desmecht, Daniel

**Faculté :** Faculté de Médecine Vétérinaire

**Diplôme :** Master en médecine vétérinaire

**Année académique :** 2019-2020

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/9519>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**LA RECHERCHE DE NOUVEAUX OUTILS DE  
DIAGNOSTIC POUR LA LEISHMANIOSE CANINE,  
UN ENJEU « ONE HEALTH ».**

*THE RESEARCH FOR NEW DIAGNOSTIC TOOLS FOR  
CANINE LEISHMANIASIS, A “ONE HEALTH” ISSUE.*

**Lucile ANNEQUIN**

**Travail de fin d'études**  
présenté en vue de l'obtention du grade  
de Médecin Vétérinaire

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2019 / 2020**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

**LA RECHERCHE DE NOUVEAUX OUTILS DE  
DIAGNOSTIC POUR LA LEISHMANIOSE CANINE,  
UN ENJEU « ONE HEALTH ».**

*THE RESEARCH FOR NEW DIAGNOSTIC TOOLS FOR  
CANINE LEISHMANIASIS, A “ONE HEALTH” ISSUE.*

**Lucile ANNEQUIN**

Tuteur : Professeur D.Desmecht

**Travail de fin d'études**  
présenté en vue de l'obtention du grade  
de Médecin Vétérinaire

**ANNÉE ACADÉMIQUE 2019 / 2020**

**Le contenu de ce travail n'engage que son auteur**

# **LA RECHERCHE DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC POUR LA LEISHMANIOSE CANINE, UN ENJEU « ONE HEALTH ».**

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL :**

Ce travail consiste en un rassemblement des informations actuelles sur la Leishmaniose canine. Une recherche bibliographique scientifique a permis d'analyser les récentes études sur des nouveaux outils de diagnostic potentiels en médecine vétérinaire ; dont certains seraient applicables chez l'homme.

## **RESUME :**

La Leishmaniose est une maladie protozoaire contagieuse dont les canidés sont les principaux réservoirs. Cette affection est zoonotique et peut être mortelle. En humaine, elle toucherait plus de 98 pays et chaque année environ 1 million de nouveaux cas sont recensés. Le diagnostic de cette maladie est très complexe. En effet, les manifestations cliniques sont très variables. La prévalence des animaux asymptomatiques est plus élevée que celle des animaux symptomatiques. Les tests sont classés en 3 catégories : parasitologiques, sérologiques et moléculaires. Ils possèdent tous une haute spécificité, néanmoins les méthodes parasitologiques et sérologiques présentent une sensibilité variable et plus faible que les moléculaires. Cette dernière dépend d'un matériel coûteux, manipulé par des professionnels avec un temps d'attente pour les résultats plus long. L'enjeu actuel est d'améliorer leur sensibilité pour une détection précoce de cette maladie. Ainsi, une prise en charge rapide, efficace pourra être mise en place afin de contrôler au mieux le développement de la maladie et d'en limiter la transmission. Depuis 2019, de nombreuses recherches ont été effectuées dans cet objectif. Des études ont testé d'autres antigènes pour ELISA tels que : les lipophosphoglycans, la protéine kinase pyridoxale, la protéine recombinée du facteur d'élongation 1 $\beta$ . Les deux derniers ont expérimenté l'applicabilité chez l'homme pour le diagnostic et le suivi post-thérapeutique. De même, la chimioluminescence associée à ELISA sur des protéines multi-épitopes augmenterait sa sensibilité analytique. Ces nouveaux outils pourraient améliorer significativement la détection d'animaux asymptomatiques et sans réactions croisées observées. Une étude a été faite sur la possible utilisation du microARN122 en PCR comme biomarqueur de dysfonctionnement hépatique lors d'une infection à *Leishmania* chez le chien. Ces nouvelles recherches prometteuses méritent, pour certaines, d'être approfondies afin d'envisager une utilisation concrète de ces tests de diagnostic pour la Leishmaniose canine.

# **LA RECHERCHE DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC POUR LA LEISHMANIOSE CANINE, UN ENJEU « ONE HEALTH ».**

## **AIM OF THE WORK :**

This work consists in collecting current information on the canine Leishmaniasis. Scientific bibliographic research has enabled analysing recent studies on potential new diagnostic tools in veterinary medicine ; some of which may be applicable to humans.

## **SUMMARY :**

Leishmaniasis is a contagious protozoan disease of which canids are the main reservoirs. This illness is zoonotic and can be fatal. In human medicine, it affects more than 98 countries and each year approximately 1 million new cases are identified. The diagnosis of this disease is very complex. Indeed, clinical signs are very variable. The prevalence of asymptomatic animals is higher than symptomatic animals. The tests are classified into 3 categories: parasitological, serological and molecular. They all have a high specificity, nevertheless the parasitological and serological methods have a variable and lower sensitivity than the molecular ones. The latter depends on expensive equipment, handled by professionals with a longer waiting time for results. The current challenge is to improve their sensitivity for early detection of this disease. Thus, rapid and effective management can be set up in order to best monitor the development of the disease and limit its transmission. Since 2019, a lot of research has been conducted for this purpose. Studies have tested other antigens for ELISA such as: lipophosphoglycans, pyridoxal protein kinase, recombinant elongation factor 1B protein. The last two have tested the applicability in humans for diagnosis and post-therapeutic follow-up. Similarly, the chemiluminescent associated with ELISA on multi-epitope proteins would increase its analytical sensitivity. These new tools could significantly improve the detection of asymptomatic animals without observed cross-reactions. A study has been made on the possible use of microRNA122 in PCR as a biomarker of hepatic dysfunction during Leishmania infection in dogs. Some of this encouraging new research deserves to be developed in order to consider a concrete use of these diagnostic tests for canine Leishmaniasis.

# REMERCIEMENTS

*Au Dr D.Desmecht, mon promoteur, pour son écoute, sa disponibilité et ses encouragements dans la concrétisation de mon projet.*

*A ma maman, sans qui je n'aurais pas pu être là où j'en suis. Tu as toujours tout sacrifié pour que je ne manque de rien et que je réalise mes rêves ... Je ne te remercierais jamais assez.*

*A mes grand-parents maternels, j'espère que vous serez fiers de moi de là-haut.*

*A mon oncle et parrain parti trop tôt, ce diplôme sera pour toi. Je t'avais promis de me battre pour y arriver.*

*A mes parrains et marraines de baptême, qui m'ont appris tant de valeurs et qui m'ont permis de découvrir la grande famille de Cureghem. A vous, qui m'avez soutenu et cru en moi pendant tout mon parcours étudiant.*

*A mes fillots et fillotes, qui j'espèrent, continueront de se battre pour terminer leurs études afin d'exercer un des plus beaux métiers du monde.*

*A Antoine, mon meilleur ami, mon amour durant toutes ses longues années d'études. J'ai toujours admiré ta volonté à toute épreuve et ton soutien infaillible. Merci, car c'est aussi grâce à toi que j'ai su me relever de chaque chute...*

*A mon maître de stage Dr Marc Leclerc ainsi que toute son équipe pour m'avoir accueilli avec toute leur bienveillance et m'avoir tant enseigné.*

*A mes groupes cliniques, groupe 19 et groupe 9, pour les deux plus belles années de mes études.*

*Au Koterpillar 2019, pour ces trois semaines de pure folie et à mes amis de la salle P/amphiD pour tous ces blocus passés à se soutenir.*

*Au Comité Photo et particulièrement Manon, Tessa et Camille, avec qui j'ai partagé 4 années de ma vie étudiante.*

*A Lola, ma chatte, qui m'a soutenu et est restée à mes côtés pendant toutes ces longues heures d'apprentissage.*

# TABLE DES MATIERES

1.	Introduction.....	7
2.	Description de la maladie.....	8
2.1	Étiologie.....	8
2.2	Epidémiologie.....	9
2.3	Physio-pathogénie et réponse immunitaire de l'hôte .....	11
2.3.1.	Interactions parasite-vecteur .....	11
2.3.2.	Interactions vecteur-hôte.....	11
2.3.3.	Interactions parasite-hôte.....	11
2.3.4.	Réponse immunitaire .....	12
2.4	Tableau clinique .....	13
3.	Méthodes de diagnostic actuelles.....	15
3.1	Diagnostic clinique et différentiel .....	15
3.2	Diagnostic de laboratoire .....	15
3.2.1.	Méthodes indirectes.....	17
3.2.2.	Méthodes directes.....	19
4.	Les avancés scientifiques en matière de diagnostic.....	24
4.1	ELISA .....	24
4.1.1.	Lipophosphoglycans .....	24
4.1.2.	Chimioluminescent avec proteine à multi-épitopes .....	24
4.1.3.	Protéine kinase pyridoxale .....	24
4.1.4.	Proteine recombinante du facteur d'élongation 1 Béta .....	24
4.2	PCR et miARN 122 .....	24
5.	Conclusion .....	24
6.	Annexes .....	24
7.	Bibliographie.....	29

## 1. Introduction

La Leishmaniose canine est une maladie zoonotique protozoaire vectorielle contagieuse. Historiquement, en 1903 deux médecins ont découvert, presque simultanément en Inde, le parasite *Leishmania* chez l'homme : le Dr William Boog Leishman et Dr Charles Donovan. Le parasite fut nommé en leur honneur *Leishmania donovani*. En 1908, le Dr Charles Nicolle décrit pour la première fois le parasite de la leishmaniose canine, *Leishmania infantum*, et prouve le rôle de réservoir du chien. Peu de temps après, en 1914, le Pr Pringault effectue le premier diagnostic sur un chien à Marseille, en collaboration avec le Dr Charles Nicolle (Brifford, 2011). Enfin, vers 1921, les travaux des frères Sargent sur l'homme met en évidence le rôle vecteur des phlébotomes.

Depuis, la Leishmaniose chez l'Homme est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une priorité (World Health Organization, 2020). Un diagnostic et un traitement précoces sont importants mais l'influence sur sa transmission reste limitée si le rôle de réservoir du chien et le vecteur ne sont pas contrôlés (Palatnik-De-Sousa and Day, 2011). La présence d'animaux asymptomatiques sous-estime la prévalence de l'infection et reste la cause d'un déficit de sensibilité dans certaines de nos techniques de diagnostic. La présentation clinique de cette maladie est considérée comme étant la « partie visible de l'iceberg » dans les zones endémiques.

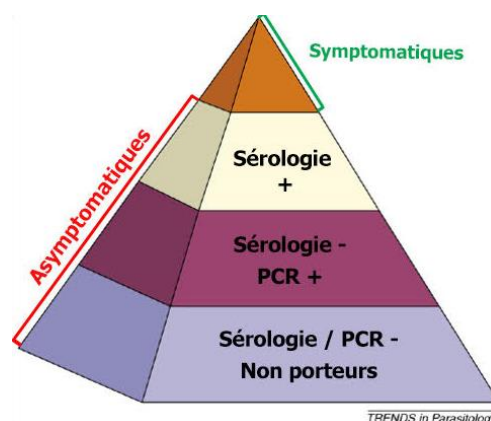


Figure 1 : Pyramide représentant les différentes populations lors du diagnostic de Leishmaniose canine. Adaptée de Baneth et collaborateurs (2008).

Dans ce contexte de zoonose, le vétérinaire reste un acteur essentiel pour le maintien de la santé publique. Il devient nécessaire d'avoir les outils suffisants pour conseiller et expliquer, au mieux, auprès des propriétaires l'importance de la prophylaxie et du dépistage précoce. Mon travail a pour but de réunir les informations actuelles sur la Leishmaniose canine. En premier



lieu, les méthodes de diagnostic courantes ont été étudiées avec leurs avantages et inconvénients. Dans un second temps, les récentes recherches sur de nouveaux outils pouvant apporter une amélioration ont été analysées. Celles-ci permettraient une perspective dans les avancées scientifiques pour le diagnostic et la gestion de cette zoonose.

## 2. Description de la maladie

### 2.1 Étiologie

L'agent responsable de la Leishmaniose canine est un protozoaire : *Leishmania infantum*. Du point de vue de sa taxonomie, il appartient à la classe des flagellés, de l'ordre des Kinétoplastidés puisqu'il possède un réseau d'ADN circulaire appelé kinétoplaste et un flagelle. Ce parasite possède deux formes : la forme promastigote (Annexe 1) et amastigote (Annexe 2) qui est intracellulaire (Taylor, 2016). Il se rattache à la famille des Trypanosomatidés au genre *Leishmania* et du complexe de *Leishmania donovani*.

Le cycle biologique de *Leishmania infantum* est dit dixène (Figure 2). Il nécessite deux hôtes : un vecteur pour hôte intermédiaire contenant la forme promastigote, et un mammifère comme hôte définitif véhiculant la forme amastigote. Le vecteur est un insecte diptère nématocère de l'ordre Diptera, de la super-famille des Psychodoidea, de la famille des Psychodidés et de la sous-famille des Phlebotominae. Il en existe 2 genres *Phlebotomus* dans le Nouveau Monde et *Lutzomyia* dans l'Ancien Monde (Taylor, 2016). Il existe environ 90 espèces pouvant transmettre le genre *Leishmania* (World Health Organization, 2020). En Europe, environ 27 espèces différentes sont vectrices de *Leishmania infantum*. Les plus répandues en Europe sont *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (European Food Safety Authority, 2020).

Dans le vecteur, il existe deux lignées de promastigotes : les pro-cycliques et les métacycliques seuls infectieux. En effet, les pro-cycliques sont des nectomades, mobiles au niveau de l'intestin médian qui migrent vers l'avant du système digestif pour se transformer en haptomonades, formes fixes. Le rôle de ces dernières est de faciliter les régurgitations des formes infectieuses (Nadau, 2005).

La transmission se fait lors d'un repas sanguin par une femelle, seule hématophage. Ce type de repas est nommé de la telmophagie, c'est-à-dire que le vecteur se nourrit à partir d'un lac hémolympatique facilitant l'invasion du système phagocytaire mononucléé (SPM). Il faudrait environ 15 jours entre le premier repas sanguin et la première pique infectieuse. Le

vecteur restera infectieux toute sa vie. (Nadau, 2005) Accessoirement, il existe d'autres moyens de transmission tels que : la transfusion (Owens et al., 2001), la voie vénérienne et transplacentaire (Kasbari et al., 2013).

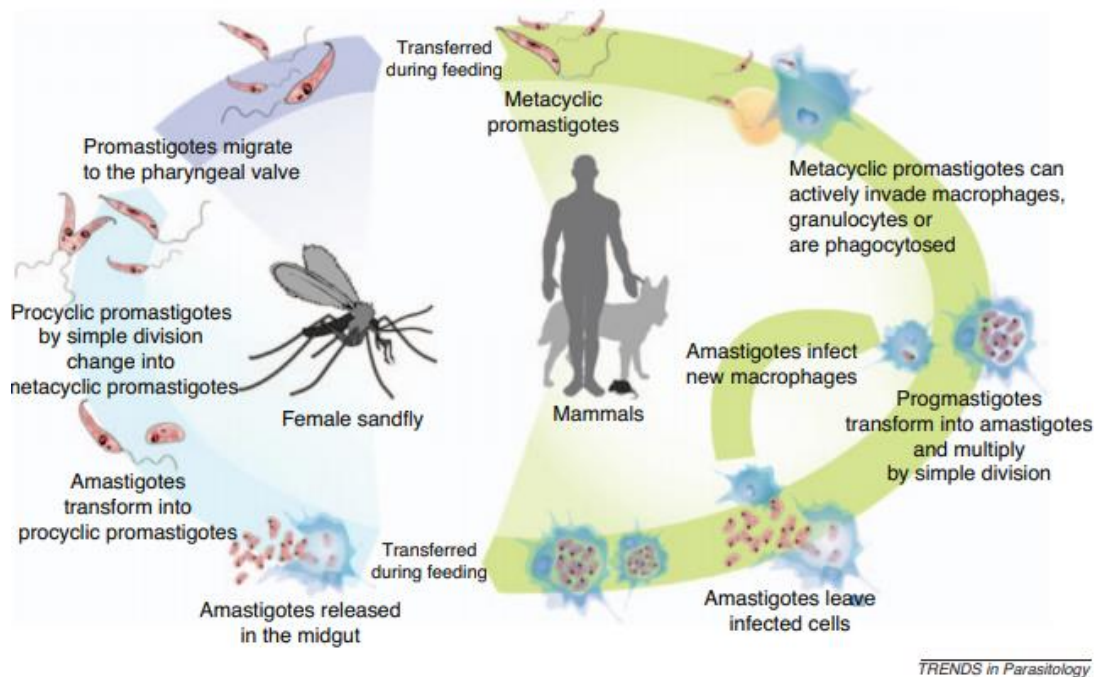


Figure 2 : Cycle biologique de *Leishmania* spp. (Harhay et al., 2011)

## 2.2 Epidémiologie

*Leishmania infantum* est la seule espèce présente à la fois dans le Nouveau monde et l'Ancien monde. Dans ce dernier, on la retrouve principalement dans le bassin méditerranéen jusqu'au Moyen-orient, le Nord de l'Afrique et le Sud-Ouest de l'Asie. Elle est l'espèce principale en Europe. Pour le Nouveau Monde, elle s'observe au niveau de l'Amérique Centrale et l'Amérique du Sud (Pennisi, 2015)(Taylor, 2016). Au niveau mondiale, elle toucherait annuellement jusqu'à 1 million de personnes avec 300 000 décès et 1 billion vivent dans des zones endémiques. Cette maladie touche particulièrement les enfants et les adultes immunodéprimés (World Health Organization, 2020). En Europe, on estime à 300-400 nouveaux cas par an (Bourdoiseau, 2019). La répartition des différents statuts endémiques mondiaux est illustrée dans l'annexe 3.

Le mode de transmission étant vectoriel, l'épidémiologie de la Leishmaniose dépend en grande partie des phlébotomes. Les deux espèces *P. ariasi* et *P. perniciosus* ont une préférence trophique pour le chien. *P. ariasi* est principalement exophile et se retrouve dans un habitat boisé à une altitude entre 200 et 600 mètres. Cependant, il peut devenir endophile si la température

extérieure diminue. Ce vecteur est cyno-anthropophile au contraire de *P. perniciosus* qui est plutôt zoophile. Le pic saisonnier d'activité se trouve en fin d'été et début d'automne. Leur répartition géographique est illustrée en annexes 4 et 5. (Bourdoiseau, 2019)

Concernant les chiens, plusieurs facteurs prédisposant au développement de cette maladie ont été démontrés : la race, l'âge et certains gènes. Certaines races seraient plus sensibles comme : le berger allemand, le boxer, le cocker spaniel et le rottweiler. Au contraire, le Ibiza Hound montrerait moins de signes cliniques. Pour l'âge, la distribution est qualifiée de bimodale avec une prévalence plus importante pour les chiens de moins de 3 ans et de plus de 8 ans. (Solano-Gallego et al., 2011). En France, une enquête épidémiologique a démontré une prévalence de 40 000 cas par an en 2011. Ces chiffres sont similaires à ceux répertoriés en 2004 mais la zone d'enzootie augmente comptant 29 départements (contre 26 en 2004) (Bourdeau, 2018).

Il est important de ne pas oublier que les nouveaux changements climatiques peuvent influencer les vecteurs pour : leur biotope, leur taux de survie et la taille de leur population (World Health Organization, 2020). De même, les déplacements d'animaux et de personnes, l'augmentation d'espèces pour les réservoirs sauvages et les animaux domestiques errants, ne bénéficiant pas de contrôle sanitaire adéquat peuvent accroître significativement la prévalence de l'infection (Pennisi, 2015). Par le biais des mouvements de populations animal et humaine, une expansion de la zone d'enzootie en Europe peut être envisageable (Figure 3).

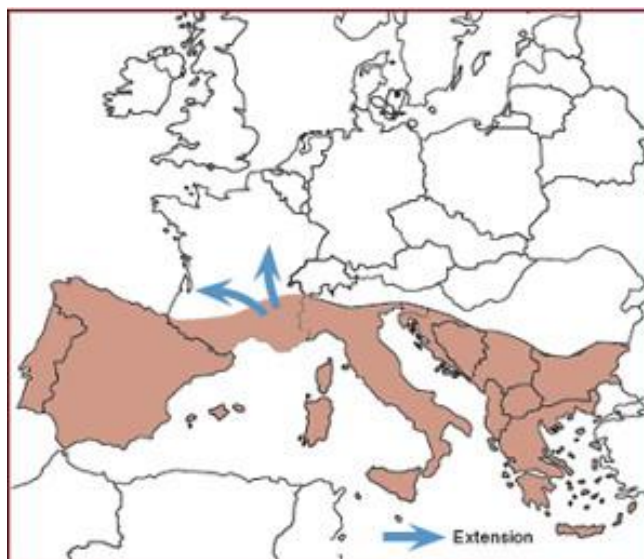


Figure 3 : Carte représentant la zone d'enzootie approximative de la leishmaniose canine en Europe. (Bourdoiseau, 2019)

Des moyens de lutte contre les vecteurs avec des mesures de prévention pour nos animaux (des colliers/ pipettes répulsifs associés à une vaccination) ainsi qu'un dépistage de tous les chiens infectés sont importants pour limiter cette expansion. Une nouvelle enquête serait intéressante pour étudier la prévalence ainsi que la dynamique de l'infection depuis la mise sur le marché d'un vaccin.

## 2.3 Physio-pathogénie et réponse immunitaire de l'hôte

La leishmaniose est une maladie avec une physio-pathogénie particulièrement intéressante et bien adaptée. En effet, elle possède des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte basés sur des enzymes qui s'opposent à l'action des radicaux oxygénés et induisent une réponse T-Helper 2. La compréhension de ces réactions immunopathologiques est essentiel pour la détermination des cibles nécessaires à la recherche de nos nouveaux outils de diagnostic.

### 2.3.1. Interactions parasite-vecteur

Lors du repas sanguin, le parasite doit survivre dans le tube digestif du vecteur. Pour cela, il dispose de plusieurs moyens pour le contrer. Les liposphosphoglycans (LPG) à la surface du parasite servent d'ancrage aux cellules épithéliales de l'intestin et joueraient un rôle dans la diminution des enzymes digestives (Sacks and Kamhawi, 2001). De plus, une enzyme chitinase permet de neutraliser la membrane péritrophique. Cette dernière est un tube chitinisé sécrété en permanence par le proventricule du vecteur permettant de contenir le sang durant sa digestion (Schlein, 1993).

### 2.3.2. Interactions vecteur-hôte

Un pouvoir immunomodulateur a été démontré sur les homogénats de glandes salivaires des vecteurs infectés ou non. En conséquence, on peut observer une augmentation de la sécrétion d'IL-4, une cytokine permettant la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes TH2. De plus, une inhibition de certaines fonctions essentielles du macrophage telles que : la présentation de l'antigène, la production de monoxyde d'azote (NO) et la prolifération de lymphocytes T spécifiques à *Leishmania* (Hall and Titus, 1995).

### 2.3.3. Interactions parasite-hôte

Dans l'hôte, le parasite est intracellulaire au niveau des cellules du SPM. Il doit pour cela se soustraire notamment au système du complément. Pour y arriver, il dispose de deux antigènes majeurs : le gp63, une métallo-protéase présente dans les deux stades du parasite et le LPG. Ils permettent d'inactiver le fragment C3b du système du complément en le

transformant en C3bi tout en permettant l'opsonisation et la phagocytose. Tous deux se lient aux C3b et C3bi qui respectivement vont sur les récepteurs CR1 et CR3. Ces liaisons permettent l'adhésion des promastigotes aux cellules du SPM et évitent le choc oxydatif lors de la phagocytose (Annexe 6).(Nadau, 2005)

La survie intracellulaire dépend de la transformation de promastigote en amastigote puisque ce dernier est plus résistant aux radicaux oxygénés et engendre une réaction oxydative plus faible. En effet, les leishmanies inactivent la protéine kinase C (PKC) afin d'inhiber la formation de radicaux oxygénés via le LPG et gp63. De plus, Le LPG via l'inactivation de PKC favoriserait la séquestration de  $Ca^{2+}$  ce qui bloquerait les voies de signalisation cellulaire calcium dépendantes. Le changement de stade favorisé par le LPG permet aussi l'inhibition transitoire de la fusion du phagosome avec l'endosome qui servirait à empêcher la présentation de leurs antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité II donc leur reconnaissance par les lymphocytes T helper CD4+. (Nadau, 2005)

#### 2.3.4. Réponse immunitaire

La réaction immunitaire de l'hôte joue un rôle essentiel dans la forme de la maladie et son développement. Le type de réponse chez l'animal infecté repose sur une dualité TH1/TH2 via l'intervention de lymphocytes T helper CD4+. Les animaux résistants dits asymptomatiques possèderaient une réponse à médiation immune de type TH1. A contrario, les chiens sensibles, donc cliniques, développeraient une réponse immunitaire humorale de type TH2. Pour les animaux asymptomatiques, certaines cytokines stimuleraient cette réponse immunitaire à médiation immune protectrice telles que :

- L'Interferon gamma ( $IFN\gamma$ ) : Stimule les macrophages et la différenciation vers une réponse de type TH1.
- Le Tumor Factor Necrosis alpha ( $TNF\alpha$ ) : active la production de parasitocides tels que les dérivés oxygénés et le monoxyde d'azote.
- L'Interleukine 12 (IL-12) : stimule la réponse de type TH1 et la production de  $IFN\gamma$ .
- L'IL-2 : Stimule la réaction immunitaire de type TH1.

Les chiens dits cliniques produisent de nombreuses cytokines expliquant la sensibilité à la maladie et la mise en place de certains symptômes :

- L'IL-4 : elle induirait une inhibition de l'activation des macrophages et de l' $IFN\gamma$ , une prolifération polyclonale de LB ainsi qu'une diminution de la production d'IL-

12. Cette dernière entraîne une hypergammabulbinémie avec la formation de complexes immuns et la production d'auto-anticorps. Contrairement aux animaux asymptomatiques possédant un faible taux d'anticorps qui sont spécifiques, la production d'immunoglobulines augmente fortement avec la synthèse d'anticorps non spécifiques (IgG) formant les complexes immuns. Ils se déposent dans les reins, articulations, vaisseaux sanguins et yeux, menant à des signes d'inflammation et provoquant une réaction d'hypersensibilité de type III. Les auto-anticorps engendrent des lésions évoquant des maladies auto-immunes telles que le pemphigus ou le lupus érythémateux disséminé.

- L'IL-10 : inhibe la synthèse de  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-12,  $\text{INF}\gamma$  et l'activation des macrophages.
- Le Transforming Growth Factor beta ( $\text{TGF}\beta$ ) : produits par les LB, LT et macrophages activés permet l'inhibition de la synthèse d' $\text{INF}\gamma$  et l'augmentation de l'IL-4.

L'ensemble de ces interactions entre les deux types de réponse a été synthétisé d'après Nadau (2005), Baneth et collaborateurs (2008), Brifford (2011) et Toepp and Petersen (2020).

## 2.4 Tableau clinique

La leishmaniose est une maladie dite protéiforme avec une période d'incubation longue allant de plusieurs mois à plusieurs années. Comme vu précédemment, les animaux peuvent exprimer différentes formes cliniques rendant le diagnostic clinique plus difficile. Les animaux asymptomatiques ou oligosymptomatiques sont généralement présenter pour : une baisse de forme et d'appétit, des ulcères ou squamosis discrets et pas d'adénomégalies. Au contraire, chez les chiens cliniques, les signes pouvant être rencontrés sont polysystémiques. (Bourdoiseau, 2019)

Dans les symptômes généraux, on retrouve principalement : abattement, fièvre inconstante fluctuante, muqueuses pâles, cachexie et fonte musculaire par catabolisme des protéines. Cet état général du chien donne, ce que l'on appelle lors d'une leishmaniose, un faciès « de vieux chien ». Concernant l'invasion et la prolifération dans le SPM, on remarquera une adénomégalie généralisée et splénomégalie modérée (Brifford, 2011).

Pour le système cutané, on peut observer : une alopecie diffuse, du squamosis, des dermatites, des chancres d'inoculation temporaires, de l'hyperkératose et de l'onychogryphose. Des ulcérations au niveau des jonctions cutanéomuqueuses peuvent être remarquées et sont

dûes soit à l'action directe du parasite soit à la vasculite nécrosante causée par les complexes immuns. Ces derniers sont fréquents au niveau de la truffe et des coussinets et sont souvent réfractaires aux traitements antiseptiques. De plus, les lésions cutanées ne sont pas prurigineuses. (Brifford, 2011; Bourdoiseau, 2019)

Le système urinaire peut être aussi touché avec : un syndrome de polydipsie/polyurie, une glomérulonéphrite avec de la protéinurie. Ces lésions rénales causées majoritairement par le dépôt de complexes immuns peuvent mener jusqu'à une insuffisance rénale chronique. Elle est une des causes de décès les plus fréquentes chez le chien (au Brésil, plus de 95% des chiens et plus de 30% de complications chez l'homme) et a une valeur de pronostic négative. L'atteinte rénale est un facteur limitant majeur pour la prise en charge thérapeutique de l'animal. (Baneth et al., 2008; Toepp and Petersen, 2020)

Au niveau du système digestif, certains chiens peuvent développer une entérite diarrhéique hémorragique. On peut découvrir des signes de colite avec émission de selles glaireuses ou hémorragiques. Histologiquement, on observera une muqueuse avec cryptes glandulaires normales mais une sous-muqueuse présentant des nodules inflammatoires et une vascularite. Des lésions d'ulcération tissulaire sont à l'origine de l'aspect hémorragique de ces inflammations. De plus, la leishmaniose peut provoquer des troubles de l'hémostase entraînant de l'épistaxis. (Bourdoiseau, 2019)

D'autres structures peuvent être touchées dont celles du système locomoteur avec l'apparition de polyarthrite et de myosite. De même, les yeux sont susceptibles d'être lésés avec des manifestations d'uvéites bilatérales, de conjonctivite ou de kératoconjonctivite sèche. La moelle osseuse, et certains organes comme le foie ou le pancréas peuvent subir des altérations. Le développement de ces signes est essentiellement dû à la présence d'inflammation granulomateuse et le dépôt des complexes immuns (Baneth et al., 2008). Une atteinte du système nerveux, telle que la présence d'anticorps dans le liquide céphalo-rachidien, avec apparition de symptômes nerveux a aussi été démontré dans certains cas (Nadau, 2005).

La prévalence de certains de ces signes a été décrite dans un article de Baneth et collaborateurs en 2008 (annexe 7). Différents grades cliniques ont été élaborés à partir des signes cliniques, des résultats d'analyses, de la sérologie, leur traitement et pronostic respectifs afin d'aider les vétérinaires dans la gestion de l'animal dans les guidelines du groupe Leishvet (Solano-Gallego et al., 2011).

### 3. Méthodes de diagnostic actuelles

Le diagnostic de la Leishmaniose est complexe. En effet, la présence d'anticorps circulants ne certifie pas la présence de la maladie ; de même la présence d'amastigotes dans les tissus peut être observé chez des animaux asymptomatiques. De plus, au vu de l'ensemble des différentes manifestations cliniques possibles, le diagnostic différentiel reste large. Par conséquent, le diagnostic doit être établi par une combinaison de suspicion clinique et d'un diagnostic de confirmation par des méthodes de laboratoire. (Paltrinieri et al., 2016)

#### 3.1 Diagnostic clinique et différentiel

La démarche de diagnostic passe d'abord par une suspicion clinique. Pour cela, une anamnèse complète avec des données épidémiologiques et un examen clinique complet est indispensable. Comme précisé précédemment, la race, l'âge, les moyens antiparasitaires et la vaccination sont des informations servant à évaluer les risques d'une possible infection. De plus, il faut savoir : si l'animal a récemment voyagé dans une zone endémique, son mode de vie, si des traitements immunosuppresseurs ont été reçus qui pourraient expliquer une activation d'une infection latente. Lors de l'examen clinique, au vu de la possibilité variée des signes cliniques tous les systèmes doivent être observé et palpé.

Le diagnostic différentiel est large. En prenant en compte les symptômes cutanés, les pathologies parasitaires les plus fréquentes et pouvant s'y rapporter sont : la teigne et la démodécie. De même, il est important de prendre en compte les maladies auto-immunes : le pemphigus foliacé avec des lésions cutanées et le lupus erythémateux ayant des atteintes polysystémiques similaires à la leishmaniose. Le lymphome présente aussi de grande similitude du point de vue symptomatologie que ce soit au niveau des symptômes généraux ou de systèmes particuliers en fonction de sa localisation. D'autres maladies protéiformes doivent être aussi pris en compte. Parmi elles, on retrouve la maladie de Chagas, la piroplasmose dues aux parasites *Trypanosoma cruzi* et *Babesia canis* respectivement et la ehrlichiose causée par la rickettsie *Ehrlichia canis*. Cependant, il est évident que cette liste n'est pas exhaustive puisqu'elle dépend beaucoup de l'examen clinique.

#### 3.2 Diagnostic de laboratoire

Des examens complémentaires sont nécessaires afin d'apporter un diagnostic de certitude. Notamment, une hématologie et une biochimie peuvent être nécessaires et révélateurs d'anomalies pouvant conforter et/ou orienter notre diagnostic et pronostic. D'après Paltrinieri et collaborateurs (2016), en hématologie, on retrouve le plus souvent une anémie normocytaire



normochrome modérée à importante et qui peut être non régénérative en cas d'atteinte de la moelle osseuse. De plus, on peut avoir une neutrophilie et une thrombocytopénie. En cas de thrombocytopénie très marquée, il faudra penser à une co-infection avec un autre pathogène à transmission vectorielle tel que *Ehrlichia canis* et *Anaplasma spp*, On peut aussi remarquer une leucocytose en début d'infection puis une leucopénie, avec plus particulièrement une lymphopénie. Une biochimie peut aussi montrer des marqueurs hépato-biliaires et pancréatiques augmentés en cas d'infiltration granulomateuse de ces organes. Le taux d'enzymes telles que la créatinine kinase et les lactates déshydrogénases peuvent s'accroître si les muscles ou le squelette sont touchés. En ce qui concerne le système urinaire, la créatinine, l'urée et la SDMA peuvent évoquer la présence de lésions et/ou dysfonction. Par ailleurs, une analyse urinaire peut être intéressante pour détecter et confirmer une atteinte rénale par une bandelette urinaire et une mesure de la densité urinaire.

Chez les animaux cliniques, on retrouve fréquemment une hyperprotidémie et semble corréler avec la sévérité du grade. Elle peut être investiguer par formoleucogélification ou électrophorèse. L'évaluation des protéines sériques par électrophorèse est utile pour mettre en évidence une hypergammaglobulinémie, une hypoalbuminémie et donc un rapport albumine/globulines diminué. Ce dernier est considéré comme un facteur de pronostic négatif et un test des plus sensible selon certains auteurs. De même, l'évolution du taux de globuline possède une valeur de pronostic, une stabilisation ou une diminution montre un pronostic plus favorable. L'hypergammaglobulinémie, bien qu'elle soit le plus souvent polyclonale, peut avoir différents profils d'électrophorèse (Annexe 8). (Paltrinieri et al., 2016 ; Bourdoiseau, 2019)

L'utilisation d'autres examens est essentielle pour un diagnostic dit étiologique ou de certitude. Ils sont divisés en deux groupes : les méthodes directes et indirectes. Les méthodes directes regroupent des test parasitologiques et moléculaires. Pour les méthodes indirectes, cela comprend essentiellement les moyens sérologiques. La démarche de diagnostic a préférentiellement abordé est illustrée en figure 4.

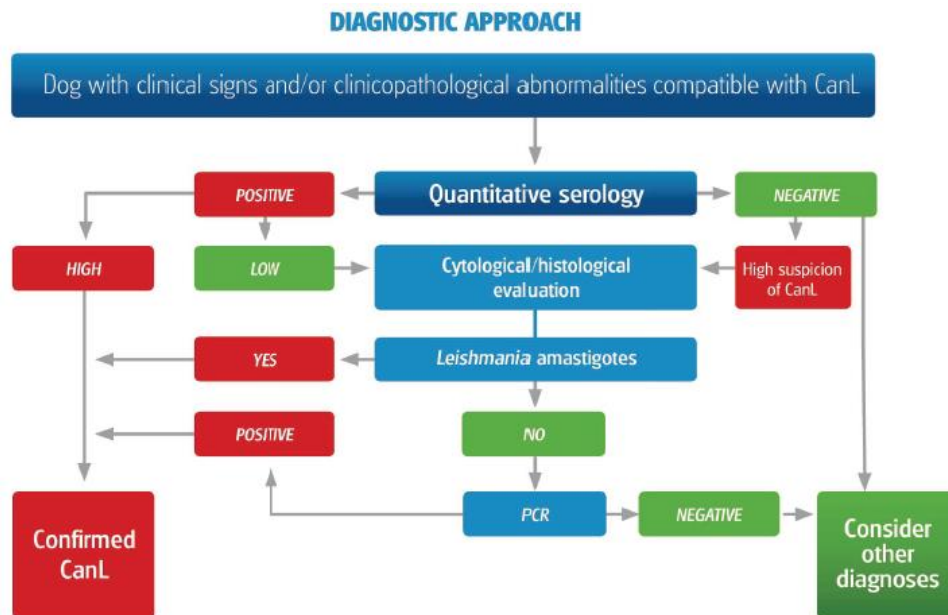


Figure 4 : Démarche de diagnostic pour confirmation sur cas suspect de leishmaniose canine.  
(Solano-Gallego et al., 2011)

### 3.2.1. Méthodes indirectes

Nous avons pu démontrer la réaction immunitaire engendrée par une infection à *Leishmania*. Ces méthodes servent donc à l'évaluer par la détection d'anticorps anti-leishmania à partir de sérum, plasma ou du sang. Pour cela, on effectue des tests sérologiques de 2 types : qualitatif et quantitatif. La sérologie qualitative permet de détecter la présence ou non d'anticorps tandis que la quantitative va nous donner une valeur. Un diagnostic de certitude va reposer préférentiellement sur la sérologie quantitative et cela pour deux raisons : la simple présence d'anticorps ne permet pas de définir un animal malade et son évolution a une valeur pronostique. Parmi ces tests quantitatifs, les plus utilisés sont l'Immunofluorescence indirecte (IFI), considérée comme le gold standard, et l'Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA). D'autres test existent mais sont peu utilisé dû à une mauvaise standardisation et/ou un coût plus élevé (Maroli et al., 2010). Tous ces tests sérologiques utilisent des antigènes spécifiques. Il a été démontré que les antigènes tels que les protéines recombinées rk39 et rK28 montrent une plus haute sensibilité et spécificité (Brifford, 2011).

L'immunodiffusion rapide est un test de sérologie qualitative permettant un résultat rapide à faible coût. Elle présente une sensibilité variant de 30 à 70% selon les études. De ce fait, en cas de résultat négatif, une méthode quantitative complémentaire est recommandée. Cette indication est aussi valable lors de résultat positif pour avoir une valeur d'anticorps

confirmant le résultat et facilitant le suivi thérapeutique. Les test d'immunodiffusion rapide sont considéré comme un test de screening. L'IFI est la méthode de référence en sérologie recommandée par l'OIE du fait de sa grande sensibilité et spécificité. Elle consiste en la dilution successives de sérum sur des lames recouvertes de promastigotes. Les liaisons anticorps-antigènes sont alors mis en évidence par l'utilisation d'anticorps fluorescents. Les limites de ce test sont l'interprétation suggestive pour l'évaluation par microscope et la présence de réaction croisée dans les zones endémiques, dans le nouveau monde, avec *Trypanosoma cruzi* créant de faux-positif. L'emploi d'ELISA montre une bonne spécificité, mais elle présente néanmoins des réactions croisées, avec *Trypanosoma cruzi* mais aussi *Ehrlichia canis* et *Babesia canis*. De plus, la présence d'animaux asymptomatiques présentant un faible taux d'anticorps ne lui permet pas une sensibilité optimale. Ainsi, l'utilisation d'une combinaison de protéines recombinantes comme antigène montre une augmentation de sensibilité. De plus, contrairement à l'IFI, l'interprétation se fait par un spectrophotomètre permettant une standardisation des résultats. Ainsi, plusieurs facteurs peuvent influencer la précision de ces méthodes sérologiques tels que le stade clinique au moment du prélèvement, le protocole utilisé et l'antigène utilisé. (Maroli et al., 2010; Paltrinieri et al., 2016; De Carvalho et al., 2018)

L'interprétation raisonnée de la sérologie est très importante. Les tests sérologiques présentent une sensibilité variable expliqués aussi par la faible production d'anticorps lors des phases initiales et terminales ainsi que chez les animaux asymptomatiques (Brifford, 2011). Le titre d'anticorps n'est pas corrélé à la gravité de signes cliniques. Néanmoins, il a été démontré que la présence d'un taux élevé d'anticorps justifie une dissémination du parasite et l'expression clinique de la maladie. On considère un titre élevé d'anticorps si la valeur est quatre fois supérieure au seuil du laboratoire. De plus, la séroconversion est possible de 1mois jusqu'à 22mois post exposition avec une médiane de 5 mois lors d'infection naturelle. Il est donc important d'effectuer les mêmes tests dans le même laboratoire pour des résultats significatifs lors du suivi thérapeutique ou à plus de 3 mois d'intervalle lors de suspicion clinique persistante (Maroli et al., 2010; Paltrinieri et al., 2016). En outre, un des challenges pour la sérologie est la discrimination entre un animal vacciné et infecté afin d'éviter de faux positifs. Une étude de Lima et collaborateurs (2019) a illustré l'efficacité de l'utilisation de quatres protéines recombinées dont rk39 et rk28 face aux antigènes solubles de promastigotes (SPLA). Le vaccin utilisé est un des deux commercialisés et valables en Europe : CaniLeish<sup>®</sup>. Un mois après la dernière injection de primo-vaccination, il a été démontré pour SPLA une séropositivité avec

l'ELISA significative ( $P= 0,0007$ ) pour le groupe de chiens vaccinés contrairement aux non vaccinés. A contrario, les antigènes rk39 n'ont montré aucune différence significative entre les deux populations ( $P<0,05$ ). Cette séroconversion avec SPLA a été aussi observé 25mois après (qui équivaut aussi à 1mois après le premier rappel) chez tous les animaux vaccinés qu'ils soient infectés ou non. De plus, l'emploi d'autres techniques de diagnostic tels que l'IFI n'a pas été plus efficace pour cette distinction lors de l'utilisation de SPLA comme antigène. Ces résultats sont expliqués par le fait que SPLA est produit à partir de promastigotes avec un grand nombre de surface et antigènes biologiques reconnaissables et se rapprochant le plus d'une infection naturelle. Seul l'antigène rk39 a montré une différence entre les animaux vaccinés non infectés séronégatifs et les chiens vaccinés infectés séropositifs. Néanmoins, une cohorte d'un plus grand nombre d'individus aurait pu être utilisée pour améliorer la représentativité des résultats. De plus, il aurait été intéressant de tester puis comparer avec le deuxième vaccin commercialisé et utilisé en Europe : le Letifend®.

### 3.2.2. Méthodes directes

Elles servent à mettre en évidence la présence du parasite dans l'organisme de l'hôte. De plus, ces techniques ne posent pas de problème de discrimination entre un animal infecté et un animal vacciné ; a contrario des méthodes sérologiques. Parmi les méthodes directes, on retrouve les tests parasitologiques tels que la cytologie, l'histologie et la culture. Les prélèvements sont faits au niveau des organes les plus infectés : les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. D'autres sites et fluides biologiques peuvent être prélevés en fonction des symptômes observés tels que : la rate, le foie, la peau, le liquide céphalorachidien et le liquide synovial articulaire. L'adénogramme reste le plus recommandé car il est facile à réaliser et c'est un des sites le plus souvent infecté que ce soit chez les chiens symptomatiques ou non (Figure5). (Bourdoiseau, 2019)

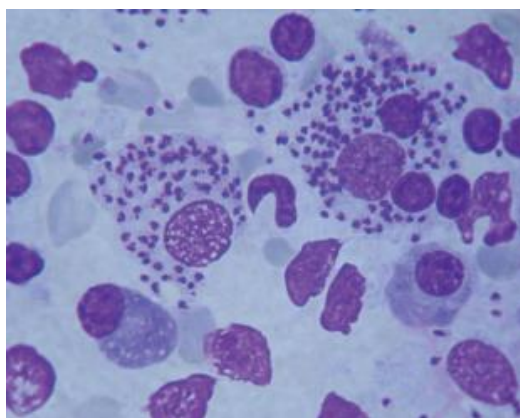


Figure 5 : Cytologie d'un adénogramme chez un chien atteint de Leishmaniose, avec présence d'amastigotes extracellulaires et intracellulaires. (microscope optique, x100 et coloration MGG) (Solano-Gallego et al., 2011)

En cytologie, les prélèvements peuvent être obtenus par ponction à l'aiguille-fine et calque cutané. La lame obtenue est ensuite colorée préférentiellement au May-Grünwald-Giemsa (MGG). La sensibilité du diagnostic cytologique par frottis est inférieure à 50% bien que sa spécificité soit proche de 100%. Ce faible taux peut être expliqué par les animaux ayant une faible charge parasitaire, la qualité de l'étalement et de la coloration. De plus, cela dépend de l'expérience de l'observateur et du temps pris pour l'examen. Cependant, la cytologie est un outil fréquemment utilisé de par un équipement minimal requis, un moindre coût et une réponse rapide de diagnostic s'il s'avère positif. L'absence de parasite visible ne permet donc pas d'exclure une infection à *Leishmania* (Guerra et al., 2019).

Une biopsie des organes peut être effectuée pour de l'histologie. Cette méthode possède un taux de sensibilité identique à la cytologie dû aux mêmes contraintes. Cette technique étant invasive, elle est plutôt utilisée pour le diagnostic lors d'autopsie. Elle sert à étudier les lésions histo-pathologiques associées au sein des tissus. Les éléments cytologiques ou histopathologiques suggérant une infection lors de leishmaniose sont : la présence d'inflammation granulomateuse ou pyogranulomateuse ou lymphoplasmocytaire, une hyperplasie réactive des organes lymphatiques, une vascularite et la présence ou non d'amastigote (Solano-Gallego et al., 2011). Néanmoins, il est important de différencier l'origine des lésions car certaines études ont montré la possibilité d'infection à *Leishmania spp* secondaire à une pathologie telle que le lymphome (Paltrinieri et al., 2016).

D'après Guerra et collaborateurs (2019), l'emploi de techniques additionnelles immunologiques telles que l'Immunocytochimie (ICC) ou l'Immunohistochimie (IHC) offrent

une meilleure sensibilité. Ces outils consistent en l'utilisation d'anticorps couplés à des marqueurs visibles au microscope afin de détecter les antigènes du parasite présents dans l'échantillon. Une étude a permis de comparer l'utilisation des différentes méthodes sur des prélèvements de ponction à l'aiguille fine du ganglion poplité en présence d'adénomégalie généralisée chez 60 chiens. Sur cette population, 50 chiens ont été diagnostiqués positifs pour la leishmaniose et 10 autres pour un lymphome multicentrique. La spécificité est de 100% pour toutes les méthodes. Il a été démontré que l'utilisation d'IHC et d'ICC augmente significativement ( $P=0,001$ ) la sensibilité du test comparée à l'utilisation de l'étude cytologique conventionnelle de frottis (respectivement 92%, 70% et 34%). De plus, le seuil de détection est plus bas pour l'IHC et l'ICC avec 9,23 amastigotes/mm<sup>2</sup> et 18,46 amastigotes/mm<sup>2</sup> respectivement ; a contrario du frottis avec 400 amastigotes/mm<sup>2</sup>. Cette diminution permet une amélioration de la détection chez les animaux à faible charge parasitaire. Enfin, l'indice de Kappa, qui traduit la concordance de résultats entre des observateurs différents ou entre différents moments d'un même examinateur, a aussi montré de grandes différences. En terme d'interprétation, on considère que plus la valeur de kappa se rapproche de 1, plus l'influence de l'expérience de l'observateur est minime sur la capacité de détection de parasite. Ainsi, on note pour la méthode de cytologie conventionnelle  $Kappa = 0,1466$  alors que  $Kappa\ ICC = 0,437$  et  $Kappa\ IHC = 0,793$ . Ainsi, tous ces paramètres expliquent l'augmentation de la sensibilité globale des tests cytologiques et histologiques, avec l'utilisation de méthodes immunologiques complémentaires. Les résultats de l'analyse comparative d'efficacité sont repris en annexe 9. De plus, les images microscopiques via les différentes méthodes citées précédemment sont illustrées en figure 6.(Guerra et al., 2019)

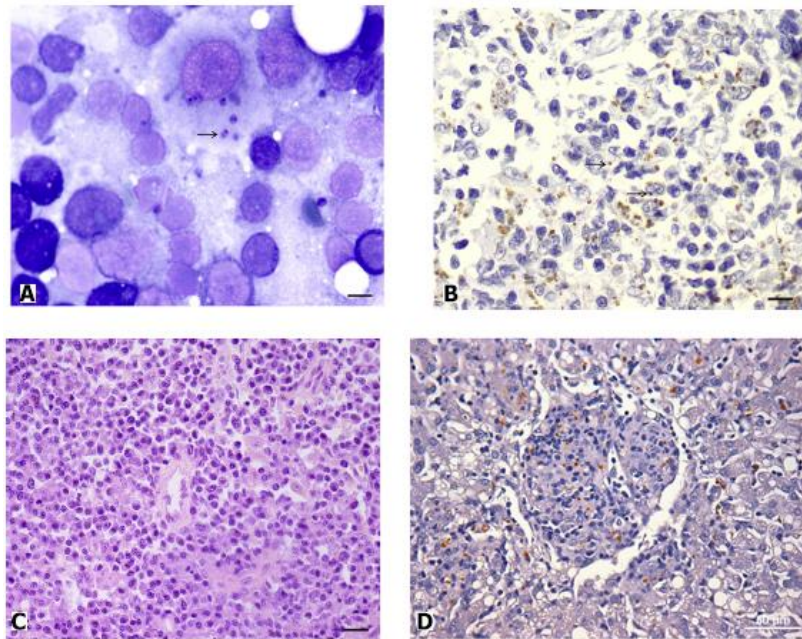


Figure 6 : Images microscopiques des différentes méthodes cytologiques et histologiques sur prélèvements de chiens atteints de leishmaniose. A,B,C ponction à l'aiguille fine du ganglion poplité : A analyse cytologique conventionnelle de frottis; B immunocytochimie; C analyse histologique (Guerra et al., 2019). D immunohistochimie d'une biopsie de foie (Lima et al., 2019)

La culture de parasite se réalise dans un milieu Novy-McNeal-Nicolle à partir de prélèvements de rate, ganglion lymphatique ou moelle osseuse. Cette technique nécessite un délai d'une à plusieurs semaines et un résultat est défini à partir de quatre cultures successives. De plus, le risque de contamination microbiologique n'est pas négligeable et l'équipement adéquat n'est disponible qu'en laboratoire spécialisé. Bien que sa spécificité soit de 100% et qu'elle permet une identification isoenzymatique pour connaître la souche, elle est donc peu utilisée. (Brifford, 2011; Paltrinieri et al., 2016)

En cas de résultat négatif lors de cytologie/histologie, le matériel prélevé peut être utilisé pour la technique moléculaire par Polymérase Chain Reaction (PCR), qui permet d'identifier la présence de l'ADN du parasite. Cette méthode est basée sur l'amplification de séquences spécifiques de génome des leishmanies à partir de l'ADN kinétoplastique (ADNk), de la région Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) ou de l'ARN ribosomal (ARNr) (Brifford, 2011). La plus sensible à ce jour est celle reposant sur l'ADNk et plus précisément le kDNA/145 avec 100% selon une récente recherche (Marcelino et al., 2020). Elle possède une haute sensibilité et spécificité proches de 100% qui fait d'elle un outil utile pour une détection d'animaux

asymptomatiques. Néanmoins, elle nécessite un matériel spécialisé de laboratoire avec un temps de réponse dépendant de ce dernier et un coût important. Il existe plusieurs types de PCR et de prélèvements pouvant être utilisés. Pour ces derniers, les plus sensibles sont les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, la rate, la peau et la conjonctive oculaire. De récentes études ont mis en évidence une haute sensibilité et des résultats plus rapides par l'utilisation de la conjonctive oculaire et de la muqueuse nasale ou buccale. A contrario, l'utilisation de sang, de buffy coat et d'urine montre un taux plus faible bien que la technique de prélèvements soit moins invasive et couteuse (Paltrinieri et al., 2016 ; Marcelino et al., 2020) . Par ailleurs, il existe différentes techniques de PCR : conventionnelle, en temps réel et nichée. Cette dernière est la plus sensible mais la moins spécifique dû au risque de contamination lors de certaines étapes. La PCR en temps réel est une méthode dite quantitative qui permet d'apprécier la charge parasitaire et un suivi post-thérapeutique. (Brifford, 2011). En ce qui concerne l'interprétation de ce test, il est important d'avoir à l'esprit la différence entre un animal malade ou clinique, infecté ou subclinique et un animal exposé. En effet, la présence d'ADN du parasite indique une infection. Cependant, un chien est dit malade si des anomalies cliniques et biologiques sont présentes. De plus, une positivité transitoire est possible dans la moelle osseuse ou dans une biopsie cutanée, chez des animaux vivants ou ayant vécu pendant le pic saisonnier d'activité du vecteur dans une zone où sa présence a été confirmée. Dans ce cas, on n'aboutit pas nécessairement à une dissémination ou même une infection, l'animal étant considéré comme exposé. Il est donc essentiel de prendre en considération et de corrélérer toutes les données cliniques et les résultats des différents tests utilisés pour une meilleure interprétation. (Figure 7)

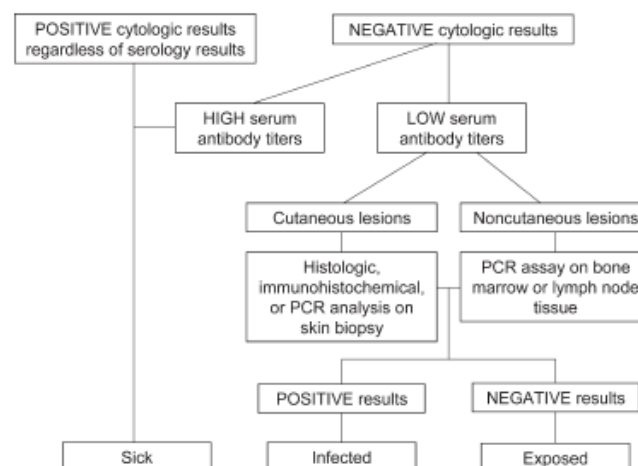




Figure 7 : Diagramme représentant la démarche et l'interprétation diagnostiques pour un chien suspecté de leishmaniose. (Maroli et al., 2010)

#### 4. Les avancés scientifiques en matière de diagnostic

##### 4.1 ELISA

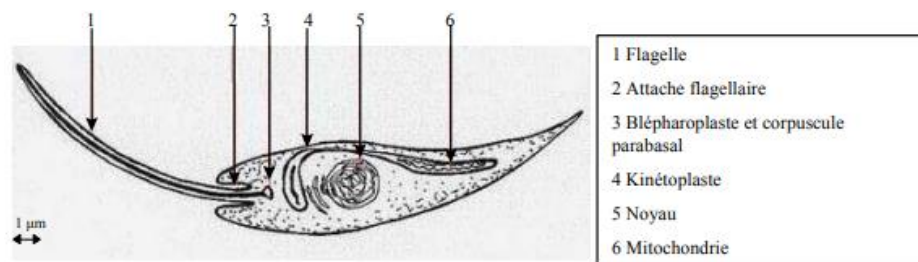
- 4.1.1. Lipophosphoglycans
- 4.1.2. Chimiluminescent avec protéine à multi-épitopes
- 4.1.3. Protéine kinase pyridoxale
- 4.1.4. Protéine recombinante du facteur d'élongation 1 Béta

##### 4.2 PCR et miARN 122

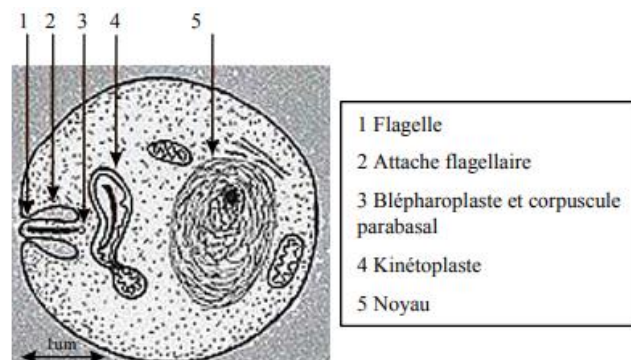
#### 5. Conclusion

#### 6. Annexes

##### Annexe 1 : Schéma de la forme promastigote de *Leishmania infantum*. (Nadau, 2005)

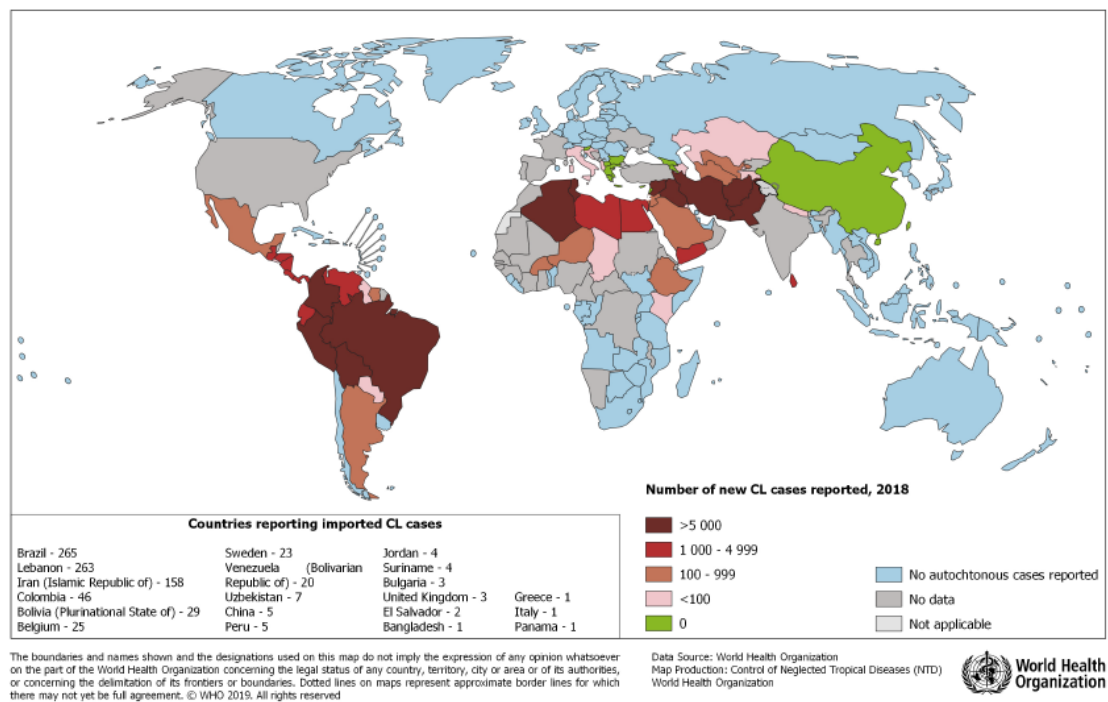


##### Annexe 2 : Schéma de la forme amastigote de *Leishmania infantum*. (Nadau, 2005)

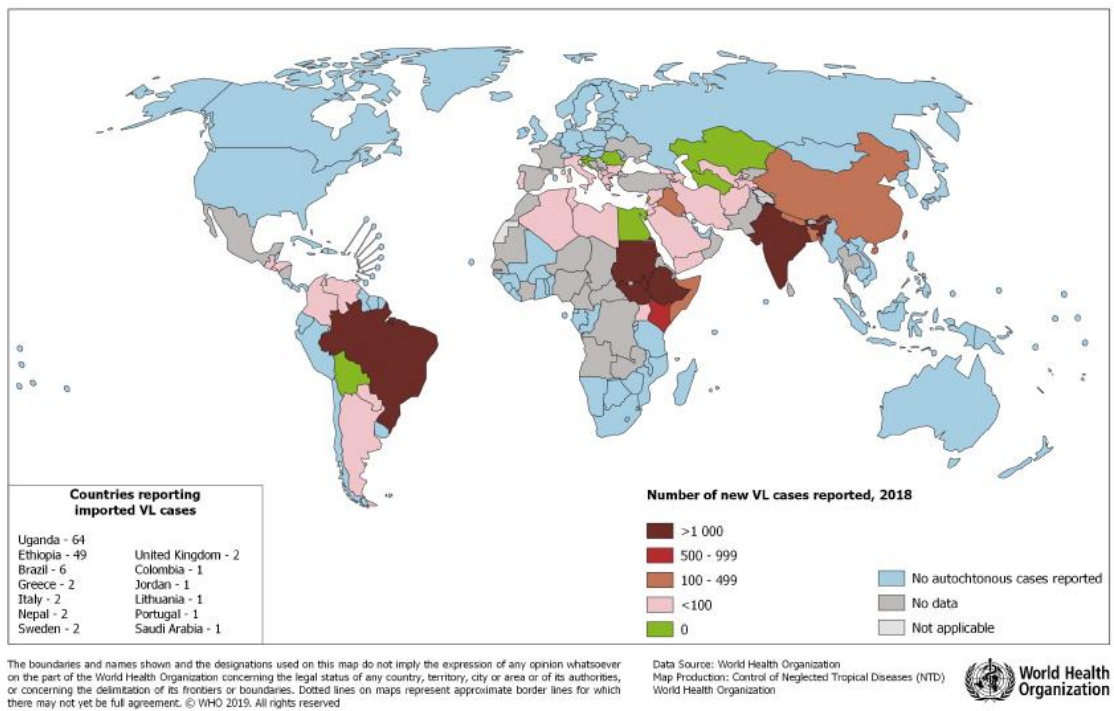


##### Annexe 3 : Cartes géographiques des statuts endémiques mondiaux de la Leishmaniose forme cutanée et viscérale en 2018.

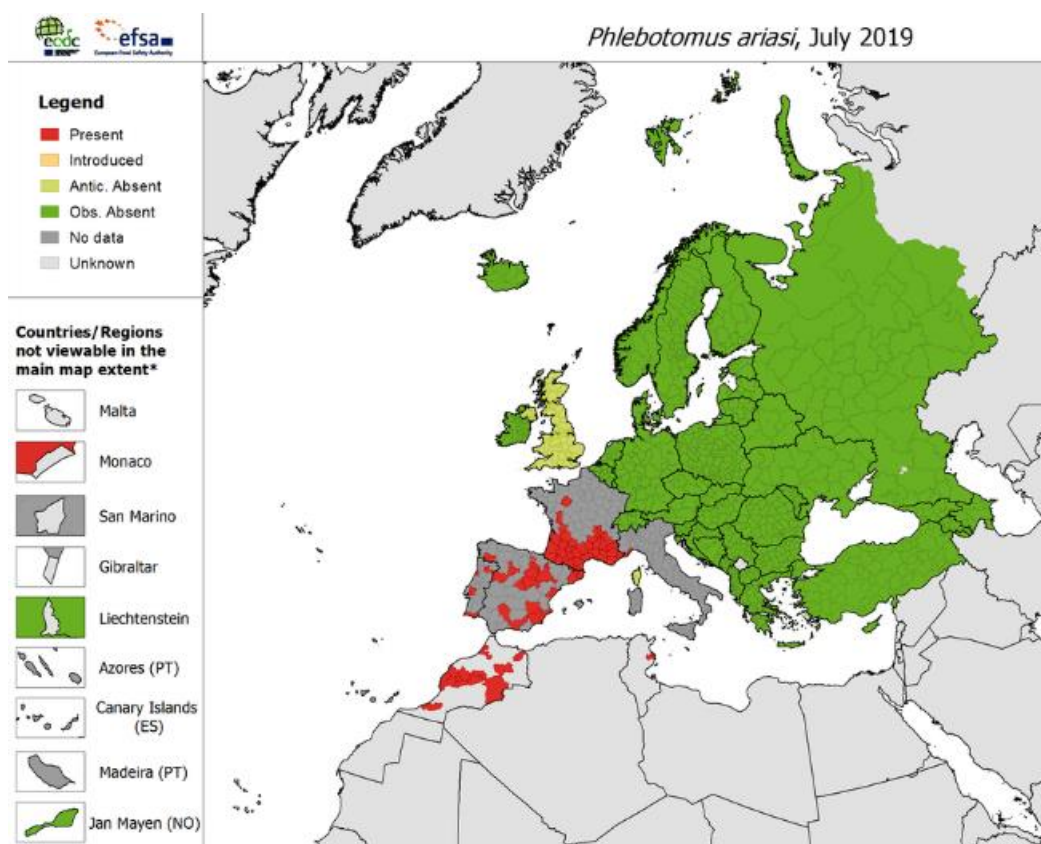
## Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2018



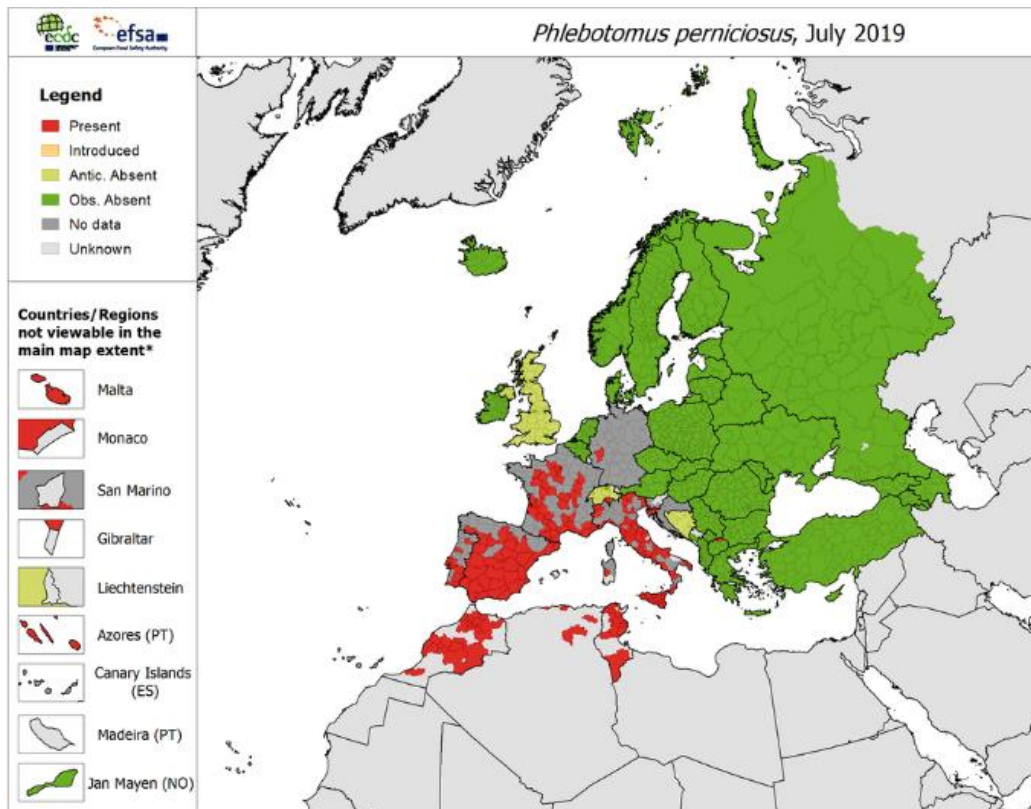
## Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018



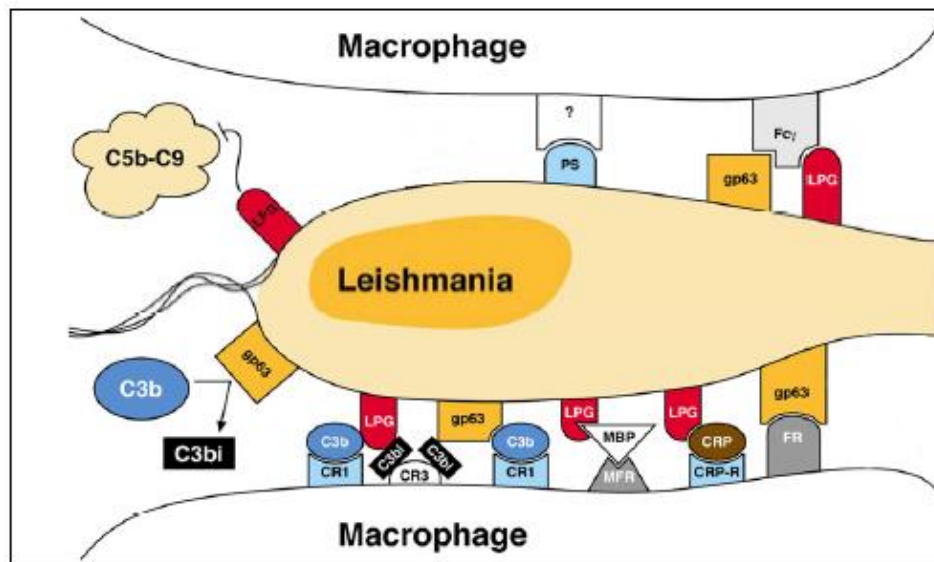
**Annexe 4 : Répartition géographique de *P. ariasi* en Europe occidentale. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019)**



**Annexe 5 : Répartition géographique de *P. perniciosus* en Europe occidentale. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019)**



**Annexe 6 : Récepteurs impliqués dans l'adhésion et l'inoculation de promastigotes.**  
(Nadau, 2005)



**Illustration 7 : Interactions entre le macrophage et la leishmanie (promastigote) via leurs molécules de surface et des protéines solubles.**

PS=phosphatidylsérine, MBP=mannose binding protein, MFR=mannose fucose receptor, CRP=C-reactive protein, CRP-R=C-reactive protein receptor, FR=fibronectine receptor.

Tiré de Bogdan et Rölinghoff, 1998 [7]

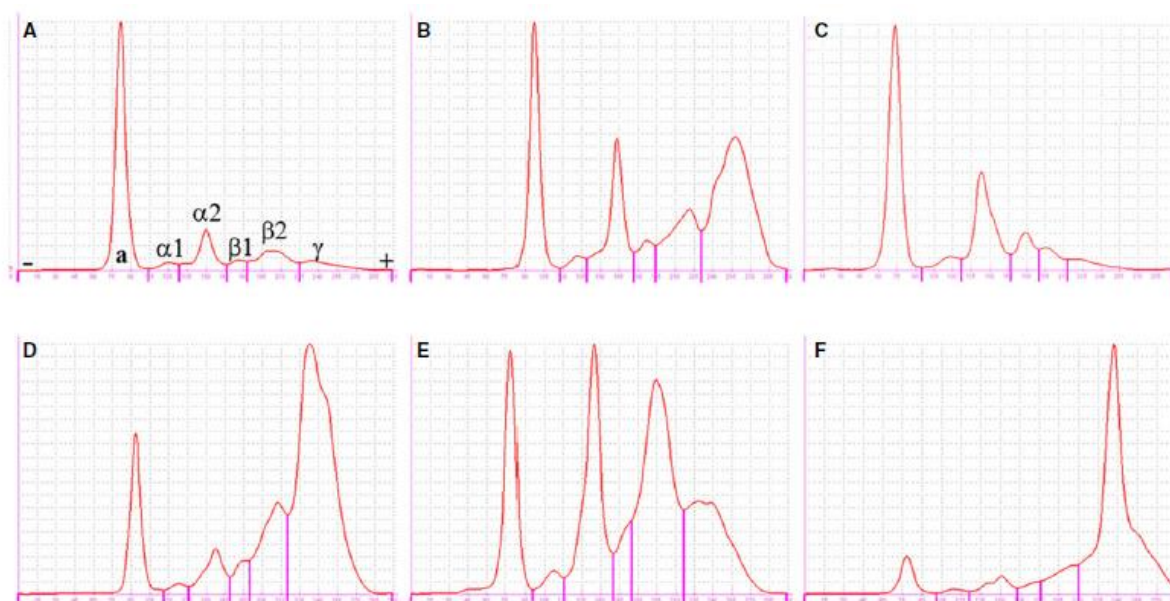
Source : <http://www.theses.ulaval.ca/2004/21419/ch01.html>

**Annexe 7 : Prévalence de signes cliniques chez des chiens cliniques de leishmaniose d'après Baneth et collaborateurs (2008)**



Clinical examination finding	Percentage of symptomatic dogs	Refs
Skin disease	81%–89%	[4,27]
Enlargement of lymph nodes	62%–90%	[4,26,27]
Eye disease	16%–81%	[4,27,41,42]
Pallor of mucous membranes	58%	[27]
Enlarged spleen	10%–53%	[4,26,27]
Cachexia	10%–48%	[4,26,27]
Fever	4%–36%	[26,27]
Nose bleeding (epistaxis)	6%–10%	[26,27]
Abnormal nails (onychogryposis)	20%–31%	[4,26,27]

## Annexe 8 : Profils d'électrophorèse chez un chien sain comparé à des chiens atteints de leishmaniose. (Paltrinieri et al., 2016)



**Figure 3.** Examples of electrophoretograms from a normal dog (A) or dogs with clinical leishmaniasis (B–F) using agarose gel electrophoresis. (A) Normal canine electrophoretogram for comparison (a = albumin;  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  = globulin fractions); (B) Marked increase of  $\alpha_2$ - and  $\gamma$ -globulins, with polyclonal gammopathy. (C) Mild increase of  $\alpha_2$ -globulins (detectable only in the early phase of the disease). (D) Severe hypoalbuminemia and polyclonal gammopathy. Also  $\beta_2$ -globulins are likely increased in this case. (E) Marked increase of  $\alpha_2$ -globulins and polyclonal gammopathy, with a prominent peak in the  $\beta_2$ -region and a less evident polyclonal peak in the  $\gamma$ -region. (F) Marked hypoalbuminemia and oligoclonal gammopathy. This dog was co-infected with *Ehrlichia canis*.

## Annexe 9 : Tableau comparatif d'efficacité des différentes techniques pour le diagnostic de Leishmaniose canine. (Guerra et al., 2019)

Comparison of diagnostic efficacy for the detection of <i>L. infantum</i> infection using different techniques					
Technique	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)	Accuracy % (95% CI)
SC	34.0 (21.6–48.9)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (77.1–100.0)	23.3 (12.3–39.0)	45.0 (32.1–58.4)
LBC	20.0 (10.5–34.1)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (65.5–100.0)	20.0 (10.5–34.1)	33.3 (21.7–46.7)
CB–HE	22.0 (11.5–35.9)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (67.9–100.0)	20.4 (18.1–22.9)	35.0 (23.1–48.4)
CB–ICC	70.0 (55.2–81.7)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (87.7–100.0)	40.0 (21.8–61.1)	75.0 (62.1–85.3)
FFPE–IHC	92.0 (79.9–97.4)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (90.4–100.0)	71.4 (42.0–90.4)	93.3 (83.8–98.1)
SC + CB–ICC	72.0 (57.3–83.3)	100.0 (65.5–100.0)	100.0 (88.0–100.0)	41.7 (22.8–63.0)	76.7 (64.0–86.6)

SC, smear cytology; LBC, liquid-based cytology; CB–HE, cell block histology combined with haematoxylin and eosin; CB–ICC, cell block histology combined with immunocytochemistry; FFPE–IHC, formalin-fixed paraffin wax-embedded combined with immunohistochemistry; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

## 7. Bibliographie

- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Bourdeau, P., 2018. La leishmaniose en France : dernières données épidémiologiques en France et adaptation des mesures de prévention., in: *Leishmaniose Canine : Dernières Actualités De l'immunité Cellulaire à Vos Préoccupations Quotidiennes*. Congrès AFVAC Marseille, pp. 19–26.
- Bourdoiseau, G., 2019. Les maladies infectieuses et parasitaires des animaux de compagnies. Université de Liège.
- Brifford, C., 2011. Revue actuelle en matière de leishmaniose canine 101.
- De Carvalho, F.L.N., Riboldi, E.D.O., Bello, G.L., Ramos, R.R., Barcellos, R.B., Gehlen, M., Halon, M.L., Romão, P.R.T., Dallegrave, E., Rossetti, M.L.R., 2018. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiol. Infect.* 146, 571–576. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000225>
- Guerra, J.M., Fernandes, N.C.C.A., Réssio, R.A., Magno, J.A., Kimura, L.M., Barbosa, J.E. d. R., Bertollo, D.M.B., Taniguchi, H.H., Hiramoto, R.M., Motoie, G., Tolezano, J.E., Cogliati, B., 2019. Evaluation of Cytopathological Techniques for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniosis with Lymph Node Samples. *J. Comp. Pathol.* 172, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.08.011>
- Hall, L.R., Titus, R.G., 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 155, 3501–6.
- Kasbari, M., Depaquit, J., Ravel, C., Dommange, N., Hubert, B., Pratlong, F., Lami, P., Boireau, P., Bastien, P., Bourdeau, P., Dedet, J., Bourdoiseau, G., 2013. Importance of transplacental and veneral transmission for canine leishmaniasis emergence, persistence and spread in non-endemic areas in France: strong evidence from the field to the lab., in: *Fifth World Congress on Leishmaniasis*. Porto de Galinhas, Brésil.

- Lima, I.S., Solcá, M.S., Tafuri, W.L., Santos, W.L.C., Freitas, L.A.R. De, 2019. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasit. Vectors* 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3723-1>
- Marcelino, A.P., Filho, J.A. de S., e Bastos, C. de V., Ribeiro, S.R., Medeiros, F.A.C., Reis, I.A., Lima, A.C.V.M. da R., Barbosa, J.R., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., 2020. Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Acta Trop.* 105495. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105495>
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Paltrinieri, S., Roura, X., Zini, E., Zatelli, A., 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 1200–1206. <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1200>
- Nadau, C., 2005. Étude Préliminaire De L ' Utilisation De La Protéine Lack Dans Le Test D ' Intra-Dermo-Réaction. *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*.
- 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>
- Palatnik-De-Sousa, C.B., Day, M.J., 2011. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites and Vectors* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>
- 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>
- Pennisi, M.G., 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Vet. Parasitol.* 208, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>
- Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155913>
- Schlein, Y., 1993. *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today* 9, 255–258. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V)

Solano-Gallego, L., Mirá, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors* 4, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

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>

World Health Organization, 2020. Fiche détails, Leishmaniose. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Consulté le 13 mars 2020.

Kasbari M. *et al.* Importance of transplacental and venereal transmission for canine leishmaniasis emergence, persistence and spread in non-endemic areas in France. *WorldLeish* 5, 2013.