

Leishmania infantum MON-1 : seul zymodème isolé chez les chiens leishmaniens en Tunisie.

K. Aoun (1)*, M. F. Diouani (2), R. Benikhlef (3), A. Bouratbine (1), S. Ben Haj Ali (2), Z. Harrat (3), M. Bel kaïd (3), M. Kilani (4) & R. Ben Ismaïl (2)

(1) Laboratoire de parasitologie clinique, Institut Pasteur de Tunis, 13 Pl. Pasteur, BP 74, 1002 Tunis, Tunisie. Tél: 216 1 801 376. Fax: 216 1 791 833.

* E-mail : Karim.Aoun@fmt.rnu.tn

(2) Laboratoire d'épidémiologie et d'écologie parasitaire, Institut Pasteur de Tunis, Tunisie.

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

(4) Service de parasitologie, Ecole nationale de médecine vétérinaire, Sidi Thabet, Tunisie.

Manuscrit n°2474. "Parasitologie". Reçu le 30 septembre 2002. Accepté le 26/ décembre 2002.

Summary: *Leishmania infantum* MON-1: the only zymodeme isolated during canine leishmaniasis in Tunisia.

Iso-enzymatic characterization of 19 *Leishmania* strains isolated from Tunisian dogs revealed that all correspond to *Leishmania infantum* MON-1. This confirms the role of dog as a reservoir of the commonest zymodeme responsible for human visceral leishmaniasis in the Mediterranean basin. However, and in spite of the high number of identifications, many zymodemes, mainly the dermatotropic ones as *Leishmania infantum* MON-24, frequently reported in humans, had never been isolated from dogs. The study of their cultural characteristics may contribute to explain the particular iso-enzymatic profile of dogs strains.

Résumé :

Dix-neuf souches de leishmanies, isolées chez des chiens originaires de différentes régions de la Tunisie, ont été typées par électrophorèse des iso-enzymes. Toutes se sont révélées correspondre à *Leishmania infantum* MON-1, confirmant la prédominance de ce zymodème chez cet animal. L'absence, aussi bien dans cette série que dans celles de certains pays méditerranéens, de certains zymodèmes dermatotropes, fréquemment rencontrés chez l'homme, pose le problème de leur réservoir. La multiplication des isollements chez les hôtes potentiels et l'étude de la cinétique en culture des différents zymodèmes pourraient apporter d'éventuelles réponses.

zymodème
Leishmania infantum
canine leishmaniasis
identification
Tunisia
Maghreb
Northern Africa

zymodeme
Leishmania infantum
leishmaniose canine
identification
Tunisie
Maghreb
Afrique du Nord

Introduction

Leishmania (L.) infantum est endémique autour du bassin méditerranéen, en Amérique du Sud et en Chine (5). Il y est l'agent responsable aussi bien de la leishmaniose viscérale (LV) que de la leishmaniose cutanée sporadique (LCS). En Tunisie, ces 2 affections sont observées principalement dans le nord et le centre (2, 3).

Le chien est incriminé comme réservoir de *L. infantum* depuis 1908 (5, 15). L'identification presque systématique du zymodème viscérotrope *L. infantum* MON-1 dans les nombreux prélèvements canins confirme le rôle déterminant du chien dans le cycle de la LV (4, 8, 11, 12, 14). L'intervention du chien dans le cycle de la LCS n'est, cependant, toujours pas confirmée. En effet, malgré les multiples isollements, aussi bien en Tunisie que dans les autres pays méditerranéens, le chien n'a encore jamais été trouvé infecté par l'un ou l'autre de deux des principaux zymodèmes dermatotropes, *L. infantum* MON-24 et MON-33 (4, 8, 11, 12, 14, 16).

Ce travail présente une contribution supplémentaire à l'identification des souches de leishmanies isolées chez des chiens en Tunisie.

Matériel et méthodes

Isolats étudiés

Dix-neuf souches canines de leishmanies ont été étudiées. L'isolement a été fait en culture par inoculation des produits des ponctions ganglionnaires ou spléniques sur milieu NNN et/ou milieu de sérum de lapin coagulé.

L'origine géographique des 19 chiens est variable, sept provenaient du gouvernorat de Kasserine, endémique pour la LV, six du gouvernorat de Béja où prédomine la LCS et six de la région de Tunis où sont rencontrées les deux formes. Tous ont vécu au moins une saison de transmission de la leishmaniose, qui s'étend en Tunisie du mois de mai au mois d'octobre de chaque année, soit la saison pendant laquelle les phlébotomes vecteurs sont abondants et en pleine activité. Des signes cliniques évocateurs de leishmaniose, particulièrement l'altération de l'état général, la splénomégalie, les adénopathies et l'allongement des ongles, ont été observés chez 16 des 19 chiens. La sérologie, par la technique d'immunofluorescence indirecte était positive chez 18 d'entre eux, dont 13 avec des titres élevés, 1/400.

Typage iso-enzymatique

Le typage iso-enzymatique de toutes les souches a été effectué à l'Institut Pasteur d'Alger selon la méthode préconisée par RIOUX et coll. (18). Quinze systèmes enzymatiques ont été étudiés; malate déshydrogénase (MDH, EC1.1.1.37), enzyme malique (ME, EC1.1.1.40), isocitrate déshydrogénase (IDH, EC1.1.1.42), 6-phosphogluconate déshydrogénase (6 PGD, EC1.1.1.44), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD, EC1.1.1.49), glutamate déshydrogénase (GLUD, EC1.4.1.3), NADH diaphorase (DIA, EC1.6.2.2), purine nucléoside phosphorylase (NP1, EC2.4.2.1. et NP2, EC2.4.2.), glutamate oxaloacétate 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

Toutes les souches typées se sont révélées correspondre au zymodème *Leishmania infantum* MON-1.

Discussion

L'introduction, dans les années 80, du typage iso-enzymatique, considéré actuellement comme l'outil taxonomique de choix en matière de leishmanioses, a permis de distinguer au sein de l'espèce *L. infantum* de nombreux zymodèmes (16, 18). Certains zymodèmes sont considérés, depuis, plutôt viscérotropes et occasionnellement dermatotropes comme *L. infantum* MON-1 et d'autres principalement dermatotropes comme *L. infantum* MON-24 (1, 2, 6, 9, 10, 14, 16).

Bien que les isolements canins aient intéressé aussi bien des zones de LV que de LCS, le zymodème *L. infantum* MON-1 a toujours été largement prédominant. Nos résultats rejoignent dans ce sens les différentes séries méditerranéennes, particulièrement celles de JIMENEZ, GRADONI et BRANDONISIO qui n'ont isolé que ce zymodème chez, respectivement, 31 chiens d'Espagne, 16 chiens de l'île de Malte et 7 chiens d'Italie (4, 9, 14). Ces données confirment, d'une part, que le chien est indiscutablement le réservoir de *L. infantum* MON-1, agent de la LV dans le bassin méditerranéen, et que, d'autre part, la mise en évidence d'autres zymodèmes chez cet animal reste un événement rare (5, 15). En effet, en dépit du nombre important d'identifications méditerranéennes, certains zymodèmes dermatotropes, dont *L. infantum* MON-24, régulièrement retrouvé dans les prélèvements humains en Italie, en Algérie et en Tunisie (2, 12, 16), n'ont jamais été mis en évidence chez le chien. L'hypothèse de l'existence d'un réservoir animal pour ces zymodèmes reste donc posée et, en particulier, le rôle du chien demeure suspecté.

L'absence de *L. infantum* MON-24 des différentes séries de prélèvements canins pourrait être la conséquence d'une compétition en culture entre les souches. En effet, les associations de souches étant possibles chez le chien (17), la cinétique en culture peut aboutir, au bout des quelques repiquages nécessaires à l'isolement, à la sélection de certains zymodèmes, en l'occurrence *L. infantum* MON-1, et à la disparition d'autres (13). L'application sur les prélèvements canins initiaux de sondes à ADN ou d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces

zymodèmes "non compétitifs" permettrait de contourner le biais de la culture. Malheureusement, les outils de biologie moléculaire ou immunologiques, actuellement disponibles, ne permettent de distinguer que les espèces et pas encore les zymodèmes (13).

Par ailleurs, certains auteurs ont incriminé le faible rendement de certains milieux de culture dans l'isolement de *L. infantum* MON-24 (10). Ceci ne semble pas être la cause de l'absence de ce zymodème dans les séries car il a déjà été isolé, à plusieurs reprises, chez l'homme avec les mêmes milieux utilisés pour le chien (2).

La nature du site de prélèvement ne peut pas non plus expliquer les profils iso-enzymatiques restrictifs obtenus chez le chien. En effet, certains auteurs ont montré que les prélèvements effectués chez les mêmes chiens, qu'ils soient viscéraux ou cutanés, aboutissaient à l'isolement des mêmes zymodèmes (15).

Dans tous les cas, une approche plus exhaustive, privilégiant la multiplication des isolements et des typages aussi bien chez le chien, l'homme, évoqué dans certains foyers comme réservoir possible de *L. infantum* (7), et d'autres hôtes potentiels, à savoir certains rongeurs ou le renard déjà trouvés infectés (11), permettrait de mieux élucider les cycles des différentes formes de leishmanioses causées par cette espèce et ses principaux zymodèmes et ainsi mieux organiser la prophylaxie et la lutte.

Conclusion

Leishmania infantum MON-1 se confirme être en Tunisie, comme c'est déjà le cas dans les autres pays méditerranéens, le zymodème largement prédominant chez le chien. En revanche, le problème de l'existence ou de la nature de réservoirs animaux ainsi que l'hypothèse du rôle de réservoir joué par le chien pour les zymodèmes dermatotropes de *L. infantum* fréquemment isolés chez l'homme, restent posés.

Références bibliographiques

1. AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, BELKAÏD M & BEL HADJ ALI S - Profil particulier des zymodèmes de *Leishmania infantum* causant la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, **94**, 375-377.
2. AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, GUIZANI I, MOKNI M *et al.* - Données épidémiologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, **93**, 101-103.
3. BOURATBINE A, AOUN K, CHAHED MK & BEN ISMAIL R - Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile en Tunisie en 1993 (lettre). *Méd Mal Infect*, 1998, **28**, 446-447.
4. BRANDONISIO O, CARELLI G, CECI L, CONSENTI B, FASANELLA A & PUCCINI V - Canine leishmaniasis in the Cargano Promontory. *Eur J Epidemiol*, 1992, **8**, 273-276.
5. DEDET JP - Les leishmanioses: actualités. *Presse Méd*, 2000, **29**, 1019-1026.
6. DEL GIUDICI P, MARTY P, LACOUR JP, PERRIN C, PRATLONG F *et al.* - Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Arch Dermatol*, 1998, **134**, 193-198.
7. DIETZE R, BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K *et al.* - Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*, 1997, **25**, 1240-1242.
8. GALLEGO M, PRATLONG F, FISA R, RIERA C, RIOUX JA *et al.* - The life cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the old world. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001, **95**, 269-271.

9. GRADONI L, GRAMICCIA M, LÉGER N, PESSON B, MADULO-LEBLANC G *et al.*- Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese islands. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, **85**, 217-219.
10. GRAMICCIA M & GRADONI L - Successful *in vitro* isolation and cultivation of Italian dermatotropic strains of *Leishmania infantum* sensu lato. *Trans R Soc Trop Med. Hyg*, 1989, **83**, 76.
11. GRAMICCIA M, MAAZOUN R, LANOTTE G, RIOUX JA, LE BLANCO S *et al.*- Typage iso-enzymatique de 11 souches de *Leishmania* isolées en Italie continentale, à partir de formes viscérales murines, canines et vulpines. *Ann Parasitol*, 1982, **57**, 527-531.
12. 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.
13. IBRAHIM ME, SMYTH AJ, ALUI MH, BARKER DC & KHARAZMI A - The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infection with *Leishmania* parasites. *Acta Trop*, 1994, **57**, 327-332.
14. JIMENEZ M, FERRER-DUFOL M, CANAVATE C, GUTIÉRREZ-SOLAR B, MOLINA R *et al.*- Variability of *Leishmania infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol Letters*, 1995, **131**, 197-204.
15. MARTIN-SANCHEZ J, LEPE JA, TOLEDO A, UBEDA JM, GUEVARA DC *et al.*- *Leishmania infantum* enzymatic variants causing canine leishmaniasis in the Huelva province (South-western Spain). *Trans R Soc Trop Med. Hyg*, 1999, **93**, 495-496.
16. PRATLONG F, DEDET JP, MARTY P, PORTUS M, DENIAU M *et al.*- *Leishmania*-human immunodeficiency virus co-infection in the mediterranean basin: isoenzymatic characterisation of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis*, 1995, **172**, 323-326.
17. PRATLONG F, PORTUS M, RISPAIL P, MORENO G, BASTIEN P & RIOUX JA - Simultaneous presence in dogs of 2 zymodemes of the *Leishmania infantum* complex. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1989, **64**, 312-314.
18. RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P & PÉRIÈRES J - Taxonomy of *leishmania*. Use of isoenzymes, Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1990, **65**, 111-125.