

CHAPITRE II : Critères d'identification des leishmanies :

Depuis le début du siècle, l'identification des leishmanies bénéficia de nombreux travaux. Les méthodes utilisées font simultanément appel à des caractères intrinsèques et à des caractères extrinsèques (Lumsden ,1974).

II -1- Critères intrinsèques :

Les leishmanies isolées sont identifiées par des méthodes moléculaires, immunologiques et / ou biochimiques.

II -1- A - Critères moléculaires type ADN :**- PCR :**

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) ; elle a une sensibilité semblable à celle des méthodes basées sur la culture, mais donne des résultats beaucoup plus rapidement. Dans la leishmaniose canine, l'efficacité des diagnostics par la PCR en comparaison avec la sérologie dépend du cours naturel de la maladie, la sensibilité étant la plus élevée brièvement après infection (88%), déclinant par la suite (50%). Dans la CL et la MCL ,la PCR apparaît plus sensible que n'importe quelle méthode de diagnostic recommandée auparavant .

II -1- B -critères immunologiques :

* les techniques sérologiques comme :

1- la technique ELISA :

Méthode immunoenzymatique, elle peut être exécutée sur un sérum ou sur un volume de sang, est collecté par piqûre avec une aiguille sur des bandes de papier absorbant approprié et laisser à sécher .L'échantillon est élué et testé avec une seule dilution déterminée auparavant pour donner une spécificité et une sensibilité acceptables. Cette épreuve peut être utilisée pour des enquêtes séro-épidémiologiques dans les conditions de terrain.

2-Limmunofluorescense indirecte (I F I) :

Introduite depuis 1968 par Quilci, elle est la technique de diagnostic la plus utilisée dans les laboratoires. L'antigène figuré est habituellement constitué de promastigotes. Les résultats sont meilleurs avec les antigènes les plus proches des espèces sévissant dans les zones de contamination. Les titres seuil se situent entre 1/80 et 1/100 selon les laboratoires. Cette réaction présente l'avantage d'être : sensible, bien lisible assez facile à réaliser, demandant peu de matériel (réactifs et appareillages), peu de sérum, relativement rapide (une demi-journée).

3- Le western blot :

Appelée également immuo-empreinte, c'est une technique extrêmement sensible, réservée aux laboratoires spécialisés.

Plusieurs bandes spécifiques d'emprunts leishmaniennes ont été décrites dans ce test.

La présence d'une des deux bandes de PM 14 ou 16 Kda signe le diagnostic (Marry, 1994).

La technique des anticorps monoclonaux : est appliquée à l'analyse et la classification des espèces et de sous-espèce de leishmania du nouveaux et du vieux monde. Cette analyse doit être quantitative, car la quantité de même antigène de surface peut varier parmi les espèces de leishmania.

II -1- C - critères biochimiques :**L'agglutination par les lectines :**

Les lectines peuvent agglutiner les leishmanies dont les glucides membranaires varient d'une espèce à l'autre. Cette technique est basée sur la présence du substrat (acides aminés, sucres) marqué au C_{14} par les promastigotes en culture. Des différences dans l'activité enzymatique des leishmanies sont ainsi mesurées par libération de $C_{14}O_2$ selon les espèces.

Caractérisation des isoenzymes :

Cette technique est aussi connue sous le nom de MLEE pour **M**ulti **L**ocus **E**nzyme **E**lectrophoresis. Pour une protéine de même fonction enzymatique, entre, différents organismes. Cette mobilité est due à la charge électrique globale de l'enzyme laquelle est une résultante de la charge élémentaire de chaque acide aminé. (Pasteur, 1987).

Bien qu'utilisée depuis les années 60, elle demeure la technique standard de typage des leishmanies choisis par la plupart des laboratoires et plus spécifiquement par les centres de référence OMS. D'un point de vue taxonomique, elle a permis d'identifier bon nombre d'espèce et de complexe d'espèce et de mettre en évidence l'existence de souches hybrides entre différentes espèces (Kelly, 1991 ; Belly 1994 ; Dujardin, 1995)

II-2-Critères extrinsèques :

Les critères extrinsèques contiennent les critères cliniques, biologiques et morphologiques.

II-2-1-Critères morphologiques :

Les leishmanioses possèdent une remarquable homogénéité structurale aussi bien dans les formes amastigotes que promastigotes.

Le microscope électronique a également été utilisé à des fines identifications ; le diamètre, le nombre de microtubules et la distance entre les microtubules ont été prises en considération, (Pratlong et Lanotte, 1999)

Dans l'ensemble, les critères morphologiques ne sont pas suffisamment discriminants pour différencier des leishmanies, ainsi, ils ont été rapidement abandonnés. (Dumon et Piarroux, 1995)

II-2-2- Critères cliniques :

Les critères discriminants se basent sur la pathologie, les aspects cliniques de la maladie, ce sont surtout des symptômes cliniques qui ont attribué aux leishmanies leurs noms d'espèce ou de sous-espèce (Pratlong et Lanotte, 1999).

II-2-3- Caractères culturels :

Des essais d'identification des leishmanies par culture *in vivo* ont été réalisés. La cinétique de croissance sur milieu NNN a été utilisée par Lainson et Shaw, (1972) pour différencier les souches à croissance rapide et les souches à croissance lente. L'étude des besoins métaboliques adaptés aux techniques bactériologiques ont également été appliqués, (Pratlong et Lanotte, 1999)

Le comportement chez l'animal de laboratoire :

Le pouvoir pathogène expérimental a été pendant longtemps l'un des critères d'identification des différents taxons du genre *leishmania*.

Plusieurs travaux se sont développés par la suite, dans un but d'identification des parasites. Deux points ont été particulièrement retenus : le tropisme et la rapidité de développement chez l'hôte vertébré expérimental. (Pratlong et Lanotte, 1999).

Comportement chez le vecteur : L'identification des phlébotomes vecteurs dans un foyer donné a constitué un important critère épidémiologique pour la définition des « espèces leishmanniennes ».

Le comportement du parasite chez le vecteur :

Soit expérimentalement, soit *in natura*, a également été utilisée pour différencier les leishmanies.

Le développement du parasite dans le tube digestif de l'insecte est considéré comme un critère majeur de subdivision du genre *leishmania* par Lainson et Shaw en 1979. (Dumon et Pianoux, 1995 ; Pratlong et Lanotte, 1999).

Classification:

Les leishmanioses sont des parasites protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des kinetoplastidés ; la famille des trypanozomatides et au genre *leishmania* (Ross, 1903) . Différents types de classification ont été successivement appliqués au genre *Leishmania*. Ceux proposés entre 1916 et 1987 appartiennent à la classification linnéenne, classifications fondées sur quelques caractères hiérarchiques. Lainson et Shaw sont les auteurs qui ont travaillé le plus sur ces types de classification. Le dernier classement (1987) a divisé le genre *Leishmania* en deux sous-genres: *Leishmania* stricto sensu, présent dans les deux Ancien et du Nouveau Monde, et *Viannia*, limitée à Nouveau Monde. Dans ces deux sous-genres des complexes de différentes espèces ont été individualisées.

Depuis les années 1980, des classifications phylogénétiques ont été utilisées. L'analyse cladistique a permis une étude plus détaillée de certains groupes et conduire à la création de nouveaux complexes (*L. infantum*, *L. turanica* et *L. guyanensis*), et aussi pour le groupement dans le même complexe de taxons précédemment séparés (*L. guyanensis*, *L.* et *L. panamensis Shawi*). (Lainson, 1987)

Classification simplifiée du genre *Leishmania*, dérivée de l'analyse phylogénétique de Rioux et al. Fondée sur les isoenzymes (1990).

a- Sous-genre *Leishmania* Ross, 1903

<i>L. donovani</i> complexe	<i>L. donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903) <i>L. archibaldi</i> Castellani & Chalmers, 1919
<i>L. infantum</i> complexe	<i>L. infantum</i> Nicolle, 1908 (syn. <i>L. chagasi</i> Cunha et la maladie de Chagas, 1937)
<i>L. Tropica</i> complexe	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)
<i>L. killicki</i> complexe	<i>L. killicki</i> Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986
<i>L. aethiopica</i> complexe	<i>L. aethiopica</i> Bray, Ashford & Bray, 1973
<i>L. graves et complexes</i>	<i>L. major</i> Yakimoff & Schokhor, 1914
<i>L. turanica</i> complexe	<i>L. turanica</i> Strelkova, Peters & Evans, 1990
<i>L. gerbilli</i> complexe	<i>L. gerbilli</i> Wang, Qu & Guan, 1964
<i>L. arabica</i> complexe	<i>Arabica L.</i> Peters, Elbihari & Evans, 1986
<i>L. Mexicana</i> complexe	<i>L. Mexicana</i> Biagi, 1953 (syn. <i>L. pifanoi</i> Medina & Romero, 1959)
<i>L. amazonensis</i> complexe	<i>L. amazonensis</i> Lainson et Shaw, 1972 (syn. <i>L. garnhami</i> Scorza et al, 1979) <i>L. aristidesi</i> Lainson et Shaw, 1979

b- 1987 Sous-genre *Viannia* Lainson et Shaw, 1987

<i>L. braziliensis</i> complexe	<i>L. braziliensis</i> Vianna, 1911. <i>L. peruviana</i> Velez, 1913
<i>L. guyanensis</i> complexe	<i>L. guyanensis</i> Floch, 1954 <i>L. panamensis</i> Lainson et Shaw, 1972 <i>Shawi</i> Lainson L. et al, 1989
<i>L. naiffi</i> complexe	<i>L. naiffi</i> Lainson et Shaw, 1989
<i>L. lainsoni</i> complexe	<i>L. lainsoni</i> Silveira et al, 1987