

LES PHLÉBOTOMES (DIPTERA-PSYCHODIDAE) DE L'ÎLE DE CHYPRE II - PRÉSENCE DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM* NICOLLE, 1908 (ZYMODEME MON 1) CHEZ *PHLEBOTOMUS (LARROUSSIUS) TOBBI* ADLER ET THEODOR, 1930

LÉGER N.*, DEPAQUIT J.*, FERTÉ H.*, RIOUX J.A.**, GANTIER J.C.***, GRAMICCIA M.****, LUDOVISI A.****,
MICHAELIDES A.*****, CHRISTOPHI N.***** & ECONOMIDES P.*****

Summary : PHLEBOTOMINE SANDFLIES (DIPTERA PSYCHODIDAE) OF CYPRUS. II - ISOLATION AND TYPING OF *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM* NICOLLE, 1908 (ZYMODEME MON 1) FROM *PHLEBOTOMUS (LARROUSSIUS) TOBBI* ADLER AND THEODOR, 1930

During two surveys conducted in Cyprus (August 1998 and September 1999), 2,910 phlebotomine sandflies females were caught by CDC miniature light traps then dissected under binocular and examined on microscope. Eleven species were identified: *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti*, *P. jacusieli*, *P. alexandri*, *P. tobbi*, *P. galilaeus*, *P. mascittii*, *P. economidesi*, *Sergentomyia fallax*, *S. minuta* et *S. azizi*. The *Larroussius* species (*P. galilaeus* and *P. tobbi*) are the most abundant (more than 60 % of our captures). Promastigotes were isolated from one specimen identified as *P. tobbi*. A *Leishmania* stock was successfully cultured and identified by isoenzyme characterisation as belonging to *L. infantum* zymodème MON 1. The same zymodème was isolated and identified from four dogs too. Because of the absence of usual vectors of *L. infantum* in the eastern part of the Mediterranean basin (*P. neglectus* and *P. syriacus*), and according to its distribution in Cyprus, *P. tobbi* constitute certainly a good local vector. It seems to be not very anthropophilic, that could explain the very few human cases.

KEY WORDS : *Leishmania infantum*, *Phlebotomus tobbi*, dog, Cyprus, transmission.

Résumé :

Dans le foyer leishmanien cyprite, les auteurs ont disséqué 2 910 femelles de phlébotomes appartenant à 11 espèces : *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti*, *P. jacusieli*, *P. alexandri*, *P. tobbi*, *P. galilaeus*, *P. mascittii*, *P. economidesi*, *Sergentomyia fallax*, *S. minuta* et *S. azizi*. Les deux *Larroussius* (*P. galilaeus* et *P. tobbi*) sont les espèces les plus abondantes. Elles représentent plus de 60 % des captures réalisées avec des pièges CDC. Des promastigotes ont été observées chez un seul spécimen appartenant à l'espèce *P. tobbi*. Elles ont été mises en culture puis identifiées selon la méthode isoenzymatique. La souche de *Leishmania* isolée appartient à l'espèce *Leishmania infantum*, zymodème MON 1. Le même zymodème a été aussi isolé et identifié chez quatre chiens de l'île. En l'absence des vecteurs habituels de *L. infantum* dans l'est méditerranéen (*P. neglectus* et *P. syriacus*) et en raison de sa répartition à Chypre, *P. tobbi* constitue vraisemblablement un bon vecteur local. Sa faible anthropophilie expliquerait peut-être le très faible nombre de cas humains. Le rôle de *P. galilaeus* dans la transmission de la leishmaniose à Chypre reste à préciser.

MOTS CLÉS : *Leishmania infantum*, *Phlebotomus tobbi*, chien, Chypre, transmission.

INTRODUCTION

Bien qu'entourée de pays à haute endémicité leishmanienne, l'île de Chypre semble relativement épargnée. Toutefois, l'affection est présente chez l'Homme (Howard *et al.*, 1992) et chez le chien (Deplazes *et al.*, 1998).

Dès le premier inventaire des phlébotomes de Chypre, Adler (1946) évoque, du fait de l'absence dans l'île des vecteurs méditerranéens habituels de leishmaniose, le rôle éventuel des deux espèces *P. tobbi* Adler et

Theodor, 1930 et "*P. chinensis*" (= *P. kyreniae* Theodor, 1958) dans la transmission de l'affection. L'hypothèse du rôle local de *P. tobbi*, l'un des deux *Larroussius* (avec *P. galilaeus*) de l'île, est reprise, toujours sans preuve directe par Deplazes *et al.* (1998) dans un article consacré à une enquête séroépidémiologique et parasitologique sur la leishmaniose canine, actuellement en recrudescence dans la région.

En 1998, nous décidons de compléter cette dernière étude par une enquête parasitologique sur l'ensemble des espèces de phlébotomes précédemment recensées par d'autres auteurs (Adler, 1946; Minter & Eitrem, 1989) et nous-mêmes en 1993.

* Faculté de Pharmacie, 51096 Reims Cedex, France.

** Institut de Botanique, 34000 Montpellier, France.

*** Faculté de Pharmacie, 92290 Chatenay-Malabry, France.

**** Istituto Superiore di Sanità, 00161 Roma, Italia.

***** Veterinary Services, Nicosia, Cyprus.

Correspondance : N. Léger, Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.
Tél. : 03 26 91 37 23 – Fax : 03 26 91 35 97.

E-mail: jerome.depaquit@univ-reims.fr

Tirés à part : N. Léger, 63, avenue Pierre Semard, 94210 La Varenne Saint Hilaire, France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre enquête s'est déroulée en deux temps : en 1998, du 22 au 28 août et en 1999, du 5 au 18 septembre, à une époque nous semblant plus propice à l'isolement de leishmanies.

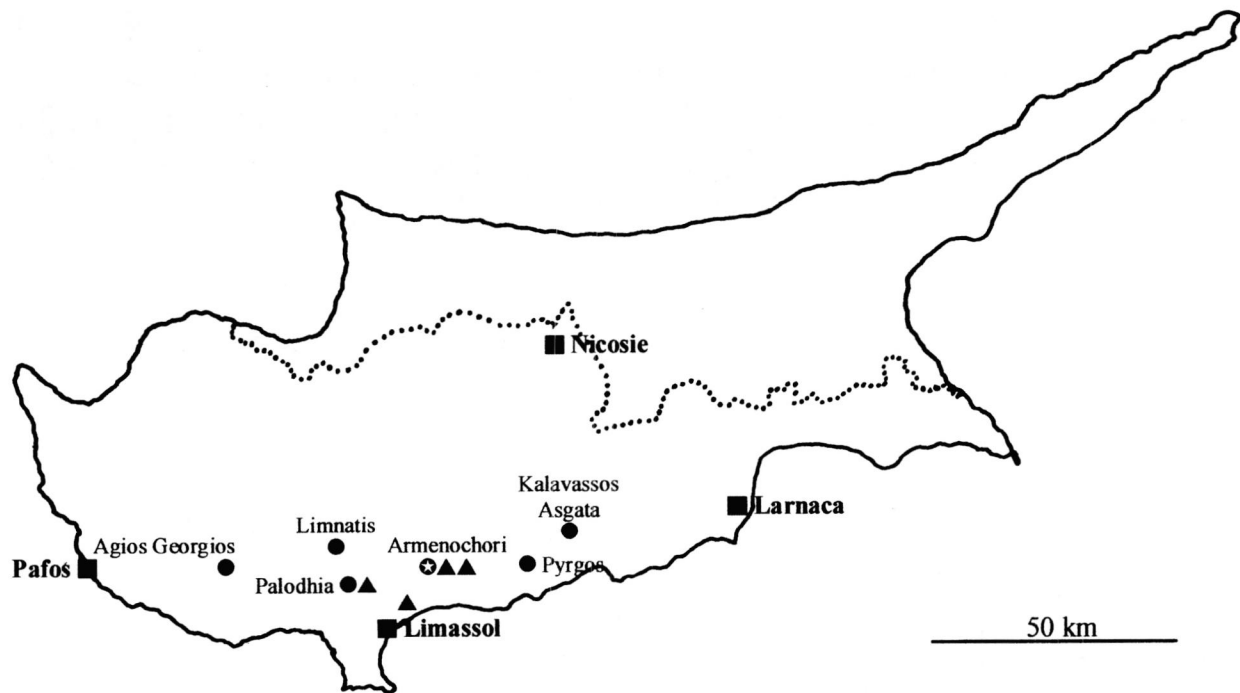


Fig. 1. – Carte illustrant les localités de capture des phlébotomes et les localités de prélèvement des chiens leishmaniens. (●) : station de capture des phlébotomes; ⊕ : station de capture du phlébotome infesté; ▲ : station de prélèvement d'un chien leishmanien).

Les localités de capture des phlébotomes (Fig. 1) ont été choisies en fonction des cas récents de leishmaniose canine observés (Deplazes *et al.*, 1998; observations des Services Vétérinaires) :

Agios Georgios (1) : sept cas en 1996,
 Armenochori : un cas en 1996, deux cas en 1998 et trois cas en 1999,
 Palodhia : un cas en 1999,
 Pyrgos : un cas en 1999,
 Limnatis : deux cas en 1996,
 Kalavassos et Asgata : trois cas en 1996.

Les captures ont été réalisées aux pièges CDC miniatures. Les femelles, tuées à la fumée de cigarette, ont été disséquées extemporanément sous la loupe binoculaire avec isolement du tube digestif dans une goutte de soluté physiologique stérile d'une part, de la tête et des spermathèques dans le liquide de Marc-André d'autre part. L'identification spécifique des phlébotomes et la recherche de leishmanies ont été faites au microscope.

Le tube digestif positif a été mis en culture sur trois milieux NNN à 10 % de sang de lapin, dont un additionné de trois gouttes de milieu cœur-cerveau et l'autre, de trois gouttes du même milieu plus trois gouttes d'urine filtrée stérilement. Dans chaque tube, 200000 unités de pénicilline ont été ajoutées.

(1) Plusieurs localités de ce nom existent dans l'île : celle indiquée par Deplazes *et al.* (1998) est erronée et nous l'avons rectifiée sur notre carte (Fig. 1).

Durant l'enquête de 1999, quatre chiens suspects ont fait l'objet de ponction *in vivo* de ganglion lymphatique puis, après euthanasie, de prélèvements et de frottis de rate, de foie et de moelle osseuse. Les frottis ont été colorés au Giemsa. Pour chaque chien, plusieurs cultures ont été réalisées à partir des divers prélèvements sur milieux NNN avec pénicilline purs, additionnés de milieu cœur-cerveau ou additionnés de milieu cœur-cerveau et d'urine filtrée stérilement.

Les souches de *Leishmania* isolées ont été identifiées par la méthode de caractérisation isoenzymatique à l'Istituto Superiore di Sanità en accord avec les procédures standardisées (Rioux *et al.*, 1990; Gramiccia *et al.*, 1995), par électrophorèse en gel épais d'amidon sur 15 systèmes isoenzymatiques: MDH, ME, ICD, PGD, G6PD, GLUD, DIA, NP₂, GOT1, GOT2, PGM, FH, MPI, GPI. Trois souches de référence OMS ont été utilisées : MHOM/TN/80/IPT1 pour *L. infantum* zymodème MON1, MHOM/SU/74/K27 pour *L. tropica* zymodème MON60 et MRHO/SU/59/P-strain pour *L. major* zymodème MON4.

RÉSULTATS

Le résultat des dissections figure dans les tableaux I (mission 1998) et II (mission 1999). Sur les 2910 femelles disséquées au cours des deux missions, seul un exemplaire de *Phlebotomus tobbi* cap-

Espèces	Stations				Total
	Agios Georgios	Armeno-chori	Lim-natis	Kalavassos Asgata	
<i>P. papatasi</i>	133	40	–	35	208
<i>P. sergenti</i>	–	34	–	–	34
<i>P. jacusieli</i>	–	–	–	–	0
<i>P. alexandri</i>	2	–	–	–	2
<i>P. tobbi</i>	103	49	–	2	154
<i>P. galilaeus</i>	106	47	–	–	153
<i>P. mascittii</i>	–	1	–	–	1
<i>P. economidesi</i>	–	–	–	–	0
<i>S. minuta</i>	21	38	2	1	62
<i>S. azizi</i>	12	4	–	1	17
<i>S. fallax</i>	1	7	–	3	11
Total	378	220	2	42	642

Tableau I. – Détail par espèces et par localités de captures des dissections pratiquées en 1998.

Espèces	Stations				Total
	Armeno-chori	Agios Georgios	Palo-dhia	Pyrgos	
<i>P. papatasi</i>	124	112	5	22	263
<i>P. sergenti</i>	5	13	1	1	20
<i>P. jacusieli</i>	–	1	–	1	2
<i>P. alexandri</i>	1	19	–	–	20
<i>P. tobbi</i>	251	279	2	11	543
<i>P. galilaeus</i>	792	172	–	6	970
<i>P. mascittii</i>	–	–	–	–	0
<i>P. economidesi</i>	1	5	–	–	6
<i>S. minuta</i>	50	183	1	2	236
<i>S. azizi</i>	8	70	–	5	83
<i>S. fallax</i>	41	82	2	–	125
Total	1273	936	11	48	2268

Tableau II. – Détail par espèces et par localités de captures des dissections pratiquées en 1999.

turé dans la nuit du 10 au 11 septembre 1999 dans une ferme isolée d'Armenochoiri, au dessus de la niche d'un chien leishmanien (Fig. 2), s'est révélé positif avec des formes promastigotes au niveau de l'intestin antérieur. Le démarrage de la culture a été tardif et a nécessité plusieurs repiquages successifs. En revanche, celui des cultures réalisées à partir des chiens positifs à l'examen direct, a été plus rapide.

Toutes les souches (une à partir de *P. tobbi* et quatre à partir des chiens) ont été typées à l'Istituto Superiore di Sanità de Rome. Elles appartiennent au zymodème MON1.

DISCUSSION

En Grèce, le vecteur habituel, prouvé de *Leishmania infantum* est *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (Léger *et al.*, 1988) et plus à l'est, au



Fig. 2. – Chien leishmanien d'Armenochoiri (cliché P. Léger).

Proche-Orient, sans doute *P. syriacus* Adler et Theodor, 1931, vecteur suspecté mais non prouvé.

En 1997 (Rioux *et al.*, 1998), une souche de *Leishmania donovani* proche de MON 3 a été isolée en Syrie nord-occidentale (région de Kassab) de *P. tobbi*. A notre connaissance, il s'agit ici du premier isolement de *L. infantum* chez *P. tobbi*. Cette observation pose une fois de plus le problème des rapports existant entre *L. infantum* et *L. donovani* ainsi que celui de la spécificité de leurs vecteurs respectifs.

Le zymodème MON1 auquel appartient cette souche, zymodème le plus fréquent de *Leishmania infantum* en zone méditerranéenne, est responsable de la majorité des cas de leishmaniose viscérale humaine, canine et de cas sporadiques de leishmaniose cutanée humaine (Gramiccia *et al.*, 1997).

Au cours de nos trois enquêtes à Chypre, les captures sur appât humain ne nous ont fourni que *P. papatasi*, qui y est très agressif pour l'Homme, et jamais *P. tobbi* ni *P. galilaeus* particulièrement abondants autour des chenils. Dans cette île, *P. tobbi* apparaît donc comme peu anthropophile, ce qui expliquerait le petit nombre de cas humains de leishmaniose répertoriés (Deplazes *et al.*, 1998) au regard de l'activité actuelle évidente du cycle canin.

REMERCIEMENTS

Nous remercions messieurs Symeon Matsis (Permanent Secretary, Ministry of Agriculture, Natural Resources and Environment, Cyprus), Savvas Theophanous (Director, Department of Forest, Ministry of Agriculture, Natural Resources and Environment, Cyprus) and Christos Alexandrou (Director, Forestry College, Ministry of Agriculture, Natural Resources and Environment, Cyprus) pour leur hospitalité et leur assistance qui ont rendu cette étude possible.

RÉFÉRENCES

- ADLER S. The sandflies of Cyprus (Diptera). *Bulletin of Entomological Research*, 1946, 36, 497-511.
- ADLER S., THEODOR O. & LOURIE E.M. On sandflies from Persia and Palestine. *Bulletin of Entomological Research*, 1930, 21, 529-539.
- DEPLAZES P., GRIMM F., PAPAPRODROMOU M., CAVALIERO T., GRAMICCIA M., CHRISTOFI N., ECONOMIDES P. & ECKERT J. Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. *Acta tropica*, 1998, 71, 169-178.
- GRAMICCIA M. Le leishmaniosi del Vecchio Mondo. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 1997, 33, 231-239.
- GRAMICCIA M., GRADONI L. & TROIANI M. Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 128, 33-38.
- HOWARD M.K., OGUNKOLADE W., BRYCESON A.D.M., DAVIDSON R.N., MOODY A.H. & MILES M.A. A DNA probe for human visceral leishmaniosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992, 86, 35-36.
- LÉGER N., GRAMICCIA M., GRADONI L., MADULO-LEBLOND G., PESSON B. FERTÉ H., BOULANGER N., KILLICK-KENDRICK R. & KILLICK-KENDRICK M. Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1988, 82, 419-420.
- MINTER D. & EITREM U. Sandflies and disease in Cyprus; 1944-1985. In *Leishmaniasis – The current status and new strategies for control*. (ed by Hart D.T.), Plenum press., New York, 1989, 207-216.
- RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1990, 65, 111-125.
- RIOUX J.A., LÉGER N., HADDAD N., GRAMICCIA M., JALOUK L., DEREURE J., AL-KHIAMI A. & DESJEUX P. Infestation naturelle de *Phlebotomus tobbi* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania donovani* s. st. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), en Syrie. *Parassitologia*, 1998, 40 (Suppl. 1), 148.
- THEODOR O. Psychodidae-Phlebotominae. *Die Fliegen der Palearktischen Region*, 1958, 201, 1-55.

Reçu le 9 mars 2000

Accepté le 11 mars 2000