

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>I. Généralités sur la leishmaniose canine.....</b>	<b>17</b>
<b>A. Définition et importance.....</b>	<b>17</b>
<b>B. Etiologie.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Le parasite.....</b>	<b>18</b>
a) Morphologie.....	18
b) Biologie.....	19
<b>2. Le cycle évolutif.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Le vecteur.....</b>	<b>22</b>
a) Classification et morphologie.....	22
b) Biologie.....	22
• <i>Nutrition</i> .....	22
• <i>Habitat</i> .....	22
• <i>Reproduction</i> .....	23
<b>C. Epidémiologie.....</b>	<b>23</b>
<b>1. Descriptive.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Analytique.....</b>	<b>24</b>
a) Espèce réservoir.....	24
b) Transmission.....	24
c) Facteurs favorisants.....	24
<b>D. Pathogénie et symptômes.....</b>	<b>25</b>
<b>E. Diagnostic.....</b>	<b>28</b>
<b>1. Clinique.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Biologique.....</b>	<b>28</b>
a) Méthodes non spécifiques.....	28
• <i>Examens hématologiques</i> .....	28
• <i>Examens biochimiques</i> .....	29
• <i>Formoleucogélification</i> .....	29

b) Méthodes spécifiques.....	30
• <i>Mise en évidence du parasite</i> .....	30
o La microscopie .....	30
o La culture du parasite .....	30
o La PCR .....	30
o Les techniques d'immunomarquage.....	31
• <i>Méthodes sérologiques</i> .....	31
o Immunofluorescence indirecte .....	31
o ELISA.....	31
o Techniques d'agglutination .....	32
o Western Blot.....	32
<b>3. En pratique .....</b>	<b>32</b>
<b>F. Réponse immunitaire.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Rappels d'immunologie .....</b>	<b>33</b>
a) Les cellules de l'immunité .....	33
• <i>Les lymphocytes</i> .....	33
• <i>Les cellules NK</i> .....	33
• <i>Les cellules présentatrices d'antigènes</i> .....	34
• <i>L'activation des lymphocytes</i> .....	34
b) Les molécules de l'immunité .....	34
• <i>Les cytokines</i> .....	34
• <i>Les immunoglobulines</i> .....	38
<b>2. Les réactions immunitaires lors de leishmaniose : modèle général.....</b>	<b>38</b>
a) Immunité innée.....	38
• <i>Les antigènes majeurs du parasite : gp63 et LPG</i> .....	38
• <i>Rôle des macrophages</i> .....	38
• <i>Rôle des cellules de Langerhans</i> .....	39
b) Immunité acquise .....	39
• <i>Activation des macrophages et synthèse de NO</i> .....	39
• <i>Sensibilité ou résistance : le modèle murin</i> .....	40
<b>3. Les réactions immunitaires du chien infecté par <i>Leishmania infantum</i>.....</b>	<b>41</b>
a) Infection expérimentale des chiens .....	41
b) Différences entre les réponses immunitaires des chiens résistants et des chiens sensibles .....	41
• <i>Chiens résistants</i> .....	42
o Description des réactions .....	42
o Orientation de la réponse immunitaire et cytokines impliquées .....	42
o Cellules impliquées .....	43
o Immunoglobulines.....	43
• <i>Chiens symptomatiques</i> .....	43
o Description des réactions .....	43
o Orientation de la réponse immunitaire et cytokines impliquées .....	44
o Immunoglobulines.....	44
o Autres .....	45
c) Contrôle génétique de l'issue de la maladie.....	47

•	<i>Gène NRAMP1</i> .....	47
•	<i>Rôle du complexe majeur d'histocompatibilité</i> .....	47
•	<i>Cas du Podenco Ibicenco</i> .....	47
<b>4.</b>	<b>Rôle de la salive du vecteur</b> .....	<b>48</b>
<b>II.</b>	<b>Traitement de la leishmaniose canine</b> .....	<b>51</b>
<b>A.</b>	<b>Décision thérapeutique</b> .....	<b>51</b>
<b>1)</b>	<b>Considérations préalables</b> .....	<b>51</b>
<b>2)</b>	<b>Leishmaniose canine et santé publique</b> .....	<b>51</b>
<b>3)</b>	<b>Leishmaniose canine : facteurs pronostiques</b> .....	<b>52</b>
<b>B.</b>	<b>Thérapeutique non spécifique</b> .....	<b>53</b>
<b>C.</b>	<b>Thérapeutique spécifique</b> .....	<b>53</b>
<b>1)</b>	<b>Molécules de première intention</b> .....	<b>55</b>
a)	Les composés stibiés .....	55
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	55
•	<i>Effets indésirables</i> .....	55
•	<i>L'antimoniote de méglumine et le stibogluconate de sodium : protocoles d'administration</i> .....	55
•	<i>L'antimoniote de méglumine : efficacité</i> .....	56
•	<i>L'antimoniote de méglumine : immunomodulation</i> .....	57
•	<i>L'antimoniote de méglumine : formulation liposomale</i> .....	57
•	<i>Résistance</i> .....	58
b)	L'allopurinol .....	59
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	59
•	<i>Effets indésirables</i> .....	59
•	<i>Protocole d'administration</i> .....	59
•	<i>Efficacité</i> .....	59
•	<i>Suivi de l'efficacité du traitement</i> .....	60
•	<i>Résistance</i> .....	60
c)	Association antimoniote de méglumine-allopurinol .....	61
•	<i>Importance et protocole</i> .....	61
•	<i>Efficacité</i> .....	61
d)	L'amphotéricine B .....	63
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	63
•	<i>Effets indésirables</i> .....	63
•	<i>Protocole d'administration et efficacité</i> .....	63
o	Amphotéricine B sous forme libre .....	63
o	Autres formulations d'amphotéricine B .....	64
•	<i>Résistance</i> .....	65
<b>2)</b>	<b>Molécules de seconde intention</b> .....	<b>65</b>
a)	La pentamidine .....	65
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	65
•	<i>Effets indésirables</i> .....	65

•	<i>Protocole d'administration</i> .....	65
•	<i>Efficacité</i> .....	66
•	<i>Résistance</i> .....	66
b)	La paromomycine (aminosidine) .....	66
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	66
•	<i>Effets indésirables</i> .....	67
•	<i>Protocole d'administration et efficacité</i> .....	67
•	<i>Résistance</i> .....	67
c)	Les azoles .....	67
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	67
•	<i>Effets indésirables</i> .....	67
•	<i>Protocole d'administration</i> .....	68
•	<i>Résistance</i> .....	68
d)	Les quinolones .....	68
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	68
•	<i>Effets indésirables</i> .....	68
•	<i>Protocole d'administration</i> .....	68
e)	La miltéfosine (hexadécylphosphocholine) .....	69
•	<i>Définition et mode d'action</i> .....	69
•	<i>Effets indésirables</i> .....	69
•	<i>Protocole d'administration et efficacité</i> .....	70
•	<i>Résistance</i> .....	70

### **III Prophylaxie de la leishmaniose canine ..... 73**

#### **A. La vaccination contre la leishmaniose canine..... 73**

##### **1) Conditions nécessaires et classification ..... 73**

a)	Qu'est-ce que la vaccination ? .....	73
b)	Les phases d'essais cliniques .....	73
c)	Rôle de l'adjuvant et vectorisation des antigènes .....	74
d)	Propriétés nécessaires pour le vaccin.....	75
e)	Classification des vaccins .....	75

##### **2) Candidats vaccins..... 75**

a)	Vaccins utilisant des leishmanies vivantes .....	75
•	<i>Leishmanisation</i> .....	75
○	Historique .....	75
○	Utilisation actuelle.....	76
○	Futur des vaccins vivants .....	76
•	<i>Parasites « knock-out »</i> .....	76
•	<i>Cassettes suicidaires</i> .....	77
b)	Vaccins de première génération.....	77
c)	Vaccins de deuxième génération.....	79
•	<i>Vaccins à base d'antigènes leishmaniens purifiés</i> .....	79
○	Le vaccin LiF2 : échec de la protection .....	79
○	Le vaccin FML-saponine : Leishmune® .....	79
▪	Composition du vaccin.....	79
▪	Efficacité du vaccin.....	80

▪ Pouvoir de blocage de la transmission .....	81
○ Le vaccin <i>LiESAp-MDP</i> .....	81
▪ Composition du vaccin .....	81
▪ Efficacité du vaccin .....	81
• <i>Vaccins à base d'antigènes recombinants</i> .....	83
d) Vaccins de troisième génération .....	86
• <i>Avantages de la vaccination génétique</i> .....	86
• <i>Candidats aux vaccins de troisième génération</i> .....	87
<b>3) Vaccination avec des antigènes de salive de phlébotome .....</b>	<b>91</b>
<b>B. L'éviction des piqûres de phlébotomes.....</b>	<b>91</b>
<b>1) Prophylaxie sanitaire .....</b>	<b>91</b>
<b>2) Prophylaxie médicale.....</b>	<b>92</b>
a) Les insecticides utilisés .....	92
• <i>Les pyréthrynoïdes</i> .....	92
○ Définition .....	92
○ Pharmacocinétique .....	92
○ Mode d'action .....	92
○ Toxicité.....	93
○ Modalités d'emploi .....	93
• <i>L'imidaclopride</i> .....	94
○ Définition .....	94
○ Mode d'action .....	94
○ Toxicité.....	94
○ Modalités d'emploi .....	94
• <i>Le pyriproxifène</i> .....	94
○ Définition .....	94
○ Mode d'action .....	94
○ Toxicité.....	95
○ Modalités d'emploi .....	95
b) Efficacité des différentes présentations .....	95
• <i>Les colliers imprégnés</i> .....	95
• <i>Les spot-on et les sprays</i> .....	96
○ <i>Spot-on</i> de perméthrine .....	96
○ <i>Spot-on</i> de perméthrine et d'imidaclopride .....	96
○ <i>Spray</i> de perméthrine et de pyriproxifène .....	97
c) Protection de l'intérieur des habitations.....	98
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>101</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>113</b>



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i> .....	18
<b>Figure 2</b> : Forme amastigote de <i>Leishmania infantum</i> .....	19
<b>Figure 3</b> : Cycle évolutif de <i>Leishmania infantum</i> .....	21
<b>Figure 4</b> : <i>Phlebotomus</i> spp. ....	22
<b>Figure 5</b> : Lésions dermatologiques de la truffe et du pavillon auriculaire chez un chien leishmanien.....	26
<b>Figure 6</b> : Cachexie chez un Dogue Allemand leishmanien .....	26
<b>Figure 7</b> : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien.....	29
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des réponses immunitaires au cours de la leishmaniose canine.....	46



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Symptômes observés lors de leishmaniose canine.....	27
<b>Tableau 2</b> : Profil de sécrétion des cytokines par les cellules Th.....	36
<b>Tableau 3</b> : Rôles des principales cytokines impliquées dans la réaction immunitaire .....	37
<b>Tableau 4</b> : Propriétés de la salive du phlébotome.....	48
<b>Tableau 5</b> : Situations extrêmes permettant la définition d'un pronostic relativement facile dans la leishmaniose canine .....	53
<b>Tableau 6</b> : Noms et protocoles d'utilisation des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine.....	54
<b>Tableau 7</b> : Résultats obtenus selon trois protocoles thérapeutiques différents chez 96 chiens.....	61
<b>Tableau 8</b> : Antigènes leishmaniens recombinants candidats pour des vaccins de deuxième génération .....	83
<b>Tableau 9</b> : Antigènes leishmaniens recombinants testés chez le chien .....	85
<b>Tableau 10</b> : Avantages de la vaccination génétique contre la leishmaniose canine .....	87
<b>Tableau 11</b> : Candidats prometteurs pour les vaccins de troisième génération dans la leishmaniose .....	88
<b>Tableau 12</b> : Efficacité comparée des vaccins contre la leishmaniose.....	89
<b>Tableau 13</b> : Résumé des études de vaccins anti-leishmaniens chez le chien .....	90
<b>Tableau 14</b> : Efficacités insecticide et répulsive du <i>spot-on</i> de perméthrine et d'imidaclopride pendant l'étude .....	97
<b>Tableau 15</b> : Efficacités insecticide et répulsive du spray de perméthrine et de pyriproxyfène pendant l'étude .....	97



## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1</b> : Principales espèces de leishmanies pathogènes pour les animaux domestiques et les humains .....	115
<b>Annexe 2</b> : Structure chimique des principales molécules antileishmaniennes.....	117
<b>Annexe 3</b> : Structure chimique des composés utilisés dans la lutte contre les phlébotomes .....	119



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : Degré Celsius  
ABC : ATP-binding cassette  
AMM : Autorisation de mise sur le marché  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATP : Adénosine triphosphate  
BCG : Bacille de Calmette et Guérin  
BT1 : Biopterin 1  
cd : Cytosine deaminase  
cf. : « Confer » = se référer à  
cm : Centimètre  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CP : Céruloplasmine  
CPa : Cystéine protéinase a  
CPb : Cystéine protéinase b  
CPA : Cellule présentatrice d'antigène  
DHFR/TS : Dihydrofolate réductase/thymidine synthétase  
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay  
ENVA : École nationale vétérinaire d'Alfort  
ENVL : École nationale vétérinaire de Lyon  
FML : Ligand fucose mannose  
g : Gramme  
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor  
gp63 : Glycoprotéine 63  
H1 : Histone 1  
HASPB : Hydrophilic acylated surface protein B1  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
Hp : Haptoglobine  
IFI : Immunofluorescence indirecte  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IGR : Insects growth regulators  
IL : Interleukine  
IM : Intramusculaire  
iNOS : Inducible nitrogen monoxide synthase  
IV : Intraveineuse  
j : Jour  
kDa : Kilodalton  
kg : Kilogramme  
KMP11 : Kinetoplastid membrane protein 11  
LB : Lymphocyte B  
LeIF : *Leishmania* elongation initiation factor  
*LiESAp* : Antigènes excrétés/sécrétés de promastigotes de *Leishmania infantum*  
LT : Lymphocyte T  
LTc : Lymphocyte T cytotoxique  
LTh : Lymphocyte T helper

L : Litre  
L. : *Leishmania*  
LACK : *Leishmania* homolog of the receptors of activated kinase C  
LmSTI1 : *Leishmania major* stress inducible protein 1  
LPG : Lipophosphoglycane  
MDP : Muramyl dipeptide  
mg : Milligramme  
mL : Millilitre  
mm : Millimètre  
MRP-1 : Multidrug resistance-associated protein 1  
nd : Non déterminé  
NH36 : Nucleoside hydrolase 36  
NK : Natural killer  
NO : Monoxyde d'azote  
P. : *Phlebotomus*  
PCr : Protéine C réactive  
PCR : Polymerase chain reaction  
P-GP : P-glycoprotéine  
pH : Potentiel hydrogène  
PO : *Per os*  
PPA : Protéines de phase aiguë  
PSA-2 : Parasite surface antigen 2  
rVV : Vaccin viral recombinant  
SC : Sous-cutanée  
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise  
SPM : Système des phagocytes mononucléés  
TCL : Test cutané à la leishmanine  
TGF- $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$   
tk : Thymidine kinase  
TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
TSA : Thiol-specific antioxidant  
 $\mu$ g : Microgramme  
 $\mu$ m : Micromètre  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION

La leishmaniose canine est une maladie infectieuse, inoculable, due à la multiplication et à l'expression du pouvoir pathogène d'un protozoaire, *Leishmania infantum*, au sein des cellules du système des phagocytes mononucléés. Ce parasite est transmis par la piqûre de petits diptères : les phlébotomes. Sa prévalence en France est élevée, en particulier sur le pourtour méditerranéen où elle atteint 10 à 18 % dans certaines localités de Provence (Pernot, 2005).

Il s'agit d'une zoonose pour laquelle l'espèce canine constitue dans nos régions le réservoir du parasite. En effet, la leishmaniose viscérale humaine en France est due à la même espèce (*Leishmania infantum*) et au même zymodème (ensemble de souches présentant le même profil enzymatique) de leishmanie. Elle concerne 88 pays et sa prévalence est actuellement estimée autour d'un demi-million de personnes (Fournet, 2008). Les foyers d'endémie sont en extension aussi bien à l'échelle nationale que mondiale.

La leishmaniose canine est une maladie redoutable aux multiples facettes, chronique, difficile à traiter, fréquemment sujette à des rechutes et donc de pronostic réservé. De plus, le caractère zoonotique de la maladie et la place du chien en tant que réservoir et source indirecte de parasites pour l'homme justifient l'importance de la lutte contre la leishmaniose canine. Cette dernière est d'autant plus difficile qu'un grand nombre de chiens sont infectés mais asymptomatiques et que les traitements, dont l'innocuité et l'efficacité sont peu satisfaisantes, aboutissent rarement à la stérilisation parasitaire, le chien restant porteur du parasite.

Les méthodes de lutte contre la leishmaniose canine sont curatives ou préventives.

Peu de traitements ont fait la preuve de leur efficacité et de leur innocuité. De plus, en raison des risques de chimiorésistance, il semble aujourd'hui nécessaire de recourir à une thérapeutique consensuelle, alliant efficacité optimale, diminution des risques de rechute, faible toxicité et respect d'une santé publique de qualité. La recherche de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques pour le chien se heurte au caractère zoonotique de la maladie qui empêche l'utilisation de molécules (pourtant efficaces) réservées à un usage hospitalier, afin d'éviter l'émergence de sources résistantes susceptibles d'infecter l'homme.

La prévention de la leishmaniose canine peut se faire à deux niveaux : la vaccination du chien contre la maladie ou l'éviction des piqûres de phlébotomes. Aucun vaccin n'est actuellement commercialisé en France. En effet, les vaccins sont particulièrement difficiles à mettre en place en raison de la complexité biologique et antigénique du parasite. Cependant, de nombreuses recherches sont en cours et on assiste à l'émergence de plusieurs candidats vaccins prometteurs et à la commercialisation récente de certains d'entre eux dans quelques pays. Les mesures prophylactiques d'éviction des piqûres de phlébotomes sont sanitaires et médicales. Outre l'utilisation d'insecticides et de répulsifs, l'action contre la salive du phlébotome, dont les propriétés améliorent l'infection parasitaire, pourrait être une méthode de prévention de la maladie.

Après avoir rappelé des notions générales sur la leishmaniose canine essentielles à la compréhension du sujet, nous aborderons les nouveautés dans les méthodes de lutte curatives contre la leishmaniose canine, puis celles dans les méthodes préventives que sont la vaccination et la lutte contre le vecteur.



## **I. Généralités sur la leishmaniose canine**

### **A. Définition et importance**

La leishmaniose canine est une maladie infectieuse liée au développement et à la multiplication dans les cellules du système des phagocytes mononucléés d'un flagellé : *Leishmania infantum*, transmis par la piqûre d'un Psychodidé, insecte Diptère Nématocère appartenant au genre *Phlebotomus* (Bourdoiseau, d'après Meunier, 2007).

Ce parasite est responsable d'une affection caractérisée cliniquement par une atteinte viscérale et cutanéomuqueuse et, sur le plan lésionnel, par une atteinte de tous les organes et tissus contenant des cellules macrophagiques (Pernot, 2005).

C'est une maladie chronique, évoluant sur plusieurs mois, difficile à traiter, fréquemment sujette à des rechutes, et donc de pronostic réservé. Il s'agit de plus d'une zoonose, le chien étant une source de parasites pour les phlébotomes qui peuvent transmettre ensuite la maladie à l'homme par piqûre. Le chien constitue le réservoir principal de la leishmaniose humaine.

La leishmaniose humaine en France, due à *Leishmania infantum*, est également appelée «Kala-azar méditerranéen» ou « Kala-azar infantile », par analogie avec la leishmaniose viscérale indienne, due à une autre espèce de leishmanie (*Leishmania donovani*). Les leishmanioses humaines dans le monde, causées par différentes espèces de leishmanies, sont classiquement divisées en leishmanioses viscérales ou Kala-azar, cutanées et cutanéomuqueuses (annexe 1). Cette distinction n'a pas lieu d'être chez le chien, qui exprime lui une leishmaniose générale, atteignant tout l'organisme (Bourdoiseau, d'après Meunier, 2007).

L'importance de la leishmaniose canine est due à son incidence relativement élevée en zone d'endémie (dans certaines zones de Provence, 10 à 18 % des chiens sont infectés, voire davantage).

L'importance médicale tient au fait qu'il s'agisse d'une cause fréquente de consultation, les rechutes étant très courantes.

L'importance économique est liée au coût des consultations, des traitements (souvent à vie), et des méthodes de prophylaxie, très développées en zone d'endémie.

L'importance sanitaire est due au caractère zoonotique de la maladie, qui, bien que rarement exprimé, reste non négligeable (Bussiéras et Chermette, 1992).

## **B. Etiologie**

### **1. Le parasite**

Les leishmanies sont des protozoaires de la classe des Flagellés, de la famille des Trypanosomatidés et du genre *Leishmania*. L'espèce rencontrée en France métropolitaine est *Leishmania infantum* (appelée *Leishmania chagasi* en Amérique tropicale). L'annexe 1 liste les principales espèces de leishmanies pathogènes dans le monde.

#### a) Morphologie

On retrouve le parasite sous deux formes :

- une forme promastigote (figure 1), observée uniquement chez le vecteur et en culture : il s'agit d'un élément allongé, de 15-20  $\mu\text{m}$ , avec un flagelle libre ;

**Figure 1 : Forme promastigote de *Leishmania infantum***

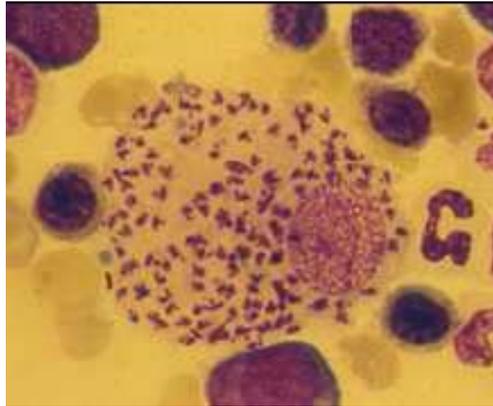


x 1 000

Laboratoire de parasitologie, ENVL

- une forme amastigote (figure 2), observée dans les cellules du système des phagocytes mononucléés du chien, élément globuleux de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre, possédant un flagelle intracytoplasmique (non visible en microscopie optique), un noyau volumineux et un kinétoplaste (Bussiéras et Chermette, 1992).

**Figure 2 : Forme amastigote de *Leishmania infantum***



x 1 000

Laboratoire de parasitologie, ENVL

La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes (Euzéby, 2008) :

- du lipophosphoglycane (LPG) ;
- des glycolipides et glyco-inositolphospholipides ;
- des enzymes :
  - des glycoprotéines : gp63, gp42, gp43 (laminine de surface), gp46 ;
  - des cystéines protéinases ;
  - une protéine de la famille tryptophane-acide aspartique, le LACK.

Il semble que ces composants soient des molécules-clés intervenant dans le métabolisme des parasites et qu'ils puissent jouer un rôle important dans leur pathogénicité, leur virulence et dans les interactions hôte-parasite. Ils représentent donc des cibles moléculaires intéressantes en immunothérapie et en chimiothérapie.

Le cytoplasme contient une kinase jouant un rôle dans la survie des leishmanies dans les cellules parasitées (Euzéby, 2008).

### b) Biologie

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont exceptionnellement rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage et se multiplient par division binaire longitudinale. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage : les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages. Ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (Bussiéras et Chermette, 1992 ; Slappendel et Ferrer, 1998).

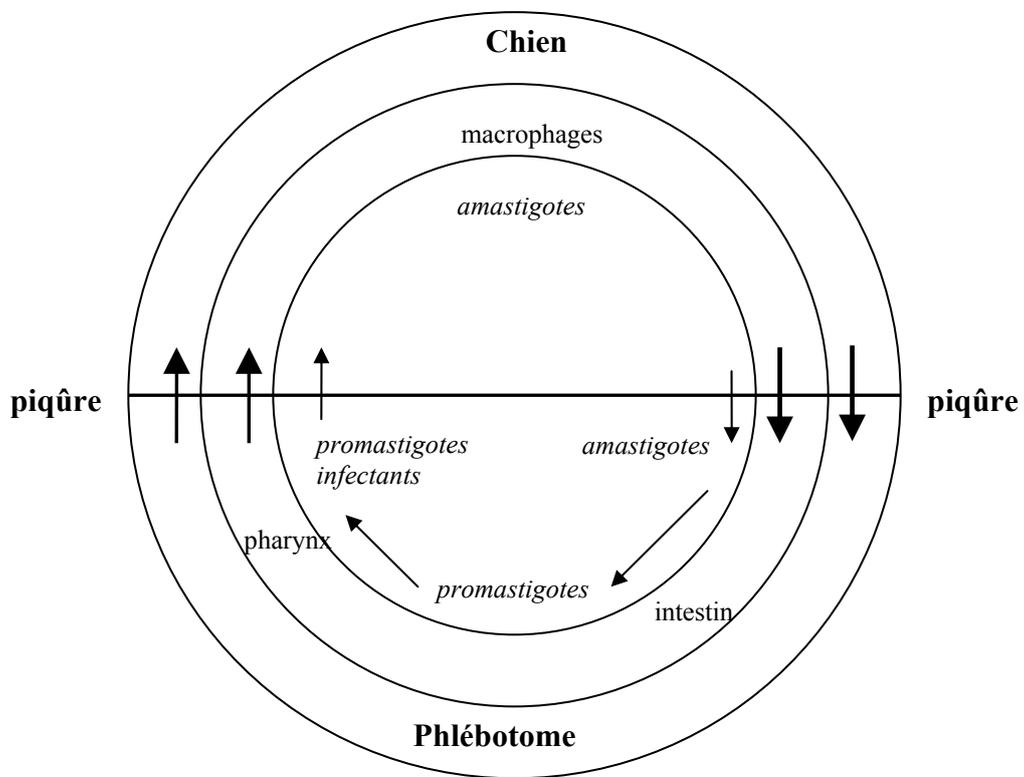
## **2. Le cycle évolutif**

Le cycle évolutif fait intervenir les phlébotomes et les chiens.

Chez les arthropodes, les leishmanies ingérées lors d'un repas sanguin se multiplient par scissiparité, et évoluent dans le tube digestif, en partie supra-pylorique. Seuls des phlébotomes femelles peuvent intervenir comme vecteurs biologiques. Étant donné que les phlébotomes se nourrissent par telmophagie, c'est-à-dire par l'absorption d'un mélange de sang et de lymphé constitué dans le derme suite à l'action traumatisante des pièces buccales et la sécrétion d'une salive histolytique, ce sont essentiellement des leishmanies présentes dans le derme qui assurent le passage à l'arthropode (Bussiéras et Chermette, 1992).

Les leishmanies ont un double mode de vie pour un double habitat : elles sont intracellulaires chez le chien et extracellulaires chez le vecteur. La forme amastigote ingérée par le vecteur se transforme en leishmanie promastigote, qui se multiplie et sera inoculée au chien. Le cycle évolutif est dixène, et dure 2 à 3 semaines au bout desquelles des promastigotes infectants pour les vertébrés sont présents dans les pièces buccales de l'insecte (Bussiéras et Chermette, 1992) (figure 3).

Figure 3 : Cycle évolutif de *Leishmania infantum*



D'après Bussiéras et Chermette, 1992

### 3. Le vecteur

#### a) Classification et morphologie

Le phlébotome est un Diptère Nématocère Psychodidé, de couleur gris jaunâtre. Il est de petite taille (2-3 mm) et son corps est grêle. Il possède une paire d'ailes lancéolées velues, dressées en « V » au repos. Son thorax bombé lui donne un aspect bossu (figure 4) (Bussiéras et Chermette, 1991).

**Figure 4 : *Phlebotomus* spp.**



Site internet : Wikipedia

#### b) Biologie

- *Nutrition*

La femelle phlébotome est telmophage : elle se nourrit d'un mélange de sang et de lymphes formé à la suite d'une piqûre, assurée par des pièces buccales de fort calibre. Ce repas s'effectue de manière interrompue, à la suite de plusieurs piqûres, sur le même individu ou non. Le repas se compose aussi de l'absorption de sucres obtenus en particulier à partir de sève végétale. Cet apport se révèle d'ailleurs indispensable à la transformation et à la multiplication des leishmanies dans le tube digestif du phlébotome (Bussiéras et Chermette, 1991). La salive inoculée est allergisante (érythème, douleur) et participe activement à l'installation et la multiplication des leishmanies chez l'hôte (Killick-Kendrick R et M, 1999).

- *Habitat*

Les phlébotomes sont présents en France jusqu'à hauteur de la vallée de la Loire, mais, dans cette zone, sont répartis de façon très hétérogène, selon de nombreux facteurs climatiques et biologiques : l'importance du vent (les biotopes abrités étant très favorables au repos et à la reproduction du phlébotome), la présence d'humus, de matières organiques (gîtes larvaires), la nature de la végétation (grande importance de la chênaie mixte à quelques centaines de mètres d'altitude), la température (optimum : 20°C) et l'humidité (optimum :

80 %) (Bussiéras et Chermette, 1991).

On rencontre en France deux espèces de phlébotomes intervenant dans la transmission de la leishmaniose : *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus ariasi*. *Phlebotomus ariasi* est un phlébotome actif l'été, essentiellement retrouvé dans le Languedoc et les Cévennes. Il est présent à l'extérieur des habitations sur les petites collines. Il confère un caractère rural à l'endémie dans cette région. *Phlebotomus perniciosus* est ubiquiste, présent sur l'ensemble du territoire français. Il n'est cependant abondant que dans la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur, durant une période assez longue et avec une densité suffisante pour maintenir une endémie leishmanienne. Il vit près des habitations, avec une activité crépusculaire. Sa démographie montre un pic printanier et un pic automnal. Il craint le vent et ne se rencontre pas sur les côtes, mais plutôt en arrière-pays. Il confère un caractère rural et sub-urbain à l'endémie (Pernot, 2005).

Dans nos régions tempérées, l'activité vectrice des phlébotomes est maximale en fin d'été, début d'automne.

- *Reproduction*

La longévité de ces insectes est de l'ordre de quelques mois. Un cycle gonotrophique complet dure environ 6 semaines. La femelle ne prend qu'un seul repas sanguin par cycle. Au moins 6 jours après ce repas de sang, elle pond entre 80 et 100 œufs qu'elle dépose dans un gîte humide, sombre et sablonneux. Quatre stades larvaires se succèdent ensuite et aboutissent à la formation d'une nymphe qui évoluera en imago. La survie hivernale est assurée par les stades larvaires en diapause. Les adultes apparaissent au printemps et sont présents pendant toute la période estivale, jusqu'à l'automne. Toutefois la longévité des adultes varie d'un endroit à un autre, en fonction des conditions climatiques (Bussiéras et Chermette, 1991 ; Killick-Kendrick R et M, 1999).

## C. Epidémiologie

### 1. Descriptive

La leishmaniose (humaine et animale) est une maladie cosmopolite, présente en Afrique, Moyen-Orient, Amérique du Sud, Inde, et sur le pourtour méditerranéen. Elle concerne 88 pays et la prévalence mondiale de la maladie humaine est actuellement estimée autour d'un demi-million de personnes (Fournet, 2008).

En France, les foyers de leishmaniose canine sont provençal, cévennois, corse, avec une extension dans les vallées du Sud-Ouest et du Rhône. Des enquêtes ponctuelles réalisées dans le sud de la France révèlent que la prévalence de l'infection parasitaire canine varie selon les communes de 5 à 25 % chez les chiens soumis au dépistage (Coulibali *et al.*, 2004).

Des cas spontanés en zone non endémique sont observés : cas ectopiques, exceptionnels, pour lesquels les circonstances de la contamination ne sont pas toujours connues. Plus importants sont les cas de chiens leishmaniens examinés en zone non endémique mais contaminés dans le sud du pays et qui expriment la maladie dans leur lieu de résidence habituel. La circulation de plus en plus importante de nos compagnons ne fait qu'augmenter le nombre de cas diagnostiqués (Bourdoiseau *et al.*, 2008).

L'aire de diffusion de la leishmaniose en France s'étend de plus en plus rapidement, à la faveur du réchauffement et des modifications du paysage. Chez les humains, les cas sont de plus en plus fréquents, en particulier chez ceux au système immunitaire fragilisé, comme les personnes contaminées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : depuis 2004, outre les 6 000 chiens infectés, on enregistre chaque année une trentaine de personnes atteintes (Fournet, 2008).

Les infections ont lieu du printemps à l'automne, période d'activité des phlébotomes. L'expression clinique est, elle, répartie sur toute l'année du fait d'une incubation extrêmement variable.

## **2. Analytique**

### **a) Espèce réservoir**

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

Les chiens, en raison de cette abondance de parasites dans le derme et de la fréquence de leur infection, constituent les véritables réservoirs habituels de la maladie humaine. Cependant, *Leishmania infantum* affecte également le chat, des rongeurs sauvages et des carnivores sauvages (renard) mais le rôle épidémiologique de ces animaux en tant que réservoir de la maladie humaine est inconnu (Bussiéras et Chermette, 1992).

### **b) Transmission**

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

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

Enfin, la transmission *in utero* est également possible mais probablement exceptionnelle (Bussiéras et Chermette, 1992). De même, une transmission vénérienne n'est pas exclue car les leishmanies sont présentes dans le sperme et des chiennes ont été infectées par cette voie (Silva *et al.*, 2009).

### **c) Facteurs favorisants**

L'abondance des vecteurs favorise les piqûres. Les phlébotomes sont particulièrement actifs et abondants dans le Midi de la France en été, dans des zones protégées du vent, au crépuscule, près du sol.

Le mode de vie des chiens est un facteur favorisant l'infection, car la maladie est rare chez les chiens d'appartement, et l'on constate que l'urbanisation totale d'un secteur entraîne la disparition de la leishmaniose. Au contraire, le développement des villas des banlieues des villes du Midi de la France, avec plantations, arrosages, chiens de garde, constitue un élément très favorable à l'extension de la maladie.

Enfin, on a pu considérer que le pelage à poils longs pouvait jouer un rôle protecteur ; mais en réalité les vecteurs attaquent des zones peu protégées par les poils (chanfrein, conques auriculaires) (Bussiéras et Chermette, 1992).

#### **D. Pathogénie et symptômes**

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

Les leishmanies développent des stratégies de survie dans ce milieu hostile. Elles utilisent pour leur pénétration la fixation aux récepteurs du complément et évitent aussi l'induction d'une réaction oxydative. Elles possèdent en outre des enzymes, comme la superoxyde dismutase, qui les protègent contre l'action des ions superoxydes, et un revêtement de lipophosphoglycane qui piègent les métabolites de l'oxygène et assurent une protection contre l'action des enzymes. La glycoprotéine gp63 inhibe l'action des enzymes lysosomales des macrophages (Roitt *et al.*, 1993).

Malgré l'infection macrophagique, l'issue de la maladie est dépendante des réactions immunitaires qui se mettent en place, et l'infection évolue soit vers l'élimination du parasite, soit vers sa prolifération incontrôlée, ce que nous verrons ultérieurement.

La prolifération des leishmanies dans les macrophages provoque la destruction de ceux-ci et la réaction du système des phagocytes mononuclés : prolifération intense dans la rate, le foie, les nœuds lymphatiques, entraînant une hypertrophie de ces organes, une anémie par hyperspl nie et des lésions cutanées par invasion macrophagique du derme. Des lésions sont également provoquées par la formation de complexes immuns et d'auto-anticorps se déposant dans les glomérules rénaux, dans les articulations, sur les hématies, d'où hémolyse extravasculaire (Bussiéras et Chermette, 1991).

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

Les neuf symptômes les plus fréquemment rencontrés dans la leishmaniose canine sont : des lésions dermatologiques (figure 5), un amaigrissement ou une anorexie (figure 6), une lymphadénopathie localisée ou généralisée, des lésions oculaires, une épistaxis, un abattement, une anémie, une insuffisance rénale, de la diarrhée ; toute combinaison de symptômes étant possible. Ces signes cliniques apparaissent au terme d'une période d'incubation dont la durée varie entre 3 mois et 1 an après l'inoculation des leishmanies par le phlébotome (Ferrer, 1999 ; Fournet, 2008). Le tableau 1 résume les symptômes observables.

**Figure 5 : Lésions dermatologiques de la truffe et du pavillon auriculaire chez un chien leishmanien**



*Laboratoire de Parasitologie, ENVA*

**Figure 6 : Cachexie chez un Dogue Allemand leishmanien**



*Laboratoire de Parasitologie, ENVL*

**Tableau 1 : Symptômes observés lors de leishmaniose canine**

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

*D'après Meunier, 2007*

Cependant, certains chiens infectés par *Leishmania infantum* ne développent pas la maladie et sont totalement asymptomatiques. Ils peuvent seulement présenter une réaction locale appelée « chancre d'inoculation », à l'endroit de l'inoculation des parasites par le phlébotome. Cela se manifeste par un nodule cutané alopécique, ulcéré et croûteux, de 1 à 3 cm de diamètre, non prurigineux et modérément douloureux. Il se situe souvent sur le chanfrein ou les pavillons auriculaires. Ce nodule peut disparaître spontanément au bout de quelques mois (Ferrer, 1999).

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

## **E. Diagnostic**

### **1. Clinique**

Il est fondé sur l'observation des symptômes généraux et spécifiques présentés par le chien. Le tableau clinique est souvent protéiforme et il ne faut donc pas se fonder sur une liste réduite et stéréotypée de symptômes.

Ces symptômes sont associés à des éléments épidémiologiques : tout chien vivant ou ayant vécu, même de façon brève (quelques jours), en zone d'endémie, même si ce séjour a eu lieu plusieurs mois auparavant, doit être considéré comme suspect de leishmaniose, d'autant plus qu'il s'agit d'un animal vivant en extérieur, suffisamment âgé (au moins quelques mois), et présentant un ou plusieurs des symptômes évoqués précédemment.

### **2. Biologique**

#### **a) Méthodes non spécifiques**

- *Examens hématologiques*

La leishmaniose peut entraîner des modifications de l'hémogramme, comme citées précédemment ; elles ne sont pas toujours observées mais on peut parfois noter (Papierok, 2002 ; Keck, 2004) :

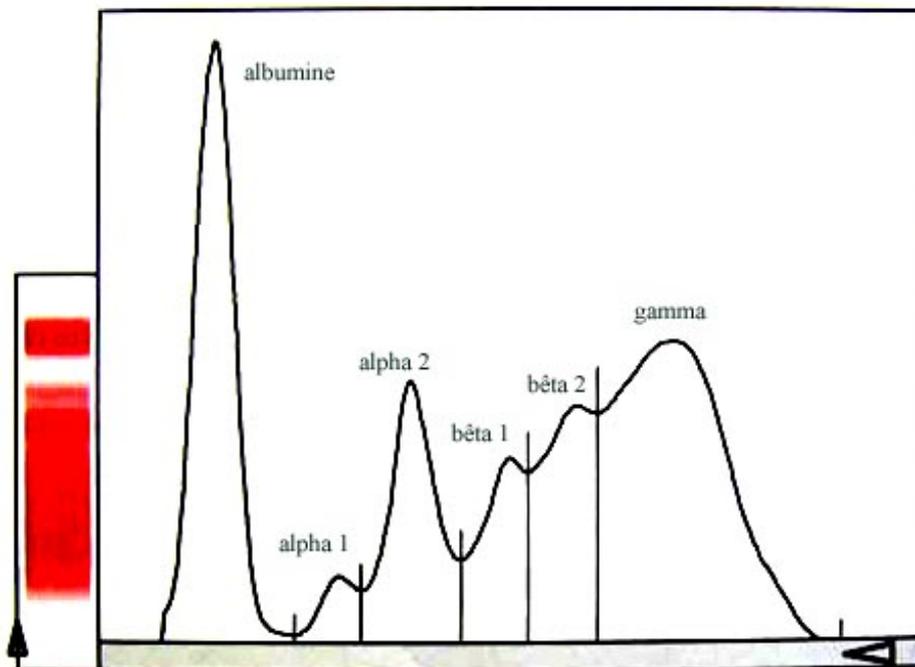
- une anémie arégénérative normochrome normocytaire et/ou une thrombocytopenie
- une leucocytose avec granulocytose en début de maladie
- une leucopénie plus tardive
- une monocytose (fréquemment)
- des troubles de la coagulation : les temps de saignement et de coagulation sont souvent augmentés.

- *Examens biochimiques*

Les protéines totales sont souvent augmentées : en général leur taux est supérieur à 80 g/L. Leur électrophorèse met en évidence un pic bêta-gamma (figure 7). Une hyperglobulinémie est présente associée à une hypoalbuminémie dans plus de 90 % des cas. Le rapport albumine sur globuline peut être un paramètre intéressant dans le cadre du suivi thérapeutique, car il augmente progressivement.

Les paramètres rénaux peuvent également être affectés. Ils sont à évaluer et à suivre en cours de traitement car les molécules utilisées sont néphrotoxiques (Papierok, 2002 ; Keck, 2004).

**Figure 7 : Electrophorèse des protéines sériques d'un chien leishmanien**



*D'après G. Lubas*

- *Formoleucogélification*

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

## b) Méthodes spécifiques

- *Mise en évidence du parasite*

C'est la seule façon d'obtenir un diagnostic de certitude. Les prélèvements possibles pour la réaliser sont (Papierok, 2002) :

- une ponction de moelle osseuse (premières sternèbres, jonction chondro-costale) ou de noeud lymphatique ;
- une ponction d'un nodule cutané à l'aiguille fine ;
- un frottis conjonctival ;
- un prélèvement de lymphé dermique par test du copeau cutané ;
- un calque cutané d'une lésion ulcéralive ;
- une biopsie cutanée pour réaliser une histologie.

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

- La microscopie

Les parasites intra-monocytaires sont recherchés après fixation à l'alcool et coloration par la technique de May-Grümwald-Giemsa de calques cutanés, d'adénogrammes ou de myélogrammes.

Cette méthode est réalisable au cabinet par le vétérinaire praticien un peu expérimenté et permet en cas de mise en évidence du parasite de confirmer très simplement et rapidement le diagnostic. Malheureusement sa sensibilité est faible (60 %) (Papierok, 2002).

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

La probabilité d'observer les leishmanies est plus importante en début d'évolution de la maladie, la charge parasitaire étant en effet plus élevée car la multiplication est plus intense, elle est ensuite limitée du fait de la réponse immunitaire de l'organisme (Hubert, 2006).

- La culture du parasite

Le parasite est cultivé dans le milieu de Nicolle-Novy-Mac Neal à partir d'un prélèvement. C'est la méthode de référence, mais elle nécessite quelques semaines d'incubation. Elle n'est réalisée que par les laboratoires de recherche (Papierok, 2002).

- La PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est la plus sensible des trois techniques : sa sensibilité est de 97 %. Elle met en évidence l'ADN de *Leishmania*, même présent en faible quantité, dans les ponctions ganglionnaires ou de moelle. C'est la technique de choix pour l'établissement de la parasitémie.

Elle nécessite des équipements sophistiqués et est très sensible aux contaminations, elle est donc réalisée uniquement dans des laboratoires spécialisés. Il est important de noter que 80 % des chiens asymptomatiques vivant en zone d'enzootie peuvent présenter de l'ADN de *Leishmania* dans la peau et les muqueuses mais seulement 10 % dans les ganglions (Papierok, 2002).

L'inconvénient de cette technique est qu'elle ne fait pas la différence entre les leishmanies vivantes et l'ADN leishmanien résiduel ; il est donc préférable de l'utiliser pour confirmer le diagnostic et non dans le cadre d'un suivi thérapeutique (Hubert, 2006).

- Les techniques d'immunomarquage

Cette technique peut être utilisée lorsque l'histopathologiste n'a pas mis en évidence de parasites malgré la forte suspicion de leishmaniose. Leur but est de révéler la présence d'antigènes présents dans le prélèvement. Il existe plusieurs méthodes (Lamothe *et al.*, 2004).

- *Méthodes sérologiques*

Elles mettent en évidence et quantifient la présence d'anticorps canins spécifiques de *Leishmania infantum* chez le sujet. Elles ne permettent pas d'établir un diagnostic de certitude mais uniquement de révéler que l'animal a déjà été exposé au parasite (mais des leishmanies sont en général toujours présentes). Un animal en début de contamination ou ayant une immunité cellulaire solide peut se révéler faussement négatif. Un résultat positif correspond à un animal ayant rencontré le parasite et qui a élaboré des anticorps spécifiques, il peut être en début de maladie ou être en état d'immunité acquise et être asymptomatique (Papierok, 2002).

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

- Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte, ou IFI, est la méthode quantitative de référence agréée par l'Office International des Épizooties. Elle est effectuée en utilisant des formes promastigotes de culture comme antigène. Le seuil de positivité est habituellement fixé à 1/100 (ou 1/80).

C'est une méthode considérée comme sensible et spécifique. La sensibilité varie entre 92 et 99 % (Papierok, 2002 ; Keck, 2004).

- ELISA

La technique ELISA est une méthode quantitative qui est préférentiellement utilisée par les épidémiologistes car elle a comme propriété d'être automatisable. Elle est au moins aussi sensible que l'IFI, et sa lecture est moins subjective car elle est réalisée par un spectrophotomètre (Papierok, 2002).

#### ○ Techniques d'agglutination

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

Leur sensibilité est de 95 % et leur spécificité de 94 % (Papierok, 2002 ; Hubert, 2006).

#### ○ Western Blot

Le Western Blot est une méthode qualitative mais elle est très sensible et très spécifique. Elle est pour cela considérée comme la méthode de référence en sérologie. Elle permet de détecter les anticorps spécifiques d'antigènes de *Leishmania infantum* préalablement séparés par électrophorèse (Papierok, 2002).

### **3. En pratique**

Il est essentiel de choisir les analyses les plus intéressantes en fonction :

- de l'utilisation que l'on veut faire du test : diagnostic de la maladie ou enquête épidémiologique ;
- de notre zone d'exercice : en zone d'endémie il est important de choisir des méthodes très sensibles pour éviter les faux positifs ;
- du coût ;
- et du stade de la maladie : la PCR permet une détection plus précoce que l'apparition des anticorps et induit moins de faux positifs (Lamothe *et al.*, 2004).

Les divers examens spécifiques peuvent être utilisés selon deux objectifs :

- si l'on souhaite confirmer une suspicion clinique (notamment en zone d'enzootie) il faut :
  - tenter une observation directe au microscope à partir de calques cutanés, d'adénogramme ou de myélogramme. Si des éléments parasitaires sont présents, le diagnostic est posé ;
  - si le parasite n'a pas été isolé, effectuer une sérologie à partir de sang prélevé sur tube sec ; il est préférable d'associer deux tests (ELISA et IFI) ;
  - si ces analyses sont négatives mais que la suspicion clinique demeure, envisager une PCR réalisée sur un prélèvement de noeud lymphatique ou, à défaut, de sang.
- si l'on souhaite contrôler un animal ne présentant pas de symptômes, il faut :
  - faire un contrôle sérologique environ 2 mois après la période de contamination,
  - ou une PCR très sensible à la fin de la saison de contamination (Keck, 2004).

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

## **F. Réponse immunitaire**

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

L'infection d'un chien par *Leishmania* ne se manifeste pas nécessairement par l'expression de la maladie. On distingue ainsi, au sein de chiens infectés, des animaux symptomatiques et des animaux asymptomatiques. Cette dualité peut suggérer une différence dans la réponse immunitaire.

### **1. Rappels d'immunologie**

L'immunité met en jeu deux processus :

- l'immunité non spécifique, ou immunité innée, d'action immédiate, qui fait intervenir entre autres les cellules douées de phagocytose ;
- l'immunité spécifique, ou immunité acquise, qui se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction ; elle peut garder la mémoire de la « rencontre ».

#### a) Les cellules de l'immunité

- *Les lymphocytes*

Ils sont présents dans le sang, la lymphe et tous les organes lymphoïdes. Deux types principaux de lymphocytes coexistent : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Ce sont des cellules effectrices de l'immunité acquise. Chaque lymphocyte porte un récepteur lui permettant d'identifier un déterminant antigénique (épitope) (Lemahieu, 2004).

On distingue deux populations de lymphocytes T :

- les LT CD8 sont des lymphocytes précurseurs des lymphocytes cytotoxiques (LTc) ;
- les LT CD4 sont des lymphocytes précurseurs des lymphocytes helper ou auxiliaires (LTh) : ils ont entre autres rôles celui d'activer les cellules de la réaction immunitaire : macrophages, LB, LTc. Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les LTh se différencient soit en LTh1 qui orientent la réponse immunitaire vers une immunité à médiation cellulaire (LTc), soit en LTh2 qui orientent la réponse immunitaire vers une immunité à médiation humorale (production d'anticorps).

- *Les cellules NK*

Les cellules NK (Natural Killer) ont été qualifiées de cellules tueuses naturelles car elles sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable, au contraire des lymphocytes T. De nombreux mécanismes de régulation empêchent les cellules NK de s'attaquer aux cellules saines, et

l'activation des cellules NK dépend entre autres de la diminution d'expression du CMH I à la surface des cellules anormales. (Lemahieu, 2004).

- *Les cellules présentatrices d'antigènes*

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont des cellules diverses qui ont en commun la faculté d'exprimer les molécules CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II. Elles présentent les antigènes aux LT4 (Lemahieu, 2004).

Les principales CPA sont :

- le système des phagocytes mononucléés (SPM) : monocytes et macrophages,
- les cellules dendritiques (dont les cellules de Langerhans),
- les lymphocytes B.

- *L'activation des lymphocytes*

L'activation des lymphocytes dépend d'abord de la reconnaissance simultanée de l'antigène et de la molécule du CMH de classe I ou de classe II :

- molécules de classe I + peptide endogène reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques ;
- molécules de classe II + peptide exogène reconnus par les lymphocytes T helpers.

La reconnaissance de l'antigène constitue le premier signal, mais, pour que le lymphocyte soit activé, un second signal est nécessaire : il est fourni par des molécules de costimulation et par des cytokines.

Les lymphocytes B activés se différencient en plasmocytes qui vont produire les anticorps et les lymphocytes T activés en LTc, qui sécrètent des molécules cytotoxiques et des facteurs solubles appelés cytokines, et deviennent les acteurs de l'immunité à médiation cellulaire (Lemahieu, 2004).

## b) Les molécules de l'immunité

- *Les cytokines*

Les cytokines interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires. Elles exercent leurs effets sur les cellules qui les ont produites (effet autocrine), sur d'autres cellules proches (effet paracrine) ou encore agissent à distance sur des organes ou tissus (effet endocrine) (Lemahieu, 2004).

Ce sont des petites glycoprotéines (poids moléculaire situé entre 10 et 50 kDa). Il n'y a pas d'homologie dans leur structure. Elles sont toutes synthétisées *de novo*. On ne les trouve généralement pas dans les cellules au repos et elles ne sont produites qu'à la suite d'une activation.

Les lymphocytes Th sont les principales cellules productrices, mais d'autres cellules en produisent également : presque toutes les cellules du système immunitaire, les fibroblastes, les cellules de l'endothélium vasculaire, les cellules épithéliales.

Les cytokines agissent "en cascade" (l'une peut induire la production de l'autre) et sont pléiotropes (plusieurs effets sur plusieurs cellules cibles). Elles peuvent avoir des actions redondantes (plusieurs cytokines peuvent partager les mêmes fonctions), synergiques ou antagonistes. Qui plus est, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et une cellule donnée produit le plus souvent plusieurs cytokines distinctes.

Elles se fixent à des récepteurs membranaires spécifiques, plus ou moins abondants. L'expression de ces récepteurs est souvent soumise à l'action des cytokines elles-mêmes.

Les principales cytokines aujourd'hui connues sont les interleukines (IL), les interférons (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc), les facteurs de croissance hématopoïétiques (les "CSF"), le facteur de nécrose des tumeurs (TNF- $\alpha$ ) et le « transforming growth factor  $\beta$ », TGF- $\beta$ .

L'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (principalement sécrétés par les macrophages) jouent un rôle majeur dans l'inflammation.

L'IL-1 est aussi un cosignal d'activation des lymphocytes Th : elle stimule leur prolifération, favorise l'expression du récepteur de l'IL-2 et augmente leur production de cytokines.

L'IL-2 est avant tout un puissant stimulant des lymphocytes T, qui en expriment le récepteur spécifique lorsqu'ils sont activés.

Les IL-4, 5 et 6 sont principalement des activateurs des cellules B, et sont produites notamment par les cellules Th2 : elles favorisent la différenciation des lymphocytes B et contribuent au "switch" (ou "commutation isotypique") : c'est-à-dire à la synthèse d'anticorps de différentes classes.

Entre autres fonctions, l'IFN- $\gamma$  active les macrophages et augmente l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, stimulant donc la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T cytotoxiques.

Il est d'ailleurs possible de distinguer deux sous-groupes de cellules T "helper", en fonction de leur production de cytokines (tableau 2) :

- les cellules Th1, qui synthétisent de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12, sont les médiateurs de l'hypersensibilité retardée, des interactions Th-Tc et de l'immunité cellulaire anti-infectieuse et anti-tumorale ;
- les cellules Th2, productrices d'IL-4, 5, 6 et 10, sont les auxiliaires des lymphocytes B.

**Tableau 2 : Profil de sécrétion des cytokines par les cellules Th**

<b>Cytokines</b>	<b>Th1</b>	<b>Th2</b>
IL-2	++	-
IL-12	++	-
IFN- $\gamma$	++	-
TNF- $\alpha$	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	++
IL-10	-	++

*D'après Pinelli et al., 1999*

La provenance et le rôle des principales cytokines impliquées dans la réaction immunitaire sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Rôles des principales cytokines impliquées dans la réaction immunitaire**

<i>Cytokine</i>	<i>Cellules sources</i>	<i>Actions</i>
<b>Cytokines pro-inflammatoires</b>		
<b>IL-1</b>	Macrophages activés Cellules dendritiques	- Costimulation de la prolifération des LT et LB - Favorise l'inflammation - Cause la fièvre
<b>IL-6</b>	Macrophages Cellules dendritiques Cellules endothéliales Cellules Th2	- Différenciation des LB en plasmocytes - Synthèse et sécrétion de protéines inflammatoires par le foie
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrophages Cellules dendritiques Cellules Th1	- Mort cellulaire non spécifique - Ralentissement de la croissance des tumeurs - Dommages sélectifs aux vaisseaux sanguins - Chimiotactisme des granulocytes - Activation des LT, des phagocytes et des granulocytes éosinophiles
<b>Cytokines anti-inflammatoires</b>		
<b>IL-10</b>	Macrophages Cellules Th2	- Inhibe la production d'IL-12 - Inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Macrophages LT CD8 <sup>+</sup>	- Inhibe la production des cellules T cytotoxiques - Inhibe l'activité des NK - Suppression locale des réactions immunitaires
<b>Cytokines impliquées dans la réponse immunitaire acquise</b>		
<b>IL-2</b>	Cellules Th	- Stimule la prolifération des LT et des LB - Active les cellules NK
<b>IL-4</b>	Cellules Th2	- Agent de costimulation des LB activés - Incite les plasmocytes à sécréter plus d'IgE - Déclenche la différenciation des LTh2 et inhibe la différenciation Th1
<b>IL-12</b>	Macrophages Cellules dendritiques	- Différenciation Th1 - Stimule l'activité des LT <sub>C</sub> et des cellules NK - Stimule la synthèse de l'IFN- $\gamma$
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Cellules Th1 LT <sub>C</sub> Cellules NK	- Activation des macrophages - Développement des LTh1 - Incite les plasmocytes à sécréter plus d'IgG

*D'après Nicolas, Immunologie médicale*

- *Les immunoglobulines*

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines comprenant quatre chaînes : deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques réunies entre elles par des ponts disulfures. Elles sont divisées en 5 classes : IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), IgM, IgA (IgA1 et IgA2), IgD et IgE. Les immunoglobulines synthétisées par les plasmocytes diffusent dans le sérum et les humeurs et se lient à l'antigène pour former des immuns complexes éliminés par les phagocytes (Lemahieu, 2004).

## **2. Les réactions immunitaires lors de leishmaniose : modèle général**

Après l'inoculation de promastigotes métacycliques par le phlébotome, les leishmanies se transforment en amastigotes intra-macrophagiques, macrophages à l'intérieur desquels le parasite peut persister et se multiplier (à la différence d'autres protozoaires), permettant ensuite sa dissémination dans l'organisme et la généralisation de l'infection.

### **a) Immunité innée**

- *Les antigènes majeurs du parasite : gp63 et LPG*

Le processus immunologique commence par la présentation aux cellules immunocompétentes des antigènes leishmaniens. Les antigènes majeurs du parasite sont la gp63 et le LPG ou lipophosphoglycane de surface.

La gp63, glycoprotéine majeure de surface de la leishmanie, est un antigène essentiel impliqué dans le processus d'échappement au système de défense de l'organisme et dans sa capacité à le coloniser. En outre, la gp63 est l'un des antigènes susceptible d'induire une réaction immunitaire favorable. Elle est l'un des antigènes majeurs présentés par les cellules présentatrices d'antigènes au système immunitaire compétent (Bourdoiseau, 2000).

- *Rôle des macrophages*

Le premier moyen de défense de l'hôte est une réponse immunitaire non spécifique. Suite à l'infection, les macrophages tissulaires ou sanguins constituent la première ligne de défense, car ils ont pour fonction de phagocyter les leishmanies et de présenter leurs antigènes aux lymphocytes, initiant ainsi une réponse plus ou moins spécifique de ces cellules. Le macrophage joue le rôle de cellule présentatrice d'antigènes aux lymphocytes, en particulier aux lymphocytes T auxiliaires (ou « helper » : LTh) qu'il stimule grâce à une interleukine, l'IL-1 (Mossalayi et Appriou, 1999 ; Bourdoiseau, 2000).

La survie des parasites à l'intérieur des macrophages montre qu'ils ont résisté à l'action lytique exercée par l'environnement intracytoplasmique (pH acide : 4,5-5,0, enzymes lysosomales, hydrolases, etc.). En effet, plusieurs mécanismes permettent aux leishmanies d'y échapper. Elles ont la capacité d'inhiber la protéine kinase C, une enzyme intervenant dans la synthèse de métabolites oxygénés par les macrophages. Elles produisent par ailleurs des lipophosphoglycans qui empêchent la maturation des phagolysosomes macrophagiques.

Mais une réponse immunitaire spécifique, cellulaire et humorale, se met également en place (Mossalayi et Appriou, 1999 ; Baneth, 2004).

- *Rôle des cellules de Langerhans*

On considère généralement que la présentation des antigènes est également effectuée par les cellules de Langerhans, mais cette conception est mise en doute par certains auteurs ayant étudié le processus chez les souris soumises à l'infection par *Leishmania major* (Moreno, 2007). La réponse initiale à l'infection serait le fait des cellules dendritiques dermiques, tandis que les cellules épidermiques de Langerhans seraient responsables des phénomènes d'évasion immunitaire des parasites : les promastigotes qui ont pénétré dans les cellules de Langerhans échapperaient aux réactions immunitaires. Cette hypothèse rendrait compte de l'incapacité des cellules de Langerhans activées par les antigènes leishmaniens de conférer l'immunité.

Les cellules dendritiques élaborent de l'IL-12, qui active les cellules tueuses naturelles (cellules NK), les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Les cellules tueuses sécrètent de l'IFN- $\gamma$  qui active les macrophages, puis lysent les macrophages parasités ; les polynucléaires, activés par l'IFN- $\gamma$  détruisent les leishmanies par action oxydative (action du monoxyde d'azote : NO) (Euzéby, 2008).

Lorsque l'agent ne peut être éliminé par l'activité anti-microbienne non spécifique, une réponse spécifique peut être établie, dirigée en partie par les cytokines et anticorps dérivés des lymphocytes reconnaissant de manière spécifique les antigènes parasitaires exprimés sur les macrophages. Cependant, un échappement à ces défenses est souvent observé, aboutissant à l'apparition des signes cliniques (Mossalayi et Appriou, 1999).

#### b) Immunité acquise

Les réactions immunologiques à l'infection leishmanienne sont bien connues dans le cas de la leishmaniose dermatotrope à *Leishmania major* inoculée à des souris résistantes : réponse de type Th1 productrice de taux élevés d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et de NO.

- *Activation des macrophages et synthèse de NO*

Le principal mécanisme impliqué dans la réponse immunitaire protectrice est l'activation des macrophages par IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  pour tuer les amastigotes intracellulaires.

Les métabolites de l'oxygène ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ) sont produits par les macrophages activés par ces cytokines. Ces macrophages libèrent davantage d'ions superoxydes et d'eau oxygénée que les macrophages résidents normaux, et leurs mécanismes de toxicité indépendants de l'oxygène sont plus efficaces (Euzéby, 2008).

Le monoxyde d'azote (NO) est l'un des produits cytotoxiques dont la synthèse est fortement stimulée par des cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  qui agissent en synergie. C'est un métabolite de la L-arginine, produit par les macrophages et les cellules endothéliales. Il contribue à la résistance de l'hôte dans la leishmaniose en provoquant la destruction des

parasites (Roitt *et al.*, 1993). Sa production est le résultat de l'activation des macrophages parasités, par la voie génératrice de NO synthase : iNOS (i=inducible) (Euzéby, 2008).

L'implication de la voie du NO dépendant de la L-arginine dans la destruction des *Leishmania* par les macrophages est démontrée par plusieurs faits : l'addition de l'inhibiteur de NOS, la N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine, inverse l'activité leishmanicide et les donneurs chimiques de NO induisent la destruction extracellulaire et intracellulaire des espèces de leishmanies (Mossolayi et Appriou, 1999).

- *Sensibilité ou résistance : le modèle murin*

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

L'acquisition de l'immunité protectrice dépend de la capacité de l'organisme à élaborer une **réaction de type Th1**, de nature cellulaire, avec des cellules CD4 produisant de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-12 et de l'IL-2, qui joue un rôle primordial ; le degré de la protection conférée est fonction du nombre des cellules T CD4 intervenant. De ce processus résulte la constitution de granulomes, au sein desquels s'exerce la capacité leishmanicide des macrophages, générateurs de NO (action des leucotriènes) et des neutrophiles : action des substances oxygène-réactives (Euzéby, 2008).

La **réaction Th2**, productrice d'anticorps, n'est pas protectrice : des taux élevés d'IgG sont observés au cours de leishmanioses chroniques, n'ayant pas tendance à la guérison. La réaction Th2 favorise plutôt la pathogénicité des leishmanies par la production d'IL-4, d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , qui désactivent la réaction Th1. Ainsi, la voie Th2 est à l'origine de la persistance d'une population parasitaire (Euzéby, 2008).

Alors que la résistance à l'infection reste largement associée à l'action de l'IL-12 produit par une réponse de type Th1, les études utilisant des souris déficientes pour certains gènes ont mis en question le rôle de l'IL-4 dans la sensibilité à la maladie ainsi que des autres candidats impliqués : il a été montré que l'IL-4 n'a pas de rôle aggravant dans la leishmaniose murine. Non seulement les réponses Th2 peuvent être induites indépendamment de l'IL-4 mais aussi que dans certaines circonstances l'IL-4 peut orienter vers la production d'IL-12 et d'une réponse de type 1 (Alexander et Bryson, 2005 ; Alexander et McFarlane, 2008 ; Noben-Trauth, 2000).

L'IL-10 est clairement, quant à elle, la principale cytokine immunosuppressive favorisant l'apparition de la maladie et contribuant également de manière significative au maintien d'infections aussi bien chroniques que latentes (Alexander et Bryson, 2005).

L'association de la voie Th1 à la résistance et de la voie Th2 à la sensibilité aux leishmanies intracellulaires est en réalité une simplification d'un système bien plus complexe d'interactions régulatrices et contre-régulatrices. Ces mécanismes dépendent des espèces de *Leishmania* étudiées, de l'hôte utilisé et du tissu examiné (Alexander et Bryson, 2005).

Les **cellules T régulatrices** ont été démontrées comme étant la seule population connue de cellules T CD4<sup>+</sup> capables d'empêcher les maladies auto-immunes et de supprimer l'activation ou la multiplication des lymphocytes autoréactifs. D'une manière générale, elles

peuvent être définies par leur capacité à contrôler les réponses immunitaires excessives ou mal dirigées (réponses contre les antigènes du soi ou contre d'autres pathogènes) (Mendez *et al.*, 2004).

Les cellules T régulatrices sont impliquées dans l'induction de l'immunosuppression lors des infections leishmaniennes chroniques. Elles s'accumulent rapidement dans les sites d'infection de *Leishmania major*, supprimant la capacité de la réponse immunitaire à détruire complètement le parasite. Chez la souris, la persistance du parasite est en effet contrôlée par des cellules T régulatrices endogènes : CD4<sup>+</sup> et CD25<sup>+</sup>, qui expriment fortement le gène *Foxp3* (essentiel au développement et au fonctionnement de ces cellules T régulatrices) et la réactivation de la maladie est associée à une augmentation de leur nombre. Ces cellules sécrètent du TGF-β qui participe à la régulation de la croissance du parasite en favorisant sa multiplication et en empêchant la réponse inflammatoire. Les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup> et CD25<sup>+</sup> sont également capables de sécréter de l'IL-10, qui contribue également à l'immunosuppression (Rodrigues *et al.*, 2009).

### **3. Les réactions immunitaires du chien infecté par *Leishmania infantum***

#### **a) Infection expérimentale des chiens**

L'infection expérimentale des chiens pour étudier les réponses immunitaires présentes au cours de la leishmaniose est très différente d'une infection naturelle pour les raisons suivantes (Pinelli *et al.*, 1999) :

- le nombre de parasites nécessaires à la réussite d'une infection expérimentale est extrêmement élevé et est probablement plusieurs ordres de grandeurs au-dessus du nombre de promastigotes déposés par le phlébotome lors d'une infection naturelle ;
- lors d'une infection naturelle, les parasites sont inoculés avec la salive du phlébotome, dont le rôle a été démontré dans l'infection ;
- infecter des chiens par la piqûre de phlébotomes infectés expérimentalement est techniquement difficile. Killick-Kendrick *et al.* (d'après Pinelli *et al.*, 1999) ont effectué la préparation de doses infectantes de *Leishmania infantum* à partir de phlébotomes infectés expérimentalement (autorisés à se nourrir sur un chien infecté cliniquement). Ces doses contenaient un extrait de glandes salivaires de phlébotomes qui améliore l'infectivité du parasite. L'infection des chiens s'est faite par inoculation intradermique de 5-8 x 10<sup>3</sup> promastigotes métacycliques prélevés sur les phlébotomes. Cette technique, plus proche de la réalité de l'infection naturelle, demande des niveaux d'expertise rarement disponibles.

#### **b) Différences entre les réponses immunitaires des chiens résistants et des chiens sensibles**

Chez le chien, l'état de « résistance », c'est-à-dire l'absence de symptômes chez un chien infecté, est caractérisé par une forte immunité cellulaire protectrice, tandis que celui de « sensibilité », caractérisé par le développement de la maladie, correspond à une forte réponse humorale (fort taux d'anticorps) (Pinelli *et al.*, 1994).

La présence d'une forte immunité cellulaire est recherchée par le test cutané à la leishmanine, aussi connu comme la réaction de Monténégro, méthode de choix pour mettre en évidence les réponses spécifiques d'hypersensibilité retardée (ou hypersensibilité de type IV) chez le chien. Le test cutané à la leishmanine est utilisé pour mettre en évidence l'immunité cellulaire spécifique dirigée contre des parasites du genre *Leishmania* chez les chiens asymptomatiques vivant en région endémique ; en effet, l'hypersensibilité de type IV ou retardée ne se produit que chez des individus déjà sensibilisés ; lors du contact avec l'antigène injecté dans le derme, les CPA (macrophages et cellules de Langerhans) captent cet antigène et le présentent aux LT<sub>mémoire</sub> circulant dans l'organisme. La reconnaissance de l'antigène par les LT CD4<sub>mémoire</sub> provoque la synthèse de cytokines (en particulier IFN- $\gamma$ ). Il en résulte un recrutement de macrophages activés à l'endroit de l'inoculation en 48 à 72 heures, ayant pour rôle de phagocyter les antigènes responsables de l'activation, et un recrutement de LT<sub>mémoire</sub>. C'est cet afflux important de cellules qui se traduit macroscopiquement par un nodule inflammatoire au site d'injection de la leishmanine (Cardoso *et al.*, 1998).

La leishmanine est une suspension tuée de promastigotes entiers ( $0,5-1.10^7$ /mL) ou détruits (250  $\mu$ g de protéines/mL) dans une solution saline sans pyrogène contenant du phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème, caractéristique de fortes réactions cellulaires.

Ce test est utilisé pour le diagnostic des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses humaines mais n'a pas de valeur pour le diagnostic de la leishmaniose canine (Cardoso *et al.*, 1998).

La présence d'une forte réponse humorale est mise en évidence par la détection d'anticorps spécifiques anti-leishmanies dans le sérum (Cardoso *et al.*, 2007).

- *Chiens résistants*

- Description des réactions

L'état de « résistance » se manifeste par l'apparition d'une réaction d'hypersensibilité retardée (test cutané à la leishmanine positif), témoignant de fortes réactions cellulaires, associée à un titre bas en anticorps anti-leishmanies (Cardoso *et al.*, 2007 ; Barbiéri, 2006).

- Orientation de la réponse immunitaire et cytokines impliquées

Ces fortes réponses cellulaires sont liées à l'**activation des cellules Th1** produisant de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  (Pinelli *et al.*, 1994, 1999).

L'IFN- $\gamma$  a un rôle clé dans l'activation des macrophages et la destruction des amastigotes intracellulaires, en collaboration avec le TNF- $\alpha$ , décrit comme le mécanisme effecteur principal dans le contrôle de la dissémination du parasite (Carrillo et Moreno, 2009). Les effets de l'IFN- $\gamma$  sont accentués par la présence du TNF- $\alpha$  : en effet, en l'absence d'un signal dérivé d'autres molécules comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  seul est inefficace pour activer les mécanismes de destruction du parasite dans les macrophages (Ji *et al.*, 2005).

L'**interleukine-12** aurait également un rôle dans l'induction et le maintien d'une réponse Th1. En effet, on observe, pendant une courte période, l'expression simultanée de l'IL-12p40, en plus de l'IL-2 et des transcrits d'ARNm d'IFN- $\gamma$  chez les chiens

expérimentalement infectés avec *Leishmania infantum*, indiquant que ces cytokines ont un lien avec le retard dans l'établissement de la maladie chez ces animaux. L'IL-12 augmente la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules mononucléées des chiens infectés naturellement ou expérimentalement, ce qui explique sa participation dans la réponse Th1 (Barbiéri, 2006).

- Cellules impliquées

Quelques études ont démontré l'implication des **lymphocytes CD8<sup>+</sup>** (lymphocytes T cytotoxiques) dans la résistance à la leishmaniose canine. Ces lymphocytes sont détectés chez les chiens asymptomatiques expérimentalement infectés avec *Leishmania infantum* mais sont absents chez ceux symptomatiques, suggérant que la lyse directe des macrophages infectés par des lymphocytes T cytotoxiques représente un mécanisme supplémentaire dans la résistance à *Leishmania infantum* (Barbiéri, 2006).

- Immunoglobulines

La résistance à la leishmaniose canine est associée à une faible réponse humorale. (Cardoso *et al.*, 2007 ; Pinelli *et al.*, 1994).

Les sous-classes IgG1 et IgG2 sont considérées comme étant un indicateur plus adéquat du statut de leishmaniose canine par rapport aux IgG totales. Une corrélation directe entre la mise en place de forts taux d'anticorps anti-leishmanies de type IgG1 et l'apparition de signes cliniques a été démontrée, tandis que les anticorps IgG2 ont été associés à l'infection asymptomatique (Nieto *et al.*, 1999).

Cependant ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études dans lesquelles des chiens présentant une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée montraient des réponses immunitaires humorales polymorphes allant de titres négatifs en anticorps à des titres positifs d'IgG1 ou IgG2. De plus, des titres élevés d'anticorps IgG2 ont été trouvés chez des chiens symptomatiques (Cardoso *et al.*, 2007 ; Iniesta *et al.*, 2007 ; Almeida *et al.*, 2005).

Une autre étude démontre que la réponse humorale à *Leishmania* n'est pas polarisée, des taux élevés des quatre sous-classes d'IgG étant notés pendant l'infection (Day, 2007).

Des données plus récentes montrent une forte expression d'IgE spécifiques anti-leishmanies, en plus d'IgG1, chez les chiens symptomatiques de différentes zones endémiques. Les IgE pourraient donc être utilisés comme marqueur d'une maladie active (Almeida *et al.*, 2005).

- *Chiens symptomatiques*

- Description des réactions

L'état de « sensibilité » se manifeste par l'absence de réaction d'hypersensibilité retardée (test cutané à la leishmanine négatif), témoignant de faibles réactions cellulaires, associée à un titre élevé en anticorps anti-leishmanies, non protecteurs (Cardoso *et al.*, 2007 ; Barbiéri, 2006).

- Orientation de la réponse immunitaire et cytokines impliquées

Le développement de la maladie est corrélé à l'**inhibition de la réponse Th1** protectrice, sans cytokines spécifiques associées. Mais la prédominance d'une réponse immunitaire de type Th2 n'a pas encore été démontrée dans ce cas car le rôle des cytokines de type Th2 n'a pas été prouvé (Pinelli *et al.*, 1994).

L'étude des cytokines impliquées dans la sensibilité à la leishmaniose canine montre que les cellules du système des phagocytes mononucléés provenant de chiens symptomatiques produisent de faibles quantités d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-18 et d'IL-10. Ces résultats montrent la coexistence des cytokines de type Th1 et de type Th2 dans la leishmaniose symptomatique, témoignant d'une réponse mixte, sans prédominance d'une réponse par rapport à l'autre (Pinelli *et al.*, 1994).

Bien que chez l'homme, la production d'**IL-10** lors de l'infection à *Leishmania chagasi* (synonyme de *Leishmania infantum*) ait été corrélée à l'apparition de symptômes, une telle association n'a pas pu être établie au cours de la leishmaniose canine, les quantités d'IL-10 dans les tissus infectés étant les mêmes chez les chiens symptomatiques et chez les chiens asymptomatiques. De plus, l'IL-10 n'est généralement pas retrouvée chez les chiens symptomatiques, sauf occasionnellement lors d'infections anciennes. L'IL-10 ne semble donc pas avoir de rôle immunorégulateur prédominant dans la leishmaniose canine (Carrillo et Moreno, 2009).

Le rôle de l'**IL-4** en tant que cytokine impliquée dans la sensibilité à la maladie est controversé dans la leishmaniose canine (Barbiéri, 2006 ; Carrillo et Moreno, 2009).

L'expression d'ARNm d'IL-4 n'a pas été observée dans des cellules mononucléées fraîchement isolées de chiens asymptomatiques bien que cette cytokine ait été détectée chez des chiens asymptomatiques stimulés par un antigène leishmanien soluble.

Chez les chiens symptomatiques l'expression d'ARNm d'IL-4 est observée dans le cas de cellules mononucléées stimulées par un mitogène et des ARNm d'IL-4 ont été retrouvés dans la myélographie de chiens présentant de sévères symptômes.

La mesure de l'IL-4 par ELISA dans le surnageant de cellules mononucléées stimulées par une cystéine-protéinase recombinante montre des niveaux élevés de cette cytokine dans le surnageant des chiens symptomatiques mais pas dans celui des chiens asymptomatiques (Barbiéri, 2006 ; Carrillo et Moreno, 2009).

- Immunoglobulines

La réponse humorale non protectrice est précoce et intense. Comme il a été décrit précédemment (Cardoso *et al.*, 2007 ; Iniesta *et al.*, 2007 ; Almeida *et al.*, 2005), les résultats des études diffèrent quant à la sous-classe des IgG impliquées dans la sensibilité à la maladie.

Les anticorps produits en quantité importante se complexent avec des antigènes et sont responsables de symptômes immunopathologiques relatifs aux complexes immuns : glomérulonéphrite, arthrite, uvéite. Ces animaux expriment donc rapidement un tableau clinique de pronostic très péjoratif.

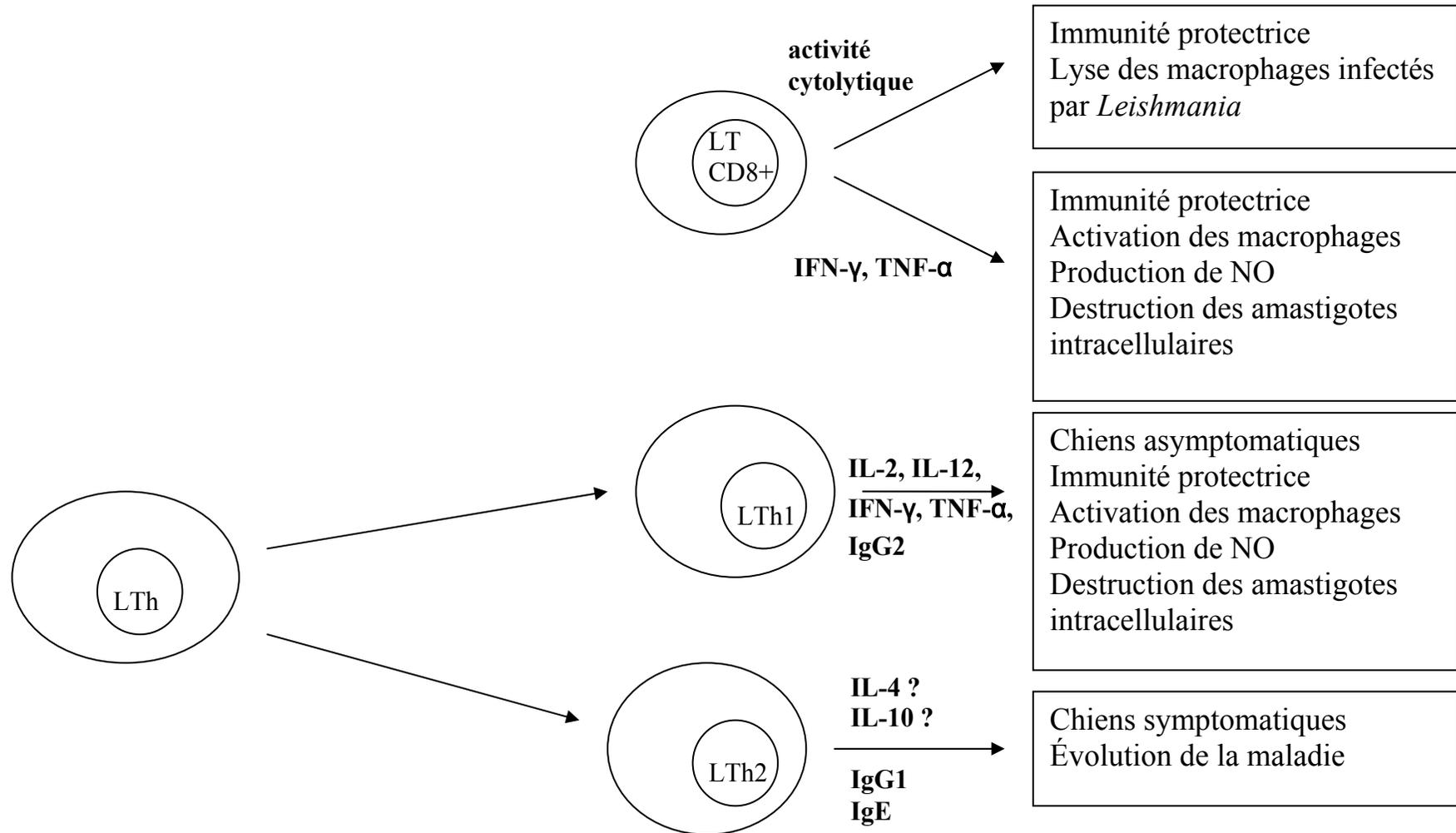
Le suivi du taux d'anticorps est intéressant dans le contrôle de l'évolution favorable d'un traitement (diminution du taux) et dans la surveillance des rechutes (remontée du taux).

La figure 8 décrit les réactions immunitaires impliquées dans la sensibilité et la résistance à la leishmaniose.

- Autres

On constate également chez les chiens sensibles une diminution de l'expression des molécules CD80 et CD86 de co-stimulation sur les macrophages infectés, par rapport aux chiens symptomatiques. Une expression suffisante de ces molécules sur les macrophages infectés est donc requise pour l'activation des cellules T spécifiques produisant l'IFN- $\gamma$  (Pinelli *et al.*, 1999).

**Figure 8 : Représentation schématique des réponses immunitaires au cours de la leishmaniose canine**



### c) Contrôle génétique de l'issue de la maladie

L'identification des facteurs génétiques influençant la résistance ou la sensibilité à la leishmaniose canine peut fournir des pistes pour la lutte contre la maladie par la vaccination.

- *Gène NRAMP1*

Le gène NRAMP1 code pour une protéine transporteuse d'ion impliquée dans le contrôle de la répllication intraphagosomale des parasites et dans l'activation des macrophages. Il a été décrit chez la souris comme déterminant dans la résistance naturelle ou la sensibilité à l'infection de plusieurs pathogènes, dont *Leishmania*.

Altet *et al.* (2002) ont étudié les mutations pouvant être associées à la sensibilité ou à la résistance à *Leishmania*. La susceptibilité à la maladie semble être associée à l'allèle 145 du microsatellite. Deux mutations importantes furent trouvées chez deux des chiens sensibles de l'étude : une région riche en guanine dans le promoteur, commune aux deux animaux, et une délétion complète de l'exon 11 qui code pour le motif consensus de transport de la protéine chez le chien sensible qui nécessitait un traitement supplémentaire et prolongé afin d'éviter les rechutes répétées.

- *Rôle du complexe majeur d'histocompatibilité*

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un candidat intéressant pour l'étude du contrôle de la sensibilité à la leishmaniose canine, compte tenu du grand nombre de maladies associées au CMH observées dans les autres espèces. Beaucoup d'allèles du CMH de classe II ont été décrits récemment chez le chien (allèles DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1) (Quinnell *et al.*, 2003).

Les résultats de l'étude de Quinnell *et al.* (2003) démontrent une association significative entre la présence de l'allèle DLA-DRB1\*01502 et la sensibilité des chiens à la leishmaniose. Les chiens possédant cet allèle ont des taux significativement plus élevés d'IgG anti-*Leishmania* et sont plus souvent positifs pour la présence du parasite (détecté par PCR). En revanche, il n'a pas été détecté d'association entre la sensibilité à la maladie et les allèles DLA-DQA1 ou DLA-DQB1. Ces résultats suggèrent que le locus DLA-DRB1 joue un rôle dans la détermination de la sensibilité à la leishmaniose canine.

- *Cas du Podenco Ibicenco*

Les vétérinaires exerçant en Espagne aux Baléares (Majorque), une région endémique de leishmaniose canine, n'ont rapporté que très peu de cas de leishmaniose chez le Podenco Ibicenco (« lévrier d'Ibiza ») alors que l'incidence de la leishmaniose canine clinique était élevée chez les chiens d'autres races.

Afin d'enquêter sur cette observation, Solano-Gallego *et al.* (2000) ont réalisé l'étude suivante : deux populations de chiens des Baléares furent examinées pour déceler la présence d'une immunité cellulaire spécifique de *Leishmania* en utilisant un test d'hypersensibilité retardée à la leishmanine et pour la présence d'une immunité humorale spécifique de *Leishmania* en utilisant un test ELISA. L'étude a porté sur 56 chiens asymptomatiques, 31 Podencos Ibicencos et 25 chiens d'autres races.

Une réponse immunitaire spécifique contre *Leishmania*, soit humorale soit cellulaire, a été décelée chez 77 % des chiens. Ces résultats suggèrent que le taux d'infection (77 %) était plus élevé que celui estimé précédemment.

Le test cutané à la leishmanine était positif chez 81 % des Podencos Ibicencos contre seulement 48 % des autres chiens. Une relation statistique entre le Podenco Ibicenco et la réponse positive au test cutané à la leishmanine fut établie.

Une réponse humorale spécifique fut démontrée chez 48 % des Podencos Ibicencos et chez 56 % des autres chiens. Aucune relation statistique relative aux taux d'IgG1 et d'IgG2 spécifiques de *Leishmania* ne fut établie entre les deux groupes.

Le Podenco Ibicenco fait donc preuve d'une réponse cellulaire à l'infection significativement plus fréquente et peut être considéré comme plus résistant à *Leishmania* que les autres races de chien. Jusqu'à présent, aucune étude génétique de cette race n'a été menée.

#### **4. Rôle de la salive du vecteur**

La salive du vecteur contribue directement aux interactions entre *Leishmania* et la réponse immunitaire de l'hôte (Andrade *et al.*, 2007).

L'action de la piqûre des phlébotomes est liée à la vaste gamme de substances pharmacologiques présentes dans leur salive, qui perturbent l'hémostase et la réponse immunitaire de l'hôte. En effet ces molécules aux propriétés anti-coagulantes, anti-plaquettaires, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immunosuppressives augmentent la probabilité de survie du pathogène (Andrade *et al.*, 2007). Le tableau 4 liste les propriétés de la salive du phlébotome.

Les leishmanies injectées avec de la salive ont un pouvoir infectant plus important que celles injectées seules et, lorsque peu de parasites sont injectés, la présence de salive détermine si l'infection aura lieu ou non (Pinelli *et al.*, 1999).

**Tableau 4 : Propriétés de la salive du phlébotome**

<b>Propriétés vasodilatatrices et immunomodulatrices de la salive du phlébotome</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- inhibition de l'activation des cellules T</li><li>- inhibition de l'activation des macrophages</li><li>- inhibition de la production d'oxyde nitrique et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages et de la destruction des parasites intracellulaires</li><li>- augmentation du chimiotactisme et de la phagocytose des parasites par les macrophages</li><li>- inhibition de l'IFN-<math>\gamma</math>, de l'IL-12 et de l'iNOS</li><li>- augmentation de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10</li><li>- anticomplément</li><li>- anticoagulation</li><li>- vasodilatation</li></ul>

*D'après Titus et al., 2006*

La salive du phlébotome oriente la réponse immunitaire de l'hôte vers une réponse de type Th2, caractérisée par une faible production de cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , et une forte production de cytokines comme l'IL-4 et l'IL-10 (Titus *et al.*, 2006).

En orientant la production de cytokines, les extraits de glandes salivaires suppriment à la fois la capacité des macrophages à être activés par l'IFN- $\gamma$  et la fonction de présentation d'antigènes de ces cellules. Ils inhibent donc la production de NO et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages, ce qui empêche la mort du parasite. Cependant, toutes les fonctions du macrophage ne sont pas affectées car la capture des pathogènes par les macrophages n'est pas altérée (Rohousova et Volf, 2006 ; Pinelli *et al.*, 1999).

D'un autre côté, les hôtes exposés de manière répétée aux piqûres de phlébotomes développent une réponse immunitaire contre des éléments antigéniques présents dans la salive de phlébotome. En effet, les sujets résidant en zone endémique qui ont une réaction d'hypersensibilité retardée au test cutané à la leishmanine développent aussi des anticorps IgG anti-salive de phlébotome et pourraient être protégés contre l'infection leishmanienne. Ces anticorps pourraient donc servir de marqueur épidémiologique d'exposition au vecteur dans les zones endémiques et de marqueur de protection contre l'infection par la leishmaniose (Andrade *et al.*, 2007)

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



## **II. Traitement de la leishmaniose canine**

### **A. Décision thérapeutique**

#### **1) Considérations préalables**

Avant d'envisager le traitement long, lourd et coûteux de la leishmaniose canine, deux caractéristiques essentielles doivent être retenues par le praticien confronté au cas clinique (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000) :

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

Au terme d'un diagnostic confirmé (suspicion clinique, sérologie « positive », mise en évidence du parasite), le praticien doit donc se préoccuper d'abord des risques de transmission à l'homme, puis des chances de guérison clinique de l'animal.

#### **2) Leishmaniose canine et santé publique**

La protection de la santé publique est motivée par plusieurs éléments. Le nombre de cas cliniques humains autochtones n'est pas très élevé, mais le contact homme-parasite est fréquent : une enquête épidémiologique fondée sur un test intradermique à la leishmanine (Marty *et al.*, 1994) a révélé une moyenne de 30 % de sujets présentant une réaction positive dans la localité de l'Abadie (Alpes-Maritimes), et jusqu'à 60 % chez des personnes âgées. Ceci démontre qu'en zone d'endémie, la plupart des sujets sont piqués par des phlébotomes infectés, que ceci est proportionnel avec la durée de séjour dans le foyer et qu'ils élaborent à l'encontre de la leishmanie (dont ils sont porteurs) une réaction d'hypersensibilité retardée efficace.

Or, les causes d'immunodépression deviennent de plus en plus variées et nombreuses (Alvar, 1994) : soit virale (virus de l'immunodéficience humaine responsable du SIDA), soit

iatrogénique (utilisation de corticoïdes et/ou d'immunosuppresseurs) ; de tels sujets peuvent exprimer, à la faveur de l'immunosuppression induite, une leishmaniose.

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

### **3) Leishmaniose canine : facteurs pronostiques**

L'autre préoccupation concerne les chances de guérison de l'animal. Le pronostic, c'est-à-dire l'ensemble des informations permettant d'apprécier aussi précisément que possible les chances de guérison et tous les risques et complications possibles, est très variable d'un sujet à l'autre. Cependant le propriétaire pose systématiquement la question du pronostic, qui appelle de la part du praticien une réponse argumentée et raisonnée.

Le pronostic s'appuiera sur les bases suivantes (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000) :

- l'état clinique de l'animal et la situation d'accès primaire ou de rechute, c'est-à-dire l'ancienneté relative de la contamination et de la multiplication des parasites ;
- le fonctionnement rénal : la leishmaniose est une maladie toujours associée à une insuffisance rénale reposant sur une glomérulonéphrite imputable à l'importance des complexes immuns circulants. L'élimination normale des produits du métabolisme est donc en partie dégradée, et davantage lors de l'utilisation de produits leishmanicides néphrotoxiques. Il est capital, à la fois pour la décision thérapeutique et la nature du traitement envisagé, d'apprécier cette glomérulonéphrite par les valeurs d'urémie, de créatinémie et de protéinurie, celles-ci pouvant conduire à surseoir la prescription de leishmanicides ;
- les données biologiques : électrophorèse des protéines, numération formule sanguine permettant d'apprécier et de qualifier l'anémie ;
- toutefois, le critère essentiel est le fonctionnement du système immunitaire tel que nous l'avons décrit précédemment. Malheureusement, il n'est pas possible aujourd'hui et dans des conditions pratiques d'explorer la nature de la réponse immunitaire chez le chien ; seule l'intradermo-réaction à la leishmanine peut, de façon imparfaite, orienter le clinicien. Ni la qualification des populations et des sous-populations lymphocytaires ni le titre de la sérologie ne peuvent, pour un individu donné, donner un pronostic précis.

Pour schématiser, le tableau 5 présente deux situations opposées et extrêmes pour lesquelles le pronostic est relativement tranché ; fréquemment, dans la pratique courante, la situation est intermédiaire et donc plus difficile.

**Tableau 5 : Situations extrêmes permettant la définition d'un pronostic relativement facile dans la leishmaniose canine**

Situation <i>a priori</i> favorable	Situation <i>a priori</i> défavorable
animal jeune premier accès de leishmaniose fonctions rénales satisfaisantes anémie régénérative sérologie avec titre bas	animal âgé en situation de rechute insuffisance rénale confirmée anémie arégénérative sérologie avec titre élevé

*D'après Bourdoiseau et Dénerolle, 2000*

## **B. Thérapeutique non spécifique**

Lors d'une insuffisance rénale prononcée, il est nécessaire de retarder le traitement spécifique et de privilégier une « réanimation rénale » : perfusion, utilisation de corticoïdes non-retard (prednisone à 1 mg/kg/j, *per os*, pendant 4-5 jours), en vue de diminuer la formation des complexes immuns circulants et les lésions induites (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

Chez les chiens naturellement infectés par *Leishmania infantum*, il existe une relation entre la thrombocytopénie et la présence d'anticorps à la surface des plaquettes. Pour cette raison, les glucocorticoïdes (prednisone à 2 mg/kg/j pendant 7 jours, puis 1 mg/kg/j pendant 7 jours et enfin 0,5 mg/kg/j pendant 7 jours) sont utiles dans le traitement de la leishmaniose canine, en plus du traitement spécifique leishmanicide, pour diminuer les anomalies de l'hémostase (épistaxis, hématurie, diarrhée hémorragique...). Cependant, en raison des effets secondaires connus des corticoïdes, leur utilisation (non systématique) dans le traitement de la leishmaniose canine doit toujours être associée à une évaluation précise des risques et des bénéfices (Cortese *et al.*, 2008).

Lors d'uvéite leishmanienne, des injections sous-conjonctivales de corticoïdes retard sont indiquées.

Enfin, lors de leishmaniose nodulaire, l'exérèse chirurgicale des nodules est nécessaire (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

## **C. Thérapeutique spécifique**

Quelques molécules se sont avérées efficaces en matière de leishmaniose canine. Les molécules les plus couramment utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine sont listées dans le tableau 6, et leur structure chimique est représentée dans l'annexe 2.

**Tableau 6 : Noms et protocoles d'utilisation des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose canine**

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

PO : *per os* ; SC : sous-cutanée ; IM : intramusculaire ; IV : intraveineuse ; AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

## 1) Molécules de première intention

### a) Les composés stibiés

- *Définition et mode d'action*

Les composés stibiés ont été les premiers médicaments actifs sur les leishmanies. En 1912, Gaspar Vianna utilisa le tartre émétique (tartrate de potassium et d'antimoine), jusqu'alors efficace contre la trypanosomose africaine, pour traiter l'infection à *Leishmania braziliensis* en Amérique du Sud (Baneth et Shaw, 2002). Ce composé stibié organique acyclique trivalent devint rapidement largement utilisé dans d'autres zones géographiques contre les agents de la leishmaniose viscérale et cutanée et pour le traitement de la leishmaniose générale du chien, en dépit de la nécessité d'administration par voie intraveineuse stricte, sous peine de périphlébites graves. Il est remplacé par des stibiés organiques cycliques, administrés par voie veineuse ou musculaire, sous une forme pentavalente, mais qui n'est efficace qu'après réduction sous forme trivalente dans l'organisme : antimoniate de méglumine, stibogluconate de sodium (Euzéby, 2008).

Les composés stibiés ont été utilisés pendant près de 90 ans et restent aujourd'hui les principales molécules employées dans le traitement de la leishmaniose humaine et canine (Baneth et Shaw, 2002).

Ces molécules exercent leur action leishmanicide sur les formes amastigotes par inhibition de la synthèse de l'adénosine triphosphate et oxydation des glucides et acides gras (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007 ; Euzéby, 2008 ; Bussiéras et Chermette, 1992).

- *Effets indésirables*

Les injections intramusculaires de composés stibiés peuvent entraîner de la fibrose musculaire et la formation d'abcès et ne sont donc pas recommandées.

La néphrotoxicité et la douleur au site d'injection sont les principaux effets secondaires rencontrés. La glomérulonéphrite due aux immuns complexes est relativement courante chez les chiens leishmaniens et la gravité de l'insuffisance rénale doit être évaluée avec attention afin de déterminer le risque de toxicité. Les autres effets secondaires possibles sont des troubles digestifs, des douleurs musculaires et articulaires (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000 ; Baneth et Shaw, 2002).

- *L'antimoniate de méglumine et le stibogluconate de sodium : protocoles d'administration*

L'antimoniate de méglumine est commercialisé en France sous le nom de Glucantime® et possède une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour la leishmaniose canine. Les indications du laboratoire conseillent une dose de 200 à 300 mg/kg, toutes les 48 heures, par les voies sous-cutanée (SC), intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV), en série de 15 à 20 injections. Du fait d'une certaine stibio-intolérance (troubles digestifs, torpeur, douleurs musculaires et articulaires : manifestations réversibles), et d'une stibiotoxicité (troubles rénaux, pancréatiques et cardiaques), il est conseillé de commencer avec une dose réduite de moitié pour les premières injections puis d'augmenter progressivement les doses (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

Diverses études cliniques et pharmacologiques permettent dorénavant de modifier, parfois radicalement, certaines de ces données (Slappendel et Teske, 1997 ; Valladares *et al.*, 1996 ; Valladares *et al.*, 1998) :

- la demi-vie de la molécule est de 20 minutes après une administration IV, 42 minutes pour la voie IM et 120 minutes pour la voie SC ; la concentration maximale est atteinte 90 à 120 minutes, 210 à 240 minutes respectivement après une administration IM et SC ; la voie IV est caractérisée sur le plan pharmacologique par 3 phases successives : une très courte correspondant à la distribution de la molécule dans le foie, la rate,..., une décroissante rapide (transformation du stibié pentavalent en composé trivalent dans le foie) et une décroissante lente reposant sur l'élimination rénale du composé ; les voies IM et SC sont approximativement très proches pour les concentrations plasmatiques, mais la diffusion viscérale est moins rapide ;
- la dose quotidienne optimale (ayant démontré une efficacité) est de 100 mg/kg/j, pouvant être fractionnée en deux prises (50 mg/kg matin et soir) ;
- enfin, la durée d'administration doit être de 20 jours au minimum (voire 30), soit de façon continue, soit en deux cures de 10 jours séparées par une pause de 10 jours.

Tout ceci concourt à retenir le protocole suivant : administration quotidienne, par la voie sous-cutanée, de 100 mg/kg, durant une période de 20 jours minimum. Le critère d'efficacité semble davantage la diffusion étalée, constante du produit dans l'organisme, sans induire l'apparition de « fenêtres », périodes au cours desquelles le parasite aurait la faculté de se multiplier, plutôt que la quantité administrée (Baneth et Shaw, 2002 ; Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

Le stibogluconate de sodium (Pentostam<sup>®</sup>) s'utilise quant à lui à la dose de 0,1 mg/kg, en voie intraveineuse tous les jours pendant 7 jours, puis arrêt de 7 jours, et reprise pendant 7 jours. Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'antimoniote de méglumine (Bussiéras et Chermette, 1992).

#### • *L'antimoniote de méglumine : efficacité*

Les composés stibiés permettent la diminution des symptômes, voire la rémission clinique du chien. Néanmoins, il est prouvé qu'ils n'entraînent pas l'élimination complète du parasite, donc que les chiens traités restent réservoirs de la maladie (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007).

Ikeda-Garcia *et al.* (2007) ont mené récemment une étude afin de confirmer l'efficacité du protocole à l'antimoniote de méglumine, de mesurer l'incidence des rechutes et d'évaluer la présence des parasites chez les chiens traités afin de savoir s'ils restaient ou non porteurs de la maladie.

Le protocole fut le suivant : 7 chiens naturellement infectés par *Leishmania chagasi* (synonyme de *Leishmania infantum*), 5 symptomatiques et 2 asymptomatiques furent traités à l'antimoniote de méglumine (Glucantime<sup>®</sup>), à la dose de 75 mg/kg par voie sous-cutanée deux fois par jour pendant 21 jours. Les animaux furent suivis (examen clinique, analyses urinaires et hématologiques, recherche du parasite) pendant 180 jours afin de surveiller la survenue de rechutes.

Les 5 chiens symptomatiques présentèrent une rémission des symptômes 60 jours après le début du traitement, ainsi qu'une normalisation des analyses urinaires et hématologiques. Deux de ces chiens (29 %) présentèrent une rechute des symptômes de la

maladie 150 jours après le début du traitement, mais à ce moment-là les formes amastigotes n'étaient pas visibles sur les biopsies de nœuds lymphatiques et les myélogrammes.

Durant toute la période d'observation, les formes amastigotes du parasite n'étaient visibles sur aucune des biopsies de nœuds lymphatiques et sur aucun myélogramme effectués sur chaque chien, sauf à la fin de l'étude où des amastigotes furent visualisés chez 4 chiens (57 %), un asymptomatique et trois symptomatiques (dont les deux ayant rechuté) au commencement de l'étude.

La présence de parasites dans la rate et le foie fut observée chez 5 chiens (71 %) à la fin de l'étude.

Pendant toute la durée de l'étude, bien que presque tous les animaux étaient asymptomatiques, 5 d'entre eux hébergeaient toujours le parasite. Cependant, ceci n'était pas prouvé par les examens parasitologiques des 150 premiers jours. Les biopsies de nœuds lymphatiques et le myélogramme n'étaient donc pas des méthodes efficaces et sûres pour prouver la totale disparition du parasite chez les chiens soumis au protocole thérapeutique. Ce n'est qu'au bout de 180 jours qu'il était possible de confirmer le statut de porteur de ces animaux. Chez l'un de ces chiens cette période de temps était insuffisante pour détecter le parasite, et c'est seulement par l'examen d'organes tels le foie et la rate qu'il fut possible de l'identifier.

Bien qu'un chien asymptomatique et un chien symptomatique semblaient être guéris d'un point de vue clinique et parasitaire, on ne peut affirmer que l'agent était définitivement éliminé chez ces chiens.

En conclusion, l'antimoniote de méglumine favorise la rémission des symptômes mais n'empêche pas la survenue de rechutes. Bien qu'ils soient asymptomatiques, beaucoup de chiens traités restent infectés.

- *L'antimoniote de méglumine : immunomodulation*

Une autre étude (Muniz-Junqueira et Paula-Coelho, 2008) a évalué l'influence *in vitro* de l'antimoniote de méglumine sur les fonctions du macrophage impliquées dans la défense contre les leishmanies telles que la phagocytose et la production d'oxygène réactif, de nitrogène et de TNF- $\alpha$ .

L'antimoniote de méglumine augmenta la capacité phagocytaire des monocytes de 158 % et celle des neutrophiles de 219 %. Il n'eut pas d'influence sur la production d'acide nitrique mais augmenta de manière significative la production de TNF- $\alpha$  de 230 %. Cependant, en présence de TNF- $\alpha$ , les monocytes produisent davantage de NO, l'antimoniote de méglumine augmente donc de manière indirecte la production de NO via la cytokine TNF- $\alpha$ .

Ces données suggèrent que les effets immunomodulateurs de l'antimoniote de méglumine pourraient jouer un rôle dans la lutte contre les leishmanies et que cette molécule stimule la phagocytose par un mécanisme qui empêche le parasite d'échapper à la défense immunitaire.

- *L'antimoniote de méglumine : formulation liposomale*

Dans les années 1970, il fut découvert que les stibiés encapsulés dans un liposome étaient des centaines de fois plus efficaces que ceux non encapsulés pour le traitement de la leishmaniose expérimentale. Les liposomes sont des microvésicules à paroi constituée par un phospholipide, et dans lesquelles peuvent être inclus divers principes actifs. Cet effet spectaculaire de l'encapsulation par un liposome fut attribué à la capacité des liposomes à

promouvoir une forte concentration d'antileishmaniens et à leur tendance naturelle à être captés de la circulation par des macrophages du système des phagocytes mononucléés, principalement dans le foie, la rate et la moelle osseuse, sites majeurs de l'infection par le parasite (Ribeiro *et al.*, 2008 ; Bussiéras et Chermette, 1992).

Ribeiro *et al.* (2008) ont étudié la toxicité et l'efficacité antileishmanienne d'une nouvelle formulation d'antimoniote de méglumine dans un liposome chez des chiens atteints de leishmaniose. Trois groupes de 12 chiens ont reçu par voie intraveineuse 4 doses (  4 jours d'intervalle) soit de liposome renfermant l'antimoniote de méglumine (groupe I (G I)), soit de liposome vide (G II), soit de solution isotonique (G III).

Il n'a pas été observé de changement dans les valeurs des marqueurs h matopo i tiques, hépatiques et rénaux. En revanche, des effets secondaires transitoires : prostration, défécation, tachypnée et sialorrhée, ont été observés durant les 15 minutes suivant les injections dans les groupes I et II.

La recherche des parasites dans le myélogramme a montré une réduction significative de la quantité de parasites dans le G I, par rapport aux autres groupes. Cent cinquante jours après le traitement, une stérilisation parasitaire significative (plus de 95,7 %)  tait démontrée dans les nœuds lymphatiques, le foie et la rate des animaux du G I, par rapport aux autres groupes.

La mise en contact de phlébotomes avec les chiens du G I, 150 jours après le traitement, a résulté en une diminution significative de l'efficacité de l'infection des phlébotomes, contrairement aux autres groupes.

Cette étude est la première à démontrer à la fois la stérilisation parasitaire à long terme (150 jours) et la réduction de l'infectivité des phlébotomes suite à un traitement par une molécule encapsulée dans un liposome. De plus, les doses d'antimoniote de méglumine utilisées étaient 20 fois inférieures à celles utilisées dans le traitement conventionnel, d'où une réduction de la toxicité du protocole, autre avantage de la formulation liposomale.

- *Résistance*

Toutes les leishmanies ne sont pas sensibles aux stibiés et certaines souches d'une même espèce sont résistantes. Cette résistance peut se manifester à l'encontre du produit pentavalent ou du produit trivalent. D'autre part, il n'y a pas toujours de corrélation entre l'activité des stibiés *in vitro* et leur efficacité chez les malades ; les individus ne réagissent favorablement à la thérapeutique que s'ils sont immunologiquement actifs. Au cours du traitement stibié de la leishmaniose viscérale humaine, les immuns complexes leishmaniens circulants induisent la production du facteur GM-CSF (cytokine facteur de différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en macrophages et granulocytes), mais ce type de réaction est peu marqué chez le chien. Une réponse lymphocytaire Th1 amoindrie, chez l'homme, et la faible aptitude à montrer une réponse à médiation cellulaire chez le chien rendent compte d'une activité médicamenteuse insuffisante. Des agents stimulants de l'immunité (imiquimod, lévamisole) peuvent améliorer l'action de l'antimoine (Euzéby, 2008).

La résistance des leishmanies à l'antimoine est due à la surexpression de deux protéines de membrane de la superfamille des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC, actifs dans le phénomène de chimiorésistance multiple) : P-GP et MRP-1, qui provoquent l'évacuation du médicament par les cellules parasit es (Euzéby, 2008).

Malgré sa large utilisation, la thérapie aux composés stibiés présente certaines limites : injections répétées, formation de résistances, manque de stérilisation parasitaire, toxicité et

coût prohibitif ; ces limites ont stimulé la recherche de composés plus efficaces, et à des prix plus abordables.

## b) L'allopurinol

- *Définition et mode d'action*

L'allopurinol est un composé analogue de l'hypoxanthine, molécule nécessaire à la biosynthèse de la pyrimidine et au métabolisme des leishmanies (Euzéby, 2008).

Tous les protozoaires sont dépendants de l'hôte parasité pour l'acquisition des bases nécessaires à leur survie et à leur multiplication en tant qu'éléments indispensables à la synthèse de l'acide ribonucléique. L'allopurinol provoque la formation de 4-aminopyrazolopyrimidine ribonucléotide triphosphate, analogue très toxique de l'ATP, qui est incorporé dans l'ARN du parasite, inhibant ainsi la synthèse protéique. Il possède donc des propriétés leishmaniostatiques confirmées *in vitro* et *in vivo* (Koutinas *et al.*, 2001 ; Lamothe, 1999 ; Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

- *Effets indésirables*

Aucun effet toxique n'a été enregistré chez le chien à ces doses si ce n'est exceptionnellement des lésions cutanées de photosensibilisation totalement réversibles à l'interruption du traitement (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000). Il présente peu d'effets secondaires : hyperxanthinurie et urolithiase sont exceptionnellement possibles (particulièrement lors d'atteinte hépatique). La prévention passe par la prescription d'un régime hypoprotéiné (Euzéby, 2008).

- *Protocole d'administration*

Ce médicament n'est pas commercialisé en médecine vétérinaire mais il l'est en médecine humaine, sous le nom de Zyloric®.

La dose leishmaniostatique chez le chien est de 15 à 30 mg/kg, *per os*, 2 fois par jour (Baneth et Shaw, 2002 ; Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

- *Efficacité*

L'efficacité de l'allopurinol est semblable à celle de l'antimoniote de méglumine : bonne rémission clinique et normalisation des paramètres biochimiques et hématologiques, mais, de la même façon, bien que le nombre de parasites soit diminué, la stérilisation parasitaire est rare (Koutinas *et al.*, 2001).

Dans une étude sur la leishmaniose canine en Hollande, des chiens traités avec 20 mg/kg par jour d'allopurinol avaient 78 % de chances de survie de plus de 4 ans à condition qu'une insuffisance rénale sévère ne soit pas présente au commencement du traitement (Slappendel et Teske, 1999).

Cavaliero *et al.* (1999) utilisèrent de l'allopurinol à 10 mg/kg par jour *per os* pour traiter 10 chiens infectés naturellement par la leishmaniose. Neuf chiens montrèrent une rémission clinique en 2 à 6 mois de traitement et aucune rechute ne fut observée pendant le traitement ni pendant les 20 mois suivants. Cependant, les niveaux d'immunoglobuline IgG2

spécifique du parasite restèrent élevés chez tous les chiens et les niveaux d'immunoglobuline IgG1 spécifique le restèrent chez 7 chiens malgré la rémission clinique. De plus, 8 de ces 9 chiens étaient positifs à la culture du parasite à partir de cytoponction de nœud lymphatique.

- *Suivi de l'efficacité du traitement*

Le suivi de l'efficacité du traitement peut être réalisé par le biais des immunoglobulines, comme l'ont démontré Vercammen *et al.* (2002). Dans leur étude, 14 chiens naturellement infectés furent suivis cliniquement et sérologiquement par immunofluorescence, ELISA et Western Blot. Chez tous les chiens le traitement à l'allopurinol aboutit à la fois à la rémission clinique et à la diminution des titres en anticorps, démontrant l'utilité de la sérologie dans le suivi du traitement. Bien que les taux d'IgG1 et d'IgG2 étaient très variables d'un animal à l'autre, celui d'IgG2 était prédominant chez tous les chiens. Ceci suggère une plus grande valeur de la surveillance de la réponse IgG2 dans le suivi des chiens traités.

Ce suivi peut également être réalisé par le dosage des protéines de phase aiguë (PPA). La production de ces protéines synthétisées par le foie est stimulée en réponse à une inflammation. Lors de leishmaniose viscérale humaine, de fortes concentrations de certaines PPA ont été rapportées. Leurs concentrations revenant à des valeurs normales pendant le traitement, ces protéines ont été proposées comme marqueurs non invasifs pour suivre la maladie, la réponse au traitement et les rechutes (Sasanelli *et al.*, 2007).

De fortes concentrations d'haptoglobine (Hp), de protéine C réactive (PCr) et de céruloplasmine (CP) ont été rapportées dans une étude sur la leishmaniose canine, suggérant que les protozoaires induisent une réponse de phase aiguë chez l'hôte. Lors d'un traitement à court terme de la leishmaniose canine les concentrations de PCr et de CP diminuent significativement par rapport aux valeurs initiales, indiquant que ces protéines pourraient être utiles pour évaluer la réponse initiale au traitement. Les résultats de l'étude de Sasanelli *et al.* (2007) montrent que les valeurs des concentrations moyennes des PPA sélectionnées changent pendant le traitement à l'allopurinol. En effet, lors d'une thérapie à long terme, les concentrations moyennes de PCr et d'Hp diminuent de manière significative. Ces résultats suggèrent que ces protéines pourraient être utilisées comme des marqueurs permettant de savoir quand l'arrêt du traitement est possible.

- *Résistance*

Dans des études comparatives, de larges variations dans la sensibilité à l'allopurinol de promastigotes de différentes espèces furent rapportées comme étant dues à des différences dans l'affinité des enzymes de la voie de récupération des purines (Croft *et al.*, 2006).

L'allopurinol est de plus en plus utilisé par les vétérinaires en région méditerranéenne, du fait de sa non-toxicité relative, de sa capacité à améliorer le statut clinique, de son faible coût et de la facilité de son administration orale. Il est surtout utilisé en association avec l'antimoniote de méglumine (rémissions plus fréquentes) (Baneth et Shaw, 2002).

### c) Association antimoniante de méglumine-allopurinol

- *Importance et protocole*

L'association antimoniante de méglumine-allopurinol est utilisée par 80 % des vétérinaires français dans le traitement de la leishmaniose canine (Coulibali *et al.*, 2004), et la synergie entre les deux molécules pour provoquer la rémission clinique a été rapportée. L'administration d'antimoniante de méglumine à la dose de 100 mg/kg par jour pendant 20 jours en association avec l'allopurinol (15-30 mg/kg 2 fois par jour) est recommandée à l'induction de la thérapie. L'allopurinol est ensuite poursuivi en entretien à long terme. L'association avec l'allopurinol diminue la durée du traitement à l'antimoniante de méglumine, rendant ce dernier mieux toléré et moins coûteux. De plus, l'entretien à long terme avec l'allopurinol diminue le taux de rechutes (Baneth et Shaw, 2002).

- *Efficacité*

Il a été possible, dans une étude portant sur 96 chiens parasités naturellement (Dénerolle et Bourdoiseau, 1999), de comparer par plusieurs critères les résultats de 3 protocoles thérapeutiques différents (définissant 3 lots) : antimoniante de méglumine (30 jours) + allopurinol (pendant 8 mois supplémentaires), antimoniante de méglumine seul (jusqu'à 3 mois de traitement), allopurinol seul (30 jours) (ce traitement a dû être arrêté et remplacé par le traitement classique du fait des très mauvais résultats observés). Le tableau 7 rapporte les résultats obtenus pour chacun des lots.

**Tableau 7 : Résultats obtenus selon trois protocoles thérapeutiques différents chez 96 chiens**

<i>critères retenus</i>	<i>antimoniante de méglumine + allopurinol</i>	<i>antimoniante de méglumine seul</i>	<i>allopurinol seul</i>
nombre de chiens traités	45	40	11
nombre de guérisons cliniques	37 (82 %)	22 (55 %)	2 (18 %)
nombre d'échecs :			
morts	8 (18 %)	18 (45 %)	9 (82 %)
rechutes	3 (7 %)	12 (30 %)	nd
mauvais état général	5 (11 %)	6 (15 %)	nd
séronégatation	0	0	9 (82 %)
survie :			
à 2 ans	6 (14 %)	12 (30 %)	1 (9 %)
à 3 ans	27 (60 %)	12 (30 %)	2 (18 %)
à 5 ans	7 (15,5 %)	5 (12,5 %)	nd
	3 (7 %)	5 (12,5 %)	nd

nd : non déterminé

*D'après Dénerolle et Bourdoiseau, 1999*

En terme d'efficacité clinique, confirmée par des critères biologiques, l'association antimoniata de méglumine-allopurinol démontre son intérêt par rapport au « traitement classique » : plus de guérisons cliniques, moins d'échecs thérapeutiques. Cependant, dans cette étude, la survie à 5 ans est meilleure lors du traitement par l'antimoniata de méglumine seul que lors du traitement par l'association antimoniata de méglumine-allopurinol.

Certains avantages non négligeables ont pu être observés avec ce protocole :

- l'administration d'allopurinol peut être commencée dès le premier jour, lors de la confirmation diagnostique, même si l'état de l'animal nécessite une thérapeutique de réanimation rénale qui interdit l'administration d'antimoniata de méglumine (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000) ;
- cette association présente un intérêt prophylactique évident :
  - l'infection des phlébotomes, démontrée par l'observation de promastigotes, se réalise indépendamment de l'état clinique de l'animal, ce qui démontre que les chiens apparemment sains ou en état clinique satisfaisant contribuent, comme leurs congénères exprimant de nombreux symptômes caractéristiques, à l'entretien et au développement du foyer ; ceci confirme la nécessité, dans une perspective de prophylaxie, de considérer la totalité de la population canine, indépendamment de l'état clinique (Alvar *et al.*, 1994) ;
  - en revanche, les phlébotomes ne sont pas infectés (et donc infectants) lorsqu'ils se nourrissent durant les 4 mois suivant la cure thérapeutique, ce qui signifie que celle-ci pourrait contribuer, si elle était appliquée à une large échelle, à stériliser les sources de parasites pour les vecteurs (Gradoni *et al.*, d'après Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).
- au terme d'une cure thérapeutique classique, un traitement de maintien à raison d'allopurinol à 20 mg/kg/j, une semaine par mois, a permis de n'observer aucune rechute alors que les animaux sans pression d'allopurinol présentaient un taux de rechute de 86 % dans les 14 mois suivants (Ginel *et al.*, 1998).

Toutefois l'association de l'antimoniata de méglumine avec l'allopurinol, si elle diminue les risques de rechute, ne stérilise pas l'animal sur le plan parasitaire à long terme. La rémission clinique s'accompagne d'une diminution du nombre de parasites dans la peau et les nœuds lymphatiques, mais même au terme d'une longue période d'administration d'allopurinol seul, les leishmanies persistent dans les tissus (Manna *et al.*, 2008).

Malgré cet inconvénient, l'association antimoniata de méglumine-allopurinol demeure, tant sur le plan de l'efficacité thérapeutique stricte que de l'intérêt prophylactique, l'association la plus intéressante.

#### d) L'amphotéricine B

- *Définition et mode d'action*

L'amphotéricine B est un antifongique fongicide du groupe des macrolides heptanéiques, synthétisée par l'actinomycète *Streptomyces nodosus*. Elle est dotée d'une activité topique et systémique et est active à la fois sur les champignons et sur les leishmanies (Euzéby, 2008 ; Baneth et Shaw, 2002).

L'amphotéricine B se fixe de façon irréversible à l'ergostérol constitutif de la membrane du parasite, altérant ainsi les fonctions de perméabilité de celle-ci, provoquant par fuite du potassium intracellulaire la mort du parasite (leishmanie ou champignon) ; cette molécule est également douée de propriétés immunostimulantes (activation des macrophages et des monocytes, des phénomènes oxydatifs, de l'excrétion de certaines interleukines) (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000 ; Baneth et Shaw, 2002).

- *Effets indésirables*

L'amphotéricine B présente une néphrotoxicité importante par vasoconstriction entraînant une diminution de la perfusion rénale et de la filtration glomérulaire et éventuellement par action directe sur les cellules épithéliales du rein, nécessitant de surseoir l'administration dès que la créatinémie dépasse 25 mg/L (Lamothe, 1999 ; Bourdoiseau et Dénerolle, 2000 ; Euzéby, 2008).

Malgré sa néphrotoxicité, l'amphotéricine B est de plus en plus utilisée à la fois comme molécule de choix dans le traitement de la leishmaniose viscérale humaine chez des patients porteurs du VIH, et dans les cas de résistance aux composés stibiés (Baneth et Shaw, 2002).

La présentation sous forme d'émulsion lipidique limite la toxicité de la molécule et permet une action mieux localisée et potentialisée.

- *Protocole d'administration et efficacité*

L'amphotéricine B est commercialisée en médecine humaine uniquement (formulation réservée aux hôpitaux en France) mais peut être utilisée dans le traitement de la leishmaniose canine sous sa forme libre néphrotoxique ou sous les formes liposomale ou associée aux lipides, moins toxiques.

- Amphotéricine B sous forme libre

L'amphotéricine B en solution (Fungizone<sup>®</sup>, flacon de 50 mg à mélanger à 10 mL d'eau) est administrée à la dose de 0,5 mg/kg 2 à 3 fois par semaine par la voie sous-cutanée ou intraveineuse (perfusion rapide, contrairement à l'homme chez qui on l'utilise en voie intraveineuse par perfusion lente), jusqu'à une dose totale de 8 à 26 mg/kg. Cependant, la dose totale administrée aux chiens leishmaniens est souvent limitée par l'apparition d'une insuffisance rénale (Baneth et Shaw, 2002).

Dans une étude utilisant la forme libre de l'amphotéricine B par perfusion intraveineuse rapide à la dose de 0,5 à 0,8 mg/kg 2 à 3 fois par semaine jusqu'à atteindre une dose totale de 15 mg/kg, l'amélioration clinique fut obtenue chez 28 des 30 chiens infectés

naturellement, et 27 de ces 28 chiens étaient toujours en rémission clinique après 12 mois. Le statut parasitaire de ces chiens n'est pas connu (Lamothe, 1997).

#### ○ Autres formulations d'amphotéricine B

Afin de réduire la toxicité de cet antibiotique, des véhicules comme des émulsions lipidiques, des liposomes et des nanoparticules ont déjà été essayés et sont actuellement disponibles en Europe, aux États-Unis et au Mexique pour la médecine humaine. Cependant, leur coût élevé, en relation avec le coût de production des préparations d'amphotéricine B adéquates (liposomes), exclut leur utilisation généralisée dans les pays développés pour le traitement de la leishmaniose canine (Ordóñez-Gutiérrez *et al.*, 2007).

L'amphotéricine B sous forme liposomale permet l'administration moins fréquente de doses plus élevées (3 mg/kg) de principe actif. Cependant, l'utilisation de ces formulations est limitée par leur coût (six fois plus élevé que les formulations de la molécule libre) et les études sur leur efficacité dans le traitement de la leishmaniose canine donnent des résultats contradictoires.

Treize chiens naturellement infectés par *Leishmania infantum* furent traités par l'amphotéricine B sous forme liposomale (AmBisome<sup>®</sup>) et suivis pendant 8 mois (Oliva *et al.*, 1995). Une amélioration clinique rapide fut suivie par une rechute dans les 4 à 6 mois après le traitement chez 12 chiens et tous les chiens restèrent porteurs du parasite. Cependant, les doses totales utilisées dans cette étude étaient faibles (15 mg/kg).

Certaines études ont évalué l'efficacité de l'amphotéricine B administrée dans une émulsion lipidique (Intralipid<sup>®</sup>), formulation moins coûteuse. Dans la première étude (Moreno *et al.*, 1999), les quatre chiens traités exprimèrent une rechute 5 mois après l'arrêt du traitement. En revanche, dans la seconde étude (Lamothe, 2001), le traitement fut une réussite chez 14 chiens sur 17, résultats basés d'après les PCR négatives réalisées 1 à 3 mois après le traitement sur prélèvement de moelle osseuse. Il est difficile de comparer les résultats de ces deux études dans la mesure où la dose totale administrée aux chiens dans la première était bien plus faible que celle reçue par les chiens dans la seconde, et le suivi dans la seconde étude était sur une période de temps considérablement plus courte que dans la plupart des études.

La microcapsule est un autre système de transport, efficace et bon marché, qui possède une bonne activité sur les cellules phagocytaires.

Ordóñez-Gutiérrez *et al.* (2007) ont évalué les avantages possibles *in vitro* d'une nouvelle formulation comprenant des stades différents d'agrégation d'amphotéricine B (monomérique, dimérique, polymérique) dans de l'albumine.

D'après les résultats, l'encapsulation de l'amphotéricine B par l'albumine, en plus du faible coût de production et de préparation, réduit clairement la toxicité pour les cellules hôtes et améliore l'efficacité de la molécule pour la destruction des amastigotes de *Leishmania*. De plus, l'efficacité liée à l'agrégation montre l'intérêt de combiner des monomères d'amphotéricine B dans des microcapsules d'albumine pour le traitement de la leishmaniose canine et humaine.

- *Résistance*

Le risque de création de souches résistantes à l'amphotéricine B chez le chien est encore inconnu. En culture, des souches résistantes de *Leishmania donovani* peuvent être sélectionnées en augmentant la concentration moyenne de la molécule. L'analyse de la composition lipidique de la membrane cellulaire montre que le principal stérol associé à la résistance est un précurseur de l'ergostérol et non pas l'ergostérol comme dans la souche sensible à l'amphotéricine B. La possible chimiorésistance est donc due au remplacement de l'ergostérol par ce précurseur lipidique méthylé, insensible à l'action de l'antibiotique (Lamothe, 1999).

L'amphotéricine B présente donc une efficacité démontrée, laquelle reste inchangée dans les formulations les moins toxiques, mais cette molécule étant à usage humain hospitalier, son usage en médecine vétérinaire, controversé, pourrait être interdit, afin d'éviter l'apparition de chimiorésistance (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

L'apparition de chimiorésistance aux molécules de première intention nécessite l'utilisation de médicaments de seconde intention pour les chiens ne répondant pas au traitement classique.

## **2) Molécules de seconde intention**

### **a) La pentamidine**

- *Définition et mode d'action*

La pentamidine est une diamidine aromatique utilisée depuis 1946 contre la pneumocystose, la babésiose, la trypanosomose et la leishmaniose canine (Baneth et Shaw, 2002 ; Lamothe, 1999).

Ce médicament agit sur le kinétoplaste, qu'il décompose, ce qui inhibe la synthèse de l'ADN, et bloque le catabolisme glucidique. Il s'accumule dans le cytoplasme des parasites (Euzéby, 2008).

- *Effets indésirables*

La toxicité de la pentamidine n'est pas négligeable : locale d'abord (nécrose importante entraînant une perte massive de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané : abcès froid, douloureux), puis rénale, cardiaque (hypotension, tachycardie) et pancréatique (hypoglycémie précoce réversible, puis hyperglycémie tardive irréversible) (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000 ; Baneth et Shaw, 2002).

- *Protocole d'administration*

La pentamidine possède une AMM pour la leishmaniose canine et est commercialisée sous le nom de Lomidine®. Elle s'utilise à la posologie de 2 puis 4 mg/kg, par voie

intramusculaire profonde stricte tous les 2 jours pendant 2 mois (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

L'injection est douloureuse à cause de l'excipient (monométhyl acétamide, qui provoque la rupture des lipides musculaires) et du pH bas (4,5). Les injections intramusculaires doivent être stériles et l'aiguille utilisée pour le prélèvement du produit doit être changée avant l'injection. L'injection intrapéritonéale est sûre si le produit est préalablement dilué (10 %) dans une solution de dextrose isotonique (Lamothe, 1999).

- *Efficacité*

Son efficacité est comparable à celle des stibiés, mais en général les problèmes de tolérance locale interdisent de prolonger les traitements. Aucune étude n'a démontré une efficacité supérieure à l'antimoniote de méglumine, y compris en association avec lui (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

La plupart des chiens infectés traités à la pentamidine guérissent cliniquement puis rechutent quelques mois après le traitement (Baneth et Shaw, 2002).

Dans l'étude de Rhalem *et al.* (1999), 3 chiens naturellement infectés par *Leishmania infantum* et 5 infectés expérimentalement furent traités par deux cures de pentamidine à 3 semaines d'intervalle. Chaque cure consistait en 8 injections de pentamidine à 4 mg/kg par voie intramusculaire, administrées à 3 jours d'intervalle. Tous les chiens s'améliorèrent cliniquement et immunologiquement après le traitement et sur les deux chiens infectés expérimentalement, les deux étaient négatifs à la culture et à la cytologie 6 mois après le traitement. Cependant, le statut parasitaire des 6 autres chiens est inconnu.

- *Résistance*

La résistance des leishmanies à la pentamidine est due à un défaut d'internalisation de la molécule et à une augmentation de sa fuite hors du parasite. Bien que des transporteurs spécifiques de capture de la pentamidine aient été caractérisés et pourraient avoir un rôle dans la résistance, d'autres données suggèrent l'importance de l'accumulation du principe actif dans la mitochondrie du parasite. Les promastigotes de type sauvage accumulent plus de pentamidine dans leur mitochondrie par rapport aux promastigotes résistants, et ceci faciliterait la fuite du principe actif hors du parasite (Croft *et al.*, 2006).

## b) La paromomycine (aminosidine)

- *Définition et mode d'action*

La paromomycine ou aminosidine est un antibiotique de la famille des aminosides, élaboré par *Streptomyces rimosus*, utilisé lors d'infections à staphylocoques, streptocoques, *Pseudomonas* (sauf *aeruginosa*). Il est actif sur les agents des leishmanioses cutanées (topique) et, à un moindre degré, sur les leishmanioses viscérales (voie intramusculaire) (Euzéby, 2008).

Elle inhibe les synthèses protéiques et mitochondriales par liaison à la sous-unité ribosomale 30S (Davidson *et al.*, 2008 ; Jhingran *et al.*, 2009).

- *Effets indésirables*

Comme tous les aminosides, les effets indésirables les plus importants associés à l'administration parentérale de paromomycine sont les toxicités vestibulaire, cochléaire et rénale. Les facteurs de risque à l'apparition de ces toxicités sont : insuffisance rénale, posologie élevée, forte dose totale, forte concentration plasmatique, déshydratation et exposition concomitante à d'autres agents ototoxiques et/ou néphrotoxiques (Davidson *et al.*, 2008).

- *Protocole d'administration et efficacité*

Chez le chien leishmanien naturellement infecté, l'injection de 10 à 20 mg/kg par jour de paromomycine par voie intramusculaire pendant 14 à 30 jours améliore l'état clinique mais la rechute survient entre 50 et 100 jours après le traitement (Poli *et al.*, 1997 ; Vexenat *et al.*, 1998). Dans la première étude (Poli *et al.*, 1997), 11 chiens sur 12 s'améliorèrent cliniquement mais 4 chiens sur les 4 pour lesquels les cultures sur nœuds lymphatiques étaient disponibles restèrent porteurs du parasite. Dans l'autre étude (Vexenat *et al.*, 1998), 3 chiens sur 3 s'améliorèrent cliniquement avec une posologie de 20 mg/kg par jour. L'augmentation de la posologie de la paromomycine à 40 mg/kg par jour donna les résultats suivants : 3 chiens sur 12 restèrent en rémission clinique et parasitologique pendant 4 ans mais les 9 autres chiens souffrirent d'une rechute ou de la toxicité du médicament.

La paromomycine a également été recommandée en association avec les stibiés (Belloli *et al.*, d'après Baneth et Shaw, 2002). Cependant, cette association augmente le risque de néphrotoxicité.

- *Résistance*

La résistance des leishmanies à la paromomycine est associée à une diminution de l'accumulation de la molécule dans les promastigotes résistants et à une réduction significative de sa liaison initiale à la surface de la cellule (Jhingran *et al.*, 2009).

### c) Les azoles

- *Définition et mode d'action*

Les dérivés azolés, comprenant les imidazolés (kétoconazole et miconazole) et les triazolés (fluconazole et itraconazole), sont des antifongiques inhibant la 14 $\alpha$ -déméthylase, enzyme à cytochrome P450, empêchant la conversion du lanostérol en ergostérol (constitutif de la membrane du parasite). La désorganisation de la membrane qui en résulte inhibe la croissance et la réplication (Lamothe, 1999).

- *Effets indésirables*

Les effets indésirables sont rares. À forte dose, le kétoconazole peut être hépatotoxique et peut entraîner une intolérance digestive (vomissements, diarrhée, anorexie) ; du prurit, de l'alopecie, l'éclaircissement du pelage et une perte de poids peuvent survenir lors d'un traitement à long terme. La toxicité de l'itraconazole est faible chez les carnivores

domestiques : rares cas de vascularite lors de prises prolongées et à forte dose (Kukanich, 2008).

- *Protocole d'administration*

Le kétoconazole administré *per os* a donné quelques résultats dans les leishmanioses cutanées ou cutanéomuqueuses humaines ; chez le chien, son utilisation avait été tentée en association avec l'antimoniote de méglumine, pendant les 2 mois de traitement, *per os*, à la posologie de 10 à 20 mg/kg par jour, en 2 prises quotidiennes, au cours du repas (Bussiéras et Chermette, 1992).

- *Résistance*

Les études sur les levures du genre *Candida* spp. ont montré que la diminution de la sensibilité aux azoles est liée à des mutations sur des sites de la 14 $\alpha$ -déméthylase et que la résistance clinique à *Candida albicans* est due à une fuite du principe actif suite à la stimulation des transporteurs membranaires et à la stimulation de plusieurs gènes codant pour des enzymes de la voie de synthèse des stérols. Il n'existe pas de publication sur l'acquisition d'une résistance chez *Leishmania* spp. mais la résistance au fluconazole a été montrée comme étant rapidement induite *in vitro* chez un parasite voisin, *Trypanosoma cruzi* (Croft *et al.*, 2006).

#### d) Les quinolones

- *Définition et mode d'action*

Les quinolones forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique. Ces substances bloquent la réplication et la transcription de l'ADN en inhibant l'action d'une enzyme : l'ADN-gyrase (et/ou des topoisomérases), métallo-enzyme à magnésium, responsable du surenroulement des chaînes d'ADN dans l'espace ; elles sont ainsi bactéricides, accessoirement leishmanicides. Cette propriété a été observée *in vitro* à propos de leishmanioses cutanées humaines (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

- *Effets indésirables*

L'ADN-gyrase des bactéries étant très différente de celle des mammifères, les quinolones sont très faiblement toxiques chez ces espèces ; cette propriété est très intéressante, du fait de l'absence de néphrotoxicité (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

- *Protocole d'administration*

L'enrofloxacin (Baytril<sup>®</sup>), à la dose de 10 mg/kg/j, *per os*, a montré une certaine efficacité dans le traitement de la leishmaniose canine : amélioration clinique notable, augmentation de poids, reprise de l'appétit, diminution des titres en anticorps, ... mais semble sans effet sur les ulcères cutanés ; en outre, après une amélioration clinique spectaculaire, il n'est pas rare d'observer une rechute 2 mois après le début du traitement (Bourdoiseau et Dénerolle, 2000).

La marbofloxacine (Marbocyl<sup>®</sup>), fluoroquinolone de 3<sup>ème</sup> génération, fut étudiée *in vitro* en présence de macrophages de chiens infectés par des promastigotes de *Leishmania infantum* par Vouldoukis *et al.* (2006). L'activité leishmanicide de la marbofloxacine était due à une augmentation de la production d'oxyde nitrique et de TNF- $\alpha$  par les macrophages, et aucune toxicité ne fut observée.

Rougier *et al.* (2008) ont ensuite étudié son efficacité *in vivo* en comparant 4 durées de traitement (10, 20, 28 ou 40 jours) à la marbofloxacine, administrée oralement, à la posologie de 2 mg/kg une fois par jour, sur 24 chiens leishmaniens (4 groupes de 6 chiens). Dans le groupe de chiens traités pendant 28 jours, le traitement était efficace plus rapidement et sur plus de chiens (5/6), et l'amélioration des signes cliniques était meilleure. Trois chiens sur 24 présentèrent une rechute durant les 9 mois de suivi. La quantité d'amastigotes dans les macrophages fut significativement réduite après 3 mois dans les 4 groupes. Aucun effet secondaire ne fut observé pendant les 9 mois de l'étude.

Les résultats obtenus avec la marbofloxacine à la posologie de 2 mg/kg une fois par jour pendant 28 jours semblent encourageants et pourraient offrir une alternative sûre au traitement de la leishmaniose canine.

#### e) La miltéfosine (hexadécylphosphocholine)

- *Définition et mode d'action*

La miltéfosine est un médicament de nature alkyolphosphocholipidique, agissant sur les leishmanies en perturbant le métabolisme lipidique au niveau de la membrane des parasites : diminution de la teneur en phosphatidylcholine et élévation de la phosphatidyléthanolamine, inactivation de la phosphatidyléthanolamine méthyltransférase, activation de la phospholipase 2 et augmentation de la lysophosphatidylcholine, augmentation de la teneur en cholestérol par condensation avec les stérols ambiants. Elle inhibe ainsi la pénétration des leishmanies dans le macrophage par interaction avec les glycosymes et les ancrages glycosylphosphatidylinositols (essentiels à la survie intracellulaire de *Leishmania*) et par perturbation de la transduction du signal membranaire de *Leishmania* par inhibition de la phospholipase C (Croft et Engel, 2006 ; Euzéby, 2008).

La miltéfosine est non seulement directement toxique pour les leishmanies, mais elle stimule aussi l'activation des macrophages et des cellules T, et la production des métabolites de l'oxygène et du monoxyde d'azote (Baneth et Shaw, 2002).

- *Effets indésirables*

La miltéfosine présente l'avantage d'une administration par voie buccale, mais n'est pas dépourvue de toxicité. Formulée au départ pour le traitement topique des cancers cutanés (lésions provoquées par le cancer du sein, lymphome cutané), la miltéfosine prise oralement par les patients humains atteints de cancer a des effets secondaires au niveau gastro-intestinal (nausées, vomissements, perte d'appétit) (Sindermann et Engel, 2006).

Les études de laboratoires sur les rats et les lapins ont montré des effets tératogéniques (rats seulement), foetotoxiques et embryotoxiques. Il convient donc de ne pas utiliser la miltéfosine chez les femelles gestantes ou en lactation et chez les reproducteurs (Sindermann et Engel, 2006).

Chez le chien, les effets secondaires surviennent dans un quart des cas et se manifestent en général au niveau du tractus digestif : vomissements, diarrhée. Ces effets secondaires sont brefs, tolérables et réversibles sans traitement concomitant, réduction de

dose ou arrêt du traitement. Les vomissements n'interfèrent pas avec l'efficacité de la miltéfosine et consistent généralement en un épisode journalier durant 1 ou 2 jours. Les effets adverses sont moins fréquents quand la miltéfosine est donnée pendant tout le repas que pendant une partie de celui-ci (Woerly *et al.*, 2006).

- *Protocole d'administration et efficacité*

Woerly *et al.* (2006) ont étudié l'efficacité de la miltéfosine administrée à 2 mg/kg/j, une fois par jour, pendant 28 jours, dans le traitement de la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*.

Le pourcentage de réduction du score clinique fut de 61,2 % ( $\pm$  44,9), indépendamment du fait qu'il s'agisse d'un premier épisode ou d'une récurrence de leishmaniose.

Pour 82,7 % des chiens, les vétérinaires impliqués considèrent que le traitement à la miltéfosine était autant voire plus efficace que le traitement antileishmanien conventionnel (association antimoniate de méglumine et allopurinol).

Le score clinique montra une diminution marquée tout au long des deux mois de suivi, avec un effet-temps significatif. La réponse clinique à la miltéfosine était marquée pendant les 4 semaines de traitement et a continué à s'améliorer lors des 4 semaines suivant le traitement, indiquant que celui-ci a poursuivi son action même après la fin de son utilisation.

En ce qui concerne le statut parasitaire des chiens, 51,5 % des chiens présentant des parasites au myélogramme avant le traitement avaient un myélogramme négatif au 56<sup>ème</sup> jour. Quant au statut sérologique, pour 37,2 % des chiens le titre en anticorps avait diminué d'une dilution, pour 3,9 % d'au moins deux dilutions.

Un autre alkylphospholipide, la périfosine (à la posologie de 5 mg/kg/j pendant 14 jours), a montré une meilleure efficacité que la miltéfosine dans une étude *in vivo* sur des souris infectées par *Leishmania amazonensis* (Cabrera-Serra *et al.*, 2008).

- *Résistance*

L'apparition d'un phénomène de chimiorésistance est possible : baisse des taux des chaînes lipidiques insaturées, modifiant la membrane plasmique des parasites et gênant la pénétration du médicament (Euzéby, 2008).

Chez l'homme, le traitement des leishmanioses à la miltéfosine est nettement moins efficace chez les patients atteints du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Ritmeijer *et al.*, 2006).

Bien que le traitement antileishmanien avec les molécules courantes confère souvent une amélioration clinique temporaire chez les chiens atteints de leishmaniose, il n'empêche pas la survenue de rechutes de la maladie. De plus, il ne permet généralement pas la stérilisation parasitaire des chiens infectés qui restent donc porteurs du parasite. Pour l'évaluation des protocoles, les mesures d'appréciation du statut parasitaire (examen microscopique, culture et PCR) avant et après le traitement devraient être considérées comme essentielles. D'autres mesures d'évaluation de l'efficacité des molécules, comme l'infectivité des chiens traités pour les phlébotomes, devraient également être considérées (Baneth et Shaw, 2002).

Aujourd'hui, la leishmaniose canine reste une maladie sans traitement réellement efficace. De nouvelles molécules, de nouveaux systèmes de délivrance et de nouvelles stratégies de traitement sont nécessaires pour atteindre la stérilisation parasitaire systématique des chiens infectés. De plus, il serait préférable que les leishmanioses humaine et canine soient traitées avec des molécules agissant par des mécanismes différents afin de minimiser le danger d'apparition de souches de parasites résistantes (Baneth et Shaw, 2002).

Le traitement des chiens leishmaniens, bien que souvent inefficace pour éliminer l'infection, est néanmoins indiqué pour les chiens de particuliers qui sont bien pris en charge, car il induit l'amélioration clinique dans la plupart des cas et peut retarder la détérioration ultérieure de l'état de l'animal. Avant de prendre la décision de commencer le traitement, les propriétaires doivent être informés de la maladie et de son caractère zoonotique, du coût élevé du traitement et de son suivi, du besoin d'être rigoureux dans le protocole thérapeutique et le suivi médical, du pronostic général, de la possibilité d'une rechute et du fait que le traitement n'aboutira pas à l'éradication de l'infection. Des précautions supplémentaires doivent être prises dans les zones endémiques, comme la prévention des piqûres de phlébotomes chez les chiens traités, par l'utilisation de colliers, de sprays, ou d'autres produits insecticides (Baneth et Shaw, 2002).

Dans l'attente de molécules véritablement efficaces et sans danger, la prophylaxie de la leishmaniose canine, c'est-à-dire l'éviction de l'infection, soit par la vaccination, soit par la lutte contre les piqûres de phlébotomes, reste une mesure très importante à considérer dans la lutte contre la leishmaniose canine.



### **III Prophylaxie de la leishmaniose canine**

La prophylaxie de la leishmaniose canine peut se faire à deux niveaux : la vaccination du chien contre les leishmanies, méthode encore à l'état de recherche car aucun vaccin n'est commercialisé en France, et l'éviction des piqûres de phlébotomes, procédé largement utilisé et ayant démontré une certaine efficacité.

#### **A. La vaccination contre la leishmaniose canine**

Une vaccination efficace contre la leishmaniose canine peut empêcher la survenue de la maladie chez le chien et constitue une stratégie majeure pour diminuer la menace de la transmission à l'homme. Les premiers essais vaccinaux ont été menés au Brésil dans les années 1940 puis à partir des années 1970 dans d'autres pays d'Amérique du Sud (Venezuela, Colombie, Équateur) et dans l'ancien Monde (Iran, Soudan). Après des décennies peu fructueuses d'essais de production de vaccins efficaces et sûrs, les vaccins canins nouvellement développés sont actuellement au stade des essais cliniques de terrain, et l'un d'eux est commercialisé au Brésil (Miró *et al.*, 2008).

##### **1) Conditions nécessaires et classification**

###### **a) Qu'est-ce que la vaccination ?**

La vaccination est un procédé consistant à introduire un antigène dans un organisme vivant afin de créer une réaction immunitaire protectrice contre cet antigène. Le principe actif d'un vaccin est l'antigène destiné à stimuler les défenses propres de l'organisme (le système immunitaire). La réaction immunitaire primaire permet en parallèle une mise en mémoire de l'antigène présenté pour qu'à l'avenir, lors d'une contamination vraie, l'immunité acquise puisse s'activer de façon plus rapide.

###### **b) Les phases d'essais cliniques**

L'élaboration d'un vaccin, après sa découverte, passe par plusieurs phases d'essais cliniques successives permettant d'aboutir ou non à sa commercialisation.

D'après les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'étude de phase I consiste à évaluer l'immunogénicité et la sécurité du vaccin en comparant des sujets traités par le vaccin et des sujets traités par un placebo.

L'étude de phase II consiste à vérifier la protection induite par le vaccin lors d'une infection expérimentale. Bien que cette étape soit nécessaire pour trouver la dose adéquate, la voie d'inoculation et le protocole vaccinal avant l'étude de terrain, elle est peu conforme à la réalité à causes des conditions expérimentales.

L'étude de phase III analyse l'efficacité du vaccin contre l'infection naturelle.

Toutes ces études sont effectuées en double aveugle avec des petits effectifs d'individus (dizaines à centaines). Si le vaccin passe ces étapes avec succès, la formulation peut être envoyée à l'enregistrement et à l'industrialisation et être utilisée en étude de phase IV dans le cadre de campagnes d'immunisation concernant de plus grandes populations (de 10 000 à 100 000 individus dans le cas d'essais cliniques humains). Pour des raisons éthiques, étant donné l'effet bénéfique du vaccin, il n'y a pas de contrôle placebo et l'efficacité du vaccin est mesurée en comparant l'incidence de la maladie avant et après la vaccination (Palatnik-de-Sousa, 2008).

### c) Rôle de l'adjuvant et vectorisation des antigènes

L'adjuvant ajouté au vaccin contre les leishmanies joue un rôle majeur dans l'orientation et le soutien de la réponse à l'antigène et dans sa reconnaissance par le système immunitaire. Le choix de l'adjuvant est donc extrêmement important dans la vaccination contre la leishmaniose canine (Miró *et al.*, 2008).

Le terme « adjuvant » dérive du latin « adjuvare » qui signifie aider, assister. Il désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément. Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine extrêmement diverses, et dont il serait impossible de dresser une liste exhaustive. Les adjuvants sont des agents immunostimulants qui activent directement les cellules de l'immunité en se liant à différents récepteurs.

Bien qu'ils soient également testés seuls dans le cadre de certaines immunothérapies, les adjuvants sont surtout utilisés en tant que constituants de vaccins. La plupart du temps, ils sont indispensables à l'installation d'une réponse immune protectrice. En effet, le pouvoir immunogène d'un vaccin non adjuvé, surtout s'il est inactivé, est souvent trop faible car la vaccination ne peut imiter parfaitement une infection naturelle. Les vaccins sous-unitaires en cours de développement, qui se réduisent parfois à de simples peptides, sont particulièrement concernés par ce problème. Même s'ils contiennent les épitopes protecteurs adéquats, ils manquent d'un agent capable d'amplifier et d'orienter la réponse immune spécifique sans en être la cible ; c'est à ce titre qu'interviennent les adjuvants.

Les adjuvants se retrouvent tant dans les vaccins humains que vétérinaires. L'alun par exemple, seul adjuvant actuellement enregistré pour la médecine humaine, est utilisé dans de nombreux vaccins vétérinaires. Au niveau expérimental, les deux types de vaccins (humains et vétérinaires) bénéficient du développement de nouveaux adjuvants tels que les saponines ou les oligonucléotides CpG (Vermout *et al.*, 2003).

Les vecteurs sont des « véhicules » non pathogènes pour l'animal dans lesquels sont insérés les gènes du pathogène. Les vecteurs peuvent être de différents types, notamment viraux (poxvirus, adénovirus, herpesvirus) ou bactériens (BCG, salmonelle). Le vecteur peut également être un plasmide, on parle alors de vaccins ADN. Le gène protecteur est incorporé dans le plasmide, molécule circulaire d'ADN bactérien.

Les vecteurs contiennent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire. Ils possèdent souvent des propriétés immunostimulantes, simplement parce qu'ils constituent des corps étrangers (Vermout *et al.*, 2003).

#### d) Propriétés nécessaires pour le vaccin

Le vaccin contre la leishmaniose canine devrait avoir les propriétés suivantes (Jaffe, 1999) :

- induction d'une réponse immunitaire de type Th1 conférant à l'animal une résistance à l'infection ;
- efficacité sur tous les stades parasitaires ;
- stabilité, coût modéré, efficacité durable ;
- induction d'une immunité stérile, c'est-à-dire empêcher l'infection par les leishmanies et pas seulement éviter le développement de la maladie. Ceci est important dans le cadre de la leishmaniose car les chiens leishmaniens asymptomatiques représentent un réservoir de parasites. Ce type de vaccin présenterait une mesure prophylactique à la fois pour la leishmaniose canine et pour la leishmaniose humaine.

#### e) Classification des vaccins

Les vaccins anti-leishmaniens en développement sont divisés en plusieurs catégories (Khamesipour *et al.*, 2006 ; Jaffe, 1999 ; Palatnik-de-Sousa, 2008) :

- les leishmanies vivantes ou modifiées génétiquement ;
- les vaccins de première génération : fractions du parasite ou parasite entier tué, avec ou sans adjuvant ;
- les vaccins de deuxième génération : antigène parasitaire associé à un adjuvant et à un transporteur, protéines recombinantes, vaccins utilisant des bactéries ou des virus recombinants ;
- les vaccins de troisième génération : gènes codant pour un antigène protecteur, cloné dans un vecteur contenant un promoteur eucaryote (vaccination génétique).

Les études vaccinales utilisent diverses espèces de leishmanies, et pas seulement *Leishmania infantum*. De plus, en ce qui concerne l'historique des vaccins, il s'agira parfois de leishmaniose humaine.

## 2) Candidats vaccins

### a) Vaccins utilisant des leishmanies vivantes

- *Leishmanisation*

- Historique

Le premier vaccin contre la leishmaniose fut développé par le Professeur Adler qui avait observé que les femmes libanaises exposaient les bras de leurs enfants aux piqûres de phlébotomes car elles savaient intuitivement que le développement d'une unique lésion

cicatrisant d'elle-même les protégerait de la maladie (leishmaniose cutanée due à *Leishmania major*) dans le futur. L'ancienne pratique consistait en l'inoculation de matériel infectieux provenant des lésions dues à *Leishmania major* aux individus non infectés (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Ce processus de « leishmanisation » en tant que vaccin prophylactique fut utilisé en Israël dans les années 1970 et en Iran dans les années 1980 puis enfin dans le cadre d'un programme massif impliquant environ 2 millions de personnes pendant la guerre entre l'Iran et l'Iraq de 1982 à 1986 (Khamesipour *et al.*, 2006).

Il évolua ensuite vers l'utilisation des vaccins de première génération composés de parasites entiers tués ou d'extraits crus. Il fut arrêté à cause de la persistance incontrôlée des lésions cutanées, de la propagation du VIH et de l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs, de raisons éthiques, de la persistance du parasite et des difficultés à contrôler l'inoculum (Palatnik-de-Sousa, 2008).

#### ○ Utilisation actuelle

A présent il n'existe qu'un seul vaccin de ce type. Il s'agit d'un mélange de *Leishmania major* vivante virulente et de parasite tué, commercialisé en Uzbekistan (Khamesipour *et al.*, 2006).

#### ○ Futur des vaccins vivants

L'utilisation de types sauvages de *Leishmania major* pour l'infection provoque le développement d'une lésion avant l'induction de la protection. Cependant, les avancées récentes en matière de manipulation génétique ont rendu possible la production de souches mutantes qui ne causent pas d'infection après leur inoculation, mais produisent une immunité stable. Il existe des exemples de vaccination protectrice chez la souris avec des parasites génétiquement modifiés qui n'entraînent aucune pathologie mais induisent une protection contre les types sauvages de parasites. Ces parasites mutants ont été développés par mutagenèse et sélection, méthodes de criblage des gènes (soit pour introduire des gènes étrangers dans le génome, soit pour induire une déficience, mutants « knock-out »), afin d'étudier la fonction des gènes individuels ou des familles de gènes. La modification génétique consiste en le retrait d'un ou de plusieurs gènes comme dans les parasites knock-out, ou en l'introduction de marqueurs de sélection en plusieurs positions.

Une autre approche est l'ajout de gènes extérieurs « cassettes suicidaires » afin de rendre le parasite plus sensible aux médicaments.

Dans tous ces modèles, l'idée est d'induire la protection sans la lésion associée à la leishmanisation (Khamesipour *et al.*, 2006).

#### • Parasites « knock-out »

Plusieurs lignées de *Leishmania* ont été utilisées pour le blocage ou le retrait/le changement de place de gènes essentiels à la survie chez l'hôte. Ces parasites, dits « knock-out » ont un cycle plus court, suffisant pour provoquer une réponse immunitaire spécifique empêchant l'infection et l'apparition de la maladie (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Ainsi, en 1991, Cruz *et al.* ont produit un clone de *Leishmania major* qui ne dispose pas du gène codant pour la dihydrofolate réductase/thymidine synthétase (DHFR/TS). La souche défective peut ainsi persister plusieurs semaines chez la souris, sans produire de

lésion. De plus, elle confère aux souris immunisées une protection significative contre la maladie (Veras *et al.*, 1999). Cependant, les études ultérieures sur des primates furent décevantes et le DHFR/TS ne fut donc pas développé en tant que vaccin.

En utilisant une technique similaire de recombinaison homologue avec *Leishmania donovani*, le transporteur biopéptidique (BT1) fut inactivé. Le clone knock-out pour BT1 avait une virulence beaucoup plus réduite mais provoquait une réponse immunitaire conduisant à une forte résistance au parasite de type sauvage (Papadopoulou *et al.*, d'après Khamesipour *et al.*, 2006).

Des clones de *Leishmania mexicana*, knock-out pour certaines cystéines protéinases (CPa, CPb, ou les deux), ont montré une pathogénicité moindre et ont induit une protection partielle chez les souris BALB/c exposées au type sauvage de *Leishmania mexicana* (Frame *et al.*, 2000)

- *Cassettes suicidaires*

Comme les autres organismes, *Leishmania* peut être modifiée génétiquement afin d'entrer en apoptose en réponse à des signaux extérieurs de destruction autonome, dans le cadre d'une stratégie de vaccination. L'introduction de gènes, appelés « cassettes suicidaires », produisant des substances létales lors de l'exposition à des substrats inoffensifs aboutit à la génération de produits toxiques létaux pour le parasite (Khamesipour *et al.*, 2006).

Récemment, grâce au progrès de la technologie de criblage des gènes, une souche de *Leishmania major* sensible à deux molécules fut élaborée en introduisant dans le chromosome un gène modifié de la thymidine kinase HSV-1 (tk), qui confère une sensibilité accrue au ganciclovir, et un gène cytosine deaminase de *Saccharomyces cerevisiae* (cd), conférant la sensibilité à la 5-fluorocytosine. Les études *in vitro* montrèrent que les promastigotes de *Leishmania major* homozygotes (tk-cd +/+) étaient tués par l'une ou l'autre des molécules seule, et qu'ensemble les deux molécules agissaient en synergie. Les études menées *in vivo* montrèrent que les lésions d'apparition progressive chez la souris BALB/c, causées par *Leishmania major* (tk-cd +/+), étaient complètement guéries par deux semaines de traitement avec les molécules seules ou en association. Les animaux traités ne montrèrent aucun signe de rechute de l'infection pendant les 4 mois suivant les expérimentations (Davoudi *et al.*, 2005).

Aucun de ces essais n'a encore atteint le développement clinique, mais cette approche dévoile les possibilités de l'induction d'une protection sans pathologie associée. Cependant ces essais concernent davantage l'homme que le chien, car il s'agit de l'utilisation de *Leishmania major*, leishmanie responsable de leishmaniose cutanée humaine.

#### b) Vaccins de première génération

Les vaccins de première génération utilisent des parasites entiers tués ou inactivés. Ils ont l'avantage d'être relativement stables en termes de composition chimique et d'antigénicité, offrent une grande diversité d'antigènes, sont peu coûteux et sûrs (Giunchetti *et al.*, 2008).

Cependant, les antigènes de *Leishmania infantum* disposent d'une forte capacité d'immunosuppression qui serait délétère pour l'immunoprotection contre la leishmaniose

canine. Plusieurs études ont rapporté la capacité des antigènes de *Leishmania infantum* à provoquer l'immunosuppression par le blocage *in vitro* de la réponse lymphoproliférative aux antigènes leishmaniens et de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes. Les différentes études ont donc utilisé différentes espèces de leishmanies auxquelles le chien n'est pas sensible, comme *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, et ont étudié les réponses immunitaires provoquées et la protection conférée par ces vaccins contre l'infection par *Leishmania infantum* (protection croisée) (Giunchetti *et al.*, 2008).

Chez le chien, les vaccins de première génération ont démontré jusqu'à 90 % de protection lors d'essais cliniques de phases I et II au Brésil utilisant des promastigotes de *Leishmania braziliensis*, lysés par sonication et inactivés par le merthiolate, formulés avec le Bacille de Calmette et Guérin (BCG). En effet, un an après la vaccination, seul un chien vacciné sur dix développa des signes cliniques, alors que quatre sur neuf des chiens contrôles montraient des signes d'infection. L'utilisation de ces vaccins à base de parasites entiers était habituellement accompagnée d'une forte réaction cellulaire, caractérisée par la prolifération des lymphocytes (Mayrink *et al.*, 1996).

Plus tard, la vaccination de chiens avec trois doses de *Leishmania major* ou *Leishmania infantum* autoclavés et adjuvés au BCG, suivie par une infection expérimentale par des promastigotes de *Leishmania infantum*, fut réalisée en Iran. Tous les chiens témoins furent négatifs pour le test cutané à la leishmanine (TCL) et furent démontrés infectés à l'autopsie réalisée 6 mois après l'infection expérimentale. En revanche, tous les chiens vaccinés furent positifs pour le TCL et seulement un sur huit fut infecté (Mohebbali *et al.*, 1998).

Puis, Lasri *et al.* (1999) démontrèrent que la vaccination des chiens avec des promastigotes de *Leishmania major* autoclavés, et l'adjuvant BCG, stimulait une forte prolifération cellulaire contre les antigènes leishmaniens.

Les réponses immunitaires cellulaires et humorales, en réponse à une stimulation par des antigènes solubles, chez des chiens vaccinés avec des promastigotes de *Leishmania braziliensis* tués et adjuvés avec de la saponine, étaient caractérisées par l'augmentation des isotopes IgG spécifiques anti-*Leishmania*, de forts taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques, une intense prolifération cellulaire et l'augmentation de la production d'oxyde nitrique (Giunchetti *et al.*, 2007).

Plus récemment, une dose unique de *Leishmania major* autoclavé adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium et mélangé au BCG fut utilisée pour vacciner des chiens dans une étude de terrain en Iran. Le vaccin se révéla sûr et diminua l'incidence de la leishmaniose avec une efficacité de 69,3 %, ce qui justifia son utilisation ultérieure en doses multiples pour l'évaluation de la protection et de la transmission de la leishmaniose chez les chiens vaccinés en Iran (Mohebbali *et al.*, 2004).

Ces études rapportent toutes des résultats prometteurs dans l'utilisation des vaccins de première génération. Compte tenu des facilités à préparer ces vaccins, de leur faible coût de production et de leurs résultats prometteurs, ils pourraient être utiles dans le contrôle de la leishmaniose en zones endémiques, particulièrement dans les pays sous-développés (Giunchetti *et al.*, 2008).

### c) Vaccins de deuxième génération

Un large nombre d'antigènes leishmaniens définis sont maintenant disponibles pour les essais vaccinaux. Ils ont été obtenus soit par purification soit par clonage du gène. Des vaccins de deuxième génération constitués d'antigènes parfaitement définis sont en cours de développement, prenant en compte les mécanismes immunologiques de protection contre la leishmaniose identifiés par les recherches fondamentales sur des modèles animaux.

- *Vaccins à base d'antigènes leishmaniens purifiés*

La première étude publiée sur les vaccins de seconde génération a utilisé la fraction LiF2, mais celle-ci ne s'est pas avérée efficace. Deux vaccins canins ont montré des résultats satisfaisants dans des essais cliniques de phase III : le vaccin FML-saponine et le vaccin LiESAp-MDP.

- Le vaccin LiF2 : échec de la protection

Ce vaccin est une préparation lyophilisée semi-purifiée de promastigotes de *Leishmania infantum*, dont le poids moléculaire apparent va de 67 à 94 kDa (fraction LiF2).

Il fut testé dans une étude de terrain sur des chiens domestiques vivant dans une zone endémique du Sud de la France (Dunan *et al.*, 1989). Ces chiens furent immunisés avec LiF2 puis confrontés pendant 2 ans à l'exposition à *Leishmania infantum*.

Cependant, le statut immunitaire de ces chiens était mal défini. La prolifération des lymphocytes suite à l'immunisation ne fut pas mesurée. La réponse humorale à l'antigène était très faible et les anticorps ne furent détectés que par immunoprécipitation.

Étonnamment, lors de la première année de suivi, les taux d'infection et de maladie clinique étaient significativement plus élevés chez les chiens vaccinés par rapport aux chiens témoins.

Bien que l'immunisation avec LiF2 sensibilisât les chiens à l'antigène, elle ne provoqua pas de réponse adéquate en cellules T. Ces résultats soulignent l'importance de choisir des antigènes appropriés pour l'immunisation et la nécessité d'optimiser ces antigènes par des adjuvants, des vecteurs et des protocoles d'immunisation, avant les essais de terrain des vaccins potentiels.

- Le vaccin FML-saponine : Leishmune<sup>®</sup>

Après 25 ans de recherche, un vaccin contre la leishmaniose canine a été certifié au Brésil en 2004. Le vaccin Leishmune<sup>®</sup> est le premier vaccin contre la leishmaniose canine à être commercialisé.

- Composition du vaccin

Ce vaccin contient une fraction purifiée isolée de *Leishmania donovani* associée à un adjuvant à base de saponine extraite de l'écorce de *Quillaja saponaria*, un arbre d'Amérique du Sud. Le ligand fucose mannose (FML), fraction purifiée du parasite, est un complexe glycoprotéique qui inhibe fortement l'infection *in vitro* des macrophages murins par *Leishmania donovani*. Présent à la surface de *Leishmania donovani* tout au long de son cycle,

le FML possède un pouvoir immunogène chez le lapin et la souris. De plus, c'est un antigène sensible, prédictif et spécifique dans le séro-diagnostic (technique ELISA) de la leishmaniose canine, bien qu'il soit isolé de *Leishmania donovani*, car il existe une antigénicité croisée (Dantas-Torres, 2006).

Ce vaccin s'est montré protecteur contre l'infection expérimentale de souris par *Leishmania infantum*, ce qui témoigne d'une protection croisée et qui a incité les chercheurs à le tester chez le chien (Aguilar-Be *et al.*, 2005).

#### ▪ Efficacité du vaccin

Une étude de terrain sur 600 chiens (Parra *et al.*, 2007) a montré que le vaccin Leishmune<sup>®</sup> est bien toléré, sûr, et très immunogène.

Dans une zone brésilienne endémique pour la leishmaniose humaine et canine à *Leishmania infantum*, São Gonçalo do Amarante, les récents essais cliniques de phase III analysant l'efficacité du vaccin FML-saponine chez le chien aboutirent à 92 % (da Silva *et al.*, 2001) et 95 % (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) de protection pour les chiens exposés à la maladie (76 et 80 % d'efficacité vaccinale, respectivement).

Dans les deux études, les chiens vaccinés reçurent 3 doses du vaccin à 21 jours d'intervalle, par voie sous-cutanée, alors que les chiens du groupe témoin reçurent une seule injection de solution saline stérile.

La protection induite par le vaccin dura jusqu'à 3 ans et demi après la vaccination et, à ce moment-là, les animaux vaccinés avaient des taux d'anticorps plus élevés, des réactions intradermiques plus importantes et ne présentaient aucun parasite ou ADN leishmanien dans leurs ponctions de moelle osseuse. En revanche, les chiens témoins étaient positifs à la PCR d'ADN leishmanien, présentaient des amastigotes dans leur moelle osseuse et une réaction intradermique négative.

Le vaccin FML-saponine induit donc sur le terrain une protection forte et durable contre la leishmaniose canine.

Cependant, il est encore impossible de faire la différence entre un chien vacciné et un chien infecté, ce qui a provoqué la réticence de certains vétérinaires brésiliens à utiliser ce vaccin (Miró *et al.*, 2008).

Le fort potentiel immunogène du vaccin Leishmune<sup>®</sup> est dû à l'activation précoce et persistante des phagocytes et à la stimulation la production de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Araújo *et al.*, 2008).

Le vaccin FML-saponine est également capable d'améliorer le statut clinique et parasitaire de chiens déjà infectés par la leishmaniose canine, comme l'ont montré des études sur l'utilisation de ce vaccin en immunothérapie : réduction des signes cliniques et de la charge parasitaire, modulation de l'issue de l'infection et du pouvoir infectieux des chiens pour les phlébotomes (Santos *et al.*, 2007).

Mais bien que le vaccin Leishmune<sup>®</sup> pourrait être une option dans l'immunothérapie de la leishmaniose canine, il n'existe à présent aucune indication quant à son utilisation en tant qu'agent d'immunothérapie. Selon le fabricant, ce vaccin est uniquement indiqué pour les chiens asymptomatiques et séronégatifs (Dantas-Torres, 2006).

- Pouvoir de blocage de la transmission

Dans une zone endémique où les individus sont très exposés, des chiens sains vaccinés avec le vaccin Leishmune<sup>®</sup> restèrent exempts de parasites et n'infectaient pas les phlébotomes, jusqu'à 11 mois après la vaccination (Nogueira *et al.*, 2005).

Les phlébotomes nourris *in vivo* avec du sérum de chiens vaccinés avec le vaccin Leishmune<sup>®</sup> (donc contenant des anticorps anti-leishmanies) 12 mois plus tôt montrèrent une réduction de l'infection de 79,3 % par rapport aux phlébotomes nourris avec le sérum des chiens avant leur vaccination. Les anticorps anti-leishmanies présents dans le sérum des chiens vaccinés empêchent donc le développement des promastigotes chez le phlébotome femelle (Saraiva *et al.*, 2006).

Ces résultats indiquent que Leishmune<sup>®</sup> est un vaccin bloquant la transmission, ce qui pourrait avoir un impact important sur l'interruption du cycle épidémiologique de la leishmaniose et le contrôle de la zoonose.

Malheureusement, il est à ce jour impossible de dire si le vaccin Leishmune<sup>®</sup> présentera un impact positif sur la santé publique. Ce vaccin étant formulé pour les chiens, il peut être considéré comme une solution majeure pour le problème animal. Évidemment, il serait encore plus important s'il avait aussi un impact sur l'incidence de la leishmaniose humaine. Si tel est le cas, le contrôle de cette maladie pourrait enfin devenir envisageable.

- Le vaccin *LiESAp*-MDP

- Composition du vaccin

Le vaccin *LiESAp*-MDP, vaccin étudié en France, est constitué d'antigènes excrétés/sécrétés (ESA) facilement purifiés à partir de surnageants de culture de promastigotes (p) de *Leishmania infantum* (Li), formulés avec du muramyl dipeptide (MDP) comme adjuvant. *LiESAp* ne contient que quelques polypeptides excrétés/sécrétés, et principalement une protéine d'un poids moléculaire d'environ 54 kDa (nom inconnu) (Lemesre *et al.*, 2005).

- Efficacité du vaccin

Dans l'étude de Lemesre *et al.* (2005), la vaccination avec deux injections sous-cutanées à trois semaines d'intervalle de 100 ou 200 µg de *LiESAp* formulé avec du MDP conféra une protection totale (100 % de protection) à des chiens beagles expérimentalement infectés avec 10<sup>8</sup> promastigotes virulents injectés 2 ou 8 mois après le rappel de vaccin. Ce résultat fut apprécié par l'absence de parasites dans les prélèvements de moelle osseuse des chiens pendant les 14 mois de suivi. En revanche, le vaccin utilisé à la dose de 50 µg de *LiESAp* ne conféra qu'une protection partielle (66,7 % de protection). Quant au groupe témoin, des parasites furent isolés des prélèvements de moelle osseuse de tous les chiens de ce groupe dès 2 mois après la vaccination.

Une étude randomisée en double aveugle fut plus tard réalisée avec le vaccin *LiESAp*-MDP sur des chiens naturellement exposés dans le sud de la France (Lemesre *et al.*, 2007). Après 2 ans, l'incidence de l'infection fut de 0,61 % (1/165) chez les chiens vaccinés contre 6,86 % (12/175) chez les chiens témoins, correspondant à une efficacité vaccinale de 92 %.

Cette seconde étude a notamment démontré une baisse de la charge parasitaire significative parallèlement à la protection.

Ce succès s'explique par une double action du vaccin *LiESAp-MDP* : induction d'une réponse cellulaire active et d'anticorps spécifiques d'isotypes IgG2 (souvent associés à l'infection asymptomatique). La réponse immune de type Th1 est caractérisée de diverses manières : augmentation du taux d'IFN- $\gamma$  accompagnée d'une activité leishmanicide des macrophages liée au NO. Ce phénomène conduit à la mort des amastigotes intracellulaires par apoptose. Parallèlement à cette activation cellulaire, apparaissent des anticorps IgG2 spécifiques du vaccin *LiESAp-MDP*. Ces anticorps ont la particularité d'inhiber la prolifération et de baisser la viabilité *in vitro* des amastigotes et promastigotes de *Leishmania infantum* (Lemesre *et al.*, 2007 ; Holzmüller *et al.*, 2005 ; Bourdoiseau *et al.*, 2009).

Plus encore, les essais pratiqués avec le vaccin *LiESAp-MDP* ont montré que les chiens vaccinés étaient capables d'induire une réponse anticorps spécifique et durable principalement dirigée contre un immunogène majeur des produits d'excrétion de *Leishmania infantum*. Celui-ci a été identifié par génie génétique comme appartenant à la famille des antigènes de surface du promastigote. Bien que cet antigène (nom inconnu) ait été initialement identifié chez les formes promastigotes, différentes études semblent indiquer qu'il serait aussi présent chez les amastigotes. D'autres travaux tendent à montrer qu'il constitue une composante essentielle au développement des leishmanies.

Récemment, l'équipe de Jean-Loup Lemesre a réalisé une étude fonctionnelle des gènes codant l'antigène de surface. Celle-ci a mis en évidence l'existence d'une corrélation directe entre le niveau d'expression de cette protéine chez les promastigotes génétiquement modifiés et leur infectivité *in vitro* vis-à-vis de macrophages. Ainsi, par ses propriétés biologiques fonctionnelles et immunologiques remarquables, l'antigène de surface du promastigote représente un candidat vaccin potentiel.

Pour tester cette hypothèse, il faudra le produire en quantité et qualité suffisantes. Pour cela, une collaboration a déjà mis au point, à partir d'un virus du riz, un vecteur utilisant les capacités de multiplication et de traduction génomique du virus pour faire produire à du riz ou du tabac des protéines exogènes. Restera également à caractériser la plus petite partie de l'antigène capable de reproduire les propriétés immunoprotectrices du vaccin *LiESAp-MDP* (Lemesre, 2008).

Le vaccin *LiESAp-MDP* induit donc une protection forte et de longue durée contre la leishmaniose canine, chez les chiens infectés expérimentalement et naturellement.

Les partenaires du projet français Vaxileish (labellisé en janvier 2007), dont l'objectif est de développer un vaccin contre les leishmanioses humaines et animales, doivent actuellement contribuer à une meilleure caractérisation du principe actif du vaccin *LiESAp-MDP* et à optimiser le développement de nouvelles méthodes visant à évaluer l'efficacité de la vaccination et à développer, à assez court terme (2009), un vaccin de seconde génération utilisant l'antigène de surface du promastigote. Les objectifs sont de simplifier l'obtention du vaccin et d'en améliorer la production. Ce vaccin, à usage vétérinaire et au nom proposé de CaniLeish, aura l'avantage d'accélérer le développement d'un vaccin à visée humaine et de rendre ce dernier abordable pour les populations concernées (Lemesre, 2008).

- *Vaccins à base d'antigènes recombinants*

Le dernier volet des vaccins de deuxième génération est l'utilisation de protéines recombinantes, technique largement étudiée depuis les années 1990. Les antigènes recombinants de *Leishmania* sont des protéines immunogènes dérivées de gènes de clones de *Leishmania* puis purifiées.

Les antigènes les plus prometteurs (testés sur différents modèles) sont listés dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Antigènes leishmaniens recombinants candidats pour des vaccins de deuxième génération**

Antigène	<i>Leishmania</i>	Modèle d'étude
gp63	<i>L. major, L. mexicana</i>	souris
LACK	<i>L. major</i>	souris
PSA-2	<i>L. major</i>	souris
H1	<i>L. major</i>	souris, singe
HASPB1	<i>L. donovani</i>	souris
H1, HASPB1, H1 + HASPB1	<i>L. infantum</i>	chien
A2	<i>L. donovani</i>	souris
LCR1	<i>L. chagasi</i>	souris
LeIF	<i>L. major</i>	souris
TSA et LmSTI1	<i>L. major</i>	souris, singe
Leish 111 (MML) = LeIF + TSA + LmSTI1	<i>L. major, L. infantum, L. chagasi</i>	souris, chien
CPb	<i>L. major</i>	souris
CPa + CPb	<i>L. infantum</i>	chien
Protéine Q chimérique	<i>L. infantum</i>	chien
NH36	<i>L. chagasi</i>	souris

*L.* : *Leishmania* ; gp63 : glycoprotéine de surface ; LACK : *Leishmania* homolog of the receptors of activated kinase C ; PSA-2 : parasite surface antigen 2 ; H1 : histone 1 ; HASPB1 : hydrophilic acylated surface protein B1 ; LeIF : *Leishmania* elongation initiation factor ; TSA : thiol-specific antioxidant ; LmSTI1 : *Leishmania major* stress inducible protein 1 ; CP : cystéine protéinase

*D'après Palatnik-de-Sousa, 2008*

Les candidats vaccins recombinants ont été testés seuls, en association, ou en polyprotéines ou chimères. Afin d'induire une protection, la plupart ont dû être formulés avec un adjuvant, ou véhiculés par une bactérie, à l'exception des protéines LeIF et HASPB1. Alors que la plupart des protéines recombinantes ont été testées pour leur immunogénicité et leur potentiel protecteur sur des modèles murins, seules quelques unes d'entre elles ont été étudiées chez le chien dans des conditions expérimentales (tableau 9) (Palatnik-de-Sousa, 2008).

**Tableau 9 : Antigènes leishmaniens recombinants testés chez le chien**

Antigène	Adjuvant/véhicule	<i>Leishmania</i>	Protection	Phase d'essai clinique
Leish 111 = LeIF + TSA + LmSTI1	MPL-SE <sup>®</sup> /Adjuprime <sup>®</sup>	<i>L. chagasi</i>	nd	I
Leish 111	MPL-SE <sup>®</sup> /Adjuprime <sup>®</sup>	<i>L. infantum</i>	nd	III
Leish 111	MPL-SE <sup>®</sup>	<i>L. infantum</i>	29 % protégés, contre 25 % dans le groupe témoin	IIa
H1, HASPB1, H1 + HASPB1	Montanide <sup>®</sup>	<i>L. infantum</i>	50 % protégés, contre 25 % dans le groupe témoin	IIa
CPb + CPa	QuilA <sup>®</sup> + IL-12	<i>L. infantum</i>	0	I-IIa
Protéine Q chimérique	BCG	<i>L. infantum</i>	90 %	I-IIa

*L.* : *Leishmania* ; nd : non déterminé ; LeIF : *Leishmania* elongation initiation factor ; TSA : thiol-specific antioxidant ; LmSTI1 : *Leishmania major* stress inducible protein 1 ; H1 : histone 1 ; HASPB1 : hydrophilic acylated surface protein B1 ; CP : cystéine protéinase ; BCG : Bacille de Calmette et Guérin

D'après Palatnik-de-Sousa, 2008

La protéine de fusion multi-composants Leish-111f, aussi connue sous le nom de polyprotéine MML, contenant les antigènes TSA, LmSTI1 et LeIF, formulée avec MPL-SE® comme adjuvant, fut seulement immunogène chez des chiens soumis à l'infection par *Leishmania infantum* (Fujiwara *et al.*, 2005 ; Moreno *et al.*, 2007), et n'empêcha pas l'infection naturelle à *Leishmania infantum*, ni la progression de la maladie chez des chiens lors d'un essai clinique de phase III (Gradoni *et al.*, 2005). Ces chiens avaient eu deux injections de trois doses vaccinales à un an d'intervalle.

L'histone H1, la protéine HASPB1 (« hydrophilic acylated surface protein B1 ») ou les deux en association avec le Montanide® comme adjuvant, développèrent une protection partielle contre la leishmaniose canine, jusqu'au niveau clinique (Moreno *et al.*, 2007). L'immunisation avec la protéine HASPB1 recombinante induit des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène et une protection à long terme, ce qui est caractéristique des vaccins ADN que nous verrons ultérieurement.

La protéine Q, un antigène chimérique composé de la fusion génétique de cinq fragments issus des protéines ribosomales acides Lip2a Lip2b, P0 et l'histone H2A, utilisée précédemment pour le diagnostic sérologique de la leishmaniose canine, fut testée sur des chiens expérimentalement infectés à *Leishmania infantum*. Les animaux reçurent la protéine chimérique mélangée à du BCG vivant et les résultats montrèrent 90 % de protection contre l'infection expérimentale chez les chiens vaccinés (Molano *et al.*, 2003).

Enfin, l'utilisation de deux cystéines protéinases, CPa et CPb, en association avec de l'IL-12 et l'adjuvant QuilA® (préparation standardisée de saponine), ne fut pas efficace pour protéger des chiens de l'infection à *Leishmania infantum*, probablement à cause de la faible concentration de l'adjuvant (50 µg dans chaque dose) (Poot *et al.*, 2006).

Les vaccins de deuxième génération, dont fait partie le seul vaccin contre la leishmaniose canine actuellement commercialisé, Leishmune®, ont une efficacité supérieure à ceux de première génération. De plus, ils sont plus stables et moins coûteux. Cependant, ils ne possèdent pas autant d'avantages que les vaccins de troisième génération fondés sur l'immunisation génétique.

#### d) Vaccins de troisième génération

- *Avantages de la vaccination génétique*

Depuis peu, un certain intérêt est accordé à la vaccination génétique pour les maladies humaines et vétérinaires. Les vaccins à base d'ADN offrent de nombreux avantages par rapport aux vaccins conventionnels (tableau 10). Tout d'abord, les plasmides utilisés pour la vaccination sont stables, peu coûteux et produits facilement sous une forme presque pure. Ceci permet le développement et la production rapide de nouveaux vaccins en grande quantité et même l'utilisation simultanée de plusieurs immunogènes. Les vaccins ADN sont faciles à transporter et ne nécessitent pas de chaîne du froid pour leur distribution.

De plus, ces vaccins permettent l'expression d'antigènes parasitaires sous leur forme native. Ceci permet le déroulement efficace de la prise en charge et de la présentation des antigènes par le système immunitaire. L'immunisation par l'ADN induit à la fois des réponses

de cellules T cytotoxiques CD4<sup>+</sup> helper et CD8<sup>+</sup>, ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de la leishmaniose où les deux types cellulaires sont impliqués dans la protection, et une réponse humorale. Ces réponses sont de longue durée, et la production persistante d'antigène en faible quantité facilite le développement d'une forte affinité des réponses des cellules B et T.

Enfin, les vaccins génétiques peuvent être utilisés en association avec des gènes de l'hôte afin d'immunopotentialiser les cytokines (Jaffe, 1999).

**Tableau 10 : Avantages de la vaccination génétique contre la leishmaniose canine**

<b>Avantages de la vaccination ADN</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaccin stable, peu coûteux et facilement produit</li> <li>• Expression des antigènes sous leur forme native</li> <li>• Réponses immunitaires de longue durée</li> <li>• Induction d'une immunité à la fois cellulaire et humorale</li> <li>• Multiples antigènes ou cytokines dans un vaccin</li> </ul>

• *Candidats aux vaccins de troisième génération*

Les antigènes les plus étudiés comme candidats potentiel à la vaccination génétique furent ceux précédemment testés comme protéines recombinantes. La plupart d'entre eux furent testés seuls, et certains en association de gènes, ou en primo-vaccination hétérologue, qui consiste en l'injection du vaccin ADN suivie de l'injection de la protéine recombinante. L'effet protecteur des vaccins fut observé pour quasiment tous les plasmides testés (Palatnik-de-Sousa, 2008). Les candidats les plus prometteurs pour les vaccins de troisième génération, toutes espèces confondues, sont listés dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Candidats prometteurs pour les vaccins de troisième génération dans la leishmaniose**

Antigène candidat	Modèle d'étude
LACK	souris, chien
LeIF, TSA, LmSTI1	souris, singe, homme
H1	souris, singe
CPa + CPb	souris, chien
KMP11	souris, hamster, chien
NH36	souris, chien

LACK : *Leishmania* homolog of the receptors of activated kinase C ; LeIF : *Leishmania* elongation initiation factor ; TSA : thiol-specific antioxidant ; LmSTI1 : *Leishmania major* stress inducible protein 1 ; H1 : histone 1 ; CP : cystéine protéinase ; KMP11 : kinetoplastid membrane protein 11 ; NH36 : nucleoside hydrolase 36

*D'après Palatnik-de-Sousa, 2008*

Chez le chien, deux vaccins ADN se sont révélés efficaces lors d'études expérimentales.

Le premier exemple de vaccination génétique du chien contre la leishmaniose canine est l'utilisation d'une primo-vaccination avec un plasmide porteur du gène codant pour l'antigène LACK de *Leishmania infantum* : DNA-LACK, suivie d'un rappel avec un vaccin viral recombinant (rVV) contenant le même gène (rVV-LACK), et d'une infection expérimentale par *Leishmania infantum*. D'après l'étude concernée, dix-sept mois après l'infection, 60 % des animaux vaccinés DNA-LACK/rVV-LACK n'étaient pas infectés et ne présentaient pas de symptômes de la maladie alors que les chiens immunisés avec deux doses du plasmide DNA-LACK n'étaient pas protégés de l'infection. Notons que le vaccin viral recombinant (rVV-LACK) n'a pas été testé seul. Les chiens témoins (non vaccinés) étaient tous cliniquement affectés (nombreux parasites dans les tissus, fort taux d'anticorps spécifiques anti-leishmanies). Chez les chiens immunisés, l'évaluation de la production de cytokines a montré des réponses immunitaires caractérisées par une prolifération initiale Th1/Th2 et une réponse finale Th1, alors que les réponses Th2 prédominaient chez les chiens témoins (Ramiro *et al.*, 2003).

Dans un autre exemple de vaccination génétique contre la leishmaniose canine, un vaccin génétique utilisant une association d'ADN codant pour les cystéines protéinases CPa et CPb de *Leishmania infantum* fut testé dans une étude expérimentale sur la leishmaniose canine en Iran et montra un effet protecteur contre l'infection expérimentale. Celui-ci fut démontré par l'augmentation de la synthèse des anticorps IgG2 spécifiques, la prolifération des lymphocytes, la sécrétion d'IL-10 et d'IFN- $\gamma$ , et la présence d'une réaction d'hypersensibilité retardée. Aucun décès ni signe clinique ne fut rapporté, probablement à cause du peu de parasite injectés ( $5.10^6$  promastigotes). Huit chiens sur les dix vaccinés furent considérés protégés d'après leurs résultats de PCR négatifs ; cependant, aucune conclusion significative ne peut être retenue de l'étude, dans la mesure où elle n'impliquait que deux chiens témoins (Rafati *et al.*, 2005).

Les résultats prometteurs obtenus par l'utilisation des cystéines protéinases recombinantes et de LACK, aussi bien que l'ADN codant pour ces antigènes, justifient les études de terrain pour l'évaluation de ces antigènes et leur utilisation future comme vaccins contre la leishmaniose canine.

La comparaison de l'efficacité des différentes générations de vaccins (tous modèles confondus) contre la leishmaniose est résumée dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Efficacité comparée des vaccins contre la leishmaniose**

Génération	Adjuvant	Phase	Protection moyenne	Evaluation	Modèle
1 <sup>ère</sup>	oui/non	III	54,4 %	EV	homme, chien
2 <sup>ème</sup> , PN	oui	III	82,7 %	EV	chien
2 <sup>ème</sup> , PR	oui	Ila	68,0 %	CP	souris, singe, chien
3 <sup>ème</sup>	non	Ila	59,2 %	CP	souris, chien

PN : protéine native ; PR : protéine recombinante ; EV : efficacité vaccinale ; CP : charge parasitaire

*D'après Palatnik-de-Sousa, 2008*

Alors que les vaccins de première génération, avec ou sans adjuvant, ont une efficacité vaccinale relativement basse, les vaccins de deuxième génération composés d'antigènes natifs ont une efficacité vaccinale significativement plus élevée. Les résultats des efficacités vaccinales de ces deux groupes de vaccins sont très significatifs dans la mesure où ils résultent d'études de terrain où les individus sont soumis à une exposition naturelle à la maladie. D'un autre côté, alors que la protection conférée par les vaccins de deuxième génération composés de protéines recombinantes est légèrement meilleure que celle des vaccins de première génération, ni les vaccins recombinants ni les vaccins ADN ne sont significativement différents de ceux de première génération. Il est important de noter que les résultats de ces deux derniers groupes sont calculés d'après la réduction de la charge parasitaire observée principalement dans les études de laboratoire sur les souris, et qu'il reste donc à établir leur efficacité vaccinale lors d'études de terrain sur des chiens et avec exposition naturelle à la maladie (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Le tableau 13 résume les différentes études de vaccins chez le chien.

**Tableau 13 : Résumé des études de vaccins anti-leishmaniens chez le chien**

Vaccin	Protection	Référence(s)
<u>Leishmania tuée</u> Promastigotes de <i>L. major</i> autoclavés + BCG <i>L. braziliensis</i> traitées au merthiolate <i>L. major</i> et <i>L. infantum</i> autoclavées + BCG <i>L. major</i> autoclavées + BCG + alum	Non évaluée Bonne en phases I et II Bonne en phases I et II Bonne en phase III	Lasri <i>et al.</i> , 1999 Mayrink <i>et al.</i> , 1996 Moheballi <i>et al.</i> , 1998 Moheballi <i>et al.</i> , 2004
<u>Fractions purifiées de Leishmania</u> Fraction LiF2, 67-94 kDa, de <i>L. infantum</i> Ligand fucose mannose (FML) de <i>L. donovani</i> Antigènes excrétés/sécrétés de <i>L. infantum</i> (LiESAp)	Exacerbation de la maladie Bonne en phase III et en immunothérapie Bonne en phases I, II et III	Dunan <i>et al.</i> , 1989 da Silva <i>et al.</i> , 2001 ; Borja-Cabrera <i>et al.</i> , 2002 ; Santos <i>et al.</i> , 2007 Lemesre <i>et al.</i> , 2005 et 2007
<u>Antigènes définis recombinants de Leishmania</u> Protéine de fusion multi-composants Leish-111f H1, HASPB1, H1 + HASPB1 Protéine Q chimérique multi-composants + BCG Cystéines protéinases a et b + saponine + IL-12	Pas de protection en phase III Protection partielle en phase II Bonne en phases I et II Pas de protection en phases I et II	Gradoni <i>et al.</i> , 2005 Moreno <i>et al.</i> , 2007 Molano <i>et al.</i> , 2003 Poot <i>et al.</i> , 2006
<u>ADN plasmide codant pour un antigène</u> Plasmide LACK Plasmide cystéines protéinases a et b	Bonne en phases I et II Bonnes en phases I et II	Ramiro <i>et al.</i> , 2003 Rafati <i>et al.</i> , 2005

*L.* : *Leishmania* ; BCG : Bacille de Calmette et Guérin ; LiF2 : *Leishmania* elongation initiation factor ; H1 : histone H1 ; HASPB1 : hydrophilic acylated surface protein B1 ; LACK : leishmania homolog of the receptors of activated kinase C

### **3) Vaccination avec des antigènes de salive de phlébotome**

Compte tenu du fait que la salive des phlébotomes augmente le pouvoir infectant des parasites (cf. première partie), des études ont été menées sur des vaccins contre les composants de la salive ou les antigènes des viscères de l'insecte, vaccins pouvant protéger de l'infection et diminuer la viabilité et la capacité de reproduction de l'insecte. Les vaccins à base d'antigènes de vecteur pourraient non seulement être une nouvelle approche dans le contrôle de la maladie, mais ils pourraient même être l'approche préférable. En effet, ils ne protégeraient pas uniquement des pathogènes connus comme étant transmis par le vecteur mais également contre d'autres pathogènes non encore identifiés (Titus *et al.*, 2006).

La protéine MAX (maxadilan), sans doute le plus puissant vasodilatateur connu de la salive du phlébotome, et l'antigène SP15, protéine protectrice de la glande salivaire de l'insecte, obtenus de *Phlebotomus papatasi*, induisent chez la souris la résistance à l'infection à *Leishmania major*, ce qui en fait des candidats vaccins potentiels (Titus *et al.*, 2006).

Bien que des progrès aient été effectués dans la vaccination de la leishmaniose canine lors de ces dix dernières années, l'objectif de produire des vaccins optimaux contre la maladie n'a pas encore été atteint et d'autres recherches sont nécessaires pour identifier les cibles vaccinales et les adjuvants immunostimulants et sûrs.

Dans l'attente du vaccin idéal, la prophylaxie de la leishmaniose canine peut toujours se réaliser par l'éviction des piqûres de phlébotomes.

## **B. L'éviction des piqûres de phlébotomes**

La prévention des piqûres de phlébotomes rompt le cycle de *Leishmania* et empêche la survenue de l'infection.

### **1) Prophylaxie sanitaire**

La lutte contre les phlébotomes est difficile. Il est souvent conseillé de rentrer les chiens au crépuscule, période d'activité maximale de ces insectes. Ce n'est cependant pas une méthode sûre car certains phlébotomes étant endophiles, on les retrouve donc également en intérieur. Il faut éviter de tondre les chiens car le pelage les protège partiellement des piqûres d'insectes (Bussiéras et Chermette, 1992).

De plus, l'utilisation de moustiquaires est sans effet car ces insectes sont de taille inférieure à leur maillage. En revanche, l'utilisation nocturne de ventilateurs les fait fuir.

Il faut également veiller à limiter les niches et les abris favorables aux phlébotomes (stades larvaire et adulte) autour des zones d'habitation (Bussiéras et Chermette, 1992) :

- éviter les eaux stagnantes et les zones humides dans les jardins ;
- enduire les murs, les abris du bétail avec de la chaux ;
- détruire les déchets organiques avec de la chaux.

## 2) Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale des piqûres de phlébotomes utilise des composés insecticides ou insectifuges qui détruisent ou éloignent les phlébotomes. Ces produits sont utilisés par voie externe, concentrés dans un collier mis autour du cou du chien ou contenus dans une solution à appliquer en *spot-on* ou en spray sur l'animal.

### a) Les insecticides utilisés

Plusieurs composés chimiques ont montré leur effet insecticide ou insectifuge sur les phlébotomes, avec une efficacité variable dépendant de facteurs tels que le mode d'action de l'insecticide, sa capacité à se répandre et à rester dans la peau, et la sensibilité spécifique des espèces de phlébotomes.

Les pyréthrynoïdes sont actuellement les insecticides les plus largement utilisés en raison de leur efficacité contre les phlébotomes et de leur faible toxicité sur le chien (Miró *et al.*, 2008).

La structure chimique des insecticides utilisés dans la lutte contre les phlébotomes est représentée dans l'annexe 3.

- *Les pyréthrynoïdes*

- Définition

Les pyréthrynoïdes sont des analogues de synthèse des pyréthrines, ensemble de principes actifs extraits de la poudre issue des capitules floraux d'une plante, le chrysanthème ou Pyrèthe de Dalmatie (famille des Composées). Les deux pyréthrynoïdes utilisés dans la lutte contre les phlébotomes sont la deltaméthrine et la perméthrine.

Ces substances sont caractérisées biologiquement par une activité insecticide immédiate, à faible dose et d'une toxicité beaucoup plus faible pour les homéothermes que pour la plupart des espèces animales présentes dans l'environnement (Enriquez *et al.*, 2006).

- Pharmacocinétique

Après application cutanée sur l'animal, la pénétration percutanée des pyréthrynoïdes est faible, et surtout variable en fonction du composé et de l'espèce.

En cas d'ingestion accidentelle après application, la biodisponibilité est limitée chez les animaux à sang chaud. Les pyréthrynoïdes sont massivement métabolisés (hydrolyse) par le foie et ils traversent difficilement la barrière méningée. C'est la raison pour laquelle ils sont beaucoup moins toxiques chez ces derniers que pour les insectes, bien que les mécanismes d'action sur le système nerveux soient assez voisins. Cependant le chat est une espèce très sensible pour laquelle les pyréthrynoïdes sont très toxiques, leur utilisation est donc fortement contre-indiquée dans cette espèce (Enriquez *et al.*, 2006).

- Mode d'action

Les pyréthrynoïdes agissent par contact (résorption au travers de la cuticule des insectes) ou par ingestion. Leur activité se manifeste en deux temps : un effet d'abattement

(« effet choc » ou « knock-down ») suivi d'un effet létal (« killing »). Certains pyréthrynoïdes de synthèse ont également une action répulsive : les parasites quittent les parties du corps d'un animal où la pyréthrine est le plus concentrée.

L'« effet choc » est immédiat. Les insectes tombent à terre, paralysés, après avoir présenté une courte phase intense d'excitation. Cet effet se poursuit pendant quelques minutes, après lesquelles l'insecte peut « récupérer » si l'effet létal ne se produit pas. Cet effet est prédominant avec les pyréthrines naturelles.

L'effet létal prolonge le premier et provoque la mort de l'insecte à très faibles doses pour les pyréthrynoïdes de synthèse, qui sont 1 000 à 30 000 fois plus actives que les pyréthrines naturelles.

Les cibles pharmacologiques des pyréthrynoïdes sont les canaux sodiques membranaires voltages dépendants du système nerveux. Il s'ensuit des stimulations neuromusculaires intenses et rapprochées (influx sodiques répétés et prolongés) ou une paralysie (dépoliarisation membranaire permanente) (Enriquez *et al.*, 2006).

#### ○ Toxicité

Comme il a été mentionné précédemment, les pyréthrynoïdes sont contre-indiqués chez le chat qui constitue une espèce particulièrement sensible. Cette toxicité survient suite à l'ingestion accidentelle d'insecticide (comportement de toilettage particulièrement actif dans cette espèce).

Ces composés sont réputés très peu toxiques pour le chien lorsque les modalités d'usage sont respectées. Néanmoins, ils peuvent donner lieu à des effets toxiques chez l'hôte en cas d'ingestion orale (accidentelle).

De l'hyversalivation, des vomissements, de l'ataxie, de la diarrhée, de l'hyper- ou hypothermie, des symptômes cutanés, comme de la dépilation voire de l'érythème marqué au site d'application, sont les effets indésirables les plus couramment observés en cas d'intoxication. Des réactions d'hypersensibilité ne sont pas à exclure. Des fasciculations musculaires et des convulsions peuvent apparaître. La mort survient du fait de la détresse respiratoire.

Les circonstances d'intoxication sont souvent liées à une ingestion accidentelle et à un surdosage.

En cas d'intoxication, il est utile de laver l'animal et de lui administrer des émétisants et du charbon activé en cas d'ingestion. Un traitement symptomatique doit être mis en place (Enriquez *et al.*, 2006).

#### ○ Modalités d'emploi

Les pyréthrynoïdes agissent par contact et sont donc destinées à un usage externe ou dans l'environnement.

Dans le cadre de la lutte contre les phlébotomes, la deltaméthrine est utilisée seule sous la forme d'un collier imprégné (Scalibor<sup>®</sup>) et la perméthrine est utilisée en association avec l'imidaclopride dans une solution *spot-on* (Advantix<sup>®</sup>).

- *L'imidaclopride*

- Définition

L'imidaclopride fait partie de la famille des néonicotinoïdes, composés dérivés de l'acide nicotinique. Leur affinité pour les récepteurs cholinergiques de l'insecte est élevée, induisant des troubles nerveux chez les parasites. Ils sont en revanche bien tolérés chez les mammifères dans les conditions normales d'emploi (Enriquez *et al.*, 2006).

- Mode d'action

L'imidaclopride se fixe avec une très haute affinité sur les récepteurs cholinergiques nicotiniques du cerveau des insectes. Cela conduit à une tétanisation musculaire du parasite en quelques minutes (intenses tremblements des pattes).

L'effet semble maximal au bout de 12 à 48 heures après le traitement et il persiste pendant environ un mois. Il s'agit d'un effet par contact, le composé étant appliqué par voie externe et n'étant pas résorbé après application cutanée. Il passe à travers les membranes constitutives de la cuticule des insectes (Enriquez *et al.*, 2006).

- Toxicité

La tolérance de cette molécule pour les animaux traités est très bonne, selon les données de pharmacovigilance. Le traitement des jeunes carnivores de moins de 8 semaines n'est cependant pas recommandé par le fabricant (Enriquez *et al.*, 2006).

- Modalités d'emploi

En application *spot-on*, l'action de l'imidaclopride est rapide. Dans le cadre de la lutte contre les phlébotomes, il est utilisé en association avec la perméthrine (Advantix<sup>®</sup>) (Enriquez *et al.*, 2006).

- *Le pyriproxifène*

- Définition

Le pyriproxifène fait partie du groupe des régulateurs du cycle des insectes, les « Insect Growth Regulators » (IGR), agissant spécifiquement sur le développement des insectes et qui présentent donc une grande innocuité pour les mammifères.

Le pyriproxifène est un représentant des IGR de première génération ou analogues de l'hormone juvénile, molécules agissant essentiellement au niveau de la métamorphose (déclenchée par la chute brutale du taux d'hormone juvénile) (Enriquez *et al.*, 2006).

- Mode d'action

C'est une substance destinée à être appliquée par voie externe et à agir sur le parasite par contact direct (ou par ingestion). Il est doué d'une activité larvicide, ovicide et stérilisante. Après administration cutanée, il diffuse partiellement dans la graisse et dans d'autres tissus mous (Enriquez *et al.*, 2006).

- Toxicité

Chez le chien, le pyriproxyfène est bien toléré : on ne dénombre aucune mortalité à une dose aussi forte que 5 g/kg (Enriquez *et al.*, 2006).

- Modalités d'emploi

Dans le cadre de la lutte contre les phlébotomes, le pyriproxyfène, à activité larvicide, ovicide et stérilisante, est utilisé en association avec la perméthrine, à activité adulticide (Duowin<sup>®</sup>). La durée d'action revendiquée varie de 8 semaines à 3 mois (Enriquez *et al.*, 2006).

## b) Efficacité des différentes présentations

- *Les colliers imprégnés*

Les études de laboratoire (France, Espagne, Iran, Brésil) sur l'efficacité des colliers imprégnés de deltaméthrine sur les chiens domestiques ont montré qu'ils réduisent de manière significative à la fois les piqûres et le taux de survie de phlébotomes confinés avec des chiens. Le taux de protection allait jusqu'à 90 % (Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

Compte tenu de l'effet longue durée des colliers : jusqu'à 34 semaines, il a été suggéré d'en mettre sur la plupart des chiens en zone endémique pendant la saison de transmission afin de diminuer le contact entre les vecteurs et les réservoirs suffisamment pour réduire le risque d'infection des chiens et des humains.

Maroli *et al.* (2001) menèrent une étude sur l'efficacité des colliers à la deltaméthrine (Scalibor<sup>®</sup>) dans le sud de l'Italie, où la séroprévalence de la maladie était d'environ 15 %, pendant deux saisons consécutives. Les degrés estimés de protection contre la leishmaniose canine furent remarquablement différents entre les deux années de l'étude.

Après la première année d'observation, la protection estimée contre l'infection était de 50 %, bien que la différence des taux de séroconversion entre le groupe des chiens avec collier et le groupe témoin n'était pas statistiquement significative. En revanche, à la fin de la deuxième année, la différence de taux de séroconversion entre les deux groupes était hautement significative, avec un taux de protection estimé contre la leishmaniose canine d'environ 86 % chez les chiens portant un collier.

La différence entre les résultats des deux années fut expliquée par les différences de pression d'infection pendant la période de l'étude. Pendant la première année, trop peu de chiens non protégés furent infectés pour engendrer une différence significative entre les deux groupes. Pendant la seconde année, la pression d'infection était plus importante que pendant la première et suffisamment de chiens témoins furent infectés pour faire apparaître une différence marquée entre les deux groupes.

Les auteurs conclurent que l'impact de l'utilisation massive de colliers de chien à la deltaméthrine sur l'incidence de la leishmaniose canine peut être négligeable pendant les saisons de faible transmission ou, probablement, dans une zone instable de leishmaniose canine où l'endémicité est toujours faible, mais peut être très fort quand la transmission est intense.

Le collier à la deltaméthrine, commercialisé sous le nom de Scalibor<sup>®</sup>, a donc une réelle efficacité de longue durée dans la protection des chiens contre les piqûres de phlébotomes. Il doit être placé sur le chien 10 jours avant l'exposition aux phlébotomes et sa durée d'action va jusqu'à 34 semaines. Cependant, l'application topique de formulations d'autres pyréthrynoïdes en *spot-on* ou en spray s'est également révélée efficace contre ces insectes, mais pour une période de temps plus courte.

- *Les spot-on et les sprays*

- *Spot-on* de perméthrine

Une solution topique de 65 % de perméthrine (Exspot<sup>®</sup>) a prouvé son efficacité dans la réduction du nombre de piqûres de phlébotomes chez les chiens traités, dans des études expérimentales (Molina *et al.*, 2001).

Ferroglio *et al.* (2008) ont étudié l'efficacité d'une telle solution dans la réduction de l'infection à *Leishmania infantum* dans une région endémique de leishmaniose canine en Italie. Les chiens traités reçurent la solution en *spot-on* tous les 30 jours pendant la saison de transmission, de mai à octobre. Les résultats montrèrent que le traitement avait conféré une protection de 84 % aux chiens traités, et que la différence par rapport au lot témoin était hautement significative. Cette efficacité est comparable à celle des colliers imprégnés de deltaméthrine, mais, alors que le collier doit être placé sur le chien 10 jours avant l'exposition aux phlébotomes, l'application topique de perméthrine possède un effet relativement immédiat. Cependant, le collier est efficace 34 semaines alors que l'application de la solution *spot-on* de 65 % de perméthrine nécessite d'être répétée tous les 30 jours.

Le traitement par une solution *spot-on* de 65 % de perméthrine est donc efficace dans la réduction de l'infection à *Leishmania infantum*.

- *Spot-on* de perméthrine et d'imidaclopride

Miró *et al.* (2007) ont étudié l'effet répulsif et insecticide d'une solution *spot-on* de 10 % d'imidaclopride et 50 % de perméthrine (nom déposé du produit non précisé) contre les phlébotomes. Des chiens de laboratoire furent imprégnés de la solution puis exposés pendant une heure à environ 100 femelles de phlébotomes une fois par semaine pendant 4 semaines, à partir du lendemain de l'application du produit. L'effet répulsif fut mesuré par le taux de piqûres des phlébotomes et l'effet insecticide par le taux de survie des phlébotomes. Les résultats de l'étude sont rapportés dans le tableau 14.

**Tableau 14 : Efficacités insecticide et répulsive du *spot-on* de perméthrine et d'imidaclopride pendant l'étude**

<b>Jour</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>29</b>
<b>Efficacité insecticide (%)</b>	53,2	49,4	15,1	13,2	2,9
<b>Efficacité répulsive (%)</b>	97,7	96,3	96,5	92,7	74,0

*D'après Miró et al., 2007*

L'effet insecticide était significatif pendant la première semaine après l'application ; cependant il ne dépassa pas 50 %. En revanche, le produit eut un effet répulsif de plus de 90 % pendant les 3 premières semaines de l'étude. Or, cet effet est essentiel car il empêche la piqûre et donc la transmission du parasite du vecteur à l'hôte, assurant donc un haut degré de protection contre la leishmaniose, particulièrement dans les 3 à 4 semaines suivant le traitement.

L'association de perméthrine et d'imidaclopride contenue dans le produit testé a donc montré un effet répulsif efficace contre *Phlebotomus perniciosus* chez le chien 24 heures après son application et pour une durée de 21 jours. Ce produit est commercialisé sous la forme de pipettes (Advantix®).

L'application de ce produit toutes les 3 semaines est donc un bon moyen de réduire significativement des piqûres de phlébotomes pendant la période de transmission des maladies vectorielles comme la leishmaniose.

○ Spray de perméthrine et de pyriproxifène

Molina *et al.* (2006) ont, de la même façon, étudié l'effet répulsif et insecticide d'un spray de perméthrine et de pyriproxifène (Duowin®) sur des chiens exposés de manière artificielle aux phlébotomes 7, 14, 21 et 28 jours après le traitement. Les résultats de l'étude sont rapportés dans le tableau 15.

**Tableau 15 : Efficacités insecticide et répulsive du spray de perméthrine et de pyriproxifène pendant l'étude**

<b>Jour</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
<b>Efficacité insecticide (%)</b>	29,6	32,0	7,2	0,8
<b>Efficacité répulsive (%)</b>	99,7	81,0	71,4	46,8

*D'après Molina et al., 2006*

L'effet répulsif maximal fut obtenu entre 7 et 21 jours après le traitement, quand les valeurs de l'efficacité étaient supérieures à 70 %. Les faibles valeurs d'efficacité insecticide peuvent s'expliquer par le fait que l'effet répulsif du traitement a diminué le nombre de piqûres, les phlébotomes étaient donc moins exposés aux capacités létales du produit. Mais, comme expliqué précédemment, l'effet répulsif est le plus important.

L'association de perméthrine et de pyriproxifène testée eut un effet répulsif immédiat contre *Phlebotomus perniciosus*, effet qui dura 21 jours.

Ces résultats suggèrent qu'en zone endémique, les chiens peuvent être traités par ce spray toutes les 3 semaines pour empêcher les piqûres de phlébotomes.

Par rapport aux autres présentations, le spray présente l'avantage d'être actif immédiatement après son application et d'être efficace sur les extrémités comme le museau et la bouche.

### c) Protection de l'intérieur des habitations

Traiter l'intérieur des maisons avec des insecticides tels que la deltaméthrine (le traitement de l'extérieur est illusoire), en utilisant des diffuseurs anti-moustiques, et mettre en place des rideaux imprégnés d'insecticide limitent l'infection des habitations par les phlébotomes endophiles. Les pyréthrynoïdes présentent peu de danger pour l'homme mais sont très toxiques par inhalation pour les poissons et pour le chat ; il convient donc de tenir ces espèces à l'écart lors du traitement de l'habitation.

Les insecticides actuels sont pratiques à utiliser, peu toxiques, efficaces contre de nombreux insectes, dont les phlébotomes. Toutefois, ils ne peuvent conférer une protection absolue pour tous les chiens, indépendamment de leur mode de vie, de la pression parasitaire, de bains ou de shampooings. Ils contribuent, lorsqu'ils sont utilisés massivement et durablement, à diminuer la prévalence des sources de parasites (les chiens parasités), et, par conséquent, les prévalences sérologique et clinique observées au sein de la population générale (Bourdoiseau *et al.*, 2008).

Les insecticides pourraient être intégrés avec succès dans les programmes de contrôle de la leishmaniose canine et utilisés en plus de la vaccination, lorsqu'elle sera largement disponible.

## CONCLUSION

La leishmaniose canine est une maladie grave, souvent mortelle chez le chien, et à caractère zoonotique, le chien étant le principal réservoir de la maladie chez l'homme. Le contrôle de la leishmaniose canine est donc important à la fois pour le pronostic vital du chien et pour la réduction de l'incidence de la maladie chez l'homme.

La nécessité de la lutte contre la leishmaniose canine a fortement stimulé les recherches sur les processus immunologiques mis en jeu chez les chiens infectés par les leishmanies. L'élucidation des mécanismes intervenant dans les réponses immunitaires de la leishmaniose canine est la clé de l'amélioration de la thérapie anti-leishmanienne et du développement de vaccins. Malgré les récents progrès effectués dans la recherche sur la maladie, la leishmaniose canine continue à être une zoonose redoutable qui se propage dans le monde.

Les traitements courants de la leishmaniose, le plus utilisé par les vétérinaires français étant l'association antimoniée de méglumine-allopurinol, se heurtent à des problèmes de toxicité, de rechutes et de résistances, si bien que le traitement optimal de la maladie et la stérilisation parasitaire sont encore impossibles. De plus, la leishmaniose étant commune à l'homme et au chien, le traitement chez le chien doit s'attacher à éviter l'apparition de chimiorésistances des leishmanies aux molécules utilisées chez l'homme. D'autres recherches doivent être menées afin d'élaborer un traitement sûr et efficace, propre au chien, permettant la stérilisation parasitaire et donc la disparition du principal réservoir du parasite pour la maladie humaine.

En revanche, des progrès ont été réalisés dans la prophylaxie de la leishmaniose canine, c'est-à-dire la prévention de l'infection par la réduction des piqûres de phlébotomes grâce à des insecticides topiques et par la vaccination. Aucun vaccin n'est actuellement disponible en France, contrairement au Brésil où un vaccin est commercialisé depuis 2004. Malheureusement ces techniques ne sont pas encore pratiquées à large échelle et n'ont pas été intégrées dans les programmes officiels de contrôle pour réduire la maladie canine et humaine. Des efforts futurs devront être réalisés pour améliorer ces nouvelles techniques et les appliquer.



## BIBLIOGRAPHIE

AGUILAR-BE I, DA SILVA ZARDO R, PARAGUAI DE SOUZA E, BORJA-CABRERA GP, ROSADO-VALLADO M, MUT-MARTIN M *et al.* (2005) Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. Immun.*, **73**(2), 812-819.

ALEXANDER J, BRYSON K. (2005) T helper (h)1/Th2 and *Leishmania* : paradox rather than paradigm. *Immunol.*, **99**, 17-23.

ALEXANDER J, McFARLANE E. (2008) Can type-1 responses against intracellular pathogens be T helper 2 cytokine dependent ? *Microbes Infect.*, **10**, 953-959.

ALMEIDA MAO, JESUS EEV, SOUSA-ATTA MLB, ALVES LC, BERNE MEA, ATTA AM. (2005) Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol.*, **106**, 151-158.

ALTET L, FRANCINO O, SOLANO-GALLEGO L, RENNIER C, SANCHEZ A. (2002) Mapping and sequencing of the canine *NRAMP1* gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect. Immun.*, **70**(6), 2763-2771.

ALVAR J. (1994) Leishmaniasis and AIDS co-infection : the Spanish example. *Parasitol. Today*, **10**, 160-163.

ALVAR J, MOLINA R, SAN ANDRES M, TESOURO M, NIETO J, VITUTIA M *et al.* (1994) Canine leishmaniasis : clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Trop. Med. Parasitol.*, **88**, 371-378.

ANDRADE BB, OLIVIERA CI, BRODSKYN CI, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. (2007) Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis : current insights. *Scand. J. Immunol.*, **66**, 122-127.

ARAUJO MSS, DE ANDRADE RA, ROCHA VIANNA L, MAYRINK W, BARBOSA REIS A, SATHLER-AVELAR R *et al.* (2008) Despite Leishvaccine and Leishmune<sup>®</sup> trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8<sup>+</sup> T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, **26**, 2211-2224.

BANETH G. (2004) Pathoimmunology of canine leishmaniasis. PROC 14<sup>th</sup> ECVIM-CA Congress, Barcelona 2004.

BANETH G, SHAW SE. (2002) Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **106**, 315-324.

BARBIERI CL. (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, **28**, 329-337.

- BORJA-CABRERA GP, CORREIRA PONTES NN, DA SILVA VO, PARAGUAI DE SOUZA E, SANTOS WR, GOMES EM *et al.* (2002) Long lasting protection against kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). *Vaccine*, **20**, 3277-3284.
- BOURDOISEAU G. (2000) *Parasitologie clinique du chien*. Créteil : NÉVA, 456p.
- BOURDOISEAU G, DÉNEROLLE P. (2000) Traitement de la leishmaniose canine : actualités. *Revue Méd. Vét.*, **151**, 395-400.
- BOURDOISEAU G, DÉNEROLLE P, CHABANNE L. (2008) La leishmaniose du chien en questions. *Le Point Vét.*, **39**, 51-53.
- BOURDOISEAU G, HUGNET C, BRAS GONCALVES R, VEZILIER F, PETIT-DIDIER E, PAPIEROK G *et al.* (2009) Effective humoral and cellular immunoprotective responses in LiESAp-MDP vaccinated protected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **128**, 71-78.
- BUSSIÉRAS J, CHERMETTE R. (1991) *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 4. Entomologie*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie. 163p.
- BUSSIÉRAS J, CHERMETTE R. (1992) *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie. 186p.
- CABRERA-SERRA MG, VALLADARES B, PIÑERO JE. (2008) *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.*, **108**, 20-25.
- CARDOSO L, NETO F, SOUSA JC, RODRIGUES M, CABRAL M. (1998) Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.*, **79**(3), 213-220.
- CARDOSO L, SCHALLIG HDFH, CORDEIRO DA SILVA A, CABRAL M, ALUNDA JM, RODRIGUES M. (2007) Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **117**, 35-41.
- CARRILLO E, MORENO J. (2009) Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **128**, 67-70.
- CAVALIERO T, ARNOLD P, MATHIS A, GLAUS T, HOFMANN-LEHMANN R, DEPLAZES P. (1999) Clinical, serologic and parasitologic follow-up after long term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.*, **13**, 330-334.
- CORTESE L, PELAGALLI A, PIANTEDOSI D, MASTELLONE V, DI LORIA A, LOMBARDI P *et al.* (2008) The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.*, **177**, 405-410.

- COULIBALI E, HEINIS V, CAMPOS C, BOURDOISEAU G, HAAS P, MARTY P. (2004) Enquête sur les pratiques diagnostiques et thérapeutiques de la leishmaniose chez les vétérinaires praticiens en 2000. *Epidémiol. et santé anim.*, **45**, 33-44.
- CROFT SL, COOMBS GH. (2003) Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.*, **19**, 502-508.
- CROFT SL, ENGEL J. (2006) Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100S**, S4-S8.
- CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 111-126.
- CRUZ A, COBURN CM, BERVERLEY SM. (1991) Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7170-7174.
- DANTAS-TORRES F. (2006) Leishmune<sup>®</sup> vaccine : the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.*, **141**, 1-8.
- DA SILVA VO, BORJA-CABRERA GP, CORREIRA PONTES NN, PARAGUAI DE SOUZA E, LUZ KG, PALATNIK M *et al.* (2001) A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine formulation against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, **19**, 1082-1092.
- DAVIDSON RN, DEN BOER M, RITMEIJER K. (2008) Paromomycin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi:10.1016/j.trstmh.2008.09.008
- DAVOUDI N, TATE CA, WARBURTON C, MURRAY A, MAHBOUDI F, McMASTER WR. (2005) Development of a recombinant *Leishmania major* strain sensitive to glanciclovir and 5-fluorocytosine for use as a live vaccine challenge in clinical trials. *Vaccine*, **23**, 1170-1177.
- DAY MJ. (2007) Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis : a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet. Parasitol.*, **147**, 2-8.
- DÉNEROLLE P, BOURDOISEAU G. (1999) Combination allopurinol and antimony treatment *versus* antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J. Vet. Int. Med.*, **13**, 413-415.
- DUNAN S, FROMMEL D, MONJOUR L, OGUNKOLADE BW, CRUZ A, QUILICI M. (1989) Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, **11**, 397-402.
- ENRIQUEZ B, TISSIER R, PERROT S. (2006) *Pharmacologie et toxicologie des médicaments anti-parasitaires externes en médecine vétérinaire*. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Pharmacie et Toxicologie. 43p.
- EUZEBY J. (2008) *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*. Paris : Lavoisier, 818p.

FERRER LM (1999) Clinical aspects of canine leishmaniasis. *In : Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 6-9.

FERROGLIO E, POGGI M, TRISCIUOGLIO A. (2008) Evaluation of 65 % permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses and Public Health*, **55**, 145-148.

FOURNET A. (2008) Alerte à la leishmaniose. *Le Nouvel Observateur*, n°2260, 88-89.

FRAME MJ, MOTTRAM JC, COOMBS GH. (2000) Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite infection. *Parasitol.*, **121**, 367-377.

FRÖHLICH A, MARSLAND BJ, SONDEREGGER I, KURRER M, HODJE MR, HARRIS NL *et al.* (2007) IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo. *Blood*, **109**(5), 2023-2031.

FUJIWARA RT, VALE AM, FRANCA DA SILVA JC, DA COSTA RT, QUETZ JDA S, MARTINS FILHO OA *et al.* (2005) Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, **36**, 827-838.

GINEL PJ, LUCENA R, LOPEZ R, MOLLEDA JM. (1998) Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, **39**, 271-274.

GIUNCHETTI RC, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA-CARVALHO A, ROATT BM, AGUIAR-SOARES RDO. (2007) Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponine adjuvant in dogs. *Vaccine*, **25**, 7674-7686.

GIUNCHETTI RC, BARBOSA REIS A, DA SILVEIRA-LEMOS D, MARTINS-FILHO OA, CORREA-OLIVEIRA R, BETHONY J. (2008) Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, **81**(1), 106-112.

GRADONI L, FOGLIA MANZILLO V, PAGANO A, PIANTEDOSI D, DE LUNA R, GRAMICCIA M *et al.* (2005) Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected. *Vaccine*, **23**, 5245-5251.

HOLZMULLER P, CAVALEYRA M, MOREAUX J, KOVACIC R, VINCENDEAU P, PAPIEROK G *et al.* (2005) Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigotes apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106**, 247-257.

HUBERT B. (2006) Comment diagnostiquer la leishmaniose canine. *Le Point Vét.*, **270**, 54-59.

IKEDA-GARCIA FA, SOUZA LOPES R, MARQUES FJ, FELIX DE LIMA VM, KAZUE MORINISHI C, BONELLO FL. (2007) Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, **143**, 254-259.

- INIESTA L, GALLEGO M, PORTUS M. (2007) Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **119**, 189-197.
- JAFFE CL. (1999) Perspectives for a vaccine against canine leishmaniasis. *In : Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 66-71.
- JHINGRAN A, CHAWLA B, SAXENA S, BARRETT MP, MADHUBALA R. (2009) Paromomycin : uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **164**, 111-117.
- JI J, MASTERSON J, SUN J, SOONG L. (2005) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.*, **174**, 7147-7153.
- KECK N. (2004) Diagnostic de laboratoire de la leishmaniose canine. *Leishmaniose canine : Surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie. Résumés*. Lyon : Société Française de Parasitologie, 2004.
- KHAMESIPOUR A, RAFATI S, DAVOUDI N, MABOUDI F, MODABBER F. (2006) Leishmaniasis vaccine candidates for development : a global overview. *Indian J. Med. Res.*, **123**, 423-438.
- KILLICK-KENDRICK R et M. (1999) Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *In : Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 26-31.
- KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, FOCHEUX C, DEREURE J, PUECH MP, CADIERGUES MC. (1997) Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, **11**, 105-111.
- KOUTINAS AF, SARIDOMICHELAKIS MN, MYLONAKIS ME, LEONTIDES L, POLIZOPOULOU Z, BILLINIS C *et al.* (2001) A randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **98**, 247-261.
- KUKANICH B. (2008) A review of selected systemic antifungal drugs for use in dogs and cats. *Vet. Med.*, <http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/ArticleStandard/Article/detail/483478>
- LAMOTHE J. (1997) Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotéricine B : 39 cas. *Prat. Méd. Chir. Anim. Cie*, **32**, 133-141.
- LAMOTHE J. (1999) Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). *In : Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 12-17.
- LAMOTHE J. (2001) Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, **42**, 170-175.

- LAMOTHE J, GAUDRAY C, ZARKA P. (2004) Diagnostic de la leishmaniose canine. *Prat. Méd. Chir. Anim. Cie*, **39**, 41-46.
- LASRI S, SAHIBI H, SADAK A, JAFFE CL, RHALEM A. (1999) Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet. Res.*, **30**, 441-449.
- LEMAHIEU JC. (2004) Le système immunitaire : organes, cellules et molécules. In : *Cours d'immunologie PCEM 2* [en-ligne], mise à jour le 13 janvier 2004 [<http://anne.decoستر.free.fr/immuno/orgcelri/orgcelmo.htm>] (consultée le 5 mars 2009).
- LEMESRE JL (2008) Leishmaniose : vaccin en développement. *Sci. Sud*, **43**, 11.
- LEMESRE JL, HOLZMULLER P, CAVALEYRA M, BRAS GONCALVES R, HOTTIN G, PAPIEROK G. (2005) Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, **23**, 2825-2840.
- LEMESRE JL, HOLZMULLER P, BRAS GONCALVES R, BOURDOISEAU G, HUGNET C, CAVALEYRA M *et al.* (2007) Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France : double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, **25**, 4223-4234.
- MANNA L, REALE S, VITALE F, PICILLO E, PAVONE LM, GRAVINO AE. (2008) Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.*, **177**, 279-282.
- MAROLI M, MIZZONI V, SIRAGUSA C, D'ORAZI A, GRADONI L. (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.*, **15**, 358-363.
- MARTY P, OZON C, RAHAL A, GARI-TOUSSANT M, LELIEVRE A, IZRI MA *et al.* (1994) Leishmaniose dans les Alpes-Maritimes. Caractéristiques épidémiologiques actuelles. *Méd. Armées*, **22**, 29-31.
- MAYRINK W, GENARO O, FRANCA-SILVA JC, DA COSTA RT, TAFURI WF, TOLEDO VP. (1996) Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **91**, 695-697.
- MENDEZ S, RECKLING SK, PICCIRILLO CA, SACKS D, BELKAID Y. (2004) Role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J. Exp. Med.*, **200**(2), 201-210.
- MEUNIER A. (2007) *Etude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l'influence des facteurs environnementaux (en France depuis 1965, dans le sud-ouest en 2006)*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 106p.
- MIRO G, GALVES R, MATEO M, MONTOYA A, DESCALZO MA, MOLINA R. (2007) Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.*, **143**, 375-379.

- MIRO G, CARDOSO L, PENNISI MG, OLIVA G, BANETH G. (2008) Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part two. *Trends Parasitol.*, **24**, 371-377.
- MOHEBALI M, FALLAH E, JAMSHIDI S, HAJJARAN H. (1998) Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East Med. Health J.*, **4**, 234-238.
- MOHEBALI M, KHAMESIPOUR A, MOBEDI I, ZAREI Z, HASHEMI-FESHARKI R. (2004) Double-blind randomized efficacy trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I. R., Iran. *Vaccine*, **22**, 4097-4100.
- MOLANO I, ALONSO MG, MIRON C, REDONDO E, REQUENA JM, SOTO M *et al.* (2003) A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **92**, 1-13.
- MOLINA R, LOHSE JM, NIETO J. (2001) Evaluation of a topical solution containing 65 % permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet. Ther.*, **2**, 261-267.
- MOLINA R, MIRO G, GALVEZ R, NIETO J, DESCALZO MA. (2006) Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet. Rec.*, **159**, 206-209.
- MORENO J. (2007) Changing views on Langerhans cell functions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, **23**, 86-88.
- MORENO J, NIETO J, CHAMIZO C, GONZAÁLEZ F, BLANCO F, BARKER DC *et al.* (1999) The immune response and PBMC subsets in canine leishmaniosis before, and after chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **71**, 181-195.
- MORENO J, NIETO J, MASINA S, CANAVATE C, CRUZ I, CHICHARRO C *et al.* (2007) Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, **25**, 5290-5300.
- MOSSOLAYI MD, APPRIOU M. (1999) Intérêt du monoxyde d'azote dans la défense anti-parasitaire des macrophages humains. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **138**, 7-17.
- MUNIZ-JUNQUEIRA MI, de PAULA-COELHO VN. (2008) Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- $\alpha$  production, but only via TNF- $\alpha$  it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int. Immunopharmacol.*, **8**, 1633-1638.
- NIETO CG, GARCIA-ALONSO M, REQUENA JM, MIRON C, SOTO M, ALONSO C *et al.* (1999) Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum* : correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **67**, 117-130.
- NOBEN-TRAUTH N. (2000) Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunol. Lett.*, **75**, 41-44.

- NOGUEIRA FS, MOREIRA MAB, BORJA-CABRERA GP, SANTOS FN, MENZ I, PARRA LE *et al.* (2005) Leishmune<sup>®</sup> vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, **23**, 4805-4810.
- OLIVA G, GRADONI L, CIARAMELLA P, DE LUNA R, CORTESE L, ORSINI S *et al.* (1995) Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **36**, 1013-1019.
- ORDOÑEZ-GUTIERREZ L, ESPADA-FERNANDEZ R, DEA-AYUELA MA, TORRADO JJ, BOLAS-FERNANDEZ F, ALUNDA JM. (2007) In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 325-329.
- PALATNIK-DE-SOUSA CB. (2008) Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, **26**, 1709-1724.
- PAPIEROK GM. (2002) Diagnostic biologique de la leishmaniose canine et perspectives. *Nouv. Prat. Vét.*, **159**, 65-68.
- PARRA LE, BORJA-CABRERA GP, SANTOS FN, SOUZA LOP, PALATNIK-DE-SOUSA CB, MENZ I. (2007) Safety trial using the Leishmune<sup>®</sup> vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, **25**, 2180-2186.
- PERNOT M. (2005) *Les anticorps anti-β2 GPI au cours de la leishmaniose*. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°17, 109p.
- PINELLI E, KILICK-KENDRICK R, WAGENAAR J, BERNADINA W, del REAL G, RUITENBERG J. (1994) Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, **62**, 229-235.
- PINELLI E, RUTTEN VPMG, RUITENBERG EJ. (1999) Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In : *Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 60-64.
- POLI A, SOZZI S, GUIDI G, BANDINELLI P, MANCIANTI F. (1997) Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **71**, 263-271.
- POOT T, SPREEUWENBERG K, SANDERSON SJ, SCHIJNS VECJ, MOTRAM JC, COOMBS GH *et al.* (2006) Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine*, **24**, 2460-2468.
- QUINNELL RJ, KENNEDY LJ, BARNES A, COURTENAY O, DYE C, GARCEZ LM *et al.* (2003) Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, **55**, 23-28.

- RAFATI S, NAKHAE A, TAHERI T, TASLIMI Y, DARABI H, ERAVANI D *et al.* (2005) Protective vaccination against canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and type II of *Leishmania infantum*. *Vaccine*, **23**, 3716-3725.
- RAMIRO MJ, ZARATE JJ, HANKE T, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, ESTEBAN M *et al.* (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, **21**, 2474-2484.
- RHALEM A, SAHIBI H, LASRI S, JAFFE CL. (1999) Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **71**, 263-271.
- RIBEIRO RR, MOURA EP, PIMENTEL VM, SAMPAIO WM, SILVA SM, SCHETTINI DA *et al.* (2008) Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**(7), 2564-2572.
- RITMEIJER K, DEJENIE A, ASSEFA Y, BEYENE HUNDIE T, MESURE J, BOOTS G *et al.* (2006) A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin. Infect. Dis.*, **43**, 357-364.
- RODRIGUES OR, MARQUES C, SOARES-CLEMENTE M, FERRONHA MH, SANTOS-GOMES GM. (2009) Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology*, **214**, 101-111.
- ROHOUSOVA I, VOLF P. (2006) Sand fly saliva : effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasit.*, **53**(3), 161-171.
- ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK. (1993) Immunité vis-à-vis des protozoaires et des helminthes. In : *Immunologie*. 3<sup>rd</sup> ed. Bruxelles : De Boeck-Wesmael, 16.1-16.22.
- ROUGIER S, VOULDOUKIS I, FOURNEL S, PERES S, WOHRLE F. (2008) Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis : a pilot study. *Vet. Parasitol.*, **153**, 244-254.
- SANTOS FN, BORJA-CABRERA GP, MIYASHIRO LM, GRECHI J, REIS AB, MOREIRA MAB *et al.* (2007) Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune<sup>®</sup> vaccine. *Vaccine*, **25**, 6176-6190.
- SARAIVA EM, BARBOSA AF, SANTOS FN, BORJA-CABRERA GP, NICO D, SOUZA LOP *et al.* (2006) The FML-vaccine (Leishmune<sup>®</sup>) against canine visceral leishmaniasis : transmission blocking vaccine. *Vaccine*, **24**, 2423-2431.
- SASANELLI M, PARADIES P, de CAPRARIIS D, GRECO B, de PALO P, PALMISANO D *et al.* (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.

SILVA FL, OLIVEIRA RG, SILVA TM, XAVIER MN, NASCIMENTO EF, SANTOS RL. (2009) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **160**, 55-59.

SINDERMANN H, ENGEL J. (2006) Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100S**, S17-S20.

SLAPPENDEL RJ, TESKE E. (1997) The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet. Q.*, **19**, 10-13.

SLAPPENDEL RJ, FERRER L. (1998) Leishmaniasis. In : GREENE CE, editor. *Infectious diseases of the dog and the cat*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, 450-456.

SLAPPENDEL RJ, TESKE E. (1999) A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. In : *Canine leishmaniasis : an update*. Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 54-59.

SOLANO-GALLEGO L, LLULL J, RAMOS G, RIERA C, ARBOIX M, ALBEROLA J *et al.* (2000) The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* **90**, 37-45.

TITUS RG, BISHOP JV, MEJIA JS. (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.*, **28**, 131-141.

VALLADARES JE, ALBEROLA J, ESTEBAN M, ARBOIX M. (1996) Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet. Rec.*, **137**, 181-183.

VALLADARES JE, RIERA C, ALBEROLA J, GALLEGU M, PORTUS M, CRISTOFOL C *et al.* (1998) Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, **75**, 33-40.

VERAS P, BRODSKYN C, BALESTIERI F, FREITAS L, BERVERLEY SM. (1999) A dhfr-ts-*Leishmania major* knock-out mutant cross-protects against *Leishmania amazonensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**, 491-496.

VERCAMMEN F, FERNANDEZ-PEREZ FJ, DEL AMO C, ALUNDA JM. (2002) Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol : immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop.*, **84**, 175-181.

VERMOUT S, DENIS M, LOSSON B, MIGNON B. (2003) Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Méd. Vét.*, **147**, 393-401.

VEXENAT JA, OLLIARO PL, FONESCA DE CASTRO JA, CAVALCANTE R, FURTADO CAMPOS JH, TAVARES JP *et al.* (1998) Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**, 448-453.

VOULDOUKIS I, ROUGIER S, DUGAS B, PINO P, MAZIER D, WOEHRLE F. (2006) Canine visceral leishmaniasis : comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.*, **135**, 137-146.



## **ANNEXES**



**Annexe 1 : Principales espèces de leishmanies pathogènes pour les animaux domestiques et les humains**

<b>Espèces</b>	<b>Synonymes</b>	<b>Répartition géographique</b>	<b>Maladies</b>	<b>Mammifères affectés</b>	<b>Principaux vecteurs</b>
<i>L. donovani</i>		Inde - Asie du sud-est	kala azar	homme	<i>P. argentipes</i>
<i>L. archibaldi</i>		Afrique centre-est	kala-azar + forme cutanée post kala-azar	homme, rongeurs, carnivores sauvages	<i>P. martini</i>
<i>L. infantum</i>	<i>L. chinensis</i> <i>L. chagasi</i>	Bassin méditerranéen Moyen Orient, Asie centrale  Chine du Nord  Amérique tropicale	forme générale, formes cutanées et muqueuses	chien, canidés sauvages, rongeurs, homme	<i>P. ariasi,</i> <i>P. perniciosus,</i> <i>P. major,</i> <i>P. perfiliewi</i>  <i>P. chinensis</i>  <i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica minor</i>	Europe Sud, Afrique du Nord, Proche et Moyen Orient, Inde (zones urbaines)	bouton d'Orient sec (bouton d'Alep)	homme, chien	<i>P. sergenti</i>
<i>L. major</i>	<i>L. tropica major</i>	Afrique, Asie, Moyen Orient, Russie (zones rurales)	bouton d'Orient humide (clou de Biskra)	rongeurs, homme	<i>P. papatasi,</i> <i>P. duboscqui</i>
<i>L. aethiopica</i>		Afrique Est	bouton d'Orient + forme cutanée diffuse	damans, homme	<i>P. longipes,</i> <i>P. podifer</i>
<i>L. mexicana</i>		Amérique centrale, Amazonie	ulcère des chicleros, forme cutanée diffuse	rongeurs sauvages, marsupiaux, homme	<i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. braziliensis</i>		Amérique centrale, Amérique du Sud	espundia, pian bois, forme cutanéomuqueuse	rongeurs, homme	<i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. peruviana</i>		Andes	uta	chien, homme	<i>Lutzomyia spp.</i>

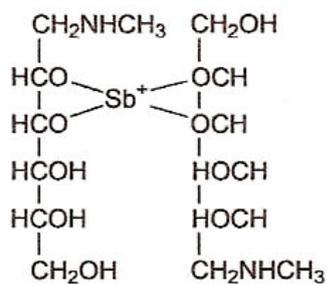
*L.* : *Leishmania* ; *P.* : *Phlebotomus*

*D'après Bussiéras et Chermette, 1992*

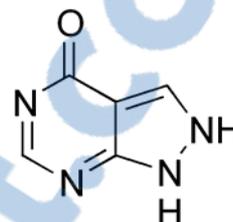


## Annexe 2 : Structure chimique des principales molécules antileishmaniennes

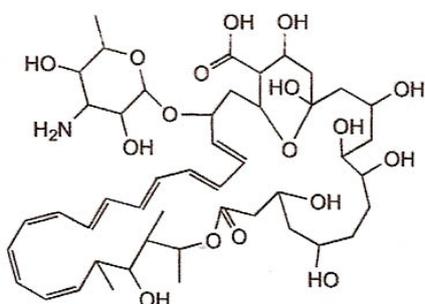
Antimoniote de méglumine



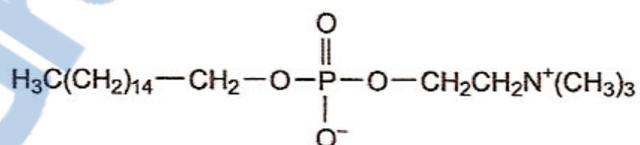
Allopurinol



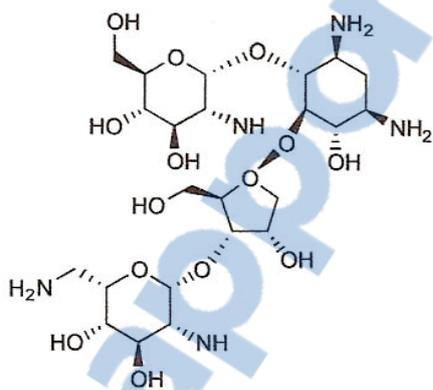
Amphotéricine B



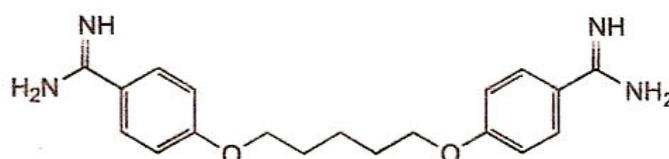
Miltéfosine



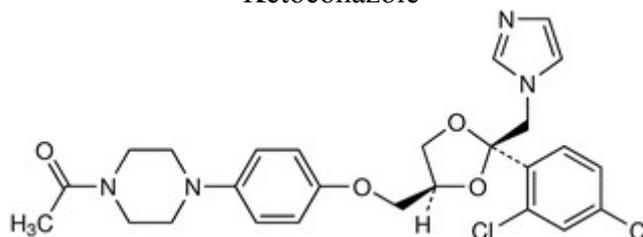
Paromomycine



Pentamidine



Kétoconazole

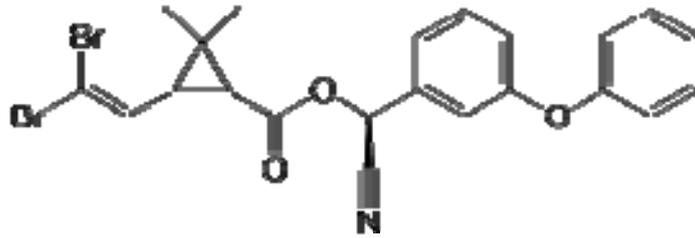


*D'après Croft et Coombs, 2003*

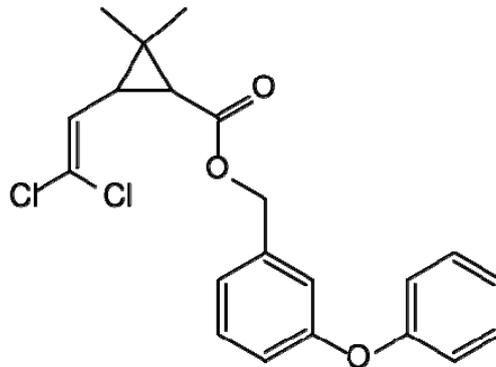


Annexe 3 : Structure chimique des composés utilisés dans la lutte contre les phlébotomes

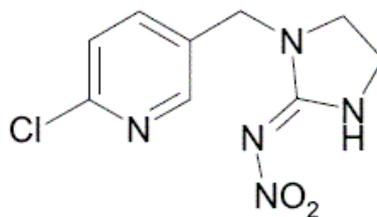
Deltaméthrine



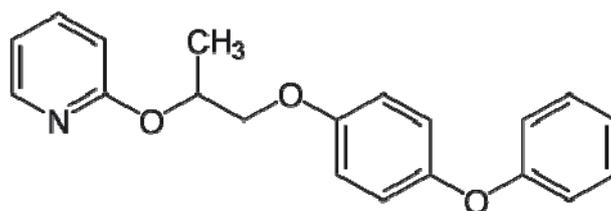
Perméthrine



Imidaclopride



Pyriproxyfène





# ACTUALITÉS DANS LA LUTTE CONTRE LA LEISHMANIOSE CANINE

**NOM et Prénom :** TULASNE Louise

## **Résumé :**

La leishmaniose générale canine est une maladie infectieuse liée à la transmission, par piqûre de phlébotome, d'un protozoaire flagellé : *Leishmania infantum*. C'est une maladie grave et zoonotique pour laquelle le chien est le principal réservoir de la maladie chez l'homme, et par conséquent la lutte contre la leishmaniose canine est d'une importance majeure. Néanmoins, les méthodes de lutte sont encore limitées.

Le traitement est long, lourd et coûteux, et ne confère pas de stérilisation parasitaire, ce qui entraîne la survenue de rechutes et la persistance du parasite, faisant du chien une source d'infection pour les phlébotomes.

La prophylaxie de la leishmaniose canine peut se faire à deux niveaux. L'éviction des piqûres de phlébotomes par l'utilisation d'insecticides s'est révélée efficace. Les travaux d'élaboration d'un vaccin sont en cours mais actuellement aucun vaccin n'est disponible en France. D'autres études sont nécessaires pour la mise en place de méthodes de lutte efficaces contre la leishmaniose canine.

## **Mots clés :**

MALADIE INFECTIEUSE, LEISHMANIOSE, *LEISHMANIA INFANTUM*, TRAITEMENT, VACCINATION, LUTTE, PROPHYLAXIE, ZOONOSE, CARNIVORE, CHIEN

## **Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Pr. René CHERMETTE

Assesseur : Dr. Ludovic FREYBURGER

## **Adresse de l'auteur :**

TULASNE Louise  
8 rue d'Estienne d'Orves  
94700 MAISONS-ALFORT  
FRANCE

# RECENT ADVANCES IN CONTROL OF CANINE LEISHMANIASIS

**SURNAME** : TULASNE

**Given name** : Louise

## **Summary :**

Canine leishmaniasis is an infectious disease due to the transmission, through the bite of a phlebotomine sand-fly, of a flagellate protozoan : *Leishmania infantum*. It is a serious and zoonotic disease and the dog is the main reservoir of human infection, therefore the control of canine leishmaniasis is very important. Nevertheless, strategies for control are still limited.

Therapy of canine leishmaniasis is long, difficult and expensive and does not confer parasitological cure, which allows the occurrence of relapses and parasite persistence, so the dog is still a source of infection for sandflies.

The prevention of canine leishmaniasis has two aspects. The eviction of sandflies bites by insecticides has been shown to be effective. Studies about the development of a vaccine are in progress but there is no vaccine currently available in France. Further studies are needed to develop effective control measures against canine leishmaniasis.

## **Keywords :**

INFECTIOUS DISEASE, LEISHMANIASIS, *LEISHMANIA INFANTUM*, TREATMENT, VACCINATION, CONTROL, PROPHYLAXIS, ZOONOSIS, CARNIVORE, DOG

## **Jury :**

President : Pr.

Director : Pr. René CHERMETTE

Assessor : Dr. Ludovic FREYBURGER

## **Author's address :**

TULASNE Louise  
8 rue d'Estienne d'Orves  
94700 MAISONS-ALFORT  
FRANCE