

La leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : essais d'immunothérapie

Canine leishmaniosis due to Leishmania infantum: immunotherapy trials

Par Gilles BOURDOISEAU⁽¹⁾, Christophe HUGNET⁽²⁾,
Gérard-Marie PAPIEROK⁽³⁾ et Jean-Loup LEMESRE⁽⁴⁾
(communication présentée le 22 janvier 2004)

RÉSUMÉ

La plupart des méthodes disponibles aujourd'hui de traitement et de contrôle de la leishmaniose canine sont d'une efficacité limitée, aussi le développement de méthodes immunothérapeutiques est-il d'un grand intérêt. Des antigènes d'excrétion-sécrétion (Ag ES) de promastigotes de *Leishmania infantum* cultivés en milieu défini sont retenus.

Trois chiens leishmaniens en reçoivent 25 µg, 2 fois à 3 semaines d'intervalle, par la voie intra-dermique : un chien est traité pour la première fois selon ce protocole, les 2 autres avaient été traités antérieurement selon un protocole classique à base de glucantime et de zyloric. Une nette amélioration clinique est observée dès J15 après la première injection, ainsi qu'une forte activité leishmanicide des monocytes récoltés et une diminution significative des titres en anticorps. Aucune rechute clinique n'est enregistrée plus de 2 ans plus tard.

Mots-clés : chien, *Leishmania infantum*, immunothérapie.

SUMMARY

As most methods currently available to treat and control canine leishmaniasis have a limited efficacy, researchers are testing immunotherapeutic methods with great interest. Excreted-secreted antigens (ES Ag) of promastigotes of *Leishmania infantum* cultured in a defined medium were selected.

Three *Leishmania*-infected dogs received two intradermal injections of 25 mg of ES Ag, at 3 weeks interval. This treatment was the first ever in one of the dogs, whereas the other two had previously received a standard treatment with Glucantime® and Zyloric®. Marked clinical improvement was noted as of Day 15 after the first injection, as well as an intense leishmanicide activity in collected monocytes, and a significant decrease of antibody titres. No clinical relapse was recorded over two years later.

Key words: dog, *Leishmania infantum*, immunotherapy.

(1) DMV, Pr. , agrégé ENV, Dr. Univ-Lyon1, dipl. EVPC. Unité Parasitologie – Maladies parasitaires, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile.

(2) DMV, Clinique vétérinaire, 26160 La Bégude de Mazenc.

(3) Dr. Univ, Laboratoire BioVétoTest, 83500 La Seyne-sur-Mer.

(4) Dr. Univ. Dir. UR008 Pathogénie des trypanosomatidés, Institut de Recherche pour le Développement, BP 64501, 34394 Montpellier.

La leishmaniose canine est une protozoose zoonosique, infectieuse et inoculable, due à la multiplication dans les macrophages – et toute cellule à capacité macrophagique – d'un flagellé *Leishmania infantum*, transmis par la piqûre d'un diptère psychodidé : le phlébotome. De pronostic toujours réservé, cette maladie sévit essentiellement sur le pourtour méditerranéen et constitue aujourd'hui une préoccupation majeure de santé publique et un défi diagnostique et thérapeutique pour les vétérinaires. Des enquêtes épidémiologiques, des observations cliniques et des publications concernant des travaux de recherche fondamentale, des essais thérapeutiques et prophylactiques de terrain et l'utilisation des nouvelles méthodes de biologie moléculaire permettent aujourd'hui de mieux appréhender l'épidémiologie, la clinique et la pathogénie de cette zoonose (BOURDOISEAU, 2000).

• IMPORTANCE

De nombreuses enquêtes effectuées chez le chien révèlent une **prévalence** variable (figure 1, COULIBALY, 2002) selon la région géographique et la méthode utilisée : de 10 à 20 % selon les techniques sérologiques usuelles, la prévalence atteint plus de 60 % par la technique d'immuno-empreinte et 80 % par l'amplification génique (PCR) ; la moitié des animaux « positifs » sont asymptomatiques, soit parce qu'ils sont en incubation, soit parce qu'ils sont « résistants », soit enfin parce qu'ils évoluent vers la guérison (cf. pathogénie).

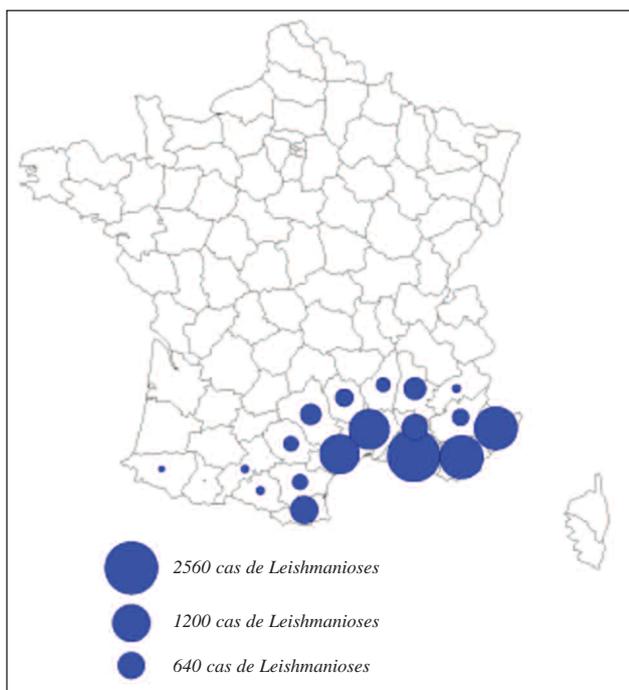


Figure 1. Carte de répartition des 12 424 cas cliniques examinés en consultation au cours de l'année 2000 par 495 vétérinaires (résultats d'une enquête du Réseau d'Epidémiosurveillance Franco-Italien des Zoonoses effectuée auprès de 1 792 praticiens et communiqués à la 2^e Journée d'actualités sur les leishmanioses, Nice, 30/11/2002).

L'**incidence** est préoccupante : DAVOUST (1994) observe une séroconversion de 83% en trois ans au sein de chenils de l'armée. La description de nouveaux foyers ectopiques instables (Sologne, Nantes, Limoges,...) et les facilités de déplacements des animaux en zone infectée ne peuvent que faire craindre une extension de la maladie et justifier les mesures de dépistage décidées par certains pays indemnes à l'égard de chiens importés. Les études à propos des récents foyers américains de leishmaniose canine ont permis de suspecter et/ou de confirmer certaines modalités de transmission : par transfusion sanguine, lors de l'accouplement, *in utero* et par contact.

Récemment, des espèces animales réputées non sensibles sont concernées : le chat (description de cas cliniques en France, très nombreux en Sicile), le cheval (formes cutanées décrites en Allemagne du sud et en Espagne).

Enfin dans les pays sud-européens, si la **leishmaniose humaine** reste d'une prévalence clinique faible (environ une trentaine de cas autochtones en France par an), son épidémiologie évolue (MARTY, DELAUNAY, LE FICHOUX, 2003): classiquement décrite chez l'enfant au siècle dernier (ce qui est encore le cas au Maghreb), cette protozoose devient une maladie de l'adulte le plus souvent immunodéprimé (traitement après une greffe, syndrome d'immunodéficience acquise). Une enquête effectuée chez 565 donneurs de sang positifs par immuno-empreinte et vivant en zone d'endémie du sud de la France (LE FICHOUX *et al.* 1999) a démontré que l'amplification de l'ADN parasitaire était positive chez 9 sujets, indiquant ainsi la présence à faible densité du parasite dans le sang de sujets « sains » qui apparaissent alors comme des porteurs asymptomatiques.

• FORMES CLINIQUES, DIAGNOSTIC, PATHOGÉNIE

La **maladie** chez le chien est bien connue et décrite depuis le début du siècle dernier : abattement, anorexie, amaigrissement et cachexie, adénomégalie, lésions cutanées et muqueuses multiples (alopécie, squamosis, ulcères), onychogryphose, uvéite, glomérulonéphrite. Toutefois, il est important de souligner la fréquence des formes atypiques décrites (BLAVIER *et al.*, 2001) : cutanées (nodulaire, pseudotumorale, pseudopyodermite), articulaires (arthralgie, œdème des extrémités, chute de griffes), cardiovasculaires (péricardite, hyperviscosité, thrombo-embolie), digestives (colite ulcéreuse, entérite hémorragique), respiratoires (rhinite, pneumonie), nerveuses,... La multiplicité de ces formes atypiques est en relation évidente avec l'augmentation du nombre de cas observés et la performance des méthodes de confirmation diagnostique.

Le **diagnostic** reste souvent un défi pour le praticien du fait du caractère protéiforme de la maladie : tout chien vivant en zone d'endémie et présentant l'un des symptômes évoqués antérieurement est suspect de leishmaniose ; il est par conséquent indispensable de confirmer l'hypothèse diagnostique par l'une des nombreuses méthodes disponibles qui n'ont pas toutes les mêmes avantages :

- la mise en évidence du parasite, méthode de choix parce qu'elle est de certitude mais souffrant d'un manque de sensibilité (environ 60 %, GRADONI, 2002) selon la nature et la fréquence des prélèvements analysés (biopsie cutanée, adénogramme, myélogramme) ;

- la sérologie (mise en évidence d'anticorps) selon plusieurs techniques (immunofluorescence indirecte, réactions de type elisa, immuno-empreinte, immunodiffusion rapide) : l'immunofluorescence indirecte reste la méthode de référence recommandée par l'OIE ;

- la PCR (Polymerase Chain Reaction) considérée comme une technique de choix; toutefois, sa sensibilité décroît avec le temps (QUINNELL *et al.*, 2001) démontrent qu'au sein d'une cohorte de 126 chiens exposés à une infection naturelle au Brésil, la PCR et l'ELISA donnent respectivement des taux de positivité de 88 % et 41 % en début d'infection (J0-J135) et de 50 % et 95 % à J300, la PCR étant en outre plus sensible chez les chiens malades.

La performance des techniques diagnostiques modernes ne dispense en rien de la démarche clinique incontournable dans laquelle le laboratoire ne fait que confirmer (ou infirmer) une hypothèse diagnostique argumentée, mais ne peut, à lui seul, asseoir un diagnostic.

La pathogénie est fort complexe et pour de nombreux aspects, encore inconnue. Toutefois, un schéma pathogénique issu des expérimentations effectuées chez diverses souches de souris (Balb/c sensibles versus C56 résistantes) et de l'exploration de l'immunité du chien (PINELLI, *et al.*, 1994) peut aujourd'hui être proposé (figure 2). Le célèbre paradigme Th1 versus Th2 a été historiquement établi chez la souris expérimentalement infectée par *Leishmania major*, ce modèle pouvant dans ses grandes lignes être extrapolé au chien. Le processus complexe peut être présenté en plusieurs étapes :

- les antigènes leishmaniens sont internalisés par une cellule présentatrice (la cellule de Langerhans migrant dans le derme) aux cellules cibles du système immunitaire, en particulier les lymphocytes T auxiliaires (Ly Th, h pour « helper ») ;

- selon le sujet, les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), certains gènes guidant le fonctionnement du système immunitaire, la nature des premières interleukines présentes,... le système immunitaire élabore une réponse favorable ou défavorable à l'organisme :

• une réponse dite Th1 caractérisée par un état « de résistance » à l'encontre des leishmanies : contrôle de la

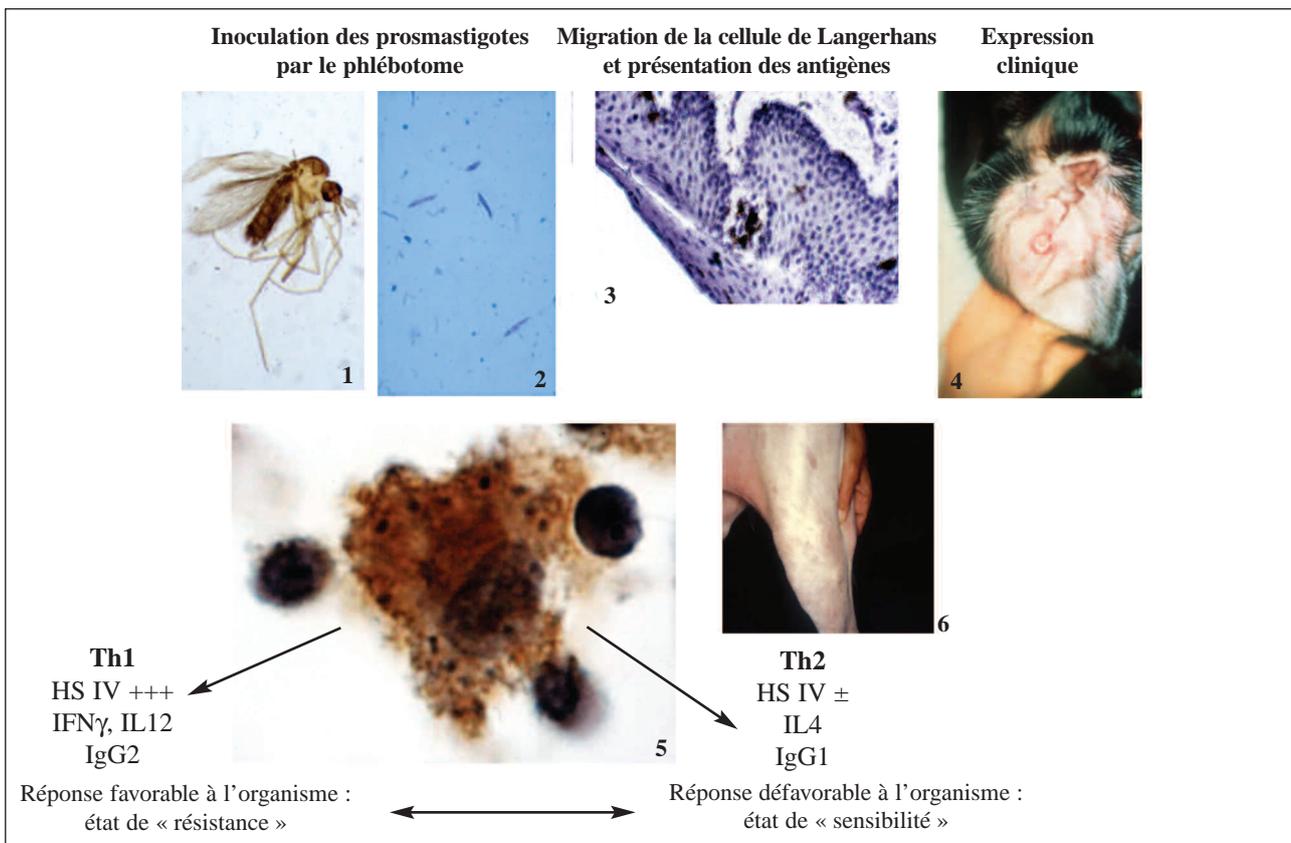


Figure 2. Schéma des conceptions pathogéniques actuelles à propos de la leishmaniose canine. Photographies de gauche à droite et de haut en bas : 1. Phlébotomus ; 2. promastigotes de *Leishmania infantum* ; 3. cellule de Langerhans en position intra-épidermique ; 4. chancre d'inoculation sur la face interne d'un pavillon auriculaire de chien (Dr. P. DENEROLLE) ; 5. cellule de Langerhans marquée ayant internalisé des leishmanies, dans un ganglion lymphatique ; 6. adénomégalie.
Th1 : réponse reposant sur l'activité des lymphocytes T helper de type 1) versus Th2 ; HS IV : hypersensibilité de type IV ou retardée ; IFN γ : interféron gamma ; IL12 : interleukine 12 ; IgG1/2 : immunoglobuline d'isotype G 1 (caractéristique de la réponse Th2) versus IgG2 caractéristique de la réponse de type Th1

multiplication des parasites, état d'hypersensibilité retardée, faible synthèse d'anticorps (plutôt d'isotype IgG2), aboutissant à un état clinique satisfaisant (peu ou pas de symptômes) et de faibles risques de rechute ;

- une réponse dite Th2 définissant une grande sensibilité : multiplication et dissémination du parasite au sein de l'organisme, faible état d'hypersensibilité, titres en anticorps très élevés (plutôt d'isotype IgG1) aboutissant à un état clinique très dégradé, et dans le cas de traitement, à des risques importants de rechute.

Ce schéma établi chez la souris et extrapolé dans les grandes lignes au chien permet d'expliquer : i) la résistance naturelle de certains animaux vis à vis du parasite (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000) fondée sur une réponse de type Th1 ; ii) la grande sensibilité d'autres animaux dont l'état général se dégrade rapidement et qui est fréquemment associé à des rechutes : réponse de type Th2. Il existe vraisemblablement des situations intermédiaires et la possibilité de passage d'un état favorable à un état péjoratif.

À partir de ce schéma pathogénique, il serait envisageable de concevoir une thérapeutique susceptible d'induire ou de favoriser un « état Th1 » soit à la faveur d'une vaccination chez l'animal sain, soit par une immunothérapie administrée à l'animal malade.

• PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES ET PROPHYLACTIQUES

Quelques molécules sont utilisables chez le chien ; les protocoles classiques ne sont pas totalement satisfaisants du fait d'une toxicité résiduelle en particulier rénale, de la lourdeur de la cure thérapeutique et des risques non négligeables de rechute. En outre, la thérapeutique ne doit pas favoriser l'émergence de souches résistantes susceptibles d'infecter l'homme ; il est par conséquent éminemment souhaitable de réserver certaines molécules de médecine humaine à un strict usage hospitalier.

Des études pharmacologiques confirmées par des essais terrain permettent désormais de retenir un **protocole de consensus** (DENEROLLE et BOURDOISEAU G, 1999) fondé sur l'association du Glucantime® (100 mg/kg/j, par la voie sous-cutanée, durant 20-30 jours) et du Zyloric® (15 mg/kg matin et soir, par la voie orale), ce dernier médicament devant être prescrit à vie afin de diminuer les risques de rechute.

Des essais effectués chez le chien (PAPIEROK *et al.* 2002 ; HUGNET *et al.*, 2002) démontrent que l'administration d'antigènes d'excrétion-sécrétion de promastigotes ou AgESP (ES Li p, brevet Institut de Recherche pour le Développement et laboratoire BioVétoTest) induit une réaction immunitaire de type Th1 à l'encontre des leishmanies amastigotes intramacrophagiques, c'est à dire une vaccination. Les mêmes AgESP administrés chez des animaux leishmaniens indiquent l'induction d'une réaction immunitaire à l'origine d'une destruction importante des parasites, et peuvent constituer les bases d'une thérapeutique : ce protocole et les résultats obtenus font l'objet de la présente publication.

Matériel et méthodes

Trois chiens leishmaniens (dont 2 en situation de rechute) sont sélectionnés sur la base de critères épidémiologiques (vie en zone d'endémie), cliniques (symptômes caractéristiques) et sérologiques (anticorps décelés par immunofluorescence à un titre supérieur à 1/400). Les animaux reçoivent 2 fois à 3 semaines d'intervalle, 25 µg de ces Ag par la voie intradermique, en association avec un adjuvant de l'immunité.

Les animaux sont suivis selon des critères cliniques, sérologiques (suivi selon la méthode d'immunofluorescence indirecte, le titre en anticorps étant relativement indicateur de la nature de la réponse immunitaire) et immunologiques : exploration de l'activité leishmanicide des monocytes récoltés à J 0 et J 60 et incubés avec les lymphocytes homologues et des promastigotes de leishmanies, permettant ainsi de mesurer l'inhibition de la multiplication du parasite par rapport aux mêmes types cellulaires récoltés chez des animaux témoins.

Résultats

Les résultats sont probants : amélioration clinique dès J 15, diminution du titre en anticorps à un taux de 1/200, différence significative du pouvoir leishmanicide (de l'ordre de plus de 70 % chez les animaux traités versus moins de 1 % chez les animaux témoins), absence de rechute clinique plus de 2 ans plus tard.

Discussion

L'innocuité de ces antigènes étant vérifiée par ailleurs par des études pré-cliniques (études réalisées à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, Pr. P. Berny – Pr. G. Bourdoiseau), ces résultats permettent d'aborder une phase exploratoire d'efficacité de ces antigènes utilisés comme modalité thérapeutique, en particulier chez des animaux en situation de rechute ou d'échec thérapeutique. Restent à déterminer la durée de l'efficacité et la fréquence des injections éventuelles à renouveler. En outre, ces antigènes du fait de leur capacité à induire une réaction Th1 sont retenus comme candidat vaccinal, sur des effectifs importants de chiens vivant en zone d'endémie, versus chiens placebo ; les résultats de cette vaccination à grande échelle sont actuellement en cours d'analyse.

Les progrès considérables enregistrés ne permettent pas d'envisager, à court terme, une éradication de cette zoonose ; ils autorisent néanmoins un contrôle plus efficace grâce à des outils diagnostiques performants, une thérapeutique mieux adaptée et des perspectives prophylactiques prometteuses. En outre, ces premiers résultats laissent entrevoir deux hypothèses supplémentaires : i) celle de tarir la source de parasites que représente le chien, et par conséquent d'envisager la diminution des risques de transmission à l'homme ; ii) enfin, celle d'une étude d'un candidat vaccinal similaire pour la leishmaniose humaine à *L. donovani*, ce qui démontrerait, s'il en était besoin, l'unicité de la médecine vétérinaire et de la médecine humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- BLAVIER A, KEROACK S, DENEROLLE Ph, GOY-THOLLOT I, CHABANNE L, CADORÉ JL, BOURDOISEAU G (2001) Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.*, **162**, 108-120.
- BOURDOISEAU G (2000) La leishmaniose. In : *Parasitologie clinique du chien*, Créteil: Neva Ed., 456 pp, 325-362.
- COULIBALY E (2002) Enquête sur les pratiques diagnostiques et thérapeutiques de la leishmaniose par les vétérinaires praticiens. In : *Proceedings de la 2^e Journée d'actualités sur les leishmanioses*, Nice, 30 novembre 2002, 42-54.
- DAVOUST B (1994) Épidémiologie de l'ehrlichiose, de la leishmaniose et de la dirofilariose canine. À propos de la situation actuelle dans les effectifs de l'armée française. *Rev. Med. Vet.*, **145**, 249-256.
- DENEROLLE Ph, BOURDOISEAU G (1999) Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniosis (96 cases). *J. Vet. Int. Med.*, **13**, 413-415.
- GRADONI L (2002) The diagnosis of canine leishmaniosis. In: *Proceedings of the second International canine Leishmaniosis Forum*, Séville, 2002, 7-14.
- HUGNET C, PAPIEROK G, HOLTZMULLER P, LEMESRE JL (2002) Therapy of canine leishmaniosis with new molecules. 18th ESVD-ECVD, Nice.
- LE FICHOUX Y, QUARANTA JF, AUFEUVRE JP, LELIEVRE A, MARTY P, SUFFIA I, ROUSSEAU D, KUBAR J (1999) Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France.. *J. Clinical Microbiology*, **37**, 1953-1957.
- MARTY P, DELAUNAY P, LE FICHOUX Y (2003) La leishmaniose viscérale méditerranéenne due à *Leishmania infantum*. I. Épidémiologie et principes du diagnostic. DiaMed Symposium, Société Française de Parasitologie, Marseille, 23 avril 2003, 27-29.
- PAPIEROK G, HOLTZMULLER P, HUGNET C, LEMESRE JL (2002) New drug and new methods of investigation for the therapy of canine leishmaniosis. 18th ESVD-ECVD, Nice.
- PINELLI E, KILLICK-KENDRICK R, WAGEBAAR J, BERNADINA W, DEL REAL G, RUITENBERG J (1994) Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, **62**, 229-235.
- QUINNELL RJ, COURTENAY O, DAVIDSON S, GARCEZ L, LAMBSON B, RAMOS P, SHAW JJ, SHAW MA, DYE C (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, **122**, 253-261.
- SOLANO-GALLEGO L, LLULL J, RAMOS G, RIERA C, ARBOIX M, ALBEROLA J, FERRER L (2000) The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitology*, **90**, 37-45.