

Données épidémiologiques et parasitologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien.

K. Aoun (1), A. Bouratbine (1), Z. Harrat (2), I. Guizani (1), M. Mokni (3), S. Bel Hadj Ali (1), A. Ben Osman (3), M. Belkaïd (2), K. Dellagi (4) & R. Ben Ismaïl (1)

(1) Laboratoire de parasitologie clinique, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.

(2) Laboratoire de parasitologie clinique, Institut Pasteur d'Alger, Algérie.

(3) Service de dermatologie, EPS la Rabta, Tunis, Tunisie.

(4) Laboratoire d'immunologie, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.

Manuscrit n°2128. "Parasitologie". Reçu le 26 octobre 1999. Accepté le 23 novembre 1999.

Summary: Epidemiological and parasitological data for sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia.

This study refers to 23 patients presenting with the sporadic forms of cutaneous leishmaniasis encountered in northern most humid parts of Tunisia. Culture inoculation for parasitic isolation was processed using two media: the classical NNN and a rabbit serum based medium (SLC). Cultures were positive in 17 cases with SLC medium and 13 cases with NNN medium. Eight isolates were typed using 15 isoenzymes systems. Six isolates were identified as *Leishmania infantum* MON-24 which confirms the crucial role of this zymodeme in causing this form of cutaneous leishmaniasis. The other two isolates were identified as *Leishmania infantum* MON-1, which is the principal agent of visceral leishmaniasis in the Mediterranean area.

Résumé :

Vingt-trois prélèvements provenant de sujets atteints de leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien (LCS) ont été mis en culture sur le classique milieu NNN et le milieu sérum de lapin coagulé (SLC). Dix-sept cultures s'étaient révélées positives avec le milieu SLC contre seulement 13 avec le milieu NNN. Huit parmi les 17 isolats de leishmanies obtenus ont été typés par une méthode utilisant 15 systèmes iso-enzymatiques. Six souches ont été identifiées comme étant *Leishmania infantum* MON-24, confirmant le rôle prédominant de ce zymodème dans la genèse de la LCS. Les deux autres souches ont été identifiées comme étant *Leishmania infantum* MON-1, agent classique de la leishmaniose viscérale dans le bassin méditerranéen.

Leishmania infantum
cutaneous leishmaniasis
epidemiology
iso-enzymatic identification
laboratory
Tunisia
Northern Africa

Leishmania infantum
leishmaniose cutanée
épidémiologie
typage iso-enzymatique
laboratoire
Tunisie
Afrique du Nord

Introduction

La leishmaniose cutanée sévit en Tunisie sous trois formes noso-géographiques distinctes (4). La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), de loin la plus fréquente, est endémo-épidémique dans le centre et le sud pays (4). Elle est provoquée par *Leishmania (L.) major* et son réservoir principal est *Psammomys obesus* ou rat des sables (5, 6). La leishmaniose cutanée chronique (LCC) causée par *L. killicki* évolue en micro-foyers au sud-est du pays (8, 22). Enfin, la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS), causée par *L. infantum*, sévit dans le nord du pays où sa distribution géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale infantile (2, 7).

Bien qu'environ 30 cas de LCS soient répertoriés chaque année, un seul isolat parasitologique provenant de telles lésions a été typé et identifié comme étant *L. infantum* zymodème MON-24 (12). Le typage iso-enzymatique d'isolats supplémentaires revêt donc une importance particulière. Il contribuerait à une meilleure connaissance du cycle épidémiologique de cette forme qui reste à ce jour hypothétique.

Matériel et méthodes

Notre travail est une étude prospective réalisée durant les années 1996, 1997 et 1998 au laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de Tunis.

Population étudiée

Vingt-trois sujets ont été inclus dans l'étude. Ils présentaient tous une leishmaniose cutanée confirmée par la mise en évidence de leishmanies à l'examen direct des frottis dermiques. Dix-sept ont consulté dans le service de dermatologie de l'hôpital de la Rabta à Tunis et six nous ont été adressés par des médecins de libre pratique de la région de Tunis. Tous les patients étaient originaires du nord tunisien qu'ils n'ont pas quitté au moins pendant les deux années précédant l'apparition de leurs lésions cutanées.

Culture des leishmanies

Les prélèvements dermiques de tous les patients ont été inoculés, chacun sur un tube NNN (NOVY-NICOLLE-MAC NEAL) et un

tube de sérum de lapin coagulé (SLC). Ces milieux ont été préparés selon les recommandations de NICOLLE pour le milieu NNN et BELKAID pour le milieu SLC (3, 9, 18). Après ensemencement, les tubes ont été incubés à 22° C. Les repiquages ont été effectués tous les trois jours pour les milieux à base de SLC et tous les six jours pour les milieux NNN. Les cultures ont été abandonnées au bout du quatrième repiquage négatif.

Typage iso-enzymatique

Le typage iso-enzymatique a été effectué à l'Institut Pasteur d'Alger selon la méthode préconisée par RIOUX et coll (23). Quinze systèmes enzymatiques ont été étudiés : malate deshydrogénase (MDH, EC1.1.1.37), enzyme malique (ME, EC1.1.1.40), isocitrate deshydrogénase (IDH, EC1.1.1.42), 6-phosphogluconate deshydrogénase (6 PGD, EC1.1.1.44), glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PD, EC1.1.1.49), glutamate deshydrogénase (GLUD, EC1.4.1.3), NADH diaphorase (DIA, EC1.6.2.2), purine nucléoside phosphorilase (NP1, EC2.4.2.1. et NP2, EC2.4.2.), glutamate oxalocétate transaminase (GOT1 et GOT2, EC2.6.1.1), phosphoglucomutase (PGM, EC5.4.2.2), fumarate hydratase (FH, EC4.2.1.2), mannose phosphate isomérase (MPI, EC5.3.1.8), glucose phosphate isomérase (GPI, EC5.3.1.9).

L'identification a été faite par rapport à des souches de référence du complexe *L. infantum* dont MHOM/FR/78/LEM75 (zymodème MON-1), MHOM/DZ/82/LIPA59 (zymodème MON-24), MHOM/DZ/83/LEM425 (zymodème MON-80) et MHOM/FR/84/LEM 528 (zymodème MON-34).

Résultats

Données épidémiologiques

Parmi les 23 patients étudiés, 12 étaient de sexe masculin et 11 de sexe féminin (SR = 1,09). L'âge a varié de 7 mois à 49 ans avec une moyenne de 20,2 ans (ET ± 10,2). La répartition des cas selon l'origine géographique montre une distribution clairsemée dans tout le nord tunisien (figure 1). Une concentration de trois cas a été, cependant, notée dans la petite localité de "Pont de Bizerte" (figure 1).

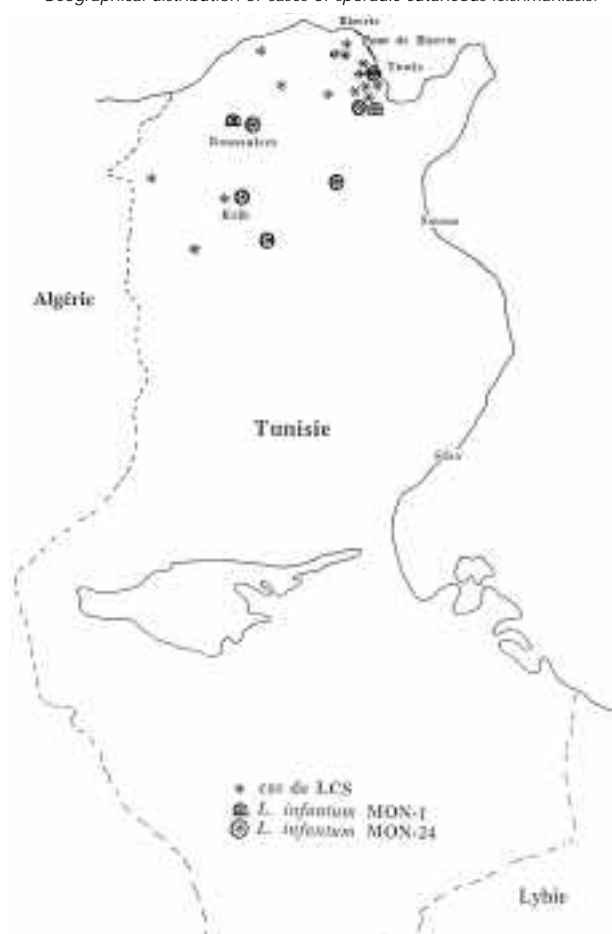
Tous les patients sauf un présentaient une lésion unique, localisée dans 21 cas sur 23 (91 %) au visage. Un patient avait une lésion de l'avant-bras. Enfin, la dernière patiente, âgée de 7 mois, avait de multiples lésions du visage apparues très tôt, dès l'âge de 4 mois.

Isolement parasitaire

Dix-sept parmi les 23 cultures étaient positives avec le milieu SLC, soit une sensibilité de ce milieu de 74 % (ES = 9,15 %). Par contre, seules 13 cultures s'étaient révélées positives avec le milieu NNN, ce qui donne une sensibilité de 56,5 % (ES = 10,33 %). Toutes les

Figure 1.

Répartition géographique des cas de leishmaniose cutanée sporadique.
Geographical distribution of cases of sporadic cutaneous leishmaniasis.



cultures positives avec le milieu NNN l'étaient aussi avec le milieu SLC, alors que 6 cultures sont restées négatives avec les deux milieux (tableau I).

Typage iso-enzymatique

Le typage iso-enzymatique de 8 des 17 souches isolées a révélé qu'elles appartiennent toutes au complexe *L. infantum* ; 6 sont des zymodèmes *L. infantum* MON-24 et 2 des zymodèmes *L. infantum* MON-1. L'isolat provenant de la lésion de l'avant-bras n'a pas été typé. La souche isolée chez la petite fille avec de multiples lésions du visage a été identifiée comme étant *L. infantum* MON-24.

Discussion

Depuis la description des premiers cas de LCS dans le nord tunisien (17, 19) des particularités cliniques propres à cette forme de leishmaniose cutanée ont été constatées permettant de la distinguer de la LCZ, endémo-épidémique dans le centre et le sud du pays. Parmi ces particularités, l'unicité des lésions et leur localisation préférentielle au visage, ont régulièrement été rapportées par les différents auteurs (2, 11). Dans notre série, les boutons ont intéressé le visage et étaient uniques dans 96 % des cas. Cependant, une observation privilégiée chez un nourrisson a montré que les lésions pouvaient être multiples (sept lésions). Ce tableau s'explique, très probablement, dans ce cas particulier par un déficit immunitaire congénital ou par l'immaturation du système immunitaire de la patiente dont les lésions avaient commencé dès l'âge de 4 mois. La répé-

Tableau I.

	Résultats des cultures. Result of cultures.		total
	SLC (+)	SLC (-)	
NNN (+)	13	0	13
NNN (-)	4	6	10
total	17	6	23

tion des piqûres du même ou de plusieurs phlébotomes infectés ne peut cependant être totalement exclue.

Malgré l'association de deux milieux de culture, le classique milieu NNN et le milieu à base de sérum de lapin coagulé (SLC), 6 parmi les 23 prélèvements ensemencés (26 %) sont restés négatifs, témoignant de la difficulté d'isolement de l'agent de LCS (3). L'utilisation systématique du milieu SLC, doté d'une meilleure sensibilité que le milieu NNN dans l'isolement de *L. infantum* (3), a permis de disposer de 4 isolats supplémentaires, portant le nombre de cultures positives à 17. Parmi les 17 cultures positives, 8 isolats ont fait l'objet d'un typage iso-enzymatique. Jamais autant d'isolats provenant de cas de LCS du nord tunisien n'avaient été typés. Six souches correspondaient à *L. infantum* MON-24, ce qui confirme le rôle prédominant de ce zymodème dans la genèse des cas de LCS en Tunisie. En effet, on ne disposait jusque-là que d'une seule identification de ce zymodème dans le nord tunisien et son incrimination comme agent principal de LCS se basait sur les données de pays voisins, en particulier l'Algérie dont le foyer de LCS se continue en Tunisie vers l'est (14). Un autre zymodème, *L. infantum* MON-1, agent classique de leishmaniose viscérale (10), a été identifié chez deux patients indemnes par ailleurs de tout signe clinique de leishmaniose viscérale. Il s'agit de la première description de ce zymodème comme agent de leishmaniose cutanée en Tunisie alors qu'il a déjà été incriminé en tant que tel en Algérie, en Italie et en France (13, 15, 21). Malgré leur appartenance au même zymodème MON-1, il n'est pas certain que le parasite dermatrope et celui viscérotrope soient strictement identiques mais des différences plus fines n'ont pu être mises en évidence par le système de typage iso-enzymatique utilisé.

Les deux zymodèmes, *L. infantum* MON-24 et *L. infantum* MON-1, ont une répartition clairsemée dans le nord tunisien et ne semblent pas se distribuer en foyers géographiques distincts. En effet, dans les deux localités, Boussalem et Sidjoui, où *L. infantum* MON-1 a été identifié, *L. infantum* MON-24 a été aussi isolé (figure 1). *L. infantum* MON-80, rapporté dans le nord tunisien au cours d'un cas de leishmaniose viscérale et isolé en Algérie chez 4 patients atteints de LCS (1, 15), n'a pas été mis en évidence dans notre série. Le réservoir de *L. infantum* MON-24 reste à ce jour inconnu. La présence de foyers mixtes de LV et de LCS pourrait suggérer que le chien, réservoir confirmé de *L. infantum* MON-1 (20), serait aussi celui de *L. infantum* MON-24. Cependant, malgré le nombre élevé d'isolements de souches canines dans les différents foyers méditerranéens de LCS, jamais ce dernier zymodème n'a été identifié chez cet animal. Le vecteur de la maladie reste aussi hypothétique en Tunisie. *Phlebotomus perfilliewi*, dont la présence a été confirmée dans les foyers de LCS, peut être suspecté car il a été trouvé infecté par *L. infantum* MON-24 dans des foyers limitrophes, particulièrement en Algérie (16).

Conclusion

Leishmania infantum MON-24 se confirme comme l'agent causal principal mis non exclusif de la LCS en Tunisie. Il a été identifié chez six patients alors que *L. infantum* MON-1 a été identifié chez deux autres patients. Par ailleurs, le milieu SLC semble plus sensible que le milieu NNN dans l'isolement de *L. infantum* MON-24. Son utilisation systématique en culture, non seulement chez l'homme mais également chez le phlébotome et le chien, permettrait de disposer de données supplémentaires qui aideraient à comprendre le cycle épidémiologique et par conséquent à mieux contrôler la LCS.

Remerciements

Ce travail a bénéficié du support financier du Programme national mobilisateur du Secrétariat d'État à la recherche scientifique tunisienne, PNM 96 (p96BSP46) et du Programme Avicenne de la CEE (Avi CT 20013). Les auteurs tiennent à remercier N. BAYAR pour sa collaboration technique.

Références bibliographiques

1. AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, MEHERZI A, BELKAID M *et al.* - Confirmation de la présence de *Leishmania infantum* MON-80 en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, **92**, 29-30.
2. BELHADJ S, DJAÏET-BARAKET Z, JEMLI B, BEN OSMAN A & CHAKER E - Leishmanioses viscérale et cutanée du nord. *Bull Soc Pathol Exot*, 1996, **89**, 269-273.
3. BELKAID M, HARRAT Z, HAMRIOUI B, THELLIER M, DATRY A & DANIS M - A propos d'un milieu simple pour l'isolement et la culture des leishmanies. *Bull Soc Pathol Exot*, 1996, **89**, 276-277.
4. BEN ISMAIL R & BEN RACHID MS - Epidémiologie des leishmanioses en Tunisie. In: *Maladies Tropicales Transmissibles*. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris, 1989, 73-80.
5. BEN ISMAIL R, BEN RACHID MS, GRADONI L, GRAMICCIA M, HELAL H & BACH HAMBDA D - La leishmaniose cutanée zoonotique en Tunisie. Etude du réservoir dans le foyer de Douara. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1987, **67**, 335-343.
6. BEN ISMAIL R, GRAMICCIA M, GRADONI L, BEN SAID M & BEN RACHID MS - Identificazione biochemica di isolati *Leishmania* della Tunisia. *Parassitologia*, 1987, **28**, 186-187.
7. BEN ISMAIL R, SMITH DF, READY P, AYADI A, GRAMICCIA M & BEN OSMAN A - Sporadic cutaneous leishmaniasis in North Tunisia: identification of the causative agent as *Leishmania infantum* by DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 58-510.
8. BEN RACHID MS & BEN ISMAIL R - Current situation in regard to leishmaniasis in Tunisia. In: WUEYRATNE P, WALTON B, MODABBER F, eds. 1988, *International Workshop on Control strategies for the leishmaniasis*.
9. BERREBI J - La culture des leishmanies. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 1936, **25**, 89-141.
10. BOURATBINE A, AOUN K, CHAHED MD & BEN ISMAIL R - Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile en Tunisie en 1993. *Méd Mal Infect*, 1998, **28**, 446-447.
11. CHAFFAI M, BEN RACHID MS, BEN ISMAIL R, BEN OSMAN A & MAKNI N - Formes clinico-épidémiologiques des leishmanioses cutanées en Tunisie. *Ann Dermatol Vénérol*, 1988, **115**, 1255-1260.
12. GRAMICCIA M, BEN ISMAIL R, GRADONI L, BEN RACHID MS & BEN SAID MA - *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in North Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, **85**, 370-371.
13. GRAMICCIA M, GRADONI L & POZIO E - Caractérisation biochimique de souches du complexe *Leishmania infantum* isolées en Italie. In: *Leishmania, taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEE, Montpellier, 1986, 445-454.
14. HARRAT Z, HAMRIOUI B, BELKAID M & TABET-DERRAZ O - Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, 1995, **88**, 180-184.
15. HARRAT Z, PRATLONG F, BELAZZOUG S, DEREURE J, DENIAU M *et al.* - *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 625-629.
16. IZRI MA & BELLAZOUG S - *Phlebotomus (Larrousius) perfilliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993, **87**, 399.
17. LADJIMI R & LAKHOUM M - Premier cas de bouton d'orient dans la banlieue de Tunis. *Arch Inst Past Tunis*, 1955, **32**, 331-336.
18. NICOLLE C - Culture du parasite du bouton d'orient. *C R Hebd Séances Acad Sci*, 1908, **146**, 842-853.
19. NICOLLE C & BLANC C - Extension de la région à bouton d'orient tunisienne. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 1917, **18**, 94.
20. NICOLLE C & COMTE C - Origine canine du kala-azar. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 1908, **3**, 99-103.
21. RIOUX JA, LANOTTE G, PRATLONG F *et al.* - La leishmaniose cutanée autochtone dans le sud-est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. *Méd Mal Infect*, 1985, **11**, 650-656.
22. RIOUX JA, LANOTTE G & PRATLONG F - *Leishmania killicki* sp (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). In: *Leishmania, taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEE, Montpellier, 1986, 130-142.
23. RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P *et al.* - Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes, Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum comp*, 1990, **65**, 111-125.