

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة ابن خلدون تيارت  
UNIVERSITE IBN KHALDOUN – TIARET  
معهد علوم البيطرة  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
قسم الصحة الحيوانية  
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire.

Présenté par : Hadj Ali Mohamed El Amine.

Hadji Abderraouf.

*Thème*

**Diagnostic cytologique de la leishmaniose du chat**

Soutenu le 02 / 07 / 2024

Jury :		Grade
Président	Dr. BOUMEZRAG Assia	MCA
Encadrant	Dr. SLIMANI Khaled Mabrouk	MCB
Examineur	Dr. Smail Fadhila	MCA

Année universitaire 2023-2024

## ***Remerciements***

Nous remercions tout d'abord Dieu le Tout-Puissant de nous avoir donné la santé, la patience et la volonté nécessaires pour entamer et mener à bien ce mémoire. Sans Sa grâce et Sa bénédiction, ce travail n'aurait pas été possible.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre cher professeur et encadrant, M. Slimani Khaled. Son expertise, sa patience et ses précieux conseils ont été d'une aide inestimable tout au long de notre recherche. Son engagement et son soutien constant nous ont permis de surmonter les nombreux défis que nous avons rencontrés.

Nous souhaitons également remercier chaleureusement notre estimé Dr. Bessghieur. Sa générosité dans le partage de ses riches connaissances.

Nos sincères remerciements vont également à tous les enseignants et enseignantes de l'Institut des Sciences Vétérinaires. Leur soutien indéfectible, leur dévouement exemplaire et leur passion pour l'enseignement ont grandement contribué à notre formation. Nous sommes profondément reconnaissants pour leur disponibilité, leur bienveillance et leurs précieux enseignements.

Enfin, nous tenons à exprimer notre gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Vos encouragements, votre aide et votre soutien moral ont été essentiels à l'accomplissement de ce travail. Que ce mémoire soit le reflet de notre reconnaissance et de notre admiration pour chacun d'entre vous.

## *Dédicace*

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Vous êtes ma source d'inspiration et ma force.

À mes chères sœurs, pour leurs encouragements constants, leur soutien moral, et leur affection. Votre présence m'a toujours réconforté.

À mes chers frères, pour leur appui, leur encouragement, et leur complicité fraternelle. Votre soutien m'a donné la confiance nécessaire pour avancer.

À toute ma famille, pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire. Votre amour et votre présence ont été essentiels à ma réussite.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux les plus chers et le fruit de votre soutien infailible.

Merci d'être toujours présents pour moi. Votre amour et vos encouragements ont été mon pilier.

*Hadj Ali Mohamed El Amine*

## *Dédicace*

À mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs sacrifices incommensurables qui ont rendu possible chaque étape de ce voyage.

À mes frères (zakaria, maroin, abdechakour, ilyes) et sœurs, pour leur soutien constant, leurs encouragements et leur affection qui ont été une source de force et de motivation tout au long de cette aventure.

À mes professeurs et mentors, pour leur enseignement passionné, leurs conseils éclairés et leur encouragement constant qui ont façonné ma compréhension et ma passion pour la médecine vétérinaire.

À mes amis (hakou, amr, abdessatar, ahmed mouzgharit, nassim, mohamed mon binôme, baker, obaida, bilel, krimou, yasser, haythem) et camarades de classe, pour les moments de collaboration, de partage de connaissances et de soutien mutuel qui ont enrichi cette expérience d'apprentissage.

À Docteur Boukhelfa, Docteur Gaouda et à toute l'équipe du cabinet vétérinaire El Hikma, Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre précieuse aide et votre soutien lors de mon stage pratique. Votre expertise, vos conseils éclairés et votre patience m'ont permis d'acquérir des compétences essentielles dans le domaine de la médecine vétérinaire.

À ma chatte Souzi, fidèle compagne de toutes mes révisions et compagnon de chaque moment d'étude, merci pour ta présence apaisante et ton soutien silencieux.

À tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à ma formation et à la réalisation de ce projet, je vous adresse ma profonde gratitude. Votre confiance en moi m'a motivé à viser l'excellence et à continuer à apprendre chaque jour.

*Hadji Abderraouf*

## Table des matières

Introduction .....	1
CHAPITRE 1 : Étude du parasite et classification, cycle, vecteur.....	4
1. Description de Leishmania spp. ....	5
1.1. Classification du parasite : .....	7
1.2. Les différentes espèces de Leishmania : .....	7
2. Cycle de vie de Leishmania : .....	6
2.1. Vecteur : .....	8
2.2. Stade extracellulaire (développement au sein du vecteur) .....	9
2.2.1. Repas sanguin du phlébotome non-infecté   « Aspiration ! » .....	9
2.2.2. Promastigotes procycliques   « Déploiement » .....	9
2.2.3. Promastigotes nectomonades   « L'adhérence ou la mort » .....	10
2.2.4. Promastigotes leptomonades   « Renflouer les troupes » .....	10
2.2.5. Promastigotes métacycliques infectieux   « Dans la cour des grands » : .....	12
2.2.6. Promastigotes retroleptomonades   « Machine arrière » : .....	12
2.2.7. Promastigotes haptomonades   « Les oubliés » : .....	13
2.2.8. Métabolisme énergétique des promastigotes   « La bonne " bouffe " : .....	11
2.3. Stade intracellulaire (développement au sein de l'hôte) : .....	13
2.3.1. Repas sanguin du phlébotome infecté   « En avant toute ! » : .....	13
2.3.2. Le système du complément   « Premier obstacle » : .....	14
2.3.3. Les neutrophiles   « Camouflage temporaire » : .....	14
2.3.4. La vacuole parasitophore   « L'habitat » : .....	15
2.3.5. Détournement des fonctions des macrophages   « Place à la stratégie ! » : .....	17
2.3.6. Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA)   « La passerelle entre l'inné et l'adaptatif » : .....	17
2.3.7. Les lymphocytes T (LT)   « Les sentinelles » : .....	18
CHAPITRE 2 : Présentation de la leishmaniose chez les carnivores domestique (étiologie et présentation clinique) .....	19
1. Les aspects mondiaux de la leishmaniose : .....	20
1.1. Étiologie : .....	20
2. la leishmaniose féline : .....	21
2.1. Épidémiologie : .....	21
2.2. Manifestation clinique : .....	21
CHAPITRE 3 : Méthode de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques. .....	23

1. Morphologie :.....	24
2. Les différentes techniques de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques : approches et méthodes actuelles :.....	24
2.1. Diagnostic indirect de présomption :.....	25
2.2. Diagnostic seroimmunologique : .....	25
2.3. PCR (Polymérase Chain Réaction) :.....	26
2.4. Culture parasitaire :.....	26
2.5. Frottis et examen microscopique :.....	27
2.5.1. Les frottis de lymph (cytoponction) : .....	27
2.5.2 Cytoponction des masses : .....	27
2.5.3. Choix de la seringue et de l'aiguille : .....	27
2.5.4. Préparation du site : .....	28
2.5.5. Techniques d'aspiration :.....	28
2.5.6. Techniques de ponction sans aspiration : .....	29
2.5.7. La ponction de la moelle osseuse : .....	30
2.5.8. Préparation des lames : .....	31
2.5.8.1. Etalement : .....	31
2.5.8.2 Fixation :.....	32
2.5.8.3. Coloration :.....	35
2.5.8.3.1. Coloration de Romanowsky :.....	35
2.5.8.3.2 BIO-DIFF Kit Coloration rapide MGG pour Hématologie :.....	36
2.5.8.3.3. Kit RAL 555 ( kit de coloration rapide) :.....	39
2.5.8.3.4. Colorations bichromes et trichromes :.....	41
2.5.8.3.5. Colorations spéciales : .....	41
2.5.9. Examen des lames : .....	42
2.6. Tests de dépistage rapide (RDT) : (speed leish k) .....	42
2.7. Biopsie de la peau : .....	43
2.8. Calque cutanée :.....	43
2.8.1. Calque cutanée par un ruban adhésif : .....	44
2.8.1.1. Matériel nécessaire : .....	44
2.8.1.2. Technique :.....	45
2.8.2. Le calque par apposition :.....	45
2.8.2.1. Technique :.....	45
2.9. Intradermoréaction avec leishmanie (IDR) :.....	45
2.9.1. Principe : .....	46
2.10. Échographie :.....	46

CHAPITRE 4 : Étude Clinique de la leishmaniose .....	47
1. Une infection très souvent asymptomatique :.....	48
2. Une expression clinique polymorphe :.....	48
2.1. Atteinte cutanée et cutanéomuqueuse :.....	50
2.2. Atteinte oculaire :.....	53
2.3. Atteinte systémique et viscérale :.....	54
3. Diagnostic de la leishmaniose :.....	55
3.1. Démarche diagnostique clinique :.....	55
3.2. Anomalies lors d'examens complémentaires :.....	55
3.3. Méthodes de diagnostic étiologique :.....	57
3.3.1. Méthodes de diagnostic direct : .....	57
3.3.2. Méthodes de diagnostic indirect :.....	62
3.4. Proposition d'approche diagnostique :.....	66
4. Traitement de la leishmaniose, suivi et pronostic :.....	67
4.1 Prise en charge thérapeutique :.....	67
4.2 Suivi thérapeutique :.....	69
4.3. Pronostic : .....	69
4.4. Prophylaxie :.....	70
Partie expérimentale.....	72
CHAPITRE I : Matériel et méthodes .....	73
1. Lieu et durée d'étude : .....	74
2. Démarches cliniques :.....	74
3. Matériel : .....	77
3.1. Matériel utilisé pour cytologie ganglionnaire :.....	77
3.2. Colorants :.....	78
3.3. Pour la lecture des frottis : .....	79
4. Organigramme de démarche clinique :.....	80
5. Ponction ganglionnaire :.....	81
6. Étalement :.....	81
7. Calque : .....	81
8. Réalisation d'un frotti sanguin :.....	83
9. Prélèvement de moelle osseuse : .....	84
10. Ponction de masse : .....	85
11. Technique de coloration :.....	86
CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	87
1. Présentation des cas :.....	92

Conclusion.....	106
-----------------	-----

## *Liste des tableaux :*

### **Abréviations :**

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial

ARNs : acide ribonucléique satellite

ATF : Activating transcription factor

AVP : Accident sur la voie publique

CC : calque cutanée

CD : cellule dendritique

CLQ : calque

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

DAPP : Dermatite par Allergie aux Piqûres de puces

DAT : Direct Agglutination Test

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EPI : Équipement de protection individuelle

FAZ : Flagellum Attachment Zone

Fc : Fragment cristallisable

FeLV : virus de la leucémie féline

FIV : immunodéficience féline

FNS : la formule numération sanguine

Fs : frottis sanguin

GP : glycoprotéine

HAP : hemagglutination

HDAC : histone désacétylase

HPS : Haptomonad Parasite Sphere

HO : hème oxygénase

IDR : Intradermoréaction avec leishmanine

IEP : Immunoélectrophorèse

IFAT : anticorps par immunofluorescence

IFAT : pour ImmunoFluorescence Antibody Test

IFI : Immunofluorescence Indirect

IFN : interféron

IgG : immunoglobulines G

IL : interleukines

## *Liste des tableaux :*

kDa : kilo Dalton

LC : leishmaniose cutanée

LCan : LEISHMANIOSE CANINE

LCR : liquide céphalo-rachidien

LMC : leishmaniose cutanomucuse

LPG : lipophosphoglycane

LV : leishmaniose viscérale

MAG : membre antérieur gauche

MO : moelle osseuse

NBM : nouveau bleu de méthylène

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NL : nœud lymphatique

NO : Nitric Oxide

Nrf : nuclear factor erythroid-2-related factor

PAF : ponction à l'aiguille fine

PCRq : Polymerase Chain Reaction quantitative

PG : ponction ganglionnaire

PGR : ponction du granulome

PM : ponction de la masse

PNE : polynucléaires éosinophiles

PNN : polynucléaires neutrophiles

PPG : protéophosphoglycane

PS : phosphatidylsérine

PSG : Promastigote Secretory Gel

RDT : Tests de dépistage rapide

RNS : reactive nitrogen species (espèces réactives de l'azote ou ERN en français, N pour nitrogen étant le symbole de l'azote)

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène ou en français ERO)

RPCU : rapport protéines sur créatinine urinaires

SQC : syndromes de la queue de cheval

VP : vacuole parasitophore

VS : vitesse de sédimentation

WB : Western Blot

## *Liste des tableaux :*

### **Liste des tableaux :**

**Tableau 1:** Agents étiologiques des leishmanioses tégumentaires. Selon les différentes espèces de *Leishmania* en cause, la forme clinique peut varier. Reproduit et adapté à partir de ...Error! Bookmark not defined.

**Tableau 2:** Les deux formes de la leishmaniose ..... 24

**Tableau 3:** La cytologie des nœuds lymphatiques : ..... 34

**Tableau 4:** Procédure de coloration des frottis sanguins /moelle osseuse : ..... 36

**Tableau 5:** Méthode de coloration de parasitologie (*Leishmania*, *Toxoplasma*, *Microsporadia*) et des échantillons microbiologiques : ..... 38

**Tableau 6:** Fréquence des signes cliniques retrouvés sur 46 cas de leishmaniose féline ..... 49

**Tableau 7:** Fréquence de plusieurs anomalies paracliniques retrouvées sur des chats atteints cliniquement de leishmaniose féline ..... 57

**Tableau 8:** Protocoles thérapeutiques employés sur des chats atteints de leishmaniose : ..... 68

**Tableau 9:** Recommandations du groupe LeishVet concernant le suivi des chats traités contre la leishmaniose ..... 69

**Tableau 10:** Cas étudiés..... 75

**Tableau 11:** Résultats obtenus ..... 88

## *Liste des figures :*

### Liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> phlébotome.....	Error! Bookmark not defined.
<b>Figure 2 :</b> Développement de Leishmania dans le phlébotome.....	Error! Bookmark not defined.
<b>Figure 3:</b> Développement de Leishmania dans l'hôte mammifère.....	<b>13</b>
<b>Figure 4:</b> Les deux formes de Leishmania observé au microscope, objectif 100× .....	<b>24</b>
<b>Figure 5:</b> PCR .....	<b>26</b>
<b>Figure 6:</b> culture parasitaire .....	<b>26</b>
<b>Figure 7:</b> Une technique par aspiration. L'aiguille est alors montée sur la seringue et introduite à la surface de la masse. ....	<b>29</b>
<b>Figure 8:</b> présente une illustration en plusieurs étapes de la procédure de PAAF sans aspiration. L'étape A, l'aiguille est insérée dans le tissu cible. L'étape B, l'aiguille est déplacée d'avant en arrière à l'intérieur de la cible en variant l'angle. L'étape C, l'aiguille est retirée. L'étape D, l'aiguille est attachée à une seringue et l'échantillon est soufflé sur une lame. ....	<b>30</b>
<b>Figure 9:</b> ponction de moelle sur la crête iliaque du chat à l'aide d'un trocard de Mallarmé. ....	<b>31</b>
<b>Figure 10:</b> Speed leish K .....	<b>43</b>
<b>Figure 11:</b> ruban adhésif médical transparent .....	<b>44</b>
<b>Figure 12:</b> calque cutanée par apposition .....	<b>45</b>
<b>Figure 13:</b> Photographies de lésions cutanées et cutanéomuqueuses chez des chats atteints de leishmaniose clinique : .....	<b>51</b>
<b>Figure 14:</b> Photographies de lésions dermatologiques moins fréquemment rapportées chez des chats atteints de leishmaniose clinique. ....	<b>52</b>
<b>Figure 15:</b> Photographies de lésions oculaires chez des chats atteints de leishmaniose clinique.....	<b>53</b>
<b>Figure 16:</b> Profil de protéines sériques d'un chat atteint cliniquement de leishmaniose, obtenu par électrophorèse sur acétate de cellulose .....	<b>56</b>
<b>Figure 17:</b> Photographies de lames cytologiques au microscope optique permettant le diagnostic de leishmaniose féline . ....	<b>59</b>
<b>Figure 18:</b> Photographies de lames histologiques réalisées à partir de biopsies d'un nodule cutané chez un chat atteint de leishmaniose .....	<b>60</b>
<b>Figure 19:</b> Proposition d'approche diagnostique de la leishmaniose féline .....	<b>66</b>
<b>Figure 20:</b> lames (CITOGLAS. REF217102 boîte de 50 PCS). ....	<b>77</b>
<b>Figure 21:</b> Seringues pour ponction à aiguille fine (PRONTO SERINGUE C.I.CRETES 2.5ml, 25G. 0.50X16ml) .....	<b>77</b>
<b>Figure 22:</b> KIT RAL 555 (RAL.DIAGOSTICS). ....	<b>78</b>
<b>Figure 23:</b> BIO-DIFF KIT Dias Can .....	<b>78</b>

## *Liste des figures :*

<b>Figure 24:</b> Microscope optique (KERN) .....	<b>79</b>
<b>Figure 25:</b> ponction du ganglion lymphatique à l'aiguille fine.....	<b>81</b>
<b>Figure 26:</b> dépôt du prélèvement ganglionnaire récolté sur la lame.....	<b>81</b>
<b>Figure 27:</b> Etallement avant coloration.....	<b>81</b>
<b>Figure 28:</b> Réalisation d'un calque cutanée.....	<b>82</b>
<b>Figure 29:</b> Réalisation d'un frotti sanguin.....	<b>83</b>
<b>Figure 30:</b> ponction de la moelle osseuse à l'aiguille fine. ....	<b>84</b>
<b>Figure 31:</b> dépôt du prélèvement de MO récolté sur la lame .....	<b>84</b>
<b>Figure 32:</b> ponction de masse à l'aiguille fine. ....	<b>85</b>
<b>Figure 33:</b> l'étape de fixation du lame . ....	<b>86</b>
<b>Figure 34:</b> L'étape de fixation de coloration .....	<b>86</b>
<b>Figure 35:</b> Etape de coloration du noyau au BLEU- RAL 555. ....	<b>91</b>
<b>Figure 36:</b> chat de gouttière consulté pour une dermatose .....	<b>92</b>
<b>Figure 37:</b> vue microscopique d'un calque cutané après coloration RAL 555, montrant la présence de polynucléaires neutrophiles (PN) et de cellules nécrosées (CN), indiquant la présence d'une pyodermite. ....	<b>92</b>
<b>Figure 38:</b> vue microscopique d'une ponction de granulome après coloration RAL 555, montrant la présence de cellules épithéliales (CE), de macrophages (MA), d'éosinophiles (EO) et de quelques bactéries(B). ....	<b>93</b>
<b>Figure 39:</b> chat de gouttière consulté pour des Crise epileptiforme, lesion neurologique. ....	<b>94</b>
<b>Figure 40:</b> vue microscopique d'un frottis sanguin après coloration RAL 555, montrant la présence de corpuscules(corp) à la périphérie des (GR), ce qui indique une forte charge d'hémobartonellose. ....	<b>94</b>
<b>Figure 41:</b> chat de gouttière consulté pour un abcès buccal.....	<b>95</b>
<b>Figure 42:</b> vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration RAL 555, qui montre une adénite granulomateuse leishmanique avec présence d'amastigotes extra cytoplasmiques (Am) et des macrophages (Mc). ....	<b>95</b>
<b>Figure 43:</b> chat croisé consulté pour une anorexie .....	<b>96</b>
<b>Figure 44:</b> vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration RAL 555, montrant un ganglion hyperplasique avec des macrophages (Mc) et quelques lymphocytes (lymph). ....	<b>96</b>
<b>Figure 45:</b> Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire du sous maxillaire après coloration MGG (RAL555) qui montre une adénite granulomateuse avec présence des polynucléaires neutrophiles (PNL) petit lymphocytes (PL) macrophage (Mc) chez un chat du race locale (Grx 10/Grx 40).....	<b>97</b>
<b>Figure 46:</b> chat de race local consulté pour une lésion sur le dos .....	<b>97</b>
<b>Figure 47:</b> Persan consulté pour un kyste au-dessus de l'œil droit .....	<b>98</b>

## *Liste des figures :*

- Figure 48:**vue microscopique d'une ponction de masse après coloration DIFF QUICK, montrant la présence de cellules tumorales avec une diversité cellulaire compatible avec des fibroblastes (FB). Ces cellules ont une forme ronde à ovale, une anisocytose (ANISO) marquée et un rapport noyau/cytoplasme élevé, indiquant la présence d'un fibrosarcome. .... 98
- Figure 49:** Vue microscopique d'un calque d'une masse mammaire après coloration MGG (RAL555) qui montre une mastite pyogène avec présence des polynucléaires neutrophiles (PNL) avec une lésion pyogène chez une chatte de race locale (Gr x10/Gr x40)..... 99
- Figure 50:** chatte de race local consulté pour un problème dermique avec une cécité brutale ..... 99
- Figure 51:** Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration ; MGG (Ral555) qui montre une adénite granulomateuse leishmanique avec présence des petits lymphocytes (dominant) (PL) et des amastigotes extra et intra cellulaire (Am) et des macrophages (Mc) chez une chatte de race locale (Grx10/Grx40/Grx100). .... 100
- Figure 52:**Chat de race local consulté pour un problème dermique, dentaire ..... 100
- Figure 53:** Vue microscopique d'un calque cutané après coloration DIFF QUICK qui montre la présence des amastigotes(Am)à la périphérie des érythrocytes(GR) chez une chatte de race locale (Grx40). .... 101
- Figure 54:**Chat de race local consulté pour un problème dermique ..... 102
- Figure 55 :**Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration ; MGG (Ral555) qui montre une adénite granulomateuse leishmanique avec présence forte charge des amastigotes extra et intra cellulaire (Am) et des macrophages (Mc) chez une chatte de race locale (Grx40). .... 102
- Figure 56:**Chat de race angora noir consulté pour un AVP ..... 103
- Figure 57:**Vue microscopique d'une frottis de la moelle osseuse après coloration bio diff quikk qui montre un ganglion hyperplasique avec présence du plusieurs population cellulaire dans la ligné blanche avec des blastes chez un chat angora noir (Grx40)..... 103

## ***Résumé :***

Cette étude porte sur l'importance de l'examen cytologique dans le diagnostic de la leishmaniose chez le chat. Durant l'année universitaire 2023-2024, nous avons suivi et traité 22 chats présentant des signes cliniques pouvant évoquer la leishmaniose à la clinique de ISV Tiaret. Chaque cas a bénéficié d'un diagnostic clinique et paraclinique approfondi.

Sur les 22 cas étudiés, seulement 3 se sont révélés positifs pour la leishmaniose, confirmant la rareté de cette maladie chez le chat. Les autres cas présentaient des pathologies aux symptômes cliniques similaires, comme l'hémobartonellose et certaines formes d'adénites, nécessitant une différenciation précise par l'examen cytologique.

Pour cette étude, nous avons utilisé plusieurs techniques de coloration, notamment Bio-Diff-Quick, MGG (Kit Ra1555). Ces techniques ont montré des différences en termes de clarté et de rapidité, chaque méthode ayant ses avantages spécifiques pour l'observation des échantillons cytologiques.

En conclusion, notre étude souligne l'importance de l'examen cytologique pour le diagnostic précis de la leishmaniose et de maladies similaires chez le chat. Elle met en évidence la nécessité de recherches supplémentaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de ces pathologies dans la région de Tiaret, et ainsi améliorer les méthodes de diagnostic et de traitement pour les animaux domestiques.

## ***Abstract :***

This study highlights the importance of cytological examination in diagnosing leishmaniasis in cats. During the 2023-2024 academic year, we followed and treated 22 cats presenting clinical signs suggestive of leishmaniasis at the ISV Tiaret clinic. Each case underwent thorough clinical and paraclinical diagnosis.

Out of the 22 cases studied, only 3 were found to be positive for leishmaniasis, confirming the rarity of this disease in cats. The other cases presented pathologies with similar clinical symptoms, such as hemobartonellosis and certain types of adenitis, which required precise differentiation through cytological examination.

For this study, we used several staining techniques, including Bio-Diff-Quick and MGG (Ral555 Kit). These techniques demonstrated differences in clarity and speed, each method having specific advantages for observing cytological samples.

In conclusion, our study emphasizes the importance of cytological examination for the accurate diagnosis of leishmaniasis and similar diseases in cats. It highlights the need for further research to better understand the epidemiology of these pathologies in the Tiaret region, thereby improving diagnostic and treatment methods for domestic animals.

## ملخص:

تسلط هذه الدراسة الضوء على أهمية الفحص الخلوي في تشخيص داء الليشمانيات عند القطط. خلال العام الجامعي 2023-2024، قمنا بمتابعة وعلاج 22 قطاً يعانون من علامات سريرية قد تشير إلى داء الليشمانيات في عيادة ISV تيارت. كل حالة خضعت لتشخيص سريري ودقيق شامل.

من بين الـ 22 حالة التي تم دراستها، تم العثور على 3 حالات فقط إيجابية لداء الليشمانيات، مما يؤكد ندرة هذا المرض عند القطط. الحالات الأخرى كانت تعاني من أمراض ذات أعراض سريرية مشابهة، مثل داء الهيموبارتونيليا وأنواع معينة من التهاب الغدد الليمفاوية، مما استدعى تمييزاً دقيقاً عبر الفحص الخلوي.

في هذه الدراسة، استخدمنا عدة تقنيات تلوين، بما في ذلك Bio-Diff-Quick و MGG (kit Ral555) أظهرت هذه التقنيات اختلافات من حيث الوضوح والسرعة، ولكل طريقة مزاياها الخاصة لملاحظة العينات الخلوية.

في الختام، تؤكد دراستنا على أهمية الفحص الخلوي للتشخيص الدقيق لداء الليشمانيات والأمراض المشابهة عند القطط. كما تبرز الحاجة إلى إجراء مزيد من الأبحاث لفهم أفضل لوبائيات هذه الأمراض في منطقة تيارت، وبالتالي تحسين أساليب التشخيص والعلاج للحيوانات الأليفة.

# **Introduction**

La leishmaniose est une maladie parasitaire tropicales/subtropicales causées par des parasites protozoaires du genre *Leishmania* (plus de 20 espèces). Parmi celles-ci, on trouve *Leishmania infantum* qui représente l'espèce la plus courante et l'agent principal de la leishmaniose canine, elle provoque la forme zoonotique qui est endémique dans le bassin méditerranéen (Sideris, 1999). Cette maladie est principalement transmise par la piqûre de phlébotomes femelles infectées appartenant au genre *Phlebotomus*, tels que *Phlebotomus perniciosus* et *P. longicuspis* en Algérie (Berdjane, 2012).

Bien que le chien soit le principal réservoir de la leishmaniose viscérale zoonotique, les chats peuvent également jouer un rôle dans le cycle épidémiologique de la maladie en fournissant un repas sanguin aux phlébotomes, ce qui fait du félin domestique un participant dans le cycle épidémiologique de cette maladie, comme cela a déjà été discuté dans plusieurs études menées dans différentes zones endémiques (da Silva al. & Paniz Mondolfi, 2015, 2019). En effet, les premières identifications de leishmaniose chez les animaux de compagnie ont été signalées à Alger entre 1908 et 1913 (Sergent et al. & Euzeby, 1912; 1994).

Malgré toutes les mesures préventives déployées pour lutter contre l'infection à *Leishmania* chez les chiens, *L. infantum* persiste dans les habitats domestiques et péri-domestiques, laissant supposer l'existence possible d'un réservoir hôte, soit le chat, étant donné que plusieurs cas de leishmaniose féline ont été signalés au cours des années précédentes (Campino, 2011). Selon certains auteurs, il est difficile de distinguer entre les réservoirs primaires et secondaires lorsque les espèces animales partagent la même zone géographique, comme c'est le cas des chiens et des chats dans la transmission de *L. infantum*.

Les signes cliniques de la leishmaniose féline ne diffèrent pas beaucoup de ceux de la leishmaniose canine (Pennisi, 2013). Les symptômes de la leishmaniose féline comprennent notamment la cachexie avec atrophie musculaire, l'anorexie, la lymphadénopathie et les lésions systémiques et cutanées qui ont également été signalées chez les chats et semblent être prédominantes (da Silva , Gradoni, & Gramicia , 2010,2005).

Les techniques de laboratoire telles que le test d'anticorps par immunofluorescence (IFAT), le test Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) et le test moléculaire (PCR) sont les plus couramment utilisées pour diagnostiquer la leishmaniose zoonotique (Ferreira & Porrozzi, 2007,2007).

En tant qu'étudiants en médecine vétérinaire, nous sommes confrontés à un besoin urgent de mieux comprendre cette maladie, en particulier chez nos compagnons félins, afin d'améliorer à la fois le diagnostic et la gestion clinique. Dans ce contexte notre travail de fin

d'étude se concentre spécifiquement sur l'étude cytologique de la leishmaniose chez le chat tout en mettant en lumière l'importance de cette dernière dans le diagnostic précoce et précis de la maladie chez les carnivores domestiques, en particulier les chats, car la cytologie, en tant que méthode de diagnostic, offre des avantages significatifs en termes de rapidité, de facilité et de coût par rapport à d'autres méthodes plus invasives, l'exploration des aspects cellulaires de la leishmaniose féline et, soulignant ainsi la nécessité d'une d'approche complémentaire dans le diagnostic différentiel.

# CHAPITRE 1 : Etude du parasite et du vecteur

## Étude du parasite et classification, cycle, vecteur

### 1. Description de *Leishmania* spp. :

La leishmaniose est une maladie vectorielle tropicale (Akhoundi et al., 2016). Les premières traces fossiles du parasite *Leishmania* ont été retrouvées dans la trompe et le tube digestif du phlébotome vecteur *Palaeomyia burbiti*, conservée dans de l'ambre de Birmanie datant du Crétacé (Poinar, 2004). *Leishmania* est un genre de protozoaires parasites appartenant à la famille des Trypanosomatidae. Plus de 20 espèces de *Leishmania* ont été identifiées, dont certaines sont spécifiques à certaines régions géographiques, tandis que d'autres ont une distribution plus large. Jugée par le passé comme une maladie rare chez le chat, la leishmaniose féline pourrait être en fait assez fréquente dans les départements où la maladie est très présente. Il semble que les formes cutanées (nodules, ulcérations, croûtes au niveau du nez, des oreilles, des paupières...) prédominent, mais le parasite peut également être à l'origine d'atteintes des organes internes. Certains spécialistes considèrent que la leishmaniose féline est une maladie émergente en France, et qu'il faut y penser lorsqu'un chat vivant ou ayant voyagé en région à risque présente des problèmes de peau compatibles avec cette maladie (<https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose>, s.d.).

**Tableau 1:** Agents étiologiques des leishmanioses tégumentaires (selon les différentes espèces de *Leishmania* en cause, la forme clinique peut varier) (Scorza,

Maladies	Espèces de <i>Leishmania</i> spp. en cause
LC	<i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i>
LMC	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i>
LMC diffuse	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i>
LC disséminée	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamanensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i>

De plus, des textes anciens ont permis de retrouver la première description de la maladie, correspondant à des lésions similaires aux lésions actuelles de la LC (Akhoundi et al., 2016). Dès l'époque précolombienne, des statuettes et des poteries péruviennes ont ensuite illustré la LMC (connue à l'époque sous le nom de « plaie orientale »), en mettant en évidence une lésion mutilante du nez. Certaines de ces œuvres sont d'ailleurs exposées dans des musées du Pérou. Pour ce qui est de la LV, elle était connue sous le nom de « Kala-azar » (le mal noir) et elle était facilement confondue avec d'autres maladies, tels que le paludisme. Bien que la forme LV soit absente de toute source historique jusqu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, elle était pourtant bien

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

présente dès l'Antiquité (Steverding, 2017). Elle fut d'ailleurs récemment identifiée chez des momies de l'Égypte ancienne et de la Haute-Nubie (Zink et al., 2006). Plus précisément, dans leurs travaux, Zink *et al.*, ont analysé des échantillons de tissus osseux provenant de momies Égyptiennes et ils ont réussi à amplifier par réactions en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction "PCR") un fragment de 120 pb d'ADN mitochondrial (ADNmt) du kinétoplaste de *Leishmania* (Zink et al., 2006). Plus généralement, divers rapports permettent de reconstituer une chronologie des différentes découvertes concernant la leishmaniose.

### **1.1. Classification du parasite :**

Chaque organisme vivant a d'abord été répertorié selon une classification classique (ou Linnéenne), proposé en 1735 par Charles Linné, et qui consistait à classer les espèces selon leurs ressemblances les plus visibles. En 1950, Willi Hennig formalise la classification phylogénétique, fondée sur la cladistique, et qui permet de visualiser les relations de parenté entre les taxons (Hennig, 1950).

Le genre *Leishmania* même si la cladistique reste la méthode la plus utilisée (notamment en milieux universitaires), en parasitologie vétérinaire et humaine, la classification classique (Linnéenne) reste de rigueur. Ainsi, *Leishmania* est classé selon les rangs taxonomiques suivants (Akhoundi et al., 2016): Domaine: Eucaryotes (Margulis, 1978), Règne: Protista (Haeckel, 1866), Embranchement: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981), Classe: Kinetoplastea (Honigberg, 1963,1976), Sous-classe: Metakinoplastina (Vickerman, 2004), Ordre: Trypanosomatida (Kent, 1880), ou Kinetoplastida (Sogin, 1991), Famille: Trypanosomatidae ou Kinetoplastidae (Döflein, 1901), Sous-famille: Leishmaniinae (Lukeš, 2012), Genre: *Leishmania* (Ross, 1903).

### **1.1. Espèces de *Leishmania* :**

De nombreuses tentatives de classification des espèces du genre *Leishmania* se sont succédé au cours du temps, en commençant par celle de Charles Nicolle, qui en 1908, après avoir découvert la leishmaniose viscérale, a séparé *L. infantum* de *L. donovani* (Akhoundi, 2016). En 1982, Saf'janova a proposé de placer les parasites *Leishmania* qui infectent les lézards dans un nouveau sous-genre, le sous-genre *Sauroleishmania*, dont la distribution géographique est isolée des autres (WHO, 1984).

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

En 1987, la classification présentée par Lainson et Shaw constitue une étape importante dans l'histoire et marque le début de la division du genre *Leishmania* en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia* (Akhoundi, 2016).

Grâce à la classification, il existerait une trentaine d'espèces de *Leishmania* qui infectent les mammifères (dont une dizaine serait d'importance significative pour la santé publique et une vingtaine qui infectent les reptiles ; mais il est fort possible que de nombreuses autres espèces soit encore actuellement inconnues (Shaw, 1994,2012,1995) .

### **2. Cycle de vie de *Leishmania* :**

*Leishmania* est un organisme hétéroxène qui nécessite deux hôtes pour réaliser son cycle de vie : le vecteur phlébotome femelle et un hôte définitif. On parle souvent « d'hôte mammifère », en référence à l'humain ou au chien, chez qui *Leishmania* se développe majoritairement et rarement au chat. Plus précisément, le parasite présente un cycle de vie dimorphique, dans lequel il alterne entre la forme promastigote flagellée motile (stade extracellulaire) présente dans l'intestin de l'insecte vecteur, et la forme amastigote non-flagellée et non motile (stade intracellulaire), dans les macrophages de l'hôte définitif (Molyneux, 1988).

Bien que les différentes espèces de *Leishmania* aient toutes un cycle dimorphique, des différences ont été observées entre les sous-genres *Leishmania* et *Viannia*. À titre d'exemple, les parasites du sous-genre *Leishmania* (qualifiés de « parasites suprapylaires ») se développent principalement dans l'intestin moyen (le mésentéron) de l'insecte, tandis que les parasites du sous-genre *Viannia* (qualifiés de « parasites péripylaires ») vont dans l'intestin postérieur (le proctodeum) avant d'aller dans le mésentéron (Kamhawi & Dostalova, 2006; 2012).

De plus, selon les espèces, la différenciation des amastigotes en promastigotes infectieux à une durée variable de 7 à 14 jours. Néanmoins, le cycle de vie de *Leishmania* constitue un ensemble de changements morphologiques et métaboliques complexes qui répondent à des stimuli présents dans l'environnement du parasite, et dont le but est d'assurer sa survie (Kamhawi & Dostalova, 2006;2012).

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

### **2.1. Vecteur :**

Le phlébotome représente le vecteur biologique des leishmanies (Figure 1), d'un point de vue étymologique, le mot phlébotome provient de deux mots grecs : "phlebos" qui veut dire « veine » et "tenmein" pour « couper » (Kravetz, 2000). Les phlébotomes se nourrissent à partir d'un « pool » sanguin (télmophagie) et non directement à partir d'un vaisseau sanguin (solénophagie) (Volfova, 2008).



**Figure 1 :** *Phlebotomus perniciosus* mâle (Izri & al., 2006).

Plus de 500 espèces de phlébotomes ont été identifiées à ce jour, mais seulement 30 d'entre elles peuvent transmettre le parasite *Leishmania* (OMS, 2019), ils sont retrouvés dans les régions tropicales et tempérées. Aussi appelée la mouche des sables, celle-ci ne couvre pas de grandes distances, car même un faible vent peut atténuer sa capacité à voler comparativement aux moustiques. Elle reste donc souvent proche de leur site de reproduction (ECDC & al., 2020,2012).

Le mâle et la femelle des phlébotomes se nourrissent du nectar des fruits et seulement la femelle va se nourrir du sang des mammifères, car elle a besoin d'un apport énergétique plus important en vue de la ponte de ses œufs (ECDC, 2020). La mouche des sables se nourrit du sang de plusieurs hôtes vertébrés incluant les mammifères et les oiseaux. Les chiens, péri-domestiques surtout, les rongeurs, les chats, les renards sont responsables du cycle zoonotique dans certaines régions du globe, tandis que les humains peuvent maintenir un cycle anthrozoootique lorsque la maladie y est hyperendémique (al & Jansen, 2009,2014). À ce jour, le phlébotome est le seul vecteur reconnu et accepté de la leishmaniose (Dantas-Torres, 2001). Cependant,

## Étude du parasite et classification, cycle, vecteur

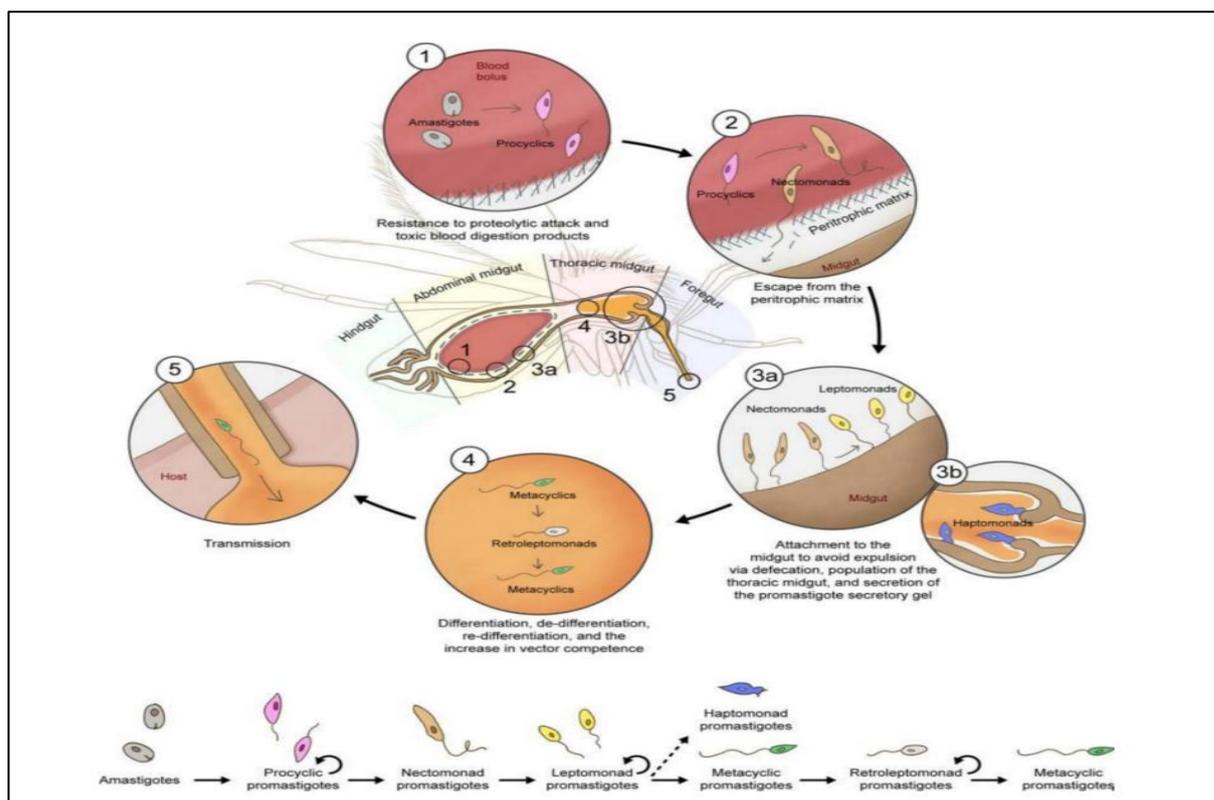
certaines études rapportent une possible transmission par les puces et les tiques chez le chien et même par les moucheron de la famille des Ceratopogonidae chez le kangourou (Colombo, et al., 2011;2007;2011;2011;2009).

### 1.2. Développement des leishmanies au sein du vecteur :

#### 1.2.1. Stade extracellulaire :

##### 1.2.1.1. Repas sanguin du phlébotome non-infecté :

Lorsqu'un phlébotome femelle prend un repas sanguin sur un hôte infecté, il ingère les parasites sous leur forme amastigote (forme non motile plus ou moins ronde de 2 à 6 µm de diamètre, avec un bourgeon flagellaire). Très rapidement, le phlébotome sécrète une membrane péritrophique (composée de protéines, de protéoglycanes et d'un réseau de chitine (Schlein Y. , 1993)), qui enveloppe le repas sanguin et qui protège temporairement les amastigotes contre



les attaques protéolytiques de la digestion (Pimenta P. e., 1997). Toutefois, jusqu'à 50 % des parasites de l'inoculum peuvent être détruit dès le premier jour suivant le repas sanguin (Pimenta P. e., 1997. 2002. ).

##### 2.2.1.2. Promastigotes procycliques :

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

### **2.2.1.3.**

#### **Promastigotes procycliques :**

Une fois enveloppés dans la membrane péritrophique, les amastigotes évoluent et acquièrent une forme allongée (de 6 à 8  $\mu\text{m}$ ), flagellée et motile : c'est la forme promastigote procyclique (Walters L. e., 1993.1994.). Plusieurs éléments semblent jouer un rôle dans l'induction de ce processus, en particulier les changements de température et de pH (insecte : pH alcalin et température à 25°C ; hôte mammifère : pH acide et température à 37°C) (Bates P. a., 1993. ).

Les promastigotes procycliques se multiplient activement avec une réplication asexuée (par fission binaire) (Walters L. e., 1993.). Ils développent également des mécanismes de défense pour lutter contre l'attaque digestive du phlébotome (Figure 2 (1)), tels que le contrôle de l'activité et de l'expression d'enzymes protéolytiques (Schlein Y. a., 1986.) et la sécrétion de molécules spécifiques (comme les protéophosphoglycane (PPG)) qui, chez *L. major*, semblent être indispensables pour lutter contre les enzymes digestives du vecteur (Secundino, 2010. ).

#### **2.2.1.3. Promastigotes nectomonades :**

Environ 48h après le repas sanguin, les promastigotes procycliques arrêtent de se répliquer et deviennent plus allongés (entre 15 et 20  $\mu\text{m}$  de longueur) et plus motiles : c'est la forme promastigote nectomonade (Bates P. G., 1994.2003. ). A ce niveau du développement, il est temps pour *Leishmania* de se libérer de la membrane péritrophique (Figure 1, (2)). Celle-ci est dégradée par de la chitinase, mais connaître le mécanisme à l'origine de la dégradation est source de débat. Certains travaux suggèrent que la chitinase est sécrétée spécifiquement par le parasite (Schlein Y. R., 1991. ) Et d'autres, par l'insecte-vecteur (Schlein Y. R.-O., 1991. 2005. ). En accord avec la seconde suggestion, une étude récente a montré qu'il n'existait aucune différence dans le processus de dégradation de la membrane péritrophique de phlébotomes infectés et non-infectés, ce qui souligne que le parasite ne semble pas être à l'origine de la destruction de la membrane (Sadlova, 2009.) mais cela ne veut pas forcément dire qu'il n'y participe pas.

Néanmoins, après leur libération hors de la membrane péritrophique, les parasites (devenus très motiles grâce à leur nouvelle morphologie) se déplacent rapidement dans la lumière intestinale pour aller s'attacher aux parois digestives du phlébotome, afin d'éviter leur élimination dans les excréments de l'insecte (Figure 1, (3a)). Il a d'abord été suggéré que cette

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

adhérence est possible grâce à la présence de lipophosphoglycanes (LPG), qui représentent des molécules de surface de *Leishmania* qui se lient aux lectines présentes à la surface intestinale du vecteur (Kamhawi S. e.-K., 2004.1993. 1974. ). Selon d'autres travaux, cette adhérence serait dépendante des LPG dans les phlébotomes restrictifs à une seule espèce de *Leishmania*, mais indépendante chez ceux permettant la présence de plusieurs espèces du parasite (Myskova, 2007. ) et pourrait s'expliquer par des modifications de la structure de base des LPG (Dobson, 2010. 2004.). Finalement une étude récente suggère que la liaison des leishmanies à la paroi intestinale du vecteur se fait par une courte zone d'attache présente sur le flagelle, nommée « FAZ » (Flagellum Attachment Zone) et que la protéine FAZ5 est indispensable à l'attachement (Sunter, 2019. ).

### **2.2.1.4.Promastigotes leptomonades :**

Les promastigotes nectomonades migrent dans la partie antérieure de l'intestin et se transforment en promastigotes leptomonades (Figure 1, (3a)). Sous cette forme plus petite, les parasites effectuent de nouvelles répliquions (Rogers M. M., 2002. 2003. ). Cette transformation marque le début de la métacyclogenèse c'est la dernière phase du stade extracellulaire, dans laquelle les parasites acquerront leur forme infectieuse. (Rogers M. M., 2002. 2003. )

### **2.2.1.5. Promastigotes métacycliques infectieux :**

La métacyclogenèse est marquée par la transformation du parasite en une forme infectieuse : les promastigotes métacycliques (forme allongée de 11 à 20 µm, avec un long flagelle et une très grande motilité) (Bates P. s., 1994.1989.1995.) (Figure 1, (4)). A ce niveau du développement, une modification des LPG entraîne une forte diminution de l'adhérence des parasites à la paroi intestinale de l'insecte, ce qui leur permet de se détacher et d'entamer leur migration vers la valve stomodéale (jonction située entre l'intestin antérieur et l'intestin moyen) (Rogers M. M., 2002. 1992. ). Une fois sur place, les parasites sécrètent un gel nommé PSG (Promastigote Secretary Gel) (Stierhof Y. e., 1999.2002. ) Dont l'accumulation provoque une obstruction qui finit par ouvrir la valve stomodéale. L'ouverture de cette valve entraîne la régurgitation des parasites dans la salive du phlébotome (Belkaid, 1998.1988.) et une partie du bouchon de PSG (Stierhof Y. e., 1999. 2004. ). Le tout sera transmis à l'hôte, lors du repas sanguin du phlébotome (Figure 1, (5)).

Il semblerait d'ailleurs que les PPG sécrétés par le parasite soient capables de modifier le comportement alimentaire du phlébotome, en l'incitant à se nourrir davantage favorisant ainsi la transmission de *Leishmania* (Rogers M. , 2012. ). En effet, les repas sanguins multiples augmentent le contact entre le vecteur et l'hôte, ce qui favorise la capacité des vecteurs (y

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

compris les phlébotomes) à transmettre des maladies infectieuses (Kramer L. a., 2003. 2017. ).  
Finalement, durant la métacyclogenèse, l'expression de la glycoprotéine 63 (GP63) augmente fortement pour préparer les parasites à une meilleure survie dans l'hôte (Alexander J. A., 1999. 1992. ) le GP63 étant un important facteur de virulence (Brittingham, 1995.).

### **2.2.1.6. Promastigotes retroleptomonades :**

Récemment, une étude a montré l'existence d'un nouveau stade de promastigotes. Plus précisément, des promastigotes métacycliques seraient capables de reprendre la forme leptomonade d'où l'attribution du nom de promastigotes retroleptomonades (Figure 1, (4)). Cette différenciation se ferait lors des repas de sang multiples et permettraient aux promastigotes métacycliques de redevenir prolifératifs, de se répliquer, et de redevenir métacycliques; la taille de la population de parasites infectieux étant ainsi augmentée (Serafim T. e., 2018.).

### **2.2.1.7. Promastigotes haptomonades :**

Selon quelques travaux, certains promastigotes leptomonades ne suivraient pas la voie classique dont l'aboutissement est de devenir infectieux et d'être transmis, mais se développeraient plutôt en promastigotes haptomonades (forme élargie, non-motile, de 5 à 8  $\mu$ m), et s'attacheraient, grâce à leur flagelle, au niveau de la valve stomodéale (Killick-Kendrick, 1974. 1994.) (Figure 1, (3b)). Le rôle exact de cette forme morphologique n'a pas été clairement identifié, mais il est suggéré qu'elle semble faciliter la génération et le maintien du PSG, et donc de contribuer au blocage de l'intestin (Bates P. , 1994.). Bien que le rôle exact des promastigotes haptomonades soit resté quelque peu « mystérieux » pendant de nombreuses années, une étude récente a montré que ces promastigotes étaient capables de former une vaste structure sphérique nommée « HPS » (« Haptomonad Parasite Sphere ») (Serafim T. e., 2018. ). Ce serait notamment l'addition de cette structure et du PSG qui permettrait l'obstruction de la valve stomodéale (Serafim T. e., 2018.); indispensable pour la transmission efficace des parasites.

### **2.2.8. Métabolisme énergétique des promastigotes :**

Pour survivre, les parasites doivent veiller au bon maintien de leur métabolisme énergétique. Par « chance », les phlébotomes se nourrissent aussi de nectar de fleurs, riches en amidon et

en disaccharides (des glucides que *Leishmania* est capable de digérer (Opperdoes F. a., 2007. ), et pour certains, de façon optimale à des pH légèrement alcalin, comme celui de l'intestin du phlébotome (Blum, 1994. )). Par ailleurs, de sa forme promastigote procyclique jusqu'au stade infectieux, *Leishmania* utilise divers processus (glycolyse (Rosenzweig D. e., 2008. ), chaîne

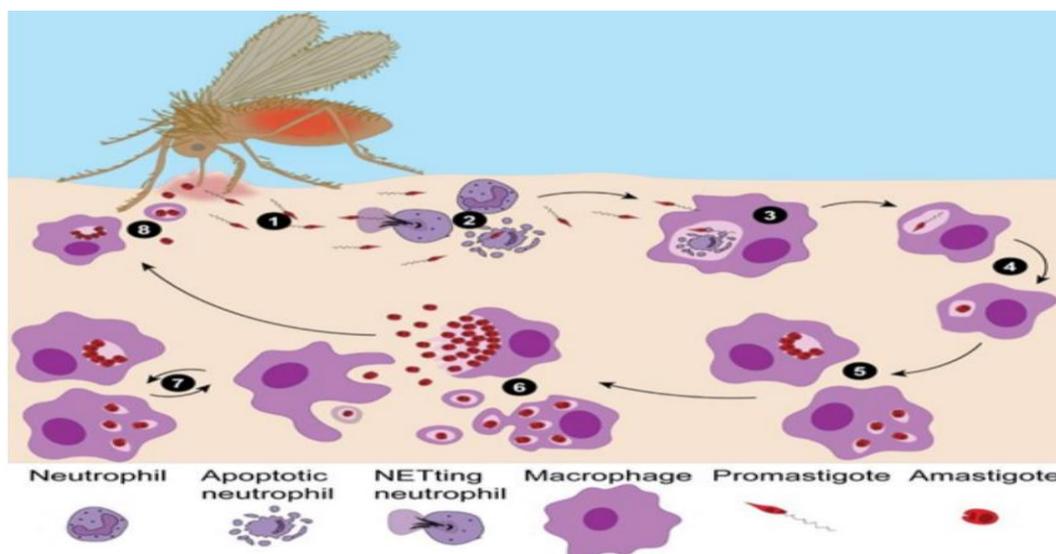
## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

de transport des électrons (Opperdoes F. a., 2007.), voies des pentoses phosphates (Rosenzweig D. e., 2008.)) pour générer suffisamment d'énergie pour sa survie dans le vecteur.

### **2.3. Stade intracellulaire (développement au sein de l'hôte) :**

#### **2.3.1. Repas sanguin du phlébotome infecté :**

La transmission classique du parasite *Leishmania* à l'hôte se fait lors du repas sanguin d'un phlébotome femelle infecté (Figure 2, (1)). L'inoculum régurgité par l'insecte contient une partie du bouchon de PSG (Stierhof Y. e., 1999. 2004. ), entre 103 et 104 parasites (promastigotes métacycliques) (Kramer L. a., 2003. ), et certaines molécules de la salive du vecteur serviraient de vasodilatateurs et faciliteraient l'infection (Kramer L. a., 2003. 2010. ). Pour assurer une transmission efficace, des travaux ont d'ailleurs démontré que les promastigotes métacycliques doivent comprendre deux populations distinctes : les parasites infectieux et ceux qui présentent à leur surface la phosphatidylsérine (PS) ; ces derniers permettant la pénétration silencieuse des parasites infectieux dans les phagocytes (van Zandbergen, 2006. 2009.). Une fois inoculés dans le mammifère, les parasites doivent rapidement neutraliser les attaques défensives du système immunitaire de l'hôte, afin de pouvoir continuer leur cycle de vie.



**Figure 1:** Développement de *Leishmania* dans l'hôte mammifère (adapté de (Ferreira, 2019.)) Le stade intracellulaire se déroule en plusieurs étapes : (1) Infection de l'hôte mammifère lors du repas sanguin, (2) Infection silencieuse des neutrophiles, (3) Recrutement des macrophages, (4) Différenciation des promastigotes en amastigotes, (5) Établissement des parasites au sein des vacuoles parasitophores « individuelles » ou « communales », selon les espèces de *Leishmania*, (6) Prolifération des parasites, (7) Réinfection des macrophages, et (8) transmission au vecteur.

### **2.3.2. Le système du complément :**

Le système du complément est rapidement activé après l'injection des promastigotes dans l'hôte mammifère et conduit à l'élimination efficace de plus de 90% des parasites (revu par (Merle, 2015. 2021.)). Même si un pourcentage élevé de promastigotes est en général éliminé dès le début de l'infection, les parasites restants sont capables de détourner les attaques du système du complément et de favoriser le développement de la maladie. A titre d'exemple, les protéines kinases du protozoaire (fortement exprimées chez les promastigotes métacycliques) semblent permettre l'inhibition de l'activation du complément, en phosphorylant les composants C3, C5 et C9 (Hermoso, 1991.). Chez *L. major*, la modification de la structure des LPG (qui les rend plus longs) empêche le complexe d'attaque membranaire C5b-9 du complément de se fixer à la membrane parasitaire (Puentes, 1990.). Chez *L. donovani*, la GP63 se lie à la protéine C3 et induit la conversion du composant actif C3b en une forme inactive, la C3bi (Ramamoorthy, 1992. 1995.). De plus, des travaux récents ont démontré un nouveau mécanisme utilisé par *Leishmania* pour induire l'inactivation du C3b, dans lequel il recrute le facteur H (une molécule régulatrice du complément) du sérum de l'hôte (Filho, 2021.). En complément, une autre étude a révélé que *Leishmania* est capable

d'utiliser un autre régulateur du complément, la protéine de liaison C4b (C4bBP), pour se protéger (Pereira-, 2023.). Finalement, les différents mécanismes utilisés par *Leishmania* pour détourner l'attaque du complément empêchent sa destruction et favorise sa phagocytose silencieuse par des cellules du système immunitaire (SI) inné (revu par (Podinovskaia, M. and A. , Descoteaux, , & Costa, 2015. 2022.)). Toutefois, plusieurs travaux ont rapporté que pour permettre efficacement la phagocytose silencieuse des promastigotes, la présence de parasites apoptotiques semble nécessaire, notamment pour « tromper » la réponse immunitaire innée (revu par (Wanderley, J, & al, 2009.)).

### **2.3.3. Les neutrophiles :**

Les polynucléaires neutrophiles sont les premiers phagocytes à migrer au site de l'infection et sont capables d'être infectés de manière silencieuse (sans activer le système immunitaire de l'hôte) par les promastigotes (Laufs, H, & al, 2002.) (Peters, N, & al, 2008.) (Figure 2, (2)). Habituellement courte, la vie des neutrophiles est ainsi prolongée par les parasites phagocytés

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

qui empêchent l'entrée trop rapide des neutrophiles en apoptose (*Laufs .H ., 2002.*) (*Aga, E, & al, 2002.*). Cependant, plusieurs travaux soutiennent qu'à l'intérieur de ces cellules, les promastigotes peuvent survivre, mais ne peuvent ni se répliquer, ni se différencier ; qualifiant les neutrophiles de cellules hôtes initiales/transitoires du parasite (*Laufs. H., 2002.*), (*Aga, E, & al, 2002.*), (*Muller, K, & ., 2001.*). Il est suggéré que cette possibilité unique de survie trouve son explication dans la composition trop pauvre en acides aminés essentiels du phagolysosome des neutrophiles (*Rubin, I., & al., 2003.*). Toutefois, la phagocytose des parasites par les neutrophiles peut être vue comme une stratégie du parasite pour obtenir une « protection initiale » en attendant l'arrivée des macrophages, qui sont effectivement recrutés pendant ce temps-là (*Sunderkotter, C., & al., 1993.*). À ce propos, des études plus récentes sur *L. infantum* et *L. mexicana* ont démontré que les PPG sécrétés par le parasite dans l'intestin du phlébotome et inoculés dans l'hôte pendant le repas sanguin, sont d'importants stimulateurs du recrutement des macrophages (*Rogers, M., & al., 2009.*), (*Rogers, M., & al., 2010.*). L'élimination des promastigotes par les neutrophiles infiltrants est tout de même possible grâce à différents mécanismes, comprenant

la phagocytose et la production de facteurs microbicides intracellulaires (tels que les espèces réactives de l'oxygène (« ROS », pour « Reactive Oxygen Species ») et extracellulaires (tels que les pièges extracellulaires des neutrophiles (« NETs », pour « Neutrophil Extracellular Traps ») (*Rochael, N., & al., 2015.*) et revu par (*Regli, I., & al, Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing, 2017.*). Cependant, des travaux ont démontré que *Leishmania* peut utiliser différentes stratégies pour empêcher sa destruction par les neutrophiles, tels que : (i) l'inhibition de la formation du phagolysosome, (ii) l'utilisation de compartiments non lytiques, (iii) la résistance contre les ROS et les NETs, ou leur inhibition, (iv) la digestion des NETs, et, possiblement, (v) la répllication dans les neutrophiles (revu par (*Regli, I., & al, 2017.*)). Chez *L. major*, l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles impliquerait l'activation de la voie des kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK1/2) (*Kilpatrick, L., & al., 2006.*), 140]. D'autre part, des travaux ont montré que la salive du phlébotome *Lutzomyia longipalpis* contient une endonucléase (la Lundep), spécifique à la femelle et capable d'hydrolyser l'ADN ; protégeant ainsi *Leishmania* contre les NETs (*Chagas, A., & al., 2014.*).

### **2.3.4. La vacuole parasitophore :**

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

Une fois arrivés au site de l'infection, les macrophages peuvent phagocyter les promastigotes issus des neutrophiles en apoptose (*van , G., & al., 2004.*), (*Peters , N., D., & Sacks, 2009.*) et les parasites qui sont restés libres hors des neutrophiles (Figure 2, (3)). L'interaction entre *Leishmania* et les macrophages s'initie par un contact via le flagelle des promastigotes. La métalloprotéase de surface GP63 et les LPG du parasite (revu par (*Olivier, M., D., Gregory , & G. , 2005.*)), ainsi que des microdomaines lipidiques situés à la surface du macrophage (*Rodriguez, N., & al., 2011.*), (*Majumder, S., & al., 2012.*) jouent un rôle primordial dans l'entrée du parasite. Une étude récente a montré que selon l'espèce de *Leishmania*, différents récepteurs macrophagiques peuvent être impliqués dans l'entrée des parasites (notamment les récepteurs du complément, les récepteurs du mannose, les récepteurs de la fibronectine et les récepteurs Fc $\gamma$ ) et que le choix du récepteur pouvait avoir un impact sur l'évolution de l'infection (*Ueno & M.E. , 2012.*). Toutefois, en contradiction avec ces informations, des travaux ont démontré que la viabilité des parasites *L. donovani* et *L. major*, et leur phagocytose par les macrophages dérivés de la moelle osseuse murine, n'étaient pas affectées par le choix du type de récepteur du macrophage impliqué dans la reconnaissance du parasite, soulignant une fois de plus la complexité de *Leishmania* (*Polando & al., 2013.*). Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'endocytose dépendante de la cavéoline joue aussi un rôle clé dans l'internalisation des parasites *L. donovani*, par les cellules hôtes (*Kumar, G.A., & al., 2019.*). Les promastigotes phagocytés/internalisés intègrent le phagosome des macrophages, via des cavéoles composées de microdomaines lipidiques membranaires (revu par (*Podinovskaia & al., 2015.*)). Les LPG du parasite s'insèrent ensuite dans les radeaux lipidiques et de l'actine s'accumule autour de la cellule ; l'ensemble permettant l'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome et empêchant la destruction du parasite (*Desjardins & A., 1997.*), (*Holm, al., & n., 2001.*). S'en suit la modification des phagosomes par fusion avec des organites pour former un compartiment dans lequel *Leishmania* pourra s'établir : la vacuole parasitophore (VP) (revu par (*Alexander, A.R. , Satoskar, & D.G., 1999.*), (*Podinovskaia & A. , 2015.*)). A l'intérieur de la VP, les promastigotes se réorientent (ils placent leur flagelle vers la périphérie de la cellule) et favorisent le déplacement de la vacuole vers l'extérieur du macrophage ; créant ainsi des lésions cellulaires néfastes pour l'hôte (revu par (*Podinovskaia & A., 2015.*)). D'autre part, les conditions environnementales de la cellule, notamment l'augmentation de la température et la diminution du pH (hôte mammifère : pH acide et température à 37°C ; insecte : pH alcalin et température à 25°C), favorisent la différenciation des promastigotes en amastigotes (revu par (*Zilberstein & M. Shapira, 1994.*)) (Figure 2, (4)). Toutefois, d'autres éléments semblent aussi intervenir dans la différenciation, tels que l'absorption du fer (*Rocco-Machado & al., 2019.*), (*Mittra & al. , 2013.*), ou même la

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

fusion de certains lysosomes avec la VP (*Forestier, C.L., & al., 2011.*). Selon les espèces de *Leishmania*, les VPs contiennent un seul ou plusieurs parasites. À titre d'exemples, *L. mexicana* et *L. amazonensis* s'établissent dans des VPs dites « communales » qui s'agrandissent au fur et à mesure que les parasites se multiplient ; tandis que *L. infantum* réside dans des VPs dites « individuelles » à partir desquelles les nouveaux parasites issus de la réplication se séparent dans de nouvelles VPs (*Ndjamen & al., 2010.*) (Figure 2, (5)). Une fois les promastigotes différenciés en amastigotes, ils prolifèrent activement, ce qui entraîne l'éclatement des macrophages (Figure 2, (6)) et les force à se déplacer jusqu'à d'autres macrophages non infectés afin de garder une exposition minimale au SI de l'hôte (revu (*Podinovskaia & A., 2015.*)) (Figure 2, (7)). Finalement, lorsqu'un phlébotome femelle prend un repas sanguin sur l'hôte infecté, il ingère les amastigotes qui pourront ainsi continuer leur cycle de vie (Figure 2, (8)).

### **2.3.5. Détournement des fonctions des macrophages :**

En réponse à la présence des parasites, l'hôte active une explosion oxydative pour produire des effecteurs microbicides comme les ROS et RNS. *Leishmania* neutralise ce stress en augmentant l'expression de facteur de transcription NRF2, l'enzyme antioxydante hème oxygénase 1 (HO-1) et facteur de transcription ATF3, et réduit l'activation des macrophages en régulant le gène CD40. *Leishmania* protège également les macrophages de l'apoptose et favorise leur recrutement. En modifiant l'ADN et les histones des macrophages, notamment via la méthylation et l'expression de l'histone désacétylase 1 (HDAC1), *Leishmania* altère les voies de signalisation pour diminuer les niveaux de Nitric Oxide (NO) et assurer sa survie. Enfin, *Leishmania* utilise divers ARNs non codants et protéines comme GP63 et LPG pour détourner la réponse immunitaire de l'hôte, induisant une modulation significative des fonctions des macrophages au début de l'infection (*Fairlamb, A.H. , & A., 1992.*).

### **2.3.6. Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA) :**

Les cellules dendritiques (CDs), notamment les cellules de Langerhans de l'épiderme, dégradent les antigènes parasitaires en peptides et les présentent à leur surface avec des molécules du CMH-I ou CMH-II, activant ainsi les lymphocytes T (LT). Les macrophages

## *Étude du parasite et classification, cycle, vecteur*

peuvent aussi jouer ce rôle, mais *Leishmania* empêche la présentation de l'antigène en séquestrant et dégradant les antigènes du CMH-II, en évitant la migration des macrophages vers les ganglions lymphatiques, et en réduisant l'expression du CMH-II et des molécules costimulatrices. Ainsi, les cellules dendritiques (CDs) sont les principales CPA de l'infection à *Leishmania* (Schaible, U.E., & al., 1999.).

### **2.3.7. Les lymphocytes T (LT) :**

La réponse immunitaire adaptative, particulièrement celle des lymphocytes T (LT), est essentielle pour contrôler l'infection par *Leishmania*, qui se cache dans les macrophages, rendant les anticorps des lymphocytes B (LB) moins efficaces pour la clairance des parasites. L'activation des LT se produit dans les ganglions lymphatiques drainant le site de l'infection, et les cytokines jouent un rôle crucial. L'IL-4 active les LT CD4+ vers la voie Th-2, produisant des cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) qui suppriment la production de NO et favorisent la maladie. L'IL-12 dirige les LT CD4+ vers la voie Th-1, produisant de l'IFN- $\gamma$ , ce qui stimule la production de NO et la destruction de *Leishmania*. L'IL-12 active aussi les LT CD8+ cytotoxiques, qui combattent l'infection via cytokines, granules cytotoxiques et interactions Fas/FasL. Cependant, *Leishmania* peut manipuler la réponse immunitaire en appauvrissant le cholestérol membranaire des macrophages, perturbant la signalisation du CD40, et réduisant l'IL-12 tout en augmentant l'IL-10, ou en inhibant la voie NF- $\kappa$ B avec des cystéines peptidases (Saunders, E.C., & al., 2018.).

## **CHAPITRE 2 :**

### **Présentation de la leishmaniose chez les carnivores domestiques (étiologie et présentation clinique)**

## *Présentation de la leishmaniose chez les carnivores domestique (etiologie et présentation clinique)*

### **1. Les aspects mondiaux de la leishmaniose :**

#### **1.1. Étiologie :**

La leishmaniose est causée par des protozoaires diphasiques du genre *Leishmania* de la classe des Kinetoplasta et de la famille des Trypanosomatidae. Le genre *Leishmania* est divisé en sous-genres *Leishmania* et *Viannia* en fonction des différences dans l'emplacement du développement du parasite au sein du phlébotome. Les phlébotomes du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde sont les vecteurs naturels de la leishmaniose (Greene, 2012).

Ce sont de petits insectes dont la longueur du corps dépasse rarement 3 mm. (Greene, 2012). Leur activité de piquûre est crépusculaire et nocturne. Dans la région méditerranéenne et en Asie, les phlébotomes sont principalement actifs pendant les mois chauds, du printemps à la fin de l'automne. En Amérique, certaines espèces de phlébotomes sont actives tout au long de l'année. Ils ne parcourent pas de longues distances, et des études ont montré qu'ils se dispersent rarement à plus de 1 km de leurs sites de reproduction. La capacité des différentes espèces de phlébotomes à agir comme vecteurs semble être liée à la capacité des promastigotes à se lier aux ligands présents dans l'intestin du phlébotome. Lorsqu'ils ne se lient pas à l'intestin du phlébotome, les parasites qui se sont initialement répliqués dans la lumière intestinale sont excrétés avec les excréments des phlébotomes et n'atteignent probablement pas la masse critique nécessaire pour infecter un hôte lors d'un deuxième repas de sang (Greene, 2012).

Le cycle de vie naturel de l'infection par *Leishmania* implique un phlébotome vecteur et un hôte vertébré. Chez les hôtes vertébrés, *Leishmania* se trouve dans les macrophages sous sa forme non flagellée. Les amastigotes sont ovoïdes ou ronds, mesurant 2,5 à 5 µm de long et 1,5 à 2 µm de large. En plus d'un noyau basophile, un kinétoplaste en forme de bâtonnet, à coloration plus foncée, est visible avec la coloration de Wright ou de Giemsa (Greene, 2012).

## *Présentation de la leishmaniose chez les carnivores domestique (etiologie et présentation clinique)*

### **2. la leishmaniose féline :**

#### **2.1. Épidémiologie :**

L'infection par leishmaniose chez un chat domestique a été décrite pour la première fois en 1912 en Algérie à partir de la moelle osseuse d'un chaton de 4 mois vivant dans la même maison où un chien et un enfant étaient atteints de leishmaniose (Greene, 2012).

Depuis lors, des maladies cliniques et des infections subcliniques ont été signalées sporadiquement dans les régions et pays suivants où la leishmaniose canine est endémique : Europe du Sud, Afrique du Nord, Irak, Iran et Amérique centrale et du Sud. Là où elle survient, la leishmaniose féline est rare et peut être provoquée par plusieurs espèces de leishmanies. Il a été signalé que la leishmaniose clinique chez les chats domestiques implique *L. infantum* en Europe et au Brésil *Leishmania mexicana* au Texas, *Leishmania venezuelensis* au Venezuela et *L. braziliensis* et *Leishmania amazonensis* au Brésil. (Greene, 2012)

Des enquêtes sérologiques et PCR sur les populations de chats dans les régions endémiques de la leishmaniose canine du sud de l'Europe et du Moyen-Orient indiquent que l'infection féline est plus répandue que la maladie clinique. Des études épidémiologiques ont décrit des taux de séroprévalence allant de 0,9 % à 28 %. Des études PCR sur des échantillons de sang ont montré des taux d'infection variables allant de 0,43 % à 30 %. (Greene, 2012)

Le véritable rôle du chat en tant que réservoir de l'infection à *L. infantum* reste incertain. Cependant, une transmission de *L. infantum* aux phlébotomes (*P. perniciosus*) à partir d'un chat chroniquement infecté dans des conditions expérimentales a été rapportée. (Greene, 2012)

#### **2.2. Manifestation clinique :**

Les lésions les plus fréquemment décrites dans la leishmaniose féline causée par *L. infantum* sont les croûtes ulcéreuses et la dermatite nodulaire, l'alopecie et la desquamation affectant principalement la face et les oreilles. Les formes viscérales de la maladie touchant la rate, le foie, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, l'uvée et les reins ont été moins fréquemment décrites et seraient associées à une immunosuppression causée par le virus de la leucémie féline, des infections par le virus de l'immunodéficience féline ou d'autres maladies concomitantes. (Greene, 2012)

Un chat présentait une atteinte viscérale comprenant une hépatosplénomégalie, un ictère, une gastro-entérite lymphoplasmocytaire avec de nombreux parasites *Leishmania* et une

### ***Présentation de la leishmaniose chez les carnivores domestique (etiologie et présentation clinique)***

glomérulonéphrite membraneuse. Un deuxième chat, à partir duquel le zymodème *L. infantum* MON-1 a été cultivé, avait des lésions cutanées croûteuses disséminées et des amastigotes dans la moelle osseuse. Un autre chat atteint d'une maladie disséminée présentait une uvéite comme résultat prédominant. Un cas de pancytopenie chez un chat a été rapporté avec des amastigotes dans des frottis sanguins, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques. Comme chez les chiens, l'hyperprotéïnémie accompagnée d'hypergammaglobulinémie est une constatation fréquente dans la leishmaniose féline. Les titres sériques d'anticorps contre l'antigène de *Leishmania* variaient de faibles à élevés. Le diagnostic a été posé dans la majorité des cas par des examens sérologiques, cytologiques, histologiques ou PCR. (Greene, 2012)

Les cas de leishmaniose féline signalés dans le Nouveau Monde ont principalement décrit des infections cutanées causées par des espèces responsables de la leishmaniose cutanée (CL) chez l'homme. Des nodules pinnaux provoqués par *L. mexicana* ont été décrits chez un chat du sud du Texas. Trente mois après la pinnectomie radicale, le chat a développé des lésions pinnales similaires qui ont progressé vers des lésions plus diffuses sur le museau et dans la muqueuse nasale. Aucune atteinte des organes viscéraux n'a été constatée à l'autopsie. Des lésions similaires ont été décrites chez huit chats du Texas, impliquant les pavillons de l'oreille, ou plus généralement le museau et la peau périorbitaire. Des lésions nodulaires sur le nez et les oreilles ont été observées chez des chats atteints de CL dans une région endémique du Venezuela, et de l'ADN de *L. chagasi* (*infantum*) a été amplifié à partir d'une lésion sur le nez d'un chat au Brésil (Greene, 2012).

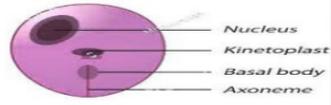
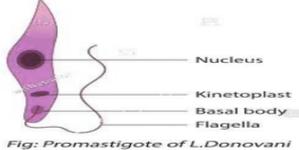
Une infection par une espèce dermatotrophe de *Leishmania* (*Viannia*) chez un chat du Brésil a été détectée dans une lésion interdigitaire proliférative sur la patte postérieure du chat. *Leishmania braziliensis* a également été isolée de lésions cutanées de deux chats au Brésil. Des études expérimentales ont montré que les chats étaient sensibles à une infection généralement spontanément résolutive avec un isolat humain de cet organisme. La PCR a été utilisée pour confirmer la présence d'ADN leishmanial dans la rate et les ganglions lymphatiques de chats affectés au Brésil (Greene, 2012).

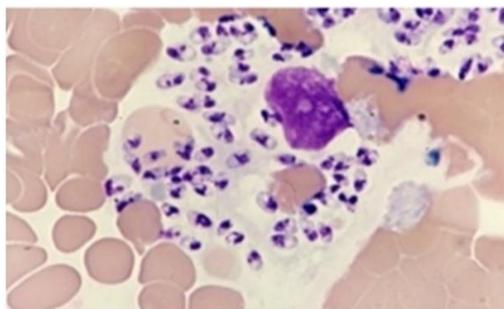
# **CHAPITRE 3 :**

**Méthodes de diagnostic de la  
leishmaniose chez les carnivores  
domestiques.**

**1. Morphologie :**

**Tableau 2:** Les deux formes de la leishmaniose (Dr Dorbani & Djama .S, 2023)

Forme amastigote	Forme promastigote
Ovoïde	Allongée
Kinétoplaste juxta-nucléaire	<b>Kinétoplaste</b> antérieur
PAS de flagelle	<b>Flagelle</b> libre antérieur
Forme intracellulaire <b>obligatoire</b>	
<b>Chez l'homme + réservoir animal</b>	Chez le vecteur + dans le milieu de culture
 <p><i>Fig: Amastigote of L.donovani</i></p>	 <p><i>Fig: Promastigote of L.Donovani</i></p>



**Formes amastigotes**



**Formes promastigotes**

**Figure 2:** Les deux formes de Leishmania observé au microscope, objectif 100×

(BACHI, 2020).

## **2. Les différentes techniques de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques : approches et méthodes actuelles :**

### **2.1. Diagnostic indirect de présomption :**

#### ***FNS :***

La formule numération sanguine va montrer une pancytopénie. Une diminution du nombre de globule rouge à l'origine de l'anémie, une diminution du nombre de globule blanc cause des surinfections et une diminution du taux de plaquette ce qui explique les complications hémorragiques. L'anémie est de type normochrome normocytaire arégénérative.

#### ***VS :***

la vitesse de sédimentation est accélérée témoignant d'un processus inflammatoire. Protidogramme : montre un taux de protéine normal avec une dysprotéinémie à savoir une hypoalbuminémie et un hyper gammaglobulinémie aboutissant à l'inversion du rapport Albumine/Globuline.

#### ***IEP :***

Immunoélectrophorèse des globulines montre que l'augmentation porte sur les IgG.

### **2.2. Diagnostic seroimmunologique :**

Il consiste à rechercher des anticorps anti-Leishmania dans le sérum du malade par différentes techniques. La technique la plus utilisée est la technique d'Immunofluorescence Indirect (IFI) dont le seuil de positivité est de 1/80. D'autres techniques peuvent être utilisées telle que l'ELISA et l'HAP. Des techniques plus sensibles sont utilisées chez le nourrisson et le sujet immunodéprimé, il s'agit du Western Blot.

### **2.3. PCR (Polymérase Chain Réaction) :**

La PCR permet de détecter l'ADN du parasite dans divers échantillons biologiques, tels que :

- Le sang périphérique en tube EDTA (substrat avec la plus faible sensibilité diagnostique) le test n'est pas significatif pendant la période d'activité du phlébotome, de juin à octobre, -

Biopsie cutanée

- Ponction de nœud lymphatique

- Ponction de moelle osseuse (substrat avec la plus haute sensibilité diagnostique) C'est une technique très sensible et spécifique ( Claudio , Marco, & Giorgio , Manuel de parasitologie vétérinaire du chien et du chat, 2017).



**Figure 3:** PCR (igenels).

### **2.4. Culture parasitaire :**

Il s'agit de la culture du parasite à partir d'échantillons tissulaires prélevés sur l'animal infecté (ponction de nœud lymphatique ou de moelle osseuse). Cette méthode peut être utilisée pour identifier la présence du parasite et éventuellement pour tester sa sensibilité aux médicaments.



**Figure 4:** culture parasitaire (CNRS News)

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

### **2.5. Frottis et examen microscopique :**

#### **2.5.1. Les frottis de lymphe (cytoponction) :**

Elle est possible de la réaliser à partir de tout nœud lymphatique explorable (le poplité permet généralement un accès plus facile) pour détecter la présence de parasites (**Claudio , Marco , & Giorgio , 2017**).

#### **2.5.2 Cytoponction des masses :**

La ponction à l'aiguille fine (PAF) est la méthode la plus adaptée pour obtenir des échantillons de masses. La PAF évite la contamination superficielle, qui peut avoir lieu au cours des raclages ou des calques, et permet de prélever des cellules dans différentes zones au sein de la lésion, afin d'obtenir du matériel représentatif. Les PAF peuvent être réalisées en effectuant ou non une aspiration. La méthode utilisée dépend du type de lésion ainsi que de la préférence et de l'expérience du praticien.

La technique sans aspiration permet de mieux contrôler l'extrémité de l'aiguille et peut être utile dans de nombreux cas, en particulier pour les biopsies écho-guidées des lésions profondes. Cette technique est également efficace pour les lésions ou les organes très vascularisés car elle permet de prélever des cellules en limitant la contamination sanguine.

Les techniques d'aspiration peuvent être nécessaires dans le cas de lésions de petite taille dans lesquelles l'aiguille ne peut pas être suffisamment enfoncée pour prélever les cellules (Tyler & al., 2006).

#### **2.5.3. Choix de la seringue et de l'aiguille :**

Les PAF sont réalisées avec une aiguille de 21 à 25 G a et une seringue de 3 à 20 ml. Plus la consistance du tissu aspiré n'est molle, plus l'aiguille et la seringue doivent être petites.

Les aiguilles supérieures à 21 G ont ne dû pas être utilisées car elles ont tendance à aspirer le centre du tissu et fournissent des échantillons de cellules de mauvaise qualité pour la préparation cytologique. De plus, les aiguilles plus larges sont souvent à l'origine d'une contamination sanguine plus importante (Tyler & al., 2006).

La taille de la seringue utilisée pour réaliser l'aspiration dépend de la consistance du tissu prélevé. Les tissus mous, tels que les nœuds lymphatiques, peuvent souvent être aspirés à l'aide d'une seringue de 3 ml. Une plus grosse seringue doit être utilisée pour les tissus plus fermes, tels que les fibromes ou les épithéliomas spinocellulaires, afin de maintenir une aspiration adéquate pour pouvoir prélever suffisamment de cellules dans le tissu. Il est impossible de connaître la taille de seringue la plus adaptée avant l'aspiration des masses ; par conséquent,

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

une seringue de 12 ml correspond à la taille standard pour effectuer une cytoponction (Tyler & al., 2006).

### **2.5.4. Préparation du site :**

La zone doit être préparée chirurgicalement lorsque des tests microbiologiques doivent être effectués ou lorsqu'une cavité corporelle (cavité péritonéale ou thoracique, articulation, etc.) doit être pénétrée. Dans les autres cas. La préparation de la peau est la même que celle qu'on effectue pour un vaccin ou une prise de sang. Un lavage à l'acole peut-être réalisé pour nettoyer la zone (Tyler & al., 2006).

### **2.5.5. Techniques d'aspiration :**

La masse qui doit être aspirée est maintenue fermement pour permettre la pénétration de la peau et de la lésion et pour pouvoir contrôler la direction de l'aiguille.

L'aiguille, attachée à la seringue, est introduite dans le centre de la masse et une forte pression négative est réalisée en tirant sur le piston jusqu'aux trois-quarts du volume de la seringue.

Différentes zones de la masse doivent être prélevées, mais il faut éviter d'aspirer du matériel dans le cylindre de la seringue et de contaminer l'échantillon en aspirant le tissu entourant la masse.

Lorsque la masse est suffisamment grosse pour permettre à l'aiguille d'être redirigée et déplacée en son sein sans risquer d'en sortir, la pression négative est maintenue durant les mouvements de l'aiguille. Cependant, lorsque la masse n'est pas suffisamment grosse pour pouvoir rediriger et bouger l'aiguille sans risquer de sortir de la masse, la pression négative doit être relâchée durant la redirection et les déplacements de la seringue.

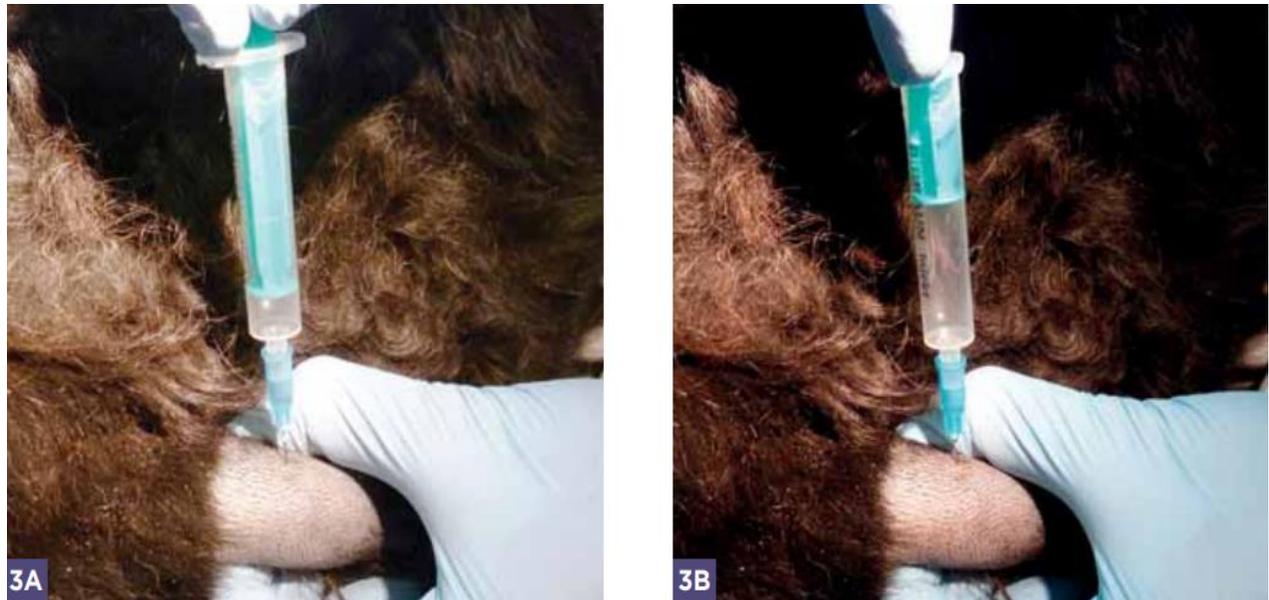
Après avoir prélevé différentes parties de la masse, la pression négative exercée sur la seringue est relâchée et l'aiguille est retirée de la masse et de la peau (Tyler & al., 2006).

L'aiguille est ensuite ôtée et de l'air est aspiré dans la seringue. L'aiguille est refixée sur la seringue et le tissu contenu dans le cylindre de la seringue et à l'intérieur de l'aiguille est expulsé au centre de la lame porte-objet propre en appuyant rapidement sur le piston (Tyler & al., 2006). Le matériel aspiré doit être expulsé en une seule fois en tenant l'extrémité de l'aiguille près de la lame. En s'éloignant de la lame, on risque d'obtenir de nombreuses petites gouttelettes qui sèchent avant d'avoir eu le temps d'étaler le prélèvement (Tyler, 2006).

Les échantillons s'avèrent alors peu utiles au diagnostic car les cellules sont amassées et ne peuvent pas être évaluées. Les cellules doivent absolument être étalées en une seule couche

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

selon les techniques de frottis décrites plus loin dans ce chapitre. Plusieurs lames doivent être réalisées dans la mesure du possible (Tyler, 2006).



**Figure 5:** Une technique par aspiration. L'aiguille est alors montée sur la seringue et introduite à la surface de la masse (vétérinaire).

### **2.5.6. Techniques de ponction sans aspiration :**

Une technique de ponction a été décrite pour prélever des échantillons cytologiques." Cette technique donne de bons résultats pour la plupart des masses, en particulier pour les tissus hyper vascularisés.

La procédure est réalisée en plaçant une petite aiguille (environ 22 G) sur une seringue de 12 ml. Aspirer quelques millilitres d'air dans la seringue avant de réaliser le prélèvement (pour permettre d'expulser rapidement le matériel sur la lame de verre). Tenir la seringue au niveau ou près du centre de l'aiguille avec le pouce et l'index pour avoir le maximum de contrôle. La masse qui doit être aspirée est stabilisée avec la main libre et l'aiguille est insérée dans la masse. La personne tenant l'aiguille la déplace rapidement d'avant en arrière, en essayant de garder le même trajet.

Cette technique permet de prélever les cellules en coupant et en exerçant une pression sur le tissu. Des précautions doivent être prises pour garder l'extrémité de l'aiguille au sein de la masse pour empêcher la contamination avec du tissu environnant.

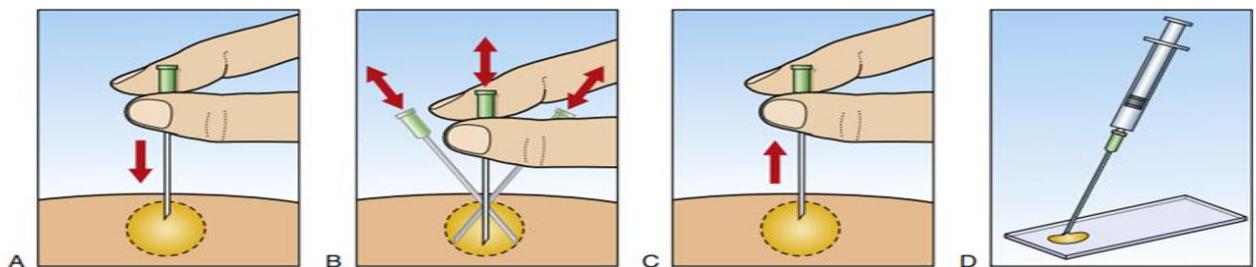
## ***Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques***

L'aiguille est ensuite retirée et le matériel dans l'aiguille est expulsé sur une lame de verre propre et un frottis est réalisé selon l'une des techniques citées dans ce chapitre (Orell & al., 2005).

Le fait d'avoir déjà de l'air dans la seringue permet de gagner du temps et de réaliser plus rapidement le frottis et d'éviter par conséquent le dessèchement des cellules prélevées. L'échantillon ne permet généralement de réaliser qu'un seul frottis (Orell & al., 2005).

Dans la mesure du possible, il est préférable de réaliser plusieurs prélèvements au niveau de différents sites au sein de la masse pour augmenter les chances d'obtenir du matériel diagnostique et un échantillon représentatif de la lésion.

Cette technique est également efficace pour réaliser des prélèvements échoguidés de lésions situées au sein de cavités corporelles : une seule main doit contrôler l'aiguille et l'autre main contrôle la sonde de l'échographe. Un meilleur contrôle de l'aiguille permet de diriger plus précisément l'aiguille (Orell & al., 2005).



**Figure 6:** présente une illustration en plusieurs étapes de la procédure de PAAF sans aspiration. L'étape A, l'aiguille est insérée dans le tissu cible. L'étape B, l'aiguille est déplacée d'avant en arrière à l'intérieur de la cible en variant l'angle. L'étape C, l'aiguille est retirée. L'étape D, l'aiguille est attachée à une seringue et l'échantillon est soufflé sur une lame (Orell & al., 2005).

### **2.5.7. La ponction de la moelle osseuse :**

consiste à prélever une carotte de moelle dans la crête iliaque du chat à l'aide d'un trocard de Mallarmé (marseille). Cette méthode est de choix pour le diagnostic de confirmation de la leishmaniose féline car la sensibilité d'environ 60% et spécificité d'environ 100% (Claudio , Marco , & Giorgio , 2017).



**Figure 7:** ponction de moelle sur la crête iliaque du chat à l'aide d'un trocard de Mallarmé.

### **2.5.8. Préparation des lames :**

L'extrémité de l'aiguille doit toucher la surface de la lame pendant que le piston de la seringue est enfoncé pour pousser une gouttelette de matériel aspiré à sa surface. Le matériel aspiré ne doit pas être rejeté à distance sur la lame. Plusieurs lames peuvent être préparées à partir du matériel contenu dans le canon d'une seringue de 2,5mL. Chaque goutte doit avoir la taille d'une tête d'épingle. Si la goutte est trop petite, les cellules se rompent souvent. Si elle est trop grande (problème plus fréquent), il devient difficile d'étaler finement et délicatement les cellules sur la surface de la lame.

#### **2.5.8.1. Etalement :**

Plusieurs techniques de préparation d'un étalement ont été décrites. La plus utilisée est la méthode d'étirement vers l'arrière suivi d'un étalement vers l'avant (Belfort, Cowell, DeMay, Orell, & Perman, 1998, 1999, 1996, 1992, 1979). Identique à celle utilisée pour le sang. La lame mobile est placée à la surface de la lame fixe en formant un angle d'environ 30 à 45 degrés. Cette lame est tirée en arrière jusqu'à l'extrémité du matériel aspiré, ce qui permet aux cellules et au liquide de s'étaler latéralement par action capillaire. Dès que les cellules et le liquide ont atteint la moitié ou les deux tiers de la largeur de la lame fixe, la lame mobile est avancée d'un mouvement rapide et régulier pour distribuer les cellules en une fine couche. L'extrémité en plume d'oiseau, qui contient souvent les cellules les plus significatives, doit se trouver dans la zone de la lecture de la lame. La répartition des cellules sur la lame peut être ajustée par :

- l'angle de la lame mobile.
- le temps laissé au mouvement d'étalement latéral.
- le volume du prélèvement placé au début sur la lame.

Certains cytopathologistes recommandent d'arrêter la lame mobile pour qu'une certaine concentration de cellules soit déposée près de l'extrémité de l'étalement (Cowell & Perman,

## ***Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques***

Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia, 1999, 1979). Cette technique a ses avantages et ses inconvénients. La concentration cellulaire est plus forte, mais le séchage est moindre et contribue à l'apparition d'artefacts. Les couches cellulaires épaisses et les amas ne peuvent souvent pas être examinés avec la coloration de Romanowsky. Si d'importants placards cellulaires sont visibles à l'extrémité en plume d'oiseau, ils peuvent être immédiatement étalés en utilisant la technique d'« écrasement ». Il est recommandé d'utiliser la technique d'« écrasement » ou de « séparation » lorsque la texture du prélèvement empêche une distribution uniforme des cellules avec la méthode décrite précédemment (Belfort, Cowell, DeMay, Orell, & Perman, 1998,1999,1996,1979). La lame mobile est placée sur une petite goutte du prélèvement et les deux lames sont séparées en utilisant seulement la force horizontale. Si l'étalement des fragments tissulaires est mauvais, il faut ajouter une pression verticale légère pendant la séparation des lames. Une pression verticale inutile s'ajoute aux forces de cisaillement et entraîne une augmentation de la rupture cellulaire. Cette technique d'écrasement doit être utilisée lorsque le prélèvement contient trop de mucine ou de petites particules tissulaires et lorsque la technique du frottis sanguin n'a pas permis la distribution cellulaire souhaitée. Les biopsies faites avec une aiguille de calibre supérieur à 8/10 résultent souvent en des biopsies de morceaux tissulaires souvent difficiles à étaler avec la technique du frottis sanguin. On peut s'attendre à une morphologie cellulaire optimale lorsqu'une l'aspiration est étalée entre deux lamelles (Duncan & Orell., 1994.1992.). Une petite goutte de matériel aspiré est placée sur une lamelle, une autre lamelle est placée en diagonale sur la première et les deux lamelles sont séparées. Le marquage des lamelles et les techniques de coloration sont plus difficiles que lors d'utilisation de lames et de coloration automatisée.

### **2.5.8.2 Fixation :**

#### **(Séchage à l'air)**

Le séchage à l'air est couramment utilisé en cytodiagnostics vétérinaire (Belfort, Cowell, & Perman, 1998,1999,1979.). Il doit être effectué rapidement pour obtenir des détails cytoplasmiques et nucléaires optimaux.

Un séchage lent crée de nombreux artefacts, en particulier une condensation surtout nucléaire, qui entraîne la perte des détails. Les cellules séchées à l'air sont colorées par la méthode de Romanowsky, mais l'utilisation d'un colorant aqueux, comme le nouveau bleu de méthylène, peut être intéressante dans certains cas (Cowell & Perman., 1999,1979.).

Dans la plupart des laboratoires de cytologie médicaux, du moins en Amérique du Nord, l'éthanol est utilisé pour la « fixation humide » des cellules avant l'utilisation des colorants

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

bichromes ou trichromes comme l'éosine hématoxyline (H&E) ou le colorant de **Papanicolaou** (Bibbo, DeMay, & Orell, Cytologic Features of Testicular Tumours in Dog, 1992, 1996, 1997). Comme les cellules disposées en une seule couche sèchent très rapidement, chaque étalement doit être immédiatement fixé avec un spray fixant à base d'alcool disponible dans le commerce, de préférence par un assistant, ou par immersion dans un flacon de Coplin rempli d'alcool (DeMay & Orell, 1996,1992). Si pendant la préparation des lames, les cellules sèchent avant de subir la fixation « humide », la morphologie cellulaire et les propriétés tinctoriales sont mauvaises et inadaptées à l'examen sous coloration trichrome ou de Romanowsky. Le séchage à l'air des cellules suivi de leur coloration au Wright permet une interprétation satisfaisante de la majorité des biopsies cytologiques, mais les cytopathologistes doivent connaître les avantages des autres méthodes de fixation et de coloration. Comme la coloration de Romanowsky est très dense, en particulier dans les noyaux, les détails intracellulaires sont souvent masqués s'il existe des amas de tissu ou plusieurs couches de cellules. En revanche, les relations intercellulaires, les limites cellulaires et les détails nucléaires sont encore visibles à l'intérieur de placards cellulaires denses si on utilise les colorants bichromes ou trichromes. Cependant, pour que les avantages morphologiques offerts par ces colorants bichromes ou trichromes soient visibles, il faut une fixation « humide ». D'après leur expérience, les auteurs se sont aperçus qu'en clinique, la fixation immédiate à l'alcool était impossible ou échouait. Après un séchage à l'air, les cellules peuvent être réhydratées 30 secondes dans du soluté salin, puis fixées immédiatement en les plongeant dans de l'alcool ou à l'aide d'un spray fixant et colorées avec un colorant bichrome ou trichrome (Chan & Jörundsson, 1998,1999.), (voir paragraphe suivant sur la coloration).

**Tableau 3:** La cytologie des nœuds lymphatiques (May, 1909)

	Populations cellulaires présentes:	Principales causes:
Noud lymphatique normal	Petits lymphocytes matures (>90-95 %) Moyens et grands lymphocytes (<10%) Blastes lymphoïdes (<1-2%) Plasmocytes (<2%) PNN. PNE. Mastocytes (CT' notamment)	
Noud lymphatique hyperplasique	Moyens et grands lymphocytes (jusque 50%) Plasmocytes (10-30%) Blastes lymphoïdes (<1-2%)	Stimulation antigénique locale ou systémique Infection ; inflammation ; métastase au NL ; maladie à médiation immune
Adénite neutrophilique	Petits lymphocytes matures majoritaires PNN (5 à 50%)	Infection ou inflammation sévère dans la zone de drainage du NL
Adénite éosinophilique	Petits lymphocytes matures majoritaires PNE (5 à 50%)	Hypersensibilité (DAPP) Syndrome hyperéosinophilique du CT Eosinophilie paranéoplasique dans le cas d'un mastocytome
Adénite granulomateuse	Petits lymphocytes matures majoritaires Macrophages (5 à 50%)	Leishmaniose ; ehrlichiose Infections mycosiques (cryptococcose ; histoplasmose) Mycobactériose

### **2.5.8.3. Coloration :**

#### **2.5.8.3.1. Coloration de Romanowsky :**

Dans la plupart des laboratoires, la coloration de Romanowsky utilisée en hématologie l'est également en cytologie de routine. La technique de coloration de Romanowsky comprend plusieurs colorations, dont celle de Wright, de Giemsa, de Wright-Giemsa et de May-Grünwald-Giemsa, ainsi que des colorations rapides développées pour être utilisées en clinique. Ce sont des colorations à base d'alcool à utiliser sur des cellules séchées à l'air. Si la coloration doit être retardée de plusieurs jours, il est possible d'améliorer la conservation des cellules séchées à l'air en les immergeant quelques minutes dans de l'alcool de méthyle. Il ne faut pas confondre cette procédure avec celle de la réhydratation et de la fixation immédiate dans de l'alcool dont nous avons parlé pour les colorations bichromes et trichromes. Les propriétés tinctoriales varient considérablement entre les différentes colorations de Romanowsky surtout entre les types de coloration rapide de Wright. Le cytotechnicien doit connaître l'aspect des précipités de colorants pour éviter de les interpréter par erreur comme des agents infectieux. La coloration de Wright est la plus utilisée par les cytopathologistes vétérinaires. De ce fait, la majorité des photographies de cet atlas ont été prises à partir d'étalements séchés à l'air et colorés au Wright. Colorations aqueuses Le nouveau bleu de méthylène (NBM) est un colorant à base d'eau qui permet un examen immédiatement après son application sur des cellules séchées à l'air. Il a été largement utilisé en cytologie vétérinaire jusqu'à l'apparition sur le marché des colorations rapides de Wright (Perman, 2001). Il reste encore très intéressant pour vérifier la richesse des lames et la présence d'une inflammation et de certains agents infectieux. L'aspect des amas de chromatine nucléaire est plus proche de celui observé dans les cellules fixées à l'alcool puis colorées avec un colorant trichrome que de celui observé avec les cellules colorées par les colorations de Romanowsky. Les nucléoles sont bien colorés. Le NBM ne permet pas une bonne coloration des détails cytoplasmiques, mais les parois des cellules fongiques sont souvent bien visibles justement parce qu'elles ne prennent pas la coloration. Comme les champignons et les bactéries poussent dans les solutions aqueuses non alcoolisées, les colorants aqueux doivent être régulièrement examinés pour vérifier qu'ils ne sont pas contaminés.

De nombreuses colorations de type Romanowsky sont disponibles dans le commerce, y compris Diff-Quik, DipStat et d'autres colorations de Wright. La plupart, voire toutes les colorations de type Romanowsky permettent de colorer les préparations cytologiques.

La coloration Diff-Quik ne crée pas de réaction métachromatique. Par conséquent, les granules de certains mastocytes ne se colorent pas et ces derniers peuvent alors être confondus avec des

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

macrophages. Ce problème peut se poser lors de l'étude d'un mastocytome.

### **2.5.8.3.2 BIO-DIFF Kit Coloration rapide MGG pour Hématologie :**

#### **a) Introduction :**

Le kit Bio-Diff (coloration rapide MGG pour Hématologie) colore les préparations hématologiques en peu de temps et fournit des résultats précis, tels que les résultats de la méthode May-Grunwald Giemsa. Chaque partie du kit est stabilisée séparément et préparée selon les normes les plus strictes.

#### **b) Principe :**

La coloration par le kit Bio-Diff (coloration rapide MGG pour Hématologie) permet d'afficher une image détaillée de la morphologie des cellules sanguines, notamment des chromatines leucocytaires, étude morphologique érythrocytaire, recherche de parasites et médullaires (réalisation de myélogrammes).

L'étude cytologique et structurale des coupes de tissus fixés et inclus en paraffine ainsi que des ponctions et liquides

L'étude cytologique des urines, des liquides et du liquide céphalo-rachidien (LCR).

Atteint un niveau optimal de fixation cellulaire et un rapport bleu/rouge optimal, ce qui permet d'obtenir une image claire des détails de la chromatine, ainsi qu'une membrane cellulaire et nucléaire clairement visible.

#### **c) Description du kit :**

Bio-Diff Reagent 1 : Composant de Fixation 100/ 250/ 500 ml

Bio-Diff Reagent 2: Composant rouge 100/ 250/500 ml

Bio-Dit Reagent 3 : Composant bleu 100/ 250/ 500 ml

Bio-Diff Reagent 4 : Solution Tampon 100/ 250/ 500 ml

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

**Tableau 4:** Procédure de coloration des frottis sanguins /moelle osseuse (Giemsa, 1922)

1	Laisser sécher le frottis. Note : les frottis sanguins sont préparés du sang frais.	
2	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 1.	5 fois x1 seconde.
3	Décanner le réactif excessif de la section sur du papier filtre.	
4	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 2. Note : prolonger la période d'incubation si une teinte plus forte de rouge/violet est nécessaire.	3/5 fois x1 seconde.
5	Décanner le réactif excessif de la section sur du papier filtre.	
6	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 3. Note : diminuer la période d'incubation si une teinte rouge/violet plus forte est nécessaire.	6/5 fois x1 seconde.
7	Rincer la section dans Bio-Diff Reagent 4 (Solution tampon pH 6.8 à 7.2).	1 min (avec agitation).
8	Sécher la préparation.	

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

**Tableau 5:** Méthode de coloration de parasitologie (Leshmania, Toxoplasma, Microsporadia) et des échantillons microbiologiques (Giemsa, 1922)

1	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 1.	1 min.
2	Décantier le réactif excessif de la section sur du papier filtre.	
3	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 2.	25 secondes.
4	Décantier le réactif excessif de la section sur du papier filtre.	
5	Plonger la section dans le Bio-Diff Reagent 3.	25 secondes.
6	Rincer la section dans Bio-Diff Reagent 4 (Solution tampon pH 6,8 à 7,2).	1 min (avec agitation).
7	Sécher la préparation.	

### **d) Résultats :**

Noyaux - rouge à violet

Lymphocytes - le plasma est coloré en bleu

Monocytes - le plasma est de couleur gris-bleu.

Granulocytes neutrophiles - violet clair

Granulocytes d'éosinophiles - rouge vif à brun-rouge vif

Granulocytes basophiles - violet foncé à noir

Thrombocytes - violet

Érythrocytes - rougeâtre

Parasites sanguins -rouge(noyau) bleu (cytoplasme)

### **e) Conservation et stabilité :**

Conservé le kit Bio-Dif dans son emballage d'origine hermétiquement fermé à une température comprise entre 15 et 25 °C, Ne pas conserver dans des endroits froids, ne pas congeler et éviter l'exposition directe au soleil. La date de péremption est imprimée sur l'étiquette du produit.

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

(Giemsa, 1922) (Klernan, 2008) (May, 1909)

### **2.5.8.3.3. Kit RAL 555 (kit de coloration rapide) :**

#### **a) Modes opératoires :**

##### **1. Hématologie :**

Frottis sanguins Parasitologie Vétérinaire : Piroplasmies, *M. papydomatis*

##### **Temps de réalisation : 15 secondes**

- Plonger la lame 5 fois 1 seconde dans le flacon (1)

Egoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 5 fois 1 seconde dans le flacon (2)

Égoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 5 fois 1 seconde dans le flacon (3)

Rincer rapidement à l'eau déminéralisée

##### **2. Parasitologie :**

Protozoaires tissulaires (*Leishmania*, *Toxoplasma*, *Microsporidies*), *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii* et champignons responsables de mycoses profondes.

##### **Temps de réalisation : 2 minutes et 5 secondes**

- Plonger la lame 1 minute dans le flacon (1)

Égoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 25 secondes dans le flacon (2)

Égoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 40 secondes dans le flacon (3)

Rincer rapidement à l'eau déminéralisée

##### **3. Histo-Cytologie :**

Cytologie des coupes de tissus fixés et inclus en paraffine; mise en évidence de *Helicobacter pylori* Temps de réalisation: 15 secondes (hors déparaffinage) .

- Déparaffiner puis hydrater la coupe.

- Plonger la lame et agiter pendant 7 secondes dans le flacon (2)

- Plonger la lame et agiter pendant 5 secondes dans le flacon (3)

- Rincer à l'eau courante et sécher sur du papier Joseph

- Agiter la lame pendant 10 dans l'alcool à 90°

- Arrêter la différenciation par immersion de la lame dans l'alcool absolu

- Plonger les lames dans deux bains de xylène ou de toluène

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

- Monter avec un milieu de montage adapté à base de Toluène/Xylène

### **4. Cytobactériologie:**

Cytologie des liquides, des ponctions, des urines et du LCR

**Temps de réalisation : 15 secondes (1 minute 4 secondes pour le LCR)**

- Plonger la lame 5 secondes

(1 minute pour le LCR) dans le flacon (1)

Égoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 5 secondes

(2 fois 1 seconde pour le LCR) dans le flacon (2)

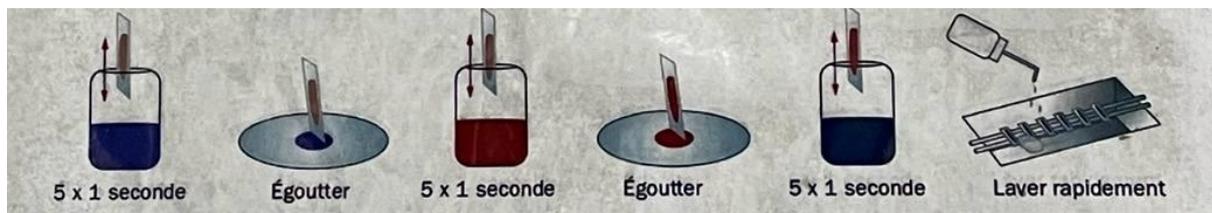
Égoutter l'excédent sur papier filtre

- Plonger la lame 5 secondes

(2 fois 1 seconde pour le LCR) dans le flacon (3)

Rincer rapidement à l'eau déminéralisée.

### **5. Exemple du frottis sanguin :**



### **Résultats : (frottis sanguin) :**

Noyaux:	chromatine :	pourpre +/- dense
Polynucléaires:	cytoplasme sans ARN :	rosé léger
	granulations éosinophiles:	brun-orange
	granulations basophiles:	bleu violacé foncé
	granulations neutrophiles:	pourpre +/- intense
Lymphocytes:	cytoplasme avec ARN:	bleu franc
	cytoplasme sans ARN:	bleu clair
Monocytes :	granulations azurophiles:	rouge
	cytoplasme:	bleu-gris
Hématies:		rouge clair
Plaquettes:	chromomère:	rouge-violacé
	hyalomère :	bleuté
Parasites sanguins:	noyaux :	rouge

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

(paludisme) cytoplasme : bleu

(kitral555, 2022)

### **2.5.8.3.4. Colorations bichromes et trichromes :**

Les colorations trichromes, en particulier la coloration de **Papanicolaou**, sont largement utilisées dans les laboratoires de médecine humaine. Elles sont appliquées sur des cellules qui ont immédiatement subi une fixation humide. La coloration de Sano modifiée (Sano, 1949) est préférée à celle de Papanicolaou (Roszel, 1975) .

L'H&E est utilisée en routine pour colorer les coupes histologiques. De nombreux anatomopathologistes préfèrent utiliser la coloration H&E pour l'interprétation cytologique parce qu'ils sont plus familiarisés avec les propriétés tinctoriales des cellules. Malheureusement, dans les cellules séchées à l'air et colorées à l'H&E, la perte des détails nucléaires est beaucoup plus marquée que dans les cellules réhydratées ou immédiatement fixées par l'alcool.

Les techniques de coloration bichromes et trichromes standards et ultrarapides peuvent être utilisées si les cellules séchées à l'air sont réhydratées puis subissent immédiatement une fixation humide (rivas, 2018). Cette technique peut être pratique à utiliser dans un laboratoire de diagnostic de cas référés. Une ou plusieurs lames non colorées sont ainsi gardées en réserve, réhydratées, fixées puis colorées si nécessaire pour faciliter l'examen cellulaire et l'interprétation. La morphologie est optimale lorsque les cellules sont réhydratées et fixées dans les quelques heures qui suivent l'étalement. Cependant, elle reste adaptée à l'examen si la réhydratation est retardée de 1 à 2 jours (Jörundsson, 1999). La plupart des points forts des colorations bichromes ou trichromes persistent, en particulier les détails nucléaires sont excellents et les cellules des amas tissulaires peuvent être examinées. De plus la lyse des hématies améliore l'examen des cellules restantes.

### **2.5.8.3.5. Colorations spéciales :**

Les colorations cytochimiques et immunocytochimiques permettent de différencier les lignées cellulaires ou de trouver la famille d'origine, en particulier lorsque les cellules sont peu différenciées (Bibbo, DeMay, Jain, & Orell, 1997, 1996, 1992.). L'utilisation des techniques de coloration doit être validée pour chaque type cellulaire visé dans chaque espèce. Il est essentiel que le cytotechnicien ait l'expérience de ces colorations pour obtenir des résultats répétables et fiables. Même si leur intérêt universitaire est considérable, l'utilisation en routine de ces techniques de coloration spéciales reste exceptionnelle dans la plupart des laboratoires de diagnostic. De même, lorsqu'il est nécessaire d'obtenir plus d'informations sur la classification

## ***Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques***

de cellules néoplasiques peu différenciées, l'expression phénotypique peut ne pas être fiable.

Chaque méthode de fixation et de coloration engendre des artefacts. Ces modifications affectent le diamètre cellulaire, le rapport nucléo-cytoplasmique, la chromatine nucléaire, l'aspect des nucléoles, et les propriétés tinctoriales. Les effets de la fixation et de la coloration diffèrent selon le type cellulaire. De plus, les effets sur l'aspect de la chromatine nucléaire peuvent être différents en présence d'une hyperplasie et d'une tumeur.

Le prélèvement, la fixation et les techniques de coloration doivent être effectués toujours de la même façon pour permettre la différenciation entre les artefacts et les modifications de la morphologie cellulaire d'importance biologique. Pour montrer l'influence considérable des techniques de fixation et de coloration, les aspects des cellules d'un mastocytome, d'un mélanosarcome peu différencié et d'un épithélioma spinocellulaire associé à une inflammation secondaire sont présentés. Noter les détails nucléaires et cytoplasmiques ainsi que les différences de propriétés tinctoriales.

### **2.5.9. Examen des lames :**

Les lames sont examinées près d'une source de lumière pour déterminer la taille, la localisation et la densité des zones de coloration. Puis elles sont examinées au faible grossissement pour identifier les zones cellulaires au sein de l'étalement et les cellules à examiner au fort grossissement. Le nombre, le type et l'état de conservation des cellules sont déterminés. En se rapportant aux données cliniques, les cellules sont examinées pour savoir si elles sont représentatives de la lésion, en nombre suffisant et bien conservées pour permettre une interprétation cytologique satisfaisante. Les cellules normalement étrangères au tissu biopsié justifient une attention particulière.

Par exemple, il ne doit pas y avoir de cellules épithéliales squameuses dans une aspiration de nœud lymphatique ou dans du liquide cavitaires. Si on élimine le risque d'une contamination par la peau de l'animal ou du praticien.

### **2.6. Tests de dépistage rapide (RDT) : (speed leish k)**

Speed Leish K est un test qualitatif rapide, basé sur le principe de l'immunochromatographie sur membrane permettant la mise en évidence des anticorps anti-*Leishmania infantum*.

Pour chaque test, il suffit de déposer une goutte d'échantillon (sérum, plasma ou sang total avec anticoagulant) dans le puits échantillon. Après dépôt de l'échantillon, les particules colorées du conjugué se lient aux anticorps anti-*Leishmania infantum* présents dans le prélèvement. Ces complexes conjugué/anticorps ainsi formés migrent par capillarité sur la membrane. Ils sont capturés par des antigènes spécifiques de *Leishmania infantum*.

## ***Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques***

immobilisés sur la membrane, formant par accumulation de particules colorées une bande test de couleur rose. Le mélange continue de migrer sur le support jusqu'à l'extrémité de la membrane où les particules colorées restantes forment une bande de contrôle rose qui confirme la bonne réalisation du test.

Sensibilité : 98 % Spécificité : 100 %

Chaque boîte contient :

- Tests (6-20-50)
- Pipettes (6-20-50)
- Flacon(s) de réactif (1 - 3)

On utilise ce test :

En cas de signes cliniques évocateurs

En zone d'endémie, l'usage régulier de ce test est fortement recommandé afin de dépister précocement les chiens asymptomatiques

Au retour d'une zone d'endémie) (virbac)



**Figure 8:**Speed leish K

### **2.7. Biopsie de la peau :**

Une biopsie de la peau ou de la moelle osseuse peut être réalisée pour détecter la présence du parasite par examen histopathologique

### **2.8. Calque cutanée :**

La méthode du calque cutané est une technique utilisée pour détecter les lésions cutanées caractéristiques de la leishmaniose chez les animaux.

## **2.8.1. Calque cutanée par un ruban adhésif :**

### **2.8.1.1. Matériel nécessaire :**

#### **a) Ruban adhésif transparent :**

Le ruban adhésif transparent est utilisé pour prélever les cellules et les débris cutanés de la zone suspecte de l'animal. Il doit être de qualité médicale pour assurer une adhérence suffisante et éviter toute contamination.



**Figure 9:**ruban adhésif médical transparent (algeriaubuy, 2024)

#### **b) Lames de microscope :**

Des lames de microscope propres et stériles sont nécessaires pour préparer les échantillons cutanés recueillis à partir du ruban adhésif.

#### **c) Microscope :**

Un microscope optique équipé d'objectifs à fort grossissement est indispensable pour examiner les échantillons cutanés sous le microscope.

#### **d) Solutions de nettoyage et de désinfection :**

Des solutions de nettoyage et de désinfection sont nécessaires pour préparer la zone cutanée à être examinée et pour nettoyer les instruments et les surfaces de travail. Des désinfectants doux et non irritants doivent être utilisés pour éviter toute réaction cutanée chez l'animal.

#### **e) Équipement de protection individuelle (EPI) :**

Des gants jetables et d'autres équipements de protection individuelle, tels que des blouses et des masques, sont recommandés pour garantir la sécurité du personnel effectuant la technique du calque cutané. Cela inclut également la protection contre les piqûres d'insectes si la manipulation de l'animal est nécessaire.

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

### **2.8.1.2. Technique :**

Elle implique l'application d'un morceau de ruban adhésif transparent sur la peau de l'animal, en particulier sur les zones suspectes de lésions ou d'ulcères. Ensuite, le ruban adhésif est retiré, placé sur la lame, la coloration peut être utilisée pour améliorer la visibilité des parasites. La coloration la plus couramment utilisée dans ce contexte est la coloration de Giemsa, qui peut rendre les parasites plus facilement identifiables sous le microscope tels que les amastigotes, qui peuvent être présents dans les tissus cutanés affectés.

### **2.8.2. Le calque par apposition :**

Application directe d'une lame de verre sur les lésions : érosives ou ulcérées, sous-crustacées

#### **2.8.2.1. Technique :**

- Saisir la lame entre le pouce et le majeur, l'index étant posé au milieu de la lame.
- Appliquer la lame de verre sur la peau, en effectuant une contre-pression avec l'index.
- Eviter de faire glisser la lame afin de limiter les artefacts d'étalement.
- Répéter l'opération plusieurs fois au même endroit.
- Un dépôt macroscopiquement visible apparaît sur la lame de verre.
- Identifier la lame, pour repérer de quel côté elle a été imprimée, puis en colore.



**Figure 10:**calque cutané par apposition (Prélaud & N.Cochet-Faivre)

## **2.9. Intradermoréaction avec leishmanie (IDR) :**

## *Méthodes de diagnostic de la leishmaniose chez les carnivores domestiques*

### **2.9.1. Principe :**

l'IDR à la leishmanine est une réaction d'hypersensibilité retardée (ou hypersensibilité de type IV), utilisée pour mettre en évidence l'immunité cellulaire spécifique dirigée contre des parasites du genre *Leishmania* chez les chiens asymptomatiques vivant en région endémique [19]; 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) vont capter cet antigène et le présenter aux LTmémoire patrouillant dans l'organisme. La

reconnaissance de l'antigène par les LT CD4mémoire va provoquer la synthèse de cytokines (en particulier IFN $\gamma$ ). Il en résulte un recrutement de macrophages activés à l'endroit de l'activation en 48 à 72h, ayant pour rôle de phagocyter les antigènes responsables de l'activation, et de LTmémoire. C'est cet afflux important de cellules qui se traduit macroscopiquement par un nodule inflammatoire au site d'injection de la leishmanine (univtoulouse.fr, 2024).

### **2.9.2. Technique :**

Consiste en une inoculation intradermique (face interne de la cuisse, après trichotomie et désinfection) de 50 $\mu$ L de leishmanine (un extrait soluble de promastigotes). La lecture est réalisée 72 heures après le test. Il est considéré, comme positif en présence d'une papule de 5mm de diamètre. Cet examen indique une réaction d'hypersensibilité retardée (réponse immunitaire de type cellulaire) vis-à-vis des antigènes parasitaires, ce qui indique une potentielle résistance de l'animal à la maladie. Toutefois, il n'existe pas de solution de leishmanine standardisée dans le commerce, et le test est utilisé seulement dans le cadre de la recherche (Genchi, Genchi, & Traldi, 2017).

### **2.10. Échographie :**

L'échographie peut être utilisée pour détecter des signes d'atteinte viscérale chez les animaux présentant des symptômes de leishmaniose.

## **CHAPITRE 4 :**

### **Étude Clinique de la leishmaniose**

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

### **1. Une infection très souvent asymptomatique :**

La leishmaniose est une affection souvent asymptomatique au sein de la population féline (SOLANO-GALLEGO, et al., 2007)

Certains chats peuvent présenter des signes cliniques de façon transitoire, suivis d'une rémission spontanée pouvant être expliquée par une réponse immunitaire à dominante Th1 qui conduit à une séroconversion et à la résolution clinique de l'affection (MONTTOYA, 2018).

Ainsi, de nombreux chats sont porteurs du parasite et peuvent le transmettre mais n'expriment pas de symptômes cliniques de l'affection.

### **2. Une expression clinique polymorphe :**

Bien que le développement de la médecine féline ait conduit à une augmentation du nombre de cas rapportés de leishmaniose féline au cours des dernières dizaines d'années, il y a peu d'informations aujourd'hui concernant les aspects cliniques de l'infection chez le chat. Les connaissances actuelles se basent sur des études épidémiologiques descriptives et des rapports de cas cliniques, soit un faible niveau de preuves scientifiques, à interpréter par conséquent avec prudence (PENNISI, 2015).

En Europe, entre 1977 et 2014, un total de 46 cas cliniques et 15 descriptions histologiques ont été publiés, pour lesquels la leishmaniose féline a été diagnostiquée par des méthodes sérologiques et/ou d'observation directe du parasite sur des chats adultes, âgés de 2 à 21 ans. Les chats infectés se trouvaient dans des pays endémiques de leishmaniose, à savoir l'Italie (27 cas), l'Espagne (21 cas), la France (6 cas) et le Portugal (3 cas). Il y avait également quatre chats diagnostiqués en Suisse mais qui étaient importés d'Espagne ou y avaient séjourné (PENNISI, 2015).

Sur la base de ces rapports de cas, la leishmaniose féline se manifeste principalement par des signes cutanés, cutanéomuqueux, oculaires, systémiques ou viscéraux dont la fréquence est reportée dans le Tableau 6.

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

**Tableau 6:** Fréquence des signes cliniques retrouvés sur 46 cas de leishmaniose féline (PENNISI, 2015)

Signes d'atteinte cutanée et/ou cutanéomuqueuse ; Signes d'atteinte oculaire ; Signes d'atteintesystémique ou viscérale

Fréquence des signes cliniques observés (%)		
Environ 50% des cas	20 – 30% des cas	< 10% des cas
<b>Lésions cutanées ou cutanéomuqueuses</b> <b>Adénomégalie</b>	<b>Lésions buccales</b> <b>Lésions oculaires</b> <b>Amaigrissement</b> <b>Anorexie</b> <b>Léthargie</b> <b>Déshydratation</b>	<b>Prurit</b> <b>Pâleur des muqueuses</b> <b>Vomissements</b> <b>Diarrhée</b> <b>Cachexie</b> <b>Fièvre</b> <b>Hypothermie</b> <b>Jetage nasal chronique</b> <b>Respiration sifflante</b> <b>Dyspnée</b> <b>Avortement</b> <b>Hépatomégalie</b> <b>Ictère</b> <b>Splénomégalie</b> <b>Polyurie/Polydipsie</b>

Certains chats présentent uniquement des signes cutanés, d'autres combinent signes cutanés et atteinte de l'état général, alors qu'à l'inverse, certains chats ne présentent aucune lésion cutanée à l'examen clinique (HERVÁS, et al., 1999) .

Il est d'ailleurs suggéré que la présentation clinique de l'affection varie selon l'espèce de leishmanie impliquée. Par exemple, *L. infantum* présente souvent un tropisme mixte, viscéral et cutané, tandis que *L. mexicana* présente un tropisme cutané uniquement, comme décrit chez l'Homme (TRAINOR, 2010).

D'autre part, l'expression clinique de la maladie est fréquemment associée à une dysimmunité due à des pathologies immunosuppressives (FIV, FeLV), un traitement immunosuppresseur, des co-

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

infections, comme celles citées dans le Tableau 6 ou une affection débilitante concomitante (tumeur maligne, diabète sucré, carcinome épidermoïde, pemphigus foliacé, ...). Cela peut influencer le tableau clinique observé : il est alors difficile d'être certain qu'un signe clinique soit dû à la leishmaniose féline plutôt qu'à une autre affection concomitante (PENNISI, 2015)

Ainsi, la leishmaniose féline présente une expression clinique polymorphe avec de nombreux signes cliniques non-spécifiques et parfois frustrés, d'intensité légère à sévère et d'évolution aiguë à chronique, rendant le diagnostic difficile à établir notamment dans les régions non endémiques de leishmaniose (MAIA, et al., 2015) .

### **2.1. Atteinte cutanée et cutanéomuqueuse :**

L'atteinte dermatologique est la plus fréquemment rapportée quelle que soit l'espèce de leishmanie impliquée, seule ou associée à d'autres signes cliniques systémiques et/ou viscéraux (PENNISI, 2015) .

Une étude regroupant 66 cas de leishmaniose féline se manifestant par des troubles dermatologiques indique que les lésions cutanées les plus fréquentes sont des dermatites nodulaires (> 70% des cas de l'étude) suivies des dermatites ulcérales et croûteuses (> 30%) avec des lésions cutanées et/ou cutanéomuqueuses (abramo, 2021)

Les dermatites exfoliatives sont plus rarement rapportées, contrairement à la leishmaniose canine où elles sont fréquentes (PENNISI, 2015)

Les nodules cutanés et cutanéomuqueux sont le plus souvent localisés au niveau de la face (paupières, pavillon externe des oreilles, museau, babines, muqueuse gingivale et linguale) et sur les parties distales des membres. Des nodules ont également été rapportés au niveau de la muqueuse anale (FERNANDEZ-GALLEG0, 2020)

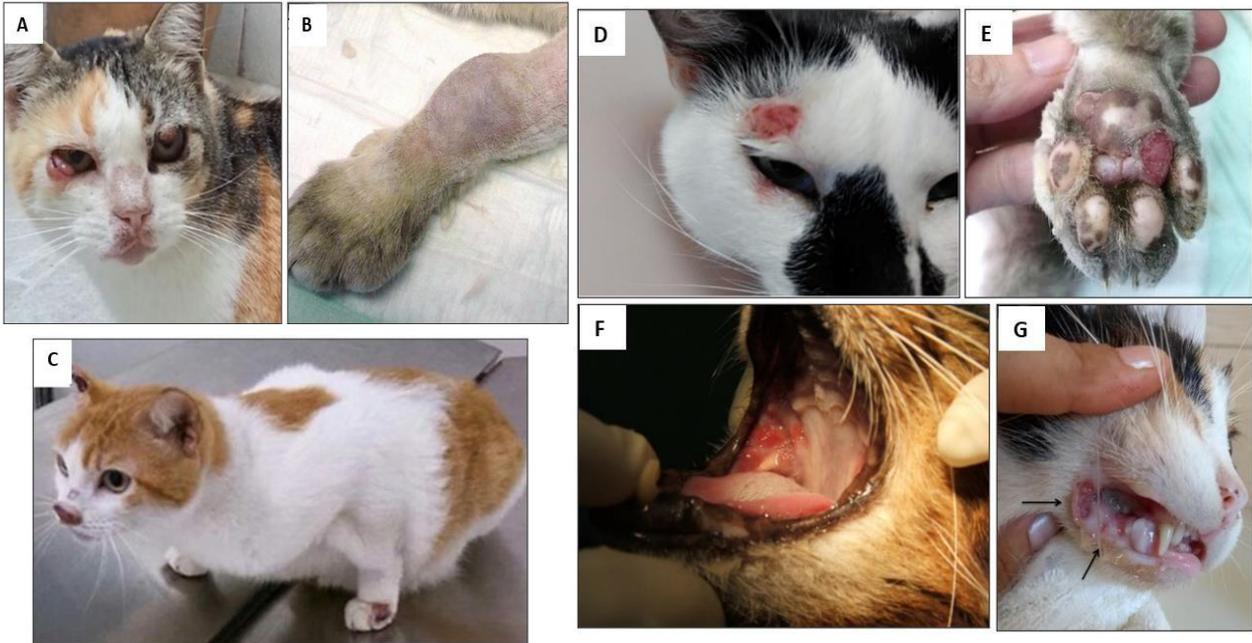
Ils sont de taille variable, généralement inférieure à 1 cm, non douloureux, non prurigineux et leur surface peut être d'aspect normal, alopecique ou ulcérée (PENNISI, 2015) .

Les ulcères peuvent présenter une répartition diffuse ou focale, superficielle ou profonde. Ils ont une distribution corporelle similaire à celle des nodules, il est également possible d'en trouver au niveau du tronc ou sur les proéminences osseuses en cas de dermatite ulcéreuse diffuse. Les ulcérations peuvent se compliquer d'infections bactériennes : les ulcères sont alors recouverts de croûtes hémorragiques et/ou de matériel purulent (FERNANDEZ-GALLEG0, 2020).

Ces différentes lésions cutanées peuvent apparaître sur tout le corps de l'animal selon un schéma focal, multifocal, régional ou diffus. Certains chats peuvent présenter différents types de lésions cutanées simultanément ou les développer l'une après l'autre ; elles peuvent coexister avec des

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

lésions cutané-muqueuses et muqueuses, souvent à l'origine d'un complexe gingivostomatite et/ou d'une glossite (DOS SANTOS & al, 2021). Des photographies représentant les différentes lésions cutanées évoquées sont disponibles en Figure 13,14



**Figure 11:** Photographies de lésions cutanées et cutané-muqueuses chez des chats atteints de leishmaniose clinique :

**A** - Dermatite nodulaire au niveau des paupières des deux yeux et de la conjonctive de l'œil droit (BRIANTI, 2019) .

**B** - Nodule au niveau de la région carpienne gauche (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020)

**C** - Dermatite ulcéreuse avec lésions au niveau de la truffe, du pavillon auriculaire droit et de la région carpienne gauche (rivas, 2018)

**D**- Lésion ulcéreuse en région temporale droite de la face (AHUIR-BARAJA A. E., 2021)

**E** - Lésion ulcéreuse sur le coussinet métatarsien gauche (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020)

**F** - Stomatite et glossite affectant respectivement les joues et le bord de la langue (PENNISI, 2015)

**G** - Ulcères dans la cavité buccale à l'origine d'un complexe gingivostomatite (DOS SANTOS & al, 2021)

L'alopecie et le prurit sont peu décrits chez le chat infecté et sont souvent expliqués par d'autres maladies cutanées concomitantes telles que la démodécie ou la dermatite allergique aux piqûres de puces (PENNISI, 2015) .

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

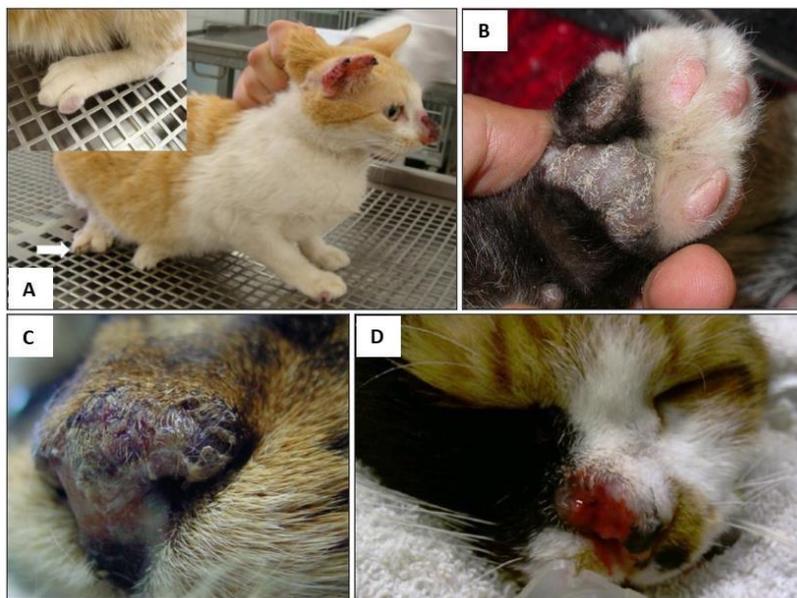
- **Incluant notamment :**

Lésions dermatologiques moins fréquentes sont également rapportées,

- des papules et nodules hémorragiques riches en formes amastigotes de *Leishmania* (PENNISI, 2015) .
- une onychogryphose caractérisée par des griffes anormalement longues, déformées et fissurées, qui est un signe relativement spécifique de leishmaniose canine (HEADLEY, 2019) .
- une dépigmentation au niveau de la truffe .
- une hyperkératose du coussinet plantaire (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

Quelques cas plus rares de leishmaniose féline associés de façon concomitante à d'autres pathologies dermatologiques comme un carcinome épidermoïde invasif ou un pemphigus foliacé ont également été décrits (MAIA, et al., 2015).

Ces différentes lésions sont représentées sur la Figure 14.



**Figure 12:** Photographies de lésions dermatologiques moins fréquemment rapportées chez des chats atteints de leishmaniose clinique.

**A** - Onychogryphose associée à un nodule érythémateux (HEADLEY, 2019)

**B** - Hyperkératose du coussinet plantaire (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020)

**C** - Croûtes, pustules, érythème et dépigmentation de la truffe sur un chat présentant une leishmaniose associée à un pemphigus foliacé (RÜFENACHT, 2005)

**D** - Lésions ulcérées au niveau de la truffe sur un chat présentant une leishmaniose associée à un carcinome épidermoïde (MAIA, et al., 2015)

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

De ce fait, la leishmaniose féline devrait être incluse dans le diagnostic différentiel de nombreuses atteintes dermatologiques. Il est essentiel de ne pas négliger cette étiologie notamment chez un chat présentant des lésions nodulaires et/ou ulcéreuses en région endémique de leishmaniose. D'autre part, en cas de présentation atypique de leishmaniose féline cutanée, il ne faut pas exclure l'implication d'une autre pathologie concomitante.

### **2.2. Atteinte oculaire :**

Les manifestations oculaires de l'affection sont également fréquemment rapportées chez le chat comme chez le chien. Elles se retrouvent chez 20 à 30% des chats atteints de leishmaniose (voir Tableau 7) (PENNISI, 2015)

Les atteintes oculaires les plus fréquentes sont des uvéites uni ou bilatérales, suivie des blépharites (inflammation des paupières) et des panophtalmies (inflammation purulente du globe oculaire) secondaires à des masses nodulaires palpébrales et conjonctivales.

D'autres symptômes variés sont décrits dans la littérature et sont observables sur la Figure 15, tels que des ulcères cornéens pouvant générer une perforation cornéenne, des opacifications de la cornée, des kératites, des conjonctivites possiblement associées à un chémosis (œdème liquidien conjonctival), des chorioretinites ou des glaucomes (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020)



**Figure 13:** Photographies de lésions oculaires chez Des chats atteints de leishmaniose clinique.

A - Uvéite bilatérale avec caillot sanguin (hyphéma) dans la chambre antérieure (PENNISI, 2015)

B - Nodule conjonctival sur la paupière supérieure, uvéite avec précipités kératiques et inflammation de l'iris sur l'œil droit (PIMENTA, et al., 2015)

C - Panuvéite exsudative avec écoulement mucoïde, chémosis et œdème cornéen endothélial diffus, présence d'une ulcération cornéenne stromale derrière la membrane nictitante (LEIVA, 2005)

D - Papules palpébrales, œdème cornéen associé à un chémosis sévère et une conjonctivite proliférative (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

Les analyses histologiques des structures oculaires infectées se sont révélées riches en formes amastigotes du parasite *Leishmania*. Comme chez le chien, le parasite semble surtout se retrouver dans la chambre antérieure de l'œil (HERVÁS, et al., 1999).

### **2.3. Atteinte systémique et viscérale :**

La leishmaniose féline se caractérise par de multiples signes cliniques systémiques et parfois viscéraux répertoriés par fréquence dans le Tableau 6.

Près d'un chat sur deux ayant une expression clinique de leishmaniose présente des signes d'atteinte systémique. Ils sont non spécifiques, souvent associés à une atteinte dermatologique ou oculaire et parfois à une atteinte viscérale, affectant alors le foie, la rate ou la moelle osseuse (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

Le signe clinique systémique le plus souvent rapporté chez le chat comme chez le chien (> 50% des cas) est une adénomégalie focale ou généralisée (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

Par ailleurs, chez 20 à 30% des chats atteints de leishmaniose, il est rapporté un amaigrissement, une dysorexie voire une anorexie, une gingivostomatite, une léthargie ou une déshydratation.

De façon moins fréquente il est également possible d'observer une pâleur des muqueuses, un ictère, une cachexie, une hypo ou hyperthermie, un avortement, un syndrome polyuro- polydipsie, des troubles digestifs (diarrhées, vomissements) ou respiratoires (jetage nasal chronique, dyspnée, éternuements) (PENNISI, 2015).

Enfin, des signes d'atteinte musculosquelettique avec une amyotrophie ; neurologique avec une ataxie ; mammaire avec une mastite ou urogénital avec des saignements vaginaux associés à des ecchymoses ont également été décrits dans la littérature. Cependant, dans certains cas, ils semblent secondaires à des affections concomitantes à la leishmaniose féline (MAIA, et al., 2015)

Toutes les espèces de *Leishmania* affectant le chat peuvent être à l'origine de signes cliniques systémiques. En revanche, l'espèce *L. infantum* semble être majoritairement responsable d'une atteinte viscérale (SIMÕES-MATTOS, 2005).

D'autre part, l'atteinte viscérale engendre une hypertrophie d'un ou plusieurs organes pouvant être expliquée par leur infiltration par les formes amastigotes du parasite, une augmentation des cellules du système phagocytaire mononucléaire ou des modifications structurales. (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

La maladie rénale est en effet une complication reconnue de la leishmaniose canine, causée par le dépôt de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux, engendrant alors une glomérulopathie. Chez le chat, il est difficile de déterminer si les signes d'atteinte rénale objectivés sont secondaires à

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

la leishmaniose, à une maladie rénale chronique concomitante ou à des effets indésirables de traitements contre la leishmaniose ( (BANETH, 2008).

Les signes d'atteinte viscérale sont associés à une forte mortalité, du fait qu'ils sont souvent synonymes de dissémination du parasite au sein de l'organisme (SOARES, 2016).

### **3. Diagnostic de la leishmaniose :**

#### **3.1. Démarche diagnostique clinique :**

Contrairement à l'espèce canine, aucune démarche diagnostique clinique consensuelle n'existe à ce jour pour le chat en cas de suspicion de leishmaniose, seules des recommandations dérivant de celles de l'espèce canine ont été formulées ( (Bourdoiseau & chermette, 2015),

##### **3.1.1. Bilan anamnestic-clinique :**

Dans un premier temps, le bilan anamnestic-clinique doit permettre d'orienter vers l'hypothèse d'une leishmaniose lorsqu'un chat présente un profil épidémiologique et/ou des signes cliniques compatibles avec l'affection.

Les chats atteints cliniquement de leishmaniose sont généralement des chats adultes, vivant en zone endémique ou y ayant circulé, présentant une maladie pouvant générer une dysimmunité ou recevant un traitement immunosuppresseur (PIMENTA, et al., 2015).

Par ailleurs, l'expression clinique de la leishmaniose féline se manifeste par des symptômes très variés avec essentiellement des troubles cutanés, oculaires, systémiques voire viscéraux pour lesquels la leishmaniose doit faire partie du diagnostic différentiel, notamment dans les régions endémiques de la maladie. (PENNISI, 2015)

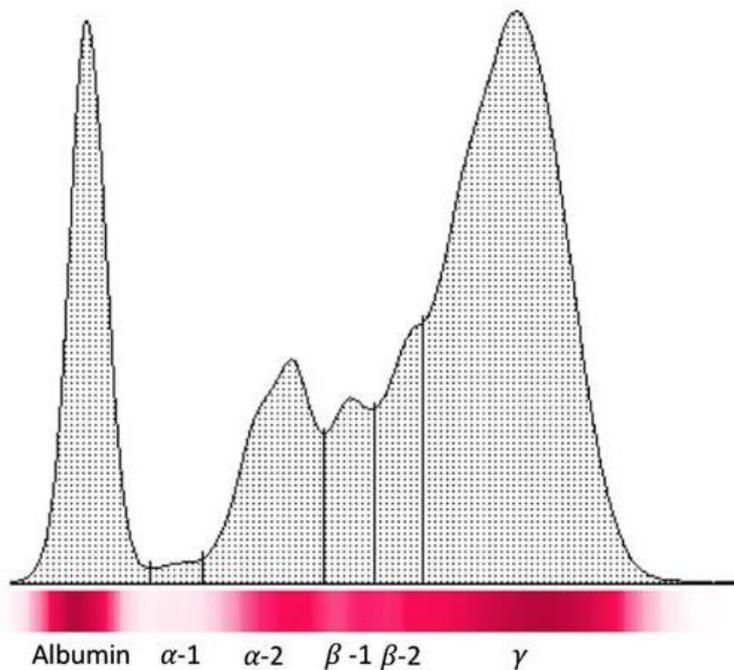
#### **3.2. Anomalies lors d'examens complémentaires :**

Dans un second temps, des examens complémentaires comprenant la biochimie sanguine, la numération formule sanguine, l'électrophorèse des protéines et l'analyse d'urine sont à réaliser : ils peuvent révéler des anomalies paracliniques orientant le diagnostic clinique de manière non spécifique. Chez le chat, les informations concernant ces anomalies sont limitées et se basent surtout sur des rapports de cas (GRAMICCIA, 2011).

L'anomalie la plus fréquemment décrite (plus de 50% des cas) chez le chat comme chez le chien est une hypergammaglobulinémie polyclonale, parfois associée à une hyperprotéïnémie. L'hypergammaglobulinémie polyclonale se retrouve aussi dans le contexte de nombreuses autres maladies inflammatoires, néoplasiques ou à transmission vectorielle chez les chats et n'est donc pas

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

un signe spécifique de leishmaniose. En revanche, le suivi de ce paramètre pourrait avoir un intérêt thérapeutique car il a été constaté une diminution de l'hypergammaglobulinémie en cas de réponse favorable à un traitement après sa mise en place. Ce raisonnement est déjà appliqué chez le chien (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020). Le profil des protéines sériques chez un chat atteint de leishmaniose avec hypergammaglobulinémie et hypoalbuminémie engendrant une inversion du rapport albumine sur globulines est observable en figure 16.



**Figure 14:** Profil de protéines sériques d'un chat atteint cliniquement de leishmaniose, obtenu par électrophorèse sur acétate de cellulose (BRIANTI, 2019).

Récemment, des études ont montré que des taux élevés d'amyloïde A et d' $\alpha$ -2 globulines associés à une hypergammaglobulinémie pourraient être de bons indicateurs de la maladie chez les chats (Savioli, 2021).

La seconde anomalie paraclinique la plus fréquente lors de leishmaniose féline est une anémie normochrome normocytaire non régénérative modérée à sévère, observée à la numération formule sanguine dans 25 à 50% des cas. Une pancytopenie (anémie, leucopénie et thrombopénie) modérée à sévère est rapportée dans moins de 25% des cas chez des chats présentant le FIV de façon concomitante à la leishmaniose, sans qu'il soit possible de déterminer à quelle affection est due la pancytopenie. A l'analyse d'urine, il est possible d'objectiver dans moins de 25% des cas une protéinurie associée ou non à une azotémie d'origine rénale, Ces résultats sont compatibles avec une maladie rénale aiguë ou chronique, complication possible de la leishmaniose du fait de dépôts de complexes immuns au niveau des glomérules rénaux (FERNANDEZ-GALLEGO, 2020).

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

La fréquence de la plupart des anomalies paracliniques pouvant être retrouvées chez le chat atteint de leishmaniose est présentée dans le Tableau 7.

**Tableau 7:** Fréquence de plusieurs anomalies paracliniques retrouvées sur des chats atteints cliniquement de leishmaniose féline (PENNISI, 2015)

Fréquence des signes cliniques observés (%)		
< 50% des cas	25 – 50% des cas	< 25% des cas
<b>Hypergammaglobulinémie</b>	<b>Anémie normochrome normocytaire non régénérative modérée à sévère</b>	<b>Hypoalbuminémie Leucocytose Leucopénie Thrombocytopénie Pancytopénie Protéinurie Azotémie d'origine rénale</b>

Si le bilan anamnestic-clinique et paraclinique est en faveur d'une forte suspicion de leishmaniose féline, il convient alors de réaliser des examens complémentaires spécifiques permettant d'établir le diagnostic final.

### **3.3. Méthodes de diagnostic étiologique :**

Il existe plusieurs méthodes diagnostiques afin de mettre en évidence la présence du parasite *Leishmania* spp. Au sein de l'organisme.

#### **3.3.1. Méthodes de diagnostic direct :**

Les méthodes diagnostiques directes visent à mettre en évidence la forme amastigote du parasite ou ses composants. Cela nécessite donc de réaliser un prélèvement adapté, c'est-à-dire habituellement

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

ciblé par le parasite afin d'augmenter la sensibilité du test diagnostique. Il n'y a pas de consensus sur l'échantillon biologique idéal à prélever dans le cadre d'un diagnostic cytologique ou moléculaire de leishmaniose féline (COSTA-VAL, 2020.).

Chez le chat, les formes amastigotes de *Leishmania* sont surtout retrouvées dans les macrophages des nœuds lymphatiques, de la moelle osseuse, de la peau, des muqueuses buccales, des structures oculaires et parfois du foie, de la rate, de l'estomac, des intestins ou des reins. A l'inverse, elles ont rarement été observées sur des prélèvements effectués à partir de sang total, de buffy coat (couche leucocytaire correspondant à la fraction d'un échantillon de sang non coagulé après centrifugation) ou d'urines (GRAMICCIA, 2011)

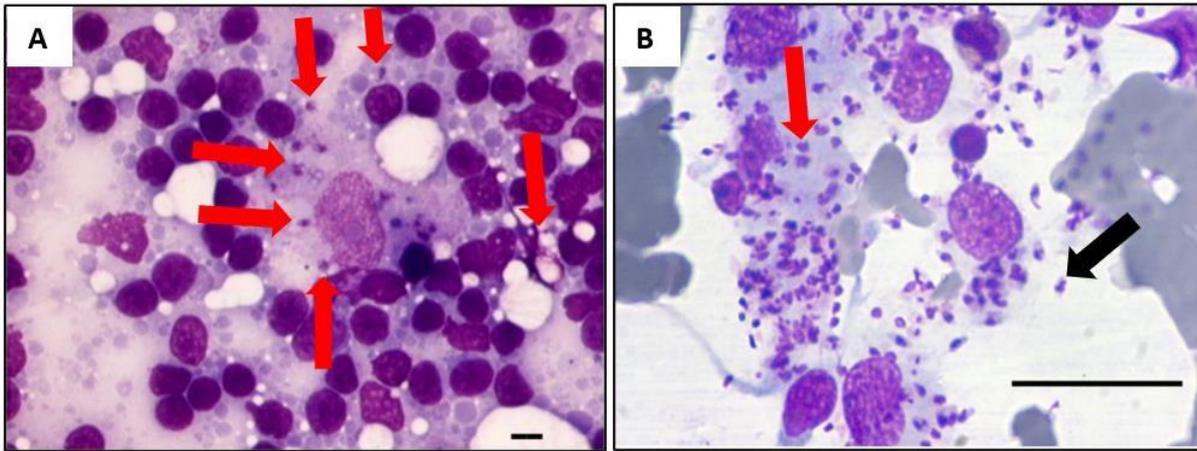
### **A. Cytologie :**

La cytologie permet de mettre en évidence la présence d'amastigotes en quantité variable sur des lames colorées correspondant à des étalements de tissus ou liquides biologiques. Elle est particulièrement indiquée chez les chats présentant des lésions dermatologiques nodulaires ou ulcéreuses et/ou une adénomégalie focale ou généralisée (Pereira, Maia 2021).

Les prélèvements sont réalisés de manière peu invasive par cytoponction à l'aiguille fine au niveau des lésions nodulaires ou des nœuds lymphatiques ; raclage ou calque cutané sur les lésions ulcéreuses et croûteuses. Une ponction de moelle osseuse ou d'autres organes sous anesthésie générale est également réalisable (SOARES, 2016).

La coloration classiquement utilisée pour la lecture des lames est celle de May-Grünwald Giemsa (abrégée MGG) et la lecture des lames se fait au microscope optique avec un objectif de grossissement x 1 000. Les préparations cytologiques compatibles avec une leishmaniose féline présentent généralement une composition cellulaire caractérisée par une inflammation pyogranulomateuse, granulomateuse ou lymphoplasmocytaire. Chez le chat comme chez le chien, une hyperplasie lymphoïde est fréquemment rencontrée dans les nœuds lymphatiques infectés par *L. infantum*. Les formes amastigotes peuvent aussi être observées en position extracellulaire après l'éclatement de leurs cellules hôtes, ce phénomène est visible sur la Figure 17.

## Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat



**Figure 15:** Photographies de lames cytologiques au microscope optique permettant le diagnostic de leishmaniose féline (PENNISI, 2015).

**A** - Cytoponction à l'aiguille fine d'un nœud lymphatique de chat atteint de leishmaniose. Coloration MGG, échelle : 20µm ;

**B** - Cytoponction à l'aiguille fine d'un nodule palpébral sur un chat atteint de leishmaniose, échelle : 30µm  
Des formes amastigotes de *Leishmania* sont retrouvées à la fois dans les macrophages (flèches rouges) et en position extra-cellulaire (flèche noire).

La cytologie est une méthode rapide, peu coûteuse et très spécifique, permettant d'établir un diagnostic de certitude. En revanche, sa sensibilité varie selon la nature du prélèvement réalisé, la charge parasitaire sur l'échantillon prélevé, la qualité de l'étalement et la qualité de la lecture, nécessitant un opérateur qualifié (Chatzis, octobre 2020)

### **B. Histologie et immunohistochimie :**

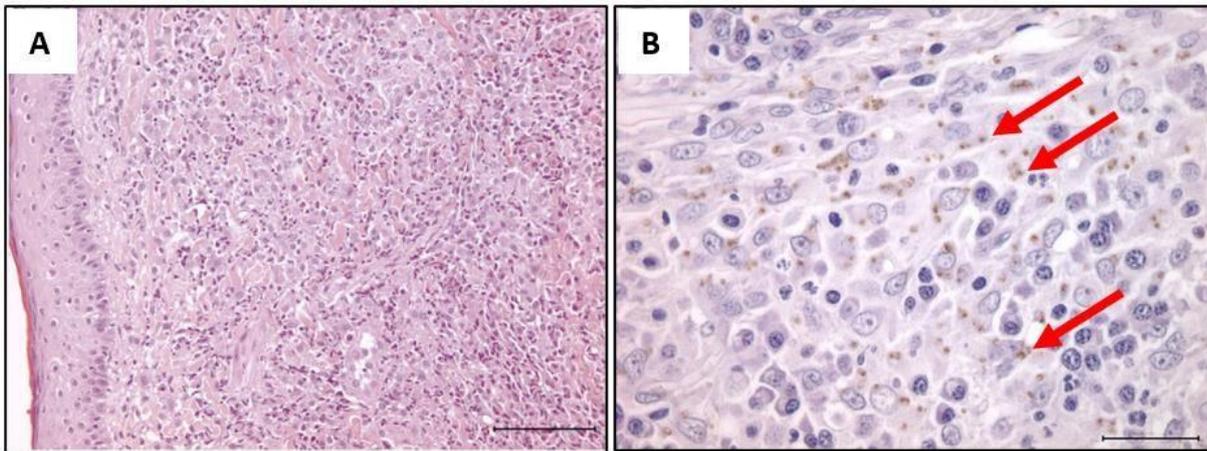
L'histologie permet de détecter la présence de formes amastigotes de *Leishmania* sur des lames colorées correspondant à des étalements issus de biopsies chirurgicales de tissus.

Cette technique de diagnostic est d'une part plus invasive que la cytologie et requiert d'autre part davantage de temps pour permettre la lecture des lames : en effet, les tissus prélevés doivent d'abord être traités avant d'être colorés (généralement avec la coloration MGG ou à l'hématoxyline-éosine) puis observés.

Comme lors de l'examen cytologique, les tissus infiltrés par le parasite, observables sur la Figure 15, présentent une composition histologique caractéristique d'une inflammation granulomateuse ou pyogranulomateuse. Les formes amastigotes sont visualisées dans des vacuoles rondes au sein de macrophages ou plus rarement de neutrophiles. Il est aussi possible d'observer des formes amastigotes extracellulaires en cas de nécrose des tissus environnants (NAVARRO, 2010)

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

L'immunohistochimie est une méthode qui permet d'augmenter la sensibilité de l'histologie. Elle permet de localiser certaines protéines dans les cellules d'une coupe de tissu grâce à des anticorps spécifiques d'antigènes, capables de catalyser une réaction chimique produisant de la couleur ou marqués par un fluorochrome. Cela permet alors de colorer les formes amastigotes de *Leishmania* et d'estimer leur nombre de façon semi-quantitative, comme cela est visible sur la Figure 18.



**Figure 16:** Photographies de lames histologiques réalisées à partir de biopsies d'un nodule cutané chez un chat atteint de leishmaniose (PENNISI, 2015)

**A** - Inflammation granulomateuse diffuse avec présence de macrophages, lymphocytes et plasmocytes. Coloration à l'hématoxyline-éosine, échelle : 100mm ;

**B** - Coupe histologique d'un nodule cutané montrant un nombre modéré de formes amastigotes de *Leishmania* dans le cytoplasme de nombreux macrophages, indiquées par les flèches rouges. Coloration par immunohistochimie, échelle : 30µm

### **C. Culture parasitaire :**

La culture parasitaire consiste à mettre en culture sur un milieu adapté un échantillon infecté par le parasite afin de permettre la multiplication de ce dernier.

C'est une méthode très spécifique permettant d'identifier l'espèce de *Leishmania* en cause. Cependant, elle est aussi très chronophage avec une durée d'incubation pouvant atteindre 30 jours et est donc uniquement destinée aux travaux de recherche en laboratoire (SOARES, 2016)

Chez le chat, des parasites ont pu être isolés à partir de sang total, lésions nodulaires, rate, nœuds lymphatiques et moelle osseuse. Il est conseillé de choisir un échantillon susceptible d'être infecté et de présenter une forte charge parasitaire afin d'augmenter la sensibilité de cette méthode diagnostique, qui est généralement assez faible. Les échantillons de sang sont considérés comme présentant une mauvaise sensibilité, avec un parasitisme transitoire ou faible (Martín-sánchez, et al., 30 avril 2007).

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

### **D. Biologie moléculaire :**

Les tests de biologie moléculaire sont des tests de réaction de polymérisation en chaîne, abrégés PCR, largement utilisés pour le diagnostic de la leishmaniose canine comme féline. Ils permettent d'amplifier de manière exponentielle un fragment d'ADN spécifique du parasite afin de pouvoir le détecter puis l'étudier. Cette technique permet de caractériser l'espèce de *Leishmania* en cause. Plusieurs séquences cibles du parasite *Leishmania* peuvent être répliquées, la plus fréquemment utilisée et considérée comme la plus sensible correspond à l'ADN kinétoplastique en mini-cercle du parasite (BASSO, et al., 2016)

On distingue la PCR traditionnelle de la PCR quantitative et la PCR nichée. La PCR quantitative ou PCR en temps réel, abrégée qPCR permet une analyse quantitative des parasites dans l'échantillon étudié, rendant la méthode diagnostique plus sensible et précise. Chez le chien, le seuil de détection de la qPCR est inférieur à 1 parasite/mL ; celui de la PCR traditionnelle est de plus de 30 parasites/mL. Ces seuils ne sont pas encore déterminés précisément chez le chat (MIRÓ, 2008).

La qPCR permet également d'assurer un suivi thérapeutique chez le chien afin de vérifier si une diminution de la charge parasitaire a lieu avec la mise en place d'un traitement adapté

La PCR nichée, appelée nested-PCR en anglais, permet de limiter l'amplification de segments non spécifiques pouvant survenir accidentellement avec la PCR traditionnelle, rendant donc la méthode diagnostique plus spécifique (PENNISI, 2015).

Les tests PCR sont plus sensibles et spécifiques que la plupart des autres méthodes diagnostiques, notamment la cytologie, l'histologie ou les méthodes sérologiques. Ainsi, un même échantillon peut revenir négatif aux examens cytologiques et histologiques et être positif par PCR. Il existe cependant des faux-positifs liés à des réactions croisées au niveau de l'ADN, notamment rapportées avec *Trypanosoma* spp. (SILVEIRA NETO, et al., 2015).

Chez le chat, de l'ADN de *Leishmania* spp. a aussi pu être identifié par PCR à partir de frottis conjonctival et oral, de tissu nasal, de foie, de reins et de liquide mammaire (COSTA-VAL, 2020.). Enfin, les tests PCR sont très utiles pour mettre en évidence l'infection chez les animaux asymptomatiques. En effet, un résultat positif par PCR signifie que l'ADN de *Leishmania* spp. est présent dans l'échantillon étudié, il indique donc l'infection par le parasite mais ne renseigne pas sur le caractère actif ou non de cette infection : la PCR ne permet pas de déterminer si le parasite est vivant et capable de se multiplier ou non (GRAMICCIA, 2011).

### **3.3.2. Méthodes de diagnostic indirect :**

#### **a. Sérologie :**

Les méthodes sérologiques sont nombreuses et consistent à rechercher chez un individu la présence d'anticorps (essentiellement les immunoglobulines G, abrégées IgG) dirigés spécifiquement contre *Leishmania* spp. (SOLANO-GALLEGO, et al., 2007)

Afin de fixer ces anticorps, des antigènes bruts du parasite issu de cultures parasitaires ou des antigènes purifiés sont utilisés. Le titre en anticorps désigne la plus grande dilution pour laquelle le sérum d'un individu fournit toujours une réponse positive au test sérologique. Une sérologie est considérée comme significative lorsque le titre en anticorps obtenu dépasse une valeur seuil fixée, différente selon la méthode sérologique utilisée, et pouvant varier en fonction du laboratoire réalisant l'analyse (PERSICHETTI, et al., 2018)

Les protocoles utilisés chez le chat sont dérivés de ceux employés pour l'espèce canine mais ne sont cependant pas encore standardisés pour le diagnostic de la leishmaniose féline. De ce fait, plusieurs enquêtes épidémiologiques s'appuyant sur différentes méthodes sérologiques ont révélé des séroprévalences très variables de leishmaniose féline dans les pays méditerranéens, allant d'environ 1 à 60%. Les valeurs seuils choisies, différentes d'une enquête épidémiologique à l'autre pour une même méthode sérologique, sont probablement l'un des facteurs impactant le plus cette différence de prévalence observée et reflètent le manque de standardisation dans la technique utilisée pour la détection d'infection à *Leishmania* spp. Chez le chat (GRAMICCIA, 2011)

La spécificité et la sensibilité des méthodes sérologiques varient selon le test utilisé, la valeur seuil fixée et l'antigène choisi.

Ainsi, il est essentiel d'interpréter les résultats des tests sérologiques avec prudence et de les confronter aux résultats d'autres examens diagnostiques (PENNISI, 2015).

Un résultat sérologique négatif ou douteux lors d'une forte suspicion clinique de leishmaniose ne permet pas d'exclure l'hypothèse de l'affection : en effet, le risque de faux-négatifs n'est pas négligeable et d'autres examens diagnostiques doivent être menés.

De même, un résultat sérologique positif est toujours à confronter au contexte clinique et à conforter avec la réalisation d'autres examens diagnostiques. En effet, des faux-positifs peuvent être la conséquence de réactions croisées lors de la réalisation des tests sérologiques, notamment avec d'autres parasites comme *Trypanosoma* spp. ou entre les différentes espèces de *Leishmania* en raison de leur proximité phylogénétique (GRAMICCIA, 2011).

Par ailleurs, il est important de rappeler que chez le chien comme chez le chat, la présence d'anticorps anti-*Leishmania* à elle seule ne permet pas de conclure à une infection à *Leishmania*, elle peut

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

simplement refléter une exposition au parasite (MAIA, et al., 2015)

Il a en revanche été observé que les chats atteints cliniquement de la leishmaniose présentent souvent une concentration plus importante en anticorps spécifiques que les chats asymptomatiques. De même, un traitement spécifique conduit fréquemment à une diminution significative du titre en anticorps dirigés contre *Leishmania* et une rechute clinique se manifeste par une nouvelle augmentation du titre en anticorps (PERSICHETTI, et al., 2018).

### □ **Immuno Fluorescence Antibody Test (IFAT)**

La méthode sérologique la plus fréquemment utilisée pour le diagnostic de la leishmaniose est le test de détection des anticorps par immunofluorescence, abrégée IFAT (pour ImmunoFluorescence Antibody Test en anglais). Elle permet de mettre en évidence un anticorps spécifique dirigé contre *Leishmania* par l'utilisation d'un conjugué fluorescent.

En raison de sa sensibilité et sa spécificité très élevées (respectivement 96% et 98%), il s'agit de la méthode de référence pour le dépistage de la leishmaniose chez l'Homme et le chien. Une étude menée en 2020 a également validé l'IFAT comme étant un test précis pour évaluer l'exposition des chats à *L. infantum* (MAIA, et al., 2015).

### □ **Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

La méthode sérologique de dosage immuno-enzymatique sur support solide, abrégée ELISA (pour Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay en anglais) est également fréquemment employée.

Il existe plusieurs protocoles ELISA mais dans le cadre du diagnostic de la leishmaniose, ce sont généralement des tests ELISA indirects qui sont utilisés : un antigène spécifique de *Leishmania* est placé au fond du puits de la microplaque et sera reconnu par les anticorps spécifiquement dirigés contre le parasite s'ils sont présents. Un anticorps secondaire, conjugué à une enzyme ou un conjugué fluorescent, va ensuite se fixer de façon spécifique sur l'anticorps primaire s'il est présent, permettant de visualiser une coloration.

Les valeurs d'un test ELISA correspondent à des valeurs d'absorbance, appelées « valeurs d'unités ELISA ». La valeur seuil recommandée pour le diagnostic de la leishmaniose féline est de 40 unités ELISA : si un chat présente une réaction sérologique positive au-dessus de ce seuil, il est considéré comme infecté ou ayant été infecté par le parasite (PERSICHETTI, et al., 2018).

Différents antigènes peuvent être utilisés pour être fixés au fond des puits du test notamment des antigènes bruts du parasite issu de cultures parasitaires ou des antigènes recombinants, plus

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

spécifiques mais plus difficiles à obtenir.

Le test ELISA est donc une méthode sérologique rapide dont la sensibilité et la spécificité dépendent en grande partie de la valeur seuil fixée et de l'antigène utilisé ; certaines études jugent cette méthode plus sensible que l'IFAT (PENNISI, 2015).

### **b. Western Blot (WB) :**

La méthode sérologique de transfert de protéines, abrégée WB (pour Western Blot en anglais) permet de détecter des antigènes protéiques spécifiques sur une membrane en fonction de leur poids moléculaire.

Plusieurs antigènes différents peuvent être fixés sur la membrane de migration d'électrophorèse, ce sont généralement les mêmes que ceux utilisés pour les tests ELISA. Des réactions croisées non spécifiques sont également décrites lors de la réalisation de ce test.

Les résultats sont fournis sous forme de bandes de différents poids moléculaires. La limite entre les bandes de bas poids moléculaire et celles de haut poids moléculaire est fixée à 31 kiloDalton (abrégé kDa). Les chats atteints de leishmaniose présentent des bandes de bas poids moléculaire et la présence d'une bande à 18 kDa serait spécifique de l'espèce *L. infantum*. , C'est une méthode qualitative qui offre une meilleure sensibilité (97%) et spécificité (99%) que l'ELISA ou l'IFAT mais qui est principalement destinée à la recherche de par sa difficulté de réalisation. (PERSICHETTI, et al., 2018).

### **c. Test d'agglutination directe (DAT) :**

Le test d'agglutination directe, abrégé DAT (pour Direct Agglutination Test en anglais), consiste à mettre en contact des antigènes spécifiques avec le sérum de l'animal testé : si des anticorps dirigés contre *Leishmania* sont contenus dans le sérum, ils vont réagir avec les antigènes en formant un agglutinat.

Les valeurs d'un DAT sont des facteurs de dilution sérique. La valeur seuil recommandée pour le diagnostic de la leishmaniose féline d'après le groupe LeishVet est une dilution sérique de 1 : 800. Cela signifie que lorsqu'un chat présente une réaction sérologique positive avec ce facteur de dilution, il est considéré comme étant infecté ou ayant été infecté par le parasite (AHUIR-BARAJA R. M., 2021).

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

### **d. Autres méthodes :**

D'autres méthodes sérologiques pour dépister la leishmaniose féline existent de manière anecdotique et ne sont pas utilisées en pratique vétérinaire de routine, comme le test d'hémagglutination indirecte, le test cutané aussi appelé test de Montenegro ou encore la mesure de l'IFN- $\gamma$  (MAIA, et al., 2015)

## Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat

### 3.4. Proposition d'approche diagnostique :

En 2021, le groupe LeishVet a créé une approche diagnostique simplifiée pour le diagnostic de la leishmaniose féline, indiquant l'ordre des différents examens diagnostiques ainsi que leur interprétation, représentée dans la Figure 16. Cette approche a pour objectif d'aiguiller le clinicien dans sa démarche diagnostique face à une suspicion de leishmaniose féline ou dans le contexte de chats cliniquement sains utilisés comme donneurs de sang ou à des fins de reproduction. Elle doit ensuite être adaptée à chaque patient.

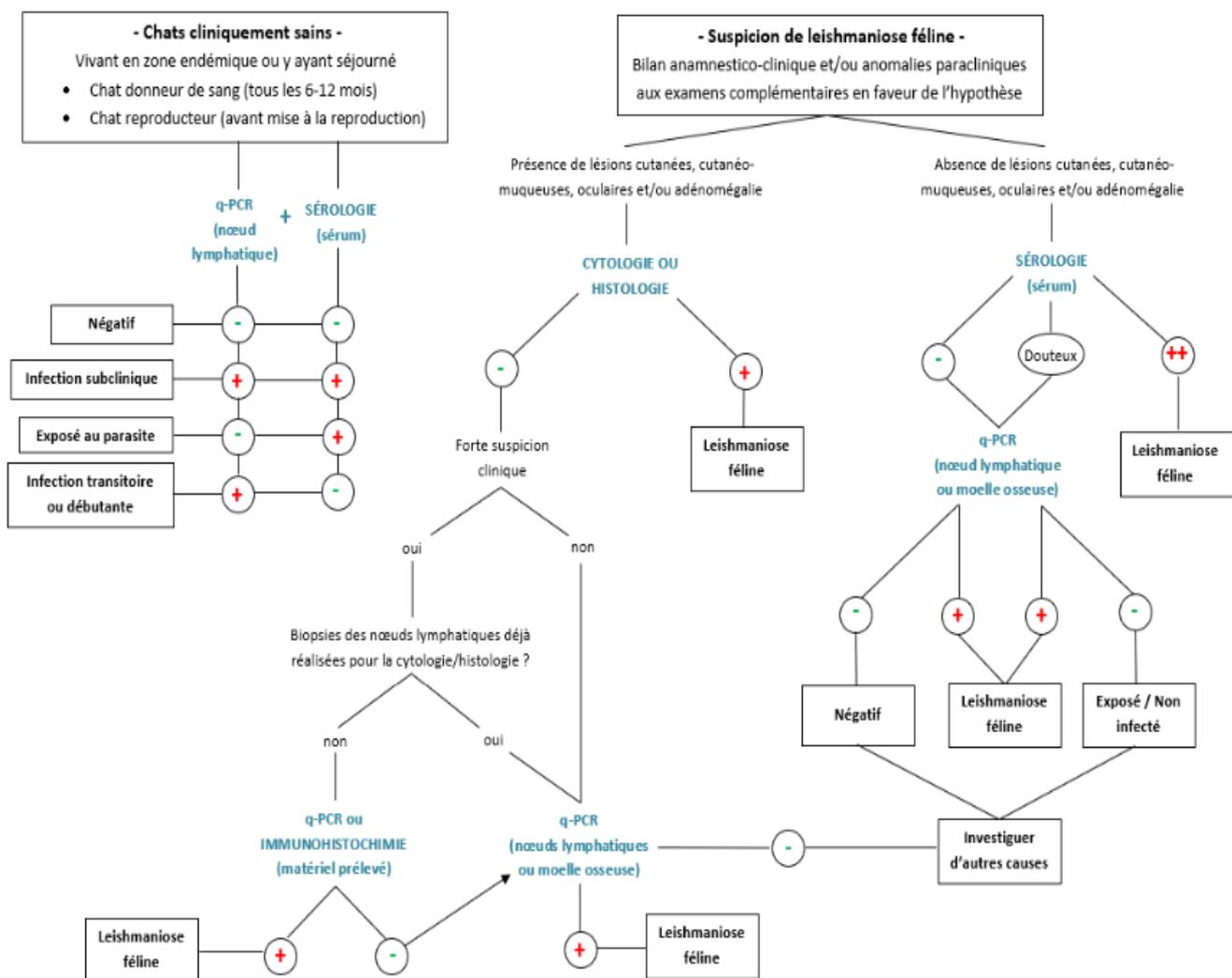


Figure 17: Proposition d'approche diagnostique de la leishmaniose féline (PEREIRA & MAIA, 2021).

Il est important de rappeler que les méthodes sérologiques telles que l'IFAT ou l'ELISA conduisant à un résultat positif doivent être idéalement complétées et suivies de méthodes diagnostiques directes

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

comme la cytologie, l'histologie ou les tests de biologie moléculaire par PCR afin de confirmer définitivement l'hypothèse de leishmaniose.

D'autre part, la combinaison de méthodes sérologiques et moléculaires aboutit parfois à des résultats non concordants pouvant être interprétés de la manière suivante (MORGANTI, et al., 2019).

- - Un chat positif à la sérologie mais négatif au test moléculaire témoigne d'une exposition au parasite *Leishmania* suivie d'une guérison parasitologique et du développement d'une réponse immunitaire à médiation humorale détectée par la sérologie.
- - Un chat négatif à la sérologie mais positif au test moléculaire témoigne d'une infection transitoire avec un chat résistant à l'infection ou d'un stade débutant d'infection.

### **4. Traitement de la leishmaniose, suivi et pronostic :**

#### **4.1 Prise en charge thérapeutique :**

Tout comme chez le chien, la mise en place d'un traitement efficace chez le chat peut conduire à une diminution voire une résolution des signes cliniques associés à la maladie ainsi qu'à une réduction de la charge parasitaire et du titre en anticorps dirigés contre *Leishmania* mais ne permet pas l'élimination totale du parasite (PEREIRA & MAIA, 2021)

Plusieurs schémas thérapeutiques, dérivant de ceux utilisés chez le chien, ont été utilisés de façon empirique. Une liste non exhaustive de ces derniers est répertoriée dans le Tableau 8.

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

**Tableau 8:** Protocoles thérapeutiques employés sur des chats atteints de leishmaniose :

PO : per os, par voie orale ; SC : voie injectable sous-cutanée ; IM : voie injectable intra-musculaire

Traitement et Dosage	Durée de traitement	Référence
Allopurinol 10-15mg/kg/12h PO	2 à 3 mois	(LEIVA, 2005)
Allopurinol 20mg/kg/24h PO	15 mois 7 mois	(PENNISI, 2015)
Allopurinol 50mg/chat/12h PO	12 mois	(fernandez-gallego, et al., 2020)
Allopurinol 100mg/chat/24h PO	4 mois	(POCHOLLE, et al., 2012)
Allopurinol 10mg/kg/12h ou 24h PO Antimoniote de méglumine 50mg/kg/24h SC	Long terme 30 jours	(PIMENTA, et al., 2015)
Allopurinol 10mg/kg/12h PO Miltéfosine 2mg/kg/24h PO	Long terme 28 jours	(fernandez-gallego, et al., 2020)
Antimoniote de méglumine 50mg/kg/24h SC	25 jours	(LEAL, et al., 2018)
Antimoniote de méglumine 175mg/chat/48h IM	55 jours	(DURÃO, 1994)
Antimoniote de méglumine 300mg/chat/24h SC	4 mois	(FERNANDEZ-GALLEGO, 2020)
Antimoniote de méglumine 5mg/kg/24h SC Kétoconazole 10mg/kg/24h PO	3 cycles de 4 Semaines à 10 jours D'intervalle	(HERVÁS, et al., 1999)
Miltéfosine 2mg/kg/24h PO	28 jours	(LEAL, et al., 2018)
Domperidone 0,5mg/kg/24h PO	1 mois	(MAIA, et al., 2015)
Fluconazole 5mg/kg/24h PO	2 mois	(PENNISI, 2015)
Spiramycine 150 000 UI/kg/24h PO Métronidazole 25mg/kg/24h PO	35 jours	(PENNISI, 2015)
Itraconazole 50mg/chat/24h PO	2 mois	(PENNISI, 2015)

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

### **4.2 Suivi thérapeutique :**

Au vu du peu d'informations disponibles concernant les traitements de la leishmaniose féline, un suivi clinique, biologique et sérologique régulier de l'animal sous traitement est essentiel. Le propriétaire doit également être informé des signes de rechute afin de présenter son animal au plus vite en cas de suspicion de rechute.

Le groupe LeishVet a émis plusieurs recommandations concernant le suivi thérapeutique d'un chat traité avec de l'allopurinol ou de l'antimoniote de méglumine. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 9.

**Tableau 9:**Recommandations du groupe LeishVet concernant le suivi des chats traités contre la leishmaniose (Bourdoiseau & chermette, 2015).

Nature de l'examen	Fréquence
<b>Examen clinique</b>	<b><u>Le premier mois de traitement</u> : chaque</b>
<b>Numération</b>	<b>semaine pour l'antimoniote de méglumine ;</b>
<b>formule sanguine</b>	<b>tous les 15 jours pour l'allopurinol</b>
<b>Biochimie sanguine</b>	
<b>Analyse d'urine avec rapport</b>	<b><u>La première année ou après l'arrêt du</u></b>
<b>protéines</b>	<b><u>traitement</u> : tous les 3 mois</b>
<b>sur créatinine urinaires (abrége</b>	
<b>RPCU)</b>	<b><u>Après la première année</u> : tous les 6 mois</b>
	<b><u>La première année ou après l'arrêt du</u></b>
<b>Sérologie +/- PCR</b>	<b><u>traitement</u> : tous les 3 mois</b>
	<b><u>Après la première année</u> : tous les 6 mois</b>

### **4.3. Pronostic :**

Une fois le diagnostic de leishmaniose établi, un pronostic peut être prononcé.

Chez le chien, la sévérité de l'affection est gradée en 4 stades cliniques selon l'examen clinique, biologique et sérologique de l'animal, permettant ainsi d'émettre un pronostic individuel selon le degré de gravité de l'affection.

D'après le groupe LeishVet, l'espérance de vie d'un chat atteint de leishmaniose est généralement bonne, de l'ordre de plusieurs années après le diagnostic en l'absence de facteurs aggravants. La

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

présence d'infections virales concomitantes telles que le FIV ou le FeLV ne semble pas influencer le pronostic (PENNISI, 2015).

En revanche, l'euthanasie de l'animal peut être envisagée dans certains cas, notamment en présence de facteurs aggravants tels qu'une insuffisance rénale évolutive et/ou réfractaire au traitement, une anémie arégénérative irréversible, une panleucopénie, une atteinte viscérale, une néoplasie, une situation de rechute clinique péjorative pour l'animal ou si une personne immunodéprimée se trouve dans l'entourage proche de l'animal. Elle est alors décidée par les propriétaires et exécutée par le praticien. Il existe également de rares cas où le chat atteint de leishmaniose meurt d'une forme aiguë atypique. (Bourdoiseau & chermette, 2015)

Une étude menée en 2016 sur un effectif de 14 chats malades n'avait pas montré de différence significative sur l'espérance de vie des chats selon qu'ils soient traités ou non contre la leishmaniose (PENNISI, 2015).

Une seconde étude plus récente, combinant un total de 63 cas cliniques, a révélé que l'espérance de vie des chats traités contre la leishmaniose était significativement plus longue que celle des chats non traités, avec un temps de survie moyen respectivement de 520 et 210 jours (GARCIA-TORRES, 2022). Ainsi, le traitement contre la leishmaniose féline devrait toujours être tenté : il peut permettre d'offrir une meilleure qualité de vie à l'animal via la résolution clinique de l'affection tout en engendrant une diminution significative de sa charge parasitaire, ce qui permet de réduire l'effet réservoir de *Leishmania* spp. Pour les phlébotomes naïfs (BRIANTI, 2019).

### **4.4. Prophylaxie :**

La leishmaniose est une maladie zoonotique vectorisée en voie d'expansion représentant un enjeu majeur en médecine humaine comme vétérinaire. Dans les zones endémiques, les chats sont fréquemment exposés aux piqûres de phlébotomes, ce qui est associé à un risque accru d'infection à *Leishmania* spp. (PEREIRA & MAIA, 2021)

Ainsi, afin de diminuer la prévalence de l'infection et le risque de développer la maladie clinique chez le chat, plusieurs stratégies préventives dérivant de celles recommandées pour le chien ont été mises en place. (PENNISI, 2015)

#### **a) Mesures préventives thérapeutiques :**

Afin de lutter contre les phlébotomes, des insecticides et répulsifs de la famille des pyréthrinés et des pyréthrinoïdes sont fréquemment utilisés.

Les pyréthrinoïdes sont des dérivés de synthèse de la famille des pyréthrinés qui ont une activité insecticide : ces molécules déclenchent une ouverture des canaux sodiques membranaires, provoquant

## *Étude Clinique et diagnostic de la leishmaniose chez le chat*

une dépolarisation des cellules nerveuses du phlébotome aboutissant à sa mort si la quantité de produit appliquée est suffisante. Il s'agit de la meilleure stratégie de prévention contre la leishmaniose chez le chien (PENNISI, 2015).

### **b) Mesures préventives hygiéniques :**

D'autres mesures préventives non chimiques existent, notamment des mesures hygiéniques employées dans le but de limiter la rencontre entre le chat et le phlébotome.

Il est par exemple conseillé de garder les chats en intérieur strict durant les périodes d'activité des phlébotomes, du soir au petit matin essentiellement pendant les mois de mai à octobre et de restreindre leur accès aux lieux présentant des conditions favorables à la présence de phlébotomes : murs en pierre sèche, lieux abrités et humides (ROCHA, et al., 2019).

Cependant, pour des raisons évidentes, il est très difficile de faire respecter ce genre de mesures aux propriétaires.

# **Partie expérimentale**

# **CHAPITRE I :**

# **Matériel et méthodes**

## *Matériel et méthodes*

### **1. Lieu et durée d'étude :**

Notre étude a été réalisée au sein du service de pathologie des carnivores de l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Tiaret, sur une période allant de septembre 2023 à juin 2024.

L'objectif principal de cette recherche est de diagnostiquer des cas cliniques de leishmaniose chez des chats présentés pour divers motifs pathologiques. Nous avons examiné 1451 chats de différentes races, des deux sexes, et d'un âge compris entre 2 mois et 9 ans. Le diagnostic clinique est associé à une ponction des ganglions lymphatiques et/ou à un prélèvement de moelle osseuse pour un examen cytologique. Ainsi, nous avons répertorié les cas confirmés de leishmaniose féline, ce qui nous a permis d'établir un état des lieux sur l'incidence de cette pathologie chez l'espèce féline.

### **2. Démarche clinique :**

Tout d'abord, dès leur arrivée, les animaux ont été soumis à un examen clinique approfondi. Nous avons rédigé une fiche d'examen clinique afin d'évaluer l'état de chaque système et de collecter un maximum d'informations cliniques pour établir un diagnostic précis. Une fois la leishmaniose est suspectée cliniquement, une ponction des ganglions lymphatiques et/ou un frottis sanguin sont réalisés immédiatement.

## *Matériel et méthodes*

Tableau 10: Cas étudiés

Cas	Date de réception	Age	Sexe	Motif de consultation	Diagnostic clinique
1.	11/03/24 13/03/24	9ans	♀	Anorexie, diarrhée	Typhus
2.	13/02/24	13mois	♂	Dermatose	Pyodermite
3.	12/03/24	3ans	♂	Dermatose	Eczéma +pyodermite
4.	20/11/23	5ans	♂	Gangrène buccale	Granulome éosinophile
5.	04/03/24	1ans	♂	Anorexie	Suspicion felv
6.	07/12/23	3ans	♂	Anorexie, asthénie	Calcivirus, dermatose faciale
7.	20/03/24	5mois	♂	Hypersalivation, crises, amaigrissement.	Crise épileptiforme, muqueuse ictérique.
8.	13/02/24	4ans	♀	Abcès buccal	Granulome inflammatoire
9.	15/02/24	6mois	♀	Masse abdominale	Mastose, abcès abdominale
10.	15/02/24	18mois	♂	Anorexie	Coryza
11.	28/02/24	1ans	♂	Diarrhée, vomissement	Typhus, parasitisme
12.	28/02/24	2ans	♂	Lésion buccal	Granulome inflammatoire
13.	5/03/24	6mois	♂	AVP	Fracture multiples
14.	18/04/24	4mois	♀	Dysorexie, vomissements	Parasitisme, indigestion

### *Matériel et méthodes*

<b>15.</b>	08/02/24	6ans	♀	Masse dans l'œil droit	Kyste au-dessus de l'œil droit
<b>16.</b>	18/04/24	3ans	♀	Masse mammaire	Mastose
<b>17.</b>	18/04/24 21/03/24	4ans	♀	Problèmes dentaire et dermique	Carrie dentaire Sus leishmaniose
<b>18.</b>	28/05/24	4ans	♀	Lésion oculaire	Conjonctivite traumatique
<b>19.</b>	30/04/24	3ans	♂	Tuméfaction MAG	Abcès MAG
<b>20.</b>	25/04/24	5ans	♀	Problème dermique, avec une cécité brutale	Dermatose, leishmaniose
<b>21.</b>	16/04/24	2ans	♂	AVP	SQC
<b>22.</b>	29/05/24	3ans	♂	Inappétence, amaigrissement	Parasitisme

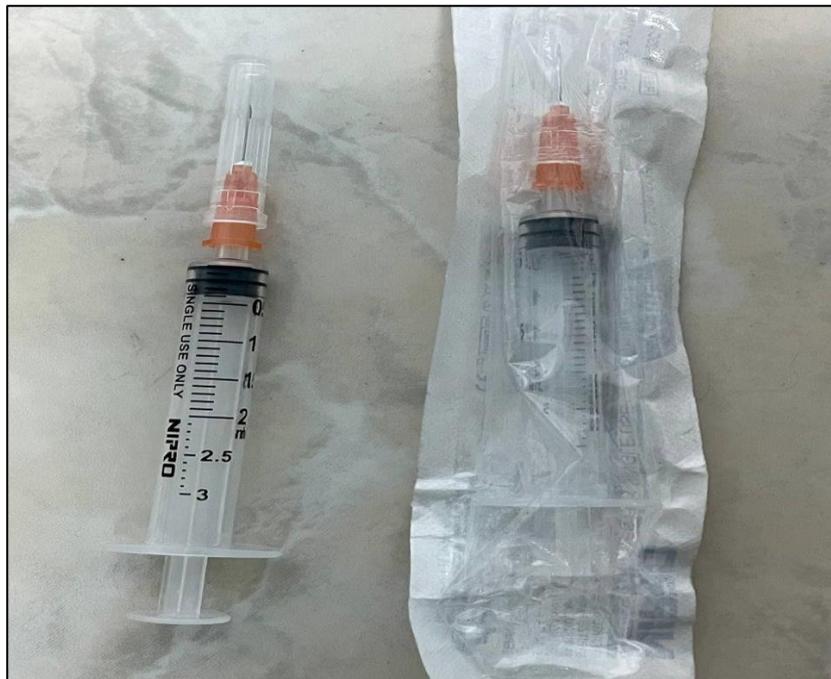
### 3. Matériel :

#### 3.1. Cytologie ganglionnaire :

- Lames (Figures 20).
- Seringues à aiguilles fine (Figure 21).



**Figure 18 :** Lames (CITOGLAS. REF217102 boîte de 50 PCS).



**Figure 19:** Seringues pour ponction à aiguille fine (PRONTO SERINGUE C.I. CRETES 2.5ml, 25G. 0.50X16ml)

**3.2. Coloration :**

- Kit Ral 555 (Figure 22).
- BIO-DIFF KIT Dias Can (Figure 23).



**Figure 20:KIT RAL 555 (RAL.DIAGOSTICS).**



**Figure 21: BIO-DIFF KIT Dias Can**

## *Matériel et méthodes*

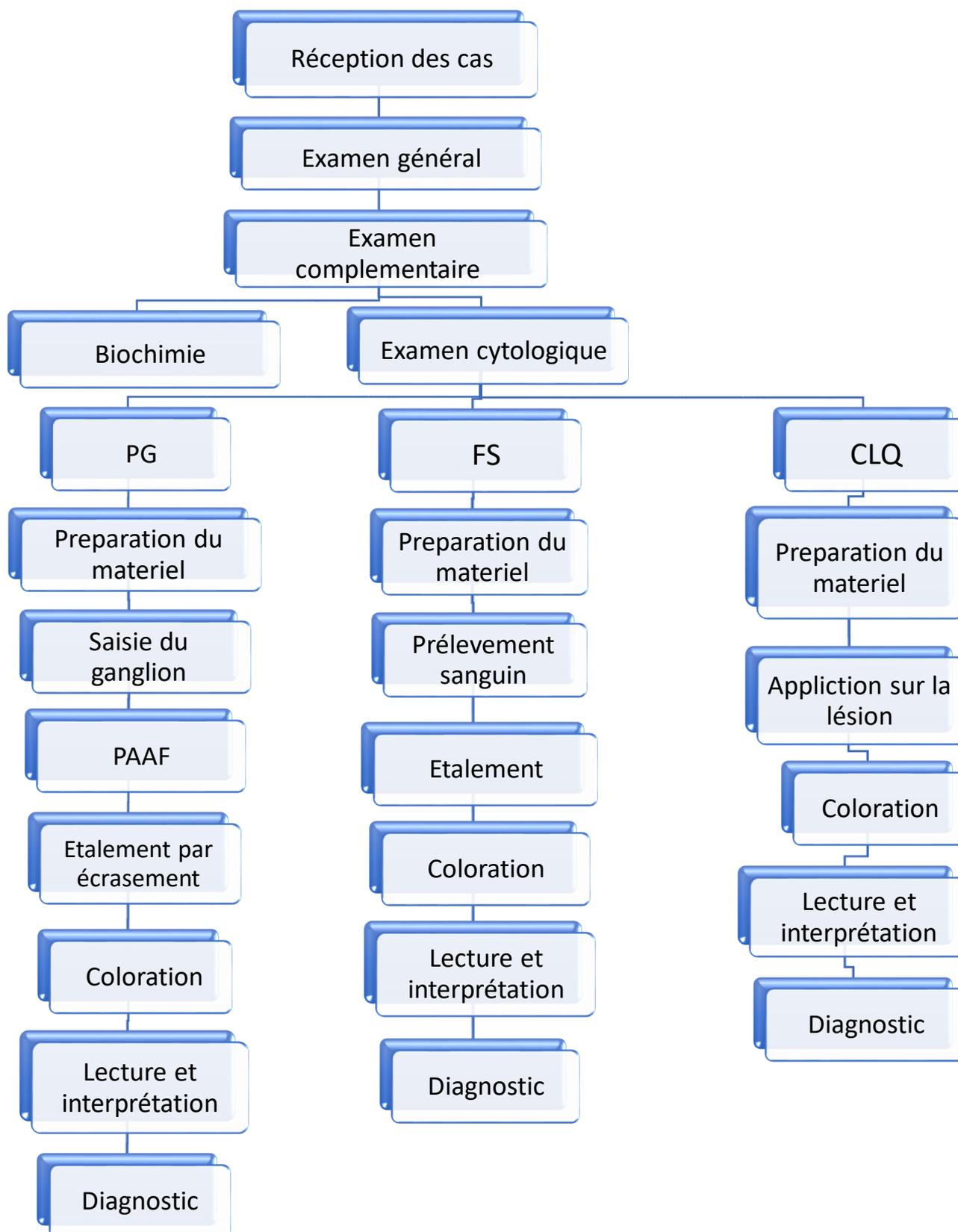
### **3.3. Lecture des frottis :**

- Microscope optique (KERN).
- Grossissement de lecture (Grossissement x10 (pour un premier balayage et pour localiser les zones d'intérêt), grossissement x40 (pour observer de façon plus détaillée les cellules et les parasites potentiels), grossissement x100 (immersion à l'huile) (pour confirmer la présence de *Leishmania spp.* Grâce à l'observation des amastigotes dans les macrophages)).



**Figure 22:**Microscope optique (KERN)

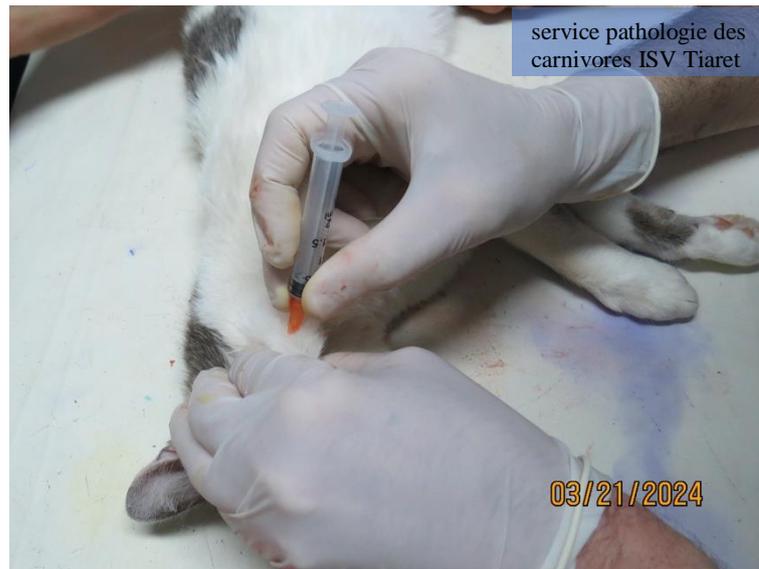
4. Organigramme de démarche clinique :



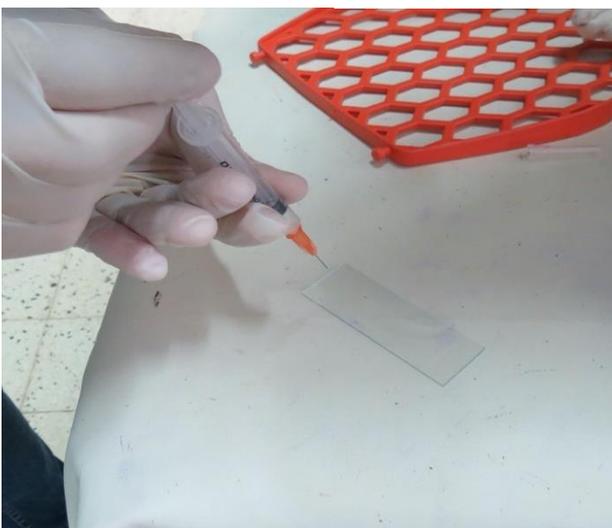
## Matériel et méthodes

### 4.1. Ponction ganglionnaire :

1. Désinfecter la zone autour du ganglion lymphatique.
2. Insérer une fine aiguille stérile dans le ganglion.
3. Aspirer doucement pour prélever des cellules (Figure 25).
4. Retirer l'aiguille et appliquer une pression pour arrêter tout saignement.
5. Etaler le dépôt récolté sur les lames (Figure 26, Figure 27).



**Figure 23:** ponction du ganglion lymphatique à l'aiguille fine.



**Figure 24:**dépôt du prélèvement ganglionnaire récolté sur la lame



**Figure 25:**Etalement avant coloration

## *Matériel et méthodes*

### **4.2. Calque cutanée :**

1. Nettoyer et sécher la lésion cutanée.
2. Presser doucement une lame de microscope contre la lésion (Figure 28).
3. Soulever la lame pour collecter les cellules.
4. Fixer et colorer la lame pour l'examen microscopique.



**Figure 26:**Réalisation d'un calque cutanée

## *Matériel et méthodes*

### **4.3. Prélèvement sanguin :**

1. Immobiliser le membre antérieur en bloquant l'articulation.
2. Mettre en place le garrot pour faire gonfler la veine.
3. Désinfecter le site de prélèvement.
4. Insérer l'aiguille et Soutirer le volume de sang désiré
5. Déposer une goutte de sang tant en haut de lame ET Etaler la (Figure 29).



**Figure 27:**Réalisation d'un prélèvement sanguin

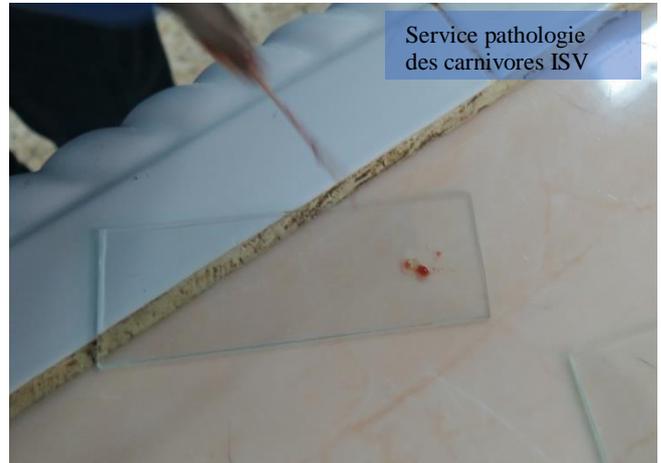
## *Matériel et méthodes*

### **4.4. Prélèvement de moelle osseuse :**

1. Faire une ouverture dans l'extrémité proximal du fémur.
2. Insérer une aiguille dans la moelle osseuse.
3. Aspirer un échantillon de moelle osseuse (Figure 30).
4. Déposer le contenu récolté et étaler le sur la lame (Figure 31).



**Figure 29:**ponction de la moelle osseuse à l'aiguille fine.



**Figure 28:**dépôt du prélèvement de MO récolté sur la lame

## *Matériel et méthodes*

### **4.5. Ponction de masse :**

1. Désinfecter la peau sur la masse tumorale.
2. Insérer une fine aiguille dans la masse.
3. Aspirer des cellules de la tumeur (Figure 32).
4. Retirer l'aiguille et appliquer une pression pour arrêter tout saignement.



**Figure 30:**ponction de masse à l'aiguille fine.

## Matériel et méthodes

### 6. Technique de coloration :

#### 6.1. Coloration au kit RAL 555 :

1. Plonger successivement la lame dans les 3 flacons (le FIX-RAL 555, l'EOSINE RAL 555 et le BLEU-RAL 555) pendant 15 secondes (Figure 33, Figure 34, Figure 35).



**Figure 31 :** Etape de fixation des cellules sur la lame au FIX-RAL 555.



**Figure 32:** Etape de coloration du cytoplasme a l'EOSINE RAL 555.



**Figure 35 :** Etape de coloration du noyau au BLEU- RAL 555.

# **CHAPITRE 2 :**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **1. Résultats :**

#### **1.1. Calculs et présentations graphiques :**

Sur un effectif de 22 chats consultés (Tableau 10), la leishmaniose était identifiée chez 3 chats, les 19 cas restants étaient négatifs concernant la leishmaniose et leurs états cliniques étaient liés à d'autres motifs pathologiques (Tableau 11).

**Tableau 11:**Résultats obtenus

Cas :	NP :	Type de coloration :	Cellularité :	Interpretation :
1.	FS	Diff-quick	-Polynucléaires neutrophiles++++ -Macrophages dégénérés -Globule rouge en hémolyse	Processus inflammatoire systémique, <b>Leishmaniose négative</b>
	FS	RAL555	-corpuscule intracellulaire	Hemonartonellose, <b>Leishmaniose négative</b>
2.	CC	RAL555	-Polynucléaires neutrophiles -Cellule nécrosé	Lesion pyogene / pyodermite, <b>Leishmaniose négative</b>
3.	CC	Diff-quick	-Cellule nécrosé aspect purulent -Polynucléaires neutrophiles dégénéré (pus) +++++	Pyodermite, <b>Leishmaniose négative</b>
4.	PGR	RAL555	-cellule épithéliale nette -globules rouges -Polynucléaires neutrophiles -plains de macrophage -Quelques bactéries -éosinophile -basophile	Granulome éosinophilique, <b>Leishmaniose négative</b>
5.	PG	RAL555	-petits lymphocytes++++ -grands lymphocytes	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>
6.	CC	RAL555	-Polynucléaires neutrophiles -petits lymphocytes	Lésion granulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>
7.	FS	RAL555	-corpuscule a la périphérie du globule rouges	Forte charge d'hemobartonella,

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

				<b>Leishmaniose négative</b>
8.	PG	RAL555	-macrophage -Polynucléaires neutrophiles -présence des amastigotes intracellulaires	Adénite granulomateuse Ganglion hyperplasique, <b>Leishmaniose positive</b>
9.	PM	RAL555	-cellule épithéliale -macrophage -Polynucléaires neutrophiles dégénérés	Réaction inflammatoire, <b>Leishmaniose négative</b>
10.	PG	Diff-quick	-petits et grands lymphocytes -macrophage	Ganglion hyperplasique, <b>Leishmaniose négative</b>
11.	PG	Diff-quick	-Polynucléaires neutrophiles -petits lymphocytes -macrophage	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>
12.	CC	RAL555	-Polynucléaires neutrophiles dominants	Lésion pyogranulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>
13.	PG	RAL555	-macrophage -petits lymphocytes	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>
14.	PG	RAL555	-macrophages	Ganglion hyperplasique, <b>Leishmaniose négative</b>
15.	PM	RAL555	-présence d'amas cellulaire de cellule fibroblaste avec nette anisocytose et anisocytose	Fibrosarcome, <b>Leishmaniose négative</b>
16.	CM	RAL555	-Polynucléaires neutrophiles++++ avec nécrose cellulaire -lésion pyogène	Mastite pyogène, <b>Leishmaniose négative</b>
17.	PG	RAL555	-petits lymphocytes dominants -présence d'amastigotes extracellulaire	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose positive</b>
	CC	RAL555	-amastigotes à la périphérie des globules rouge	<b>Leishmaniose positive</b>

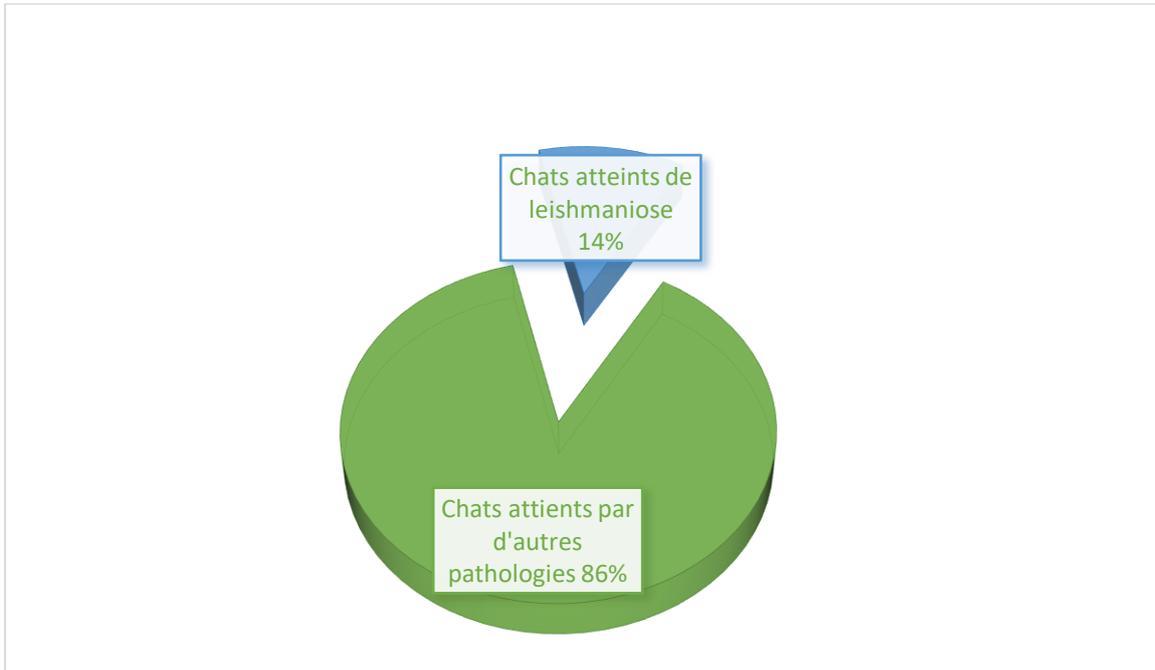
## **RESULTATS ET DISCUSSION**

	PG	RAL555	-Amastigotes intracellulaires	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose positive</b>
18.	PG	RAL555	-petits et grands lymphocytes	Ganglion hyperplasique, <b>Leishmaniose négative</b>
19.	PG	RAL555	-nécrose et dégénération cellulaire	Adénite pyogranulomateuse (nécrosante), <b>Leishmaniose négative</b>
20.	PG	Diff-quick	-macrophages (dominants) -Polynucléaires neutrophiles -bactéries -amastigotes extracellulaires	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose positive</b>
21.	MO	RAL555	-riche en cellules -plusieurs populations cellulaires dans la lignée blanche	<b>Leishmaniose négative</b>
22.	PG	Diff-quick	-macrophages (dominants) -quelques lymphocytes	Adénite granulomateuse, <b>Leishmaniose négative</b>

### **1.2. Diagnostic de la leishmaniose :**

Par rapport à l'ensemble des cas consultés (1451 chats), 22 chats faisaient l'objet d'une suspicion d'atteinte par la leishmaniose. Cette dernière s'est manifestée chez 3 chats ce qui représente un pourcentage de 14 %, les 19 chats restants soient 86 % étaient atteints par d'autres pathologies (Figure 36).

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***



**Figure 33:** Répartition des chats atteints par la leishmaniose diagnostiquée par rapport aux cas consultés pour différents motifs.

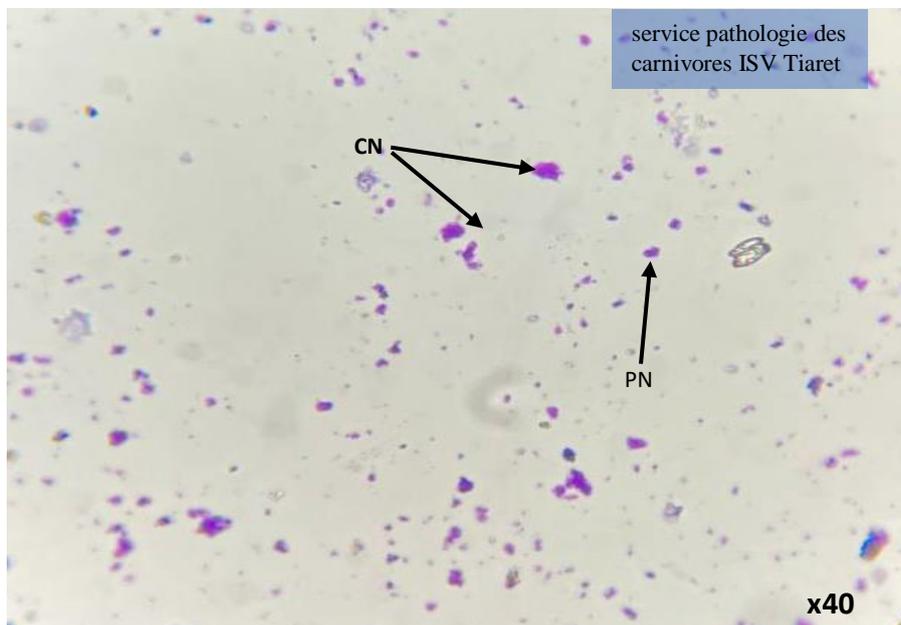
## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Présentation des cas :

Cas N°1 :



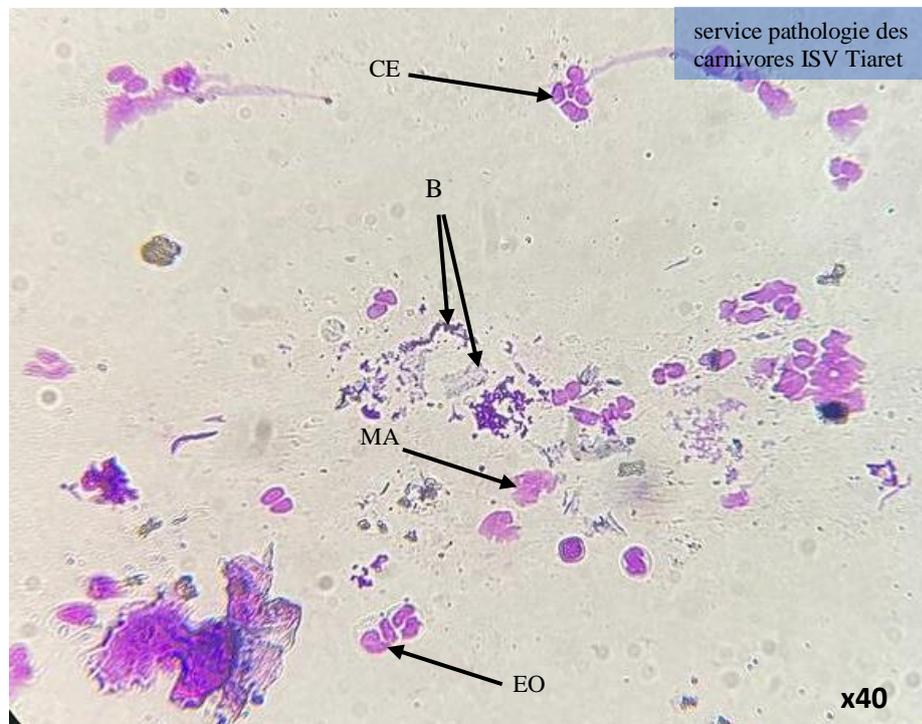
**Figure 34:** chat de gouttière consulté pour une dermatose (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



**Figure 35:** vue microscopique d'un calque cutané au grossissement 40 après coloration RAL 555, montrant la présence de polynucléaires neutrophiles (PN) et de cellules nécrosées (CN), indiquant la présence d'une pyodermite et absence de leishmanies (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°2 :



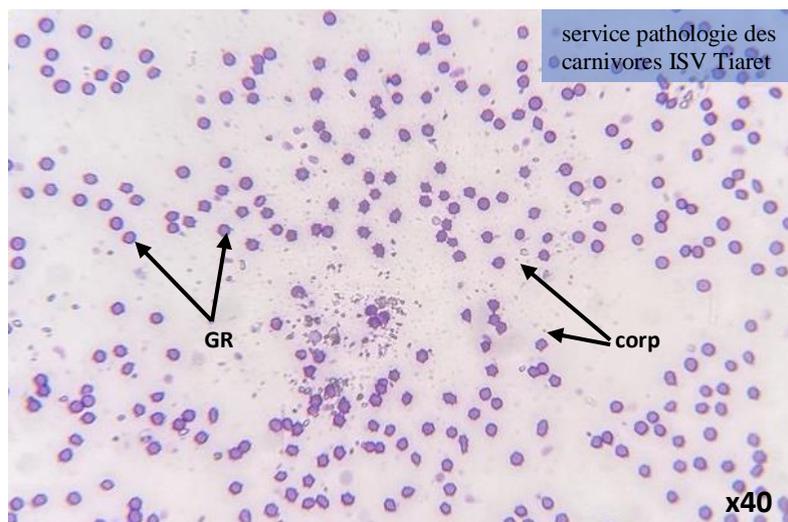
**Figure 36:**vue microscopique d'une ponction d'un granulome après coloration RAL 555, montrant la présence de cellules épithéliales (CE), de macrophages (MA), de polynucléaires éosinophiles (EO) et de quelques bactéries(B) avec absence de leishmanies (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°3 :



**Figure 37:** chat de gouttière consulté pour des crises épileptiformes et lésions neurologiques (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



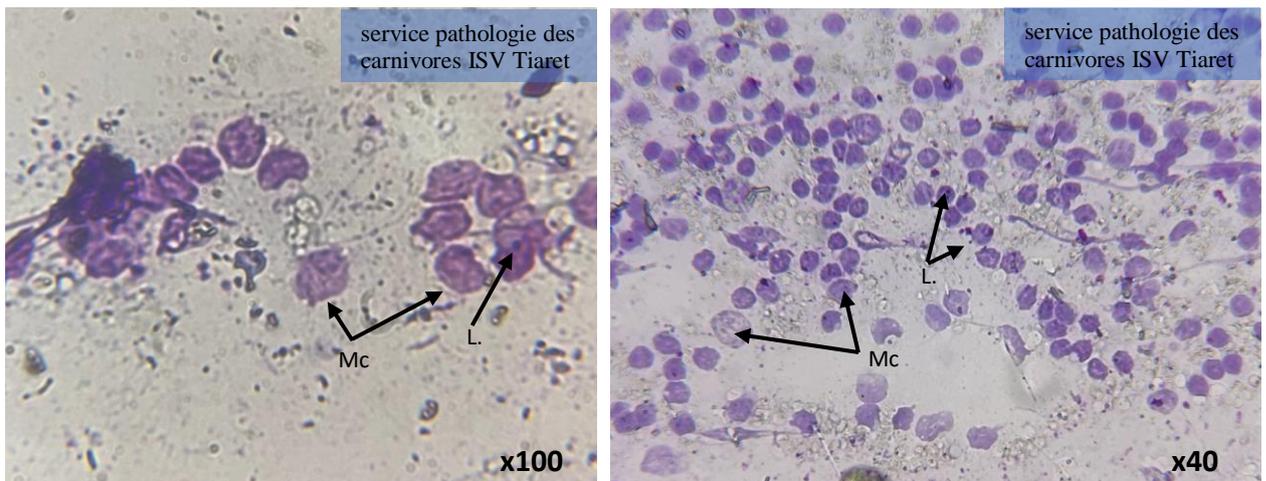
**Figure 38:** vue microscopique d'un frottis sanguin après coloration RAL 555, montrant la présence de corpuscules (corp) à la périphérie des (GR), ce qui indique une forte charge d'hémobartonellose avec absence de leishmanies (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°4 :



**Figure 39:** chat de gouttière consulté pour un abcès buccal (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



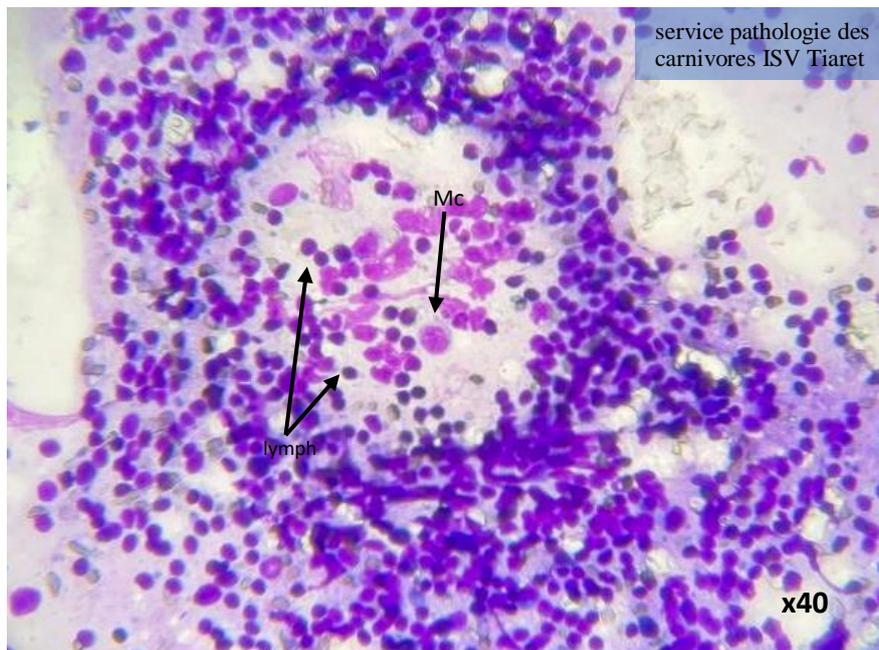
**Figure 40:** vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration RAL 555, qui montre une adénite granulomateuse leishmanique avec présence de leishmanies intra et extracellulaires (après éclatement des Mc) (L.) et de macrophages (MC) (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°5 :



**Figure 41:** chat croisé consulté pour une anorexie (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



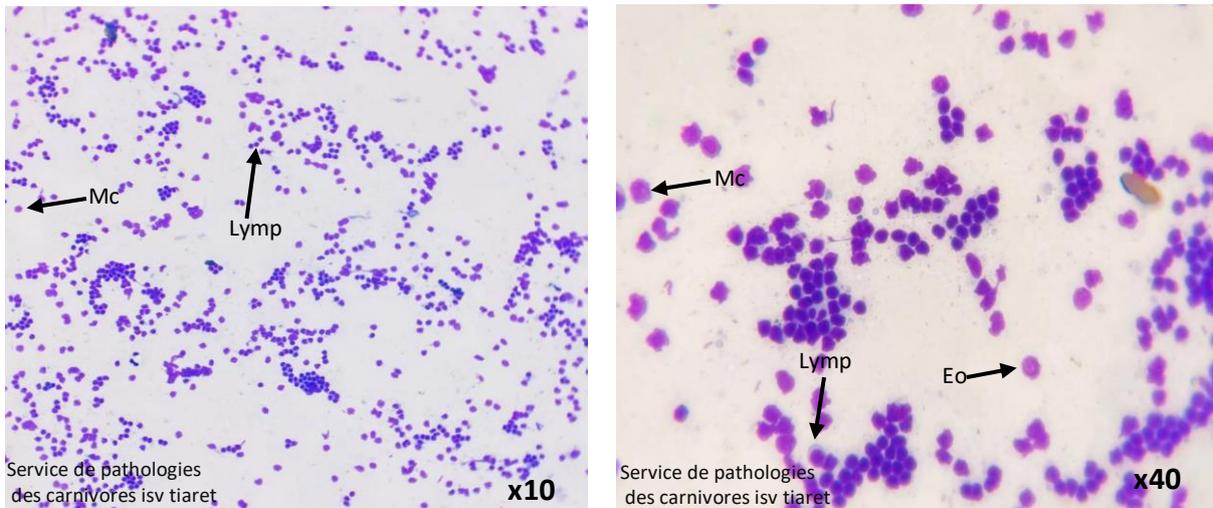
**Figure 42:**vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration RAL 555, montrant un ganglion hyperplasique avec présence de macrophages (Mc) et de lymphocytes (lymph) et absence de leishmnanies (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°06 :



**Figure 44:** chat de race local consulté pour une lésion au niveau du dos (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



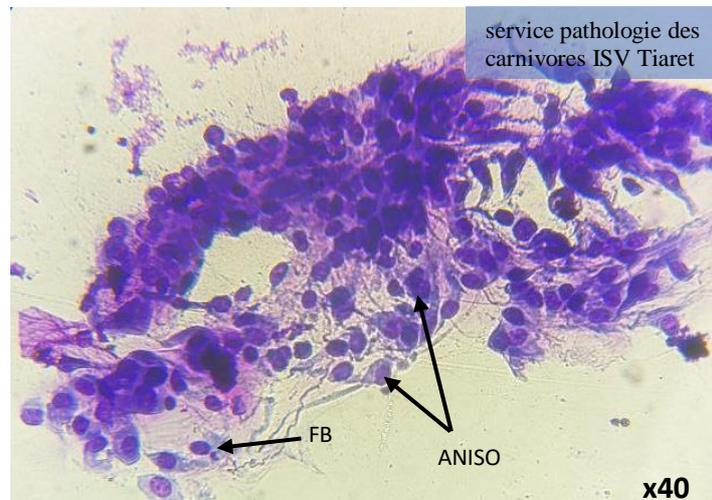
**Figure43:** Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire du ganglion sous maxillaire après coloration MGG (RAL555) montrant une adénite granulomateuse avec présence de polynucléaires éosinophiles (Eo), lymphocytes (Lymp) et de macrophages (Mc) et absence de leishmanies (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°7 :



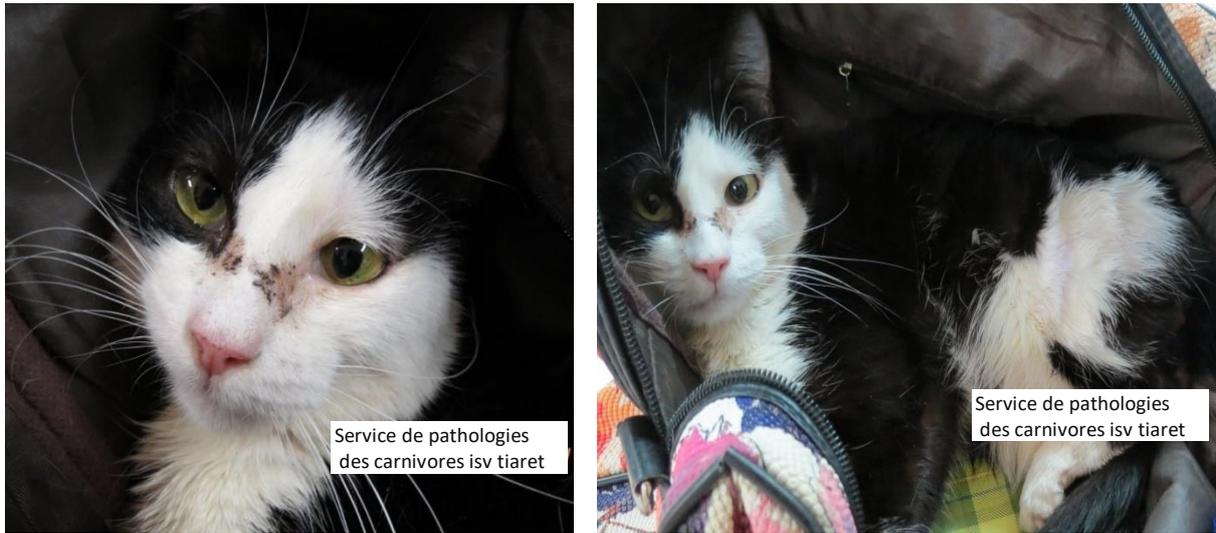
**Figure 45:** Persan consulté pour un kyste au-dessus de l'œil droit (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV-Tiaret).



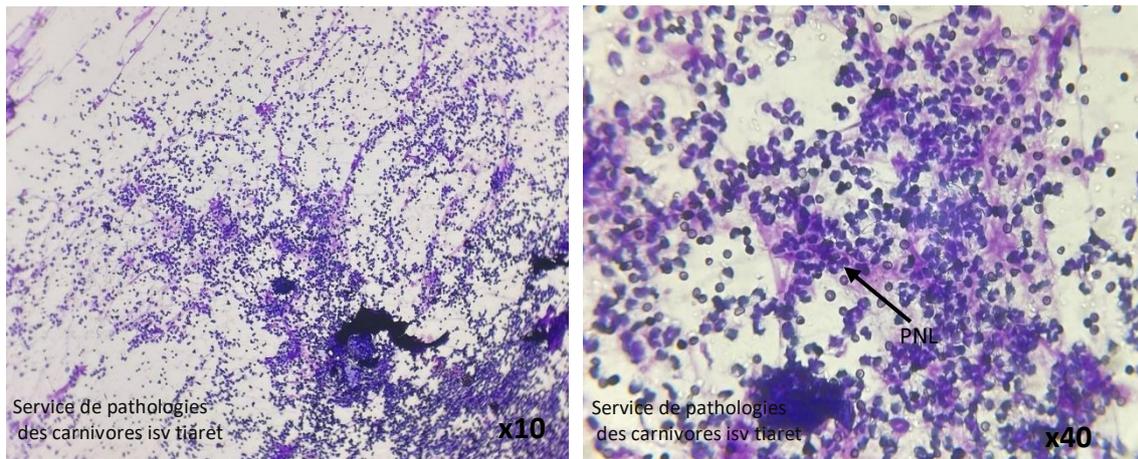
**Figure46:**vue microscopique d'une ponction de masse après coloration DIFF QUICK, montrant la présence de cellules tumorales avec une diversité cellulaire compatible avec des fibroblastes (FB). Ces cellules ont une forme ronde à ovale, une anisocytose (ANISO) marquée et un rapport noyau/cytoplasme élevé, indiquant la présence d'un fibrosarcome (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°08 :



**Figure 48:** chatte de race local consulté pour un problème dermique avec une cécité brutale (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV-  
---



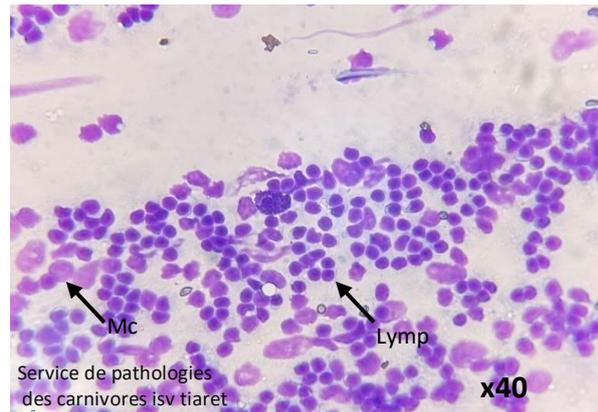
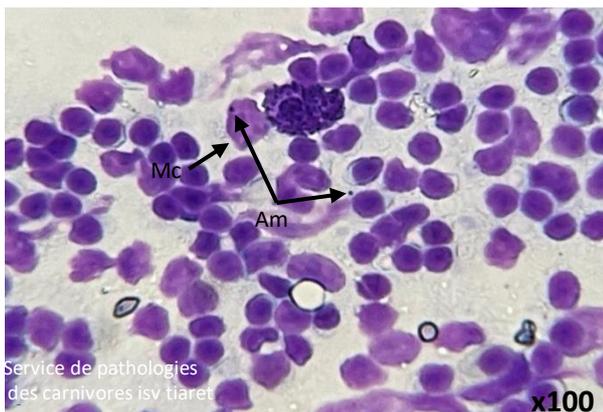
**Figure 47:** Vue microscopique d'un calque d'une masse mammaire après coloration MGG (RAL555) qui montre une mastite pyogène avec présence de polynucléaires neutrophiles (PNL) avec une lésion pyogène et absence de leishmanies (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°09 :



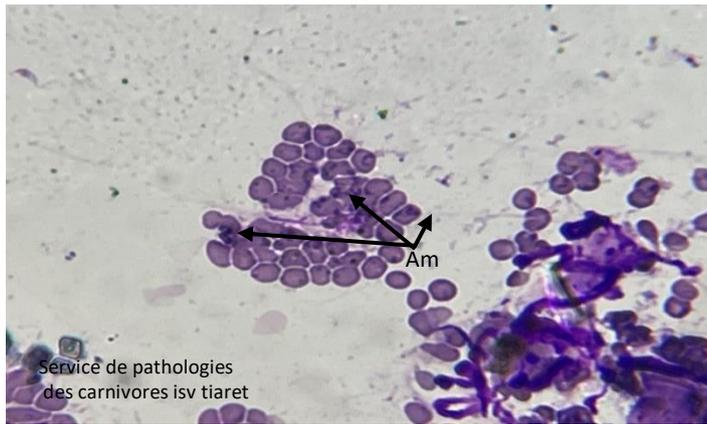
**Figure 49:** Chat de race local consulté pour un problème dermique et dentaire (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



**Figure 50:** Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration ; MGG (Ral555) montrant une adénite granulomateuse leishmanique avec présence de lymphocytes (Lymp), d'amastigotes extra (après éclatement des Mc) et intra cellulaire (Am) et de macrophages (Mc) chez une chatte de race locale (Grx40/Grx100) (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

x40

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***



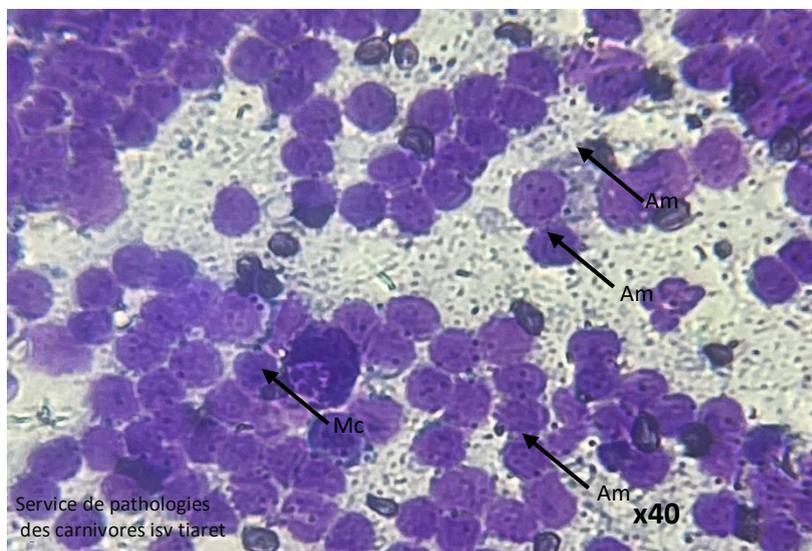
**Figure 51:** Vue microscopique d'un calque cutané après coloration DIFF QUICK qui montre la présence d'amastigotes (Am) chez une chatte de race locale (Grx40) (**Dr. Slimani Khaled M.**, Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Cas N°10 :



**Figure 52:** Chat de race local consulté pour un problème dermique (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



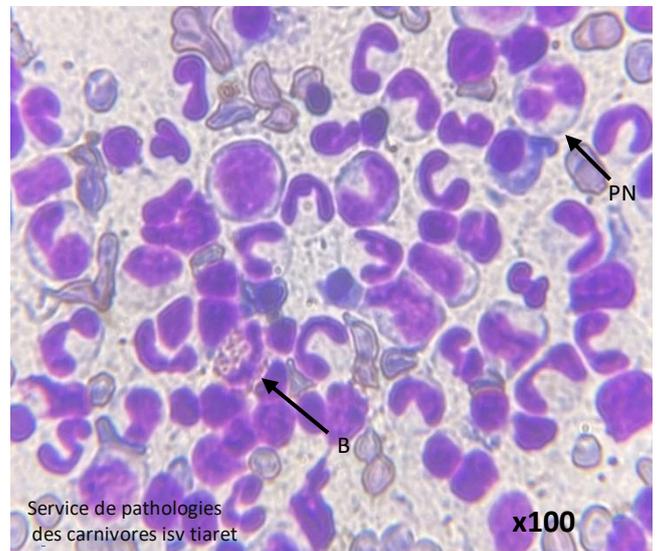
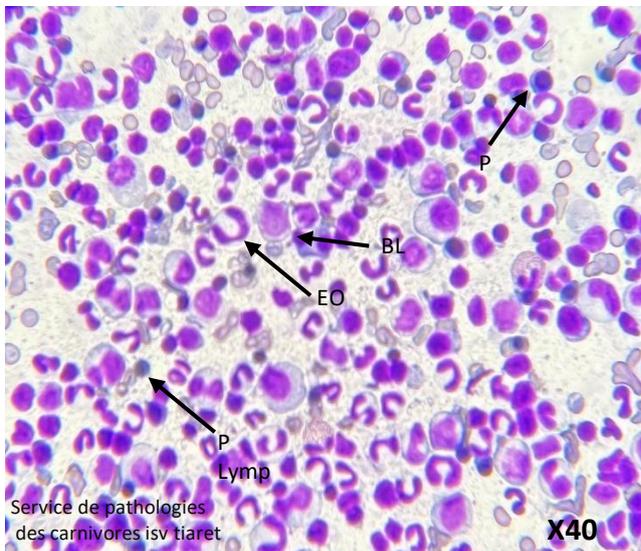
**Figure 53** Vue microscopique d'une ponction ganglionnaire après coloration ; MGG (Ral555) qui montre une adénite granulomateuse leishmanique avec présence d'une forte charge d'amastigotes extra (après éclatement des Mc) et intra cellulaire (Am) et de macrophages (Mc) chez une chatte de race locale (Grx40) (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## RESULTATS ET DISCUSSION

as N°11 :



**Figure 54:** Chat de race Angora noire consulté pour un AVP (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).



**Figure 55:** Vue microscopique d'un frottis de la moelle osseuse après coloration diff quikk qui montre un ganglion hyperplasique avec présence de plusieurs populations cellulaires de la lignée blanche dont les petits lymphocytes (P Lymph), les plasmocytes (P), les polymucléaire éosinophiles (EO), basophiles (B) et neutrophiles (PN) et les blastes (BL) avec absence de leishmanies (Dr. Slimani Khaled M., Service de pathologies des carnivores, ISV- Tiaret).

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***

### **2. Discussion :**

Durant cette étude, nous avons observé différentes pathologies chez 22 cas cliniques de chats consultés et suivis au niveau du Service de pathologies des carnivores de l'Institut vétérinaires de Tiaret.

Sur le plan clinique, nous avons constaté que les cas présentaient deux formes cliniques de la leishmaniose : cutanée ou cutanéomuqueuse et oculaire avec absence de forme viscérale, ce résultat est semblable trouvé par Maria Grazia Pennisi (2014) dans l'étude qu'elle a réalisé en Europe entre 1977 et 2014, sur un total de 46 cas cliniques. Elle a déclaré que les manifestations cliniques compatibles avec la leishmaniose féline comprenaient une hypertrophie des ganglions lymphatiques, des lésions cutanées et cutanéomuqueuses, des lésions oculaires, une gingivostomatite chronique, hyper-gamma-globulinémie et une anémie normochrome normocytaire.

Nous avons également remarqué que les signes cliniques de la leishmaniose féline peuvent être similaires à ceux d'autres maladies comme par exemple l'hémobartonellose (ou mycoplasmosse hémotrope) qui représente une maladie bactérienne pouvant causer une anémie une perte de poids et la léthargie ainsi que d'autres signes cliniques semblables à ceux de la leishmaniose, les différents types d'adénites qui présente des symptômes similaires et les lésions cutanées et ulcérations, telles que celles causées par la teigne.

Marc verneuil (2013) proclame dans son étude d'inclure l'uvéite granulomateuse chez un chat leishmanien dans le diagnostic différentiel des uvéites félines en pratiquant plus d'examen complémentaires car la leishmaniose constitue une préoccupation sérieuse pour la santé publique en raison de la forte prévalence constatée dans la population canine et la possibilité que d'autres espèces, telles que les félins puissent constituer un réservoir secondaire.

De plus, dans ces cas-là et comme dans pleins d'autres cas le vétérinaire peut être perturbé et confondu à l'erreur et administrera donc un traitement d'une certaine maladie alors que le chat souffre de leishmaniose et afin d'éviter cela et garantir un diagnostic correct il est crucial de veiller à une approche diagnostique rigoureuse, précise et fiable tel que l'examen cytologique (Slappendel & Ferrer, 2002) qui est considéré comme un examen qui présente des avantages significatifs vu sa rapidité, sa facilité d'exécution sur tout lorsque le prélèvement consiste à réaliser une ponction ganglionnaire par exemple, son faible coût.

En outre, il est extrêmement utile car il permet d'obtenir un diagnostic de certitude vu la visualisation directe du parasite (Tulsane, 2009) permettant ainsi de distinguer entre la leishmaniose féline et d'autres pathologies présentant des similitudes cliniques et même encore

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***

à la mise en évidence des changements consécutifs liés à l'infection (Briffod, 2011) et la mise en place d'une prise en charge adaptée et adéquate.

En plus, d'une part, lors de la réalisation de l'examen cytologique pour notre étude nous avons utilisé différentes colorations et nous avons constaté que les critères cellulaires et parasitaires sont bien définis et que le RAL555 reste le plus facile à utiliser et le meilleur pour observer ces critères (Piatan *et al.*, 2015). D'une autre part, lors de la lecture des lames nous avons noté la présence d'adénite granulomateuse ce résultat rappelle le résultat de Pocholle *et al.* (2012) qui citent qu'au niveau microscopique, généralement l'aspect d'une inflammation diffuse granulomateuse est le plus retrouvé avec présence de macrophages contenant des amastigotes de *Leishmania* associés à de nombreux neutrophiles, lymphocytes, plasmocytes et mastocytes. Nous avons également diagnostiqué 3 cas seulement présentant la leishmaniose féline soit 14% parmi les 22 chats examinés, ce résultat confirme la rareté de cette maladie chez le chat (Djoudi, 2011). Cette faible prévalence peut être attribuée à une moindre exposition des chats aux vecteurs de la maladie ou à une résistance naturelle plus élevée par rapport aux chiens (escap.fr). Cependant, ce résultat indique que la région de Tiaret a un faible pourcentage de leishmaniose féline par rapport à d'autres études comme celle réalisée par Djoudi Mustapha en 2011 à Alger, où il évoque un pourcentage de 36% de chats atteints de leishmaniose féline. Il est donc important de prendre cela en considération dans l'épidémiologie.

L'identification de seulement 3 cas positifs sur 22 échantillons suggère aussi que la leishmaniose, bien qu'elle soit une maladie importante à considérer, reste rare chez le chat. Cette faible prévalence pourrait être attribuée à une moindre exposition des chats aux vecteurs de la maladie ou à une résistance naturelle plus élevée par rapport aux chiens.

Il est donc crucial et important pour les vétérinaires de maintenir une approche diagnostic large et d'inclure la leishmaniose dans les diagnostics différentiels, surtout dans les régions endémiques. La maîtrise des techniques cytologiques et l'utilisation appropriée des grossissements microscopiques sont indispensables pour un diagnostic précis.

Cette étude apporte des données supplémentaires sur la prévalence de la leishmaniose chez le chat et souligne l'importance des diagnostics différentiels et l'emploi de techniques complémentaires. Elle met également en lumière la nécessité de la cytologie pour l'identification précise des parasites et la mise en place du diagnostic de certitude.

# Conclusion

## *Conclusion*

### **Conclusion :**

L'examen cytologique en médecine vétérinaire est un outil essentiel pour établir un diagnostic précis, particulièrement lorsque les animaux domestiques présentent des symptômes compatibles avec d'autres maladie et une suspicion clinique de leishmaniose. Dans notre étude, nous avons constaté la rareté de la leishmaniose chez le chat, avec seulement 3 cas positifs (14%) sur 22 chats examinés au service de pathologies des carnivores de l'institut vétérinaire de Tiaret. Cette prévalence faible souligne l'importance de considérer d'autres diagnostics différentiels, tels que l'hémobartonellose et certaines formes d'adénites, qui peuvent présenter des signes cliniques similaires.

La cytologie permet d'observer directement les éléments étiologiques à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, facilitant ainsi la confirmation du diagnostic clinique. Les différentes techniques de coloration utilisées dans notre étude (Bio-Diff-Quick, MGG (Kit Ral555) ont démontré des résultats efficaces pour identifier les parasites, chaque méthode présentant ses avantages spécifiques en termes de clarté et de rapidité mais la meilleure et la plus facile reste la coloration au kit Ral 555.

Cette étude a permis de mieux comprendre la prévalence, les caractéristiques cytologiques de la leishmaniose chez le chat et l'importance de l'examen cytologique dans le diagnostic de certitude et le diagnostic différentiel. Nous encourageons la poursuite des recherches dans ce domaine pour établir une situation épidémiologique plus complète au niveau de la wilaya de Tiaret, ce qui permettra d'améliorer les stratégies de diagnostic, de traitement et de lutte contre cette pathologie.

## Référence bibliographique :

### Référence bibliographique

- (s.d.). Récupéré sur <https://www.escap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose>.
- Claudio , G., Marco, G., & Giorgio , T. (2017). *Manuel de parasitologie vétérinaire du chien et du chat*.
- (WHO). (1984, July 2-6 ). W.H.O., Leishmania: Taxonomy and phylogeny: applications to ecology and epidemiology: International colloquium CNRS/INSERM/WHO . p. p. 537.
- abramo, f. a. (2021). Skin Lesions in Feline Leishmaniosis. *A Systematic Review. Pathogens*, 472.
- Aga, E, & al. (2002.). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.*, pp. 169(2): p. 898-905.
- AHUIR-BARAJA, A. E. (2021, août 30 ). Feline Leishmaniosis: An Emerging Public Health Problem. *Veterinary Sciences.*, p. 173.
- Akhoundi, M. e. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.*, p. 10(3): p. e0004349.
- al, C. e., Linardi, C. e., Dantas-Torres, & Dougall et al, F. e. (2011;2007;2011;2011;2009).
- Alexander, J. A. (1999. 1992. ). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form. *J Cell Sci. J Biol Chem.*, pp. 112 Pt 18: p. 2993-3002.267(3): p. 1888-95.
- algeriaubuy. (2024). *algeira ubuy*. Récupéré sur <https://www.algeria.ubuy.com/en/product/23XZ3POQ-transpore-hypoallergenic-surgical-tape-2-x-10-yds-1-count>.
- BACHI, F. (s.d.). *Institut Pasteur d'algerie*. Récupéré sur <https://pasteur.dz/fr/departement-parasitologie>.
- BANETH, G. K.-G. ( 2008, juillet). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, pp. 324-330.
- BASSO, M. A., MARQUES, . (2016). *Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate*. *JFMS open reports*.
- Bates, P. (1994.). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.*, pp. 79(2): p. 215-8.
- Bates, P. s. (1994.1989.1995.). The developmental biology of *Leishmania* promastigote, Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes, Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Exp Parasitol.Parasitology.*, pp. 79(2): p. 215-8.69(1): p.100-3. 111 ( Pt 3): p. 275-87.
- Belfort, Cowell, & Perman. (1998,1999,1979.). *Brazilian guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of primary cutaneous melanoma-Part II*.
- Belfort, Cowell, DeMay, Orell, & Perman. (1998, 1999, 1996, 1992, 1979). Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia.
- Belkaid, Y. e. (1998.1988.). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Salivary gland lysates from*

## Référence bibliographique :

- the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. Science.*, pp. 188(10): p. 1941-53. 239(4845): p. 1306-8.
- Bibbo, DeMay, & Orell. (1992, 1996, 1997). *Cytologic Features of Testicular Tumours in Dog*.
- Bibbo, DeMay, Jain, & Orell. (1997, 1996, 1992.). *atlas de cytologie canine et feline*.
- Blum, J. a. (1994. ). Opperdoes, Secretion of sucrase by Leishmania donovani. . *J Eukaryot Microbiol.*, pp. 41(3): p. 228-31.
- Bourdoiseau, g., & chermette. (2015, décembre 1). La leishmaniose canine à Leishmania infantum : données actuelles sur une zoonose négligée. *Revue Francophone des Laboratoires.*, pp. 25-34.
- BRIANTI, E. C. (2019). Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniosis. 121.
- Brittingham, A. e. (1995.). Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol*, , pp. 155(6): p. 3102-11.
- Cecilio, P. A.-d.-S. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasi. *Commun Biol.*, p. 5(1): p. 305.
- Chagas, A., C., & al. (2014.). Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases Leishmania parasite survival in neutrophils and inhibits XIa contact activation in human plasma. *PLoS Pathog.*, p. 10(2): p. e1003923.
- Chan, & Jörundsson. (1998,1999.). *atlas de cytologie canine et feline* .
- Chatzis, m. K. (octobre 2020, octobre). Evaluation of clinicopathological 124 abnormalities in sick cats naturally infected by Leishmania infantum. *Heliyon*.
- Claudio , G., Marco , G., & Giorgio , T. (2017). *Manuel de parasitologie vétérinaire du chien et du chat*.
- CNRS News. (s.d.). Récupéré sur <https://news.cnrs.fr/slideshows/preventing-malaria-from-proliferating>.
- COSTA-VAL, A. P. (2020.). Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis in cats (Felis catus). *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*:.
- Cowell, & Perman. (1999, 1979). Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia.
- Cowell, & Perman. (1999,1979.). *Defensive Relativism: The Use of Cultural Relativism in International Legal Practice*.
- da Silvaal., e., & Paniz Mondolfi, a. (2015, 2019).
- Dantas-Torres. (2001).
- DeMay, & Orell. (1996,1992). *Cytologic Features of Testicular Tumours in Dog*.
- Desjardins, M., & A. (1997.). Descoteaux, Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J Exp Med*,, pp. 185(12): p. 2061-8.
- Dobson, D. e. (2010. 2004.). Leishmania major survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern.Leishmania tropica: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by diffe. *PLoS Pathog, Exp Parasitol.*, pp. 6(11): p. e1001185. 107(1-2): p. 105-14.
- Döflein. (1901).
- Dorbani, D., & Djama .S. (2023). *La dernière couche Parasitologie-Mycologie*.
- DOS SANTOS, & al. (2021). Feline Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum: Parasite Sequencing, Seropositivity, and Clinical Characterization in an Endemic Area From Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*.

## *Référence bibliographique :*

- Dostalova, A. a. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors.*, p. 5:p. 276.
- Dr Dorbani , & Djama .S. (2023). *La dernière couche Parasitologie-Mycologie.*
- Duncan, & Orell. (1994.1992.). *Fine needle aspiration cytology diagnosis of malignant lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia.*
- DURÃO, J. R. ( 1994). *First case of leishmaniosis in domestic cat (Felis catus domesticus) detected in Portugal (Sesimbra).* Preliminary report. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.*
- ECDC. (2020).
- ECDC, & al., M. e. (2020,2012).
- esccap.fr. (s.d.). *esccap.* Récupéré sur <https://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose>.
- Fairlamb, A.H. , & A. (1992.). Cerami, Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.*, pp. 46: p. 695-729.
- FERNANDEZ-GALLEGO, (2020). Feline leishmaniosis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* octobre 2020., 993-1007.
- Ferreira et al., & al, P. e. (2007,2007). *Relevance of multi-species phenotypic assays in Leishmania early drug discovery.*
- Ferreira, T. .. (2019.). *Relevance of multi-species phenotypic assays in Leishmania early drug discovery.* .
- Filho, A. e. (2021.). Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. . *Acta Trop.*, p. 224: p. 106152.
- Forestier, C.L., & al. (2011.). Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe.*, pp. 9(4): p. 319-30.
- GARCIA-TORRES, M. L.-B. (2022, juillet 11 ). Review and statistical analysis of clinical management of feline leishmaniosis caused by Leishmania infantum. *Parasites & Vectors*, p. 253.
- Genchi, C., Genchi, M., & Traldi, G. (2017). *manuel de parasitologie vétérinaire du chien et du chat.*
- Giemsa, G. (1922). Das Wesen der Glemsa-Farbung, *Zentralb f Bakt.*; pp. 89, p 99-106.
- GRAMICCIA, M. ( 2011, septembre 8). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, pp. 23-30.
- Greene, C. E. (2012). *INFECTIOUS DISEASES OF THE DOG AND CAT.* Athens, Georgia: ELSEVIER SAUNDERS.
- Haeckel. (1866).
- HEADLEY. (2019, août). Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports.*
- Hennig, D. .. (1950). Herausgegeben vom Deutschen entomologischen institut, BerlinFriedrichshagen. (*Foundations of a theory of phylogenetic systematics*).
- Hermoso, T. e. (1991. ). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. . *EMBO J.*, pp. 10(13): p. 4061-7.
- HERVÁS, ., & GÓMEZ-VILLAMANDOS, .. e. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 101-105.

## Référence bibliographique :

- Holm, A., al., & n. (2001.). Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol.*, pp. 3(7): p. 439-47.
- Honigberg, e. V. (1963,1976).
- igenels. (s.d.). Récupéré sur <https://www.igenels.com/uses-of-the-pcr-machine/>.
- Jörundsson. (1999). *atlas de cytologie canine et feline*.
- Kamhawi, S. (2006. ). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* , pp. p. 439-45.
- Kamhawi, S. e.-K. (2004.1993. 1974. ). A role for insect galectins in parasite survival. Life cycle of Leishmania major in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis Leishmania in phlebotomid sandflies. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophagea. *Cell. Kinetoplastida: Trypanosomatidae. Diptera: Psychodidae. Proc R Soc Lond B Biol Sci.* , pp. 119(3): p. 329-41.30(4): p. 699-718.187(1089): p. 409-19.
- Killick-Kendrick, R. D. (1974. 1994.). Ashford, Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. Bates, P.A., The developmental biology of Leishmania promastigotes. . *Proc R Soc Lond B Biol Sci. Exp Parasitol.* , pp. 187(1089): p. 4 .79(2): p. 215-8.
- Kilpatrick, L., E., & al. (2006.). Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J Leukoc Biol.* , pp. 80(6): p. 1512-21.
- kitral555. (2022). *CellaVision*.
- Klernan, J. (2008). *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*, 4n ed., Bloxham, Scion Publishing Ltd.
- Kramer, L. a. (2003. ). Ebel, Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res.* , pp. 60: p. 187-232.
- Kramer, L. a. (2003. 2010. ). Ebel, Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res.* Frequency of multiple blood meals taken in a single gonotrophic cycle Anopheles arabiensis mosquitoes in Macha, Zambia. *Am J Trop Med Hyg.* pp. 60: p. 187-232. 83(1): p. 33-7.
- Kramer, L. a. (2003. 2017. ). Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. Beyond the entomological inoculation rate: characterizing multiple blood feeding behavior and Plasmodium falciparum multiplicity of infection in Anopheles mosquitoes in northern Zambia. . *Adv Virus Res. Parasit Vectors.* , pp. 60: p. 187-232. 10(1): p. 45.
- Kumar, G.A., & al. (2019.). Leishmania donovani Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. *Sci Rep.* , p. 9(1): p. 12636.
- Laufs .H ., a. (2002.). Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* , pp. 70(2): p. 826-35.
- LEAL, & et PEREIRA DA FONSECA, I. (2018). *Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniasis: report of an unusual presentation and therapeutic complications*. *JFMS Open Reports*.
- Leishman, W. R. (1903,2006,1903.). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India, Indian, Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. . pp. 123(3): p. 1252-4; discussion 79.2(2237): p. 1261-2.
- LEIVA, M. L. (2005, février). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology* , pp. 71-75.

## Référence bibliographique :

- MAIA, C., SOUSA, C., RAMOS, C., CRISTÓVÃO, J. M., F., & P. et CAMPINO, L. (2015). First case of feline leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. *JFMS open reports*.
- Majumder, S., & al. (2012.). *Leishmania*-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite. *J Infect Dis.*, pp. 205(10): p. 1607-16.
- marseille, c. v. (s.d.). *clinique-veterinaire-marseille*. Récupéré sur <https://clinique-veterinaire-marseille.com/deux-cas-danemie-severe-chez-un-chien-et-un-chat-interet-de-la-ponction-de-moelle-osseuse/> .
- Martín-sánchez, & o. Et morillas- márquez, f. (30 avril 2007, avril 30). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, pp. 267-273.
- May, R. e. (1909). Ober die Färbung von Feuchtpreparaten mit meiner Azur-Eosine methode, *Deutsche med Xschr.*, pp. 35, p 1751-1752.
- Merle, N. e. (2015. 2021. ). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Front Immunol . Biomed Pharmacother.*, p. 6: p. 262.139: p. 111671.
- MIRÓ, G. C. (2008, août). Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, pp. 371-377.
- Mitra, B., & al. . (2013.). Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J Exp Med.*, pp. 210(2): p. 401-16.
- Molyneux, D. (1988). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, ed. E. R. Peters. Vol. Volume 96. .
- MONTOYA, A. G. (2018). *Implications of zoonotic and vector- borne parasites to free-roaming cats in central Spain*.
- MORGANTI, G. (2019, mai 2). Emerging feline vector-borne pathogens in Italy. *Parasites & Vectors*, p. 193.
- Muller, . (2001.). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.*, pp. 190(1-2): p. 73-6.
- Myskova, J. e. (2007. ). A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. . *Microbes Infect.*, pp. 9(3): p. 317-2.
- NAVARRO, J. A.-V. (2010). Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniasis. *Journal of Comparative Pathology*, 297-302.
- Ndjamen, B., & al. (2010.). *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell Microbiol.*, pp. 12(10): p. 1480-94.
- Olivier, M., D., J., Gregory , & G. . (2005.). Forget, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.*, pp. 18(2): p. 293-305.
- OMS. (2019).
- Opperdoes, F. a. ( 2007. ). Coombs, Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.* pp. 23(4): p. 149-58.
- Opperdoes, F. a. (2007.). Coombs, Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.*, pp. 23(4): p. 149-58.
- PENNISI. (2015). Leishmaniasis of companion animals in Europe: an update. *Veterinary Parasitology*. 35-47.

## Référence bibliographique :

- PEREIRA, A., & MAIA, C. (2021). Leishmania infection in cats and feline leishmaniosis: An updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*.
- Pereira-, F. A. (2023.). Evasion of the complement system by Leishmania through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface. *Acta Trop.*, p. 242: p. 106908.
- Perman, J. H. (2001). *atlas de cytologie canine et feline*.
- PERSICHETTI, M. F., PENNISI, . et SOLANO-GALLEGO, & L. (2018, mars 20 ). Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. *Parasites & Vectors*, p. 136.
- Peters , N., C., D., L., & Sacks. (2009.). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.*, pp. 11(9): p. 1290-6.
- Pimenta, P. e. (1997. 2002. ). A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly. *Parasitology*, pp. 115 ( Pt 4): p. 359-69. 124(Pt 5): p. 49.
- PIMENTA, P., ALVES-PIMENTA, , . . . et CARDOSO, L. (2015, décembre). Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, pp. 65-69.
- POCHOLLE, GIACOMO., & et MARTY, P. (2012, février ). Un cas de leishmaniose féline disséminée dans le sud de la France. *Parasite*, pp. 77-80.
- Podinovskaia , M., & al. (2015.). Descoteaux, Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.*, pp. 10(1): p. 111-29.
- Podinovskaia,, M. and A. , Descoteaux, , & Costa, d.-S. (2015. 2022.). Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Future Microbiol. Trop Med Infect Dis.*, pp. 10(1): p. 111-29. 7(4).
- Poinar, G. J. (2004). Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae:Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*, pp. 155(3): p. 305-10.
- Polando, R., & al. (2013.). The roles of complement receptor 3 and Fcγ receptors during Leishmania phagosome maturation. *J Leukoc Biol.*, pp. 93(6): p. 921-32.
- Prélaud, D. P., & N.Cochet-Faivre. (s.d.). *lapvso*. Récupéré sur <https://www.lapvso.com/les-calques-cutanes/>.
- Puentes, S. e. (1990. ). Serum resistance of metacyclic stage Leishmania major promastigotes is due to release of C5b-9. . *J Immunol.*, pp. 145(12): p. 4311-6.
- Ramamoorthy, R. e. (1992. 1995.). Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of Leishmania donovani chagasi promastigotes to an infectious form. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion. *J Biol Chem.and resistance to complement-mediated lysis. J Immunol.*, pp. 267(3): p. 1888-95.155(6): p. 3102-11.
- Regli, I., B., & al. (2017.). Survival Mechanisms Used by Some Leishmania Species to Escape Neutrophil Killing. *Front Immunol.*, p. 8: p. 1558.
- rivas, . (2018, mars 20) ., 2018. Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniosis in Venezuela. *Parasites & Vectors*, p. 141.
- Rocco-Machado, N., & al. (2019.). Leishmania amazonensis ferric iron reductase (LFR1) is a bifunctional enzyme: Unveiling a NADPH oxidase activity. *Free Radic Biol Med.*, pp. 143:p. 341-353.

## *Référence bibliographique :*

- ROCHA,. (2019, septembre ). Diagnosis and epidemiology of Leishmania infantum in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. *Veterinary Parasitology*, pp. 80-85.
- Rochael, N., C., & al. (2015.). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Sci Rep.*, p. 5: p.18302.
- Rodriguez, N., E., & al. (2011.). Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS One*,, p. 6(4): p. e19000.
- Rogers, M. (2012. ). The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. . *Front Microbiol.*, p. 3: p. 223.
- Rogers, M. M. (2002. 1992. ). Bates, The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis.The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. *Parasitology.Annu Rev Microbiol.*, pp. 124(Pt 5): p. 495-507.46: p. 65-94.
- Rosenzweig, D. e. (2008. ). Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. . *FASEB J.*, pp. 22(2): p. 590-602.
- Rosenzweig, D. e. (2008.). Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.*, pp. 22(2): p. 590-602.
- Roszel. (1975). *CELLS IN CANINE MAMMARY GLAND FLUIDS ASSOCIATED WITH PARTURITION, PSEUDOCYTES AND TUMOR.*
- Rubin, B., I., & al. (2003.). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, pp. 100(19): p. 11007-12.
- RÜFENACHT, S. S. (2005, avril 23 ). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. . *The Veterinary Record.*, pp. 542-545.
- Sadlova, J. a. (2009.). Peritrophic matrix of Phlebotomus duboscqi and its kinetics during Leishmania major development. . *Cell Tissue Res.*, pp. 337(2): p. 313-25.
- Sano. (1949). Histological and cytological studies on the liquor contacting peptidergic neurons in the preoptic nucleus of the Japanese eel (Anguilla japonica).
- Saunders, E.C., & al. (2018.). Leishmania mexicana can utilize amino acids as major carbon sources in macrophages but not in animal models. *Mol Microbiol.*, pp. 108(2): p. 143-158.
- Savioli, g. a. ( 2021, avril 21 ). Serum amyloid A levels and alpha 2 and gamma globulins on serum protein electrophoresis in cats exposed to and infected with Leishmania infantum. *Parasites & Vectors*, p. 217.
- Schaible, U.E., & al. (1999.). Parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J Cell Sci.*, pp. 112 ( Pt 5): p. 681-93.
- Schlein, Y. R.-O. (1991. 2005. ). Chitinase secreted by Leishmania functions in the sandfly vector. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors Lutzomyia longipalpis and Phlebotomus papatasi. *Proc Biol Sci. Insect Mol Biol.*, pp. 245(1313): p. 121-6. 14(6): p. 703-12.
- Secundino, N. e. (2010. ). Proteophosphoglycan confers resistance of Leishmania major to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. . *Cell Microbiol.*, pp. 12(7): p. 906-18.

## Référence bibliographique :

- Serafim, T. e. (2018. ). Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. . *Nat Microbiol.*, pp. 3(5): p. 548-555.
- Sergent Ed, S. P. (1921). Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (Phlebotomus papatasi Scop.). C R Hebd Séances Acad Sci. , .
- Sergent et al., & Euzeby. (1912, 1994).
- Shaw, J. D. (1994,2012,1995). Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications, Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. The Kinetoplastid Hemoflagellates of Reptiles, in Parasitic Protozoa (Second Edition). . *Mem Inst Oswaldo Cruz, Parasit Vectors*, , pp. 89(3): p. 471-8, 5: p. 276. p161-223.
- Sideris et al., & Gradoni, G. e. (1999 , 2005).
- SILVEIRA NETO, L. D., MARCONDES, S. ( 2015, juin 10). Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, p. 1467.
- SIMÕES-MATTOS, L. M.-L.-J. (2005, février 28). The susceptibility of domestic cats (Felis catus) to experimental infection with Leishmania braziliensis. *Veterinary Parasitology*, pp. 199-208.
- SOARES, C. S. (2016). What do we know about feline leishmaniosis? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 435-442.
- Sogin, M. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, , pp. 1(4):p. 457-63.
- SOLANO-GALLEGO M. et ALBEROLA. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 676-680.
- Steverding, D. ( 2017). The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*, p. 10(1): p. 82.
- Stierhof, Y. e. (1999. 2004. ). Filamentous proteophosphoglycan secreted by Leishmania promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vecto. *Eur J Cell Biol. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. Nature.*, pp. 78(10): p. 675-89. 430(6998): p. 463-7.
- Sunderkotter, C., & al. (1993.). Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol.*, pp. 151(9): p. 4891-901.
- Sunter, J. e. ( 2019. ). Leishmania flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sand fly, and pathogenicity in the host. . *Proc Natl Acad Sci U S A.*, pp. 116(13): p. 6351-6360.
- TRAINOR, K. E. (2010). Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Veterinary Pathology*, 1076-1081.
- Tyler , & al. (2006). *Phytophthora Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis*.
- Ueno, N., & M.E. . (2012.). Wilson, Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.*, pp. 28(8): p. 335-44.
- univtoulousefr. (2024). *univ toulouse fr*. Récupéré sur THESE DEFINITIVE.DOC (univ-toulouse.fr).
- van , Z., G., & al. (2004.). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J Immunol.*, pp. 173(11): p. 6521-5.

### *Référence bibliographique :*

- van Zandbergen, G. e. (2006. 2009.). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci U S A, . Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. PLoS One. pp. 103(37):p. 13837-42. 4(5): p. e5733.
- vétérinaire, u. d. (s.d.). *envt Université de Toulouse - Ecole Nationale Vétérinaire*. Récupéré sur <https://envt.fr/lenvt/>.
- Vickerman. (2004).
- virbac. (s.d.). *virbac*. Récupéré sur <https://bvt.virbac.com/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/vector-borne-and-parasitic-disea/main/produits/speed-leish-k.html>.
- Walters, L. e. (1993.). Life cycle of Leishmania major . in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis . *Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae.*, pp. 30(4): p. 699-718.
- Walters, L. e. (1993.1994.). Life cycle of Leishmania major in the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis . The developmental biology of Leishmania promastigotes. *Kinetoplastida: Trypanosomatidae ; Diptera: Psychodidae. Exp Parasitol.*, pp. 30(4): p. 699-718.79(2): p. 215-8.
- Wanderley, J, L., & al . (2009.). Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One*,, p. 4(5): p. e5733.
- wikipedia. (s.d.). Récupéré sur [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Phlebotomus\\_sp\\_01.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Phlebotomus_sp_01.jpg).
- Zilberstein, D., & M. Shapira. (1994.). The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Annu Rev Microbiol*,, pp. 48: p. 449-70.
- Zink, A. e. (2006). Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper nubia. *Emerg Infect Dis*, pp. 12(10): p. 1616-7.