



Institut des Sciences Vétérinaires



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
UNIVERSITÉ DES FRÈRES
MENTOURI CONSTANTINE

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI DE CONSTANTINE
INSTITUT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES EL KHROUB

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

MEDKOUR Hacène

Né le 28 Septembre 1990, à Alger

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR en sciences**

Filière : Sciences vétérinaires

Option : Immunologie animale

**Approches innovantes dans la prévention et le
traitement de la leishmaniose canine à
Leishmania infantum en Algérie**

**Innovative approaches in the prevention and
treatment of canine leishmaniasis due to
Leishmania infantum in Algeria**

Soutenue publiquement le 24/01/2023

Jury de la thèse :

Pr BERERHI El hacene	Université des frères Mentouri-Constantine 1	Président du jury
Pr TITI Amal	Université des frères Mentouri-Constantine 1	Examinatrice
Pr LAATAMNA AbdElkarim	Université de Djelfa	Examineur
Pr BITAM Idir	ESSAIA, Alger.	Examineur
Pr MEKROUD Abdeslam	Université des frères Mentouri-Constantine 1	Directeur de thèse
Dr LAFRI Ismail	Université de Blida 1	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur **Abdeslam MEKROUD**, mon directeur de thèse, pour avoir dirigé ce travail. Merci pour la confiance, le temps, l'assistance et les conseils qu'il a dispensés pour moi, depuis le premier jour. Merci pour ses qualités humaines. Je le prie d'accepter l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie le Docteur **Ismail LAFRI**, mon co-directeur de thèse, pour avoir co-dirigé ce travail de thèse. Sa disponibilité, son aide sur le terrain, son soutien de toute nature et ses conseils m'ont permis de mener à bien mes travaux de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Toute ma gratitude envers le Professeur **El hacene BERERHI** qui a accepté de présider le jury de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier le Professeur **Idir BITAM** d'avoir accepté d'examiner le fruit de ces années de travail ainsi que pour son aide incontournable dans la réalisation de mes travaux. J'éprouve un profond respect pour son aide, son parcours, son esprit scientifique ainsi que pour ses qualités humaines. Je remercie également chacun des membres de mon jury, la Professeure **Amal TITI** et le Professeur **AbdElkarim LAATAMNA** de m'avoir fait l'honneur d'être les examinateurs de ma thèse, et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'adresse toute ma reconnaissance au Dr vétérinaire **Bernard DAVOUST** et au Docteur **Oleg MEDIANNIKOV** de m'avoir reçu et formé à l'IHU Méditerranée Infection à Marseille, ainsi que pour leurs aides très précieux. Merci énormément. Mes remerciements vont aussi aux dirigeants et aux chercheurs de **CEVA Santé Animale, France**, en particulier, Madame **Marie VARLOUD**, responsable technique de Parasitologie pour les animaux de compagnie. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans votre appui scientifique, votre soutien moral et votre aide financière. Veuillez tous accepter l'expression de mes sincères remerciements.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes et je tiens à remercier tous mes co-auteurs, mes amis et collègues vétérinaires praticiens et universitaires. Sans leur collaboration, ces projets ne seraient, sûrement pas, achevés. Un grand merci aux docteurs: Aziz Lounes, Mohamed Azaz, Hamza Hamidat, Younes Laidoudi, Fouad Kermia, Dahmen Chaba, Salim Achite, Amine Aouadi, Bilel Mouissi, Fethi Mazari, Hocine Madoui, Mahfoud Rassoul, Hamza Laajal, Saadi Hannaoui, Mohamed Rahal, Ramdani Nacira, Bellatreche Aicha-Yasmine, Ghiles Alileche, Fateh Ghomara, Rodouane Kara. Merci pour tous les moments partagés ensemble et pour votre aide de toute nature.

Mes sincères remerciements vont ensuite à mes amis et collègues de l'IHU à Marseille et de l'IRD à Montpellier qui ont participé à égayer mes journées. Un grand Merci aux membres de mon équipe iHAT et à mes amis à Mivegec, à Julien, Dorothée, Rodolphe, Félix, Florian, Idalba, Lauryne, Quentin, Ai-rada. Merci à Idris, Mathilde, Lauriane, Jordan pour votre soutien permanent et tous les autres que je n'ai pas cités, vous êtes tous adorables.

Je remercie le **service de post graduation à l'ISV d'ELKroub** pour leur gentillesse et réponses à nos questions. Recevez tout mon estime et respect.

Je finis par remercier ma famille, c'est l'énergie renouvelable, à Mon **Papa** que Dieu te garde pour nous, à Ma **Maman** « paix à ton âme » tu es toujours avec nous, à Ma **Tante**, à mes **grand-parents**, qui avez tout oeuvré pour ma réussite, en reconnaissance de tous vos sacrifices consentis et vos précieux conseils, pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous. Aucun mot ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous, recevez à travers ce travail, aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Je remercie mes chers frères, **Ali, Hamoud, Lakhdar, Omar et Said** et mes chères soeurs, **Fatiha, Souad et Samira**, ainsi que leurs maris et épouse mes chers neveux et nièces. Merci pour le soutien et l'éternelle affection que vous avez toujours eus à mon égard. Je vous adresse toute mon affection. Spéciale dédicace à mes petits : ma petite soeur **Rihab** et mon petit frère **Mohamed Baraa** et leur maman, ma tante, ce travail n'aurait jamais vu le jour sans votre affection, vos encouragements et votre présence. A toute la famille MEDKOUR, mes oncles, mes tantes et mes cousins.

SOMMAIRE

Titres	Pages
REMERCIEMENTS	
SOMMAIRE	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
REVUE DE LA LITTERATURE	
I. INTRODUCTION	1
II. HISTORIQUE	3
III. PARASITE, VECTEURS ET RESERVOIRS	6
1. Parasite et sa taxonomie	6
2. Biologie, cycle de vie et transmission de <i>L. infantum</i>	10
3. Etude moléculaire de <i>L. infantum</i>	13
3.1. Le génome kinétoplastique	13
3.2. Le génome nucléaire	14
4. Le vecteur	15
4.1. Morphologie	15
4.2. Systématique	18
4.3. La bio-écologie et l'éthologie des phlébotomes	24
4.3.1. Mode d'alimentation	24
4.3.2. Mode de vie et comportements	25
4.3.3. Croissance et développement du phlébotome	26
4.3.4. Phlébotomes et <i>Leishmania</i>	26
4.3.5. Phlébotome, immunité, microbiote et <i>Leishmania</i> : Une interaction complexe	31
5. Le réservoir	35
5.1. Réservoirs zoonotiques	35
5.1.1. Le chien	35
5.1.2. Le chat	36
5.1.3. Les canidés sauvages	37
5.1.4. Les rongeurs	37
5.1.5. Autres mammifères	38
5.2. Réservoirs anthropiques	38
IV. EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSE	40
1. Répartition mondiale des leishmanioses	40
2. Répartition géographique en Algérie	43
3. Incidence des leishmanioses en Algérie	45
4. Facteurs de risque	45
4.1. Pour l'animal (chien)	45
4.1.1. Facteurs intrinsèques	45
4.1.2. Facteurs extrinsèques	47
4.2. Pour l'Homme	47
5. Changement climatique et évolution de la leishmaniose	49
V. IMMUNOLOGIE ET SIGNES CLINIQUES DE LA LEISHMANIOSE CANINE	50
VI. DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CANINE	58
VII. TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE CANINE	61

VIII.	PREVENTION ET CONTROL DE LA LEISHMANIOSE CANINE	65
	PARTIE EXPERIMENTALE	68
I.	INTRODUCTION	69
II.	MATERIEL ET METHODES	73
1.	Ethique de la recherche	73
2.	Région d'étude et échantillonnage	73
3.	Prélèvements	75
4.	Test d'immuno-migration rapide (RIM™) et test IFAT quantitatif pour la détection des anticorps spécifiques au <i>L. infantum</i>	76
5.	Analyses moléculaires	77
5.1.	Extraction de l'ADN	77
5.2.	PCRs pour la recherche et l'identification des hémoprotozoaires	78
5.3.	Séquençage et phylogénies	80
6.	Essai clinique	80
6.1.	Design de l'étude	80
6.2.	Critères d'inclusion et d'exclusion	81
6.3.	Suivi thérapeutique	83
6.3.1.	Calendrier des visites et des prélèvements	85
6.3.2.	Suivi clinique	85
6.3.3.	Suivi de la charge parasitaire	86
6.3.4.	Suivi sérologique	87
7.	Analyses statistiques	87
III.	RESULTATS	90
1.	Résultats de l'étude épidémiologique	90
1.1.	Signalement et état clinique des chiens	90
1.2.	Anticorps anti- <i>Leishmania infantum</i>	90
1.3.	Détection d'ADN des agents infectieux	94
1.4.	Infection versus facteurs de risque	95
1.5.	Infections versus signes cliniques	96
1.6.	Analyses des séquences et phylogénies	98
2.	Résultats de l'essai thérapeutique	101
2.1.	Inclusion des chiens et suivi	101
2.2.	Evolution clinique des chiens suivis	102
2.3.	Effets secondaires liés aux traitements	104
2.4.	Cinétique de la parasitémie durant l'essai thérapeutique	104
2.5.	Suivi sérologique des chiens traités	105
IV.	DISCUSSION	108
1.	Etude épidémiologique	108
2.	Essai thérapeutique	113
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120
VI.	DONNEES SUPPLEMENTAIRES	122
VII.	ANNEXES	125
VIII.	REFERENCES	127
	ARTICLES	142
IX.	RESUME - ABSTRACT	143

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
Fig 1. Classification actualisée des espèces de <i>Leishmania</i>	7
Fig 2. Le cycle de vie de <i>L. infantum</i> avec indication des voies de transmission au chien prouvées et non prouvées, autres que la transmission par les phlébotomes	11
Fig 3. A gauche. Morphologie d'un phlébotome adulte. A droite. Phlébotomes (femelle)	16
Fig 4. Vue générale de la tête d'un phlébotome	17
Fig 5. Cycle évolutif du <i>Phlebotomus</i> sp.	26
Fig 6. Représentation graphique des différents stades du parasite <i>Leishmania</i> dans le vecteur phlébotome (numéros 1-6) et des facteurs essentiels déterminant la fitness du parasite (lettres capitales A-I).	27
Fig 7. a. Cycle de développement classique dans l'intestin moyen des parasites <i>Leishmania</i> . b. Les repas de sang consécutifs favorisent l'infection par <i>Leishmania</i> en déclenchant la différenciation des formes métacycliques en rétroléptomonades multiplicatives, amplifiant ainsi le nombre des parasites. c. Cycle de vie révisé de <i>Leishmania</i> chez le phlébotome	31
Fig 8. Le cycle évolutif de <i>Leishmania</i> spp. avec les différentes formes cliniques chez l'homme	40
Fig 9. Distribution des 20 espèces de <i>Leishmania</i> pathogènes pour l'homme.	41
Fig 10. Manifestations cliniques de chiens naturellement infectés par <i>L. infantum</i>	51
Fig 11. Mécanismes immunitaires simplifiés lors d'infestation par <i>Leishmania</i>	57
Fig 12. Carte montrant les trois wilayas (Tizi-Ouzou, Bouira et Sétif) de la zone d'étude et les prévalences des hémoprotozoaires à transmission vectorielle retrouvées chez le chien	75
Fig 13. Quelques biotopes de la région d'étude et la réalisation des prélèvements de la veine radiale	76
Fig 14. Organigramme des groupes montrant les protocoles thérapeutiques et les chiens atteints de la leishmaniose à chaque étape de l'étude.	84
Fig 15. Exemple d'un chien positif par l'IFAT et par le WINTNESS® et présentant des signes cliniques de la LCan.	91
Fig 16. Matrice de corrélation montrant la relation entre les titres des IgG anti- <i>L. infantum</i> , le score clinique et la co-infection chez les chiens étudiés.	98
Fig 17. Analyse phylogénétique et moléculaire par la méthode du maximum de vraisemblance sur le modèle Tamura-Nei basé sur les séquences nucléotidiques partielles (360 pb) de l'ITS2 pour <i>Leishmania</i> spp. (A); (250 pb) de l'ITS1 pour <i>Trypanosoma</i> spp. (B); (900 pb) de l'ARNr 18S pour <i>Piroplasmida</i> (C) et (600 pb) de l'ARNr 18S pour <i>Hepatozoon</i> spp. (D).	99
Fig 18. Évolution dans le temps du SC total	102
Fig 19. Comparaison du pourcentage moyen de réduction des SC entre les deux groupes de traitement	103
Fig 20. Suivi sérologique	106
Fig 21. Comparaison du pourcentage moyen de réduction des titres d'anticorps obtenus par l'IFAT chez les chiens traités par l'Artésunate ou le	106

Glucantime/ allopurinol	
Fig 22. Diagramme montrant les principes basés sur la spécificité de l'approche moléculaire proposée pour la détection des filarioïdes canins.	126

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Pages
Tableau 1. Distribution géographique des espèces de <i>Leishmania</i> infectant les chiens et leurs vecteurs	8
Tableau 2. Liste des espèces de phlébotomes recensées en Algérie et leur répartition géographique en 2018	23
Tableau 3. Quelques études sur les prévalences de la LCan en Tunisie et au Maroc	42
Tableau 4. Prévalences de la leishmaniose canine en Algérie	44
Tableau 5. Protocoles thérapeutiques actuels et mesures prophylactiques utilisées pour la prévention et le contrôle de la LCan	62
Tableau 6. Séquences des oligonucléotides utilisées pour la détection et l'identification des espèces de protozoaires	79
Tableau 7. Manifestations de la LCan identifiées pour évaluer les scores cliniques des chiens	82
Table 8. Caractéristiques des chiens affectés dans chaque bras de traitement et données de l'analyse d'homogénéité exprimées en moyenne \pm écart-type et fréquences (%)	84
Tableau 9. Prévalences et facteurs de risque associés aux hémoprotozoaires à transmission vectorielle chez le chien dans cette étude	92
Tableau 10. Fréquence des infections et des co-infections chez les chiens étudiés	94
Tableau 11. Evolution clinique individuelle des chiens au cours du temps de suivi	104
Tableau 12. Variations individuelles du nombre de parasites par ml de sang et du pourcentage de réduction de la parasitémie au cours du suivi	105
Tableau 13. Comparaison entre les deux traitements testés contre la LCan.	120
Tableau S1. Fiche des renseignements de l'étude épidémiologique	122
Tableau S2. Fiche de suivi de l'essai clinique	123
Tableau S3. Signes cliniques individuels et calcul des scores cliniques (SC) et du pourcentage de réduction des SC à chaque point de temps	124

REVUE DE LA LITTERATURE

I. INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des protozooses infectieuses, inoculables, exceptionnellement contagieuses dues au développement et à la multiplication, dans les cellules du système phagocytaire mononucléaire (SPM), d'un flagellé du genre *Leishmania* transmis par la piqûre d'un insecte diptère hématophage (Marty P et Rosenthal E, 2002; Dedet JP, 2009) appartenant au genre *Phlébotomus* dans l'ancien monde et au genre *Lutzomyia* dans le nouveau monde. Ces parasitoses affectent l'Homme et l'animal, en particulier le chien (Osman et al, 2000).

Chez l'homme, la leishmaniose se décline en 3 formes principales: viscérale (la plus sévère, souvent appelée kala-azar), cutanée (la plus fréquente) et cutanéomuqueuse. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2022), près de 370 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la maladie. Elle estime de 700 000 à 1 million nouveaux cas par an. C'est pourquoi la leishmaniose représente l'une des préoccupations majeures de l'OMS, au même titre que le sida, le paludisme et la tuberculose; c'est d'ailleurs un des six programmes de lutte prioritaire pour l'OMS.

En Algérie, les leishmanioses sont un problème majeur de santé publique. Elles occupent la première place dans les maladies parasitaires et représentent 35 % des maladies à déclaration obligatoire (Achour Barchiche N et Madiou M, 2009). Pour faire face à ce fléau, l'Algérie a adopté, en urgence, une stratégie de lutte intégrée ciblant les différents maillons du cycle épidémiologique de la maladie avec mise en oeuvre d'un programme national de lutte contre la leishmaniose depuis 2006.

Parallèlement, la leishmaniose canine (LCan) est une maladie d'importance croissante, elle est répandue dans plus de 50 pays, et sévit sous forme enzootique

dans de nombreux pays méditerranéens. Le chien est reconnu comme le seul réservoir domestique de *Leishmania infantum* (Bourdoiseau G et Franc M, 2008). En effet, des études épidémiologiques effectuées partout dans le monde (Brésil, Italie, Algérie..) ont montré qu'il y a une étroite corrélation entre la prévalence de la LCan et l'incidence de la leishmaniose viscérale humaine (Costa CHN, 2011; Oliveira CDL. et al, 2001; Mouloua A, 2014).

Chez le chien, la maladie est qualifiée de « générale » car elle associe la plupart du temps des lésions viscérales à des lésions cutanées (Euzéby J, 1986; Bourdoiseau G et Franc M, 2002). C'est une maladie protéiforme chronique qui évolue sur plusieurs mois, associant des troubles généraux à des symptômes extrêmement variés. Le traitement est difficile, il engendre fréquemment des effets secondaires indésirables pour l'animal et souvent sujet à des rechutes d'où le pronostic réservé. Chez le chien non traité la mort est inéluctable. La gravité de la maladie est amplifiée par la difficulté du diagnostic, liée à l'existence de porteurs asymptomatiques, à une durée d'incubation parfois très longue ainsi qu'à une absence quasi présente de séroconversion (Raquin E, 2010).

L'objectif principal de cette thèse est : **i)** d'évaluer la prévalence de la LCan dans le nord Algérien, faisant référence au foyer historique de la Kabylie, d'en rappeler les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et de surveiller la circulation de certaines autres hémoprotozoaires chez le chien; **ii)** Evaluer une nouvelle stratégie de lutttes contre la LCan.

Le présent manuscrit a été articulé en deux parties :

Une première partie bibliographique, consacrée à une mise au point synthétique sur la leishmaniose en général et la leishmaniose canine en particulier.

Une seconde partie expérimentale, qui a porté sur : **i)** une étude sérologique et moléculaire des hémoprotozoaires transmis par les arthropodes chez le chien dans le nord algérien, en particulier *L. infantum* agent étiologique de la LCan, et d'autres protozoaires à savoir *Trypanosoma* spp., *Piroplasmida* et *Hepatozoon* spp. ([Publication N°1](#)); **ii)** Le potentiel de l'artésunate dans le traitement, voir la prévention, de la LCan chez les chiens naturellement infectés par *L. infantum* avec une preuve d'efficacité d'un essai randomisé sur le terrain ([Publication N°2](#)).

Le matériel utilisé et les méthodes adoptées lors de l'étude expérimentale y sont détaillés et les résultats obtenus sont présentés et discutés.

II. HISTORIQUE

Les leishmanioses constituent unes des premières parasitoses décrites dans l'histoire, du moins dans leur forme cutanée. Dans le palais de Ninive, on a découvert la tablette d'argile, ce qui évoque une ulcération indolore de la face, c'était une transcription d'un récit akkadien au second ou au troisième millénaire avant Jésus Christ ([Jarry DM, 1999](#)).

Pour la leishmaniose cutanée du vieux monde, on peut remonter jusqu' à 1500-2500 ans avant JC. Les premières descriptions du « bouton d'orient » ont été retrouvées sur des objets appartenant au roi Ashurbanipal au septième siècle avant JC. La blessure de « Balkh » était la description des médecins arabes, y compris Avicenne au dixième siècle, qui l'a décrit dans le nord de l'Afghanistan, et il existe des documents plus récents provenant de divers endroits du Moyen-Orient, notamment Bagdad et Jéricho. A travers l'histoire, différentes régions du monde dans lesquelles la maladie fut découverte ont donné leurs noms à celle-ci ([Cox FE, 2002](#)).

La leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse du nouveau monde a été bien décrite par les missionnaires espagnols du seizième siècle, ils décrivent la manifestation de la maladie andine ou celle de la vallée en tant que blessures cutanées (Cox FE, 2002). La paléopathologie a mis en évidence et a confirmé la présence de lésions leishmaniennes mucocutanées antiques sur des crânes des populations autochtones anciennes (Costa MA et al, 2009). James Homer Wright est considéré comme le premier observateur du parasite de leishmanies, cependant, d'autres auteurs avancent que c'est David Cunningham en 1885 et Peter Borovsky, un chirurgien russe qui aurait découvert le parasite. Borovsky avait même publié un article décrivant exactement le parasite en tant que protozoaire. Cependant, le travail de Borovsky écrit en russe n'a pas été mondialement reconnu (Cox FE, 2002).

La leishmaniose viscérale a été décrite beaucoup plus tard. Il n'y avait aucune documentation sur la maladie jusqu'en 1823, en dépit de la documentation claire sur d'autres maladies causant le même degré de sévérité, indiquant probablement qu'elle ne s'était pas manifestée avant cette date. Il a été noté qu'en 1824 une manifestation épidémique au Bengale d'une maladie causant la fièvre et la cachexie et ne répondant à la quinine (Cox FE, 2002). Cette maladie fut appelée « kalaazar ou fièvre noire » en raison du noircissement de la peau des patients indiens; la maladie fut également appelée « la fièvre de Dum Dum » en raison de son occurrence dans la région de Dum Dum, près de Calcutta.

William Boog Leishman et Charles Donovan ont été les premiers à découvrir l'agent causal du Kala Azar. Leishman a trouvé le parasite dans la rate d'un soldat qui était mort de la fièvre Dum Dum. Il a d'abord faussement classé le parasite comme étant un trypanosome en 1903. Au même temps, Donovan, a isolé le parasite de la rate d'un patient malade. Il s'est également rendu compte que c'était le même parasite

isolé des malades atteints de bouton d'orient. En 1908, en Tunisie, Charles Nicolle retrouvera des leishmanies chez un enfant de kala azar méditerranéen et le désigna par *L. infantum*. En 1908, Nicolle et Comte décèlent les mêmes protozoaires chez le chien à l'Institut Pasteur de Tunis et démontrent expérimentalement la transmission possible de l'homme au chien. Ils font de cette affection une maladie commune à l'homme et à d'autres mammifères ouvrant ainsi la voie aux recherches épidémiologiques (Dedet JP, 1999).

En Algérie, le premier cas de leishmaniose canine a été rapporté par les frères Edmond et Etienne Sergent en 1910 (Sergent Ed et Sergent Et, 1910). Deux ans plus tard, ils rapportent la présence de l'infection chez un chien et un chat vivant avec un enfant atteint de leishmaniose viscérale. Et le premier cas humain de leishmaniose viscérale fut découvert en 1911 par Lemaire (Lemaire et al, 1913). La relation entre le vecteur (phlébotome) et les symptômes de la maladie a été décrite par l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) dirigée par les frères Sergent et leurs collaborateurs. Les preuves expérimentales de la transmission de la leishmaniose cutanée ont été apportées en 1921, lorsque les frères Sergent contaminèrent un sujet sain en le faisant piquer par des phlébotomes récoltés à Biskra. Presque parallèlement des observations faites en Palestine et en Syrie par Adler et Theodor (1941) confirmèrent celles de l'équipe de l'IPA (Dedet JP, 1999).

En 1946, le premier cas de Kala-azar infantile fut rapporté en Kabylie (Sarrouy Ch et al, 1946).

A partir des années 1970, débute la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies.

En 1990, Rioux et ses collaborateurs présentent une nouvelle classification des *Leishmania*, basée sur les caractères biochimiques et le profil isoenzymatique des souches des différents complexes (Harrat Z, 2006).

Papierok et al, en 2002, ont démontré que l'administration d'antigènes d'excrétion-sécrétion de promastigote induit une réaction immunitaire de type Th1 à l'encontre des leishmanies amastigotes intramacrophagiques (Brevet Institut de recherche pour le développement et laboratoire Bio Vétro Test). Le groupe VIRBAC en 2011 commercialise en France ce même vaccin sous le nom de CANILEISH®.

III. PARASITE, VECTEURS ET RESERVOIRS

1. Parasite et sa taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinétoplastidés et à la famille des Trypanosomatidés.

Depuis la description de la première espèce de *Leishmania* en 1903, le nombre de taxons du genre *Leishmania* n'a cessé de croître pour atteindre 54 espèces dont au moins 21 sont pathogènes pour l'homme (Akhoundi M et al, 2016). L'identification des leishmanies a longtemps constitué un problème car leur morphologie et leur pouvoir pathogène ne permettaient pas de les classer. Initialement basée sur des critères écobiologiques puis immunologiques, la classification des leishmanies utilise aujourd'hui des marqueurs d'ADN. Une classification récente des leishmanies est rappelée en figure 1 (Akhoundi M et al, 2017).

Les méthodes de classification récentes basée sur les caractères intrinsèques des *Leishmania* font appel aussi bien à l'activité qu'aux structures du génome parasite (Rioux JA et al, 1990). Elles ont prouvé leur efficacité dans la classification des

parasites. En effet, depuis les années 70, les *Leishmania* ont pu être identifiés avec assez de précision au moyen de l'analyse électrophorétique des isoenzymes, formant ainsi une population homogène ou zymodème. L'identification isoenzymatique reste la méthode de référence même si des techniques plus résolutive tels que la PCR (Polymerase Chain Reaction), les RLFP (Restriction Fragments Length Polymorphisms), la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ou les microsatellites permettent d'affiner la classification (Centre National de Référence des Leishmaniose, 2013). On définit par "zymodème" l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique. Plus de 200 zymodèmes sont à ce jour individualisés.

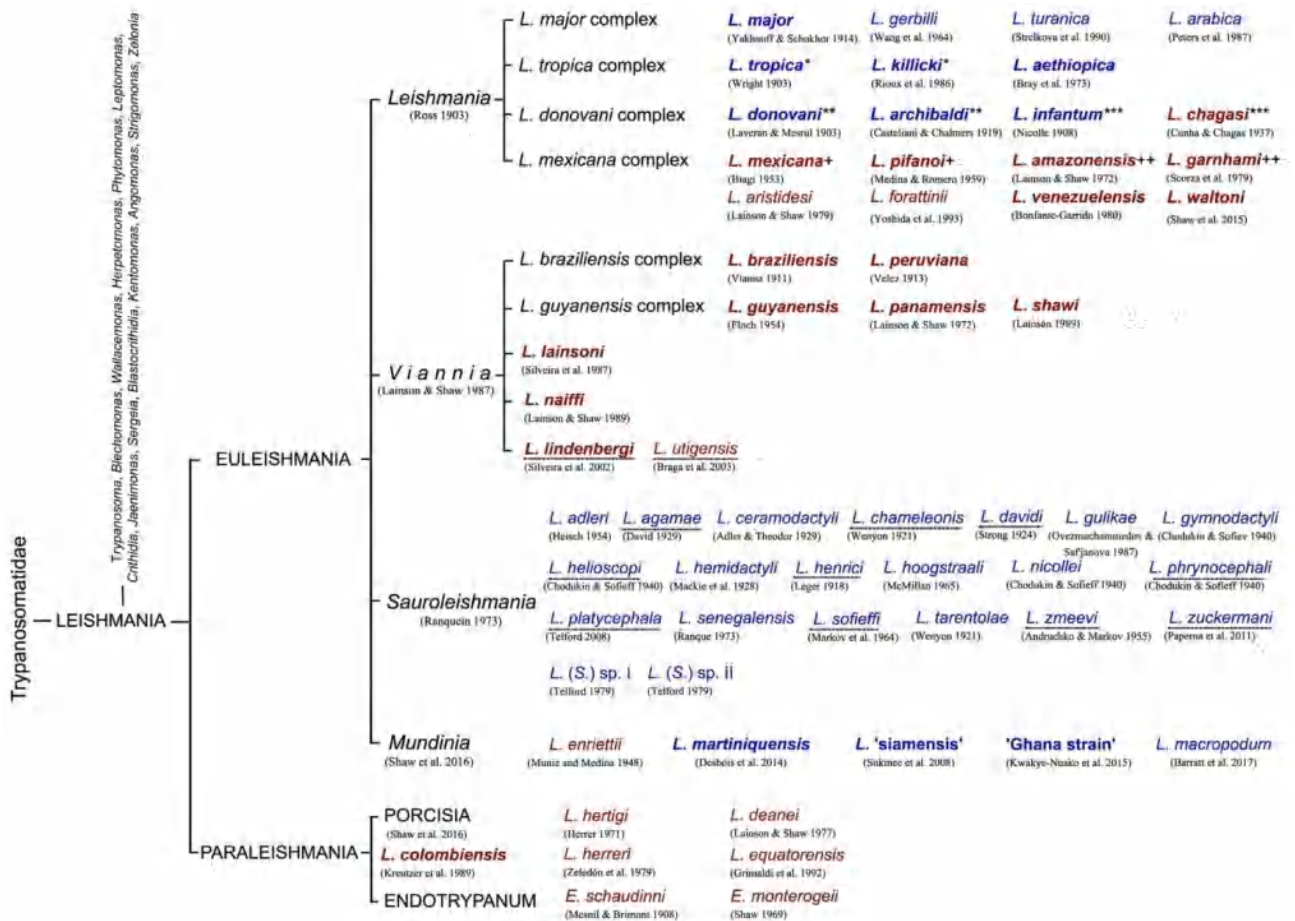


Fig 1. Classification actualisée des espèces de *Leishmania* (Akhoundi M et al, 2017). *, + : Synonyme; les différents nombres de signes étoile (*) et plus (+) indiquent quel nom d'espèce est le synonyme de quelle espèce originale, **Souligné** : Pas de

*classification finale. L. 'siamensis' et L. martiniquensis ont été trouvés aussi dans le Nouveau Monde. Les noms de Leishmania entre guillemets sont des noms non officiels sans description formelle. Les espèces pathogènes pour l'homme sont écrites **en gras**. Les espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde sont surlignées en bleu et en rouge respectivement.*

Toutes les espèces n'ont pas la même importance médicale : seule une vingtaine d'entre elles est considérée comme pathogènes pour l'homme et dix ont été isolées chez les chiens à savoir: *L. infantum* (ou *chagasi* dans le Nouveau Monde), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* et *L. colombiensis* (Antinori S et al, 2012). Les chiens sont donc infectés par plusieurs espèces de leishmanies, mais pour certaines d'entre elles, le chien ne représente pas un réservoir significatif pour l'homme. L'infection canine la plus largement répandue et la mieux caractérisée est celle causée par *L. infantum*, qui appartient au complexe de *L. donovani* et qui infecte à la fois l'homme et le chien, principalement dans le bassin méditerranéen, au Portugal, en Afrique de l'Ouest, en Asie du Sud et en Amérique latine ainsi qu'aux Etats-Unis de manière plus récente. *L. infantum* est probablement issue de *L. donovani* qui a émergé en Afrique de l'Ouest (Banuls AL et al, 2007) alors que *L. chagasi*, espèce synonyme de *L. infantum*, aurait été introduite dans le Nouveau Monde après l'arrivée des colons européens (Mauricio IL et al, 2000).

Les espèces de leishmanies qui infectent le chien et leur distribution dans le monde sont listées dans le [tableau 1](#).

Tableau 1. Distribution géographique des espèces de *Leishmania* infectant les chiens et leurs vecteurs.

Espèces de <i>Leishmania</i>	Distribution géographique	Vecteurs prouvés	Vecteurs suspectés
<i>L. infantum</i>	Bassin Méditerranéen Moyen Orient Asie du Sud, Iran, Arménie, Afghanistan Asie centrale, Chine	<i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. kandelakii</i> <i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , etc. <i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , etc <i>P. smirnovi</i> , <i>P. transcaucasicus</i> , <i>P. Longiductus</i>
<i>L. infantum</i> = <i>L. chagasi</i>	Amérique centrale et du sud	<i>L. longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>L. olmeca olmeca</i>	<i>L. antunesi</i> , <i>L. shannoni</i>
<i>L. donovani</i>	Afrique de l'est	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	Afrique du Nord	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Amérique centrale et du sud	<i>L. wellcomei</i> , <i>L. spinicrassa</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>L. yucumensis</i> , <i>L. carrerai carrerai</i> , <i>L. llanosmartinsi</i> , <i>L. ovallesi</i> , <i>L. intermedia</i> ,	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. paraensis</i> , <i>L. complexus</i> , <i>L. pessoai</i> , etc.
<i>L. peruviana</i>	Andes péruviennes	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i> , <i>L. ayacuchensis</i>	<i>L. noguchii</i> , <i>L. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	Amérique centrale	<i>L. trapidoi</i> , <i>L. ylephiletor</i> , <i>L. gomesi</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. hartmanni</i>	<i>L. shannoni</i> , <i>L. ovallesi</i> , etc

L : *Leishmania*, *P* : *Phlébotomus*, *L* : *Lutzomyia* (Solano-Gallego L et al, 2009).

En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques de leishmaniose appartiennent à deux complexes distincts : le complexe *L. infantum* et le complexe *L. major* (Harrat Z et al, 1996). Dans le complexe *L. infantum*, les zymodèmes responsables de la forme viscérale sont les MON-1, MON-24, MON-33, MON-34, MON-78, et MON-80. Quant à la leishmaniose cutanée, on trouve les zymodèmes MON-1, MON-24 et MON-80. Les zymodèmes MON-1, MON-34 et MON-77 étant isolés du réservoir canin et le MON-1 et le MON-24 de chez le vecteur, toujours dans

le complexe *L. infantum* (Harrat Z et al, 1996). Dans le complexe *L. major*, un seul zymodème a été isolé chez l'homme, le rongeur et le vecteur : il s'agit du MON- 25. Ce dernier est, également, l'agent causal de la leishmaniose cutanée en Tunisie (Kallel K et al, 2005). En 2009, Ait-Oudhia identifia chez le chien un nouveau zymodème, MON-281, qui appartient au complexe *L. infantum* (Ait Oudhia K et al, 2009).

2. Biologie, cycle de vie et transmission de *L. infantum*

Leishmania accomplit son cycle de vie dans deux hôtes, un vecteur phlébotome, qui transmet la forme flagellée, et un mammifère, où se développe et se réplique la forme amastigote intracellulaire (Fig 2). Les phlébotomes sont les seuls arthropodes qui sont adaptés à la transmission biologique de *Leishmania*. La proportion relativement faible de phlébotomes porteurs de *L. infantum* (0,5- 3%) est suffisante pour maintenir l'infection dans les zones endémiques. Des modes de transmission autres que le phlébotome ont également été décrits mais leur rôle dans l'histoire naturelle et l'épidémiologie de la leishmaniose reste peu clair (Fig 2). Les modes avérés de transmission incluent l'infection suite à une transfusion sanguine (Owens SD et al, 2001) par des donneurs de sang qui sont porteurs de l'infection (de Freitas E et al, 2006; Tabar MD et al, 2008), la transmission verticale (Rosypal AC et al, 2005; Pangrazio KK et al, 2009; Boggiatto PM et al, 2011) et la transmission vénérienne (Silva FL et al, 2009). La sélection adéquate des donneurs de sang canins est d'une grande importance pour la prévention de l'infection par *L. infantum* et les recommandations sur la sélection des donneurs sont résumées graphiquement dans la Fig2. Les modes de transmission suspectés mais non prouvés comprennent :

- 1) la transmission directe de chien à chien par morsure ou blessure, ce qui pourrait expliquer la présence de cas clinique autochtone de la LCan (Shaw SE et al, 2009)

dans des zones non endémiques en l'absence de vecteurs apparents, comme il a été décrit chez les foxhounds aux Etats-Unis (Duprey ZH et al, 2006) ou dans des chenils d'élevage en Europe (Chamaille L et al, 2010), et 2) la transmission par d'autres arthropodes hématophages, tels que les tiques et les puces (Coutinho MT et al, 2005; Coutinho MT et Linardi PM, 2007; Dantas-Torres F et al, 2010; Paz GF et al, 2010; Dantas-Torres F et al, 2011) (Fig 2).

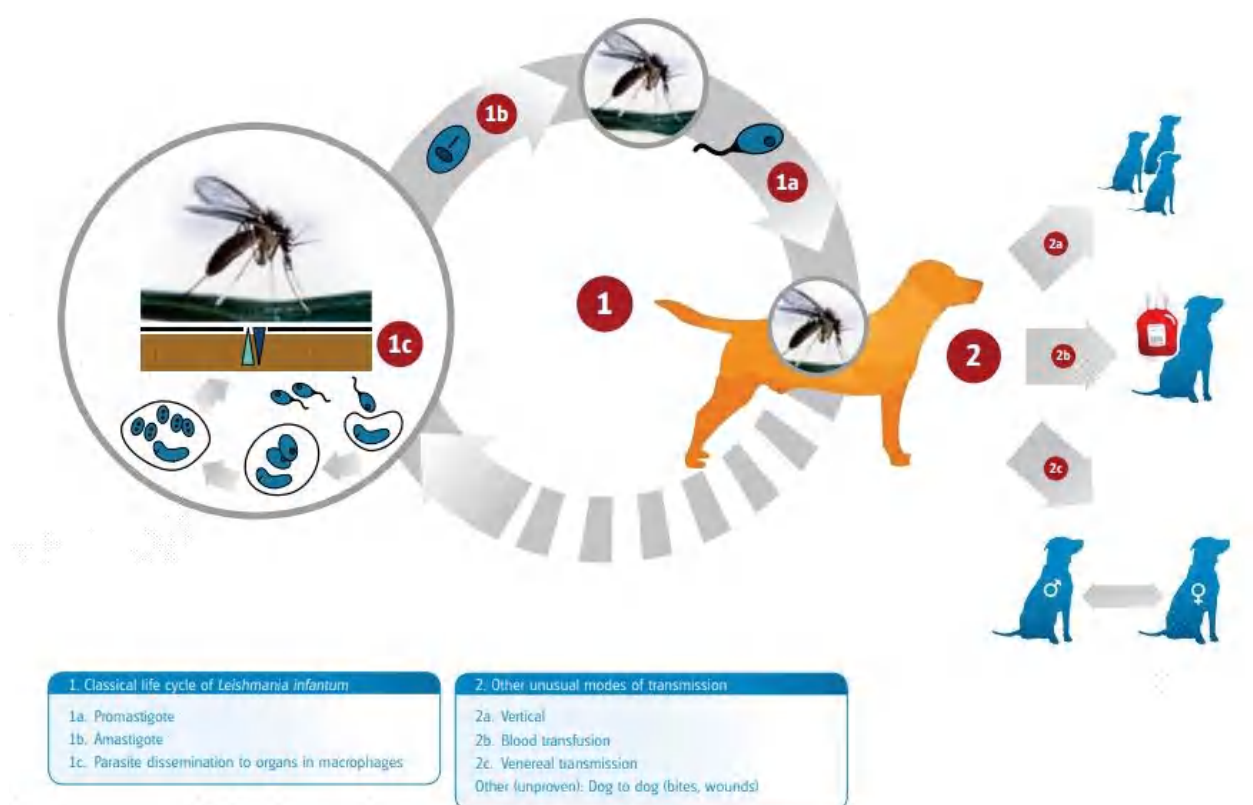


Fig 2. Le cycle de vie de *L. infantum* avec indication des voies de transmission au chien prouvées et non prouvées, autres que la transmission par les phlébotomes (Cardoso L et al, 2011).

C'est au cours du repas sanguin pris sur un animal ou un sujet infecté que le phlébotome absorbe les *Leishmania* sous la forme amastigote. La rupture des cellules hôtes intervient au cours de l'ingestion et les amastigotes sont libérées.

Chez les insectes, le repas sanguin est rapidement entouré par la membrane péritrophique sécrétée par les cellules intestinales abdominales. En effet, au cours

des 24-48 heures qui suivent le repas sanguin, les leishmanies se multiplient une ou deux fois dans l'intestin du phlébotome sous la forme amastigote. Il semblerait qu'il existe dans le sang de l'hôte vertébré un facteur inhibant leur transformation en forme promastigote, caractéristique de la phase hôte-invertébré, qui ne pourrait intervenir qu'après destruction de ce facteur par les enzymes protéolytiques sécrétées par l'insecte. Ainsi, ce n'est qu'après ce temps de latence que les formes promastigotes apparaissent et se multiplient. Au bout de 3-4 jours, elles s'échappent de la membrane péritrophique qui est déchirée et gagnent leur lieu de multiplication qui varie en fonction de l'espèce de leishmanies. Ce critère a permis la mise en place d'une classification des *Leishmania* en : **Hypolaria** (au niveau de l'intestin postérieur); **Péripylaria** (de part et d'autre du pylore); **Suprapylaria** (au niveau de l'intestin antérieur et moyen). Les deux derniers types concernent des espèces de *Leishmania* des mammifères. Les parasites gagnent ensuite les pièces buccales. La durée du cycle chez le phlébotome est de 4 à 7 jours suivant la température. Le vecteur peut alors transmettre le parasite à un autre animal ou à l'homme. Les promastigotes injectés seront transformés en amastigotes lors de leur passage en phagolysosome, dans lesquels ils se multiplieront entraînant la lyse cellulaire successive des macrophages du sang ou de la peau de l'hôte vertébré.

Les phlébotomes infectés ont des difficultés à prendre leur repas sanguin ce qui peut être un facteur de multiplication des piqûres et donc d'augmentation de transmission (Chappuis F et al, 2007).

Chez le chien, les *Leishmania* atteignent les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM.): macrophages de divers tissus, histiocytes dermiques, cellules de Küpffer du foie et monocytes sanguins. Dans ces cellules, elles sont rassemblées par dizaines dans une vacuole parasitophore (le phagosome) contrairement à ce qui

est le cas pour d'autres parasites intracellulaires, les *Leishmania* n'empêchent pas la fusion phagosome-lysosome et elles résistent aux enzymes lysosomales. Ils sont très largement dispersés dans l'organisme, intéressant de nombreux organes et tissus : SPM, peau, tube digestif, appareil respiratoire, etc. Ce qui est à l'origine du caractère polymorphe de la maladie. Ces protozoaires utilisent les protéines des cellules-hôtes et leur ADN est synthétisé à partir des précurseurs de l'ARN de ces cellules (notamment la purine qu'elles ne peuvent pas synthétiser et qui leur est fournie par leur hôte) (Bourdoiseau G, 2000).

Leur multiplication se fait par scissiparité. Elle se produit aussi bien pour les formes promastigotes, en culture et chez le vecteur, que pour les formes amastigotes dans les phagosomes de la cellule qui les abrite. Ainsi, chez le chien, qui est un animal sensible, les *Leishmania* persistent dans le SPM et se multiplient dans les cellules comme les macrophages en utilisant des mécanismes d'échappement à l'action du système immunitaire. Quand la multiplication devient importante, la cellule parasitée sera détruite et les parasites seront phagocytés par une cellule saine qui s'infecte à son tour. La reproduction sexuée n'est pas connue mais fortement suspectée.

Les sites de transmission sont préférentiellement les zones peu poilues de la peau comme la tête (notamment la truffe chez le chien), l'arête du nez, les pavillons auriculaires, les régions inguinales et péri-anales.

3. Etude moléculaire de *L. infantum*

Comme tous les Kinétoplastidés, les leishmanies possèdent un génome nucléaire et un génome kinétoplastique, qui ont tous deux des caractéristiques inhabituelles, en particulier dans les mécanismes de transcription (Ravel C et al, 1999).

3.1. Le génome kinétoplastique

Le kinétoplaste est considéré comme un ADN mitochondrial modifié (Vickerman KPT, 1976). C'est en effet une portion particulière de l'unique mitochondrie, il représente de 10 à 20 % de l'ADN total de la cellule. Il est constitué de deux types de molécule d'ADN circulaire : les maxicercles (environ 10 à 30 par cellule) et les minicercles (de 5000 à 10000 par cellule), entrelacés les uns dans les autres, constituant ainsi un réseau complexe et compact (Simpson L, 1987).

Les maxicercles, d'une taille de 20 à 40 kb suivant les espèces, sont identiques dans un même réseau. Ils sont équivalents à l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. En effet, ils codent pour des gènes classiques de la mitochondrie tels que les gènes de l'ARN ribosomique (ARNr), les gènes de la chaîne de transport des électrons (cytochrome oxydase, complexe NADH déshydrogénase...) mais également pour des gènes codant de petits ARN appelés ARN guides (ARNg) qui interviennent dans un processus très original de modification post transcriptionnelle de la séquence de l'ARN messager appelé ARN editing.

Les minicercles, d'une taille inférieure à 1 kb, codent aussi pour les ARNg. Mais, contrairement aux maxicercles, leur séquence est très variable non seulement d'une espèce à l'autre, mais également au sein d'une même espèce (Stuart K, 1991).

3.2. Le génome nucléaire

Leishmania est essentiellement diploïde même si le cycle sexuel n'a pas été observé (Ivens AC et Blackwell JM, 1999). Le nombre de chromosomes est resté longtemps indéterminé en raison de l'absence de condensation au cours du cycle cellulaire (Raikov, 1982). Grâce à la technique d'électrophorèse en champs pulsé on a pu visualiser les chromosomes de *Leishmania*. Son génome d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0.3 à 2.8 Mb. Certaines espèces

n'ont que 34 à 35 chromosomes mais la complexité du génome est conservée (Britto C et al, 1998). Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. De cette réunion est né le *Leishmania* Genome Network, un consortium de laboratoires impliqués dans la cartographie, le séquençage et l'annotation des génomes. Aujourd'hui, le génome de *Leishmania* est entièrement séquencé. On recense 8272 gènes codant des protéines, 911 gènes d'ARN et 39 pseudo-gènes (Ivens AC et al, 2005).

4. Le vecteur

Les phlébotomes (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) sont les principaux vecteurs des leishmanioses. Plus de 900 espèces et sous-espèces de phlébotomes ont été identifiées à ce jour, mais seul un nombre limité a été prouvé ou incriminé comme vecteurs de *Leishmania* (Bates PA et al, 2015).

Certaines espèces de phlébotomes sont considérées comme :

- Permissives (ou non spécifiques) car elles peuvent héberger des infections expérimentales de plusieurs espèces de *Leishmania* (comme *Lutzomyia longipalpis* et *L. infantum chagasi* ou *L. mexicana*).
- Restrictives (ou spécifiques) car elles ne peuvent être infectées que par les espèces de *Leishmania* qu'elles transmettent dans la nature (comme *Phlebotomus papatasi* et *L. major*).

4.1. Morphologie

Les phlébotomes, aussi appelés mouches des sables, sont des moucheron hémaphages présentant un corps grêle et allongé (1,2 à 3,7 mm), recouvert, ainsi que les ailes, d'une fine pilosité. Leur corps est de couleur jaune terne à noir, et les ailes sont velues (Fig 3).

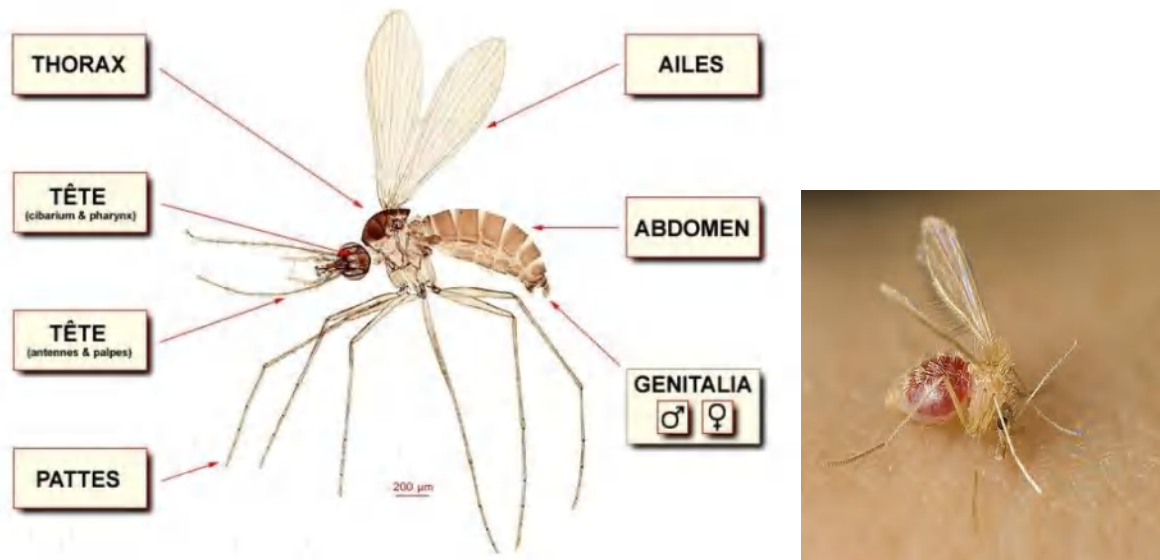


Fig 3. A gauche. Morphologie d'un phlébotome adulte (Niang AA et al, 2000). **A droite.** Phlébotomes (femelle), <http://www.diptera.info/forum/viewforum.php>.

Les principales caractéristiques morphologiques des phlébotomes:

- Petite taille : moins de 5 mm de longueur
- Corps velu : poils denses
- Ailes lancéolées, au repos, elles sont maintenues vers le haut et vers l'extérieur, au-dessus du corps
- Insectes diptères (2 ailes)
- Couleur jaune ou brun pâle
- Aspect bossu, corps, pattes et ailes velus
- Antennes plus longues (16 articles) que palpes maxillaires (5 articles).

Ainsi, leur corps grêle se divise en tête, thorax et abdomen (Fig 3):

- **La tête** forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue. Elle porte les antennes, les organes visuels et les pièces buccales (Fig 4). Elle comporte d'avant en arrière : le clypeus, les fosses temporales, le front, les yeux, l'épicrane et l'occiput. L'ensemble des pièces buccales forme une trompe courte. Seules les femelles portent des mandibules dentelées.

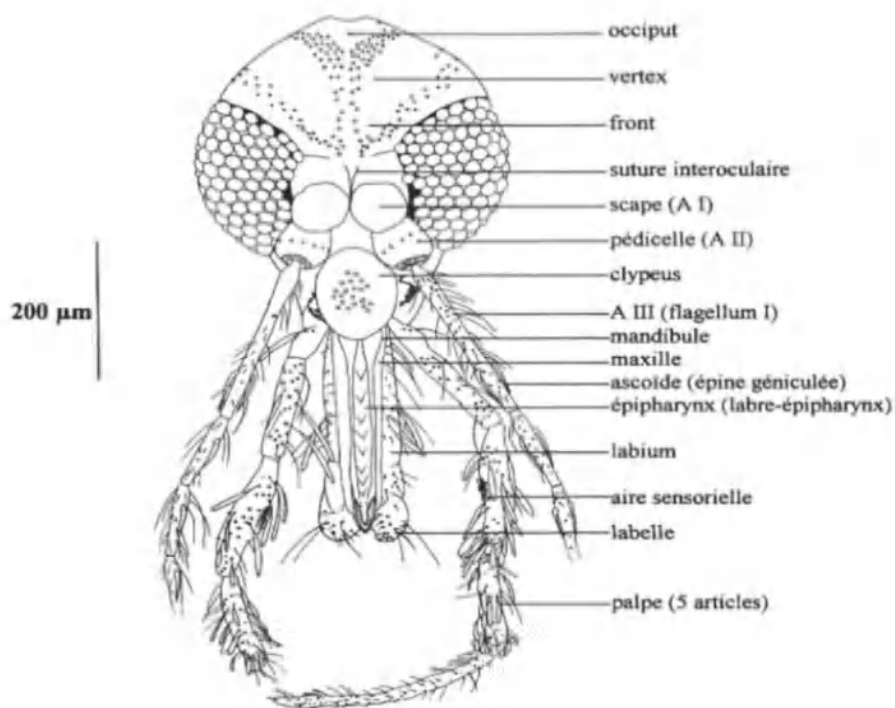


Fig 4. Vue générale de la tête d'un phlébotome.

Les pièces buccales de la femelle sont de type piqueur classique : elles comportent un labium, deux mandibules, deux maxilles et un labre, l'épipharynx. L'hypopharynx dorsal est parcouru par le canal alimentaire. Les pièces buccales du mâle sont similaires mais les mandibules sont absentes.

- **Le thorax** porte une paire d'ailes et des balanciers qui assurent l'équilibration de l'insecte pendant le vol. Il est gibbeux et les cuticules comme les ailes sont abondamment velues. Le thorax se divise en prothorax, mésothorax et métathorax. Sur chacun des trois segments thoraciques fusionnés, est insérée une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies.
- **L'abdomen** est formé de dix segments composés en tergite et sternite. Le premier tergite est plus grand que le suivant, et le premier sternite n'est pas visible. Chaque tergite est collé à un sternite par une membrane fortement plissée ce qui permet l'extension lors du repas sanguin. Les tergites portent

des soies qui sont dressées chez *Phlebotomus* (II et VI) et couchées chez *Sergentomyia*. Les segments VIII et X sont invaginés chez la femelle, fortement développés chez le mâle, et les trois derniers sont transformés en génitalia. Les sternites comportent deux lobes articulés : les cerques.

Chez le mâle, le génitalia ou hypopygium est composé d'une paire de coxites sur lesquels s'articulent les styles; une paire de pièces médianes, les paramères naissent à la base des coxites; une paire de prolongements ventraux appelés lobe latéraux et enfin, soudés à la partie interne de ces derniers par deux lames membraneuses médianes entre lesquelles s'ouvre l'anوس. Entre les paramères se situent les fourreaux ou valves péniennes.

Chez la femelle, l'appareil génital comporte une paire de lobes appelée gonapophyses ou valvula. Le génitalia comprend deux ovaires constitués chacun de nombreux ovarioles, deux glandes annexes et deux spermathèques. Les spermathèques sont formées chacune d'une capsule chitineuse de morphologie variable, suivie d'un conduit plus ou moins long qui vient déboucher dans l'atrium génital.

L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle, sont utilisés dans l'identification et la classification des espèces.

4.2. Systématique

Les phlébotomes sont des métazoaires, appartenant à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères (Mazelet L, 2004). De nombreux travaux ont débuté au 18ème siècle par la description de *Phlebotomus papatasi*, notamment Scopoli en 1786. Et actuellement, près de 950 espèces sont décrites et ont été classées en plusieurs genres dont une

centaine, tant dans l'Ancien que dans le Nouveau Monde, sont incriminées dans la transmission de divers agents pathogènes, y compris ceux qui infectent l'homme : la bactérie *Bartonella bacilliformis*, les virus transmis par les phlébotomes et, surtout, les protozoaires du genre *Leishmania* (Benallal KE et al, 2022).

-En 1943, Rondani établit une liste dans laquelle Walker (1851) a groupé les espèces de phlébotomes dans la famille des *Phlebotomidae* (Bounamous A, 2010).

-Plus tard, Kertész (1903) distingue et classe les sous-familles : *Psychodinae* et *Phlebotominae*, qu'il groupe dans la famille des *Psychodidae* (Bounamous A, 2010).

-Franca et Parrot (1920) ont ensuite subdivisé le genre *Phlebotomus* en cinq sous-genres: *Phlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Brumptomyia*, *Lutzia* (=Lutzomyia) et *Sergentomyia*.

-Theodor (1948), en se basant sur la variabilité morphologique de l'armature buccale (cibarium), du pharynx et des spermathèques des femelles, a divisé la sous-famille des *Phlebotominae* en quatre genres, *Phlebotomus*, et *Sergentomyia* dans l'Ancien Monde; *Lutzomyia*, *Brumptomyia* et *Warileya* dans le Nouveau Monde.

-Perfiliew en 1966, regroupe tous les phlébotomes dans la famille des *Phlebotomidae* et crée la super-famille des *Psychodidae* et quelques années plus tard (1973), Lewis reconnaît la famille des *Phlebotomidae*.

-En 1976, Abonnenc et Léger proposent ensuite une nouvelle classification dans laquelle la famille des *Phlebotomidae* (Walker, 1848) est divisée en trois sous-familles et 10 genres :

* la sous-famille des *Neophlebotominae* qui compte 4 genres : *Grassomyia* (Theodor, 1958), *Parvidens* (Theodor et Mesghali, 1964), *Brumptomyia* (Franca et Parrot, 1921) et *Lutzomyia* (Franca, 1921) (Bounamous A, 2010).

* la sous-famille des *Disphlebotominae* avec deux genres: *Warileya* (Hertig, 1948) et *Hertigia* (Fairchild, 1949) (Bounamous A, 2010).

* la sous-famille des *Euphlebotominae* qui comprend 4 genres : *Spelaeophlebotomus* (Theodor, 1948), *Idiophlebotomus* (Quate et Fairchild, 1961), *Phlebotomus* (Rondani, 1843) et *Sergentomyia* (Franca et Parrot, 1921) (Bounamous A, 2010).

Parmi ces derniers, seuls les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* sont présents dans la région méditerranéenne. Ils comportent chacun quatre sous-genres (Bounamous A, 2010).

Le genre *Phlebotomus*, qui prédomine dans l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) (Quitterie N et al, 2005; Samake S, 2006; Dedet JP, 2009; Estevez Y, 2009), se distingue par les caractéristiques morphologiques suivantes : soies des tergites abdominaux toutes dressées, armature cibariale absente ou rudimentaire, spermathèques complètement ou incomplètement segmentées et style des génitalia comportant 4 à 5 épines (Rondani, 1843 in Abonnenc E, 1972).

Quant au genre *Sergentomyia*, qui prédomine dans le Nouveau Monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale) (Quitterie N et al, 2005; Samake S, 2006; Dedet JP, 2009; Estevez Y, 2009), se caractérise par des soies abdominales couchées dans la plupart des espèces (quelques-unes sont dressées dans un sous-genre), armature cibariale bien développée, spermathèques tubulaires, capsuliformes ou segmentées,

style des génitalia des mâles à quatre longues épines et une petite soie sur le côté interne (França et Parrot, 1921 in Abonnenc E, 1972).

Dans l'Ancien Monde, les phlébotomes sont traditionnellement divisés en 7 genres, certains d'entre eux comprenant d'autres sous-genres. La taxonomie des phlébotomes est traditionnellement basée sur l'analyse de caractères morphologiques décisifs sur la tête et les organes génitaux (Lewis DJ, 1982; Munstermann LE, 2018), mais l'avènement des techniques moléculaires qui déploient principalement des analyses de séquençage de marqueurs génétiques appropriés (Depaquit J, 2014) a permis de mieux comprendre les espèces cryptiques, y compris les taxons difficiles dans le monde, et plus particulièrement de la région du Maghreb comme *Ph. perniciosus* et *Ph. longicuspis* ou *Ph. riouxi* et *Ph. chabaudi*. De plus, ils ont permis d'associer les mâles aux femelles, par exemple *Chinius samarensis* (Léger N et al, 2012), de donner un aperçu des vecteurs et des non-vecteurs par la détection de l'ADN du parasite ou de proposer une systématique évolutive (Di Muccio T et al, 2000; Bounamous A et al, 2008; Depaquit J, 2014). En outre, le séquençage de nouvelle génération (NGS) et l'analyse statistique des données qui en résultent ont été utilisés pour aider à l'identification des espèces dans des échantillons groupés dans plusieurs études virologiques (Di Muccio T et al, 2000; Bounamous A et al, 2008; Léger N et al, 2012). Récemment, la spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), une méthode basée sur les protéines, a été introduite pour l'identification rapide et rentable des espèces de divers arthropodes, y compris les phlébotomes, sur la base de leurs profils protéiques spécifiques (Lafri I et al, 2016; Yssouf A et al, 2016). Ces approches moléculaires complètent l'identification morphologique qui est toujours considérée comme la méthode de référence des

enquêtes entomologiques et des programmes de lutte antivectorielle (Benallal KE et al, 2022).

Au total, 32 espèces des genres *Phlebotomus* (Ph.) et *Sergentomyia* (Se.) ont été signalées dans la région du Maghreb (24 en Algérie, 15 en Libye, 18 en Tunisie, 23 au Maroc, et 9 en Mauritanie). *Ph. mariae* et *Se. africana subsp. asiatica* ont été enregistrés uniquement au Maroc, *Ph. mascitti*, *Se. hirtus*, et *Se. tiberiadis* uniquement en Algérie, tandis que *Ph. duboscqi*, *Se. dubia*, *Se. africana africana*, *Se. lesleyae*, *Se. magna*, et *Se. freetownensis* ont été signalés uniquement en Mauritanie (Benallal KE et al, 2022).

En Algérie, les phlébotomes ont été signalés pour la première fois en 1912 (Foley H et Leduc H, 1912). Ils ont fait l'objet de travaux très importants à l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction de Parrot et des frères Sergent, avec la description de plusieurs nouvelles espèces (*Ph. sergenti* en 1917, *Se. fallax* en 1921, *Se. dreyfussi* en 1933 et *Ph. bergeroti* en 1934). En 1980 et 1981 respectivement, la population de phlébotomes du Tassili n'Ajjer et du Hoggar dans le sud de l'Algérie a été décrite (Belazzoug S. et Mahzoul D, 1980, 1981). Ensuite, la même équipe a rapporté pour la première fois la présence de *Se. minuta* (Belazzoug S et al, 1982). Plus tard, après une enquête épidémiologique sur les leishmanioses menée en Algérie entre 1972 et 1976, Dedet et ses collègues ont rapporté le résultat de leurs investigations entomologiques avec une référence particulière à la taxonomie, la distribution, l'écologie et le rôle pathogène des 15 espèces trouvées. La liste des phlébotomes a ensuite été actualisée à 21 espèces et une clé a été fournie pour aider à l'identification des phlébotomes algériens (Dedet JP et al, 1984). En 1991, Belazzoug a établi un nouveau statut de la faune algérienne des phlébotomes avec 22 espèces recensées (Belazzoug S, 1991). Quelques études dans le Nord-Est du

pays ont été réalisées concernant le statut écologique des phlébotomes (Kabbout N et al, 2016), et la distinction morphologique entre deux espèces sympatriques : *Ph. perniciosus* et *Ph. longicuspis* (Berchi S et al, 2007). En 2011, *Ph. mascittii* a été signalé pour la première fois en Algérie lors d'une étude entomologique menée dans un foyer endémique de LV du nord du pays (Kabylie) (Berdjane-Brouk Z et al. 2011). Une autre enquête entomologique réalisée à Tamanrasset a permis d'identifier une nouvelle localisation de *Ph. kazeruni* en Algérie (Benallal KE et al, 2013), ce qui a conduit à élargir la faune phlébotomienne à 25 espèces. Récemment, Lafri et al. ont établi l'application du MALDI-TOF MS pour le suivi et l'identification des phlébotomes capturés sur le terrain (Lafri I et al, 2016). Plus récemment, une étude entomologique a fourni pour la première fois la présence d'une forme atypique de *Ph. perniciosus* en Algérie (Benallal KE et al, 2017) (tableau 2).

Tableau 2. Liste des espèces de phlébotomes recensées en Algérie et leur répartition géographique en 2018 (Lafri I et Bitam I, 2021).

Espèces de phlébotomes	Distribution géographique
<i>Phlebotomus</i>	
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i> (Scopoli, 1786)	Frontière nord des steppes (Hauts plateaux)
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti</i> (Parrot, 1934)	Djanet, In Amguel, Tamanrasset
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> (Parrot, 1917)	Sud, Tell, steppe saharienne
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri</i> (Sinton, 1928)	Steppes présahariennes, Atlas
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi</i> (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970), synonyme de <i>P. riouxi</i>	Steppes présahariennes (climat aride), Ghardaia, Aures
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964)	Hoggar
<i>Phlebotomus (Larrousius) ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	Tell
<i>Phlebotomus (Larrousius) chadlii</i> (Rioux, Juminer et Gibily 1966)	Tell
<i>Phlebotomus (Larrousius) perniciosus</i> (Newstead, 1911)	Tous les étages bioclimatiques
<i>Phlebotomus (Larrousius) longicuspis</i> (Nitzulescu, 1911)	Tell, Hauts plateaux, steppe saharienne, Sahara central

<i>Phlebotomus (Larroussius) langeroni</i> (Nitzulescu, 1930)	Tell
<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i> (Parrot, 1930)	Tell
<i>Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii</i> (Grassi, 1908)	Kabylie
<i>Phlebotomus hirtus</i> (Parrot et de Jolinière, 1945)	Hoggar
Sergentomyia	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta parroti</i> (Adler et Theodor, 1927)	Tous les étages bioclimatiques
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i> (Parrot, 1921)	Steppes présahariennes, Atlas
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i> (Newstead, 1912), synonyme de <i>S. cincta</i>	Steppes présahariennes, Sahara central
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi</i> (Adler, Theodor et Parrot, 1929)	Tamanrassat
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) lewisi</i> (Parrot, 1948), synonyme <i>S. palestinensis</i>	Biskra, Djanet, Iherir, Tamanrassat
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) eremitis</i> (Parrot et de Jolinière, 1945), synonyme de <i>S. africana asiatica</i>	In Amguel, Tamanrassat
<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i> (Parrot, 1933)	Biskra
<i>Sergentomyia (Sintonius) clydei</i> (Sinton, 1928)	Frontière nord des steppes, Sahara central (Hoggar, Tassili)
<i>Sergentomyia (Sintonius) christophersi</i> (Sinton, 1927)	Frontière nord des steppes, Sahara central (Hoggar, Tassili)
<i>Sergentomyia (Sintonius) hirta</i> (Parrot et de Jolinière, 1945)	Sahara central
<i>Sergentomyia (Sintonius) tiberiadis</i> (Adler, Theodor et Louric, 1930)	Djanet

4.3. La bio-écologie et l'éthologie des phlébotomes

4.3.1. Mode d'alimentation

Les mâles et les femelles se nourrissent de nectar des fruits, des fleurs et de jus de plantes. Les glucides sont la source d'énergie. Les femelles sucent un repas de sang pour compléter le développement des lots d'œufs. Certaines espèces de phlébotomes sont autogènes, elles pondent des œufs sans se nourrir d'abord de sang. Les phlébotomes femelles sont les agents pathogènes ([Hashiguchi Y et Gómez Landires EA et al, 1991](#)). La plupart des phlébotomes anthropophiles piquent

les gens à l'extérieur de leurs tentes, maisons et logements (Colacicco-Mayhugh MG et al, 2011).

4.3.2. Mode de vie et comportements

Les phlébotomes sont nocturnes et sensibles à la déshydratation. Ils s'abritent dans des grottes, des rochers, des terriers d'animaux, des trous d'arbres et des chambres ou d'hébergements humains. Ils volent près du sol en sauts courts. Leur aire de répartition est de 300 m mais dans des environnements désertiques, certaines espèces peuvent parcourir jusqu'à 2300 m (Gómez-saladín E et al, 2005).

Les phlébotomes dans le Nouveau Monde se trouvent près des trous d'arbres et des grottes (Felicciangeli MD, 2004). *Lutzomyia (Lu.) shannoni* aux États-Unis a été trouvé dans la forêt de feuillus et la prairie. Dans l'Ancien Monde, les phlébotomes sont associés aux sols contaminés, des refuges pour animaux, des terriers de rongeurs et des termitières, également dans les sols en terre des habitations humaines (Claborn D et al, 2008).

Le vol des phlébotomes est caractéristique, il s'agit d'un vol silencieux par petits bonds aériens de 1.5 à 2 m, interrompu par de brèves périodes de repos (Colange H, 2011). Des études suggèrent que la vitesse maximale de ce vol soit légèrement inférieure à 1m/s (Killick-Kendrick R et al, 1986). L'altitude de vol est peu élevée : les phlébotomes ont tendance à voler horizontalement près du sol en zone dégagée. Par ailleurs, les femelles gorgées seraient moins enclines à parcourir de longues distances (Ready PD, 1971; Kettle DS, 1995).

Enfin, il apparaît que la pluie serait un facteur limitant pour le vol, de même qu'un vent d'une force supérieure à 1- 1.5 m/s, tout vol cessant à partir de 4-5 m/s (Dillon RJ et Lane RP, 1993; Rutledge LC et Gupta RK, 2002).

4.3.3. Croissance et développement du phlébotome

La mouche des sables nécessite une température de 28 degrés (max) centigrades et une humidité de 40% pour sa croissance et son développement. Au laboratoire, ces mouches mettent 20 à 40 jours pour compléter leur cycle de vie. Le phlébotome présente une métamorphose holométabolique (œuf, larve, pupa et adulte) (Fig 5). Ils peuvent pondre entre 30 et 70 œufs. En 1 à 2 semaines, les œufs éclosent. Les larves se nourrissent de matière organique morte. Le développement de la pupa prend 5 à 10 jours. Avant que l'adulte n'émerge de la nympha, pendant la journée, le phlébotome ne peut pas survivre dans un environnement sec et doit être dans des sites humides. La nuit, celui-ci abaisse la température ambiante et devient actif en augmentant l'humidité (Durrani AZ et al, 2012).

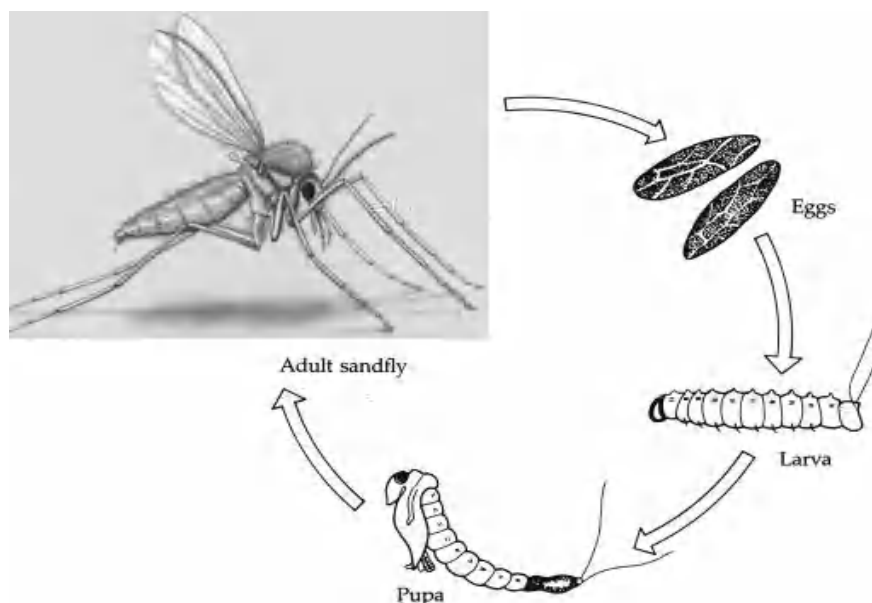


Fig 5. Cycle évolutif du *Phlebotomus* sp. (Bogitsh BJ et al, 2013).

4.3.4. Phlébotomes et *Leishmania*

Le cycle de vie de *Leishmania* chez l'insecte commence lorsque les phlébotomes femelles ingèrent le sang d'un mammifère infecté. Dans le phlébotome, les

Leishmania se développent exclusivement à l'intérieur du tube digestif (Sacks D et Kamhawi S, 2001). Au cours de leur développement, les parasites subissent des changements pour s'adapter à leur nouvel environnement et se développer à la forme infectieuse. Dans le processus appelé métacyclogenèse, les parasites passent des amastigotes sphériques aflagellés intracellulaires ingérés avec le sang des vertébrés à des formes métacycliques infectieuses extra-cellulaires flagellées allongées. Ces changements morphologiques s'accompagnent de modifications moléculaires. Par exemple, des altérations à la surface du parasite permettent l'interaction avec l'intestin moyen de l'insecte, une étape fondamentale pour la survie du parasite, son développement et l'infectivité subséquente pour l'hôte vertébré (Bates B et al, 2008) (Fig 6).

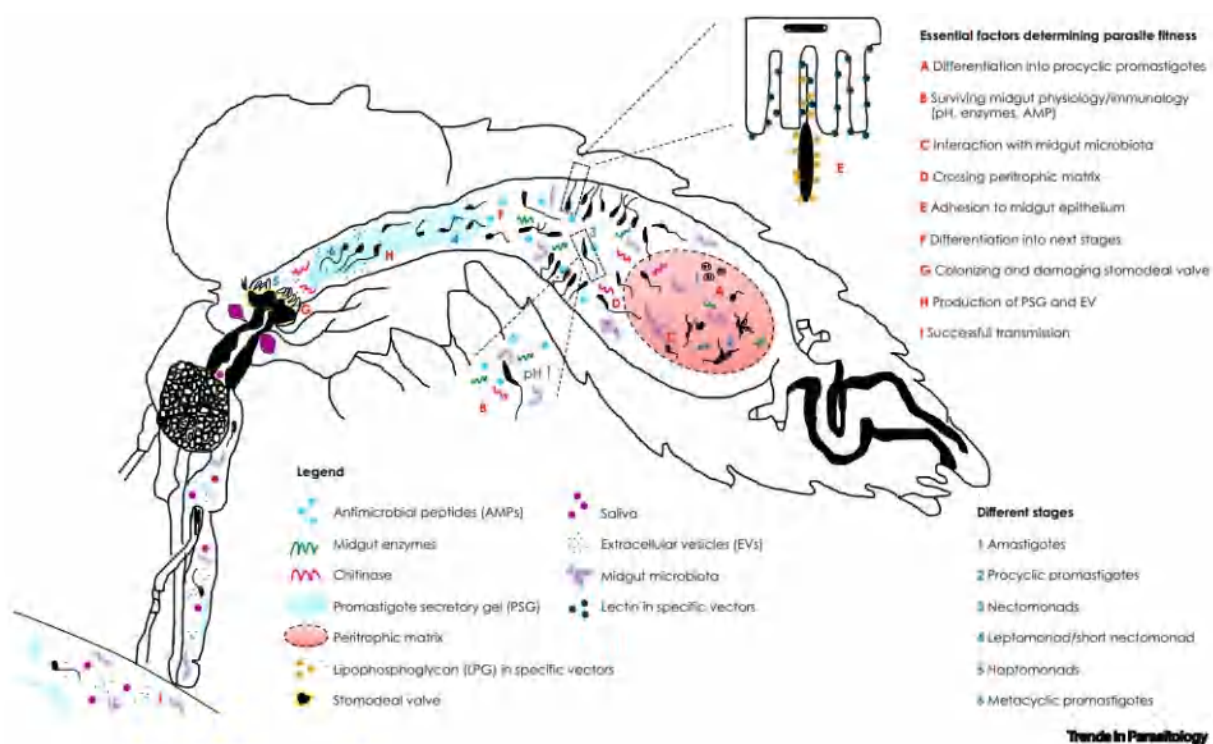


Fig 6. Représentation graphique des différents stades du parasite *Leishmania* dans le vecteur phlébotome (numéros 1-6) et des facteurs essentiels déterminant la fitness du parasite (lettres capitales A-I). Les différents acteurs physiologiques et immunologiques connus pour être impliqués dans l'interaction *Leishmania*-phlébotome sont indiqués dans la légende (Van Bocksta L et al, 2020).

Pour être transmis avec succès, le parasite doit surmonter plusieurs obstacles, parmi lesquels infecter l'espèce de phlébotome adéquate. La compétence vectorielle du phlébotome dépend de plusieurs facteurs tels que la préférence trophique (repas sanguin), la capacité d'infection par une espèce de *Leishmania* ingérée, et être capable d'achever son développement dans l'intestin moyen après la digestion du repas sanguin.

Dans la nature, vivre en sympatrie n'équivaut pas à la compétence vectorielle, car des vecteurs restrictifs ou spécifiques ne transmettent que des espèces particulières de *Leishmania* (comme *Ph. papatasi* et *L. major*) (Sacks D et Kamhawi S, 2001). D'autres espèces de phlébotomes sont considérées comme permissives ou non spécifiques, car elles peuvent héberger des infections expérimentales de plusieurs espèces de *Leishmania* (par exemple *Lu. longipalpis* et *L. infantum chagasi* ou *L. mexicana*).

Le succès de la colonisation de l'intestin moyen du phlébotome par *Leishmania* est déterminé par plusieurs facteurs moléculaires. Le premier défi de *Leishmania* chez le phlébotome est de résister au processus digestif en interférant avec l'activité des enzymes digestives du phlébotome (Dillon RJ et Lane RP, 1993; Schlein Y et Jacobson RL, 1998; Sant'Anna MR et al, 2009; Telleria EL et al, 2010) et en modulant la transcription de plusieurs gènes d'enzymes digestives (Jochim RC et al, 2008; Pitaluga AN et al, 2009). Selon des données de la littérature, *Leishmania* spp. sécrètent un peptide myoinhibiteur qui arrête le péristaltisme de l'intestin postérieur de l'espèce du phlébotome spécifique, retardant ainsi l'élimination fécale et augmentant la persistance du parasite au sein de l'intestin moyen de l'insecte. Cela augmente ainsi la probabilité d'une transmission ultérieure (Vaidyanathan R, 2004). Du point de vue du phlébotome, *Leishmania* est un invité indésirable qui provoque

une indigestion, une constipation intestinale et des difficultés à avaler le repas sanguin. Un élément fondamental dans le tube digestif du phlébotome est la membrane péritrophique (MP). Il s'agit d'une membrane semi-perméable composée de glycoprotéines associées à des fibrilles de chitine qui isole le bol digestif de l'épithélium de l'intestin moyen et pourrait avoir un rôle dans la colonisation de l'intestin moyen par *Leishmania*. Le succès de la colonisation du parasite est en relation fondamentale avec l'homéostasie de la biogenèse des MP chez les phlébotomes. Des études sur *Ph. papatasi* ont montré que l'inhibition de la formation de MP, par addition d'une chitinase exogène dans le repas sanguin, a conduit à des phlébotomes réfractaires à l'infection par *L. major* (Pimenta PF et al, 1997). Plus récemment, il a été suggéré que la mortalité par *Leishmania* n'était pas directement causée par les protéases du phlébotome et pourrait résulter de produits toxiques de la digestion des repas sanguins. Néanmoins, l'interruption de la dégradation des MP, par le silencing d'un gène de chitinase d'insecte, a également entraîné une réfraction à l'infection par *Leishmania*, indiquant ainsi la nécessité de plus d'expériences pour comprendre ce mécanisme (Coutinho-Abreu IV et al, 2010).

Après le passage à travers la matrice péri-trophique, *Leishmania* s'attachent à l'épithélium de l'intestin moyen du phlébotome, alors que les déchets du repas sanguin passent à l'intestin postérieur pour la défécation à la fin du processus digestif. L'attachement peut être favorisé par les lipophosphoglycans (LPG), comme dans le cas des vecteurs restrictifs tels que *Ph. papatasi*, ou via un mécanisme indépendant du LPG (Myskova J et al, 2007).

Lors de la dernière étape du développement des parasites et avant que le phlébotome tente de se nourrir d'un autre hôte, les parasites métacycliques migrent vers la région du mésogastre thoracique de la valve stomodéale. D'après des études

(Pimenta PF et al, 1997), les chitinases sécrétées par les *Leishmania* attaquent la paroi de cette valve endommageant irrémédiablement et empêchant ainsi son bon fonctionnement. D'un autre côté, le gel sécrétoire parasitaire (GSP), sécrété par *Leishmania*, forme un bouchon qui empêche ou réduit considérablement l'afflux de sang vers l'intestin moyen (Pruzinova K et al, 2018). Ensemble, le bouchon GSP et l'absence de valve stomodéale fonctionnelle, créent un mécanisme qui facilite l'expulsion (ou la régurgitation) des parasites situés devant ou à l'intérieur du bouchon sur la peau de l'hôte vertébré.

Une étude en 2018 a montré que l'ingestion d'un deuxième repas de sang non infecté par des phlébotomes infectés par *Leishmania* déclenche la différenciation des promastigotes métacycliques, considérés comme un stade de différenciation terminale chez le vecteur, en un stade de type leptomonade-like : le promastigote rétroleptomonade. De plus, un repas sanguin secondaire amplifie de 125 fois les quelques parasites *Leishmania* ingérés en se nourrissant d'hôtes infectés et multiplie par quatre la fréquence des lésions chez les phlébotomes ayant pris deux repas de sang par rapport aux phlébotomes ayant pris qu'un seul repas (Serafim TD et al, 2018) (Fig 7).

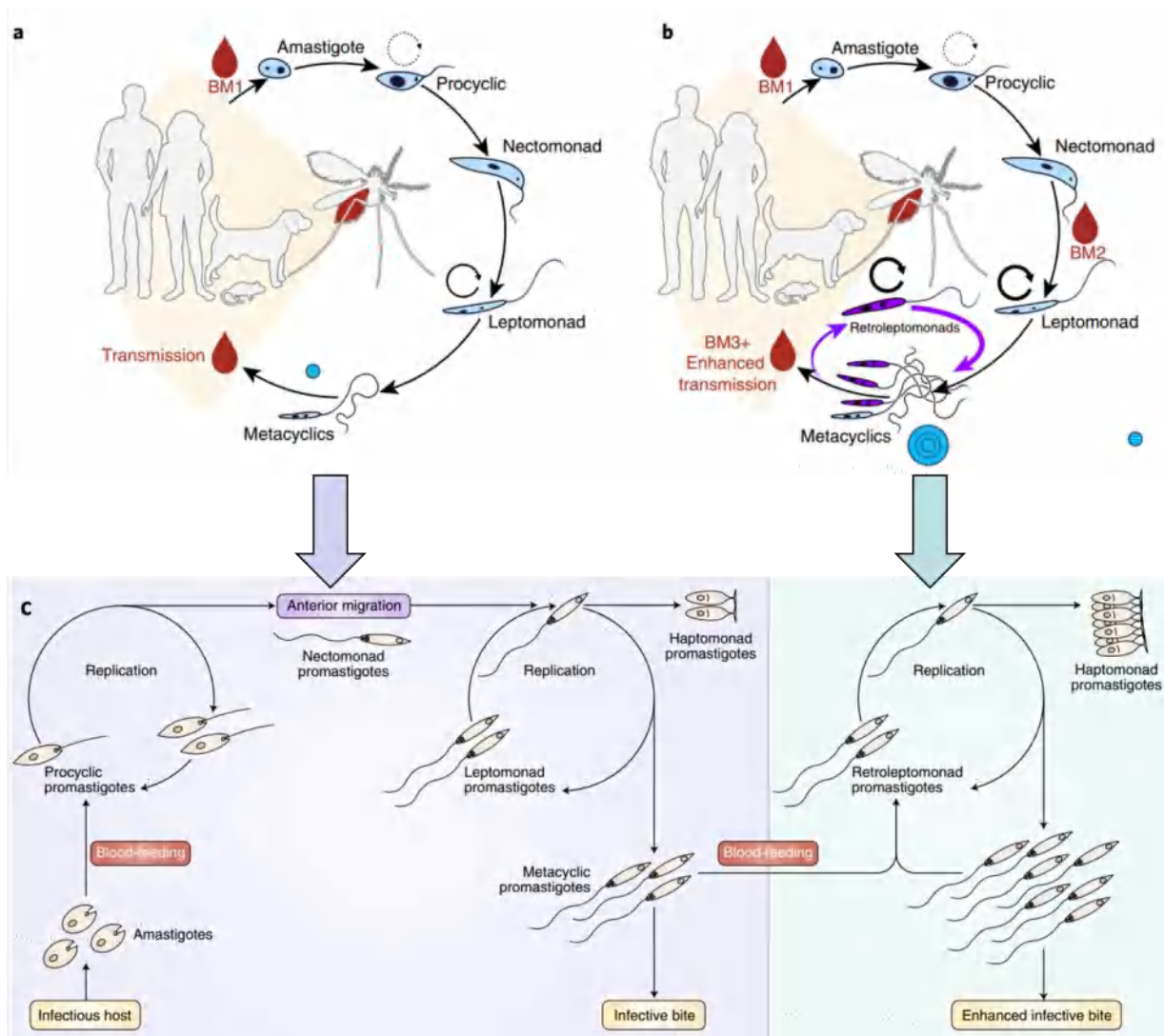


Fig 7. a. Cycle de développement classique dans l'intestin moyen des parasites *Leishmania*. **b.** Les repas de sang consécutifs favorisent l'infection par *Leishmania* en déclenchant la différenciation des formes métacycliques en rétroleptomonades multiplicatives, amplifiant ainsi le nombre des parasites. **c.** Cycle de vie révisé de *Leishmania* chez le phlébotome. (Modifier à partir de (Bates PA, 2018, Serafim TD et al, 2018)).

4.3.5. Phlébotome, immunité, microbiote et *Leishmania* : Une interaction complexe

Contrairement aux nombreuses études sur la réponse immunitaire d'autres insectes aux parasites, on sait peu sur la réponse immunitaire des phlébotomes aux infections par *Leishmania*.

Les réponses immunitaires des insectes conduisent à la stimulation de divers mécanismes immunitaires. Parmi ceux-ci, on trouve l'ARNi, JAK-STAT, IMD et Toll, qui détermineront la production de molécules effectrices de la réponse (Lemaitre B et al, 1995; Brennan CA et Anderson KV, 2004; Zeidler MP et Bausek N, 2013).

La capacité du phlébotome à lutter contre les infections microbiennes a été démontrée dans de nombreuses études. Dans le cas des infections parasitaires, l'isolement et la caractérisation d'une défensine, un peptide antimicrobien active de *Ph. duboscqi* induit par *L. major*, démonte une réponse immunitaire humorale de phlébotome (Boulanger N et al, 2004). Plus récemment, l'implication d'une défensine de *Lu. longipalpis* dans la réponse immunitaire du phlébotome a été étudiée (Telleria EL et al, 2013). Les femelles de *Lu. longipalpis* ont été infectées par *L. mexicana* par voie orale ou par micro-injection. Les résultats ont montré que contrairement à ce qui a été observé avec *Ph. duboscqi*, l'infection orale de *Lu. longipalpis* par *Leishmania* n'a pas stimulé la transcription de la défensine. Il est possible que des peptides antimicrobiens (PAM) de *Lu. longipalpis*, autres que la défensine, soient induites suite à l'infection par *L. mexicana*. Un aspect intéressant de ces différentes réponses est le fait que *Ph. duboscqi* est un vecteur restrictif de l'Ancien Monde tandis que le *Lu. longipalpis* est un vecteur permissif du Nouveau Monde (Dostálová A et Volf P, 2012).

Dans une récente étude, les cellules LL5 ont été challengées avec différents microorganismes, dont *L. infantum chagasi*. La présence de *Leishmania* a conduit à une régulation positive du gène Cactus, le régulateur négatif de la voie Toll, tandis que l'expression de Caspar, le régulateur négatif de la voie IMD (immune deficiency), n'a pas changé de manière significative. Les gènes Dorsal et Relish, modulateurs positifs des voies Toll et IMD, ont été régulées à la hausse par les *Leishmania* avec

l'expression des PAM : attacine, cécropine et défensine 2 (Tinoco-Nunes B et al, 2016). Ces résultats ont révélé que les voies Toll et IMD sont impliquées dans la réponse immunitaire de la lignée cellulaire LL5 du phlébotome contre les *Leishmania*.

Leishmania ne se trouve pas seul dans l'intestin moyen du phlébotome. Lorsque les parasites atteignent le tube digestif de l'insecte, ils rencontrent le microbiote intestinal, une riche communauté de micro-organismes commensaux, avec une prédominance bactérienne qui colonise naturellement l'intestin du phlébotome. Le microbiote des insectes joue un rôle important dans la physiologie des vecteurs, comme la nutrition et la digestion (Dillon RJ et Dillon VM, 2004) et peut également agir sur la maturation du système immunitaire inné (Weiss BL et al, 2011). La relation entre les agents pathogènes à transmission vectorielle et le microbiote intestinal des insectes a été mise en évidence dans plusieurs rapports. Le microbiote peut influencer l'infection parasitaire par l'activation des voies immunitaires innées du vecteur, conduisant à l'induction de molécules effectrices qui aideront à contrôler l'infection. À titre d'exemple, la suppression des réactifs oxygénés (ROS) dans l'intestin moyen de *Lu. longipalpis* a révélé le rôle important du microbiote dans la facilitation de l'infection par *Leishmania* (Diaz-Albiter H et al, 2011).

Récemment, des études ont démontrés que le développement de *Leishmania* dans le vecteur dépend du microbiote. Tout d'abord, on a étudié la flore bactérienne dans l'intestins de *Lu. longipalpis* nourris au sucre, nourris au sang et infectés par *L. infantum* et élevés en colonies dans un insectarium. Ensuite, on a étudié l'effet du traitement antibiotique sur l'infection par *Leishmania*. Les résultats ont montré que l'infection par *Leishmania* entraînait une perte importante de la diversité de la flore bactérienne tout au long de l'infection, l'épuisement du microbiote intestinal de *Lu.*

longipalpis après l'antibiothérapie altérerait la réplication et le développement de *L. infantum* vers les formes métacycliques infectieuses (Kelly PH et al, 2017). Une autre étude menée sur *Ph. duboscqi* infecté par *L. major*, après traitement par des antibiotiques a corroboré l'effet du microbiote dans développement de *Leishmania* dans l'intestin moyen de *Ph. duboscqi*. Les auteurs ont également démontré que l'alimentation des phlébotomes avec de surnageant de culture bactérienne n'a pas été en mesure d'inverser l'effet antibiotique. L'introduction de bactéries résistantes aux antibiotiques isolées à partir du microbiote naturel de *Ph. duboscqi* dans l'intestin moyen n'a pas altéré l'infection par *Leishmania* (Sant'Anna MR et al, 2014).

La complexité de la relation entre le vecteur, le protozoaire pathogène et le microbiote peut être observée dans un travail récent avant que des preuves aient été présentées pour l'implication du microbiote dans la formation des MP des anophèles. Les moustiques traités avec des antibiotiques ont montré une réduction de l'expression de plusieurs gènes liés à la production de la MP. De plus, la microscopie électronique a révélé des perturbations de l'intégrité des particules chez les insectes traités aux antibiotiques (Rodgers FH et al, 2017).

L'importance du microbiote des phlébotomes dans l'infection par les *Leishmania* a été renforcée dans un autre travail récent où les auteurs ont identifié un rôle crucial du microbiote dans l'infection par *L. donovani* chez les mammifères. En effet, lors du repas sanguin de *Lu. Longipalpis*, les microorganismes du microbiote du vecteur régurgités avec *Leishmania* activent l'inflammasome des neutrophiles de souris, conduisant à une production rapide d'interleukine-1b (IL-1b), qui stimule l'infiltration des neutrophiles dans le site de l'infection (Dey R et al, 2018). Ces neutrophiles aident à protéger les parasites *L. donovani* et à favoriser l'infection des macrophages après la transmission. La dysbiose des phlébotomes utilisant un traitement

antibiotique a perturbé l'infection par *L. donovani*. Ce résultat suggère que la relation entre *Leishmania* et le microbiote du phlébotome peut aller au-delà de l'intestin moyen du vecteur : la présence de microorganismes module la réponse immunitaire de l'hôte vertébré en produisant un milieu favorable à l'infection des vertébrés par le parasite *Leishmania* transmis.

En conclusion, ces résultats révèlent la complexité de la relation entre le phlébotome, *Leishmania* et le microbiote commensal. Une meilleure compréhension de cette relation et des mécanismes sous-jacents pourrait identifier des cibles pour le développement de stratégies pour contrôler la capacité du phlébotome à transmettre les *Leishmania* à l'homme et aux animaux.

5. Le réservoir

On peut faire entrer les leishmanioses dans deux grandes catégories en fonction de l'origine de l'infestation humaine : les leishmanioses zoonotiques pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques, et les leishmanioses anthroponosiques pour lesquelles le réservoir est constitué par l'homme.

5.1. Réservoirs zoonotiques

Les hôtes réservoirs des leishmanioses zoonotiques sont des animaux sauvages et des animaux domestiques tels que :

5.1.1. Le chien

La leishmaniose est la première parasitose du chien. Les sources de parasites sont les chiens hébergeant des leishmanies dans le derme; les parasites peuvent être présents dans la peau même en l'absence des lésions cutanées (Bussiéras J et

Chermette R, 1992). Le chien domestique est donc considéré comme le réservoir principal de *L. infantum* dans le bassin méditerranéen (Denerolle P, 2003; Carre N et al, 2010), en Chine et en Amérique en raison de :

- Sa forte réceptivité;
- La forte prévalence d'infection des chiens par *L. infantum* (la plupart étant asymptomatiques) dans les zones d'endémie de leishmanioses humaines;
- Un parasitisme cutané intense chez les chiens infectés augmentant le risque de transmission;
- Une latence d'apparition des signes cliniques pouvant atteindre des années;
- L'isolation du zymodème MON-1 de *L. infantum*, à partir de chiens, responsable de la plupart des formes de LV humaine autour du bassin méditerranéen.

Le chien est également le réservoir principal de *L. braziliensis*, qui est l'agent étiologique de la LC en Amérique. Le rôle de réservoir du chien est probablement négligeable pour les autres espèces de *Leishmania* (Dantas-Torres F, 2007).

5.1.2. Le chat

Bien que la leishmaniose féline (LF) soit considérée comme une constatation rare (Passos VMA et al, 1996; Ozon C et al, 1998), plusieurs cas de formes à la fois viscérale et cutanée ont été rapportés en Amérique, Europe, Afrique et en Asie (Soares CS et al, 2016). Néanmoins, la sensibilité réelle des chats à l'infection par *Leishmania* spp. est mal comprise. D'après les travaux de Simões-Mattos et al., les chats domestiques ont toutes les propriétés nécessaires pour servir de réservoirs potentiels de *Leishmania*. D'autres études épidémiologiques sont nécessaires pour

déterminer la part réelle des chats dans la transmission de la leishmaniose dans les zones endémiques (Simões-Mattos L et al, 2005).

En Algérie, le premier cas de la LF rapporté dans la littérature date de 1912 à Alger (Leiva M et al, 2005). Et selon une enquête menée à la fourrière canine d'Alger en 2010, le chat serait un réservoir réel de la leishmaniose en Algérie (Djoudi M et al, 2010).

5.1.3. Les canidés sauvages

Tel que les chacals, renards, lycalopex sont révélés porteurs de *L. infantum* aussi bien dans l'Ancien que dans le Nouveau Monde. On a avancé l'hypothèse que ces animaux pourraient servir de réservoirs mais cela n'a pas encore été entièrement prouvé (OMS, 2010).

5.1.4. Les rongeurs

Ceux qui sont naturellement infestés appartiennent à des familles différentes : Gerbillidés (*Meriones*, *Gerbillus*, *Rhombomys*), Cricetidés (*Arvicanthis*) et Gliridés (Loirs et lérots). La grande gerbille, *Rhombomys opimus*, constitue l'hôte réservoir primaire de *L. major* dans les steppes de l'Asie centrale. *Psammomys obesus*, le principal réservoir de *L. major* en Asie de l'Ouest et en Afrique du Nord (OMS, 2010).

En Algérie, les hôtes réservoirs de *L. major*, agent étiologique de la LC, sont des rongeurs. *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* ont été reconnus comme réservoirs de *L. major* (Belazzoug S, 1984; Izri MA et al, 1992).

M. shawi est granivore, tandis que *P. obesus* est strictement végétarien, il se nourrit de chénopodiacées, *M. shawi* quand à lui, a une activité nocturne, il a une grande aire vitale, il circule loin de son gîte à la recherche de graines. *P. obesus* a une

activité diurne, il peuple les régions des chotts et sebkha, son régime alimentaire comporte essentiellement des plantes halophiles. La densité de peuplement étant en rapport avec la quantité des ressources disponibles pour nourrir les individus, ils doivent pouvoir vivre isolément, les uns loin des autres, d'où leur faible densité de peuplement en période de sécheresse (Petter F, 1961).

5.1.5. Autres mammifères

Tels que les tapirs, les hérissons (Wery M, 1995). Seuls les mammifères ont été à ce jour trouvés porteurs de protozoaires *Leishmania* pathogènes pour l'homme. Les hôtes/réservoirs de *Leishmania* appartiennent à ces sept ordres de mammifères : *Marsupialia*, *Cingulata*, *Pilosa*, *Rodentia*, *Primata*, *Carnivora* et *Chiroptera*, et ils sont les responsables du maintien des espèces de *Leishmania* dans la nature (Roque AL et Jansen AM, 2014).

5.2. Réservoirs anthropiques

L'homme malade joue le rôle de réservoir du parasite dans le cas de Kala-Azar indien et dans certains foyers de leishmaniose anthroponotique viscérale à *L. donovani*. Il est également le réservoir pour *L. tropica* pour la LC (Wery M, 1995). Il a également joué le rôle de réservoir dans certaines flambées dues à *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. panamensis*. Pour l'instant on ignore quel pourrait être le rôle des individus présentant une infestation asymptomatique dans le cycle de la transmission.

On sait que les sujets présentant une infection concomitante par le VIH sont très infectieux pour les phlébotomes et pourraient, dans certaines régions, jouer un rôle dans la transmission. En 2021, des cas de co-infection *Leishmania*-VIH avaient été

signalés dans 45 pays. On observe des taux élevés de co-infection *Leishmania*-VIH au Brésil, en Éthiopie et dans l'État du Bihar en Inde (OMS, 2022).

Parmi les formes provoquées par *L. donovani*, la LV et la leishmaniose dermique post-kala-azar (LDPKA) sont des sources d'infestation des phlébotomes de sorte que les cas doivent être activement recherchés et traités. Il en va de même des formes récidivantes de la LC dues à *L. tropica*. En outre, il est possible que l'homme joue le rôle de réservoir dans la leishmaniose due à *L. major* ainsi que dans un certain nombre de formes strictement cutanées due à *L. infantum*, par suite de l'évolution torpide des lésions (OMS, 2010).

Plusieurs espèces de leishmanies peuvent coexister à l'intérieur d'un même foyer, provoquant des formes cliniques apparemment identiques alors qu'elles relèvent de cycles épidémiologiques différents. Dans la Péninsule arabique, par exemple, *L. donovani* et *L. infantum* sont présentes à l'intérieur des mêmes foyers, la première uniquement chez l'homme et la seconde à la fois chez l'homme et le chien. Cela souligne l'importance d'une identification précise des parasites en cause (OMS, 2010).

La figure ci-dessous (Fig 8) synthétise le cycle évolutif des leishmanies, en mentionnant les deux formes du parasite (amastigote et promastigote), les deux genres de vecteurs (*Phlebotomus* et *Lutzomyia*), quelques hôtes réservoirs que nous avons présentés ainsi que les trois principales formes de leishmaniose humaine à savoir : la leishmaniose viscérale, cutanée et cutanéomuqueuse.

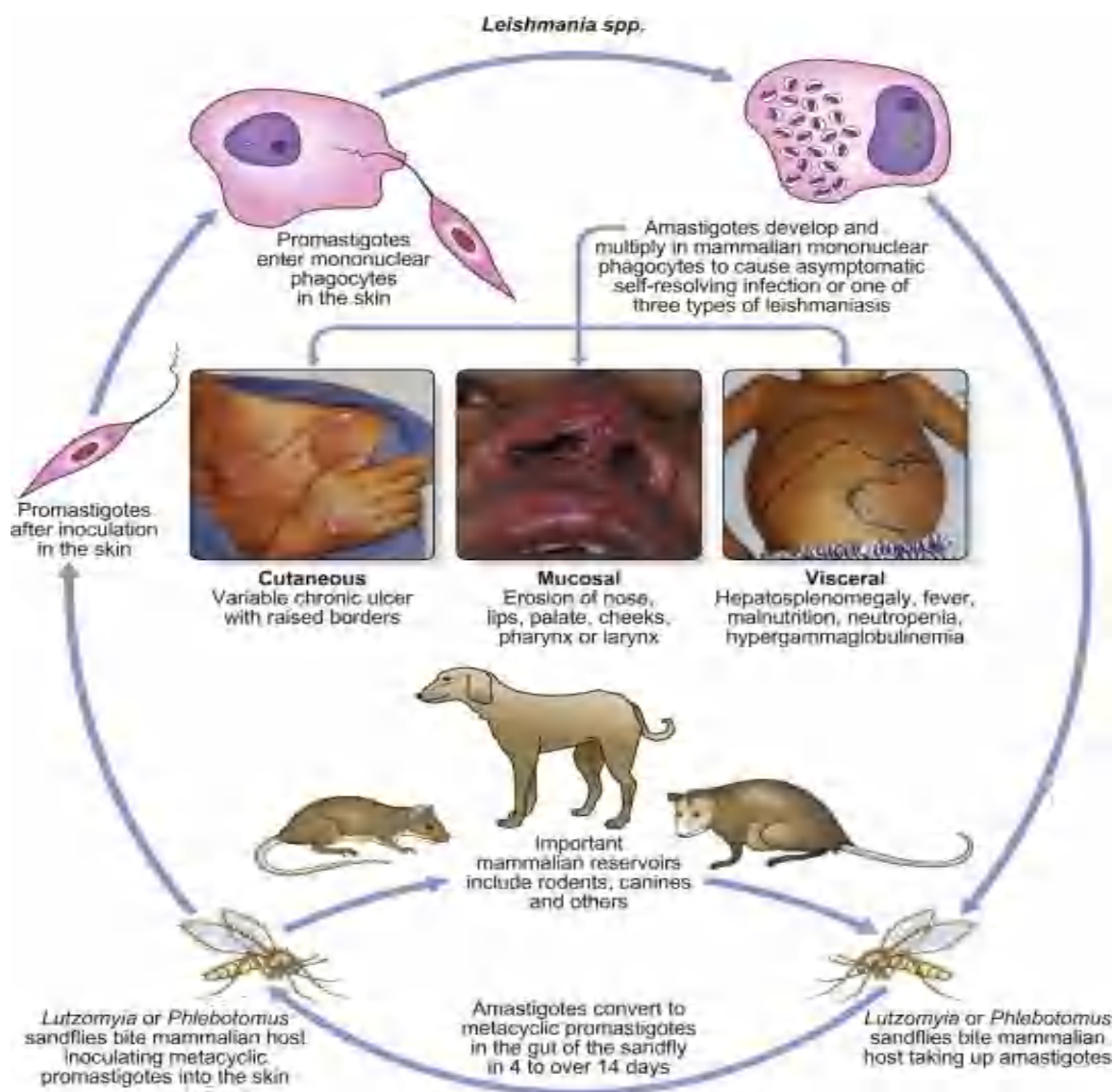


Fig 8. Le cycle évolutif de *Leishmania spp.* avec les différentes formes cliniques chez l'homme (Jerónimo SMB et al, 2011).

IV. EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSE

1. Répartition mondiale des leishmanioses

Les leishmanioses sont endémiques dans de vastes régions des tropiques, des subtropiques et du bassin méditerranéen, couvrant globalement plus de 98 pays (Fig 9). Il y a ~ 350 millions de personnes à risque et ~ 12 millions de cas, avec une incidence annuelle mondiale estimée à 0,7-1,2 million de cas de LC et 0,2-0,4 million

de cas de LV (Alvar J et al, 2012). Les leishmanioses constituent donc un problème de santé publique majeur, dont le fardeau s'est alourdi au cours des dernières décennies. Parmi les infections tropicales, elles sont la deuxième et la quatrième cause de décès et de maladie, respectivement (Bern C et al, 2008). De grandes épidémies meurtrières sont survenues en Inde (300,000 cas entre 1977 et 1980), avec une mortalité de 3% et au Soudan (100,000 morts entre 1989 et 1994) (OMS, 2010).

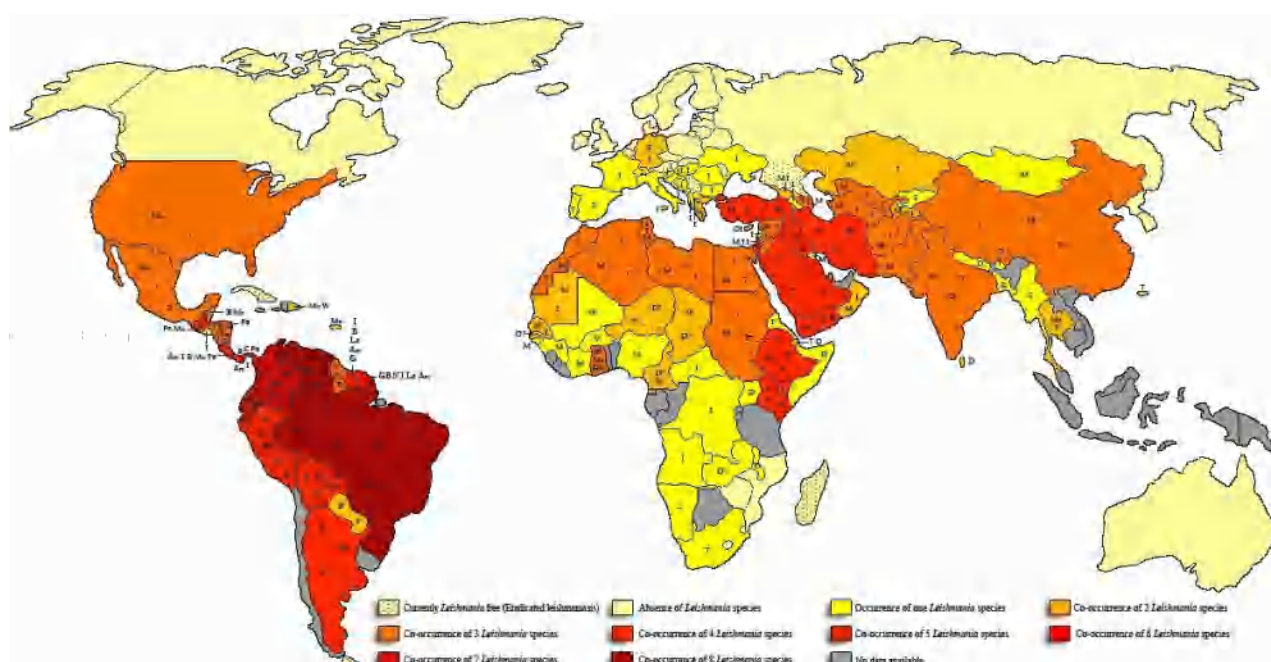


Fig 9. Distribution des 20 espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'homme. Le nom de l'espèce a été indiqué sous forme d'abréviation. A : *L. aethiopica*; Am : *L. amazonensis*; B : *L. braziliensis*; C : *L. colombiensiensis*; D : *L. donovani*; G : *L. guyanensis*; Gh : 'Ghana strain'; I : *L. infantum*; La : *L. lainsoni*; L : *L. lindenbergi*; M : *L. major*; Ma : *L. martiniquensis*; Mx : *L. mexicana*; N : *L. naiffi*; Pa : *L. panamensis*; P : *L. peruviana*; S : *L. 'siamensis'*; Sh : *L. shawi*; T : *L. tropica*; V : *L. venezuelensis* et W : *L. waltoni*. Les espèces avec des points d'interrogation doivent être confirmées par des études génotypiques supplémentaires (Akhoundi M et al, 2017).

Quant à la LCan, elle est répandue dans plus de 50 pays, survenant principalement dans la région méditerranéenne et en Amérique du Sud (Dantas-Torres F, 2009; Solano-Gallego L et al, 2009). La répartition géographique de la LCan s'est élargie, ces dernières années, dans l'hémisphère ouest, où elle se produit maintenant du

nord de l'Argentine (Cruz I, 2010), jusqu'au nord des États-Unis, atteignant même certaines provinces du sud du Canada (Duprey ZH et al, 2006). Il y a aussi une évidente propagation vers le nord de l'Europe, c'est le cas de l'Italie (Maroli M et al, 2008; Baldelli R et al, 2011). C'est une maladie d'importance croissante, elle est observable dans de nombreux pays méditerranéens dans laquelle elle sévit sous forme endémique et stable.

Concernant la séroprévalence de la LCan à *L. infantum* est similaire dans tous les pays de la Méditerranée occidentale, avec des variations d'une région à une autre, selon les aspects écologiques (Moreno J et Alvar J, 2002). On estime (une estimation prudente) sur 15 millions chiens en Europe, que 2,5 millions de chiens seraient infectés (16,7%) et qui peuvent être malades ou asymptomatiques (Dujardin JC et al, 2008; Moreno J et Alvar J, 2002; Palatnik-de-Sousa CB et Day MJ, 2011).

Pour certains pays voisins (Maroc et Tunisie), les prévalences sont variables selon le test de diagnostic utilisé mais aussi de la région d'étude (tableau 3).

Tableau 3. Quelques études sur les prévalences de la LCan en Tunisie et au Maroc

Pays	Province	Prévalence %	Années	Références
Tunisie	Kairouan	20,9 par PCR 12 par IFI	2005	Chargui N et al, 2009
	Sfax	6	/	Chargui N et al, 2007
Maroc	Khémisset	16,71	1996	Sahibi H et al, 2001
	Taza	16,09		
	Taounate	15,98		
	Sud du Maroc	19,8	2004-2007	Bousaa S et al, 2014
	Fès	24,59 par IFI 9,83 par test rapide	2009	Hajiba F et al, 2014

Dans le Moyen-Orient et les pays entourant le bassin méditerranéen, la séroprévalence varie de 1% à 24% (Baneth G et al, 1998; Abedelmajeed Nasereddin A et al, 2005). Dans les pays du Moyen-Orient bordant le bassin méditerranéen, en 2005 au Palestine par exemple, on a enregistré une prévalence de 16.7%.

Une séroprévalence importante a été signalée en Amérique du Sud: de 73% à São Vicente Férrer, Brésil (Silva AO et al, 2007), 40.3% à Pernambuco, Brésil (Dantas-Torres F et al, 2006), 33% dans l'île de Margarita, au Venezuela (Zerpa O, 2000).

Nous signalerons que l'incidence annuelle de la LCan n'a été étudiée que dans quelques régions, par exemple, à Madrid, 30 sur 1000 chiens ont été trouvés infectés en une saison (Amela C et al, 1995). En Italie, l'incidence était de 4.25 à 9.5% par an selon la région (Paradies P et al, 2006). L'incidence globale de l'infection par *Leishmania* dans la province de Jequié, au nord-est du Brésil, était de 6,55% par an, bien que l'incidence varie fortement entre les grappes de la ville (Paranhos-Silva M et al, 1998). La séroprévalence réelle du nombre de chiens infectés dans les zones endémiques serait vraisemblablement sous-estimée (Dye C, 1996). Comme le confirme les chiffres obtenus dans le dépistage, par PCR, des chiens séronégatifs, qui montrent des prévalences de 80% (24 sur 30) à Marseille, France (Berrahal F, 1996), et 67% à Majorque, Espagne (Solano-Gallego L et al, 2001).

2. Répartition géographique en Algérie

Les leishmanioses sont signalées sur tout le territoire national. La LV infantile et la LC sporadique se répartissent sur toute la partie nord du pays et leur distribution géographique correspond à celle de la LCan (Adel A et al, 2015). Bien que leur fréquence varie d'une région à l'autre, il est cependant important de noter que le foyer de la Grande Kabylie regroupe à lui seul près de 50% des cas recensés. Cette

affection qui touche habituellement des enfants malnutris, vivants en zone rurale, affecte depuis quelques années de plus en plus de sujets n'ayant jamais quitté les grandes zones urbaines (Harrat Z et Belkaid M, 2003). Ceci a été confirmé par Barchiche NA et Madiou (2009) en Kabylie, région endémique de la LV.

Les LC sporadiques du nord moins fréquentes et bénignes avec 485 cas en 2004–2005 (source INSP), présentes toute l'année à l'état endémique dans le nord du pays, ont augmenté timidement annuellement et ont touché tout le littoral et le tell algérien (Tizi-Ouzou, Bouira, Bordj-Menail et Alger) (Barchiche NA et Madiou M, 2009).

Quant à la LC, Benikhlef et al. (2004) ont rapporté qu'il existait deux formes endémiques : la LC du nord à *L. infantum* et la LC zoonotique à *L. major*, répandue dans les régions steppiques et sahariennes et récemment elle s'étend de plus en plus vers le nord (Bachi F et al, 2019). La LC du nord se trouve sous forme de cas sporadiques le long du littoral algérien. Elle est due dans la majorité des cas à *L. infantum* zymodème MON-24 (Benikhlef R et al, 2004).

Concernant la LCan en Algérie, en comparant les résultats obtenus lors des enquêtes antérieures dans la même région, on note une recrudescence alarmante de l'enzootie canine. Les fluctuations annuelles de la leishmaniose canine varient d'une saison à l'autre avec cependant, une augmentation croissante du nombre de cas de la maladie au cours des dernières années (Harrat Z et al, 2003).

Tableau 4. Prévalences de la leishmaniose canine en Algérie.

Région d'étude	Prévalence (%)	Année d'étude	Référence
Alger	37	1990-1997	Harrat Z et al, 2003
Alger	CN errant (11.7) CN de la GN (9.7)	2004-2005	Adel A et al, 2010

CN de ferme (5.9)			
Alger	25.1	2005-2008	Ait oudhia K et al, 2009
Tlemcen, Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, Bejaia, Jijel	11 à 38	2008-2009	Adel A et al, 2015
Tizi-Ouzou	10 à 67	2007-2010	Mouloua K, 2014
Alger (Fourrière canine)	40	2010	Djoudi M et al, 2010
Bouira, Tizi-Ouzou, Sétif	35.7	2018	Medkour H et al, 2020

CN : Chien, GN : Gendarmerie Nationale

3. Incidence des leishmanioses en Algérie

Les leishmanioses constituent un véritable problème de santé publique en Algérie avec près de 40 000 cas par an ([Harrat Z, 2006](#)).

Pour la LV, selon les données de l'INSP de 2000 à 2010, le nombre de cas recensés au niveau national a connu de grandes fluctuations, il est passé de 220 en 2000 à 127 cas en 2001 et de 80 en 2008 à 129 cas en 2010. Il en est de même pour l'incidence annuelle qui pour 105 habitants a enregistré aussi des variations. Elle est passée de 0,42 en 2001 à 0,28 en 2006 pour augmenter à 0,31 en 2007 et à 0,33 en 2010.

Pour la LC, l'Algérie a connu une recrudescence alarmante de la LC à la fin des années 1990. De 2000 à 2004, 45 363 cas ont été notifiés par l'INSP ([Zait H et Hamrioui B, 2009](#)).

L'incidence de la LCan en Algérie n'est pas connue et la population canine reste non estimée.

4. Facteurs de risque

4.1. Pour l'animal (chien)

4.1.1. Facteurs intrinsèques

a. Age : De nombreuses études ont révélé que les chiens adultes sont plus particulièrement touchés par la maladie. En 2009, une étude a montré que les chiens âgés de plus de 2 ans ont maintenu un risque plus élevé de séropositivité (OR = 5,39, IC 95% de 2,63 à 11,05) alors que ceux de moins de deux ans étaient moins souvent infectés, cependant le groupe d'âge le plus infecté était de 5 à 8 ans (Cortes Yolanda Vaz S et al, 2012). Galvez et al. en 2010, ont observé que la séroprévalence suit une répartition bimodale par rapport à l'âge, avec un pic apparaissant chez les jeunes chiens (1-2 ans) et le deuxième plus évident chez les chiens les plus âgés (7-8 ans) (Galvez R et al, 2010). Les animaux plus âgés présentaient un risque de séropositivité deux fois plus élevé que les jeunes chiens (Cardoso L et al, 2004).

b. Sexe : Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative dans la prévalence entre les mâles et les femelles (Cortes Yolanda Vaz S et al, 2012).

c. Race : En théorie, toutes les races de chiens sont sensibles à l'infection par *Leishmania* bien que certaines races, dans des zones d'endémie, comme les « Ibiza Hound » et les « chiens de races croisées » ont développé un certain niveau de résistance (Solano-Gallego L et al, 2000). Denerolle a montré une incidence chez le Boxer plus importante par rapport à la population de référence (Denerolle P, 2003). Par contre, Cortes et al. ont montré des différences significatives dans le risque d'infection entre les classes de race : le fait d'être de race croisée pourrait être un facteur de protection (Cortes Yolanda Vaz et al, 2012).

d. Pelage : Une augmentation du risque chez les animaux dont la fourrure est de type « court » ou « moyen » a été constatée (Cortes Yolanda Vaz et al, 2012), dans

la mesure où les phlébotomes préfèrent se nourrir sur des zones peu envahies par les poils (Killick-Kendrick R, 1999).

4.1.2. Facteurs extrinsèques

a. Mode de vie : Le risque augmente avec l'augmentation du niveau d'exposition à l'environnement extérieur. Vivre principalement ou exclusivement à l'extérieur est associée à un risque accru de contracter la leishmaniose ($P < 0,001$), OR = 2,53 (IC 95% 1,80 à 3,55), comparativement à vivre à l'intérieur (Cortes Yolanda Vaz et al, 2012). C'est le cas des chiens errants, d'une part, du fait de leur errance qui augmenterait le temps d'exposition aux piqûres de phlébotomes infectés et d'autre part, à leurs conditions physiques précaires qui font d'eux des cibles faciles à l'infection et aux piqûres de phlébotomes (Adel A et al, 2010).

b. Utilisation d'insecticides : les chiens non protégés par des insecticides efficaces ont présenté une prévalence plus élevée (7,08%) que ceux utilisant d'autres insecticides (5,05%). Néanmoins, ce dernier facteur reste moins important (Cortes Yolanda Vaz et al, 2012).

c. Abondance des vecteurs : Les phlébotomes sont particulièrement actifs dans des zones protégées du vent, au crépuscule, près du sol.

d. Saison : les phlébotomes adultes sont actifs l'été en période nocturne

e. Environnement : pendant la journée, les phlébotomes se réfugient dans les interstices des vieux murs, du sol et dans les terriers. La larve a besoin d'humus, de déchets organiques et d'eau. Le sol humide des caves, les tas d'ordures constituent les gîtes larvaires les plus fréquents (Catheland S, 2005).

4.2. Pour l'homme

Selon l’OMS, Il existe plusieurs facteurs susceptibles d’augmenter le risque de développer la maladie (OMS, 2022), on note :

a. Conditions socioéconomiques : La pauvreté accroît le risque de leishmaniose. L’insalubrité des logements et l’insuffisance de l’assainissement domestique (par exemple, absence de système de gestion des déchets, égouts à ciel ouvert) peuvent favoriser le développement des sites de reproduction et de repos des phlébotomes et augmenter les contacts de ces derniers avec l’homme. Les phlébotomes sont attirés par les repas de sang potentiels que leur offrent les logements surpeuplés. Certains comportements humains, notamment le fait de dormir dehors ou à même le sol, sont également susceptibles d’accroître le risque.

b. Malnutrition : Les carences alimentaires en protéines, en fer, en vitamine A et en zinc augmentent le risque de progression de l’infection jusqu’à une forme complète de la maladie.

c. Mobilité de la population : Les épidémies des formes aussi bien cutanées que viscérales de la leishmaniose sont souvent associées à des mouvements migratoires et à l’arrivée de personnes non immunisées dans des zones où il existe déjà des cycles de transmission. L’exposition professionnelle, ainsi que la déforestation généralisée, demeurent des facteurs importants.

d. Changements environnementaux : Les changements environnementaux, tels que l’urbanisation et l’incursion de l’homme dans les zones forestières, peuvent avoir un impact sur l’incidence de la leishmaniose.

e. Changement climatique : Les conditions climatiques ont une incidence sur la leishmaniose car elles influent de plusieurs manières son épidémiologie.

5. Changement climatique et évolution de la leishmaniose

Selon l’OMS, la leishmaniose est une maladie influencée par le climat; elle occupe un «espace climatique» caractéristique qui dépend fortement des changements des facteurs climatiques comme le degré de précipitation, la température et le taux d’humidité. La conjugaison du réchauffement mondial et de la dégradation des terres va vraisemblablement modifier l’épidémiologie de la leishmaniose par un certain nombre de mécanismes (OMS, 2022):

- L’évolution des températures, de la pluviométrie et de l’humidité peut avoir des effets importants sur les vecteurs et sur les réservoirs en modifiant la distribution, la survie et la taille des populations.
- Les fluctuations, même faibles, de la température peuvent avoir une profonde incidence sur le cycle de développement des promastigotes de *Leishmania* dans les phlébotomes, et permettre ainsi au parasite de se transmettre là où la maladie n’était pas endémique auparavant.
- Les sécheresses, famines et inondations peuvent entraîner des migrations et des déplacements massifs de population vers des zones de transmission de la leishmaniose et la malnutrition peut compromettre l’immunité de ces populations.

Selon les prévisions, un changement climatique à long terme devrait étendre la zone où sévissent actuellement les leishmanioses et leurs phlébotomes vecteurs à des régions qui sont actuellement exemptes des unes et des autres (OMS, 2010). Des nuits plus chaudes et des températures plus élevées ont pour conséquence, dans les zones que les vecteurs occupent déjà, plus de risques de transmission pendant des périodes plus longues (Epstein P, 2000).

V. IMMUNOLOGIE ET SIGNES CLINIQUES DE LA LEISHMANIOSE CANINE

Le nombre et l'intensité des signes cliniques sont déterminés par un ensemble de facteurs impliquant la souche du parasite, la génétique et l'état immunitaire de l'hôte. Ainsi, certains chiens sont capables de contrôler l'infection pendant de nombreuses années sans l'apparition de signes cliniques et peuvent même parfois évoluer vers une guérison spontanée. D'autre part, certains chiens infectés peuvent présenter un frome aigue et une maladie grave, évoluant dans 95% de cas vers la mort en absence du traitement.

Le diagnostic clinique de la LCan est complexe, car près de 50% de la population canine infectée est asymptomatique (Mancianti F et al, 1988). De plus, lorsque les chiens sont malades, ils présentent un spectre clinique variable et non spécifique (Ribeiro RR et al, 2013), car la LCan est une maladie chronique et multisystémique qui peut potentiellement toucher n'importe quel organe (Cardoso L et al, 2011). Les manifestations cliniques des chiens infectés naturellement par *L. infantum* sont présentées dans la Fig 10. Les signes cliniques peuvent apparaitre de trois mois à plusieurs années après l'infection (Koutinas AF et Koutinas CK, 2014). Dans la forme classique cutané-viscérale, l'un des signes cliniques les plus précoces et les plus courants est la lymphadénopathie, affectant principalement les ganglions poplités (Fig 10.c), préscapulaire et sous-maxillaire (Lima WG et al, 2004).

Les anomalies dermatologiques apparaissent plus tard et sont fréquentes et variables dans leurs caractéristiques et leur extension (Foglia Manzillo V et al, 2013). Environ 90% des chiens présentent des lésions cutanées; cependant, les altérations dermatologiques sont rares en l'absence d'autres signes de la LCan (Ferrer L et al,

1988). Les schémas dermatologiques classiques sont les suivants : une dermatite exfoliative non prurigineuse avec ou sans alopecie et qui peut être localisée ou disséminée (Fig 10.b et 10.d); une dermatite érosive-ulcéreuse (Fig 10.e); une dermatite nodulaire, papulaire, ou pustuleuse; hyperkératose nasale (Fig 10.d); dépigmentation nasale et onychogryphose (Fig 10.f) (Roura X et al, 2013; Koutinas AF et Koutinas CK, 2014; Ordeix L et al, 2017). D'autres signes impliquent l'anorexie, l'entérite chronique et la perte de poids, splénomégalie et hépatomégalie, ophtalmopathie et hypotrophie musculaire (Cardoso L et al, 2011; Roura X et al, 2013; Koutinas AF et Koutinas CK, 2014; Pietro SD et al, 2016). Des signes atypiques comme l'arthrite et les troubles neurologiques peuvent survenir (Sabrana S et al, 2014; Proverbio D et al, 2016).



Fig 10. Manifestations cliniques de chiens naturellement infectés par *L. infantum* : **(a)** chien asymptomatique (apparemment sain mais infecté); **(b)** alopecie généralisée

non prurigineuse et multiples autres anomalies dermatologiques; (c) lymphadénomégalie poplitée; (d) blépharite bilatérale et atteinte étendue du museau avec des lésions ulcératives exfoliatives marquées; (e) lésions ulcératives au niveau des proéminences osseuses du membre postérieur; (f) onychogryphose (Ribeiro RR et al, 2018).

La maladie rénale peut être la seule manifestation clinique de la LCan et elle peut évoluer d'une protéinurie légère à un syndrome néphrotique ou à une maladie rénale terminale (Cardoso L et al, 2011). L'insuffisance rénale chronique est une conséquence grave de la progression de la maladie et constitue la cause la plus fréquente de décès (Cardoso L et al, 2011, Roura X et al, 2013).

Il existe deux systèmes connus de stades cliniques pour la LCan, avec un bon niveau de concordance entre eux (Proverbio D et al, 2016), et qui contribuent à l'établissement d'un diagnostic, d'un pronostic et d'un traitement plus précis (Solano-Gallego L et al, 2009) en regroupant les chiens affectés en fonction de la gravité de leur manifestation clinique. **Dans le système LeishVet**, la maladie est classée en quatre stades d'évolution [stade I : maladie légère; stade II : maladie modérée (sous-stades A et B); stade III : maladie sévère; stade IV : maladie très sévère] sur la base de l'examen physique associée aux niveaux d'anticorps déterminés par immunofluorescence indirecte et aux résultats biochimiques et hématologiques [y compris l'évaluation détaillée de la fonction rénale conformément à l'International Renal Interest Society (IRIS)] (Cardoso L et al, 2011). **Le système Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG)** classe les chiens en cinq stades [Stade A : chiens exposés; Stade B : chiens infectés; Stade C : chiens malades (chiens présentant une leishmaniose cliniquement évidente); Stade D : chiens gravement malades; Stade E : ne répondant pas au traitement ou rechute précoce] en fonction de l'état clinique et en association avec le diagnostic sérologique et parasitologique

(cytologie, histologie ou PCR) et les anomalies clinicopathologiques ([Paltrinieri S et al, 2010](#); [Roura X et al, 2013](#)).

Il n'y a pas encore de consensus sur la place exacte de chaque forme clinique dans le cycle de transmission du parasite. Certaines données suggèrent que la majorité des cas de transmission aux vecteurs résultent d'une petite proportion de chiens infectieux avec des charges parasitaires cutanées très élevées, qui seraient corrélées à une maladie grave ([Courtenay O et al, 2002](#); [Courtenay O et al, 2014](#)). D'autre part, les chiens asymptomatiques peuvent également être très infectieux, ce qui indique leur rôle dans le maintien et la propagation du parasite dans les zones endémiques ([Laurenti MD et al, 2013](#)). Malgré ces résultats contradictoires et jusqu'à ce que des marqueurs spécifiques et sensibles de l'infectiosité, qu'ils soient directs ou indirects, soient disponibles, il est important, et plus prudent, de considérer que les chiens symptomatiques et asymptomatiques pourraient être infectieux pour les phlébotomes et qu'ils devraient donc être considérés de la même manière lors de la proposition de mesures de contrôle.

La réponse immunitaire commence par la présentation aux cellules immunocompétentes des antigènes leishmaniens. Les antigènes majeurs du parasite sont la gp63 et le LPG ou lipophosphoglycane de surface. La gp63, glycoprotéine majeure de surface des leishmanies, est un antigène essentiel impliqué dans le processus d'échappement au système de défense et dans sa capacité à le coloniser. En outre, la gp63 est l'un des antigènes susceptibles d'induire une réaction immunitaire favorable. Elle est l'un des antigènes majeurs présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) au système immunitaire compétent ([Bourdoiseau G, 2000](#)).

Au niveau de la peau, les leishmanies interagissent en premier lieu avec les cellules résidentes, c'est-à-dire les kératinocytes, les macrophages dermiques et les cellules dendritiques, ainsi qu'avec de nombreux facteurs solubles. En réponse à *Leishmania*, les kératinocytes ont notamment été associés à la production de médiateurs immuno-modulateurs comme l'IL-12, l'IL-1b, l'ostéopontine, l'IL-4 et l'IL-6, participant ainsi à l'initiation d'une immunité protectrice (Ehrchen JM et al, 2010).

L'activation des protéines du complément par la voie classique entraîne la fixation de C3 sur la membrane plasmique des parasites et son clivage en C3b, capable de se fixer au LPG ou à la protéine gp63 et de déclencher la formation du complexe lytique C5b-9 aboutissant à la lyse parasitaire (Pearson RD et Steigbigel RT, 1980). Les promastigotes qui échappent à l'action délétère du complément infectent leurs cellules cibles capables de phagocytose.

Après infection par *Leishmania*, Les cellules de Langerhans (LCs) et les cellules dendritiques dermiques (DCs) s'immobilisent en réponse aux Pathogen associated molecular patterns (PAMP) et phagocytent rapidement un grand nombre de leishmanies. Des travaux ont démontré que ces DCs et LCs migrent vers les ganglions lymphatiques et participent à la mise en place d'une immunité protectrice contre *L. major* (Ritter U et al, 2004; Brewig N et al, 2009). L'implication des LCs et DCs dans l'initiation d'une réponse immune spécifique contre les leishmanies viscérotropes n'est pas entièrement documentée.

Les macrophages dermiques (MCs) phagocytent également les promastigotes par un mécanisme dépendant au CR3 (Locksley RM et al, 1988). Néanmoins, les cibles principales de *Leishmania* ne sont pas les macrophages résidents, mais les macrophages migrants en provenance de la circulation sanguine. Les promastigotes

de *Leishmania* sont notamment capables d'induire la production de CXCL1 agissant comme un chimio-attractant pour les monocytes et neutrophiles (Racoosin EL et Beverley SM, 1997).

Les polynucléaires neutrophiles, l'un des premiers types cellulaires à migrer vers le site de l'infection sont aussi capables de phagocyter les leishmanies (Chang KP, 1981). Une fois ingérées, les leishmanies peuvent être détruites par des enzymes protéolytiques ainsi que par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les neutrophiles ayant phagocyté des leishmanies sécrètent de l'IL-8 dans le but d'attirer d'autres neutrophiles au site de l'infection (Laufs H et al, 2002). Les neutrophiles sont des cellules à demi-vie courte du fait d'un mécanisme apoptotique déclenché après 6 à 10 heures (Squier MK et al, 1995). Cependant, les *Leishmania* peuvent prolonger la vie des neutrophiles de 2 à 3 jours (Aga E et al, 2002). L'intérêt pour les parasites est de laisser le temps aux neutrophiles notamment pour recruter des monocytes/macrophages par la sécrétion de chimiokines (Scapini P et al, 2000).

Une fois les macrophages au contact avec les neutrophiles infectés, ceux-ci entrent en apoptose et sont alors phagocytés (Fadok VA et al, 1992). L'ingestion de cellules apoptotiques n'active pas la machinerie microbicide des macrophages (Meagher LC et al, 1992) et serait donc pour les *Leishmania* une manière idéale d'entrer silencieusement dans leurs cellules hôtes préférentielles (Laskay T et al, 2003; Gueirard P et al, 2008). Les neutrophiles infectés phagocytés par les DCs seraient également capables de réprimer les propriétés fonctionnelles de ces dernières (Ribeiro-Gomes FL et al, 2012).

En outre, les promastigotes de *L. donovani* sont capables d'induire la sécrétion, par les neutrophiles, d'un piège extracellulaire constitué de structures filamenteuses

capables de les piéger et les tuer (Guimaraes-Costa AB et al, 2009). Ce mécanisme permet de contenir l'infection au niveau du site de l'inoculation, mais pourrait également être un moyen d'immobiliser les promastigotes afin de faciliter leur phagocytose par les phagocytes mononucléés recrutés au niveau du site de l'infection (Gabriel C et al, 2010).

La femelle phlébotome inocule, lors de son repas sanguin, certains éléments salivaires capables d'influencer les défenses innées de l'hôte au niveau de la peau. Des extraits de glande salivaire de *Lu. longipalpis* ont été notamment démontrés comme inducteurs de la sécrétion de CCL2, attirant ainsi les monocytes au niveau du site de la piqûre (Teixeira CR et al, 2005). Le maxadilan produit par *Lu. longipalpis* présente quant à lui un effet vasodilatateur (Lerner EA et Shoemaker CB, 1992) et pourrait donc favoriser l'infiltration des neutrophiles et des monocytes, cellules cibles des *Leishmania*, assurant leur colonisation des viscères.

Ainsi, ces différents acteurs moléculaires et cellulaires permettent l'organisation d'une réponse locale, avec le recrutement en premier lieu des polynucléaires neutrophiles entre 1 et 24 heures après infection. L'infiltrat devient ensuite principalement mononucléaire avec un afflux majoritaire de monocytes, après 48 heures, qui s'organisent en nodules afin de circonscrire les parasites. Des granulomes bien organisés sont observés et corrèlent avec la disparition des parasites, comme observé après 45 jours chez le hamster syrien infecté par *L. donovani* (Laurenti MD et al, 1990). Cependant, cette réponse spécifique et efficace s'organise en un temps relativement long permettant la dissémination des *Leishmania* viscérotropes avant la clairance parasitaire cutanée. Chez les immunodéprimés, les *Leishmania* sont aussi disséminées via la circulation sanguine

dans des tissus moins typiques tels que la peau, l'estomac et les intestins, les poumons ou les cavités pleurale ou péritonéale (Rosenthal E et al, 2000).

Les mécanismes immunitaires responsables de la résistance ou de la sensibilité à l'infection ne sont pas encore bien connus. L'efficacité de la réponse immunitaire est un aspect fondamental de la pathogenèse de la maladie et de sa progression (Alvar J et al, 2004), jouant un rôle crucial dans les manifestations cliniques de la LCan.

Chez l'homme (Kaye PM et al, 2011), la souris (Liew FY et O'donnell CA, 1993) et le chien (Koutinas AF et Koutinas CK, 2014; Hosein S et al, 2017), l'immunité protectrice contre la leishmaniose est médiée par les cellules T et est associée à la production d'IFN- γ et de TNF- α , tandis que le rôle des cytokines Th2, telles que IL-4 et IL-10, et la réponse humorale exubérante sont liés à la maladie progressive (Barbiéri CL, 2006; Solano-Gallego L et al, 2009; Koutinas AF et Koutinas CK, 2014; Hosein S et al, 2017).

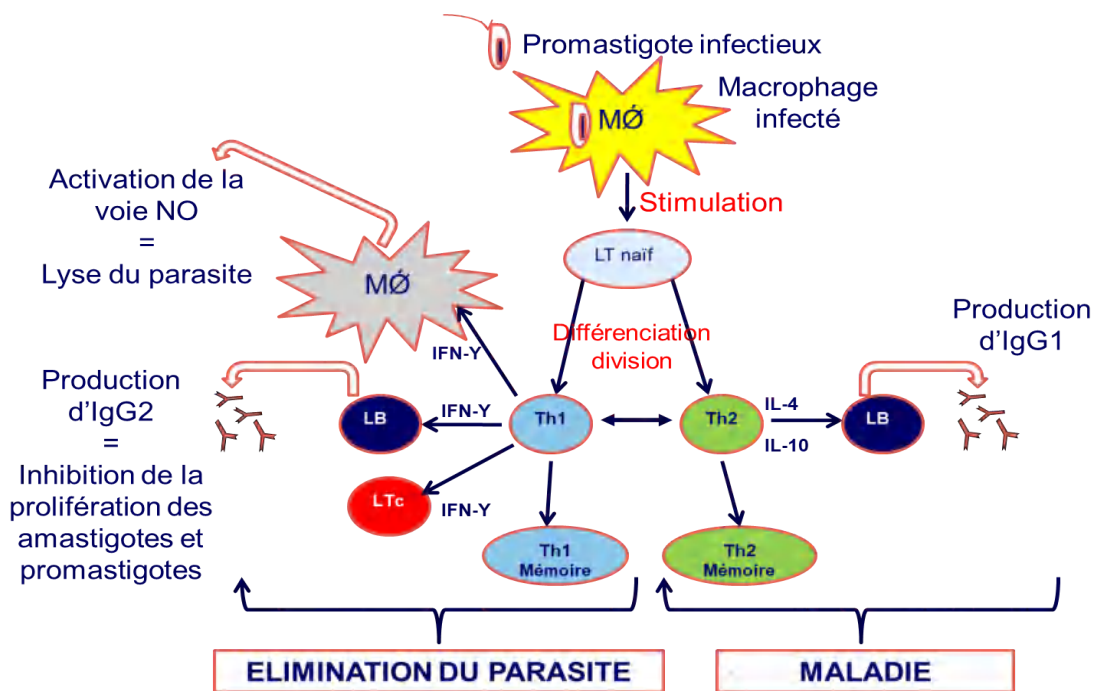


Fig 11. Mécanismes immunitaires simplifiés lors d'infestation par *Leishmania* (Modifié à partir de Freyburger L et al, 2012).

Il semble que la sensibilité à la LCan de certaines races, comme le Boxer, le Cocker Spaniel, le Rottweiler et le Berger allemand, puisse être associée à l'expression du gène *Slc11a1* (Solute Carrier family 11a member 1 ; ou *NRAMP1*) et/ou au polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Quinnell RJ et al, 2003; Sanchez-Robert E et al, 2005; Sanchez-Robert E et al, 2008; de Vasconcelos TC et al, 2019). À l'inverse, le chien de chasse d'Ibiza serait plus résistant à l'infection par *Leishmania* car il présente une réponse immunitaire essentiellement cellulaire (Solano-Gallego L et al, 2000; de Vasconcelos TCB et al, 2019). Le taux d'infection plus élevé chez les races de chiens de chasse est probablement dû à un temps de contact plus long avec l'insecte vecteur à l'extérieur. En résumé, il semble que les chances de contracter une infection par *Leishmania* soient plus faibles chez les chiens femelles de races mixtes, à poils longs, maintenus dans des conditions restreintes ou retenues (chiens élevés à l'intérieur) en absence d'un environnement vert à proximité de la maison (Belo VS et al, 2013).

VI. DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CANINE

Pour améliorer le pronostic et éviter à la fois la transmission à l'homme et au chien (à partir de cas faussement négatifs) et l'euthanasie inutile (à partir de cas faussement positifs), le diagnostic doit être établi le plus tôt possible, même sur la base de quelques signes cliniques, voire d'un seul (Gharbi M et al, 2015). Le diagnostic est établi en tenant compte de l'origine épidémiologique et de l'ensemble des signes cliniques présentés par le chien (Cardoso L et al, 2011). En raison du grand nombre de chiens asymptomatiques et de l'absence de signes cliniques pathognomoniques, le diagnostic nécessite l'appui du laboratoire. Toutes les techniques parasitologiques,

immunologiques et moléculaires disponibles pour le diagnostic sont importantes et doivent être interprétées en fonction de leurs avantages et de leurs limites.

Le diagnostic parasitologique est la seule méthode définitive, qui repose souvent sur l'observation d'amastigotes, préférentiellement dans les organes lymphoïdes tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate, ainsi que dans le foie et la peau. En routine clinique, un fragment obtenu par biopsie cutanée permet la préparation de lames pour les techniques cytologiques et histopathologiques/immunohistochimiques (Tafari WL et al, 2001). La biopsie par aspiration des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse ou de la rate peut être évaluée par des frottis colorés par les méthodes Giemsa ou Panoptic et, plus rarement, dans des milieux de culture (NNN, LIT et α -MEM, voir d'autres). La sensibilité du frottis de la moelle osseuse est d'environ 60-85%, elle est de 30-40% pour les ganglions lymphatiques (Sundar S, Rai M, 2000). Selon la littérature, les prélèvements spléniques sont considérés comme la méthode de choix pour le diagnostic parasitologique de la LCan (Barrouin-Melo SM et al, 2004).

Les techniques moléculaires ont une sensibilité et une spécificité élevées. La PCR et la qPCR font actuellement partie de la routine du diagnostic vétérinaire. Elles sont particulièrement utiles pour le suivi et peuvent être réalisées sur différents échantillons biologiques, tels que le sang périphérique, l'aspirat de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques, la peau et autres (Solano-Gallego L et al, 2007; Cardoso L et al, 2011; Silva RC et al, 2017). Il est important de souligner que les informations fournies par la PCR/qPCR ne doivent pas être séparées des données obtenues par les évaluations clinicopathologiques et sérologiques (Cardoso L et al, 2011).

La LCan est fréquemment diagnostiqué par la détection d'anticorps spécifiques contre *Leishmania* sp. en utilisant, de préférence, des techniques sérologiques quantitatives comme le test d'immunofluorescence des anticorps (IFAT) et le test immuno-enzymatique (ELISA). Cependant, les tests sérologiques présentent d'importantes limites, telles que les réactions croisées avec les parasites *Trypanosoma*, les espèces de leishmaniose cutanée et d'autres hémoparasites (de Castro Ferreira E et al, 2007; Porrozzi R et al, 2007), ainsi que des résultats faussement négatifs dans les cas d'anergie ou de faibles titres (réactions douteuses) (Lopes EG et al, 2017).

Récemment, les tests d'immunochromatographie ont été utilisés comme des tests de laboratoire de routine dans les cliniques vétérinaires pour la détection de dizaines de maladies, dont la LCan. Ces tests sont rapides (environ 15 minutes) et faciles à réaliser, ne nécessitent pas de personnel qualifié ni de formation spécialisée en laboratoire pour interpréter les résultats, et présentent des index fiables de sensibilité et de spécificité. Pour la LCan, des protéines recombinantes du parasite, comme le rK39, sont généralement imprégnées sur des membranes de nitrocellulose, et les échantillons de sérum sont appliqués dans la plaque du test rapide. Au Brésil, pays très endémique, le ministère de la santé a officiellement obligé un test d'immunochromatographie rapide pour le dépistage de la LCan, basé sur le Dual Path Platform (DPP®), suivi par l'ELISA comme test de confirmation (Fraga DB et al, 2016). Du point de vue de la santé publique, les résultats positifs des tests sérologiques sont utilisés comme critère pour indiquer l'euthanasie des chiens suspects, conformément au programme d'élimination pour le contrôle de la LV adopté au Brésil.

VII. TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE CANINE

Comme les guérisons parasitologiques sont rarement obtenues et que des récurrences cliniques de la LCan surviennent souvent après le traitement, on considère que les protocoles disponibles peuvent favoriser la guérison clinique, augmenter l'espérance de vie et améliorer la qualité de vie, réduire la charge parasitaire et l'infectiosité pour les vecteurs. Ainsi, la décision de traiter un chien malade est le résultat d'une discussion entre le propriétaire du chien et le vétérinaire. Un facteur important à analyser est la capacité et/ou la volonté du propriétaire à se conformer au protocole thérapeutique (Gharbi M et al, 2015), en plus de l'évaluation de la réponse potentielle du chien au traitement par un profil sérologique, hématologique et biochimique complet et une analyse d'urine afin de vérifier, principalement, l'état de la moelle osseuse, rénal et hépatique. D'après la littérature, la réponse clinique au traitement peut varier de mauvaise à bonne en fonction de l'état clinicopathologique initial global du chien et de sa réponse spécifique au traitement. Par exemple, on s'attend à ce que les chiens souffrant d'une insuffisance rénale aient un taux de guérison plus faible que ceux qui n'ont pas de problèmes rénaux ou qui ne présentent qu'une légère protéinurie (Cardoso L et al, 2011). Pour des raisons de santé publique et pour prévenir la réinfection, il est nécessaire d'utiliser constamment des colliers imprégnés de perméthrine et/ou de fluméthrine ou de deltaméthrine chez les chiens traités et d'assurer un suivi vétérinaire continu.

Les protocoles de traitements actuels sont résumés dans le [tableau 5](#). Certains composés chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement de la LCan sont inclus dans la 19ème édition de la liste modèle des médicaments essentiels de l'OMS contre la leishmaniose: les antimoniés pentavalents, la miltefosine, l'amphotéricine B

désoxycholate ou formulée en liposomes et la paromomycine (Gharbi M et al, 2015). En plus des médicaments mentionnés, il existe d'autres produits proposés pour moduler la réponse immunitaire en immunostimulant l'organisme animal comme la dompéridone, les cytokines et les vaccins (immunothérapie). Cependant, en médecine vétérinaire, l'allopurinol (un analogue de la purine) est considéré comme le médicament de première ligne pour le traitement à long terme de la LCan, souvent en association avec les antimoniés pentavalents ou avec la miltefosine durant le premier mois du traitement puis poursuivi seul (Cardoso L et al, 2011; Manna L et al, 2015). Bien qu'il soit rarement utilisé pour le traitement de la leishmaniose humaine, l'allopurinol étant le seul médicament recommandé par l'OMS pour le traitement de la LCan, le premier rapport de résistance à l'allopurinol a récemment été publié chez *L. infantum* isolés de chiens. Cette résistance était associée à une rechute clinique (Yasur-Landau D et al, 2016).

Tableau 5. Protocoles thérapeutiques actuels et mesures prophylactiques utilisées pour la prévention et le contrôle de la LCan.

Vaccins commercialisés		
Nom commercial/labo	Antigènes/adjuvants	Efficacité dans les essais de terrain [références]
CaniLeish®/Virbac	Protéines excrétées- secrétées de <i>L. infantum</i> (LiESP)/QA21	68.4% [Oliva G et al, 2014]
Leish-Tech®/Hertape Calier	Protéine recombinante A2 de <i>L. donovani</i> /Saponine	71.4% [Regina-Silva S et al, 2016]
Leishmune®/Zoetis (Actuellement suspendu)	Ligand Fucose-Mannose (FML) de <i>L. donovani</i> /QS21	76–80% [Palatnik-de-Sousa CB et al, 2012]
LetiFend®/Leti + MSD-Santé Animale	Protéine recombinante Q de <i>L. infantum</i> /Aucun	[Party DA, 2006]
Insecticides à application topique commercialisés		
Nom commercial/labo	Composé pharmaceutique/application /durée	Efficacité dans les essais de terrain [références]
Scalibor®/MSD-Santé Animale	4% deltaméthrine/ collier PVC imprégné /4–6 mois	50–86%; 61.8% [Maroli M et al, 2001; Brianti E et al, 2016]

Seresto®/Bayer Santé Animale	10% imidaclopride + 4.5% fluméthrine/ collier PVC imprégné/8 mois	88.3% [Brianti E et al, 2016]
Advantix®/Bayer Santé Animale	10% imidaclopride + 50% perméthrine/spot-on/3 semaines	88.9–90.4% [Otranto D et al, 2007]
Exspot®/MSD- Santé Animale	65% perméthrine/spot-on/2-3 semaines	84% [Ferroglio E et al, 2008]
Frontect® ou Frontline Tri-Act®/Merial	6.76% fipronil + 50.48% perméthrine/spot-on/3 semaines	100% [Papadopoulos E et al, 2017]
Effitix® ou Fiprotix® ou Fipratix®/Virbac	6.1% fipronil + 54.5% perméthrine/spot-on/4 semaines	In [Ribeiro RR et al, 2018]
Perfikan®/Clément Thékan	6.1% fipronil + 54.5% perméthrine/spot-on/4 semaines	In [Ribeiro RR et al, 2018]
Caniguard Line On®/Beaphar	40% perméthrine/spot-on/5 semaines	In [Ribeiro RR et al, 2018]
Vectra 3D® et (Milbactor®)/Ceva Santé Animale	4.95% dinotefurane + 36.08% perméthrine + 0.44% pyriproxifène/spot-on/4 semaines Et 0.5 mg/kg milbemycline oxime+ 5 mg/kg praziquantel BID/P.O./1 mois	100% [Laidoudi Y et al, 2021]

Médicaments et combinaisons utilisés [Cardoso L et al, 2011; Reguera RM et al, 2016]

Molécules actives	Protocoles thérapeutiques	Effets secondaires potentiels
Allopurinol	10 mg/kg BID P.O. pendant au moins 6–12 mois ou bien à vie	Xanthine urolithiases
Amphotéricine B déoxycholate	0.5 mg/kg I.V. 2 fois par semaine pendant 2 mois	Néphrotoxicité
Antimoniote de méglumine	75–100 mg/kg SID S.C. ou 40–75 mg/kg S.C. pour 4 semaines	Néphrotoxicité
Miltéfosine	2 mg/kg SID P.O. pendant 28 jours	Problèmes digestifs
Allopurinol + Antimoniote de méglumine	10 mg/kg BID P.O. pendant 12 mois; 100 mg/kg SID S.C. pendant 4 semaines	Urolithiases et néphrotoxicité
Allopurinol + miltéfosine	10 mg/kg BID P.O. pendant 12 mois; 2 mg/kg SID P.O. pendant 28 days	Urolithiases et problèmes digestifs

SID : Une fois par jour; **BID** : Deux fois par jour; **P.O** : Per Os; **S.C** : Sous cutanée; **I.V** : Intraveineuse.

Le traitement de le LCan par la miltefosine (Milteforan®) a été autorisé au Brésil en 2017, une décennie après son introduction dans le sud de l'Europe. Cependant, après un suivi de six ans, les résultats cliniques et de laboratoire ont montré que l'antimoniote de méglumine plus l'allopurinol avait une meilleure efficacité clinique

que la miltefosine plus l'allopurinol dans le traitement de la LCan (Manna L et al, 2015).

Le traitement le plus fréquemment choisi pour la LCan est l'antimoniote de méglumine (antimonié pentavalent) administré par voie sous-cutanée à la dose de 100 mg/kg une fois par jour pendant 1 mois, associé à l'allopurinol (médicament leishmaniostatique) administré par voie orale à raison de 10 mg/kg toutes les 12 heures pendant six mois minimum (Cardoso L et al, 2011; Manna L et al, 2015; Solano-Gallego L et al, 2016) (tableau 5). La durée du traitement dépend de la gravité de la maladie, de la tolérance individuelle aux médicaments et de la réponse clinique au traitement. Il existe également plusieurs effets secondaires, tels que la xanthinurie, la minéralisation rénale et l'urolithiase en cas de traitement à long terme par l'allopurinol. L'antimoniote de méglumine peut être potentiellement néphrotoxique et la miltefosine peut provoquer des troubles gastro-intestinaux (Solano-Gallego L et al, 2007; Cardoso L et al, 2011; Torres M et al, 2016).

Certains traitements à base d'immunomodulateurs, comme la dompéridone, peuvent renforcer les mécanismes immunitaires innés, en activant les cellules phagocytaires et en potentialisant l'élimination intracellulaire des parasites, ce qui peut éviter la LCan et réduire le risque de développer la maladie clinique (Sabaté D et al, 2014). Récemment, une étude sans précédent a enregistré la guérison parasitologique de chiens atteints de la LCan traités par une thérapie innovante combinant l'antimoniote de méglumine liposomale encapsulée et l'allopurinol (da Silva SM et al, 2012). Il est donc d'une importance capitale de chercher d'autres alternatives thérapeutiques plus simples en pratique, sûres et efficaces, un de nos objectifs dans cette thèse.

Les connaissances sur les relations hôte-parasite chez le chien augmentent et signalent l'existence de facteurs inhérents à l'hôte, tels que les différences immunologiques en réponse à l'infection, qui influenceraient l'efficacité du traitement. Dans cette optique, des groupes de recherche tentent à soigner les chiens avec de nouvelles préparations par des molécules existantes ou en les associant à des immunostimulants et/ou à l'immunothérapie. Les résultats observés laissent espérer une amélioration du traitement à l'avenir.

VIII. PREVENTION ET CONTROL DE LA LEISHMANIOSE CANINE

Étant donné que la piqûre de phlébotome est la principale voie de transmission de la LCan, les mesures de contrôle de l'infection doivent être principalement axées sur la prévention du contact avec l'insecte vecteur, soit par des barrières physiques (filets à mailles fines dans les fenêtres et les chenils), soit par des barrières chimiques (répulsifs), soit par la gestion (éviter l'exposition au crépuscule, éliminer les matières organiques péri-domiciliaires). En prévoyant une grande possibilité d'échec de ces mesures, le chien doit encore être capable de répondre aux piqûres infectieuses des phlébotomes, de préférence par une réponse immunitaire adaptative préalablement développée par la vaccination, ou en dernière alternative, par les molécules chimiothérapeutiques, qui peuvent stimuler le système immunitaire pour aider à combattre l'infection.

Les mesures prophylactiques utilisées actuellement pour la prévention et le contrôle de la LCan sont résumées dans le [tableau 5](#). Les produits répulsifs disponibles pour prévenir la LCan contiennent des pyréthroides synthétiques (deltaméthrine, perméthrine ou fluméthrine) seuls ou en combinaison avec d'autres insecticides, ce

qui présente un effet synergique sur les insectes. La protection contre les phlébotomes après utilisation de l'insecticide peut aller de 2 à 4 semaines pour les préparations en *spot-on*, et de 4 à 8 mois pour les colliers imprégnés en PVC (Scalibor® et Seresto®). Ces derniers doivent être utilisés aussi bien chez les chiens non infectés que chez les chiens infectés (Otranto D et al, 2010; Davoust B et al, 2013; Brianti E et al, 2014; Wylie CE et al, 2014).

La vaccination contre la LCan est un outil récent pour les propriétaires d'animaux de compagnie et malheureusement les trois vaccins commerciaux disponibles ont une faible efficacité d'environ 68-72% (Canileish® 68,4% ; Leish-Tec® 71%, Letifend® 72%) (Quinnell RJ et al, 2003; Palatnik-de-Sousa CB et al, 2012; Oliva G et al, 2014; Ribeiro RR et al, 2018).

Il n'existe aucune preuve scientifique montrant que l'abattage des chiens infectés et/ou malades pourrait réduire l'incidence de la LV (Costa CH et Vieira JB, 2001; Romero GA et al, 2010), et partout où cette mesure a été appliquée (par exemple, au Brésil, les pays de Balkans, d'Asie centrale et même en l'Algérie), les programmes nationaux de lutte contre la LV ont échoué. Par conséquent, la vaccination contre *Leishmania* associée à des insecticides topiques est sans doute la stratégie la plus efficace de prévention et de contrôle de la LCan.

Enfin, étant donné les marges de tolérance et de sécurité suffisantes des insecticides et des vaccins disponibles, des recommandations spécifiques peuvent être données pour optimiser le résultat de l'effet répulsif désiré selon les besoins locaux lors de l'évaluation de la meilleure méthode de contrôle de la LCan. Pour répondre aux besoins actuels en matière de prévention de la propagation de la LCan, les recherches futures sur le contrôle et le traitement devraient inclure : **(i)** la découverte

et l'évaluation des molécules chimiothérapeutiques et de nouveaux insecticides topiques dont la capacité, respectivement, à traiter et à réduire la transmission de la LCan a été démontrée; **(ii)** le développement de meilleurs vaccins avec un bon profil de sécurité pour mieux protéger les chiens sur de plus longues périodes; **(iii)** des études sur le taux d'infection des vecteurs par xénodiagnostic afin de comparer l'efficacité de tous les composés actifs des insecticides et des traitements utilisés pour traiter les chiens ainsi que pour les vaccins.

La concrétisation de ces résultats futurs relatifs à l'impact des mesures de contrôle sur la transmission de la LCan aidera à déterminer les meilleures stratégies pour réduire la transmission entre les chiens et les humains. Aucune mesure de contrôle ne doit être considérée comme une action isolée, mais doit au contraire faire partie d'un programme complet de prévention de la leishmaniose chez les chiens vivant ou voyageant dans une zone endémique, qu'ils soient en bonne santé, infectés mais cliniquement sains ou infectés et malades.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION

Comme précédemment définis, la leishmaniose viscérale (LV) est une maladie infectieuse, à transmission vectorielle, chronique et systémique. Il s'agit d'une zoonose majeure nécessitant un contrôle clinique et épidémiologique urgent dans le monde. Le chien domestique est le principal réservoir animal, tandis que d'autres animaux sauvages, tels que les renards, jouent un rôle dans la transmission sylvatique. *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) est l'agent causal de la LV humaine et de la leishmaniose canine (LCan) (Caixeta I et al, 2018). Au cours des dernières décennies, des changements épidémiologiques de la LV, y compris l'augmentation de l'incidence et du taux de mortalité, ainsi que sa propagation à de nouvelles zones, même des zones urbaines, ont été observés (Courtenay O et al, 2002; Desjeux P, 2004; Dantas-Torres F et al, 2009; Romero GAS et al, 2010; Salomón OD et al, 2015; Medkour H et al, 2019). Comme le chien représente le principal réservoir de l'infection humaine, il existe un chevauchement important entre les zones de forte prévalence de la LCan et la mortalité humaine attribuée à cette parasitose (Alvar J et al, 2012; Ready PD, 2014). Parmi les raisons qui ont conduit à sa propagation : l'absence de vaccins et des traitements efficaces, les échecs dans le contrôle des vecteurs et la sélection croissante de parasites résistants aux médicaments (Freitas-junior LH et al, 2012).

La LCan est une maladie grave qui touche plusieurs millions de chiens domestiques dans des pays des deux côtés de l'océan Atlantique (principalement dans la région méditerranéenne, en Amérique du Sud, en Europe mais aussi en Afrique et en Asie), elle est fatale aux chiens infectés en absence du traitement (Baneth G et al, 2006; Ribeiro RR et al, 2018). Dans les pays méditerranéens où les taux d'infection

atteignent 63% et au moins 2,5 millions de chiens séropositifs (Moreno J, Alvar J, 2002; Leontides LS et al, 2002 ; Miró G et López-Vélez R, 2018), la LCan représente l'une des principales causes de décès chez le chien (Nogueira S et al, 2019; Dujardin JC et al, 2008). Il s'agit d'une maladie en pleine expansion qui est devenue l'une des plus importantes maladies canines importées en Europe centrale (Pineda C et al, 2017). L'Afrique du Nord est fortement endémique et des prévalences importantes de LCan ont été rapportées en Algérie (Adel A et al, 2015; Medkour et al, 2020), en Tunisie (Zoghlami Z et al, 2014; Gharbi M et al, 2018) et au Maroc (Boussaa S et al, 2014). De plus, *L. infantum* a été bien décrit chez des animaux sauvages en Algérie, comme le chacal (Bessad A et al, 2012).

Les manifestations cliniques chez les chiens infectés par *L. infantum* sont très larges et variables. Par conséquent, plusieurs formes de la LCan peuvent être caractérisées par leurs nombreux signes cliniques, y compris les formes cutanées, muco-cutanées et viscérales (Cardoso L et al, 2011). En outre, l'infection par *L. infantum* chez le chien peut se manifester sous une forme subclinique, une maladie autolimitée ou une maladie grave mettant en jeu le pronostic vital (Solano-Gallego L et al, 2016).

En Algérie, le plus grand pays d'Afrique, on distingue trois étages bioclimatiques: (i) le climat méditerranéen doux de la côte; (ii) climats de transition, notamment le climat semi-aride du nord du pays, qui est légèrement plus continental et modérément pluvieux, et (iii) le climat désertique de la vaste zone occupée par le Sahara, dans le sud algérien. Le climat du nord est propice au développement des arthropodes tels que les tiques, les puces, les poux, les moustiques et les phlébotomes et, par conséquent, aux maladies qui peuvent en transmettre; notamment les maladies vectorielles canines (Gage et al, 2008; Thiébault et Moatti, 2016). Cependant, les données disponibles concernant les protozooses canines à transmission vectorielle

sont limitées. Bien que la LCan soit connue pour être endémique dans le nord de l'Algérie (Adel et al, 2015) et d'autres pays d'Afrique du Nord (Rami et al, 2003; Diouani et al, 2014), à ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur les infections à *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp. ou *Hepatozoon* spp. chez les chiens en Algérie. Par conséquent, le premier objectif de cette thèse est **d'évaluer la prévalence et la diversité des hémoparasites *Kinetoplastida* et *Apicomplexa* chez les chiens de la Kabylie (Nord Algérien) en utilisant des techniques moléculaires et sérologiques.**

D'un autre côté, le traitement de la LCan constitue, jusqu'au-là, un défi en raison de la localisation intracellulaire du parasite (Oliva G et al, 2009). De plus, l'OMS a suggéré de réserver les médicaments antileishmaniens utilisés pour la LV humaine à l'usage exclusif pour la médecine humaine et non à la médecine vétérinaire en raison de la suspicion d'une résistance aux médicaments lors de leur utilisation chez les animaux (Adel A et al, 2015). Par conséquent, le traitement de première intention pour la LCan est actuellement l'utilisation combinée d'agents leishmanicides utilisés comme médicaments de seconde intention chez l'homme (comme les antimonies pentavalents, la miltefosine) et de l'allopurinol (Cardoso L et al, 2009; OMS, 2010; Cardoso L et al, 2011; Miró G et al, 2017; Travi BL et al, 2018). Certains composés chimiothérapeutiques utilisés pour la LCan sont inclus dans la 19e édition de la liste modèle des médicaments essentiels de l'OMS (avril 2015) contre la leishmaniose comme : les antimonies pentavalents, la miltefosine, l'amphotéricine B désoxycolate ou les formulations liposomales et la paromomycine. D'autres médicaments semblent également plus au moins être efficaces comme : l'allopurinol, la pentamidine, l'enrofloxacin, la marbofloxacin, le métronidazole, la spiramycine et le kétoconazole (Noli C et al, 2005). La détermination du meilleur médicament est

basée sur l'examen clinique et le stade de la LCan, selon les résultats des tests immunodiagnostiques, les signes cliniques, les anomalies clinicopathologiques et la charge parasitaire (Cardoso L et al, 2009; Cardoso L et al, 2011). La plupart de ces traitements sont coûteux et ne permettent pas une guérison complète de la maladie, et certains d'entre eux peuvent provoquer des effets secondaires importants (Mateo M et al, 2009; Miró G et al, 2017). Les vomissements, la léthargie, la diarrhée et la néphrotoxicité sont fréquents lors des traitements par les antimonies pentavalents et la miltefosine (Bianciardi P et al, 2009; Oliva G et al, 2009; Manna L et al, 2009; Mateo M et al, 2009; Woerly V et al, 2009; Miró G et al, 2017). L'administration prolongée d'allopurinol induit fréquemment une urolithiase à la xanthine (Saridomichelakis MN et al, 2006). Il existe donc un besoin urgent de nouveaux médicaments efficaces, sûrs et abordables pour le traitement de la LCan.

L'artémisinine et ses dérivés (ART) ont démontré leur efficacité contre les parasites protozoaires, tels que les *Plasmodium* (Loo CS et al, 2017) et *Perkinsus* (Araujo NCP et al, 2013). L'activité antiparasitaire des ARTs contre d'autres protozoaires humains et animaux, à savoir *Leishmania* spp., a rarement été explorée. Bories et Chollet ont rapporté l'activité des fluoroartémisinines contre les formes promastigotes de *L. donovani* (à des concentrations micromolaires) (Bories C et Chollet C, 2008). D'autres composés, comme l'artésunate, l'artésunate désoxygéné, et la dihydroartémisinine désoxygénée, ont montré une activité *in vitro* contre toutes les formes de *L. infantum* (promastigote et amastigote) (Cortes S et al, 2015). En outre, les ARTs ont montré leur efficacité dans le traitement de la LV murine (Sen R et al, 2010; Islamuddin M et al, 2015; Want MY et al, 2015; Want MY et al, 2017).

Le deuxième objectif de cette thèse c'était de tester, pour la première fois, l'artésunate dans le traitement de la LCan chez des chiens naturellement

infectés par *L. infantum*. Il s'agit d'un essai terrain randomisé, simple et ouvert, incluant deux groupes de chiens malades : (i) groupe contrôle, constitué de chiens traités avec la chimiothérapie de première intention actuelle pour la LCan (l'association antimoniate de méglumine/allopurinol) ; et (ii) groupe test, constitué de chiens traités par l'artésunate (chimiothérapie alternative). Les chiens ont été suivis pour leur statuts cliniques, parasitologiques et sérologiques pendant 6 mois.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Ethique de la recherche

L'étude a été réalisée conformément aux directives de la législation algérienne. Dans ce cas, les échantillons ont été collectés après avoir obtenu un consentement verbal des propriétaires de chiens par un vétérinaire spécialiste. L'évaluation des risques a été soumise et approuvée par les services des inspections des vétérinaires praticiens des wilayas du nord de l'Algérie. Ces institutions sont affiliées au Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (Directions des Services Vétérinaires). Le protocole de l'étude a également été approuvé par le conseil scientifique (Procès-Verbal du CSI N°6, 2018) de l'Institut des Sciences Vétérinaires d'El Khroub, Université de Constantine 1, Algérie. De plus, aucun chien infecté non traité, servant de contrôle, n'a été impliqué dans cette étude pour des raisons éthiques. Afin de faciliter le travail sur le terrain, des collaborations ont été établies avec des médecins vétérinaires et leurs assistants travaillant dans la région d'étude.

2. Région d'étude et échantillonnage

L'étude a été menée en Kabylie, une région culturelle et naturelle du nord de l'Algérie. Elle fait partie de la chaîne montagneuse du Tell Atlas, et est sur les rives de la mer Méditerranée. Elle couvre plusieurs wilayas: l'ensemble de Tizi-Ouzou et

de Bejaia, la majeure partie de de Bouira et des parties des wilayas de Boumerdes, Jijel, Sétif et Bordj Bou Arreridj. Une étude récente a montré une prévalence de 10% de la LCan en Kabylie (Mouloua A et al, 2017). Aucune donnée sur les autres protozoaires canins à transmission vectorielle n'est disponible dans cette région. Cette dernière prévalence (10%) a été choisie comme prévalence assistée pour cette étude. En utilisant 5% comme marge d'erreur et un niveau de confiance de 95%, la taille de l'échantillon doit être d'au moins 140 échantillons pour une enquête épidémiologique transversale.

En mai 2018, des prélèvements sanguins ont été effectués sur 227 chiens vivant dans trois wilayas de la Kabylie avec : 97 chiens de Bouira (36°22'29.6 "N, 3°54'7.2"E), 98 chiens de Sétif (36°11'28.03 "N, 5°24'49.43"E) et 32 chiens de Tizi-Ouzou (36°42'42.55 "N, 4°2'45.28"E) (Fig 12 et 13). Un questionnaire (tableau S1) a été rempli pour chaque chien avec des informations sur l'âge, le sexe, la race, le mode de vie et les résultats de l'examen physique. Un score clinique (SC) de 0 à 4 a été attribué à chacun des chiens en fonction du nombre de signes cliniques identifiés : SC0 pour les chiens sans signes cliniques, SC1 : pour les chiens présentant un ou deux signes cliniques, SC2 : si les chiens ont trois ou quatre signes cliniques, SC3 : cinq ou six signes et SC4 pour les chiens avec plus de six signes cliniques. En général, les signes enregistrés étaient compatibles avec le tableau clinique connu pour la LCan et comprenaient la fièvre, l'anorexie, les manifestations dermatologiques, lymphadénopathie, perte de poids, léthargie, atrophie musculaire, onychogryphose, ulcération, manifestations oculaires, splénomégalie, épistaxis et troubles neurologiques. Chaque fois que possible, des tiques ont été collectées, elles ont été utilisées dans une autre étude en parallèle (Laidoudi Y et al, 2020).

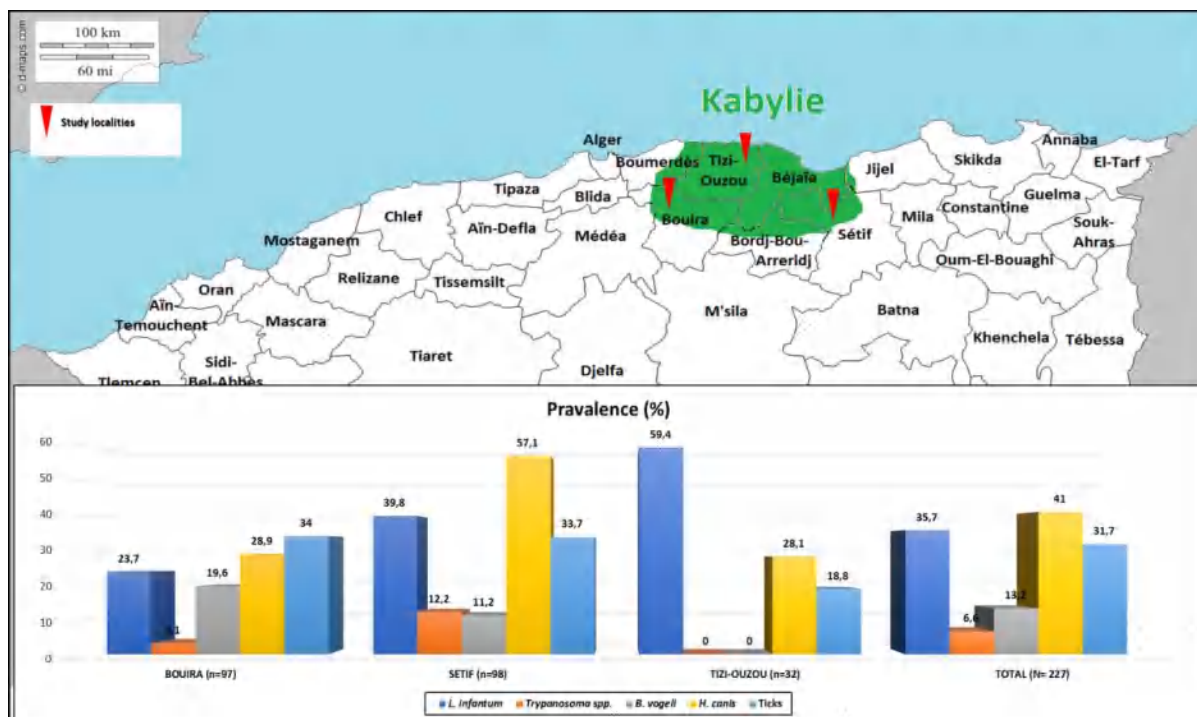


Fig 12. Carte montrant les trois wilayas (Tizi-Ouzou, Bouira et Sétif) de la zone d'étude et les prévalences des hémoprotosoaires à transmission vectorielle retrouvées chez le chien (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Kabylia.gif>).

3. Prélèvements

Un volume de 5 ml de sang a été prélevé de la veine radiale de chaque chien. Une goutte de sang total de chaque échantillon a été utilisée pour le dépistage rapide de la leishmaniose sur place au moment du prélèvement et le reste du sang a été transféré dans des tubes EDTA et des tubes secs pour les tests moléculaires et sérologiques, respectivement. Les sérums ont été récupérés dans des cryotubes après centrifugation (10 min, 3000 g). Une fois collectés, les échantillons ont été conservés à 4 °C toute la nuit, puis congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation (Fig 13).



Fig 13. Quelques biotopes de la région d'étude et la réalisation des prélèvements de la veine radiale.

4. Test d'immuno-migration rapide (RIM™) et test IFAT quantitatif pour la détection des anticorps spécifiques au *L. infantum*

Deux tests sérologiques ont été utilisés : le test rapide qualitatif WITNESS® *Leishmania* (Zoetis, France) et le test quantitatif d'immunofluorescence indirecte (IFAT). Le test rapide a été réalisé conformément aux instructions du fabricant sur d'une goutte (10 μ L) de sang total de chaque chien, directement après le prélèvement. L'IFAT pour la détection et le titrage des immunoglobulines G spécifiques à *L. infantum* a été réalisé sur les sérums. Des lames à puits ont été sensibilisées par 20 μ L d'antigènes commerciaux de *L. infantum* (Zoetis, France). Les échantillons ont été dilués à 1:50 avec du PBS, puis, 20 μ l de chaque dilution de sérum ont été appliqués dans les puits. Les lames ont été incubées pendant 30 min à 37°C. Elles ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS pendant 5 min et une fois

avec de l'eau distillée. Après le lavage, 20 μ L d'IgG anti-chien conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Cambridge House, UK) ont été ajoutés dans chacun des puits après dilution au 1:200. Ensuite, les lames ont été incubées à 37 °C pendant 30 min dans l'obscurité. La procédure de lavage a été répétée comme décrit ci-dessus. Ensuite, quelques gouttes de milieu de montage Fluoprep (bioMérieux, France) ont été ajoutées au centre des lames avant de déposer les lamelles de couverture. La lecture a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence et chaque puits a été comparé avec la fluorescence des contrôles positifs et négatifs ajoutés dans chaque lame. Le contrôle positif était un sérum connu de chien français infecté par *L. infantum* (à la dilution 1:1600), et le contrôle négatif était un sérum connu de chien non infecté par *Leishmania* provenant de la collection du laboratoire IHU – Méditerranée infection, Marseille, France. Pour éviter les erreurs d'observation, les échantillons ont été examinés par deux investigateurs différents. Tous les échantillons négatifs à 1:50 ont été considérés comme négatifs et aucune autre dilution n'a été effectuée. Tous les résultats positifs ont été examinés plus en détail en utilisant une dilution en série double à 1:100 et 1:200. Si un résultat fortement positif était observé, les échantillons ont été dilués à 1:400, 1:800 et 1:1600. À ce stade, les échantillons ont été classés comme hautement positifs pour *L. infantum* (> 1:1600).

5. Analyses moléculaires

5.1. Extraction de l'ADN

L'ADN total a été extrait à partir de 200 μ L de sang, après digestion avec la protéinase K à +56 °C toute la nuit, à l'aide d'un kit commercial d'extraction d'ADN (QIAamp DNA Mini Kit®, Qiagen, Courtaboeuf, France) sur le BIOROBOT EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN a

été élué dans 200 µl d'eau distillée (exempte d'ADNase et ARNase) et conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.

5.2. PCRs pour la recherche et l'identification des hémoprotozoaires

Pour le dépistage, les extraits d'ADN ont été testés par la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) ciblant le gène de l'ARNr 18S pour *Leishmania* spp., le gène de l'ARNr 5.8S pour *Trypanosoma* spp. et pour les *Piroplasmida* (tableau 6). La qPCR spécifique à *L. infantum* ciblant l'ADN kinétoplastique des minicercles (ADNk) est réalisée pour le dépistage et la quantification de la charge parasitaire comme décrit précédemment (Mary et al, 2004).

Les réactions qPCR ont été préparées dans un volume final de 20 µl avec 10 µl du mélange Eurogentec Master Mix Roche, 3 µl d'eau distillée exempte de DNase et RNase, 0,5 µl de chaque amorce sense et anti-sense (concentrée à 20 µM), 0,5 µl de sonde marquée au FAM (concentrée à 5 µM) (tableau 6), 0,5 µl d'UDG et 5 µl de la matrice d'ADN. L'amplification est réalisée dans un système CFX96 Real-Time (BioRad Laboratories, Foster City, CA, USA) suivant le protocole Roche: une première étape d'incubation à 50 °C pendant 2 minutes et une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 5 secondes et d'hybridation-extension à 60 °C pendant 30 secondes. Dans chaque plaques de qPCR, nous avons rajouté un ADN connu du protozoaire cible comme contrôle positif et le mix tout seul comme contrôle négatif. Les échantillons sont considérés comme positifs lorsque le seuil de cycle (Ct) était inférieur à 35 Ct pour tous les tests qPCR, à l'exception de la qPCR pour *Leishmania* spp. ciblant le 18S, nous avons considéré l'échantillon comme positif lorsque le $Ct < 38$.

Tableau 6. Séquences des oligonucléotides utilisées pour la détection et l'identification des espèces de protozoaires.

Microorganismes ciblés	Gene cible	Nom	Amorces et sondes (5'-3')	Tm	Références	
Leishmania spp.	18S	Leish. F	GGTTTAGTGCCTCCGGTG	60°C	Medkour H et al, 2020	
		Leish. R	CGGCCATAAGATCC CCAA			
		Leish. P*	FAM-CGGCCGTAACGCCTTTTCAACTCA -TAMRA			
			Leish. F1	CTGTGACTAAAGAAGCGTGAC	52°C	
			Leish. R1	AGGCCGAATAGAAAAGATACGT		
	kDNA	RV1	CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG	60°C	Mary C et al, 2004	
RV2		CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA				
Probe. Leish*		FAM-TTTTTCGAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA				
ITS II	LGITSF2	GCATGCCATATTCTCAGTGTC	60°C	De Almeida ME et al, 2011		
	LGITSR2	GGCCAACGCGAAGTTGAATTC				
Trypanosoma spp.	5.8S	Tryp 5.8SF	CAACGTGTCGCGATGGATGA	60°C	Medkour H et al, 2020	
		Tryp 5.8SR	ATTCTGCAATTGATACCACTTATC			
		Tryp 5.8S P*	FAM-GTTGAAGAACGCAGCAAAGGCGAT-TAMRA			
	ITS I	ITS1-CF	CCGGAAGTTCACCGATATTG	58°C	Njiru ZK et al, 2005	
ITS1-BR		TTGCTGCGTTCTTCAACGAA				
Piroplasmida	5.8S	5.8S-F5	AYYKTYAGCGRTGGATGTC	60°C	Dahmana H et al, 2019	
		5.8S-R	TCGCAGRAGTCTKCAAGTC			
		5.8S-S*	FAM-TTYGCTGCGTCCTTCATCGTTGT-MGB			
	18S	piro18S-F1	GCGAATGGCTCATTAAIACA	58°C		
		piro18S-R4	TTTCAGMCTTGCGACCATACT			
Hepatozoon spp.	18S	H14Hepa18SFw	GAAATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCT	58°C	Hodžić A et al, 2015	
		H14Hepa18SRv	GTGCTGAAGGAGTCGTTTATAAAGA			

Tm: La température de l'hybridation ; *: Sonde.

Ensuite, les échantillons positifs par qPCRs ont été amplifiés par des PCR conventionnelles (PCR) ciblant les gènes *ITS II* pour *Leishmania* spp. et *ITS I* pour *Trypanosoma* spp., et l'ARNr 18S pour les *Piroplasmida*.

Le dépistage pour la présence d'*Hepatozoon* spp. a été réalisé pour tous les échantillons par PCR en utilisant des amorces amplifiant un fragment d'environ 600 paire de bases (pb) de l'ARNr 18S (tableau 6).

Les amplifications par PCR sont réalisées dans un thermocycleur de modèle Peltier PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). Les mélanges réactionnels ont été préparés dans un volume de 50 µl comprenant 25 µl du mélange Amplitaq gold, 1 µl de chaque amorce, 5 µl d'ADN et 18 µl d'eau distillée. Des contrôles positifs et

négatifs sont ajoutés dans chaque réaction. Les protocoles PCRs étaient les suivants : Une étape d'incubation à 95 °C pendant 15 minutes, une étape à 40 cycles d'une minute à 95 °C, 30 secondes à la température d'hybridation des amorces (tableau 6) et une minute à 72 °C, et une étape finale d'extension pendant 5 minutes à 72 °C. Enfin, les amplicons sont visualisés en électrophorèse sur des gels d'agarose à 1,5%.

5.3. Séquençage et phylogénies

Tous les amplicons positifs ont été purifiés à l'aide de plaques PCR NucleoFast 96 (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France) selon les instructions du fabricant, puis séquencés à l'aide du kit de séquençage Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) avec un séquenceur automatique ABI (Applied Biosystems). Les électrophérogrammes obtenus ont été assemblés et édités à l'aide du logiciel ChromasPro (ChromasPro 1.7, Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australie) et comparés à ceux disponibles dans la base de données GenBank par NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Toutes les séquences de *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia* et *Hepatozoon* obtenues ont été analysées par BLASTn, comparées entre elles et à celles disponibles dans la base de données GenBank. Les analyses phylogénétiques et moléculaires sont déduites en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le paramètre Tamura-Nei pour les séquences nucléotidiques sur le logiciel MEGA version 6.06 (<https://www.megasoftware.net/>). Le support statistique pour les branches internes des arbres phylogénétiques est évalué par bootstrapping avec 100 itérations.

6. Essai clinique

6.1. Design de l'étude

L'objectif de l'étude était de tester l'efficacité de l'artésunate dans le traitement de la LCan. Nous avons réalisé un essai clinique de terrain ouvert, randomisé, avec preuve d'efficacité. Nous avons effectué une randomisation simple déséquilibrée. Tous les chiens dans cette étude ont été exposés à la même pression épidémiologique selon les résultats et les prévalences de la LCan observés dans l'enquête épidémiologique ci-dessus dans la Kabylie, région de cette étude. Les chiens des propriétaires sélectionnés, quel que soit leur âge, leur race ou leur sexe, ont été suivis par 11 vétérinaires praticiens. Les chiens ont fait l'objet d'un suivi complet et le traitement pouvait être changé en antimoniate méglumine/allopurinol à la demande du propriétaire si une quelconque altération clinique était constatée. Au total, 187 chiens ont été examinés pour vérifier leur conformité aux critères d'inclusion. Parmi eux, 42 chiens adultes malades (30 mâles et 12 femelles), âgés en moyenne de 3,8 ans (min = 1, max = 11 ans), pesant entre 3 et 37 kg et de races différentes (8 bergers allemands, 1 berger belge malinois, 2 Saloughi, 5 pointer, 6 Braques, 1 Bagnole, 1 American Staffordshire terrier, 1 beagle et 17 chiens de races mixtes) ont été sélectionnés pour cette étude.

6.2. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les principaux critères d'inclusion étaient les suivants : (i) chiens présentant au moins deux manifestations cliniques liées à la LCan (tableau 7) et (ii) chiens présentant une sérologie positive pour *Leishmania* au test rapide qualitatif WITNESS® Leishmania et/ou au test quantitatif IFAT (IFAT \geq 100) ou un résultat positif en qPCR obtenu à partir d'un échantillon de sang.

Les chiens présentant des altérations significatives de la fonction rénale et/ou hépatique ou d'autres maladies infectieuses cliniquement apparentes ont été exclus.

Les chiens ont été exclus s'ils avaient été vaccinés contre ou avaient été traités avec des agents leishmanicides moins de 3 mois avant la préinclusion dans la présente étude ou avec un leishmanostatique 1 mois avant la préinclusion. Aucun traitement antérieur avec des antibiotiques ou des antifongiques systémiques dans les 7 jours ou avec des corticostéroïdes systémiques à longue durée d'action dans le mois précédant la préinclusion n'était autorisé. Enfin, Les chiens étaient également exempts d'autres infections dues aux hémoprotozoaires telles que *Babesia* et *Trypanosoma* spp.. Les chiennes gestantes ou allaitantes étaient exclues. Les chiens pouvaient être retirés de l'étude à tout moment s'ils présentaient une intolérance au traitement ou à la demande du propriétaire.

Les critères d'efficacité ont été déterminés par la réduction des scores cliniques (c'est-à-dire que la somme des scores cliniques était inférieure à celle obtenue avant le traitement) (Manna L et al, 2009; Woerly V et al, 2009; Nogueira S et al, 2019), ce qui correspondait à une diminution d'ADN parasite et des titres d'anticorps spécifiques de *Leishmania*. Le score a été défini en fonction de la gravité de chaque signe clinique et la valeur finale a été obtenue à partir de la somme de toutes les valeurs (tableau 7). La charge parasite a été suivie par la qPCR et les titres d'anticorps par l'IFAT quantitative.

Tableau 7. Manifestations de la LCan identifiées pour évaluer les scores cliniques des chiens.

Symptômes	Nombre des signes	Manifestations cliniques
Conditions générales	5	Emaciation, anorexie, abattement, anémie, hyperthermie
Signes cutanés	6	Alopécie localisée, prurits, squames, hyperkératose, onychogribose, ulcères
Lésions viscérales	4	Lymphadénopathie, splénomégalie, hépatomégalie, désordre rénal

Niveau ophtalmique	4	Dépilation autour des yeux "en lunettes", conjonctivite mucopurulente, kératites and/or uvéites
Niveau oral	1	Erosions orales
Niveau squelettique	3	Arthrites, synovites, douleurs diffuses dans le train postérieur
Autres	3	Epistaxis, diarrhée chronique, signes neurologiques

Chaque manifestation a reçu un score de gravité allant de 0 à 3, où 0 = aucune, 1 = légère, 2 = modérée et 3 = grave. Les scores cliniques variaient de 3 à 21 chez les chiens suivis. Le score le plus élevé (22) a été attribué à la mortalité liée à la LCan.

6.3. Suivi thérapeutique

Les chiens sélectionnés ont été inclus au hasard dans l'un des deux groupes de traitement (tableau 8). Les chiens (N = 26) du groupe 1 (groupe contrôle) ont reçu 100 mg/kg d'antimoniote de méglumine (Glucantime, Merial, France) par jour pendant 28 jours, par voie sous-cutanée, et 30 mg/kg d'allopurinol (Allopurinol Arraw 300 mg, France) par jour pendant un mois, par voie orale. Les chiens (N = 16) du groupe 2 (groupe test) ont reçu 25 mg/kg d'artésunate (Asu-Denk, Denk Pharma, Allemagne) par jour pendant 6 jours, par voie orale. Après chaque administration, les chiens ont été observés pendant 30 minutes pour surveiller leur réactivité, les vomissements et/ou les régurgitations afin de garantir l'absorption complète du médicament. Les chiens ont été suivis pendant 180 jours (Fig 14). Pour faciliter l'essai, nous avons effectué une randomisation simple déséquilibrée. Cette dernière était plus équilibrée à la fin de l'essai et permettait une efficacité d'environ 98% comme une randomisation simple équilibrée.

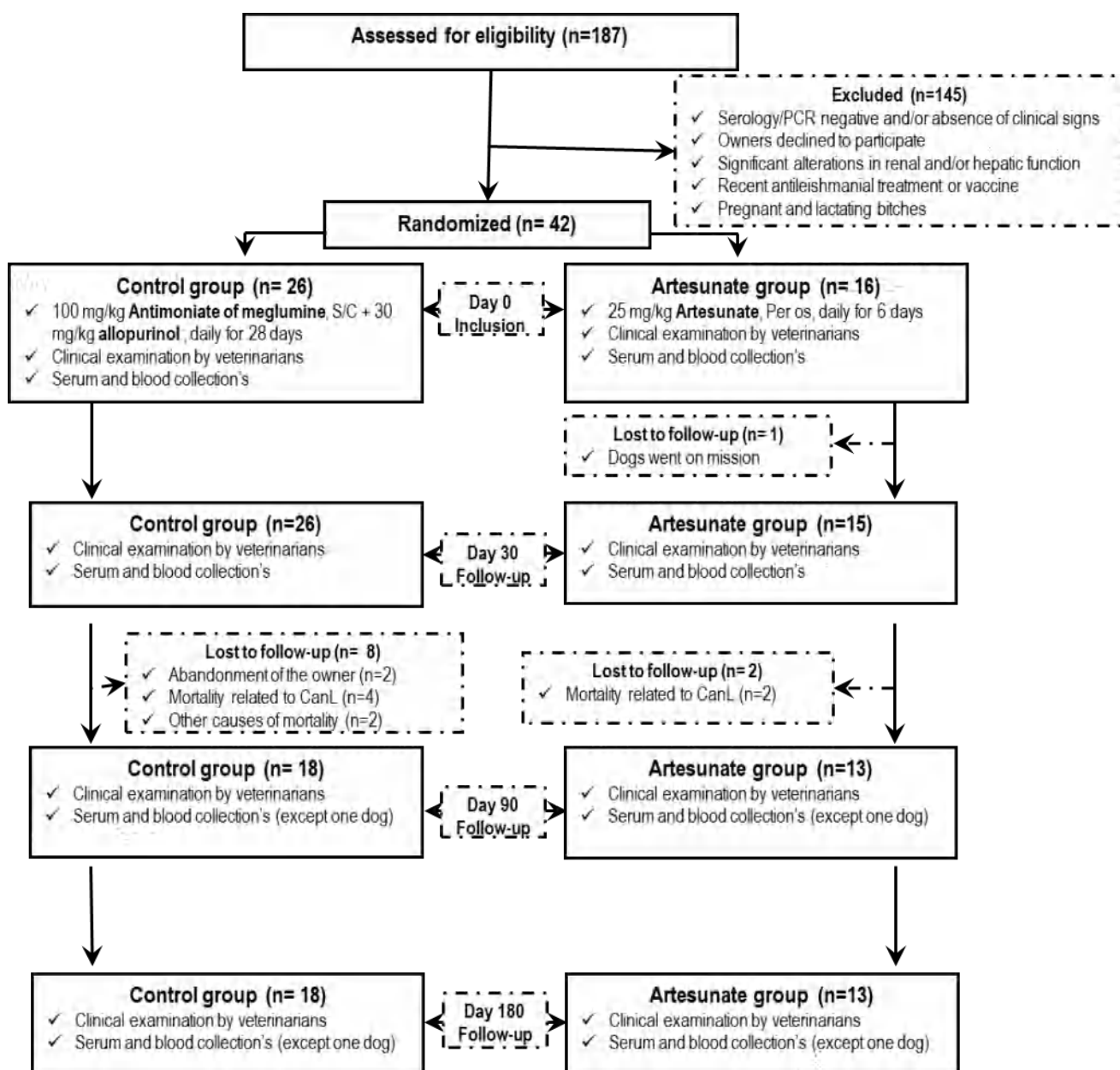


Fig 14. Organigramme des groupes montrant les protocoles thérapeutiques et les chiens atteints de la leishmaniose à chaque étape de l'étude. Sur l'ensemble des 42 chiens inclus à J+0, un chien du groupe 2 a été perdu de vue avant le point de temps J+30. Au cours des 6 mois de suivi, quatre chiens du groupe 1 ont été perdus de vue deux mois après le début du traitement, et deux d'entre eux étaient dus au fait que les clients ne sont pas revenus pour les revisites finales à J+90 et J+180. Deux autres étaient dus à des décès non liés à la LCan. Enfin, six chiens sont morts entre J+60 après le début du traitement et avant la visite de J+90 avec une augmentation des signes cliniques liés à la LCan. Quatre d'entre eux faisaient partie du groupe 1, et deux du groupe 2.

Table 8. Caractéristiques des chiens affectés dans chaque bras de traitement et données de l'analyse d'homogénéité exprimées en moyenne ± écart-type et fréquences (%).

Variable	Traitment control (Glucantime+ Allopurinol) (n=26)	Traitment test (Artesunate) (n=16)
Age, an	3.71 ± 2.11	3.94 ± 1.45
(min- max)	(1- 11)	(2.5- 8)
Genre, male (%)	17 (65.39)	13 (81.25)
Race		
Pure (%)	17 (65.39)	8 (50)
Mixte (%)	9 (34.61)	8 (50)
Score clinique: points	7.46 ± 4.04	6.67 ± 2.30
(min- max)	(3- 21)	(3- 11)
Nbr. positifs par qPCR (%)	7 (26.92)	5 (31.25)
qPCR-Parasitémie (Leish/mL)	1108.72 ± 4154.5	78.04 ± 98.98
(min- max)	(0- 21000)	(0- 233)
Nbr. Positifs par qPCR (%*)	7 (26.92)	5 (31.25)
Titres, IgG Anti-<i>Leishmania</i>	476.92 ± 448.38	390.62 ± (507.35)
(min- max)	(100- 1600)	(50- 1600)

(%*) : (Nombre de positifs par qPCR/Nombre de positifs totaux) x 100.

6.3.1. Calendrier des visites et des prélèvements

Les animaux ont été contrôlés aux jours J0, J+30, J+90 et J+180 après le début du traitement, et des échantillons de sang ont été prélevés à chaque point de temps. Les signes cliniques et les lésions associés à la leishmaniose, le statut de l'infection (charge parasitaire et titres d'anticorps) ont été évalués et suivis à ces points.

6.3.2. Suivi clinique

L'efficacité des traitements a été évaluée à chaque point du temps sur la base de la réponse clinique au traitement (évolution des scores cliniques (SC) dans le temps et pourcentage de réduction du SC total). Pour chaque chien, le même vétérinaire a effectué toutes les évaluations cliniques afin de maintenir la cohérence. Les vétérinaires ont rempli un questionnaire, des signes cliniques que nous pouvons

trouver lors des examens cliniques ([tableau S2](#)). Les SC ont été calculés en fonction de la gravité des signes cliniques listés dans le [tableau 7](#), comme rapporté précédemment ([Manna L et al, 2009](#); [Woerly V et al, 2009](#); [Nogueira S et al, 2019](#)). Pour chaque manifestation s'est attribué un score de sévérité allant de 0 à 3, où 0 = aucune, 1 = légère, 2 = modérée et 3 = sévère (SC total maximum = 21). La mortalité liée à la LCan a été évaluée par le score le plus élevé (22). Le SC est la somme des scores des signes cliniques. Le pourcentage de réduction du SC a été calculé selon la formule :

Pourcentage de réduction du SC % = $(SC \text{ à } J+xx - CS \text{ à } J+0) / CS \text{ à } J+0 \times 100$.

SC : score clinique; **J+xx** : au jour xx post-traitement (J+30, J+90 ou J+180); **J+ 0** : à l'inclusion (jour 0).

Les signes cliniques constatés lors des examens cliniques, leurs scores, les SC et les pourcentages de réduction des signes cliniques, pour chaque chien à chaque point de temps, sont présentés dans le [tableau S3](#).

6.3.3. Suivi de la charge parasitaire

Les échantillons de sang prélevés à chaque point du temps ont été analysés pour la quantification de la charge parasitaire par la qPCR ciblant l'ADNk du minicercle citée ci-dessus. La quantification était basée sur une courbe des standards, qui était une dilution en série de 8 fois à partir de 10^8 copies d'ADN plasmidique/mL de la région cible d'ADNk, équivalente à 10000 parasites/mL, et 5 μ L des dilutions en série allant de 10000 à 0,001 parasites/mL ont été introduits dans chaque plaque de réaction qPCR. Les résultats ont été exprimés en nombre de parasites *Leishmania* présents dans 1 mL de sang en tenant compte du volume de sang (200 μ L) et de l'élution (200

µL) introduits lors du processus de l'extraction d'ADN. Le pourcentage de réduction de la charge parasitaire (PCP%) a été calculé selon la formule :

$$\text{PCP}\% = (\text{PCP à J+xx} - \text{PCP à J+0}) / \text{PCP à J+0} \times 100.$$

PCP : charge parasitaire sanguine (Leish/mL); **J+xx** : au Jour xx post-traitement (J+30, J+90 ou J+180); **J+0** : au jour d'inclusion.

6.3.4. Suivi sérologique

Au jour 0, le test rapide qualitatif WITNESS® *Leishmania* a été réalisé selon les instructions du fabricant en utilisant une goutte (10 µL) de sang total de chaque chien directement après le prélèvement. L'IFAT quantitative pour le titrage des IgG anti- *L. infantum* a été réalisée sur les sérums comme décrit ci-dessous. Tous les échantillons négatifs au 1:50 ont été considérés comme négatifs. Les résultats positifs ont été examinés plus en détail en utilisant une dilution sérielle pour l'IFAT de cinq fois, de 1:100 à 1:1600. À la plus grande dilution, les échantillons ont été classés comme fortement positifs (> 1:1600). En fin, de la même manière que pour la charge parasitaire, nous avons calculé le pourcentage de réduction des titres d'anticorps.

Pour évaluer l'efficacité des traitements, nous avons effectué une comparaison des moyennes des SC, de la parasitémie et des titres d'anticorps prises à différents points du temps pour les deux groupes, le groupe 1 seul et le groupe 2 seul. Les traitements ont été comparés entre eux selon le pourcentage de réduction des SC, de la charge parasitaire et des anticorps anti-*Leishmania* à chaque point de temps durant le suivi.

7. Analyses statistiques

Pour l'étude épidémiologique, le logiciel IBM SPSS statistics version 2.3 a été utilisé pour l'analyse statistique. Après la préparation des bases de données dans XL 2010, j'ai réalisé une étude descriptive des infections chez les chiens et du nombre de co-infections détectées chez chaque chien, en fonction des résultats de l'IFAT pour la LCan, des qPCRs pour *Trypanosoma* spp. et *Piroplasmida* et de la PCR standard réalisée pour *Hepatozoon* spp.. L'association entre les infections, l'origine, l'âge, le sexe, la race, l'aptitude, les conditions cliniques des chiens et le portage des tiques a été évaluée à l'aide du test X². Le test exact de Fischer a été utilisé lorsque les pourcentages étaient faibles. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à une valeur $P < 0,05$. La comparaison entre les tests sérologiques pour le diagnostic de la LCan a été réalisée à l'aide du test de McNemar dans XLSTAT Addinsoft version 2018.7.

Pour étudier la relation entre les manifestations cliniques et les titres d'anticorps de *L. infantum*, nous avons transformé la variable qualitative des SC (de SC0 à SC4) en variables quantitatives (de 0 à 4, respectivement), puis effectué la corrélation de Spearman dans XLSTAT. Des variables quantitatives ont été attribuées en fonction de nombre d'infections comme suit : 0 pour aucune infection, 1 : un seul pathogène, 2 : infection avec deux pathogènes, 3 : infection avec trois pathogènes et 4 : quatre pathogènes. Ensuite, nous avons établi la relation entre les manifestations cliniques (scores cliniques) et le nombre d'infections (corrélation de Spearman) dans le logiciel XLSTAT.

Pour l'essai thérapeutique, tout d'abord, une analyse descriptive des données a été réalisée en fonction de la nature des variables pour chaque visite du suivi et traitement assigné dans XLSTAT. Le test non paramétrique Kruskal-Wallis/bilatéral a été utilisé pour la comparaison des moyennes prises dans des points de temps du

suivi pour les deux groupes, le groupe 1 seul et le groupe 2 seul. Les comparaisons multiples par paires suivant la procédure du test de Dunn/bilatéral ont été utilisées pour les SC, la parasitémie et les titres d'anticorps. Les effets du traitement ont été comparés entre les deux groupes par l'analyse du pourcentage de réduction des SC, de la charge parasitaire et des titres d'anticorps à chaque point de temps durant le suivi. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer l'efficacité des traitements en comparant la différence de pourcentage de réduction des SC, de la parasitémie et des titres d'anticorps entre J+0 et J+30 jours, J+0 et J+90 jours, J+0 et J+180 jours. Le seuil de signification choisit pour tous les tests était de 5% à part celui de la correction de Bonferroni qui était de 0,0083.

III. RESULTATS

1. Résultats de l'étude épidémiologique

1.1. Signalement et état clinique des chiens

L'âge était disponible pour tous les chiens. L'âge moyen étant de 3,5 ans avec une fourchette de 6 mois à 13 ans. Les chiens sont répartis en fonction de leur âge comme suit 47 chiots [6 mois -2 ans], 108 jeunes chiens [2-4 ans], 39 adultes [4-6 ans] et 33 vieux chiens [>6 ans]. Soixante-douze chiens étaient des femelles et 155 des mâles. De plus, 108 chiens étaient de race pure tandis que les autres (119) étaient de race commune. En outre, 77 (34%) chiens présentaient au moins un des signes cliniques mentionnés ci-dessus et 150 (66%) étaient apparemment en bonne santé. Les chiens ont été classés en fonction de leurs signes cliniques et un SC a été attribué à chacun d'entre eux. Selon les SC, 150 chiens étaient asymptomatiques (SC0), 32 ont été classés SC1 avec un ou deux signes, 31 ont été classés dans la catégorie SC2 avec trois ou quatre signes, neuf chiens ont été classés en CS3 avec cinq ou six signes et enfin, cinq chiens ont été classés comme CS4 avec de nombreux signes cliniques (> 6 signes). Parmi les chiens, 32% (72/ 227) étaient porteurs de tiques.

1.2. Anticorps anti-*Leishmania infantum*

Les anticorps contre *L. infantum* ont été détectés à l'aide du test Rapid Immuno Migration (RIM™) et l'IFAT quantitative, qui est considérée comme l'étalon-or pour le diagnostic de la LCan (OIE, 2018). Les IgG ont été détectés chez 36 % (81/227) des chiens par l'IFAT (tableau 9). Nous avons effectué une dilution en série pour les sérums positifs. Les chiens positifs présentaient différents titres d'IgG et 12,3 % (10/81) étaient positifs à une dilution de 1:50, 28,4% (23/81) étaient positifs à la

dilution 1:100, 24,7% (20/81) à la dilution 1:200, 6,2% (5/81) à la dilution 1:400, 20,1% (17/81) à une dilution de 1:800 et 7,4% (6/81) étaient positifs à une dilution supérieure à 1:800.

La prévalence avec le test RIM™ (WITNESS® Leishmania) était de 32% (72/227). Tous les échantillons positifs au test rapide, sauf un, étaient positifs à l'IFAT. D'autre part, l'IFAT était plus sensible et 10 échantillons étaient positifs alors qu'ils étaient négatifs par le test WITNESS® Leishmania. La différence observée entre les résultats des deux tests était statistiquement significative (test de McNemar, valeur $p = 0,012$) avec des valeurs de 0,88 (0,78-0,94) et 0,99 (0,96-1,00) respectivement pour la sensibilité et la spécificité du test rapide.

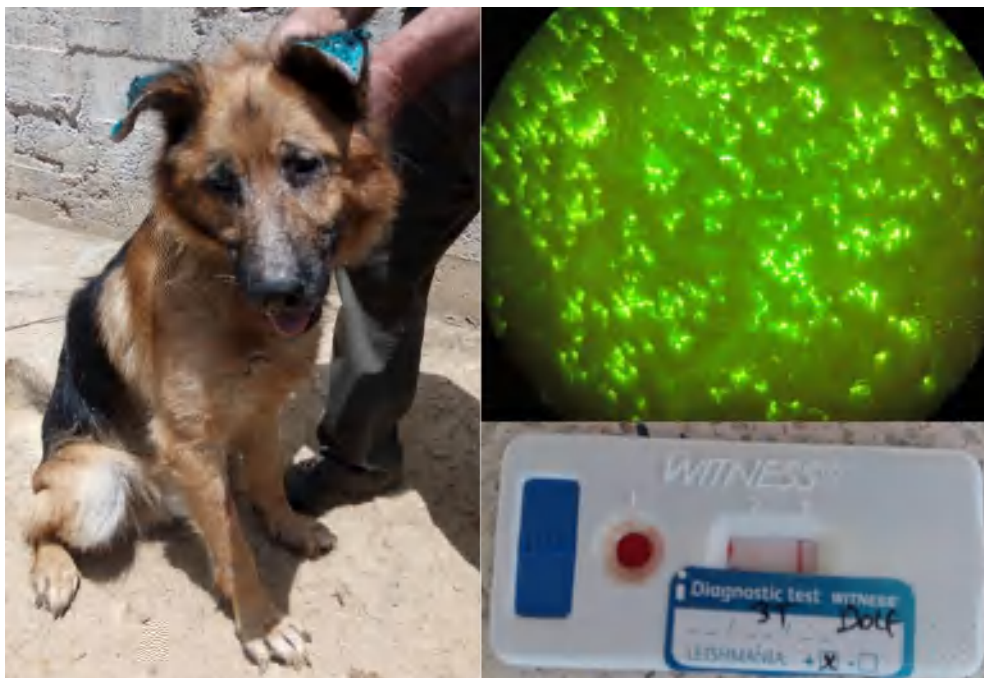


Fig 15. Exemple d'un chien positif par l'IFAT, par le WITNESS® et présentant des signes cliniques de la LCan.

Tableau 9. Prévalences et facteurs de risque associés aux hémoprotozoaires à transmission vectorielle chez le chien dans cette étude.

Facteurs de risque	<i>L. infantum</i>				<i>Trypanosoma spp.</i>				<i>B. vogeli</i>		<i>H. canis</i>		Tiques										
	IFAT (No. Pos)	PV	Witness (No. Pos)	PV	qPCR (No. Pos)	PV	qPCR (No. Pos)	PV	qPCR (No. Pos)	PV	qPCR (No. Pos)	PV	collectées (No. Pos)	PV									
Prévalence	Positive	35.7	81	-	31.7	72	-	4.8	11	-	6.6	15	-	13.2	30	-	41	93	-	31.7	72	-	
	Négative	64.3	146		68.3	155		95.2	216		93.4	212		86.8	197		59	134		68.3	155		
Région	227																						
BOUIRA	97	23.7	23	0.001	18.6	18	0.00	4.1	4	0.71	3.1	3	0.01	19.6	19	0.013	28.9	28	0.00	34.0	33	0.23	
SETIF	98	39.8	39		35.7	35		6.1	6		12.2	12		11.2	11		57.1	56		33.7	33		
TIZI-OUZOU	32	59.4	19		59.4	19		3.1	1		0.0	0		0.0	0		28.1	9		18.8	6		
Age	227																						
[0-2]	47	23.4	11	0.13	19.1	9	0.14	6.4	3	0.39	10.6	5	0.20	31.9	15	0.00	42.6	20	0.52	29.8	14	0.74	
[2-4]	108	36.1	39		33.3	36		6.5	7		5.6	6		8.3	9		37.0	40		29.6	32		
[4-6]	39	38.5	15		33.3	13		2.6	1		10.3	4		12.8	5		41.0	16		33.3	13		
>6	33	48.5	16		42.4	14		0.0	0		0.0	0		3.0	1		51.5	17		39.4	13		
Sex	227																						
Femelle	72	29.2	21	0.16	22.2	16	0.036	2.8	2	0.32	4.2	3	0.4	20.8	15	0.02	40.3	29	0.88	25.0	18	0.14	
Male	155	38.7	60		36.1	56		5.8	9		7.7	12		9.7	15		41.3	64		34.8	54		
Race	227	0.0																					
Pure	108	38.9	42	0.33	34.3	37	0.43	7.4	8	0.08	5.6	6	0.6	12.0	13	0.61	41.7	45	0.83	28.7	31	0.35	
Mixte	119	32.8	39		29.4	35		2.5	3		7.6	9		14.3	17		40.3	48		34.5	41		
Aptitude	227																						
Ferme	31	12.9	4	0.001	9.7	3	0.001	3.2	1	0.18	3.2	1	0.34	12.9	4	0.81	41.9	13	0.37	22.6	7	0.34	
Garde	75	50.7	38		46.7	35		1.3	1		6.7	5		13.3	10		36.0	27		30.7	23		
Chasse	73	37.0	27		31.5	23		9.6	7		11.0	8		13.7	10		49.3	36		38.4	28		
Compagnie	9	11.1	1		11.1	1		0.0	0		0.0	0		0.0	0		22.2	2		11.1	1		
Berger	39	28.2	11		25.6	10		5.1	2		2.6	1		15.4	6		38.5	15		33.3	13		
Statut	227																						

Partie expérimentale..... Medkour H, 2023

<i>Malade</i>	77	88.3	68	0.00	81.8	63	0.00	13.0	10	0.00	6.5	5	0.60	15.6	12	0.45	53.2	41	0.01	39.0	30	0.1
<i>Non malade</i>	150	8.7	13		6.0	9		0.7	1		6.7	10		12.0	18		34.7	52		28.0	42	
<u>Score clinique</u>	227																					
<i>SC0</i>	150	8.7	13	0.00	6.0	9	0.00	0.7	1	0.00	6.7	10	0.46	12.0	18	0.26	34.7	52	0.63	28.0	42	0.13
<i>SC1</i>	32	81.3	26		68.8	22		3.1	1		3.1	1		25.0	8		50.0	16		31.3	10	
<i>SC2</i>	31	90.3	28		87.1	27		19.4	6		12.9	4		9.7	3		51.6	16		48.4	15	
<i>SC3</i>	9	100.0	9		100.0	9		11.1	1		0.0	0		11.1	1		55.6	5		22.2	2	
<i>SC4</i>	5	100.0	5		100.0	5		40.0	2		0.0	0		0.0	0		80.0	4		60.0	3	
<u>Tigues</u>	227																					
<i>Présence</i>	72	44.4	32	0.06	40.3	29	0.06	4.2	3	0.74	9.7	7	0.08	13.9	10	0.83	45.8	33	0.31			
<i>Absence</i>	155	31.6	49		27.7	43		5.2	8		5.2	8		12.9	20		38.7	60		-		

IFAT: immunofluorescence antibody test; PV: P-value; SC: score clinique; (No. Pos): Nombre des positifs.

1.3. Détection d'ADN des agents infectieux

Parmi les 227 échantillons de sang analysés par PCRs, 62% (141/227) avaient au moins une infection. Les tests qPCR ont montré une prévalence de 4,8% (11/227) pour *Leishmania* avec une parasitémie moyenne de 7×10^6 parasite/mL de sang (min : 4; max : 38×10^6), 6,6% (15/227) pour *Trypanosoma* spp. et 13,2% (30/227) pour *Babesia* spp.. L'ADN d'*H. canis* a été détecté chez 41% (93/227) des chiens en utilisant la PCR conventionnelle pour le dépistage (tableau 9).

En ce qui concerne la mono-infection, 36% (82/227) des chiens ont été infectés par un seul agent pathogène avec : 14% (32/227) infectés par *L. infantum*; 1% (2/227) infectés par *Trypanosoma* spp.; 4% (9/227) des chiens par *B. vogeli* et 17,2% (39/227) par *H. canis*. En outre, les co-infections par ces protozoaires à transmission vectorielle ont été détectées chez 26% (59/227) des chiens, avec deux, trois ou même les quatre agents analysés. La plus répandue était la co-infection *L. infantum*-*H. canis* chez 16% (36/227) des chiens, suivie par les co-infections *L. infantum*-*B. vogeli*, *B. vogeli*-*H. canis* et l'association de ces trois pathogènes chez 2,2% (5/227) des chiens pour chaque type. Les co-infections avec *Trypanosoma* -*H. canis* et l'infection triple associant les deux derniers agents avec *B. vogeli* ont été moins fréquentes, 1% (2/227). D'autres co-infections telles que : *L. infantum*-*Trypanosoma* spp.-*B. vogeli*, *L. infantum*-*Trypanosoma* spp.-*H. canis* et *Trypanosoma* spp.-*B. vogeli* étaient beaucoup plus rares avec un seul cas (0,4 %). Enfin, l'ADN des quatre agents pathogènes a été détecté chez un seul chien (0,4 %) (tableau 10).

Tableau 10. Fréquence des infections et des co-infections chez les chiens étudiés

	Bouira	n=97	Setif	n=98	Tizi- Ouzou	n=32	Total	N=227
Infections	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%

	Positifs		Positifs		Positifs		Positifs	
Mono-infection	33	34,0%	34	34,7%	15	46,9%	82	36,1%
<i>L. infantum</i>	10	10,3%	9	9,2%	13	40,6%	32	14,1%
<i>Trypanosoma spp.</i>	1	1,0%	1	1,0%	0	0,0%	2	0,9%
<i>B. canis vogeli</i>	6	6,2%	3	3,1%	0	0,0%	9	4,0%
<i>H. canis</i>	16	16,5%	21	21,4%	2	6,3%	39	17,2%
Co-infection	19	19,6%	35	35,7%	5	15,6%	59	26,0%
L+B	4	4,1%	1	1,0%	0	0,0%	5	2,2%
L+H	7	7,2%	24	24,5%	5	15,6%	36	15,9%
L+B+H	2	2,1%	3	3,1%	0	0,0%	5	2,2%
L+T+B	1	1,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,4%
L+T+H	0	0,0%	1	1,0%	0	0,0%	1	0,4%
L+T+B+H	0	0,0%	1	1,0%	0	0,0%	1	0,4%
T+B	1	1,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,4%
T+H	0	0,0%	2	2,0%	0	0,0%	2	0,9%
T+B+H	0	0,0%	2	2,0%	0	0,0%	2	0,9%
B+H	4	4,1%	1	1,0%	0	0,0%	5	2,2%
Total	52	53,6%	69	70,4%	20	62,5%	141	62,1%

L : *L. infantum*; *B* : *B. vogeli*; *T* : *Trypanosoma spp.*; *H* : *H. canis*

1.4. Infection versus facteurs de risque

En ce qui concerne la prévalence des infections selon la région, à Bouira, 24% (23/97) étaient positifs pour CanL, 3,1% (3/97) pour *Trypanosoma spp.*, 19,6% (19/97) pour *B. vogeli*, 29% (28/97) pour *H. canis*. La prévalence à Sétif était de 39,8% (39/98) pour *L. infantum*, 12,2% (12/97) pour *Trypanosoma spp.*, 11,2% (11/97) pour *B. vogeli* et 57,1% (56/98) pour *H. canis*. Pour Tizi-Ouzou, 59,4 % (19/32) étaient infectés par *L. infantum*, aucun cas n'a été détecté pour *Trypanosoma spp.* et *B. vogeli* et 28,1% étaient infectés par *H. canis*. Des différences statistiquement significatives ont été constatées entre la région et la prévalence des agents pathogènes (valeur $P < 0,01$).

Les chiens ont été classés dans quatre tranches d'âge, comme décrit ci-dessus. Aucune association n'a pu être observée entre l'âge et la prévalence de tous les agents pathogènes, sauf pour *B. vogeli* ou la prévalence variait avec l'âge et les

chiots de moins de 2 ans étaient plus sensibles (valeur $P < 0,001$) avec une prévalence de 31,9% (15/47). De plus, nous avons noté une différence statistiquement significative entre la prévalence de ce même agent pathogène en fonction du sexe (valeur $P = 0,02$). Les femelles étaient plus infectées (20,8%) (15/72) par *B. vogeli* que les males (9,7%) (15/155).

Les taux d'infection étaient les mêmes chez les chiens quelle que soit leur race (valeur $P > .08$). En revanche, l'infection par *L. infantum* variait en fonction de l'aptitude ou l'activité du chien. Les chiens de garde étaient plus infectés avec 50,7% (38/75) de cas, suivis par les chiens de chasse avec 37% (27/7), ensuite les chiens berger avec 28,2% (11/39), les chiens de ferme avec 12,9% (4/31) et enfin les chiens de compagnie avec 11% (1/9) (valeur $P = 0,001$).

Au total 567 tiques ont été collectées sur 72 chiens. Aucun lien n'a été trouvé entre l'infestation par les tiques et la prévalence des agents infectieux (valeur $P > 0,08$).

1.5. Infections versus signes cliniques

Nous avons étudié la relation entre l'état clinique du chien (malade ou sain) et les infections par les pathogènes. Aucun lien n'a été trouvé entre l'état du chien et les infections par *Trypanosoma* spp. (Valeur $P = 0.6$) et *B. vogeli* (valeur $P = 0,45$). En revanche, des différences statistiquement significatives ont été constatées entre l'état du chien et la détection des IgG anti-*L. infantum* (valeur $P < .001$). A noter que 88 % des chiens malades (68/77) présentaient des IgG anti- *L. infantum*, alors que ces IgG ont été détectés chez 8,7% (13/150) des chiens sains. Il en était de même vrai pour la relation entre l'infection par *H. canis* et le statut clinique du chien (valeur $P = 0,01$) et 53,2% (41/77) des chiens malades étaient infectés par *H. canis* versus 34,7% (52/150) d'infection chez les chiens sains. Cependant, cette différence semble être

influencée par l'association avec les autres infections, notamment l'infection par *L. infantum*, et lorsque nous avons considéré uniquement les chiens infectés par *H. canis* seulement, nous avons trouvé une prévalence de 5,2% (4/77) chez les chiens malades et 23,3% (35/150) chez les chiens sains (valeur P = 0,0001) en faveur des chiens asymptomatiques. L'infection par *Hepatozoon* spp. est donc beaucoup plus asymptomatique chez le chien.

Les signes cliniques révélés lors de l'examen physique, décrits ci-dessus, sont corrélés positivement avec les manifestations cliniques de la LCan tel qu'il a été décrit dans le guide LeishVet (Cardoso L et al, 2011). Ici, nous avons essayé de comprendre s'il existe une corrélation entre les manifestations cliniques et les titres d'anticorps anti- *L. infantum*. Nous avons trouvé une bonne corrélation positive (coefficient de corrélation de Spearman : 0,8 ; min : -1 ; max : 1, et valeur P = 0,0001). Ensuite, nous avons exploré l'hypothèse que les manifestations cliniques varient en fonction du nombre d'agents pathogènes infectant les chiens. Une corrélation positive a été trouvée entre ces deux dernières variables (coefficient de corrélation de Spearman: 0,6 et valeur P = 0,0001) (Fig 16).

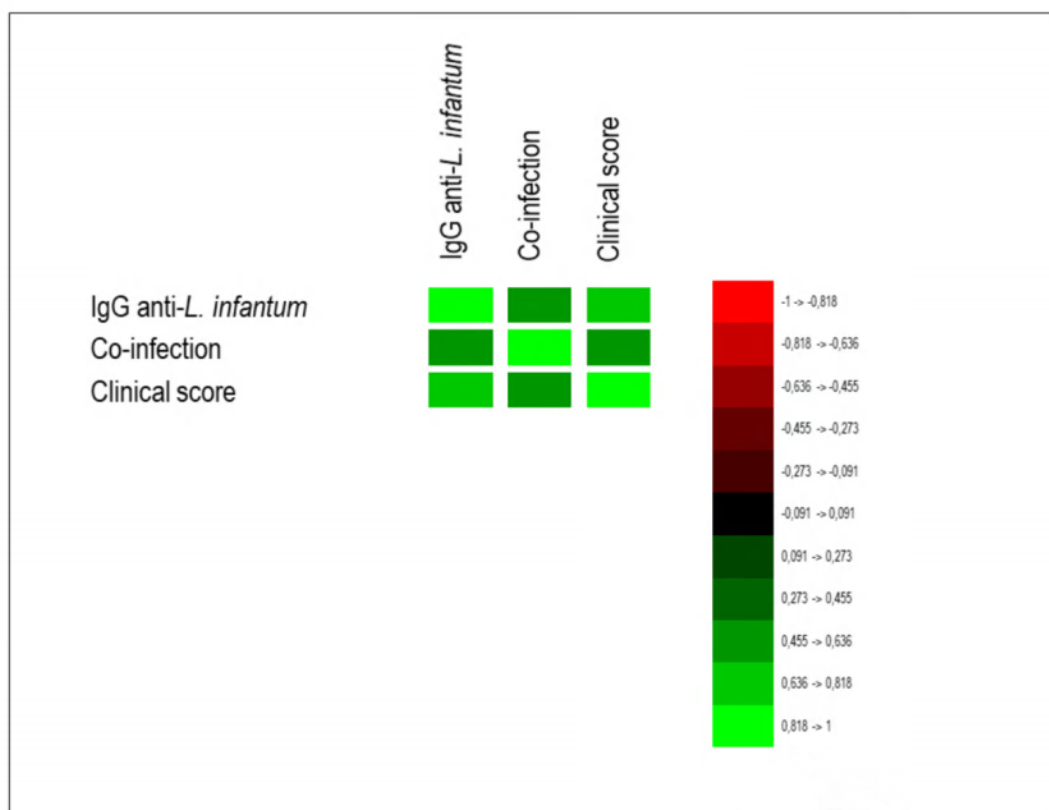
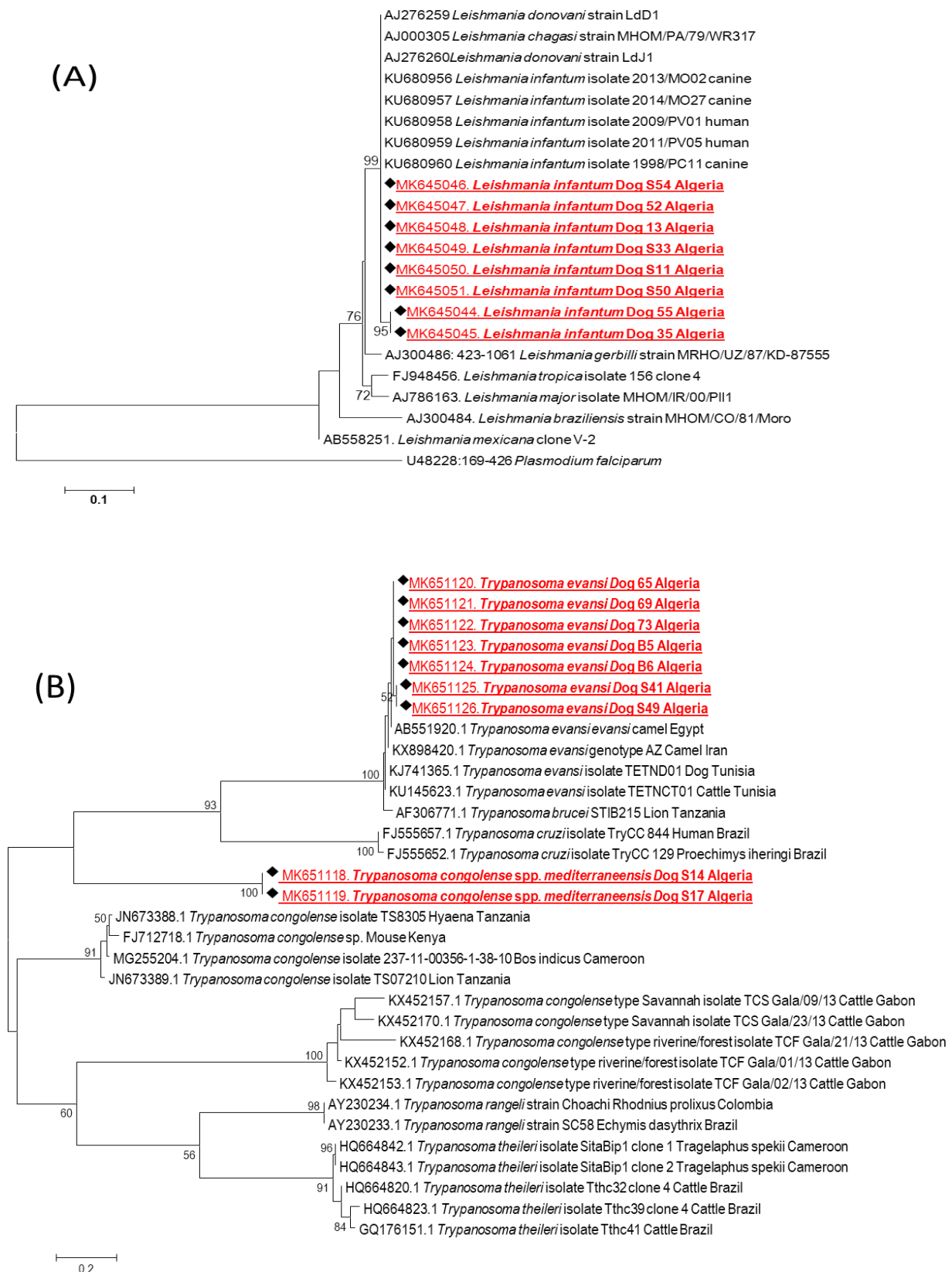


Fig 16. Matrice de corrélation montrant la relation entre les titres des IgG anti- *L. infantum*, le score clinique et la co-infection chez les chiens étudiés.

1.6. Analyses des séquences et phylogénies

La comparaison par BLASTn des dix séquences partielles obtenues pour le gène *ITSII* de *Leishmania* a révélé une homologie de 97-99% avec les séquences de *L. infantum* disponibles dans la base de données GenBank (MH605316; KU680960; KU680959 etc.) (Fig 17. A). Parmi les neuf séquences partielles obtenues pour le gène *ITS I* de *Trypanosoma*, sept d'entre elles ont une identité de 99% avec *T. evansi* (AB551920; FJ712716; AB551922 etc.) déposées dans la GenBank. Les séquences obtenues à partir de deux autres chiens ont montré, après BLASTn, 92-93% d'identité avec *T. congolense* (FJ712718; MG255204) (Fig 17. B). Ces deux chiens avaient un statut clinique modéré (SC2). En outre, le séquençage des gènes

d'ARNr 18S de *Piroplasmida* et d'*Hepatozoon* spp. a permis l'identification des nouveaux génotypes de *B. vogeli* et *H. canis* (Fig 17. C et D).



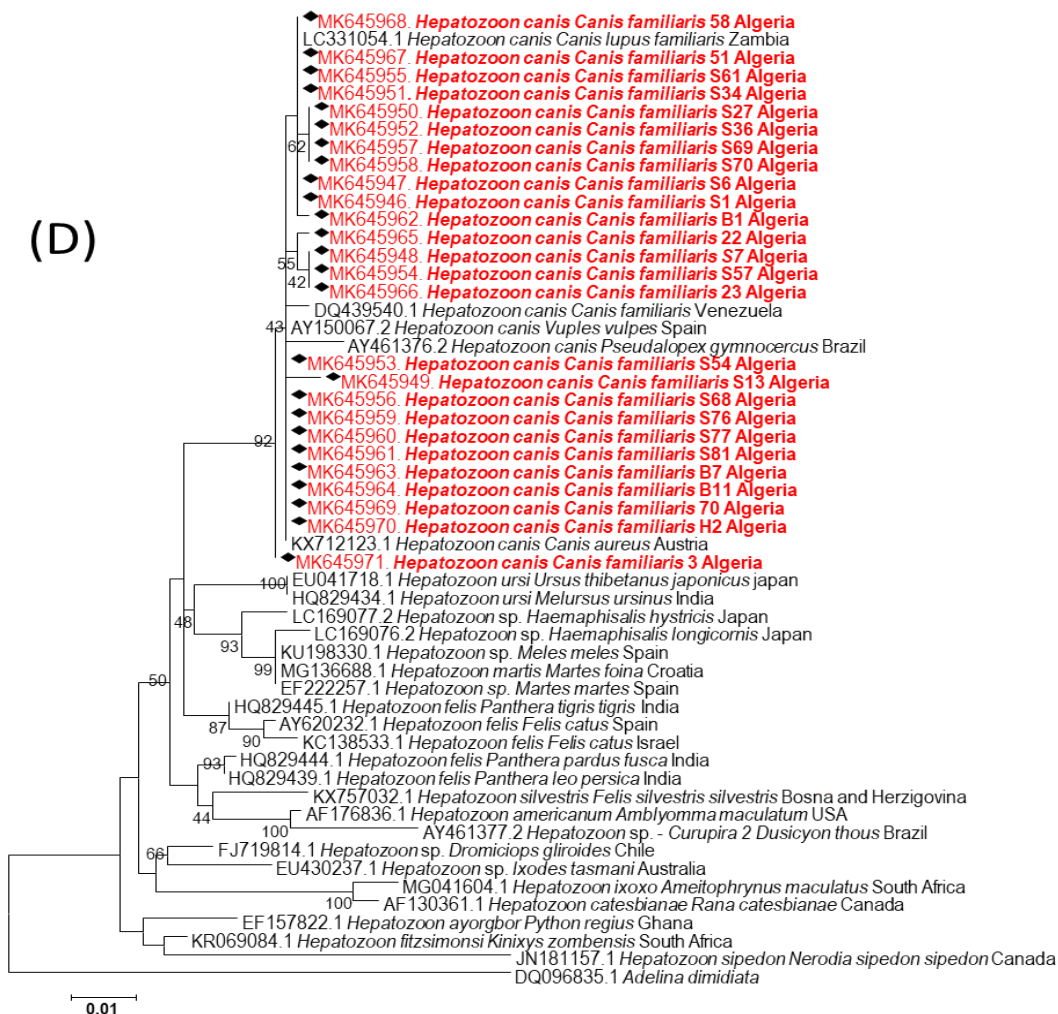


Fig 17. Analyse phylogénétique et moléculaire par la méthode du maximum de vraisemblance sur le modèle Tamura-Nei basé sur les séquences nucléotidiques partielles (360 pb) de l'ITS2 pour *Leishmania* spp. (A); (250 pb) de l'ITS1 pour *Trypanosoma* spp. (B); (900 pb) de l'ARNr 18S pour *Piroplasmida* (C) et (600 pb) de l'ARNr 18S pour *Hepatozoon* spp. (D).

2. Résultats de l'essai thérapeutique

2.1. Inclusion des chiens et suivi

Aucune différence significative n'a été trouvée pour l'âge, le sexe, la race (pure ou mixte), le statut clinique des chiens, la parasitémie moyenne et les titres d'anticorps anti-*Leishmania* entre les deux groupes de traitement au jour de l'inclusion J+0 (valeur $P > 0,05$) (tableau 8).

L'examen clinique a permis d'estimer et de suivre l'évolution clinique des chiens sélectionnés (tableau S3). Nous avons identifié, le jour de l'inclusion, des signes généraux chez 92,85% (39/42), cutanés chez 83,33% (35/42), viscéraux chez 38,1% (16/42), ophtalmiques chez 23,8% (10/42), et musculo-squelettiques chez 4,76% (2/42). Un chien (2,3%) a présenté une érosion buccale, un autre une épistaxis et deux chiens (4,76%) des troubles neurologiques.

Une analyse statistique a été réalisée sur l'ensemble de chiens présents à chaque point de temps. Sur l'ensemble des 42 chiens inclus à J+0, un chien du groupe 2 a été perdu de vue avant le point J+30. Au cours des 6 mois du suivi, quatre chiens du groupe 1 ont été perdus de vue deux mois après le début du traitement, dont deux en raison de l'absence de retour des propriétaires pour les visites finales à J+90 et J+180. Les deux autres étaient à cause d'une mortalité non liée à la LCan. En outre, six chiens sont morts entre J+60 après le début du traitement et avant la visite du J+90 avec une aggravation des signes cliniques de la LCan. Quatre d'entre eux faisaient partie du groupe 1 et les deux autres du groupe 2 (Fig 14).

2.2. Evolution clinique des chiens suivis

Par rapport au SC initial, une amélioration des SC totaux dans les deux groupes de traitement a été observée tout au long de l'étude. En attribuant le SC le plus élevé (SC= 22) aux chiens morts de la LCan, les SC moyens ont diminué au fil du temps, passant de $7,16 \pm 3,47$ à J+0 à $4,24 \pm 4,37$ à la visite J+30, puis ont augmenté à nouveau légèrement à J+90 ($5,75 \pm 8,25$), et ont ensuite diminué en dessous du niveau de J+0 et sont restés constants ($5,60 \pm 8,35$) jusqu'à J+180. La même cinétique des SC a été observée dans les deux groupes, séparément (Fig 18).

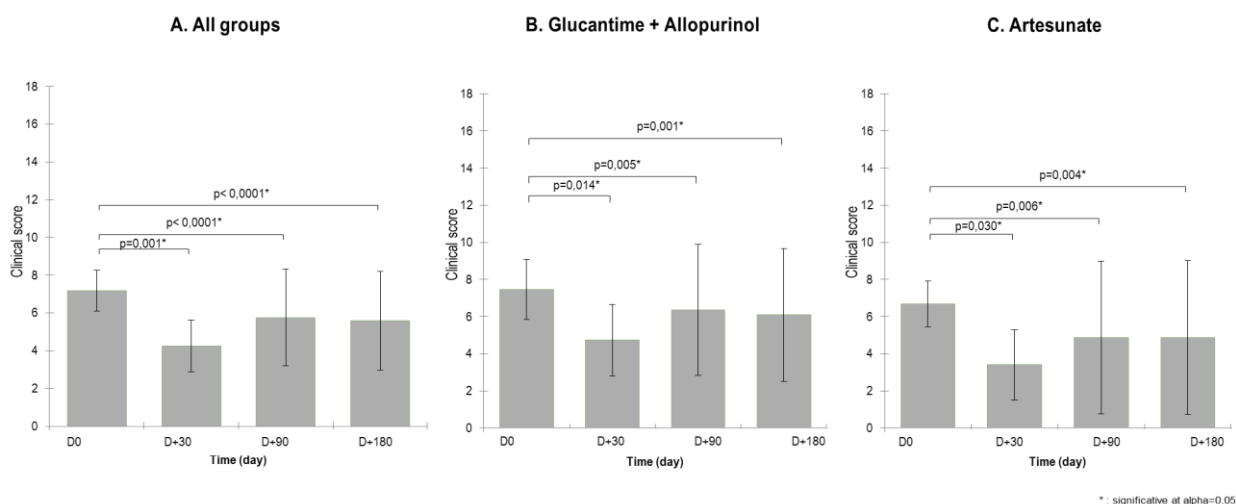


Fig 18. Évolution dans le temps du SC total (test de Kruskal-Wallis). Les SC (moyenne \pm DS) des chiens ($n = 42$) ont été évalués par les vétérinaires lors des visites programmées à J+0, J+30, J+90 et J+180. **A.** Tous les groupes traités. **B.** Groupe traité par Glucantime + Allopurinol. **C.** Groupe traité par l'artésunate.

En comparant les SC des deux groupes entre le J+0 et le J+30, le pourcentage moyen de réduction des SC était de $43,3 \pm 47,8\%$. À chaque point de temps, J+30, J+90 et J+180, une différence statistiquement significative ($p < 0,0001$) du pourcentage moyen de réduction des SC a été observée entre les deux groupes. Une amélioration plus importante a été constatée dans le groupe 2 par rapport au groupe 1 (Fig 19).

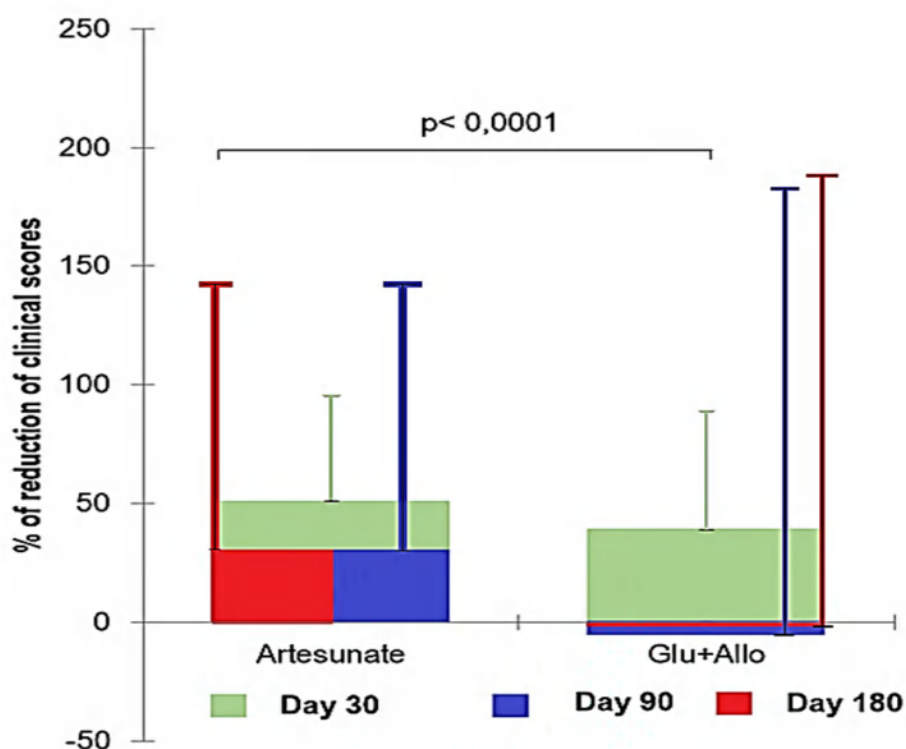


Fig 19. Comparaison du pourcentage moyen de réduction des SC entre les deux groupes de traitement (test de Mann-Whitney) : **Vert.** Jour 30 après traitement; **Bleu.** Jour 90 après le traitement; **Rouge.** Jour 180 après le traitement. La mortalité a été prise en compte (SC de la mortalité = 22). Le pourcentage moyen de réduction des SC est plus élevé dans le groupe traité par Artesunate par rapport au groupe traité par l'association Glucantime/Allopurinol tout au long du suivi.

Au niveau de la réponse individuelle aux traitements, environ 26,66% (4/15) des chiens du groupe 2 ont complètement récupéré (SC= 0) contre 18,18% (4/22) dans le groupe 1, tandis qu'environ 50% des chiens ont montré une amélioration partielle à 6 mois de suivi dans les deux groupes avec 54,54% (12/22) et 46,66% (7/15) dans les groupes 1 et 2, respectivement. À J+180, les taux d'aggravation clinique étaient similaires dans les deux groupes avec 27,27% (6/22), dont 18,18% (4/22) de mortalité, dans le groupe 1, contre 26,66% (4/15), dont 13,33% (2/15) de mortalité, dans le groupe 2. Les détails sur les changements cliniques au fil du temps pour les chiens suivis sont décrits dans [le tableau 11](#).

Tableau 11. Evolution clinique individuelle des chiens au cours du temps de suivi.

Groupes	Visites	Amélioration complète (%)	Amélioration partielle (%)	Aucun changement (%)	Aggravation (%)
Chiens traités par l'Artésunate (groupe 2)	D+30 (n=15)	-	12 (80)	-	3 (20)
	D+90 (n=15)	3 (20)	8 (53.33)	1 (6.66)	3 (20)
	D+180 (n=15)	4 (26.66)	7 (46.66)	-	4 (26.66)
Chiens traités par le Glucantime/allopurinol (groupe 1)	D+30 (n=26)	2 (7.69)	17 (65.38)	1 (3.84)	6 (23.07)
	D+90 (n=23)	3 (13.04)	13 (56.52)	1 (4.34)	6 (26.08)
	D+180 (n=22)	4 (18.18)	12 (54.54)	-	6 (27.27)
Total dogs	D+30 (N=41)	2 (4.87)	29 (70.73)	1 (2.44)	9 (21.91)
	D+90 (N=38)	6 (15.79)	21 (55.26)	2 (5.26)	9 (23.68)
	D+180 (N=37)	8 (21.62)	19 (51.35)	-	10 (27.02)

La mortalité liée à la LCan a été prise en compte (SC= 22).

2.3. Effets secondaires liés aux traitements

Aucun effet secondaire majeur lié à ces traitements n'a été signalé chez les chiens. Les deux composés étudiés ont été bien tolérés par tous les chiens, à l'exception de deux chiens qui ont présenté de légères douleurs locales et un prurit après 15 jours de traitement par le Glucantime/allopurinol.

2.4. Cinétique de la parasitémie durant l'essai thérapeutique

A J+0, 28,5% (12/42) des chiens suivis étaient positifs par la qPCR sur les échantillons de sang. Une clairance parasitaire a été observée au fil du temps après le traitement par l'artésunate et tous les chiens initialement positifs (5/5) se sont devenus négatifs pour *L. infantum*. En revanche, 6/7 chiens positifs par la qPCR traités par le Glucantime/allopurinol se sont révélés négatifs et 1/7 chien est resté positif. En outre, deux chiens traités par le Glucantime/allopurinol se sont tournés

positifs alors qu'ils étaient négatifs au début du traitement. L'évolution individuelle de la parasitémie au cours du suivi est présentée dans le [tableau 12](#).

Tableau 12. Variations individuelles du nombre de parasites par ml de sang et du pourcentage de réduction de la parasitémie au cours du suivi.

Identifiant du chien	Traitement	Parasitémie Nbr. Leish/mL de sang (% de réduction)				
		J+ 0	J+ 30	J+ 90	J+ 180	
13	Glucantime/ Allopurinol	1500	288,7 (80,75)	30,3 (97,98)	357 (76,2)	
5		0	0 (0,00)	176 (-100)*	177 (-100)*	
A11N12		0	46,6 (-100)*	N/A*	N/A*	
S26		2400	19,8 (99,18)	2 (99,92)	0 (100)	
S27		3800	0 (100)	0 (100)	0 (100)	
S33		21000	0 (100)	0 (100)	N/A	
S54		7,7	0 (100)	0 (100)	N/A	
C4P2G2		101	16,2 (83,96)	0 (100)	0 (100)	
C1G2P4		18	0 (100)	0 (100)	0 (100)	
10		Artésunate	6,8	0 (100)	0 (100)	0 (100)
S50			17,4	14 (19,54)	29 (-66,67)	0 (100)
A9N9			122	44 (63,93)	N/A	N/A
T11C2P1	233		1,7 (99,27)	0 (100)	0 (100)	
A8 N8	11		0,17 (98,45)	0 (100)	0 (100)	

Tous les autres chiens étaient négatifs en qPCR et sont restés négatifs pendant toute la durée du suivi. **N/A*** : Mortalité liée à la LCan. **N/A** : Perdu au cours du suivi.

2.5. Suivi sérologique des chiens traités

Initialement, tous les chiens étaient positifs à la fois au test rapide WITNESS et à l'IFAT, et aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre les deux groupes. Les titres moyens d'anticorps anti-*Leishmania* ont diminué au fil du temps (moyenne \pm DS, 444,05 \pm 467,50 à J+0, 181,25 \pm 234,71 à J+30, 120,69 \pm 298,36 à J+90 et 118,97 \pm 297,73 à J+180) après le traitement ([Fig 20](#)). Par rapport aux valeurs initiales, une diminution significative ($P < 0,012$, par l'IFAT) a été observée dans les deux groupes à J+30 (moyenne \pm DS, artésunate : 128,57 \pm 212,78; Glucantime/allopurinol : 209,61 \pm 244,96). Ces niveaux ont continué à diminuer

(moyenne \pm DS, artésunate : 37,50 \pm 60,77; Glucantime/allopurinol : 176,471 \pm 379,604) à J+ 180 (Fig 20).

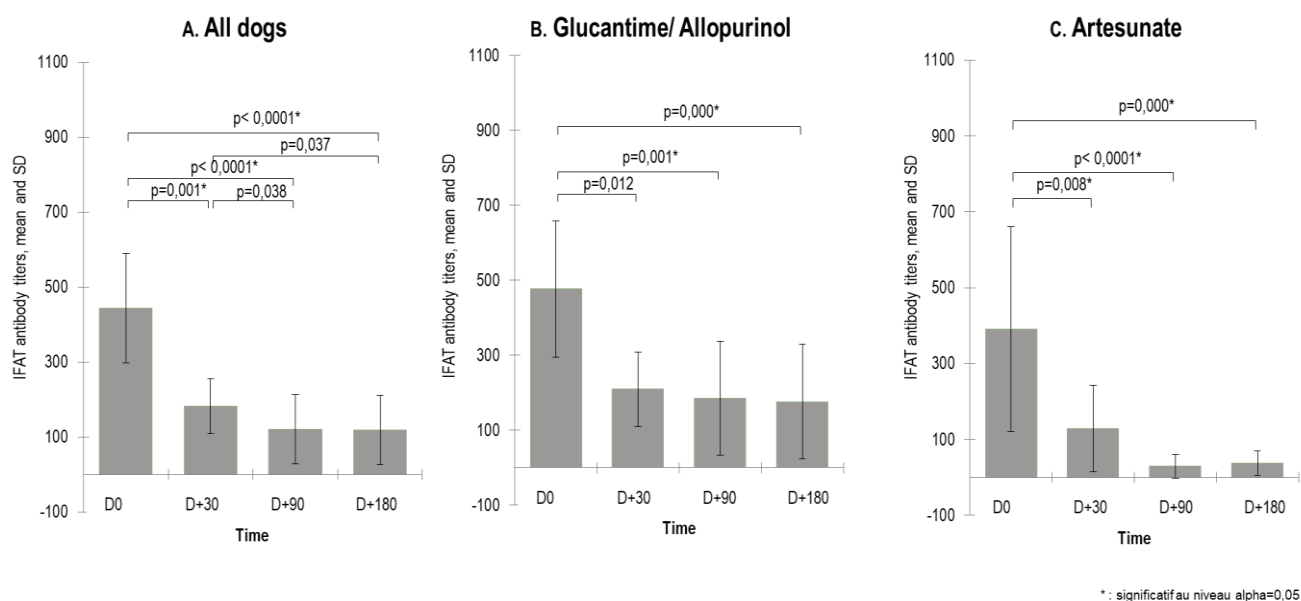


Fig 20. Suivi sérologique. Les titres d'anticorps (moyenne \pm DS) des chiens ($n = 42$) ont été quantifiés par l'IFAT dans les points de temps J+0, J+30, J+90 et J+180 (test de Kruskal-Wallis/bilatéral). **A.** Tous les chiens dans le suivi. **B.** Groupe traité par le Glucantime/allopurinol. **C.** Groupe traité par l'artésunate.

En comparant les deux groupe entre eux, le groupe artésunate a montré un pourcentage plus élevé de réduction des titres d'anticorps tout au long jusqu'à la fin du suivi ($P < 0,0001$) (Fig 21).

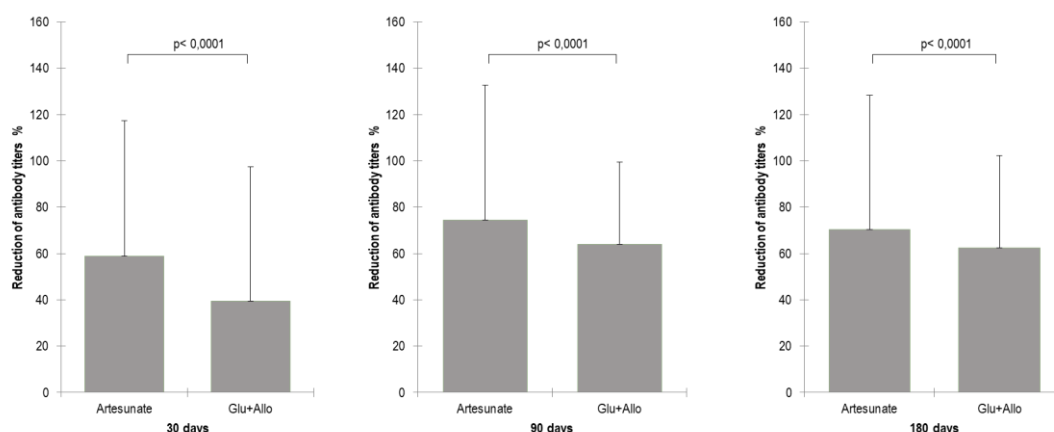


Fig 21. Comparaison du pourcentage moyen de réduction des titres d'anticorps obtenus par l'IFAT chez les chiens traités par l'Artésunate ou le Glucantime/allopurinol. Données rapportées en moyenne \pm DS, Artesunate versus Glucantime/allopurinol (test de Mann-Whitney) à 30, 90 et 180 jours après le traitement.

Au niveau individuel, 78,57% (11/14) des chiens traités par l'artésunate ont présenté une diminution des titres d'anticorps à J+30, et 50% (7/14) d'entre eux sont devenus absolument séronégatifs. En revanche, dans le groupe Glucantime/allopurinol, 57,7% (15/26) ont présenté une baisse des IgG anti-*L. infantum* à J+30, et seulement 15,38% (4/26) sont devenus séronégatifs. À la fin du suivi, 41,37% (12/29) des chiens sont devenus séronégatifs dont 29,41% (5/17) dans le groupe 1 contre 58,33% (7/12) dans le groupe 2 (valeur P= 0,227, test Z/bilatéral).

IV. DISCUSSION

1. Etude épidémiologique

Les chiens sont des réservoirs compétents voir des hôtes pour plusieurs agents infectieux, dont certains sont zoonotiques. La relation croissante des chiens avec l'homme dans les pays en développement en tant qu'animaux de compagnie pose de nouveaux problèmes de santé publique (Otranto D et al, 2009). Cela a considérablement augmenté le nombre d'études sur les maladies canines à transmission vectorielle (CVBD) durant les dernières décennies. En revanche, les données sur les CVBD dans de nombreux pays africains, leur fréquence et leur diversité, sont très insuffisantes. Elles sont fortuitement absentes pour certaines maladies canines dues aux protozoaires à transmission vectorielle en Algérie et dans toute l'Afrique du Nord. Cette étude épidémiologique rapporte pour la première fois l'infection par *Trypanosoma* spp., *B. vogeli* et *H. canis* chez le chien en Kabylie (Algérie). En outre, elle actualise la situation épidémiologique dans ce foyer historique (la Kabylie) de LV en Algérie, où une forte prévalence de *L. infantum* a été détectée chez les chiens. De plus, une corrélation positive a été observée entre les co-infections avec ces pathogènes à transmission vectorielle, la LCan et le nombre de signes cliniques identifiés chez les chiens. Au total, 62% des chiens avaient au moins une infection et 26 % étaient co-infectés.

Nous avons détecté les anticorps anti- *L. infantum* chez environ un tiers (35,7% et 31,7%) des chiens en utilisant l'IFAT et le test rapide WITNESS® *Leishmania*, respectivement. La sensibilité (88%) et la spécificité (99%) du test rapide sont bonnes par rapport au test IFAT, considérée comme le test sérologique de référence. Dans une étude comparant différents tests sérologiques, la sensibilité et la spécificité

du test WITNESS® *Leishmania* étaient respectivement de 58% et 100% (Rodríguez-Cortés A et al, 2013). La prévalence par l'IFAT était comprise entre 27 et 47% dans une étude incluant des chiens de six wilayas du nord de l'Algérie (Adel et al, 2015). Plus récemment, une étude menée sur 603 chiens en Kabylie a rapporté une séroprévalence globale de 10% avec une relation significative entre la densité des phlébotomes, notamment *Ph. perniciosus* et *Ph. perfiliewi*, la séroprévalence de la LCan ainsi que les cas de leishmaniose humaine rapportés dans la région (Mouloua A et al, 2017). Le séquençage du gène *ITS II* a permis l'identification de *L. infantum* chez tous les chiens positifs à la PCR. Nos résultats suggèrent la persistance d'un cycle de transmission de *L. infantum* avec de possibles épidémies de la LCan et/ou de LV humaine dans ce foyer. Par conséquent, un programme national de contrôle de la leishmaniose devrait être mis en place.

Les trypanosomes ont été détectés chez 6,6% des chiens de la Kabylie. Aucune donnée n'est disponible sur la présence de ces protozoaires chez les chiens algériens. L'analyse moléculaire après séquençage de l'*ITS I* a montré : (i) une grande diversité génétique de deux séquences obtenues avec les espèces de trypanosomes étroitement apparentées chez deux chiens malades présentant des signes cliniques généraux tels que l'amaigrissement, la léthargie et l'hyperthermie. Ces séquences étaient étroitement identiques et présentaient une identité de 92-93% avec *T. congolense*. Nous avons proposé une nouvelle entité génétique comme sous-espèce : *T. congolense* spp. *mediterraneensis*. *T. congolense* reste l'un des plus importants agents de la trypanosomose canine (Ogbu KI et al, 2017), affectant particulièrement le bétail en Afrique sub-saharienne (Morrison LJ et al, 2016). Un programme de lutte international se déroule depuis plusieurs années dans les pays endémiques afin de limiter les dégâts des trypanosomioses animales (Boulangé A et

al, 2022). La maladie est relativement courante au Nigéria en raison de la forte prévalence de *Glossina* spp., qui est le vecteur principal responsable de la transmission des trypanosomiasés africaines (Isaac et al, 2016). Récemment, 5,3 % (5/95) des chiens d'Abidjan ont été trouvés infectés par *T. congolense* (Medkour H et al, 2020b). Dans notre étude, sept chiens ont été infectés par *T. evansi*, l'agent du surra et un trypanosome salivaire originaire d'Afrique. Il a été signalé en Afrique du Nord, en Europe du Sud, en Amérique latine et en Asie (Pommier de Santi et al, 2018). Il est communément pathogène pour les dromadaires, les chevaux, les bovins et occasionnellement pour les humains (Joshi PP et al, 2005; Elhaig MM et al, 2013) et les chiens (Desquesnes M et al, 2013). *T. evansi* a été signalé à Sousse (Tunisie centrale) chez un chien présentant des signes cliniques de trypanosomiase (Rjeibi MR et al, 2015) et récemment chez des bovins du nord de la Tunisie (Sallemi S et al, 2018). Deux autres cas de trypanosomose canine ont été signalés : l'un en Allemagne (Defontis M et al, 2012) et l'autre en Afghanistan (Aref M et al, 2013). Des prévalences importantes à *T. evansi* ont été détectées chez les dromadaires dans le sud-est de l'Algérie (Bennoune O et al, 2013). De l'autre côté de la Méditerranée, une infection à *T. evansi* a été détectée dans la province d'Alicante, en Espagne, dans un élevage camelin et d'équidés après l'introduction de ces animaux en provenance des îles Canaries (Tamarit A et al, 2010). Le mode d'infection de ces chiens est très obscur et des recherches supplémentaires seront nécessaires pour résoudre ce dilemme. La migration des animaux infectés, comme les dromadaires, les ovins et les bovins, du sud vers le nord Algérien peut être l'origine de l'infection chez les chiens. Le vecteur compétent reconnu pour les trypanosomes africains (*Glossina* spp.) est absent en Algérie. Ce vecteur reste très discutable et d'autres diptères, comme les *Tabanidae*, peuvent être impliqués dans cette transmission (Keita ML et

al, 2020), ce qui pourrait aussi expliquer l'apparition de nouveaux génotypes (*T. congolense* spp. *mediterraneensis*) adaptés à ces vecteurs.

L'infection par *B. vogeli* a été trouvée chez 13,2% des chiens dépistés. *B. canis* est signalé en Algérie sans détermination concluante de l'espèce dans les anciennes sous-espèces (Matallah F et al, 2012). En Tunisie, *B. vogeli* a été détecté chez 6,7% (12/180) des chiens et chez 0,6% (1/160) de leurs tiques *Rhipicephalus sanguineus* (M'ghirbi Y et Bouattour A, 2008). Des enquêtes menées en Côte d'Ivoire (Medkour H et al, 2020b), au Nigeria (Kamani J et al, 2013) et en Angola (Cardoso L et al, 2016) ont rapporté une prévalence de 1,6% (2/123), 0,6% (1/181) et 5,8% (6/103) de chiens, respectivement. Cette espèce a une distribution mondiale (Dantas-Torres F, 2008b) et a été identifiée en Afrique, en Asie, en Turquie, en Australie, en Amérique du Nord et du Sud et au Costa Rica. En Europe, *B. vogeli* a été trouvé en Slovénie, en Albanie, en France, en Espagne, au Portugal et en Croatie avec une prévalence allant de 1% à 16,3% (Rojas A et al, 2014; Bilić P et al, 2018). La présence de tiques brunes, le vecteur principal de *B. vogeli* (Otranto D, 2018), sur les chiens dépistés peut expliquer nos résultats.

Une forte prévalence de *H. canis* a été observée dans notre étude (41%). Il s'agit du premier rapport en Afrique du Nord de ce protozoaire pathogène du chien. La même prévalence a été détectée chez des chiens au Nigeria et 21% de leurs tiques étaient infectées (Kamani J et al, 2013). De plus, 13% des chiens zambiens et 17,5% en Angola ont été trouvés infectés (Williams BM et al, 2014; Cardoso L et al, 2016). *H. canis* est distribué en Europe, en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud (Azzag N et Ghalmi F, 2016). Comme dans le cas de l'infection par *B. vogeli*, l'infection par *H. canis* peut s'expliquer par la large distribution de ses principaux vecteurs, les tiques, en Kabylie.

Dans les wilayas étudiées, la prévalence des infections varie considérablement pour les quatre agents pathogènes. Les chiens de Tizi-Ouzou ont été plus infectés (59,4%) par *L. infantum*, certainement parce que la région est endémique depuis longtemps. L'infection par *Trypanosoma* spp. est plus élevée à Sétif (12,2%) par rapport aux autres wilayas (0 et 3%). Cela peut être dû à la densité du bétail et au commerce du bétail dans cette région, qui peut être la source de l'infection des chiens. Les infections par *B. vogeli* et *H. canis* sont moins fréquentes chez les chiens de Tizi-Ouzou. Le taux d'infestation par les tiques est plus faible dans cette région. Les chiots de moins de deux ans ont un taux d'infection par *Babesia* significativement plus élevé que les autres groupes d'âge. Ces résultats suivent les études précédentes qui ont montré que les jeunes chiens sont plus sensibles à la babésiose en raison de leur système immunitaire sous-développé (Taylor MA et al, 2007). Aucune relation n'a été trouvée entre le sexe du chien et l'occurrence des infections, sauf pour *B. vogeli* pour laquelle les mâles sont plus infectés. De même, les chiens de garde présentaient la plus forte prévalence de la LCan, suivis des chiens de chasse, puis les chiens bergers. Comme ils sont souvent attachés et/ou vivent à l'extérieur des maisons, ils seront plus exposés aux piqûres de phlébotomes.

En ce qui concerne l'état clinique du chien et sa relation avec les infections, les chiens malades étaient plus infectés par *L. infantum* et *H. canis* par rapport aux chiens asymptomatiques. Les signes cliniques identifiés à l'examen clinique rejoignent les signes de la LCan décrits dans le guide Leishvet (Cardoso L et al, 2011). Les chiens malades infectés par *Hepatozoon* avaient généralement une ou plusieurs autres infections et tous les chiens atteints de mono-infection par *H. canis*, sauf quatre, sont asymptomatiques (35/39). En conclusion de ça, *H. canis* est plutôt responsable d'infections asymptomatiques chez le chien.

Dans cette étude, les co-infections ont été diagnostiquées chez 26% des chiens étudiés. La co-infection avec deux protozoaires était plus fréquente qu'avec trois protozoaires et un seul chien était infecté par les quatre agents pathogènes. Des co-infections par plus d'un agent pathogène à transmission vectorielle ont été observées dans de nombreuses études sur les CVBD (Rojas A et al, 2014; Medkour et al, 2020b). De plus, une corrélation positive a été trouvée entre le SC estimé en fonction du nombre de signes cliniques et les IgG anti-*Leishmania* détectés par l'IFAT. Ainsi, un chien présentant un stade avancé de la maladie a, dans cette étude, un taux élevé d'anticorps. De plus, une relation positive a été trouvée entre le SC et le nombre d'agents pathogènes infectant les chiens. Par conséquent, les co-infections concourent à compliquer les manifestations cliniques. Dans une étude incluant des chiens infectés par *Leishmania*, la présence d'autres pathogènes à transmission vectorielle était associée à des anomalies clinicopathologiques plus marquées ainsi qu'à une sévérité de la LCan (Baxarias A et al, 2018).

2. Essai thérapeutique

Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapie efficace et sûre contre la LCan. De nouveaux médicaments, systèmes de surveillance et stratégies de traitement et de prévention sont nécessaires pour limiter cette zoonose (Baneth G et Shaw SE, 2002). Ceci est important non seulement pour les chiens mais aussi dans le cadre de la lutte contre la leishmaniose humaine (par sanction du réservoir). Ici, nous avons comparé l'efficacité de l'artésunate comme chimiothérapie alternative et le Glucantime/ allopurinol, qui est actuellement le traitement du choix contre la LCan (Manna L et al, 2015). Les réponses au traitement ont été déterminées à l'aide d'un SC complet basé sur les principaux signes cliniques associés à la LCan, de la charge parasitaire estimée par la qPCR et le suivi sérologique par le titrage des anticorps anti-L.

infantum par l'IFAT quantitative (Cardoso L et al, 2011; Roura X et al, 2013; Segarra S et al, 2017). Il s'agit du premier rapport sur l'efficacité de l'artésunate (un dérivé de l'artémisinine) dans le traitement de la LCan chez des chiens naturellement infectés par *L. infantum* et dans des conditions de terrain.

Les deux traitements ont permis une amélioration clinique, une réduction de la charge parasitaire et des titres d'anticorps anti-*Leishmania*, mais une plus grande amélioration des signes cliniques a été observée avec l'artésunate. L'artémisinine et ses dérivés ont prouvé leur potentiel thérapeutique contre le paludisme, ils ont également démontré leur efficacité contre la leishmaniose dans des modèles expérimentaux (Yang DM et al, 1993 ; Sen R et al, 2010; Gugliandolo E et al, 2020; Intakhan N et al, 2022). L'artémisinine était active contre six souches de *Leishmania* responsables de diverses formes de leishmaniose (Sen R et al, 2010). Dans cette étude, l'artésunate a été bien toléré sans aucun effet indésirable. Dans une étude, l'artésunate a été utilisé chez des chiens comme traitement anticancéreux ; les chiens n'ont présenté aucun effet indésirable (Rutteman GR et al, 2013). Deux chiens du groupe control (traité par le Glucantime/ allopurinol) ont présenté une douleur locale au site d'injection. Le traitement dans le groupe control a été administré par injection en sous cutanée du Glucantime + administration orale de l'allopurinol, tandis que l'artésunate a été administré par voie orale. Les effets secondaires rapportés suite au traitement par l'antimoniote de méglumine/allopurinol sont principalement: douleur locale, pancréatite, panniculite et néphrotoxicité pour l'antimoniote de méglumine; et xanthinurie, urolithiase et minéralisation rénale pour l'allopurinol (Mateo M et al, 2009; Miró G et al, 2017), où il a été observé que 16% des chiens ont développé des effets indésirables après traitement par le Glucantime.

Une amélioration rapide de l'état général a été observée quelques jours après le traitement par l'artésunate. Lors de la visite à J+30, 80% des chiens du groupe test contre 73% dans le groupe control présentaient une amélioration clinique. Une amélioration clinique est constatée rapidement, chez les chiens, 30 jours après le traitement associant l'antimoniote de méglumine et l'allopurinol dans plusieurs études (Alvar J et al, 1994; Denerolle P et al, 1999; Oliva G et al, 2009; Torres M et al, 2011; Manna L et al, 2015). Les traitements ont été couronnés de succès dans près de $\frac{3}{4}$ des cas et ont échoué dans près de $\frac{1}{4}$ des cas après six mois de suivi dans les deux groupes de notre étude. Une aggravation a été observée chez 6 chiens *versus* 4 chiens (y compris la mort de 4 chiens *versus* 2 chiens) dans le groupe control *versus* le groupe test. Dans une étude précédente, 10 mois après la fin du traitement combinant la méglumine et l'allopurinol chez 6 chiens, 4 chiens ne présentaient aucun signe clinique, 2 avaient rechutés et les formes amastigotes de *Leishmania* étaient présentes dans la rate de 5 chiens (Manna L et al, 2015). De plus, nous estimons que le traitement par le Glucantime/allopurinol est au moins 10 fois plus cher que l'artésunate. Aussi, l'artésunate a montré une réduction des SC plus importante par rapport à le Glucantime/allopurinol. En comparaison au traitement actuel de la LCan qui est très lourd et compliqué à appliquer, le traitement par l'artésunate pourrait être une bonne alternative chimiothérapeutique, notamment parce qu'il est peu couteux et facile à administrer (*per os*) pour une courte période (6 jours de traitement dans la présente étude) (Miró G et al, 2017). De plus, son efficacité peut être améliorée en ajustant la dose et/ou la durée du traitement. D'autres essais cliniques peuvent être intéressants pour déterminer le meilleur schéma thérapeutique.

La technique qPCR sur le sang avait une valeur diagnostique moindre que la sérologie quantitative, comme il a été montré dans l'étude épidémiologique ci-dessus, et seuls 12/42 de chiens séropositifs malades se sont révélés positifs à la qPCR. Ce résultat est en accord avec d'autres auteurs (Oliva G et al, 2009; Rodríguez-cortés A et al, 2010) le fait qu'il est bien connu que la parasitémie sanguine peut être intermittente (Manna L et al, 2008; Paltrinieri S et al, 2016; Travi BL et al, 2018), et la charge parasitaire sanguine de *Leishmania* est beaucoup plus faible que la charge trouvée dans d'autres tissus comme la moelle osseuse chez les chiens atteints de la leishmaniose clinique (Solano-gallego L et al, 2007; Maia C et al, 2009; Rodríguez-cortés A et al, 2010).

La parasitémie a diminué de façon continue après le traitement par l'artésunate jusqu'à sa disparition totale (100% de clairance des parasites à 180 jours après le traitement), ce qui suggère une activité leishmanicide pour ce composé. L'activité leishmanicide des ARTs contre *Leishmania* spp., agents responsables des leishmanioses du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde (y compris *L. infantum*), a été démontrée *in vitro* (Cortes S et al, 2015; Intakhan N et al, 2022) et dans des modèles murins (Sen R et al, 2010; Gugliandolo E et al, 2020). Dans cette étude, le Glucantime/allopurinol a fortement réduit la charge parasitaire à la fin du traitement (4/7 chiens initialement positifs sont devenus négatifs en qPCR à J+ 30). Une diminution significative de la charge parasitaire sanguine pendant les 30 premiers jours en utilisant cette thérapie combinée a été rapportée (Solano-Gallego L et al, 2010; Martínez V et al, 2011). De plus, tous les chiens négatifs à la qPCR sont restés négatifs après le traitement par l'artésunate; en revanche, deux chiens du groupe control sont devenus positifs à la qPCR avec une aggravation des signes cliniques à J+90 de suivi. Des échecs de la thérapie combinée (Glucantime/allopurinol) ont été

rapportés, principalement en raison de la résistance de *Leishmania* aux médicaments, mais le délai de rechute chez les chiens traités n'a pas été documenté (Miró G et al, 2017). Dans notre cas, la rechute a commencé dès le deuxième mois après le traitement.

Nous avons constaté, 30 jours après le début du traitement, une baisse importante et significative (2,28 fois *versus* 3,04 fois, pour le groupe control *versus* le groupe test) des IgG anti- *L. infantum* correspondant à une amélioration clinique, comme indiqué dans des études précédentes (Oliva BYG et al, 1998; Solano-Gallego L et al, 2010). Les titres d'anticorps ont continué à diminuer davantage dans le groupe test, où 58 % des cas sont devenus séronégatifs 6 mois après le traitement (Fig 19). Cela suggère une régression de la stimulation antigénique (Baneth G et Shaw SE, 2002; Altet L et al, 2007). Une association positive a été trouvée entre les niveaux d'anticorps et la dissémination parasitaire dans différents tissus (Martínez-Moreno A et al, 1995; Solano-gallego L et al, 2006) par conséquent, on pourrait émettre l'hypothèse que la diminution des niveaux d'anticorps implique l'absence de dissémination parasitaire. En comparaison à d'autres études, le taux d'anticorps a continué de diminuer progressivement mais lentement durant la période du traitement (Solano-gallego L et al, 2001; Pasa S et al, 2005; Torres M et al, 2011). Il a été démontré que seule une minorité de chiens devenait séronégative au cours de la première année du traitement, par référence aux niveaux de base, alors que presque tous les chiens atteignaient des niveaux d'anticorps beaucoup plus faibles (Vercammen F et al, 1996; Rodríguez A et al, 2006). Nos résultats montrent que l'artésunate induit une réduction plus rapide et plus importante des IgG anti-*Leishmania* par rapport à la thérapie combinée Glucantime/allopurinol. De plus, par rapport à J+0, l'aggravation clinique et la mortalité, dans tous les cas, ont été associées à des niveaux

d'anticorps croissants ou au moins stables sans aucune amélioration sérologique. Par conséquent, nous rejoignons les études disant que la surveillance sérologique est très utile pour la détection des rechutes cliniques et le pronostic après le traitement de la LCan, car ils sont associés à l'augmentation des titres d'anticorps (Cardoso L et al, 2009; Cardoso L et al, 2011; Torres M et al, 2011; Solano-Gallego L et al, 2016).

Cette étude est innovante car elle utilise un médicament antiprotozoaire qui n'a jamais été utilisé contre la LCan. Cependant, elle présente certaines limites qui nous ont été imposées par les difficultés rencontrées sur le terrain :

- i) Le nombre de chiens suivis reste insuffisant (42 chiens au début et seulement 31 à la fin du suivi). Il nous n'était pas possible d'aller plus que ça et n'était pas évident de trouver des propriétaires sérieux et collaborateurs.
- ii) Nous avons effectué une randomisation simple déséquilibrée, il serait préférable de faire une randomisation équilibrée avec un nombre égal de chiens dans chaque groupe. Par contre, cette dernière était beaucoup plus équilibrée à la fin du suivi.
- iii) Une autre limite de cette étude est l'utilisation du sang pour déterminer la charge parasitaire car il est connu que *L. infantum* est un parasite des cellules du SPM et qu'il a un tropisme pour la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et d'autres organes internes comme la rate et les reins. Le nombre de parasites dans le sang est faible et il n'était pas possible d'effectuer un autre type de prélèvement, car la plupart des propriétaires des chiens l'ont refusé. Pour cette raison, nous n'avons pas beaucoup de cas positifs par la qPCR sur le sang.

- iv) Autre point, les analyses biochimiques, notamment le dosage de la créatinine et de l'urée, n'ont pas été réalisées.
- v) Enfin, la co-infection peut influencer l'évolution clinique de LCan. Nous avons examiné les co-infections avec d'autres hémoprotozoaires pathogènes aux chiens, comme *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp.. Les chiens dans cet essai n'étaient pas co-infectés au moment de l'inclusion. Malheureusement, nous n'avons pas examiné l'infection par *Ehrlichia canis*, qui peut également influencer l'évolution clinique de la LCan.

Nous aimerions que ces limites soient prises en compte dans les études futures afin de mieux confirmer les résultats sur l'efficacité de l'artésunate dans le traitement de la LCan.

Un autre point très important, étant donné la place des ARTs en médecine humaine comme médicaments de choix pour le traitement du paludisme, ils ont participé fortement à la diminution de la mortalité due à cette maladie dans le monde, et même si le chien n'est pas du tout impliqué dans le cycle de transmission du paludisme, nous recommandons une évaluation de risque du développement de la résistance aux ARTs liée à l'utilisation de l'artésunate dans le traitement de la LCan dans les pays endémiques du paludisme. Le cas échéant, c'est –à-dire risque de la résistance aux ARTs, nous recommandons l'usage de l'artésunate pour le traitement de la LCan dans les pays et les zones indemnes du paludisme comme l'Algérie voir tout le bassin méditerranéen.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre étude épidémiologique a montré que les chiens de la Kabylie (Algérie) sont des hôtes fréquents des protozoaires à transmission vectorielle. L'infection par *Leishmania* et les co-infections avec plus d'un agent pathogène sont associées à davantage de manifestations cliniques. Des preuves moléculaires de *Trypanosoma* spp., *B. vogeli* et *H. canis* ainsi que la prévalence élevée de *L. infantum* ont été portées à l'attention des autorités de la santé publique et animale et aux propriétaires de chiens. Des plans rigoureux de surveillance et de contrôle de ces maladies canines doivent être mis en place dans la région afin de contenir leur propagation.

Les résultats de l'essai clinique indiquent que l'artésunate ainsi que la combinaison antimoniate de méglumine/allopurinol sont des traitements efficaces contre la leishmaniose viscérale canine. L'artésunate était plus sûr et plus efficace pour contrôler et réduire les signes cliniques de la leishmaniose, la charge parasitaire et les titres d'anticorps en comparaison au traitement associant l'antimoniate de méglumine et allopurinol. En outre, il est moins cher et plus facile à administrer (par voie orale) avec une courte durée de traitement (6 jours) (tableau 13).

Tableau 13. Comparaison entre les deux traitements testés contre la LCan.

Paramètres	Artésunate	Control (Glucantime+ Allopurinol)
Amélioration clinique	73.33%	72.72%
Aggravation clinique (mortalité)	26.66 (13.33)%	27.27 (18.18)%
Intolérance	Non	2 chiens (7.7%) avaient des douleurs locales et prurit 15 jours post traitement
Chiens devenus séronégatifs après 6 mois	58%	29,4%
Parasitémie	Tous les positifs en PCR sont devenus négatifs	14.3% restaient positifs + 2 nouveaux cas
Application	Court : 6 jours en <i>Per os</i>	Long: 30 jours minimum SC (Glucantime) + <i>Per os</i> (Allopurinol)
Prix (1 animal de 20 kg)	2800 Dinar algérien	>28000 Dinar algérien

Maintenant, il est plus judicieux de collecter plus de données sur le traitement avec l'artésunate par d'autres essais, avec un plus grand nombre de chiens et un suivi à long terme. D'autres essais cliniques sont nécessaires pour : **i)** confirmer nos résultats, **ii)** également déterminer s'il y a des rechutes après le traitement à plus long terme, et **iii)** si les chiens restent infectieux pour les phlébotomes, **iv)** définir la dose et la durée du traitement idéales, **v)** étudier le risque de développement de la résistance des parasites *Plasmodium* à l'artémisinine suite à son utilisation dans le traitement de la leishmaniose, **vi)** utiliser l'artésunate dans la prévention des chiens contre la LCan, **vii)** enfin, le chien étant un modèle idéal pour les études sur la LV humaine, l'efficacité de l'artésunate dans le traitement de la LV devrait être évaluée.

VI. DONNEES SUPPLEMENTAIRES

1. **Tableau S1.** Fiche des renseignements de l'étude épidémiologique

Fiche des renseignements sur les chiens inculs dans l'enquête épidémiologique

- **Date :** **N° du chien :** **Test Witness Leishmania :** +
- **Commune :** **Village :** -
- **Nom et Prénom du propriétaire :**
- **Mobile :**
- **Nom du vétérinaire :**
- **Identification du chien :**

Race	Sexe	Age	Origine	Activité

Remarque : la prise de photos (avec le numéro du chien et la date) si possible pour chaque chien présentant des signes cliniques visualisables

Commentaires (surtout s'il y aura des informations sur l'historique clinique et les traitements) :

- Symptômes observés (veuillez remplir le tableau ci-dessous) :

Symptômes	Fréquence			
	Absent 0	Rare +	Importante ++	Très importante +++
Au niveau de l'état général				
Amaigrissement				
Anorexie				
Abattement				
Anémie				
Hyperthermie				
Au niveau dermatologique				
Alopécie localisée				
Squamosis				
Hyperkératose				
Onychogribose				
Ulcérations				
Au niveau ophtalmologique				
Dépilation en lunettes				
Conjonctivite muco-purulente				
Au niveau buccal				
Erosions buccales				
Au niveau squelettique				
Arthrites, synovites				
Douleurs diffuses du train postérieur				
Divers				
Adénopathie				
Splénomégalie				
Epistaxis				
Troubles rénaux				
Diarrhée chronique				
Autre (bien préciser)				

- Collier antiparasitaire : Oui Non
- Traitements entrepris et/ou en cours :

2. **Tableau S2.** Fiche de suivi de l'essai clinique

Fiche de renseignements et du traitement appliqué pour J0/ J+30/ J+90 ou J+180

- **Date :** **N° du chien :** **Test Witness Leishmania :** +
- **Commune :** **Village :** -
- **Nom et Prénom du propriétaire :**
- **Mobile :**
- **Nom du vétérinaire :**
- **Identification du chien :**

Race	Sexe	Age	Origine	Activité

Remarque : la prise de photos (avec le numéro du chien et la date) si possible pour chaque chien dans chaque point de temps.

Commentaires (surtout s'il y aura des informations sur l'historique clinique et les traitements) :

- Symptômes observés (veuillez remplir le tableau ci-dessous) :

Symptômes	Fréquence			
	Absent 0	Rare +	Importante ++	Très importante +++
Au niveau de l'état général				
Amaigrissement				
Anorexie				
Abattement				
Anémie				
Hyperthermie				
Au niveau dermatologique				
Alopécie localisée				
Squamosis				
Hyperkératose				
Onychogribose				
Ulcérations				
Au niveau ophtalmologique				
Dépilation en lunettes				
Conjonctivite muco-purulente				
Au niveau buccal				
Erosions buccales				
Au niveau squelettique				
Arthrites, synovites				
Douleurs diffuses du train postérieur				
Divers				
Adénopathie				
Splénomégalie				
Epistaxis				
Troubles rénaux				
Diarrhée chronique				
Autre (bien préciser)				

- Collier antiparasitaire : Oui Non
- Traitement appliqué : Glucantime/ Allopurinol Artésunate
- Protocole thérapeutique :

3. **Tableau S3. Signes cliniques individuels et calcul des scores cliniques (SC) et du pourcentage de réduction des SC à chaque point de temps.**

Dog ID	Treatment	Clinical signs and calcule of clinical scores at each time-point (CS= sum of score of clinical signs); 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe.				Clinical scores over time				Percentage of reduction of clinical scores at each time-point				
		Clinical signs	D+0	D+30	D+90	D+180	D+0	D+30	D+90	D+180	% of red D+0/D+30	% of red D+0/D+90	% of red D+0/D+180	
13	Antimoniate of meglumine + Alopurinol	Amaigrissement+ Adenomégalia+inappétence+deplation	2+2+2+1	1+2+2+3	1+2+2+3	1+2+2+3	7	8	8	8	-14,29	-14,29	-14,29	
14		Amaigrissement+ inappétence	2+1	1	1	1	3	1	1	1	66,67	66,67	66,67	
15		Amaigrissement+ onychogryphose+Adenomégalia+inappétence	3+1+2+2	3+2+2+2+1+2			8	12			-50,00			
3 ^e Rosa		Amaigrissement+ Inappétence+escarts+localized depilation+Onychogryphosis	2+3+1+3+1	1+1+1	1+1+1	1+1+1	10	3	3	3	70,00	70,00	70,00	
5 ^e		Amaigrissement+ Inappétence+escarts+localized depilation+Onychogryphosis ulcération+Adenomégalia+ arthritis	3+3+1+3+3+2+2+3	3+3+1+3+3+2+2+3	3+3+1+3+3+2+3+3	3+3+1+3+3+2+3+3	20	20	21	21	0,00	-5,00	-5,00	
8 ^e		Amaigrissement+deplation	2+1	0	0	0	3	0	0	0	100,00	100,00	100,00	
S26 Rex		Escarts+Abattement+Hyperthermia	2+2+2	1+1	1	1	6	2	1	1	66,67	83,33	83,33	
S27 Laika		Escarts+Onychogryphosis+Inappétence	2+2+1+1	1+1	1+1	1+1	6	2	2	2	66,67	66,67	66,67	
S33		Amaigrissement+Onychogryphosis+Abattement+deplation+ulcération+annorexia+squamosis+hyperkeratosis+deplation around the eyes	2+1+1+3+2+1+2+2+1+1	1+1+2+1			16	5			68,75			
S34		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+deplation	2+2+2+2	2+1			8	3			62,50			
S35		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+deplation	2+1+2+1	0	0	0	6	0	0	0	100,00	100,00	100,00	
S41 Rombo		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+annorexia	2+1+3+2	1+2	1+1	1	8	3	2	1	62,50	75,00	87,50	
S42 Jack		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+ulcération	2+1+3+1	1+2	1+2	1	7	3	3	1	57,14	57,14	85,71	
S52		Abattement	3	1	0	0	3	1	0	0	66,67	100,00	100,00	
S53		Abattement+ ulcération	3+1	1	1	1	4	1	1	1	75,00	75,00	75,00	
S54		Amaigrissement+Onychogryphosis+Abattement+ulcération	2+2+2+2	3+2+2+2			8	9			-12,50			
S56		Abattement+Adenomégalia	2+1	1	1	0	3	1	1	0	66,67	66,67	100,00	
S59		Amaigrissement+deplation	2+2	2+2+1+2	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	4	7	22,00	22,00	-75,00	-450,00	-450,00	
S61		Amaigrissement+deplation	2+1	2+2	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	3	4	22,00	22,00	-33,33	-633,33	-633,33	
C4P2G2		Amaigrissement+Abattement+deplation+Adenomégalia+Escarts	2+3+2+2+2	1+1	1+1	1	11	2	2	1	81,82	81,82	90,91	
A11 N12		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+deplation+Adenomégalia+Escarts	2+1+2+1+2+1	2+1+3+1+2+2	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	9	11	22,00	22,00	-22,22	-144,44	-144,44	
A4		Amaigrissement+Onychogryphosis+ Abattement+deplation+Adenomégalia+Escarts	2+1+2+1+2+2	2+1+3+1+2+3	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	10	12	22,00	22,00	-20,00	-120,00	-120,00	
A13		Abattement+inappétence+Adenomégalia	2+2+2+1	1	1	1	5	1	1	1	80,00	80,00	80,00	
A N6		Abattement+inappétence+Adenomégalia+deplation	2+1+3+2	2+1	2	2	8	3	2	2	62,50	75,00	75,00	
A N7		Abattement+inappétence+deplation+arthritis	2+2+1+2	2+2+1+1	1	1+1	7	6	1	2	14,29	85,71	71,43	
C1G2P4		Abattement+inappétence+deplation+splénomégalia+Hyperthermia+Onychogryphosis	2+2+2+2+2+1	2+1	2+1	1	11	3	3	1	72,73	72,73	90,91	
10		Attesunate	Abattement+conjonctivite+neurological disorders+amaigrissement	1+2+1+1	1	1	1	5	1	1	1	80,00	80,00	80,00
44 Abdo			Amaigrissement+Abattement+congectivitis+ Inappétence	2+2+2+2	2	1	1	8	2	1	1	75,00	87,50	87,50
58	Amaigrissement+deplation+ulcération+		3+2+1	2+1	1+1	0	6	3	2	0	50,00	66,67	100,00	
63 Noir	Amaigrissement+deplation+furfures+larmoiment		1+2+2+1	1	1	1+1	6	1	1	2	83,33	83,33	66,67	
S2	Ulcération+localized depilation		2+1	1	1	1	3	1	1	1	66,67	66,67	66,67	
S7 rex	Abattement+Ulcération+deplation+larmoiment+onychorifosse+ Depilation around the eyes+		2+1+2+1+1+1	2+1+2+1+2+2	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	8	10	22,00	22,00	-25,00	-175,00	-175,00	
S8	Abattement+amaigrissement+ Inappétence+ deplation+		1+1+2+1	1	1	1	5	1	1	1	80,00	80,00	80,00	
S14	Amaigrissement+Onychogryphosis+Abattement		2+2+1+1	1	1	1	6	1	1	1	83,33	83,33	83,33	
S31	ulcération+amaigrissement+Hyperthermia		2+2+2	3+2+2+2	Mortality due to CanL	Mortality due to CanL	6	9	22,00	22,00	-50,00	-266,67	-266,67	
S50	Abattement+conjonctivitis+neurological disorders+amaigrissement		2+1+2+3	1+2+1	2+2+2+2	2+2+2+3	8	4	8	9	50,00	0,00	-12,50	
S17 ^e	Amaigrissement+Abattement		1+2	1	0	0	3	1	0	0	66,67	100,00	100,00	
T3	Ulcération+Depilation around the eyes+amaigrissement+splénomégalia+Onychogryphosis+larmoiment+neurological disorders.		2+2+2+2+2+1				11							
T11 C2P1G1	Amaigrissement+ Abattement+ Inappétence+deplation+Adenomégalia		1+3+3+1+2	2+1	0	0	10	3	0	0	70,00	100,00	100,00	
A14 N14	Amaigrissement+deplation+Adenomégalia		2+1+2	1	1	1	5	1	1	1	80,00	80,00	80,00	
A8 N8	Amaigrissement+Inappétence+Depilation around the eyes+Adenomégalia+hyperkeratosis		2+2+1+2+1	1+1	0	0	8	2	0	0	75,00	100,00	100,00	
A9 N9 Roui	Amaigrissement+ Inappétence+Depilation around the eyes+Adenomégalia+hyperkeratosis+Onychogryphosis		2+2+1+2+1+1	2+2+1+2+2	2+2+1+2+2+3	2+2+1+2+2+3	9	11	12	12	-22,22	-33,33	-33,33	

Case vide : perte de vue ou mortalité non liée à LCan.

Score clinique de **22** : Mortalité liée à LCan.

VII. ANNEXES

Article: Approche moléculaire pour le diagnostic des filarioses canines sanguines et cutanées

Auteurs : Younes Laidoudi, Samia Bedjaoui, **Hacène Medkour**, Maria Stefania Latrofa, Abdeslam Mekroud, Idir Bitam, Bernard Davoust, Domenico Otranto and Oleg Mediannikov

Publié à *Microorganisms*, 2020, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111671>

Résumé :

Le zoonotique *Onchocerca lupi* et les filarioses transmises par les tiques du genre *Cercopithifilaria* restent moins bien connues en raison des difficultés d'accès aux échantillons de peau comme tissus cibles. Nous avons proposé ici une approche moléculaire reposant sur des tests qPCR multiplex qui permettent l'identification rapide des filarioïdes à partir d'échantillons de sang, de peau et de tiques de chiens. Il s'agit de deux tests qPCR duplex nouvellement développés, le premier ciblant l'ADN des filaires et celui de *C. grassii* (PanFil- *C. grassii*) et le second test qPCR conçu pour la détection des ADN de *Cercopithifilaria bainae* et de *Cercopithifilaria* sp. Il (*C. bainae*- *C.spII*). Le troisième est un test triplex TaqMan ciblant l'ADN *cox1* des microfilaries sanguines (comme *Dirofilaria immitis*, *D. repens* et *Acanthocheilonema reconditum*). Les nouveaux systèmes qPCR duplex mis au point ont été validés *in silico* et par criblage de collections d'ADN connues. Les tests qPCR ont également été utilisés pour le dépistage des échantillons de sang et de tiques de 72 chiens d'Algérie. Cela a permis d'identifier les filarioses canines avec une spécificité de 100%, et une sensibilité de 89,47% et 100% à partir du sang et des tiques naturellement infectées, respectivement. Les prévalences de 26,39% pour *D. immitis*

et de 5,56% pour *D. repens* et *A. reconditum* ont été retrouvées dans le sang et les tiques. L'ADN de *Cercopithifilaria* ont été détectés uniquement dans les tiques, avec une prévalence de 4,17% et 5,56% pour *C. bairae* et *Cercopithifilaria* sp. II, respectivement. Les co-infections ont été diagnostiquées dans 6,94% et 13,89% des échantillons de sang et de tiques, respectivement. Alors que tous les échantillons étaient négatifs pour *C. grassii*. L'utilisation de tiques engorgées au lieu d'échantillons de sang et de peau pourrait être une option plus facile pour la surveillance de tous les filaroides canins étudiés ici. Les tests qPCR multiplex validés dans cette approche (Fig 22) sont utiles pour la détection des co-infections filariennes en surmontant le séquençage des échantillons positifs.

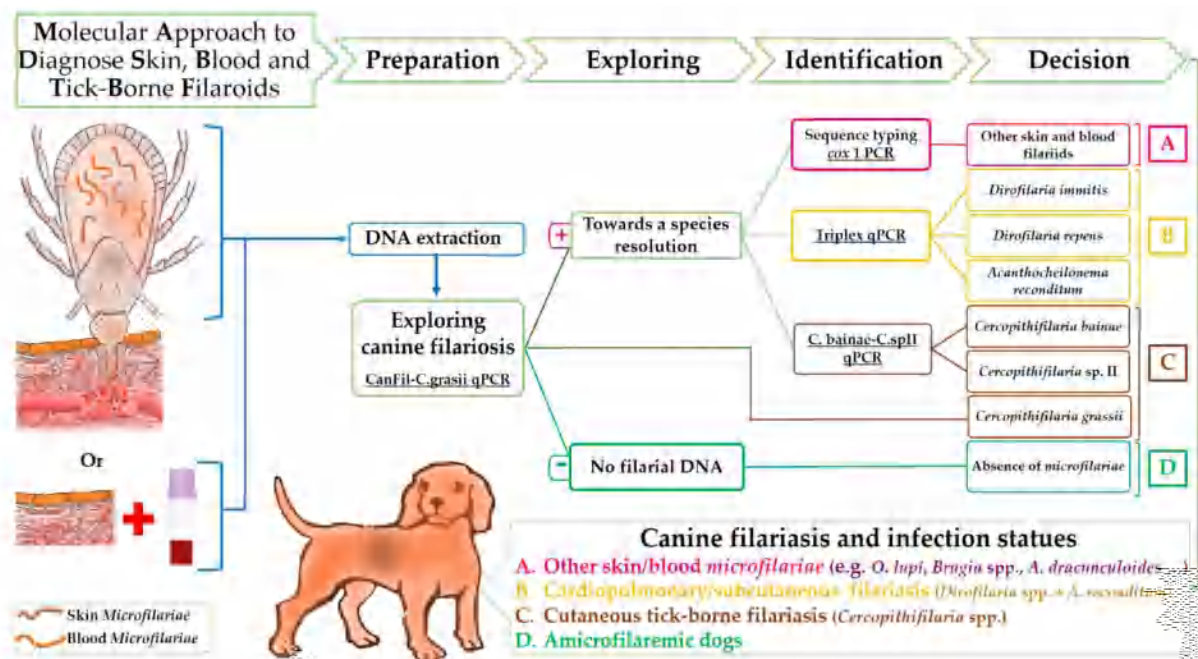


Fig 22. Diagramme montrant les principes basés sur la spécificité de l'approche moléculaire proposée pour la détection des filaroides canins.

VIII. REFERENCES

1. Abedelmajeed Nasereddin A, Baneth G, Schonian BG, Kanaan M, et Jaffe CL. Molecular Fingerprinting of *Leishmania infantum* Strains following an Outbreak of Visceral Leishmaniasis in Central Israel. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 43, n°12, 2005, 6054–6059.
2. Abonnenc E, Les phlébotomes de la région Ethiopienne (*Diptera, Psychodidae*). Ed. Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.), Paris, 1972, p 285.
3. Achour Barchiche N et Madiou M. Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathologie Biologie* 57, 2009, 65–70.
4. Adel A, Abatih E, Speybroeck N, Soukehal A, Bouguedour R, Boughalem K, et al. Estimation of canine *Leishmania* infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. *PLoS One*; 2015;10: e0117313–e0117313. doi:10.1371/journal.pone.0117313
5. Adel A, Saegerman C, Speybroeck N, Praet N, Victor B, De Deken R, Soukehal A, Berkvens D. Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Veterinary Parasitology*. 2010 Sep 20;172(3-4):204-13.
6. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol* 169, 2002,898-905.
7. Ait Oudhia K, Lami P, Lesceu S, Harrat Z, Hamrioui B, Dedet JP & Pratloug F. Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Annals of Tropical medicine & Parasitology*, Vol. 103, No. 8, 2009, p679–692.
8. Akhouni M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*. 2017 Oct 1;57:1-29.
9. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Mar 3;10(3):e0004349.
10. Altet L, Solano-gallego L, Sa E, Timo M, Francino O, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. 2007;37: 683–693. doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.007
11. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*. 2004 Jan 1;57(3):1-88.
12. Alvar J, Molina R, San Andrés M, et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994;88(4):371-378. doi:10.1080/00034983.1994.11812879
13. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0035671
14. Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European journal of epidemiology*. 1995 Apr;11(2):157-61.
15. Antinori S, Schifanello L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2012 Feb;31(2):109-18.
16. Araujo NCP, Afonso R, Bringela A, Cancela ML, Cristiano MLS, Leite RB. Parasitology International Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of *Perkinsus olseni*, the causative agent of Perkinsosis in bivalves. *Parasitol Int.*; 2013;62: 575–582. doi:10.1016/j.parint.2013.06.010
17. Aref M, Yasin SM, Bahear W, Ghulam Z, Hastie L, Dennison T, Deborggraeve S. Canine *Trypanosoma evansi* infection in Afghanistan. *Veterinary Parasitology*, 2013. 197(3–4), 638–641. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.016>
18. Azzag N & Ghalmi F. Canine hepatozoonosis a bibliographic review. *Revue Méd. Vét.*, 2016, 167, 7-8, 201-210;
19. Bachi F, Icheboudene K, Benzitouni A, Taharbout Z, Zemmouri M. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Algeria through Molecular Characterization. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*. 2019 Jan 1;112(3):147-52.
20. Baldelli R, Piva S, Salvatore D, Parigi M, Melloni O, Tamba M, Bellini R, Poglayen G. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Veterinary parasitology*. 2011 Jun 30;179(1-3):57-61.
21. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J*. 2008;175: 14–15. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.011
22. Baneth G, Dank G, Keren-kornblatt E. Emergence of visceral leishmaniasis in Central Israel. *Am J Trop Med Hyg* 59 (5), 1998, p722–5
23. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2002;106(4):315-324. doi:10.1016/s0304-4017(02)00115-2
24. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. "Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans". *Adv. Parasitol.*, 64, 2007, p6-8.
25. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2006 Jul;28(7):329-37.

26. Barchiche NA, Madiou M. Recrudescence des leishmanioses cutanées: à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathologie Biologie*. 2009 Feb 1;57(1):65-70.
27. Barrouin-Melo SM, Lorangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, Dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004 ;99:195-7.
28. Bates B, Kundzewicz Z, Wu S. Climate change and water. Intergovernmental Panel on Climate Change Secretariat; 2008.
29. Bates PA, Depaquit J, Galati EA, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, Picado A, Ready PD, Salomón OD, Shaw JJ, Traub-Csekö YM. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & vectors*. 2015 Dec;8(1):1-8.
30. Bates PA. Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature microbiology*. 2018 May;3(5):529-30.
31. Baxarias M, Álvarez-fernández A, Martínez-orellana P, Montserrat-sangrà S, Ordeix L, Rojas A, ... Solano-gallego L. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniosis ?, *Parasites and vectors*. 2018. 1–16.
32. Belazzoug S, Mahzoul D, Addadi K et Dedet JP. *Sergentomya minuta parroti* (Adler and Theodor, 1927) in Algeria (Diptera, Psychodidae). Intraspecific systematics and geographical distribution. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1982. 57, 621-630.
33. Belazzoug S et Mahzoul D. Note sur les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Tassili N'Ajjer. *Arch Institut Pasteur Algérie*, 1980. 54, 103-106.
34. Belazzoug S et Mahzoul D. Note sur les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Hoggar. *Arch Institut Pasteur Algérie*, 1981. 55, 113-116.
35. Belazzoug S. The sandflies of Algeria. *Parassitologia*, 1991.33, 85-87
36. Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RG, da Silva ES. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary parasitology*. 2013 Jul 1;195(1-2):1-3.
37. Benallal KE, Gassen B, Bouiba L, Depaquit J, Harrat Z. Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta Trop*, 2013. 128 (3), 518-521.
38. Benallal KE, Benikhlef R, Garni R, Gassen B, Dedet JP et Harrat Z. Presence of *Phlebotomus perniciosus* atypical form in Algeria. *J Arthropod Borne Dis*, 2017. 11, 139-146.
39. Benallal KE, Garni R, Harrat Z, Volf P, Dvorak V. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLoS neglected tropical diseases*. 2022 Jan 6;16(1):e0009952.
40. Benikhlef R, Harrat Z, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali-Braham S, Belkaid M. Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Med trop*. 2004;64:42-6.
41. Bennoune O, Adili N, Amri K, Bennecib L, & Ayachi A. Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: First report. *Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal*, 2013. 4(4), 273–275.
42. Berchi S, Bounamous A, Louadi K, Pesson B. Différenciation morphologique de deux espèces sympatriques: *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911 et *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu 1930 (Diptera: Psychodidae). *Ann Soc Entomol Franc*, 2007. 43, 201-203
43. Berdjane-Brouk Z, Charrel RN, Bitam I, Hamrioui B, Izri A. Record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 and *Phlebotomus* (*Larrousius*) *chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite*, 2011. 18, 337-339.
44. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008 Oct 29;2(10):e313.
45. Berrahal F. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 55, 1996, p273–277.
46. Bessad A, Mouloua K, Kherrachi I, Benbetka S, Benikhlef R, Mezai G, et al. *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull la Soc Pathol Exot*. 2012;105: 5–7. doi:10.1007/s13149-011-0182-4
47. Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, et al. *Toxicologic Pathology*. 2009; doi:10.1177/0192623309344088
48. Bilić P, Kuleš J, Barić Rafaj R, & Mrljak V. Canine babesiosis: Where do we stand? *Acta Veterinaria*, 2018. 68(2), 127–160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>
49. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA: Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, 5 (4):
50. Bogitsh BJ, Carter Clint E, Oeltmann TN. *Arthropods as Vectors*. Chapter 18 Human. *Parasitology* (Fourth Edition), 2013, p349–379.
51. Bories C, Chollet C. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*.

- 2008;62: 462–465. doi:10.1016/j.biopha.2008.04.003
52. Boulangé A, Lejon V, Berthier D et al. The COMBAT project: controlling and progressively minimizing the burden of vector-borne animal trypanosomiasis in Africa [version 2; peer review: 3 approved]. *Open Res Europe* 2022, 2:67 (<https://doi.org/10.12688/openreseurope.14759.2>)
 53. Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, Svobodova M, Beverley SM, Späth G, Brun R, Pesson B. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and immunity*. 2004 Dec;72(12):7140-6.
 54. Bounamous A, Boudabous R, Jouet D, Augot D, Ferte H, Babba H, et al. Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines de *Paraphlebotomus*: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 (Diptera: Psychodidae). *Parasite*. 2008 Dec 1;15 (4):565–71. pmid:19202763
 55. Bounamous A. Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'Est algérien. Thèse de Doctorat. Université de Constantine, 2010, p304.
 56. Bourdoiseau G et Franc M, "Leishmaniose canine et féline". EMC – Vétérinaire, [Article 1350], 2008, p1-10.
 57. Bourdoiseau G et Franc M. Leishmaniose canine. *Encyclopédie vétérinaire - Parasitologie*. Elsevier, Paris, 2002.
 58. Bourdoiseau G. Chapitre 13 : Maladies parasitaires disséminées, la leishmaniose. In : *Parasitologie clinique du chien*, Ed.NEVA, Créteil, 2000, p325-362.
 59. Boussaa S, Kasbari M, Mzabi A El, Boumezzough A. Epidemiological Investigation of Canine Leishmaniasis in Southern Morocco. *Advances in Epidemiology*. 2014; 104697. doi.org/10.1155/2014/104697
 60. Brennan CA, Anderson KV. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.* 2004 Apr 23;22:457-83.
 61. Brewig N, Kissenpennig A, Malissen B, Veit A, Bickert T, Fleischer B, Mostböck S, Ritter U. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 182, 2009, p774-783.
 62. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F, Latrofa MS, Tarallo VD, Dantas-Torres F, Capelli G, Stanneck D. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2014 Dec;7(1):1-0.
 63. Brianti E, Napoli E, Gaglio G, Falsone L, Giannetto S, Solari Basano F, Nazzari R, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Stanneck D. Field evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniasis in a highly endemic area. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Sep 15;10(9):e0004987.
 64. Britto C, Ravel C, Bastein P, Blaineau C, Pages M, Dedet JP, et al. Conserved linkage groups associated with largescale chromosomal rearrangement between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Genes* 22, 1998, p107-117.
 65. Bussiéras J, Chermette R. *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie, 1992, p186.
 66. Caixeta I, Helena L, Coura-vital W, Macedo G, Magalhães C, Almeida T, et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. *Parasites & Vectors*; 2018; 1–12.
 67. Cardoso L, Oliveira AC, Granada S, Nachum-Biala Y, Gilad M, Lopes AP, ... Baneth G. Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasites and Vectors*, 2016. 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1536-z>.
 68. Cardoso L, Pennisi MG, Solano-gallego L, Koutinas A, Miro G, Ferrer L, et al. Veterinary Parasitology Directions for the diagnosis , clinical staging , treatment and prevention of canine leishmaniasis. 2009;165: 1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
 69. Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*. 91, (2004), p95–100.
 70. Cardoso L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2011; 1–16. doi:10.1186/1756-3305-4-86
 71. Carre N, Collot M, Guillard P, Horellou M, Gangneux JP. La leishmaniose viscérale : Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *Journal de Pharmacie Clinique*. Volume 29, Numéro 3, 2010, p121-48,
 72. Catheland S. Leishmaniose : une zoonose en pleine extension. *La dépêche vétérinaire*, n°865. 2005.
 73. Chamaille L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP: Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors*. 2010, 3: 31. 10.1186/1756-3305-3-31.
 74. Chang KP. Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 30, 1981, p334-339.
 75. Chappuis F. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 2007, p873–882.
 76. Chargui N, Haouas N, Gorcii M, Akrouit Messaidi F, Zribi M. & Babba H. Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite*, 14, 2007, p247-251.

77. Chargui N, Haouas N, Gorcii M, Lahmar S, Guesmi M, Ben Abdelhafidh A, Mezhoud H, et Babba H. Use of PCR, ITAT and in vitro culture in the detection of leishmania infantum infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. *Parasite*,16, 2009, p65-69.
78. Claborn D, Masuoka P, Morrow M, Keep L. Habitat analysis of North American sand flies near veterans returning from leishmania-endemic war zones. *International Journal of Health Geographics*. 2008 Dec;7(1):1-8.
79. Colacicco-Mayhugh MG, Grieco JP, Putnam JL, Burkett DA, Coleman RE. Impact of phlebotomine sand flies on United States military operations at Tallil Air Base, Iraq: 5. Impact of weather on sand fly activity. *Journal of medical entomology*. 2011 May 1;48(3):538-45.
80. Colange H. Contribution à l'étude du repas sanguin de *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) (Doctoral dissertation). 2011.
81. Committee WHOE. Control of the leishmaniasis. 2010; 22–26.
82. Cortes S, Albuquerque A, Cabral LIL, Lopes L, Campino L, Cristiano LS. In Vitro Susceptibility of *Leishmania infantum* to Artemisinin Derivatives and Selected Trioxolanes. 2015;59: 5032–5035. doi:10.1128/AAC.00298-15
83. Cortes Yolanda Vaz S, Neves R, Maiaa C, Cardoso FL, Campino L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology* 189, 2012, p189– 196.
84. Costa CH, Vieira JB. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2001 Mar 1;34(2).
85. Costa MA, Matheson C, Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O. Ancient leishmaniasis in a highland desert of northern Chile. *PLoS One*, 4(9), e6983, 2009.
86. Costa, CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? a critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [online]*. 2011, v. 44, n. 2, pp. 232-242.
87. Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 Jan 9;8(1):e2583.
88. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*. 2002;125(Pt 5):407-414. doi:10.1017/s0031182002002238
89. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of infectious diseases*. 2002 Nov 1;186(9):1314-20.
90. Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM: Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2005, 128 (1-2): 149-155. 10.1016/j.vetpar.2004.11.011.
91. Coutinho MT, Linardi PM: Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Vet Parasitol*. 2007, 147 (3-4): 320-325. 10.1016/j.vetpar.2007.04.008.
92. Coutinho-Abreu IV, Sharma NK, Robles-Murguia M, Ramalho-Ortigao M. Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania* major development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010 Nov 30;4(11):e901.
93. Cox FE. History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews* 15(4), 2002, p595-612.
94. Cruz I. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect. Dis*. 10, 342, 2010.
95. da Silva SM, Amorim IF, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, Melo MN, Tafuri WL, Gontijo NF, Michalick MS, Frézard F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Jun;56(6):2858-67.
96. Dahmana H, Amanzougaghene N, Davoust B, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O, et al. Great diversity of Piroplasmida in Equidae in Africa and Europe including new species. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. Volume 18, December 2019, 100332. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100332
97. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(3):151-156. doi:10.1590/s0036-46652006000300007
98. Dantas-Torres F, Felinto de Brito ME, Brandao-Filho SP, Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 140, 2006, p54–60.
99. Dantas-Torres F, Martins TF, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandao-Filho SP: Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol*. 2010, 125 (2): 184-185. 10.1016/j.exppara.2010.02.003.
100. Dantas-Torres F, Stefania Latrofa M, Otranto D: Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 2011, 4 (1): 56. 10.1186/1756-3305-4-56.
101. Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasites & Vectors*. 2009 Apr;2(1):1-8.
102. Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 2008. 152(3–4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

103. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Vet.Parasit* 149, 2007, p139-146.
104. Davoust B, Roqueplo C, Parzy D, Watier-Grillot S, Marié JL. A twenty-year follow-up of canine leishmaniosis in three military kennels in southeastern France. *Parasites & vectors*. 2013 Dec;6(1):1-5.
105. de Castro Ferreira E, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary parasitology*. 2007 May 31;146(3-4):235-41.
106. de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS: Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. 2006, 137 (1-2): 159-167. 10.1016/j.vetpar.2005.12.011.
107. de Vasconcelos TC, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: a systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Oct 1;74:103293.
108. Dedet JP, Addadi K, Belazzoug S, Dib D, Knidler B et Touami M. Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) d'Algérie. *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 1984. 22 (2), 99-127.
109. Dedet JP. *Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8- 506-A-10, 2009.
110. Dedet JP. Les Leishmanioses. Paris, *Ellipses*, 1999, p253.
111. Defontis M, Richartz J, Engelmann N, Bauer C, Schwierk VM, Büscher P, & Moritz A. Canine *Trypanosoma evansi* infection introduced into Germany. *Veterinary Clinical Pathology*, 2012. 41(3), 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00454.x>
112. Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*. 1999;13(5):413-415. doi:10.1892/0891-6640(1999)013<0413:caaav>2.3.co;2.
113. Denerolle P. La leishmaniose : données actuelles en France. *Point vét* 236, 2003, p46-48.
114. Depaquit J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infect Genet Evol* 2014;b28:744–56.
115. Desjeux P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. 2004;27: 305–318. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.004
116. Desquesnes M, Holzmüller P, Lai D-H, Dargantes A, Lun Z-R, & Jittaplapong S. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*, 2013, 194176. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>
117. Dey R, Joshi AB, Oliveira F, Pereira L, Guimarães-Costa AB, Serafim TD, de Castro W, Coutinho-Abreu IV, Bhattacharya P, Townsend S, Aslan H. Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1 β . *Cell host & microbe*. 2018 Jan 10;23(1):134-43.
118. Di Muccio T, Marinucci M, Frusteri L, Maroli M, Pesson B, Gramiccia M. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000 May;30:387–93. pmid:10745162
119. Diaz-Albiter H, Mitford R, Genta FA, Sant'Anna MR, Dillon RJ. Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PLoS One*. 2011 Mar 9;6(3):e17486.
120. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*. 2004 Jan;49(1):71-92.
121. Dillon RJ, Lane RP. Influence of *Leishmania* infection on blood-meal digestion in the sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P. langeroni*. *Parasitology research*. 1993 Jun;79(6):492-6.
122. Diouani M F, Bouafif NB.E.N.A, Bettaib J, Louzir H, Jedidi S, Ftaiti, A, ... Salah AB.E.N. Dogs L . *infantum* Infection From an Endemic Region of the North of Tunisia : a Prospective Study. *Most*, 85(June 2014), 55–62.
123. Djoudi M, Triki-Yamani R et Kaidi R. la leishmaniose féline dans la région d'Alger. 3ème Journées d'Epidemiologie Animale. Université Saad Dahlab de Blida, 2010, p32-37.
124. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*. 2012 Dec;5(1):1-2.
125. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14: 1013–1018. doi:10.3201/eid1407.071589
126. Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM: Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006, 12 (3): 440-446.
127. Durrani AZ, Durrani HZ, Kamal N. Prevalence of *Leishmania* in sand fly in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*. 2012 Feb 1;44(1).
128. Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1996 Aug 1;55(2):125-30.

129. Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Munck NA, Viemann D, Varga G, Muller-Tidow C, Schuberth HJ, Roth J, Sunderkotter C. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 6:e1000871, 2010.
130. Elhaig MM, Youssef AI, & El-gayar AK. Veterinary Parasitology Molecular and parasitological detection of *Trypanosoma evansi* in Camels in Ismailia , Egypt. *Veterinary Parasitology*, 2013. 198(1–2), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.003>
131. Epstein P. Oui, le réchauffement de la planète est dangereux. Pour la science, n°276, 2000, p80-88.
132. Estevez Y. Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure activité. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III, 2009.
133. Euzéby J, Protozoologie médicale comparée, Vol. I : Généralités sarcomastigophores (Flagellés, Rhizopodes) – Ciliés, 212-313., Ed.coll.M.Merieux, Lyon, 1986, p463.
134. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149, 1992, p4029- 4035.
135. Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology*. 2004 Mar;18(1):71-80.
136. Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*. 1988 Jun;29(6):381-8.
137. Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses and Public Health*. 2008 Apr;55(3):145-8.
138. Foglia Manzillo V, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013 May 9;7(5):e2225.
139. Foley H et Leduc H. Phlébotomes dans le sud-oranais. Accidents simplement locaux dûs à leurs piqûres. *Bull Soc Path Exot*, 1912, 5, 511-513.
140. Fraga DB, Pacheco LV, Borja LS, Tuy PG, Bastos LA, Solcà MD, Amorim LD, Veras PS. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Jan 5;10(1):e0004333.
141. Freitas-junior LH, Chatelain E, Andrade H, Siqueira-neto JL. International Journal for Parasitology : Drugs and Drug Resistance Visceral leishmaniasis treatment : What do we have , what do we need and how to deliver it ? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist. Australian Society for Parasitology*; 2012;2: 11–19. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003
142. Freyburger L, Chabanne L, Bourdoiseau G. Vaccination anti-parasitaire contre la babésiose et la leishmaniose chez le chien, *Le Point Vétérinaire*, n°325, 2012, p28-33.
143. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 185, 2010, p4319-4327.
144. Gage K L, Burkot T R, Eisen RJ, & Hayes EB. *Climate and Vectorborne Diseases*, 2008. 35(5). <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>.
145. Galvez R, Miro G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region. *Veterinary Parasitology* 169, (2010), p327– 334.
146. Gharbi M, Jaouadi K, Mezghani D, Darghouth A. Symptoms of Canine *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp in Tunisian Dogs. 2018; 51–55. doi:10.3166/bspe-2018-0017
147. Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech*. 2015 Aug 1;34(2):613-26.
148. Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M. surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005 Feb 1;72(2):138-41.
149. Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* 10, 2008, p100-111.
150. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2009, p6748-6753.
151. Gugliandolo E, Palma E, Peritore AF, Siracusa R, D'Amico R, Fusco R, Licata P, Crupi R. Effect of Artesunate on *Leishmania Amazonensis* Induced Neuroinflammation and Nociceptive Behavior in Male Balb/C Mice. *Animals (Basel)*. 2020 Mar 27;10(4):557. doi: 10.3390/ani10040557.
152. Harrat Z et Belkaid M. Les leishmanioses dans l'Algérois : Données épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot*, V. 96, n° 3, 2003, p212-214.

153. Harrat Z, Pratloug F, Belazzoug S, Dereure J, Deniau M, Rioux JA, Belkaid M, Dedet JP. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996 Nov 1;90(6):625-9.
154. Harrat Z. La leishmaniose canine en Algérie : Analyse épizootologique, écologique et étude du parasite. Thèse doctorale soutenue au Centre Universitaire d'El Tarf (Algérie). 2006, 154p.
155. Hashiguchi Y, Gómez Landires EA. A review of leishmaniasis in Ecuador. *Bulletin of the Pan American Health Organization (PAHO)*; 25 (1). 1991.
156. Hodžić A, Alić A, Fuehrer HP, Harl J, Wille-Piazzai W, Duscher GG. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites and Vectors*. 2015. 8:1–7.
157. Hosen S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*. 2017 Jan;144(1):95-115.
158. Intakhan N, Siriyasatien P, Chanmol W. Anti-Leishmania activity of artesunate and combination effects with amphotericin B against *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* in vitro. *Acta Trop*. 2022 Feb;226:106260. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106260.
159. Isaac C, Ciosi M, Hamilton A, Scullion KM, Dede P, Igbinosa IB, ... Turner CMR. Molecular identification of different trypanosome species and subspecies in tsetse flies of northern Nigeria. *Parasites and Vectors*, 2016. 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1585-3>
160. Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9. doi:10.1371/journal.pntd.0003321
161. Ivens AC et Blackwell JM. The *Leishmania* genome Comes of Age. *Parasitologie aujourd'hui* Persona ed. Vol. 15. Num. 6. Ed. Elsevier Ltd, 1999, p 225-231.
162. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 2005, p436-442.
163. Izri MA, Marty P, Rahal A, Lelievre A, Ozon C, Baldelli G, Presiozo J, Haas P et Le Fichoux Y. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturellement infeste par des promastigotes dans la région de Nice (France). *Bul. Soc. Path. Exot*, 1992, 85, 385-387.
164. Jarry DM. Historique des leishmanioses et leurs complexes pathogènes. In Dedet, J.P. *Les leishmanioses*. Edition Ellipses, 1999, p253.
165. Jeronimo SMB, Anastacio de Queiroz Sousa, Richard D Pearson. *Leishmaniasis Chapter 100 Tropical Infectious Diseases (Third Edition)*, 2011, p696–706.
166. Jochim RC, Teixeira CR, Laughinghouse A, Mu J, Oliveira F, Gomes RB, Elnaïem DE, Valenzuela JG. The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* chagasi-infected sand flies. *BMC genomics*. 2008 Dec;9(1):1-24.
167. Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, ... Truc P. Human trypanosomiasis caused by *trypanosoma evansi* in india : the first case report, 2005. 73(3), 491–495.
168. Kabbout N, Merzoug D, Chenchouni H. Ecological status of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural communities of Northeastern Algeria. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 2016 Mar;10(1):24.
169. Kallel K, Pratloug F, Belhadj S, Cherif F, Hammadi M, Dedet JP, Chaker E. Cutaneous leishmaniasis in Tinisia: results of the iso-enzymatic characterization of 71 strains. *Ann Trop Med Parasitol*, V.99, n°1, 2005, p11-19.
170. Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu KY, Waziri NE, Eyal O, Guthmann Y, & Harrus S. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013. 7(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>
171. Kaye PM, Aebischer T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clinical microbiology and infection*. 2011 Oct 1;17(10):1462-70.
172. Keita ML, Medkour H, Sambou M et al. Tabanids as possible pathogen vectors in Senegal (West Africa). *Parasites Vectors* 13, 500 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04375-w>
173. Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, Kirby JR, Valenzuela JG, Kamhawi S, Wilson ME. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*. 2017 Jan 17;8(1):e01121-16.
174. Kettle DS. *Medical and veterinary entomology*. CAB international; 1995.
175. Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I, Righton LA. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986 Jan 1;80(1):138-42.
176. Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, Volume 17, Issue 3, May–June 1999, p279–289
177. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. *Veterinary Pathology*. 2014 Mar;51(2):527-38.
178. Lafri I et Bitam I. Phlebotomine sandflies and associated pathogens in Algeria: update and comprehensive overview. *Vet Ital*. 2021 Dec 31;57(3). doi: 10.12834/VetIt.1763.9298.3. PMID: 34971507.

179. Lafri I, Almeras L, Bitam I, Caputo A, Yssouf A, Forestier CL et al. Identification of Algerian Field-Caught Phlebotomine Sand Fly Vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004351, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004351
180. Laidoudi Y, Medkour H, Tahir D, Dahmana H, Marié JL, Varloud M, Mediannikov O, Davoust B. Field evaluation of preventive efficacy of monthly multimodal prophylactic treatment (Milbactor® and Vectra® 3D) against *Dirofilaria* spp. in Dogs. *Parasitologia*. 2021 Jul 30;1(3):130-6.
181. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11, 2003, p210-214.
182. Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun* 70, 2002, p826-835.
183. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary Parasitology*. 2013 Sep 23;196(3-4):296-300.
184. Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CE, da Matta VL, Duarte MI. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int J Exp Pathol* 71, 1990, p791-797.
185. Léger N, Depaquit J, Gay F. Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n. sp. (Psychodidae; Diptera) from the Philippines. *Pathog Glob. Health*. 2012;106 (6):346–51. pmid:23182139
186. Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*. 2005 Jan;8(1):71-5.
187. Lemaire G, Sergent E. et L'Héritier A. « Recherches sur la leishmaniose du chien d'Alger ». *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 6, 1913, p579-581.
188. Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, Nicolas E, Meister M, Georgel P, Reichhart JM, Hoffmann JA. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995 Oct 10;92(21):9465-9.
189. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. 2002;109: 19–27.
190. Lerner EA et Shoemaker CB. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267, 1992, p1062-1066.
191. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull Br Mus Nat Hist* 1982 Jun;45:121–209.
192. Liew FY, O'donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Advances in parasitology*. 1993 Jan 1;32:161-259.
193. Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica*. 2004 Sep 1;92(1):43-53.
194. Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infect Immun* 56, 1988, p336-342.
195. Loo CS, Lam NS, Yu D, Su XZ, Lu F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. *Pharmacol Res*. 2017;117:192-217. doi:10.1016/j.phrs.2016.11.012
196. Lopes EG, Sevá AD, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, Ferreira HL, Oliveira TM, Bigotto MF, Galvis-Ovallos F, Galati EA. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology & Infection*. 2017 Sep;145(12):2436-44.
197. M'ghirbi Y, & Bouattour A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Veterinary Parasitology*, 2008. 152(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.018>
198. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*. 2009;179: 142–144. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009
199. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988 Jul 1;82(4):566-7.
200. Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*; 2015; 1–9. doi:10.1186/s13071-015-0896-0
201. Manna L, Gravino E, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. *Leishmania* DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. 2008;360: 358–360. doi:10.1196/annals.1428.018
202. Manna L, Reale S, Vitale F, Elio A. Research in Veterinary Science Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*. Elsevier Ltd; 2009;87: 76–78. doi:10.1016/j.rvsc.2008.12.009
203. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2009;182: 441–445. doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.009

204. Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D'orazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology*. 2001 Dec;15(4):358-63.
205. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health*. 2008 Feb;13(2):256-64.
206. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: The key points for qPCR result interpretation. *Parasites and Vectors*. 2011;4: 1–5. doi:10.1186/1756-3305-4-57
207. Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995;48(3-4):209-220. doi:10.1016/0165-2427(95)05434-8
208. Marty P et Rosenthal E, "Treatment of visceral leishmaniasis", *Expert Opin. Pharmacother*, V. 3, n° 8 2002, p1101-1108.
209. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 5249–5255. doi:10.1128/JCM.42.11.5249
210. Matallah F, Benakhla A, Medjouel L, & Matallah S. Tick infestation of dogs and Prevalence of canine babesiosis in the north-east of Algeria; area of El-Tarf 1. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2012. 6(3): 126-134
211. Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. 2009; 155–162. doi:10.1007/s00436-009-1375-3
212. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology today*. 2000;16(5):188-9.
213. Mazelet L. La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français. Mémoire de Métrise en Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France. 2004, p31.
214. Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 52, 1992, p269-273.
215. Medkour H, Davoust B, Dulieu F, Maurizi L, Lamour T, Marié J-L, et al. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13: e0007456. doi:10.1371/journal.pntd.0007456
216. Medkour H, Laidoudi Y, Athias E, et al. Molecular and serological detection of animal and human vector-borne pathogens in the blood of dogs from Côte d'Ivoire. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2020b Apr;69:101412. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101412. PMID: 31981798.
217. Medkour H, Laidoudi Y, Lafri I, Davoust B, Mekroud A, Bitam I, et al. Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. Elsevier; 2020;19: 100353. doi:10.1016/j.vprsr.2019.100353
218. Miró G, López-Vélez R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting "One Health" principles into practice. *Vet Parasitol*. Elsevier; 2018;254: 151–159. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.002
219. Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-gallego L, et al. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2017;xx: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005>
220. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002;18: 399–405. doi:10.1016/S1471-4922(02)02347-4
221. Morrison LJ, Vezza L, Rowan T, & Hope JC. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. *Trends in Parasitology*, 2016. 32(8), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.012>
222. Mouloua A. Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie. Thèse de doctorat en sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou; Février 2014.
223. Mouloua A, Boubidi SC, Bouiba L, Mezai G, Madiou M, & Harrat Z. Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Revue de Medecine Veterinaire*, 2017. 168(10–12), 252–261.
224. Munstermann LE. Phlebotomine sand flies and moth flies (Psychodidae). *Med Vet Entomol*. Elsevier Inc.; 2018. 191–211 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00012-1>
225. Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and infection*. 2007 Mar 1;9(3):317-24.
226. Niang AA, Geoffroy B, Angel G, Trouillet J, Killick-Kendrick R, Hervy JP, Brunhes J. Les phlébotomes d'Afrique de l'Ouest : logiciel d'identification et d'enseignement. Paris (FRA) ; Dakar : IRD ; IFAN, 1 CD ROM. (Didactiques). 2000.ISBN 2-7099-1453-0. ISSN 1142-2580.
227. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RCA, et al. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res*. 2005. 95:186–92.
228. Nogueira S, Avino VC, Galvis-ovallos F, Pereira-chioccola VL, Antonio M, Moreira B, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*; 2019;0: 1–11.
229. Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*.

- 2005;16(4):213-232. doi:10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x
230. Ogbu KI, Anene BM, Nweze NE, Chukwudi IC, And Danladi MA. Trypanosomosis in dogs : a review. *International journal of science and applied research*; 2017. Vol. 2, No.2, ISSN 2504-9070.
 231. Oliva BYG, Gradon LI, Cortese L, Ella PC, Medica C, li ÁF, et al. Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate , alone or in combination , in canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Volume 92, Number 2, 1 March 1998, pp. 165-171(7). <https://doi.org/10.1080/00034989860003>.
 232. Oliva G, Cruz I, Veterinaria M, li F, Animal P. Multicentric , controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. 2009; 397–404. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x
 233. Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS neglected tropical diseases*. (2014) Oct 9;8(10):e3213.
 234. Oliveira CDL, Renato Martins Assunção IAR, and Fernando Augusto P. "Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997." *Cadernos de saude publica* 17, 2001: 1231-1239.
 235. OMS. Leishmaniose. 8 Janvier 2022. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
 236. OMS. Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, OMS Série de rapports techniques n° 949. Genève 2010.
 237. Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasites & vectors*. 2017 Dec;10(1):1-8.
 238. Osman OF, Kager PA, et Oskam L, "Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects", *Trop Med International Health*, V5, n°8,(2000), p553-562.
 239. Otranto D, Dantas-Torres F, & Breitschwerdt EB. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends in Parasitology*, 2009. 25(5), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.005>
 240. Otranto D, De Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa S, Diniz PP, Mencke N, Maggi RG. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary parasitology*. 2010 Sep 20;172(3-4):323-32.
 241. Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*. 2007 Mar 31;144(3-4):270-8.
 242. Otranto D. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. *Veterinary Parasitology*, 2018. 251(November 2017), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.021>
 243. Owens SD, Oakley DA, Marrayott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U: Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2001, 219 (8): 1076-1083. 10.2460/javma.2001.219.1076.
 244. Ozon C, Marty P, Pralong F, Breton C, Blein M, Lévièvre A, Haas P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania* infection in southern France. *Vet. Parasitol.*, 75, 1998, p273–277.
 245. Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2011 Dec;4(1):1-0.
 246. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. 2012 Apr 17;3:69.
 247. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*. 2016;45: 552–578. doi:10.1111/vcp.12413
 248. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010 Jun 1;236(11):1184-91.
 249. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TM, Paixao TA, Costa LF, Dengues EG, Diaz AA, Santos RL: Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol*. 2009, 165 (3-4): 327-331. 10.1016/j.vetpar.2009.07.013.
 250. Papadopoulos E, Angelou A, Diakou A, Halos L, Beugnet F. Five-month serological monitoring to assess the effectiveness of permethrin/fipronil (Frontline Tri-Act®) spot-on in reducing the transmission of *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2017 Jan 1;7:48-53.
 251. Papierok, G-M. "Diagnostic biologique de la leishmaniose canine et perspectives". *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*. Janvier-Mars 2002, p65- 68.
 252. Paradies P, Capelli G, Cafarchia C, De Caprariis D, Sasanelli M, Otranto D. Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. (2006) Aug;53(6):295-8.
 253. Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, Dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta tropica*. 1998 Mar 1;69(1):75-83.
 254. Party DA, consultation e, Party AB. Committee for medicinal products for veterinary use (cvmp). (2006)
 255. Pasa S, Ozensoy S, Voyvoda H, Ozbek Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated

- with allopurinol and sodium stibogluconate. 2005;128: 243–249. doi:10.1016/j.vetpar.2004.12.002
256. Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF., Fernandes O, Degrave W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais. *Braz. Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91, 1996, p19–20.
 257. Paz GF, Ribeiro MF, de Magalhaes DF, Sathler KP, Morais MH, Fiuza VO, Brandao ST, Werneck GL, Fortes-Dias CL, Dias ES: Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med*. 2010, 97 (2): 131-133. 10.1016/j.prevetmed.2010.08.006.
 258. Pearson RD, Steigbigel RT. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol* 125, 1980, p2195-2201.
 259. Petter F. Répartition géographique et écologique des Rongeurs désertiques de la région paléarctique (Doctoral dissertation), 1961.
 260. Pietro SD, Bosco VR, Crinò C, Francaviglia F, Giudice E. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary World*. 2016 Jun 22;9(6):633-7.
 261. Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997 Oct;115(4):359-69.
 262. Pineda C, Aguilera-Tejero E, Morales MC, Belinchon-Lorenzo S, Gomez-Nieto LC, Garcia P, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PLoS One*. 2017 Oct 5;12(10):e0185981. doi: 10.1371/journal.pone.0185981..
 263. Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AM, Souza AA, Ramalho-Ortigão JM, Traub-Cseko YM. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Molecular genetics and genomics*. 2009 Sep;282(3):307-17.
 264. Porrozi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi Jr G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and vaccine immunology*. 2007 May;14(5):544-8.
 265. Proverbio D, Perego R, Spada E. The use of two clinical staging systems of canine leishmaniasis in a clinical setting: a critical evaluation. 2016, 1-7.
 266. Pruzinova K, Sadlova J, Myskova J, Lestinova T, Janda J, Volf P. *Leishmania* mortality in sand fly blood meal is not species-specific and does not result from direct effect of proteinases. *Parasites & vectors*. 2018 Dec;11(1):1-9.
 267. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 2003 Apr;55(1):23-8.
 268. Quitterie N, Odette L, Nadau C. Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le Test d'intra-dermo-réaction de la leishmaniose Canine. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier, Toulouse. 116, 2005, p12-51.
 269. Racoosin EL, Beverley SM. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol* 85, 1997, p283-295.
 270. Raikov. The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Spring-verlaged. wein 9, 1982, p467.
 271. Rami M, Atarhouch T, Sabri M, Cadi SM, Benazzou T, & Dakkak A. Leishmaniose canine dans le Rif (côte méditerranéenne marocaine): enquête séro-épidémiologique. *Parasite*, 2003. 10(1), 79–85. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p77>.
 272. Raquin E. Etude rétrospective de cas de leishmaniose canine à l'ENVA de 2000 à 2009. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, thèse de Doctorat vétérinaire, 2010.
 273. Ravel C. Wincker P. & Blaineau C. Biologie moléculaire de *Leishmania*. In *Les leishmanioses* Dedet JP ed. EllipSES. 249,1999, p59-62.
 274. Ready, PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6: 147–154. doi:10.2147/CLEP.S44267
 275. Regina-Silva S, Feres AM, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, Coelho EA, Ribeiro GM, Fernandes AP, Machado-Coelho GL. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*. 2016 Apr 27;34(19):2233-9.
 276. Reguera RM, Moran M, Perez-Pertejo Y, Garcia-Estrada C, Balana-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 2016 Aug 30;227:98-114.
 277. Ribeiro RR, Michalick MS, da Silva ME, Dos Santos CC, Frézard FJ, da Silva SM. Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *BioMed research international*. 2018 Mar 29;2018.
 278. Ribeiro RR, Silva SM, Fulgêncio GD, Michalick MS, Frézard FJ. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2013 Jul;22:373-8.
 279. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8, 2012, e1002536.
 280. Rioux JA, 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 comparee*. 1990;65(3):111-25.

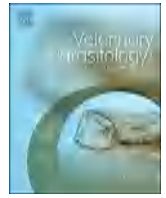
281. Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Korner H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 34, 2004, p1542-1550.
282. Rjeibi MR, Ben Hamida T, Dalgatova Z, Mahjoub T, Rejeb A, Dridi W, & Gharbi M. First report of surra (*Trypanosoma evansi* infection) in a Tunisian dog. *Parasite*, 2015. 22, 3. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015004>
283. Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CA, Christophides GK. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS pathogens*. 2017 May 17;13(5):e1006391.
284. Rodríguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A. Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med*. 2006;20(3):495-498. doi:10.1892/0891-6640(2006)20[495:doliii]2.0.co;2
285. Rodríguez-cortés A, Ojeda A, Francino O, López-fuertes L, Timón M, Alberola J. *Leishmania* Infection : Laboratory Diagnosing in the Absence of a “ Gold Standard .” 2010;82: 251–256. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0366
286. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Todolí F, & Alberola J. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 2013. 191(3–4), 363–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.009>
287. Rojas A, Rojas D, Montenegro V, Gutiérrez R, Yasur-Landau D, & Baneth G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Veterinary Parasitology*, 2014. 199(3–4), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>
288. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010 Jan 19;4(1):e584.
289. Roque AL, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2014 Dec 1;3(3):251-62.
290. Rosenthal E, Marty P, le Fichoux Y, Cassuto JP. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis associated with HIV infection: a retrospective study of 91 French cases. *Ann Trop Med Parasitol* 94, (2000), p37-42.
291. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS: Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*. 2005, 91 (4): 970-972. 10.1645/GE-483R.1.
292. Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *The Veterinary Journal*. 2013 Oct 1;198(1):43-7.
293. Rutledge LC et Gupta RK. Moth flies and sand flies (Psychodidae). *Medical and veterinary entomology*, Elsevier: 2002. 147-161.
294. Rutteman GR, Erich SA, Mol JA, et al. Safety and efficacy field study of artesunate for dogs with non-resectable tumours. *Anticancer Res*. 2013;33(5):1819-1827..
295. Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive veterinary medicine*. 2014 Jul 1;115(1-2):56-63.
296. Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology*. (2001) Oct;55(1):453-83.
297. Sahibi H, Natami A, Moufaïd A, Lasri S. & Rhalem A. Clinical and seroepidemiological study of Leishmaniasis in Northern Morocco. *Actes Inst. Agron. Vet*. Vol. 21 n°4, 2001, p227-232
298. Sallemi S, Rjeibi MR, Rouatbi M, Amairia S, Ben Said M, Khamassi Khbou M, & Gharbi M. Molecular prevalence and phylogenetic analysis of *theileria annulata* and *trypanosoma evansi* in cattle in Northern Tunisia. *Veterinary Medicine and Science*, 2018. 4(1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/vms3.79>
299. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Martins M, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. 2015;110: 831–846. doi:10.1590/0074-02760150207
300. Samake S. Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (Cercle de Baroueli). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Mali, 2006, p120.
301. Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *Journal of Heredity*. 2005 Nov 1;96(7):755-8.
302. Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary research*. 2008 May 1;39(3):1.
303. Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Aguiar-Martins K, Al Salem WS, Cavalcante RR, Dillon VM, Bates PA, Genta FA, Dillon RJ. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & vectors*. 2014 Dec;7(1):1-0.
304. Sant'Anna MR, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon RJ, Bates PA. Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors*. 2009 Dec;2(1):1-0.
305. Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). 2006; 228–233.
306. Sarrouy Ch. Combe P. et Claude. Un cas de Kala-azar infantile traité par la diamidine. *Algérie, Médical*. 1946, 447-448

307. Sbrana S, Marchetti V, Mancianti F, Guidi G, Bennett D. Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection. *Journal of Small Animal Practice*. 2014 Jun;55(6):309-13.
308. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177, 2000, p195-203.
309. Schlein Y, Jacobson RL. Resistance of *Phlebotomus papatasi* to infection with *Leishmania donovani* is modulated by components of the infective bloodmeal. *Parasitology*. 1998 Nov;117(5):467-73.
310. Segarra S, Miró G, Montoya A, Pardo-marín L, Boqué N, Ferrer L, et al. Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. Elsevier; 2017;239: 50–56. doi:10.1016/j.vetpar.2017.04.014
311. Sen R, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier B.V.; 2010;36: 43–49. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.008
312. Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature microbiology*. 2018 May;3(5):548-55.
313. Sergent Ed et Sergent Et. - Kala-azar. Existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 1910, 3, 510-511
314. Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ: Canine leishmaniasis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector?. *Vet Parasitol*. 2009.
315. Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL: Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009, 160 (1-2): 55-59. 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.
316. Silva OA, Silva PB, Silva OV, Braga GM, Albuquerque-Júnior A. Leishmaniose canine dans le Nord-est du Brésil : aspects épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot*,V. 100, n°1, (2007), p49-50.
317. Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H. Detection of *Leishmania* (L.) *infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Veterinary Quarterly*. 2017 Jan 1;37(1):23-30.
318. Simões-Mattos L, Mattos MR, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilacqua CM, Prata-Júnior RC, Holanda CM, Rondon FC, Bastos KM, Coêlho ZC, Coêlho IC. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*. 2005 Feb 28;127(3-4):199-208.
319. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa : genomic organisation, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41, 1987, p363-382.
320. Soares CS, Duarte SC, Sousa SR. What do we know about feline leishmaniasis?. *Journal of feline medicine and surgery*. 2016 Jun;18(6):435-42.
321. Solano-Gallego L, Di Filippo L, Ordeix L, Planellas M, Roura X, Altet L, Martínez-Orellana P, Montserrat S. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites & Vectors*. 2016 Dec;9(1):1-9.
322. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary parasitology*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-8.
323. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. The Iberian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol*. 90, 2000, p37–45.
324. Solano-gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Farmacologia D De. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. 2006;39: 560–563. doi:10.1128/JCM.39.2.560
325. Solano-gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Enric J. *Leishmania infantum* -specific IgG , IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas Evolution in the course of infection and after treatment. 2001;96: 265–276.
326. Solano-gallego L, Rodriguez-cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Elsevier B.V.*; 2007;147: 315–319. doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.013
327. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2007 Jul 20;147(3-4):315-9.
328. Squier MK, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol* 57, 1995, p2-10.
329. Stuart K. RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. *Trends BiochemSci* 16, 1991, p68-72.
330. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology*. 2002 Sep;9(5):951-8.
331. Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R: Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract*. 2008, 49 (7): 325-328. 10.1111/j.1748-5827.2008.00542.x.
332. Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary parasitology*. 2001 Apr 2;96(3):203-12.

333. Tamarit A, Gutierrez C, Arroyo R, Jimenez V, Zagalá G, Bosch I, ... Caballero C. Trypanosoma evansi infection in mainland Spain. *Veterinary Parasitology*, 2010. 167(1), 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.050>
334. Taylor MA, Coop RL & Wall RL. Parasites of dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 3rd edition. Iowa State, Blackwell Publishing, USA, 2007. Pp 409-426.
335. Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, Silva JS, Guglielmotti A, Miranda JC, Barral A, Brodskyn C, Barral-Netto M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175, 2005, p8346-8353.
336. Telleria EL, Araujo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*—expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum* chagasi. *PloS one*. 2010 May 18;5(5):e10697.
337. Telleria EL, Sant'Anna MR, Alkurbi MO, Pitaluga AN, Dillon RJ, Traub-Csekö YM. Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & vectors*. 2013 Dec;6(1):1-8.
338. Thiébault S, Moatti JP. The Mediterranean region under climate change : a scientific update; 2016; p. 391-401. ISBN 978-2-7099-2219-7;
339. Tinoco-Nunes B, Telleria EL, da Silva-Neves M, Marques C, Azevedo-Brito DA, Pitaluga AN, Traub-Csekö YM. The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*. *Parasites & Vectors*. 2016 Dec;9(1):1-1.
340. Torres M, Bardagi M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniasis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J. Elsevier Ltd*; 2011;188: 346–351. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.025
341. Torres M, Pastor J, Roura X, Tabar MD, Espada Y, Font A, Balasch J, Planellas M. Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*. 2016 Jun;57(6):299-304.
342. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(1):e0006082. Published 2018 Jan 11. doi:10.1371/journal.pntd.0006082
343. Vaidyanathan R. *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. *Journal of invertebrate pathology*. (2004) Oct 1;87(2-3):123-8.
344. Van Bockstal L, Bulté D, Hendrickx S, Sadlova J, Volf P, Maes L, Caljon G. Impact of clinically acquired miltefosine resistance by *Leishmania infantum* on mouse and sand fly infection. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020 Aug 1;13:16-21.
345. Vercammen F, DeDeken R. Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *Vet Rec*. 1996;139(11):264. doi:10.1136/vr.139.11.264-a
346. Vickerman KPT. Comparative cell biology of the Kinetoplastid flagellates. *Biology of the kinetoplastida*. Ed. WCA Lumsden? DA Evans. New York: Academic Press 1, 1976, p35-130.
347. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, Chattopadhyay AP, et al. Nanoliposomal artemisinin for the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Int J Nanomedicine*. 2017;12: 2189–2204. doi:10.2147/IJN.S106548
348. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, Dasgupta AK, et al. Therapeutic efficacy of artemisinin-loaded nanoparticles in experimental visceral leishmaniasis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V.; 2015;130: 215–221. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.013
349. Weiss BL, Wang J, Aksoy S. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS biology*. 2011 May 31;9(5):e1000619.
350. Wery M. *Protozoologie médicale*. De Boeck, 1995.
351. Wijerathna T, Gunathilaka N. Morphological identification keys for adults of sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):1–13. Available from. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04305-w>. pmid:31900233
352. Williams BM, Berentsen A, Shock BC, Teixeira M, Dunbar MR, Becker MS, & Yabsley M. J. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia*, and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. *Parasitology Research*, 2014. 113(3), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3722-7>
353. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun H. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. 2009; 463–469. doi:10.1007/s00436-009-1404-2
354. Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniasis, part I: vaccinations. *Preventive veterinary medicine*. 2014 Nov 1;117(1):7-18.
355. Yang DM, Liew FY. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 1993;106 (Pt 1):7-11. doi:10.1017/s003118200074758.
356. Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Jan 6;10(1):e0004341.
357. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol*. 2016;11 (4):549–66. pmid:27070074

358. Zait H et Hamrioui B. Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiques au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. revue francophone des laboratoires, N°412 Mai 2009.
359. Zeidler MP, Bausek N. The Drosophila Jak-Stat Pathway. *Jak-Stat*. 2013 Jul 15;2(3):e25353.
360. Zerpa O. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, (2000), p484–487.
361. Zoghlami Z, Chouih E, Barhoumi W, Dachraoui K, Massoudi N, Helel K Ben, et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta Trop.* 2014;139: 32–38. doi:10.1016/j.actatropica.2014.06.012

ARTICLES



Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria

Hacène Medkour^{a,b,c}, Younes Laidoudi^{a,b}, Ismail Lafri^{d,e}, Bernard Davoust^a, Abdeslam Mekroud^c, Idir Bitam^{d,f}, Oleg Mediannikov^{a,*}

^a IHU Méditerranée Infection - Microbes, Evolution, Phylogeny and Infection (MEΦI), France

^b UMR Aix-Marseille Université, IRD, APHM -19-21, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

^c PADESCA Laboratory, Veterinary Science Institute, University Constantine 1, 25100, El Khroub, Algeria

^d IHU Méditerranée Infection - Vectors-Tropical and Mediterranean Infections (VITROME), UMR Aix-Marseille Université, IRD, SSA, APHM -19-21, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

^e Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Algeria

^f Superior School of Food Sciences and Food Industries of Algiers, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Dog
Algeria
Leishmaniosis
Babesiosis
Trypanosomiasis
Hepatozoon spp.

ABSTRACT

Dogs are competent reservoirs/hosts of several protozoan pathogens transmitted by blood-feeding arthropods. Throughout their long history of domestication, they have served as a link for the exchange of parasites among livestock, wildlife, and humans and therefore remain an important source of emerging and re-emerging diseases. In Algeria, while canine leishmaniosis (CanL) is well known to be endemic, no data are available on other vector-borne protozoans. Here, we investigate the occurrence and diversity of trypanosomes, piroplasms and *Hepatozoon* spp. and update the epidemiological status of CanL in dogs from Kabylia, northern Algeria. A total of 227 dogs from three regions of Kabylia were enrolled, including 77 dogs with clinical signs. Dogs were clinically examined and were tested for *L. infantum* antibodies using a Rapid Immuno-Migration (RIM™) and a quantitative indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). PCR screening and sequencing were performed for vector-borne protozoa. Sixty two percent (141/227) of dogs presented at least one infection, whereas 26% (59/227) were co-infected. *L. infantum* antibodies were detected in 35.7% (81/227) of dogs including 88.7% (68/77) of sick dogs. Molecular investigation revealed prevalence of: 6.6% (15/227), 13.2% (30/227), 41% (93/227) for *Trypanosoma* spp., *B. vogeli* and *H. canis*, respectively. *T. evansi* (3.1%) and potential new subspecies of *T. congolense* had been identified. Dog's clinical status correlates positively with *L. infantum* antibody titers and the presence of co-infections. Susceptibility to CanL varied according to the dog's aptitude and guard dogs were more infected (51%) (P-value = .001). *B. vogeli* infection was more frequent in juveniles than adults (32% vs 9%, P-value < .001) and in females than males (21% vs 10%, P-value = .02). To the authors' knowledge, this is the first report on vector-borne protozoa infected dogs in Algeria. Current results are important not only for animal health, but also to avoid serious public health and livestock problems.

1. Introduction

Parasitic protozoa are protists, unicellular eukaryotes. They share the common traits of being heterotrophic and host dependent for survival. They can cause significant morbidity and mortality in domestic animals, thus causing substantial economic losses related to animal production or a major concern for animal owners (Dantas-Torres, 2008a) (Schnittger and Florin-Christensen, 2018). Domestic dogs live in

close association with humans and livestock, participating in the transmission of diseases of zoonotic, veterinary and conservation interest (Millán et al., 2013). Dogs can therefore be infected by a large number of these parasites, haemoparasites belong the genus *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia* and *Hepatozoon* (Otranto et al., 2009) (Díaz-Regañón et al., 2017). They are causative agents of emerging or re-emerging vector-borne diseases with a major impact on animal and human health and an economic burden (Harrus and Baneth, 2005)

* Corresponding author.

E-mail address: oleguss1@gmail.com (O. Mediannikov).

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100353>

Received 13 April 2019; Received in revised form 16 November 2019; Accepted 16 November 2019

Available online 18 November 2019

2405-9390/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Otranto et al., 2010).

Canine leishmaniosis (CanL) is the most common vector-borne protozoa disease caused by *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). The parasite is mainly transmitted by the infected bite of females of *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. It is a severe systemic disease characterized by a wide range of overlapping clinical signs (e.g., lymph node enlargement, weight loss, and splenomegaly). Dogs with CanL may also present skin alterations (alopecia, furfureaceous dermatitis, ulcers, and nodular lesions) (De Tommasi et al., 2013).

Trypanosomes found in mammals (including humans) are blood and sometimes tissue parasites of the order Kinetoplastida, family of Trypanosomatidae, genus *Trypanosoma*, principally transmitted by biting insects, in which most of them undergo a biological cycle (Desquesnes et al., 2013). Some species have a veterinary and economic interest and can infect domestic dogs. This includes *Trypanosoma brucei* *brucei* and *T. congolense*, the causative agents of Nagana or a similar disease in Africa and Asia, as well as *T. evansi*, the etiological agent of surra and the so-called “mal de cadeiras” outside Africa. Domestic dogs are also important reservoirs of *T. cruzi* in the Americas (Eloy and Luchois, 2009).

Canine babesiosis and hepatozoonosis, caused by Apicomplexa protozoa of the genus *Babesia* and *Hepatozoon*, respectively, are protozoal tick-borne diseases. *Babesia canis*, *B. vogeli*, *B. rossi* and *B. gibsoni* are the main causative agents of babesiosis (Otranto et al., 2009). Their geographical distribution and therefore the presence of babesiosis depends largely on the habitat of the relevant vector tick species, with the exception of *B. gibsoni* where evidence of dog-to-dog transmission indicates that infection can be transmitted between fighting dog breeds regardless of the limits of the vector tick infestation (Bilić et al., 2018). Clinical characteristics can vary considerably depending on the different species and strains involved and the factors that determine the host's response to infection such as immune status, age and the presence of co-infections. One of the main clinical manifestations is hemolytic anemia with systemic inflammatory responses observed in severe canine babesiosis (Schnittger and Florin-Christensen, 2018).

Hepatozoon canis and *H. americanum* are the agents of canine hepatozoonoses that range from being asymptomatic with low levels of parasitemia to a severe life-threatening illness characterized by high levels of parasitemia, fever, anemia, and lethargy (Baneth, 2011). These two *Hepatozoon* species are genetically and geographically distinct. *H. canis* is distributed in Africa, southern Europe, the Middle East and Asia, and is mainly transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* s.l. and *Haemaphysalis longicornis*. *H. americanum* is found in the Americas and is transmitted by *Amblyomma maculatum* (Qiu et al., 2018).

In Algeria, the largest country in Africa, there are three types of climate: (1) the mild Mediterranean climate of the coast; (2) the transitional climate of the northern hills and mountains in the north of the country, which is slightly more continental and moderately rainy, and (3) the desert climate of the vast area occupied by the Sahara, when reaching the Algerian south. The northern climate is conducive to the development of arthropods such as ticks, fleas, lice, mosquitoes and sandflies and therefore to diseases that can be transmitted; especially canine vector-borne diseases (Gage et al., 2008) (Thiébaud and Moatti, 2016). However, only limited data are available on canine protozoan vector-borne infections. Although CanL is known to be endemic in northern Algeria (Adel et al., 2015) and other North African countries (Diouani et al., 2014) (Rami et al., 2003), to date, no information is available on *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp. or *Hepatozoon* spp. infections in dogs in Algeria. Therefore, the aim of this study is to assess the prevalence and the diversity Kinetoplastida and Apicomplexa parasites in dogs from Kabylia (Northern Algeria) using molecular and serological techniques.

2. Material and methods

2.1. Ethic statement

The study was carried out in accordance with Algerian legislation guidelines. In addition, the samples were collected after obtaining a verbal consent from dog owners by a veterinarian specialist. Risk assessment was submitted to and approved by the ethics committee and decision board of the veterinary practitioners from the wilayas of the North of Algeria. These institutions are affiliated with the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development (Directions des Services Vétérinaires). Protocol of the study was also approved by the scientific college (Procès-Verbal du CSI N°6, 2018) at the Veterinary Science Institute, University Constantine 1, Algeria. To facilitate field work, collaborations were established with veterinary doctors and their assistants working in these establishments.

2.2. Study area and dogs

The study was conducted in Kabylia, a cultural and natural region in northern Algeria. It is part of the Tell Atlas mountain range, and is located on the shores of the Mediterranean Sea. It covers several wilayas (provinces) of Algeria: the whole of Tizi-Ouzou and Bejaia, most of Bouira and parts of the wilayas of Boumerdes, Jijel, Setif and Bordj Bou Arreridj. Recent study showed prevalence of 10% of CanL in dogs from Kabylia (Mouloua et al., 2017). No data on the other canine vector-borne protozoa are available. This last prevalence (10%) was chosen as attended prevalence for this study. By using 5% as margin of error and 95% of confidence level, the sample size must be at least 140 samples for a cross-sectional survey.

In May 2018, blood samples were collected from 227 dogs living in three Kabylia wilayas, that included 97 dogs from Bouira (36°22'29.6"N, 3°54'7.2"E), 98 dogs from Setif (36°11'28.03"N, 5°24'49.43"E) and 32 dogs from Tizi-Ouzou (36°42'42.55"N, 4°2'45.28"E) (Fig. 1). A questionnaire was completed for each dog with information on age, sex, breed, lifestyle and physical examination results. A clinical score (CS) of 0 to 4 was given to each dog according to the number of clinical signs identified with: CS0 for dogs without clinical signs, CS1: for dogs with one or two clinical signs, CS2: if dogs have three or four clinical signs, CS3: five or six signs and CS4 for dogs with more than six clinical signs. In general, registered signs were compatible with CanL and comprised fever, anorexia, dermatological manifestations, lymphadenopathy, body weight loss, lethargy, muscular atrophy, onychogryphosis, ulceration, ocular manifestations, splenomegaly, epistaxis and neurological disorders. Whenever available, ticks were collected.

2.3. Samples

A volume of six ml of blood were collected from the radial vein of each dog. One drop of whole blood from each sample was used for rapid on-site leishmaniasis screening at the time of sampling and the remaining blood was transferred to EDTA and dry tubes for molecular and serological screening, respectively. Sera were recovered from the dry tubes after centrifugation (10 min, 3000 g). Once collected, samples were stored at 4 °C overnight and then frozen at -20 °C until further use.

2.4. Rapid Immuno Migration (RIM™) test and quantitative IFAT for the detection of *L. infantum* specific antibodies

Two serological tests were used: the immunochromatographic based qualitative rapid test WITNESS® *Leishmania* (Zoetis, France) and the quantitative indirect immunofluorescence antibody test (IFAT). The rapid test was carried out according to the manufacturer's instructions using one drop of 10 µL of whole blood from each dog directly after

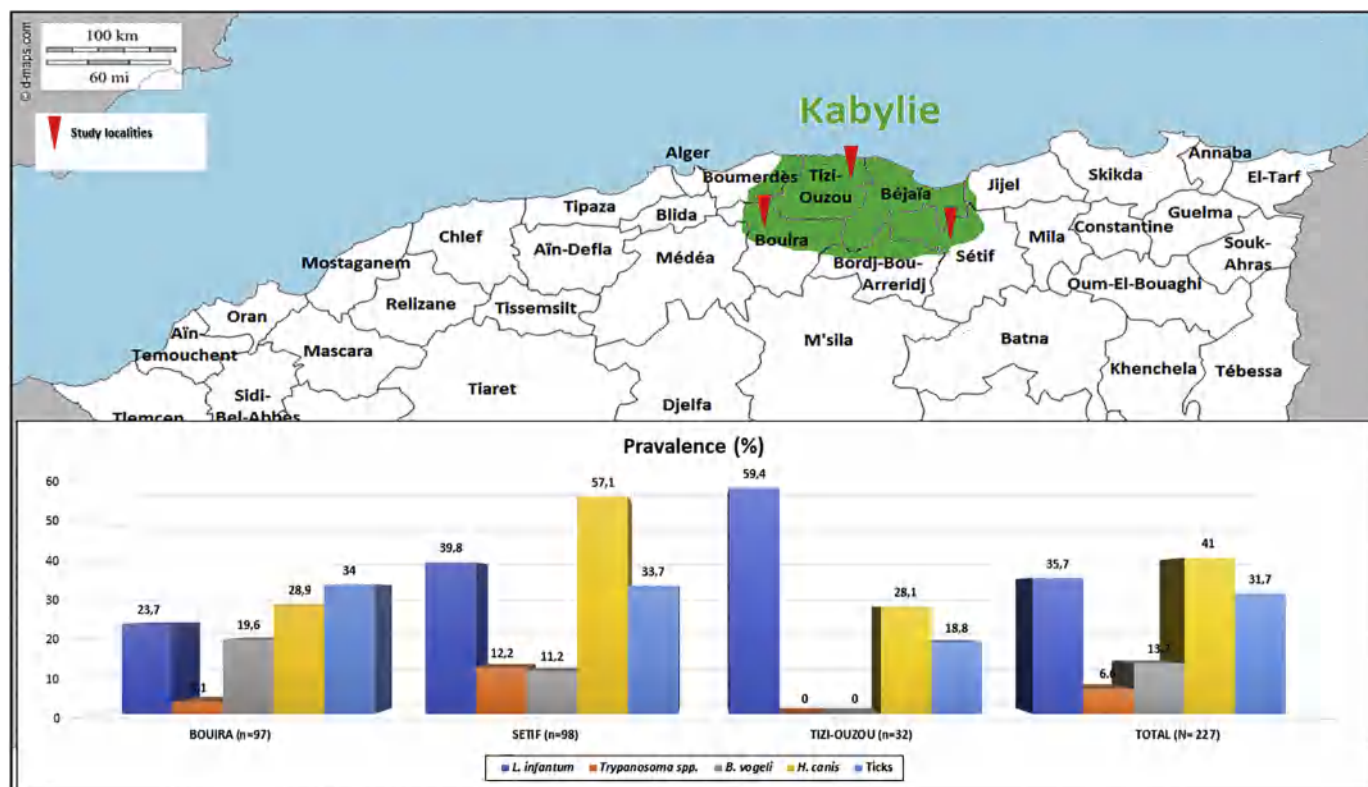


Fig. 1. Carte shows the three localities (Tizi-Ouzou, Bouira and Setif) of the study area (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Kabylia.gif>) and prevalence of canine vector-borne protozoa in this area.

sampling. IFAT for the detection and the titration of specific immunoglobulins G (IgG) anti-*L. infantum* was performed on sera. Plate wells were sensitized by 20 μ L of *L. infantum* commercial antigens (Zoetis, France). The samples were diluted to 1:50 with PBS, 20 μ L of every serum dilution was applied per well and plates were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. They were then washed twice with PBS for 5 min and once with distilled water. After the washing, 20 μ L of IgG anti-dog conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Cambridge House, UK) were added into each well after dilution at 1:200. The plates were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$ C in the dark. The washing procedure was repeated as described above. Then, some drops of mounting medium Fluoprep (bioMérieux, France) were added on the cover slips. The reading was performed using a fluorescence microscope and each well was compared with the fluorescence of positive and negative controls added in each plate. Positive control was a known serum of French dog infected by *L. infantum* (at the dilution, 1:1600), and negative control was a known serum of non-infected dog by *Leishmania* form IHU – Méditerranée Infection lab collection. To avoid errors of observation, all samples were examined by two different investigators. All samples negative at 1:50 were considered negative and no further dilutions was performed. All positive results were further investigated using a two-fold serial dilution IFAT at 1:100 and 1:200. If a high positive result was observed, the samples were diluted to both 1:400, 1:800 and 1:1600. At this point, the samples were classified as a high positive for *L. infantum* (> 1:1600).

2.5. Molecular assays

2.5.1. Blood DNA extraction

Total DNA was extracted from 200 μ L of blood after digestion with proteinase K at + 56 $^{\circ}$ C overnight using a commercial DNA extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit[®], [Qiagen, Courtaboeuf, France]) and performed on BIOROBOT EZ1 (Qiagen, Qiagen, Courtaboeuf, France) per the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 200 μ L of distilled

water and stored at - 20 $^{\circ}$ C.

2.5.2. PCR for the detection of *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia* and *Hepatozoon* spp

Blood samples were screened using real-time polymerase chain reaction (qPCR) assays targeting the 18S rRNA gene for *Leishmania* spp., the 5.8S rRNA gene for *Trypanosoma* spp. and the 5.8S rRNA gene for *Piroplasmida* (Table 1). The specific *L. infantum* qPCR assay based on the amplification of kinetoplast minicircle DNA (kDNA) was performed to quantify the parasite load as previously described (Mary et al., 2004).

qPCR assays were prepared in a final volume of 20 μ L with 10 μ L of Eurogentec Master Mix Roche, 3 μ L of distilled water DNase and RNase free, 0.5 μ L of each forward and reverse primers (concentrated at 20 μ M), 0.5 μ L FAM- labeled probe (concentrated at 20 μ M) (Table 1), 0.5 μ L of UDG and 5 μ L of the DNA template. The amplification was performed in a CFX96 Real-Time system (BioRad Laboratories, Foster City, CA, USA) with the following Roche protocol: a first incubation step at 50 $^{\circ}$ C for two minutes and an initial denaturation step at 95 $^{\circ}$ C for five minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 s and annealing-extension at 60 $^{\circ}$ C for 30 s. Known DNA of the target protozoa was included as a positive control and master mixtures as a negative control for each test. Samples were considered positive when the cycle threshold (Ct) was lower than 35 Ct for all PCR assays except for the 18S-based *Leishmania* spp. PCR, we considered sample as positive when Ct is lower than 38.

2.5.3. PCR amplification

Positive samples by qPCR were amplified by conventional PCR assays targeting fragment of genes ITS II for *Leishmania* spp., ITS I for *Trypanosoma* spp. and 18S rRNA for *Piroplasmida*. Screening for *Hepatozoon* spp. was evaluated by conventional PCR using primers that amplify a fragment of approximately 600 bp of the 18S ribosomal DNA gene (Table 1). PCR amplifications were performed in a Peltier PTC-200 model thermal cycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA).

Table 1
Sequences of primers set used for detection and species identification in this study.

Targeted microorganisms	Target gene	Name	Primers (5'-3') and probe	Tm	References
Leishmania spp.	18S	Leish. F	GGTTTAGTGCCTCCGGTG	60 °C	Medkour et al. submitted
		Leish. R	CGGCCATAAGATCC CCAA		
		Leish. P*	FAM-CGGCCGTAACGCCCTTTCAACTCA -TAMRA		
		Leish. F1	CTGTGACTAAGAAGCGTGAC		
		Leish. R1	AGGCCGAATAGAAAAGATACGT		
	kDNA	RV1	CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG	60 °C	Mary et al., 2004
		RV2	CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA		
		Probe. Leish*	FAM-TTTTTCGAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA		
		LGITSF2	GCATGCCATATTCTCAGTGTC		
		LGITSR2	GGCCAACGCGAAGTTGAATTC		
Trypanosoma spp.	5.8S	Tryp 5.8SF	CAACGTGTCGGATGGATGA	60 °C	Medkour et al. submitted
		Tryp 5.8SR	ATTCTGCAATGATACCATTATC		
		Tryp 5.8S P*	FAM-GTTGAAGAAGCGAGCAAAGGCGAT-TAMRA		
	ITS I	ITS1-CF	CCGGAAGTTCACCGATATTG	58 °C	Njiru et al., 2005
		ITS1-BR	TTGCTGCGTCTTCAACGAA		
Piroplasmida	5.8S	5.8S-F5	AYYKTYAGCGRTGGATGTC	60 °C	Dahmana et al., 2019
		5.8S-R	TCCGAGRAGTCKCAAGTC		
		5.8S-S*	FAM-TTYGCTGCGTCTTCATCGTTGT-MGB		
	18S	piro18S-F1	GCGAATGGCTCATTAAACA	58 °C	
		piro18S-R4	TTTCAGMCTTGCACCATACT		
Hepatozoon spp.	18S	H14Hepa18SFw	GAAATAACAATACAAGGAGTTAAATGCT	58 °C	Hodžić et al., 2015
		H14Hepa18SRv	GTGCTGAAGGAGTCGTTTATAAGA		

Abbreviations

Tm: Annealing temperature *: Probe.

Reaction mixtures were prepared in 50 µl volume, including 25 µl Amplitaq gold master mix, 1 µl of each primer, 5 µl of DNA template, and 18 µl of distilled water. Positive and negative controls were added to each reaction. The thermal cycling protocols were: incubation step at 95 °C for 15 min, 40 cycles of one minute at 95 °C, 30 annealing at a different hybridization temperature for each PCR assays and one minute at 72 °C and a final extension step for five minutes at 72 °C (Table 1). All amplicons were visualized in electrophoresis on 1.5% agarose gels.

2.6. Sequencing and phylogenetic analysis

All positive amplicons were purified using NucleoFast 96 PCR plates (Macherey Nagel EURL, Hoerdt, France) as per the manufacturer's instructions and sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an ABI automated sequencer (Applied Biosystems). The electropherograms obtained were assembled and edited using ChromasPro software (ChromasPro 1.7, Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia) and compared with those available in the GenBank database by NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). All sequences of *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia* and *Hepatozoon* species obtained were analyzed using BLAST and compared to those available in the GenBank database. Phylogenetic and molecular evolutionary analysis was inferred using the maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameter for nucleotide sequences and used on MEGA software version 6.06 (<https://www.megasoftware.net/>). Statistical support for the internal branches of the trees was evaluated by bootstrapping with 100 iterations.

2.7. Statistical analysis

IBM SPSS statistics version 23 software was used for the statistical analysis. After set of databases in XL 2010, we realized a descriptive study of the detection of infections in dogs and the number of co-infections detected in each dog, according to the results of the IFAT for leishmaniosis, qPCRs for *Trypanosoma* spp. and *Piroplasmida* and the standard PCR performed for *Hepatozoon* spp. The association between infections, origin, age, sex, breed, aptitude, clinical conditions of dogs and tick's carriage were evaluated using χ^2 test. The exact Fischer test

was used when the percentages were low. Statistically significant was consider at P-value < .05. The comparison between serological tests for CanL diagnosis was performed using the McNemar test in XLSTAT Addinsoft version 2018.7. To investigate the relationship between clinical manifestations and *L. infantum* antibody titers, we transformed qualitative variable of clinical scores (CS0 to CS4) into quantitative variables (from 0 to 4, respectively) and Spearman's test correlation was performed in XLSTAT. Quantitative variables were performed according to the number of infections as follow: 0 for no infection, 1: only one pathogen, 2: infection with two pathogens, 3: infection with three pathogens and 4: four pathogens. Then, we established the relationship between clinical manifestations (clinical scores) and the number of infections (Spearman correlation) in XLSTAT software version 2018.7.

3. Results

3.1. Signalment and clinical status

Age was available for all dogs with a median sampling age of 3.5 years and a range of 6 months to 13 years. Dogs are distributed according to their age as follows: 47 juveniles [6 month – 2 years], 108 young dogs [2–4 years], 39 adults [4–6 years] and 33 oldies [> 6 years] dogs. Seventy-two dogs were females and 155 males. 108 dogs were pure bred while the others (119) were mongrel. In addition, 77 (34%) dogs presented at least one clinical sign mentioned above and 150 (66%) were apparently healthy. Dogs were classified according to their clinical signs and a clinical score (CS) was given for each one. One hundred-fifty were asymptomatic (CS0), 32 were classified as CS1 with one or two signs, 31 were classified in CS2 with three or four signs, nine were as CS3 with five of six signs and finally, five dogs were classified as CS4 with many clinical signs (> 6 signs). Among dogs, 32% (72/227) carried ticks.

3.2. *Leishmania infantum* specific antibodies detection

L. infantum antibodies were detected using Rapid Immuno Migration (RIM™) test and quantitative IFAT, which is considered as gold standard for the diagnosis of CanL (World Organisation for Animal Health (OIE), 2018). Antibodies (IgG) were detected in 36% (81/227) of dogs using IFAT (Table 2). We performed a serial dilution for the positive sera.

Table 2
Prevalence and risk factors associated to canine vector-borne protozoans in this study.

Risk factor	L. infantum				Trypanosoma spp.				B. vogeli				H. canis				Ticks		
	IFAT(No. Pos)		PV		qPCR(No. Pos)		PV		qPCR(No. Pos)		PV		qPCR(No. Pos)		PV		Collected(No. Pos)		
	Positive	Negative	Witness(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	qPCR(No. Pos)	PV	Collected	PV	
Prevalence	35.7	81	31.7	72	4.8	11	6.6	15	13.2	30	-	41	93	31.7	72	-	31.7	72	
	64.3	146	68.3	155	95.2	216	93.4	212	86.8	197	-	59	134	68.3	155	-	68.3	155	
Region																			
BOUIRA	23.7	23	18.6	18	0.001	4	3.1	3	0.01	19.6	0.013	28.9	28	0.00	34.0	0.00	34.0	33	
SETIF	39.8	39	35.7	35	6.1	6	12.2	12	11.2	11	0.013	57.1	56	0.00	33.7	0.00	33.7	33	
TIZI-OUZOU	59.4	19	59.4	19	3.1	1	0.0	0	0.0	0	0.013	28.1	9	0.00	18.8	0.00	18.8	6	
Age																			
[0-2]	23.4	11	19.1	9	0.13	3	10.6	5	0.20	31.9	0.00	42.6	20	0.52	29.8	0.00	29.8	14	
[2-4]	36.1	39	33.3	36	6.5	7	5.6	6	8.3	9	0.00	37.0	40	0.00	29.6	0.00	29.6	32	
[4-6]	38.5	15	33.3	13	2.6	1	10.3	4	12.8	5	0.00	41.0	16	0.00	33.3	0.00	33.3	13	
> 6	48.5	16	42.4	14	0.0	0	0.0	0	3.0	1	0.00	51.5	17	0.00	39.4	0.00	39.4	13	
Sex																			
Female	29.2	21	22.2	16	0.16	2	4.2	3	0.4	20.8	0.02	40.3	29	0.88	25.0	0.02	25.0	18	
Male	38.7	60	36.1	56	5.8	9	7.7	12	9.7	15	0.02	41.3	64	0.88	34.8	0.02	34.8	54	
Breed																			
Defined	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0.00	0.0	0	
Mongrel	32.8	39	29.4	35	2.5	3	7.6	9	0.6	14.3	0.61	40.3	48	0.83	34.5	0.61	34.5	41	
Aptitude																			
Farm	12.9	4	9.7	3	0.001	1	3.2	1	0.18	12.9	0.34	41.9	13	0.37	22.6	0.34	22.6	7	
Guard	50.7	38	46.7	35	1.3	1	6.7	5	13.3	10	0.34	36.0	27	0.37	30.7	0.34	30.7	23	
Hunting	37.0	27	31.5	23	9.6	7	11.0	8	13.7	10	0.34	49.3	36	0.37	38.4	0.34	38.4	28	
Pet	11.1	1	11.1	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.34	22.2	2	0.37	11.1	0.34	11.1	1	
Shepherd	28.2	11	25.6	10	5.1	2	2.6	1	15.4	6	0.34	38.5	15	0.37	33.3	0.34	33.3	13	
Dog's status																			
Sick dogs	88.3	68	81.8	63	0.00	10	6.5	5	0.60	15.6	0.45	53.2	41	0.01	39.0	0.45	39.0	30	
Healthy	8.7	13	6.0	9	0.7	1	6.7	10	12.0	18	0.45	34.7	52	0.01	28.0	0.45	28.0	42	
Clinical score																			
CS0	8.7	13	6.0	9	0.00	1	6.7	10	0.46	12.0	0.26	34.7	52	0.63	28.0	0.26	28.0	42	
CS1	81.3	26	68.8	22	3.1	1	3.1	1	25.0	8	0.46	50.0	16	0.63	31.3	0.46	31.3	10	
CS2	90.3	28	87.1	27	19.4	6	12.9	4	9.7	3	0.46	51.6	16	0.63	48.4	0.46	48.4	15	
CS3	100.0	9	100.0	9	11.1	1	0.0	0	11.1	1	0.46	55.6	5	0.63	22.2	0.46	22.2	2	
CS4	100.0	5	100.0	5	40.0	2	0.0	0	0.0	0	0.46	80.0	4	0.63	60.0	0.46	60.0	3	
Ticks																			
Presence	44.4	32	40.3	29	0.06	3	9.7	7	0.08	13.9	0.83	45.8	33	0.31	-	0.83	-	33	
Absence	31.6	49	27.7	43	5.2	8	5.2	8	12.9	20	0.83	38.7	60	0.31	-	0.83	-	60	

Abbreviations
IFAT: immunofluorescence antibody test PV: P-value CS: clinical score (No. Pos): Number of positive.

Positive dogs had different IgG titers and 12.3% (10/81) were positive at 1:50 dilution. 28.4% (23/81) was positive at 1:100 dilution, 24.7% (20/81) at 1:200 dilution, 6.2% (5/81) at 1:400 dilution, 20.1% (17/81) at 1:800 dilution and 7.4% (6/81) were positive at dilution above 1:800. The prevalence using the RIM™ test (WITNESS® Leishmania) was 32% (72/227). All but one of the rapid test positive samples were IFAT positive. On the other hand, IFAT was more sensitive and 10 samples were positive while they were negative in the WITNESS® Leishmania test. Statistical differences were observed among the results of these tests (McNemar Test, p-value = .012) with 0.88 (0.78–0.94) and 0.99 (0.96–1.00) respectively for the sensitivity and specificity of the rapid test.

3.3. Pathogen DNA detection

Blood samples from a total of 227 dogs from the three different geographical zones were analyzed. Sixty two percent (141/227) of the dogs had at least one infection. qPCR assays showed a prevalence of 4.8% (11/227) for Leishmania with an average parasitemia of 7.10^6 parasite/mL (min: 4; max: 38.10^6) of blood, 6.6% (15/227) for Trypanosoma spp. and 13.2% (30/227) for Babesia spp. PCR detects pathogens. DNA for Hepatozoon canis was detected in 41% (93/227) of dogs using conventional PCR for the screening (Table 2).

Regarding mono-infection, 36% (82/227) of dogs were infected by one pathogen with: 14% (32/227) being infected with *L. infantum*; 1% (2/227) infected with *Trypanosoma* spp.; 4% (9/227) of dogs by *B. vogeli* and 17.2% (39/227) with *H. canis*. In addition, co-infections by vector-borne protozoa were detected in 26% (59/227) of dogs, with two, three or even all four pathogens. The most prevalent was co-infection *L. infantum*-*H. canis*, around 16% (36/227) of dogs followed by co-infections with *L. infantum*-*B. vogeli* and *B. vogeli*-*H. canis* and association of these three pathogens in 2.2% (5/227) dogs for each type. Co-infections with *Trypanosoma* spp. – *H. canis* and triple infection combining the latter two *B. vogeli* pathogens with 1% *B. vogeli* were less frequent (2/227). Other co-infections such as: *L. infantum*-*Trypanosoma* spp.-*B. vogeli*, *L. infantum*-*Trypanosoma* spp.-*H. canis* and *Trypanosoma* spp.-*B. vogeli* were rare with only one case (0.4%). Finally, DNA for the four pathogens was detected in one dog (Table 3).

3.4. Pathogen infections versus risk factors

Regarding the prevalence of the protozoan infection according to the region: in Bouira, 24% (23/97) were positive for CanL, 3.1% (3/97) for *Trypanosoma* spp., 19.6% (19/97) for *B. vogeli*, 29% (28/97) for *H. canis*. The prevalence in Setif was as follows: 39.8% (39/98) for *L.*

infantum, 12.2% (12/97) for *Trypanosoma* spp., 11.2% (11/97) for *B. vogeli* and 57.1% (56/98) for *H. canis*. For Tizi-Ouzou, 59.4% (19/32) were infected with *L. infantum*, no positive was detected for *Trypanosoma* spp. and *B. vogeli* and 28.1% were infected with *H. canis*. Statistically significant differences were found between the region and the prevalence of pathogens (P-value < .01). The dogs were classified into four age classes, as described above. No association could be observed between age and prevalence of all pathogens except *B. vogeli*, whereas prevalence varied with age and juvenile dogs were more sensitive at 31.9% (15/47), (P-value < .001). Also, we noted a statistically significant difference between the prevalence of this same pathogen vs sex (P-value = .02). Females were found to be more infected (20.8%) (15/72) with *B. vogeli* than males (9.7%) (15/155). In addition, we found that infection rates are the same in dogs whatever their breed (P-value > .08). By contrast, *L. infantum* infection varied according to dog's aptitude. Guard dogs were more infected, 50.7% (38/75), followed by hunting dogs, 37% (27/73), shepherd, 28.2% (11/39), farm dogs 12.9% (4/31) and finally pet with 11% (1/9) (P-value = .001). A total of 567 ticks were collected from 72 dogs. No link was found between tick infestation and pathogen prevalence (P-value > .08).

3.5. Pathogen infection versus clinical signs

We investigated the relationship between the dog's condition (sick or healthy) and pathogenic infections. No link was found between the dog's condition and *Trypanosoma* spp. infections (P-value = .6) and *B. vogeli* (P-value = .45). By contrast, statistically significant differences were found between dog's condition and *L. infantum* IgG detection (P-value < .001). 88% of sick dogs (68/77) had *L. infantum* IgG, whereas these IgGs were detected in 8.7% (13/150) of healthy dogs. The same was true for the relationship between *H. canis* infection and dog status (P-value = .01). 53.2% (41/77) of sick dogs were *H. canis* infected while 34.7% (52/150) of healthy dogs were found infected. However, this difference seems to be influenced by the association with other protozoa; and when we considered only dogs mono-infected with *Hepatozoon*, we found 5.2% (4/77) in sick dogs and 23.3% (35/150) in healthy dogs, (P-value = .0001) in favor of asymptomatic dogs. *Hepatozoon* infection is therefore much more asymptomatic in dogs.

The clinical signs revealed during the physical examination, described above, are correlated with the clinical manifestations of CanL as described in the LeishVet guide (Luis Cardoso, 2011). Here, we have tried to understand whether there is a correlation between clinical manifestations and antibody titers of *L. infantum* in CanL. We found a good positive correlation (Spearman correlation coefficient: 0.8; min: -1; max: 1), P-value = .0001. We explored the hypothesis that clinical

Table 3
Frequency of infections and co-infection on surveyed dogs.

	Bouira n = 97		Setif n = 98		Tizi-Ouzou n = 32		Total	N = 227
Infections	No. Positive	%	No. Positive	%	No. Positive	%	No. Positive	%
Mon-infection	33	34,0%	34	34,7%	15	46,9%	82	36,1%
Leishmania infantum	10	10,3%	9	9,2%	13	40,6%	32	14,1%
Trypanosoma spp.	1	1,0%	1	1,0%	0	0,0%	2	0,9%
Babesia canis vogeli	6	6,2%	3	3,1%	0	0,0%	9	4,0%
Hepatozoon canis	16	16,5%	21	21,4%	2	6,3%	39	17,2%
Co-infection	19	19,6%	35	35,7%	5	15,6%	59	26,0%
L + B	4	4,1%	1	1,0%	0	0,0%	5	2,2%
L + H	7	7,2%	24	24,5%	5	15,6%	36	15,9%
L + B + H	2	2,1%	3	3,1%	0	0,0%	5	2,2%
L + T + B	1	1,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,4%
L + T + H	0	0,0%	1	1,0%	0	0,0%	1	0,4%
L + T + B + H	0	0,0%	1	1,0%	0	0,0%	1	0,4%
T + B	1	1,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,4%
T + H	0	0,0%	2	2,0%	0	0,0%	2	0,9%
T + B + H	0	0,0%	2	2,0%	0	0,0%	2	0,9%
B + H	4	4,1%	1	1,0%	0	0,0%	5	2,2%
TOTAL	52	53,6%	69	70,4%	20	62,5%	141	62,1%

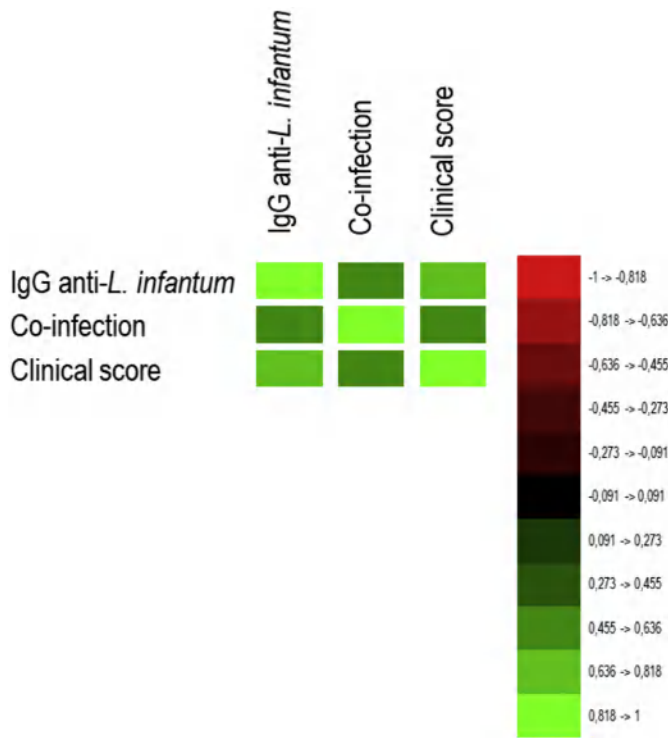


Fig. 2. Correlation matrices showed the relationship between *L. infantum* IgG titers, Clinical score and co-infection in dogs surveyed in this study.

manifestations varied according to the number of pathogen infecting dogs. A positive correlation was found between these last two variables (correlation coefficient: 0.6 and P-value = .0001) (Fig. 2).

3.6. Sequencing results and phylogeny

The BLAST comparison of the ten partial sequences obtained for the ITS2 gene of *Leishmania* revealed 97–99% homology with *L. infantum* sequences available in GenBank database (i.e: MH605316; KU680960; KU680959) (Fig. 3. A). Among the nine partial sequences obtained from the ITS1 gene of *Trypanosoma*, seven of them have a 99% identity with *T. evansi* (AB551920; FJ712716; AB551922; etc.) deposited in the GenBank. Obtained sequences from two other dogs when BLASTed showed 92–93% identity to *T. congolense* (FJ712718; MG255204) (Fig. 3. B). These two dogs had moderate clinical status (CS2). In addition, sequencing of 18S rRNA genes of Piroplasmida and Hepatozoon spp. allowed news genotypes of *B. vogeli* and *H. canis* to be found (Fig. 3. C and D).

4. Discussion

Dogs are competent reservoirs as host for several pathogens, some of which are zoonotic, and their increased relationship with humans in developing countries as companions poses new public health problems (Otranto et al., 2009). In recent decades, this has considerably increased the number of studies on canine vector-borne diseases (CVBD) in these countries. In contrast, data on CVBD in many African countries, their frequency and diversity, are very insufficient. These are casually absent for some canine vector-borne protozoan diseases in Algeria and

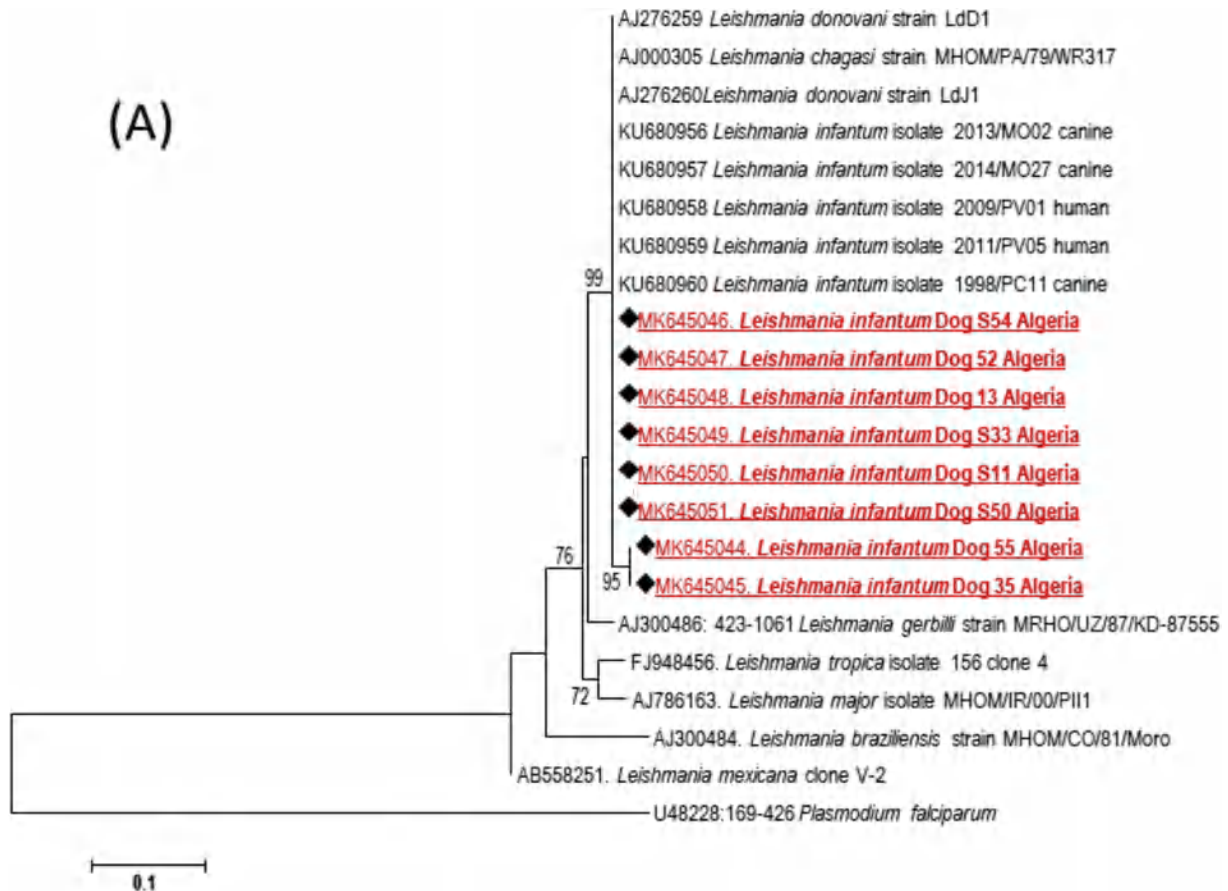


Fig. 3. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method on the Tamura-Nei model based on the partial nucleotide sequences (360 pb) of ITS2 rRNA for *Leishmania* spp. (A); (250 pb) of ITS1 for *Trypanosoma* spp. (B); (900 pb) of 18S rRNA for Piroplasmida (C) and (600 pb) of 18S rRNA for Hepatozoon spp. (D). Trees highlight the positions of identified pathogens in this study.

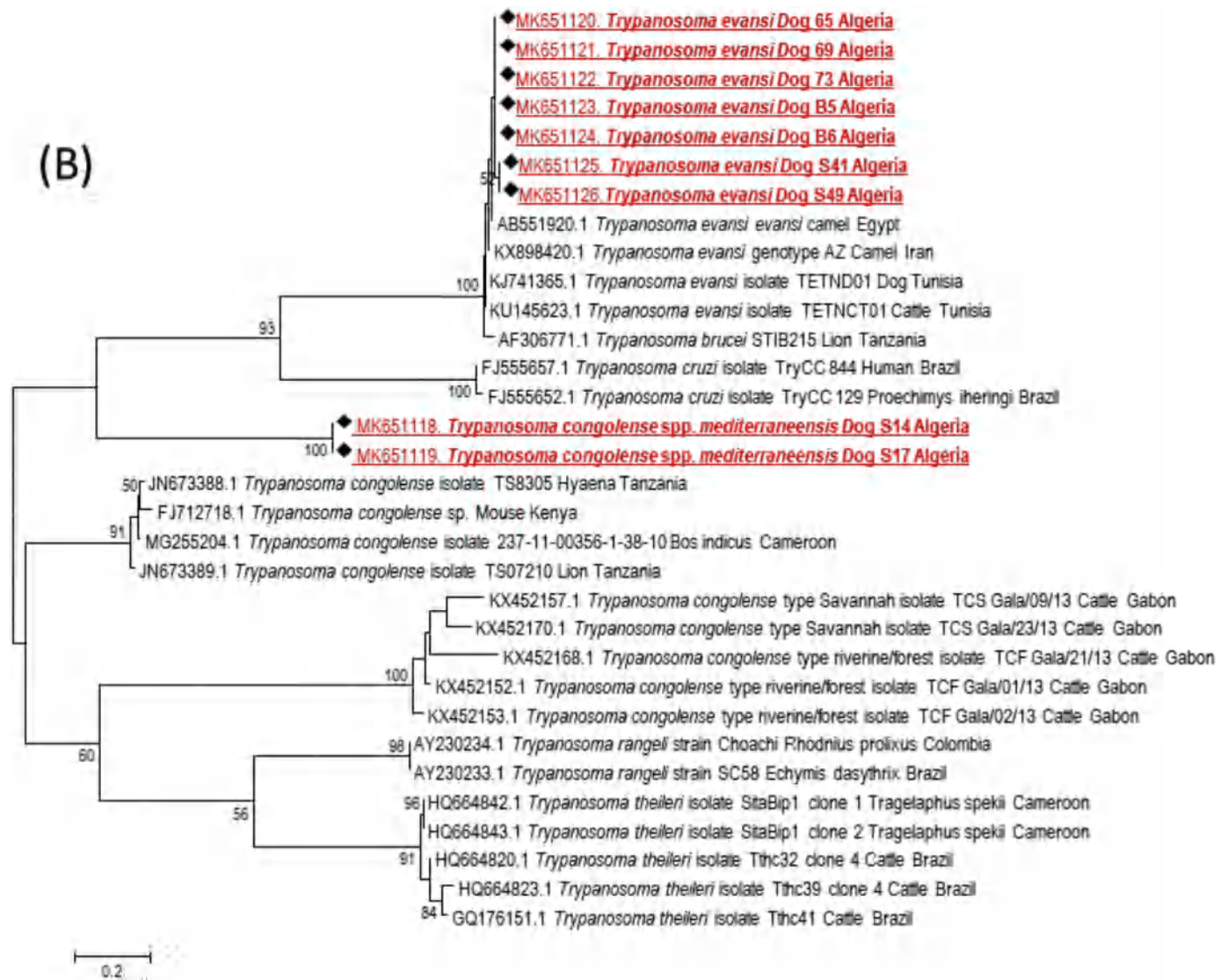


Fig. 3. (continued)

all Northern Africa. This study constitutes the first report of *Trypanosoma* spp. *B. vogeli* and *H. canis* infection in dogs from Kabylia (Algeria). In addition, it updates the epidemiological status historical outbreak (Kabylia) of visceral leishmaniasis in Algeria, where a high prevalence of *L. infantum* infection has been detected in dogs. Also, positive correlation was observed between co-infections with these vector-borne pathogens, CanL, and the number of clinical signs identified in dogs. Sixty two percent of dogs presented at least one infection and 26% were found to be co-infected.

We detected *L. infantum* antibodies in 35.7% and 31.7% of dogs using IFAT and WITNESS® Leishmania rapid test, respectively. Sensitivity (88%) and specificity (99%) of the rapid test are good compared to the IFAT test. In a study compared different serological tests, sensitivity and specificity of WITNESS® Leishmania test were 58% and 100%, respectively, (Rodríguez-Cortés et al., 2013). The prevalence of IFAT ranged from 27 to 47% in the study including dogs from six localities in northern Algeria (Adel et al., 2015). Recently, a study conducted on 603 dogs from Kabylia reported an overall seroprevalence of 10% with a significant relationship between the density of phlebotomes, especially *Phlebotomus perniciosus* and *P. perfiliewi*, the seroprevalence of CanL as well as the reported human leishmaniasis cases in the region (Mouloua et al., 2017). Sequencing of ITS2 gene showed *L. infantum* identity in all PCR positive dogs. Our results suggest the

persistence of a *L. infantum* transmission cycle with possible outbreaks of CanL and/or human visceral leishmaniasis in this focus. Therefore, a national control program against leishmaniasis should be implemented.

Trypanosomes were detected in 6.6% of the Kabylia dogs. No data are available on the presence of these protozoa in Algerian dogs. Our molecular assay by sequencing showed: 1) a high genetic diversity of two sequences obtained on two sick dogs with general clinical signs such as weight body loss, lethargy and hyperthermia, with the closely related species of trypanosomes. These sequences were closely identical and exhibited 92–93% identity with *T. congolense*. We proposed a new entity as sub-species: *T. congolense* spp. *mediterraneensis*. *T. congolense* remains one of the most important agent of canine trypanosomiasis (Ogbu et al., 2017) and livestock diseases in Sub-Saharan Africa, particularly affecting cattle (Morrison et al., 2016). The disease is relatively common in Nigeria due to the high prevalence of *Glossina* spp. which is the main factor responsible for the transmission of African trypanosomiasis (Isaac et al., 2016). Recently, 5.3% (5/95) of dogs from Abidjan were found infected with *T. congolense* (Medkour et al., submitted). Seven dogs were infected with *T. evansi*, the agent of surra and a salivarian trypanosome, originating from Africa. It is reported in North Africa, Southern Europe, Latin America and Asia (Pommier de Santi et al., 2018). It is commonly pathogenic in camels, horses, cattle and occasionally in humans (Elhaig et al., 2013) (Joshi et al., 2005) and

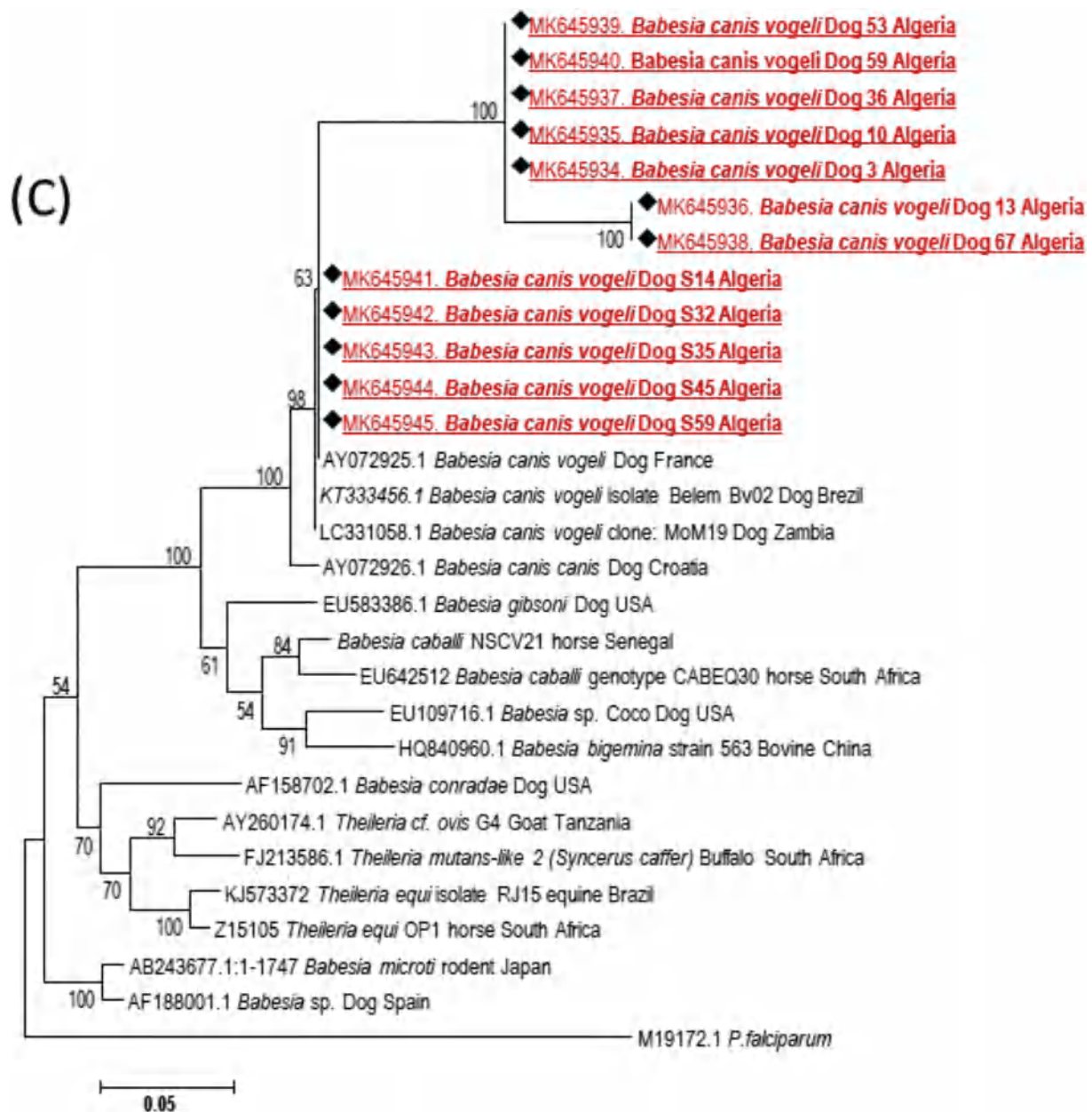


Fig. 3. (continued)

dogs (Desquesnes et al., 2013). *T. evansi* has been reported in Sousse (central Tunisia) in a dog showing clinical signs of trypanosomiasis (Rjeibi et al., 2015) and recently in cattle from northern Tunisia (Sallemi et al., 2018). Two other cases of canine trypanosomiasis have been reported: one in Germany (Defontis et al., 2012) and another in Afghanistan (Aref et al., 2013). Higher-level *T. evansi* infections have been detected in camels in south-eastern Algeria (Bennoune et al., 2013). On the other side of the Mediterranean, *T. evansi* infection was detected in the province of Alicante, Spain, on a camel and equine farm after the introduction of camels from the Canary Islands (Tamarit et al., 2010). The mode of infection of these dogs is very obscure and further research will be needed to resolve this dilemma. The migration of infected animals, such as camels, sheep and cattle, from south to north can be a source of infection for dogs. The competent vector recognized for African trypanosomes (*Glossina* spp.) is not found in Algeria. The vector remains very questionable and other Diptera, such as Tabanidae, can be involved in this transmission, which could explain the appearance of new genotypes (*T. congolense* spp. *mediterraneensis*) adapted to

these vectors.

B. vogeli-infection was found in 13.2% of the sampled dogs. *Babesia canis* is reported in Algeria without conclusive determination of the species in the former subspecies (Matallah et al., 2012). In Tunisia, *B. vogeli* was detected in 6.7% (12/180) of dogs and in 0.6% (1/160) of their ticks *R. sanguineus* (M'ghirbi and Bouattour, 2008). Surveys in Côte d'Ivoire (Medkour et al., submitted), Nigeria (Kamani et al., 2013) and Angola (Luis Cardoso et al., 2016) reported a prevalence of 1.6% (2/123), 0.6% (1/181) and 5.8% (6/103) in dogs, respectively. This species has a global distribution (Dantas-Torres, 2008b) and has been identified in Africa, Asia, Turkey, Australia, North and South America and Costa Rica. In Europe, *B. vogeli* was found in Slovenia, Albania, France, Spain, Portugal and Croatia with a prevalence ranging from 1% to 16.3% (Bilić et al., 2018) (Rojas et al., 2014). The presence of dog's brown ticks the main vector of *B. vogeli* (Otranto, 2018) on surveyed dogs can explain our results.

A high prevalence of *H. canis* was observed in our study (41%). This is the first report in North Africa of this pathogenic protozoan. The

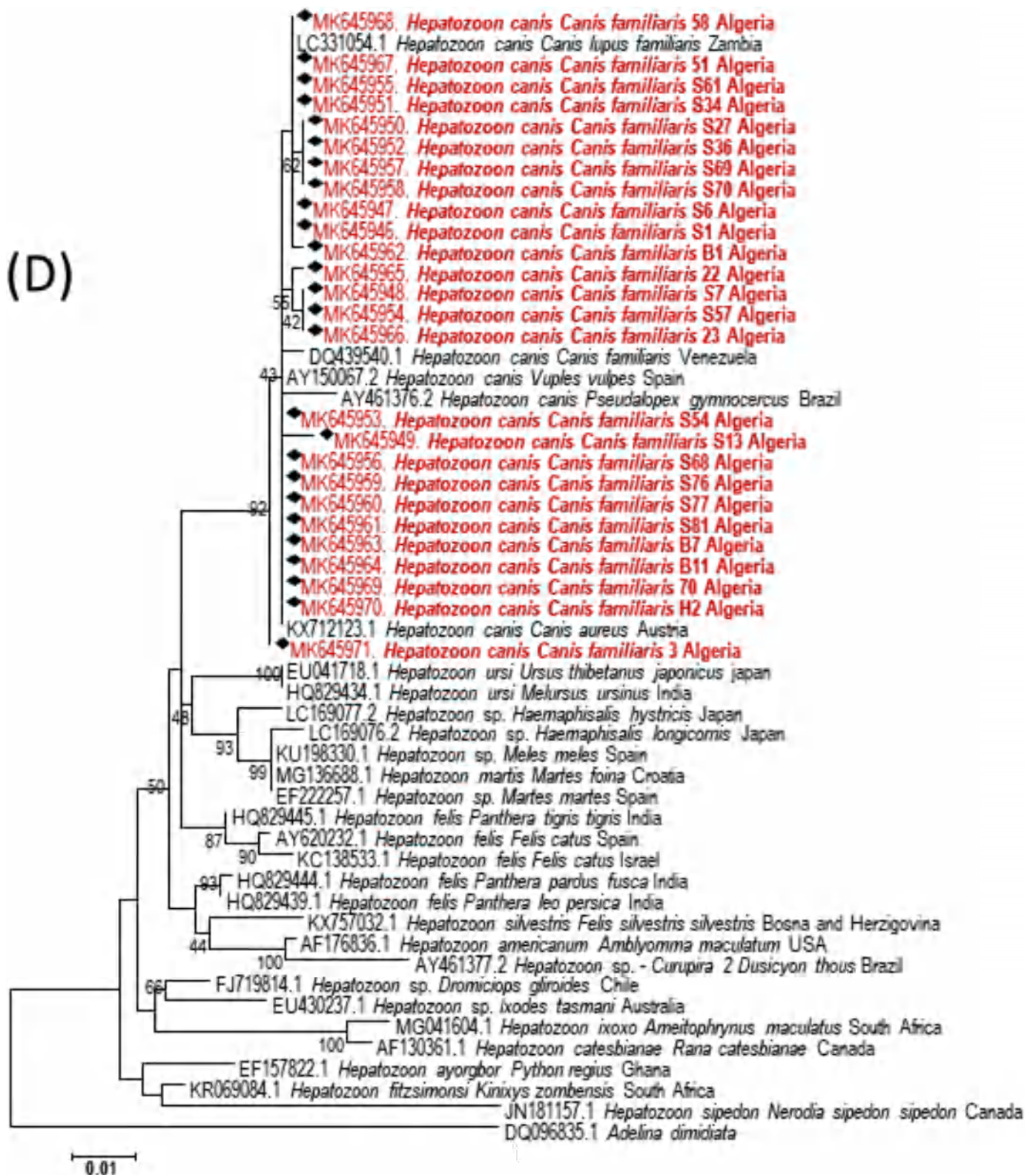


Fig. 3. (continued)

same prevalence was detected in dogs from Nigeria and 21% of their ticks were infected (Kamani et al., 2013). 13% of Zambian dogs and 17.5% in Angola were found infected (Williams et al., 2014) (Luís Cardoso et al., 2016). *H. canis* is distributed in Europe, Asia, Africa and in South America (Naouelle and Ghalmi, 2016). As in the case of *B. vogeli*-infection, infection with *H. canis*, can be explained by the

widespread prevalence of its main tick vectors in Kabylia.

Amount the distract surveyed, the occurrence of infections varied considerably for all four pathogens. Dogs from Tizi-Ouzou are found to be more infected (59.4%) by *L. infantum*, certainly because the region has been endemic for a long time. *Trypanosoma* spp. infection is higher in Setif (12.2%) than the other distracts (0 and 3%). This may be due to

livestock density and livestock trade in this area, which can be the source of dog's infection. *B. vogeli* and *H. canis* infection are less frequent in dogs from Tizi-Ouzou. The tick infestation rate is lower in this region. Juvenile dogs under two years of age have a significantly higher rate of *Babesia* infection than other age groups. These results are consistent with previous studies that have shown that young dogs are more sensitive to babesiosis because of their underdeveloped immune systems (Taylor et al., 2007). No relationship was found between dog's sex and the occurrence of infections, except for *B. vogeli* for which males are more infected. Also, guard dogs presented the higher prevalence for CanL, followed by hunting and shepherd dogs. Because they are often tied and/or live outside their homes, they will be more exposed to phlebotomous bites.

With regard to the clinical condition of the dog in relation to the occurrence of infections, sick dogs were more infected with *L. infantum* and *H. canis* than healthy dogs. The clinical signs identified belong to the physical examination correlated with the CanL signs described in the Leishvet guide (Cardoso, 2011). Sick dogs infected with Hepatozoon usually had one or more other infections and all but four dogs with *H. canis* mono-infection are asymptomatic. (35/39).

In this study, co-infection was diagnosed in 26% of the dogs surveyed. Co-infection with two protozoa was more frequent than with three protozoa and only one dog was infected with all four pathogens. Co-infections by more than one vector-borne pathogen were observed in many studies on canine vector borne diseases (Rojas et al., 2014) (Medkour et al., submitted). Moreover, a positive correlation was found between the clinical score estimated according to the number of clinical signs and *Leishmania* antibody titers detected by IFAT. Therefore, a dog with an advanced stage of the disease has, in this study, a high rate of antibodies. In addition, a positive relationship was found between the clinical score and the number of pathogens infecting dogs. Therefore, co-infections concur to complicate the clinical manifestations. In a study including *Leishmania* infected dogs, positivity to some vector-borne pathogens was associated with more marked clinicopathological abnormalities as well as disease severity with CanL (Baxarias et al., 2018).

5. Conclusion

Our study demonstrates that dogs from Kabylia (Algeria) are frequent hosts of vector-borne protozoa. *Leishmania* infection and co-infections with more than one pathogen are associated with more clinical manifestations. Molecular evidence of canine *Trypanosoma* spp., *B. vogeli* and *H. canis* as well as the high prevalence of *L. infantum* has been brought to the attention of public and animal health authorities and dog owners. Rigorous surveillance and control plans for these canine diseases are in place in this area to contain them, or at least reduce their spread.

Funding

This study was supported by the Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection, the National Research Agency under the program « Investissements d'avenir », reference ANR-10-IAHU-03, the Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and European funding FEDER PRIM1.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All animals sampled in this study were examined with the assistance of their owners. Blood samples were collected by a veterinarian.

Ethical statement

The study was carried out in accordance with Algerian legislation guidelines. In addition, the samples were collected after obtaining a verbal consent from dog owners by a veterinarian specialist. Risk assessment was submitted to and approved by the ethics committee and decision board of the veterinary practitioners from the wilayas of the North of Algeria. These institutions are affiliated with the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development (Directions des Services Vétérinaires). Protocol of the study was also approved by the scientific college (Procès-Verbal du CSI N°6, 2018) at the Veterinary Science Institute, University Constantine 1, Algeria. To facilitate field work, collaborations were established with veterinary doctors and their assistants working in these establishments.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We are grateful to Azzaz M, Lounas A, Hamidat HK, Chaba A, Amara F, veterinarians and dog owners for their valuable help with the field work.

References

- Adel, A., Abatih, E., Speybroeck, N., et al., 2015. Estimation of canine *Leishmania* infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. *PLoS One* 10 (3), e0117313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117313>.
- Aref, M., Yasin, S.M., Bahear, W., Ghulam, Z., Hastie, L., Dennison, T., Deborggraeve, S., 2013. Canine *Trypanosoma evansi* infection in Afghanistan. *Vet. Parasitol.* 197 (3–4), 638–641. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.016>.
- Baneth, G., 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet. Parasitol.* 181 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.015>.
- Baxarias, M., Álvarez-fernández, A., Martínez-orellana, P., Montserrat-sangrà, S., Ordeix, L., Rojas, A., Solano-gallego, L., 2018. Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniasis? *Parasit. Vectors* 1–16.
- Bennoune, O., Adili, N., Amri, K., Benneceb, L., Ayachi, A., 2013. Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: first report. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal* 4 (4), 273–275. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4279620&tool=pmcentrez&pubtype=abstract>.
- Bilić, P., Kuleš, J., Barić Rafaj, R., Mrljak, V., 2018. Canine babesiosis: where do we stand? *Acta Veterinaria* 68 (2), 127–160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>.
- Cardoso, L., 2011. Parasites & Vectors LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniasis. pp. 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>.
- Cardoso, L., Oliveira, A.C., Granada, S., Nachum-Biala, Y., Gilad, M., Lopes, A.P., ... Baneth, G., 2016. Molecular investigation of tick-borne pathogens in dogs from Luanda, Angola. *Parasit. Vectors* 9 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1536-z>.
- Dahmana, H., Amanzougaghene, N., Davoust, B., Fenollar, F., Raoult, D., Mediannikov, O., et al., December 2019. Great diversity of Piroplasmida in Equidae in Africa and Europe Including New Species. *VPRSR* 18, 100332. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100332>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939018302375>.
- Dantas-Torres, F., 2008a. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit. Vectors* 1 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>.
- Dantas-Torres, F., 2008b. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152 (3–4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>.
- de Almeida, M.E., Steurer, F.J., Koru, O., Herwaldt, B.L., Pieniazek, N.J., da Silva, A.J., 2011. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3143–3149.
- De Tommasi, A.S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B., De Caprariis, D., 2013. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit. Vectors* 6 (1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-97>.
- Defontis, M., Richartz, J., Engelmann, N., Bauer, C., Schwierk, V.M., Büscher, P., Moritz, A., 2012. Canine *Trypanosoma evansi* infection introduced into Germany. *Vet. Clin. Pathol.* 41 (3), 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00454.x>.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., Jittapong, S., 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed. Res. Int.* 194176. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-

- Bueno, L., ... Sainz, Á., 2017. Molecular detection of Hepatozoon spp. and Cytauxzoon sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasit. Vectors* 10 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2056-1>.
- Diouani, M.F., Bouafif, N.B.E.N.A., Bettaib, J., Louzir, H., Jedidi, S., Ftaiti, A., ... Salah, A.B.E.N. June 2014. Dogs L. infantum infection from an endemic region of the North of Tunisia : a prospective study. *Most* 85, 55–62.
- Elhaig, M.M., Youssef, A.I., El-gayar, A.K., 2013. Veterinary Parasitology molecular and parasitological detection of Trypanosoma evansi in camels in Ismailia. *Egypt. Vet. Parasitol.* 198 (1–2), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.003>.
- Eloy, L., Luchois, S., 2009. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *J. Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases* 15 (4), 589–611. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000400002>.
- Gage, K.L., Burkot, T.R., Eisen, R.J., Hayes, E.B., 2008. Climate and Vectorborne Diseases. 35(5) <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>.
- Harrus, S., Baneth, G., 2005. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int. J. Parasitol.* 35 (11–12), 1309–1318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.005>.
- Hodžić, A., Alić, A., Fuehrer, H.P., Harl, J., Wille-Piazza, W., Duscher, G.G., 2015. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit. Vectors* 8, 1–7.
- Isaac, C., Ciosi, M., Hamilton, A., Scullion, K.M., Dede, P., Igbinosa, I.B., ... Turner, C.M.R., 2016. Molecular identification of different trypanosome species and sub-species in tsetse flies of northern Nigeria. *Parasit. Vectors* 9 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1585-3>.
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., ... Truc, P., 2005. Human Trypanosomiasis Caused by trypanosoma evansi in India: The First Case Report. 73(3). pp. 491–495.
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K.Y., Waziri, N.E., Eyal, O., Guthmann, Y., Harrus, S., 2013. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H., 2004. Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 42 (11), 5249–5255. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5249>.
- Matallah, F., Benakhla, A., Medjouel, L., Matallah, S., 2012. Tick infestation of dogs and prevalence of canine babesiosis in the north-east of Algeria; area of El-Tarf 1. *American-Eurasian. J. Sustain. Agric.* 6 (3), 126–134.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Athias, E., Bouam, A., Dizoé, S., Davoust, B. and Mediannikov, O. Molecular and serological detection of animal and human vector-borne pathogens in the blood of dogs from Côte d'Ivoire. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, under review
- M'ghirbi, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of Babesia canis vogeli from naturally infected dogs and Rhipicephalus sanguineus ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152, 1–2, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.018>.
- Millán, J., Chirife, A.D., Kalema-Zikusoka, G., et al., 2013. Serosurvey of dogs for human, livestock, and wildlife pathogens. *Uganda. Emerg. Infect. Dis.* 19 (4), 680–682.
- Morrison, L.J., Vezza, L., Rowan, T., Hope, J.C., 2016. Animal African trypanosomiasis: time to increase focus on clinically relevant parasite and host species. *Trends Parasitol.* 32 (8), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.012>.
- Mouloua, A., Boubidi, S.C., Bouiba, L., Mezai, G., Madiou, M., Harrat, Z., 2017. Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Rev. Med. Vet.* 168 (10–12), 252–261.
- Naouelle, A., Ghalmi, F., 2016. Canine hepatozoonosis a bibliographic review. *Revue Méd. Vét.* 167, 7–8 (201-210).
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J.M., Thompson, R.C.A., et al., 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.* 95, 186–192.
- Ogbu, K.I., Anene, B.M., Nweze, N.E., Chukwudi, I.C., Danladi, M.A., 2017. Trypanosomosis in dogs : a review. *Int. J. Sci. Appl. Res. Vol. 2 (2)* (ISSN 2504–9070).
- Otranto, D., 2018. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: from pathways and times of transmission to disease control. *Vet. Parasitol.* 251, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.021>. (November 2017).
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B., 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol.* 25 (5), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.005>.
- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., De Paiva Diniz, P.P.V., De Caprariis, D., ... Breitschwerdt, E.B., 2010. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: A longitudinal study. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (9), 3316–3324. <https://doi.org/10.1128/JCM.00379-10>.
- Pommier de Santi, V., Briolant, S., Mahamat, A., Ilcinkas, C., Blanchet, D., de Thoisy, B., ... Raoult, D. Q. 2018. Fever epidemic in Cayenne, French Guiana, epidemiologically linked to three-toed sloth. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 56, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.12.004>. (May 2017).
- Qiu, Y., Kaneko, C., Kajihara, M., Ngonda, S., Simulundu, E., Muleya, W., ... Nakao, R., 2018. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmatocae in domestic dogs in Zambia. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 9 (4), 988–995. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.025>.
- Rami, M., Atarhouch, T., Sabri, M., Cadi, S.M., Benazzou, T., Dakkak, A., 2003. Leishmaniose canine dans le Rif (côte méditerranéenne marocaine) : enquête séro-épidémiologique. *Parasite* 10 (1), 79–85. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p77>.
- Rjeibi, M.R., Ben Hamida, T., Dalgatova, Z., Mahjoub, T., Rejeb, A., Dridi, W., Gharbi, M., 2015. First report of Surra (Trypanosoma evansi infection) in a Tunisian dog. *Parasite* 22, 3. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015004>.
- Rodriguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F., Alberola, J., 2013. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect Leishmania infantum infection on experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 191 (3–4), 363–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.009>.
- Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., Baneth, G., 2014. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of Babesia vogeli and Hepatozoon canis infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet. Parasitol.* 199 (3–4), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>.
- Sallemi, S., Rjeibi, M.R., Rouatbi, M., Amairia, S., Ben Said, M., Khamassi Khbou, M., Gharbi, M., 2018. Molecular prevalence and phylogenetic analysis of theileria annulata and trypanosoma evansi in cattle in northern Tunisia. *Vet. Med. Sci.* 4 (1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/vms3.79>.
- Schnittger, L., Florin-Christensen, M., 2018. Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>.
- Tamarit, A., Gutierrez, C., Arroyo, R., Jimenez, V., Zagalá, G., Bosch, I., ... Caballero, C., 2010. Trypanosoma evansi infection in mainland Spain. *Veterinary Parasitology* 167 (1), 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.050>.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. Parasites of dogs and cats. In: *Veterinary Parasitology*, 3d edition. Iowa State, Blackwell Publishing, USA, pp. 409–426.
- Thiébaud, S., Moatti, J.P., 2016. The Mediterranean Region Under Climate Change : A Scientific Update. pp. 391–401. ISBN 978-2-7099-2219-7; Available from. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers16-11/010068495.pdf.
- Williams, B.M., Berentsen, A., Shock, B.C., Teixeira, M., Dunbar, M.R., Becker, M.S., Yabsley, M.J., 2014. Prevalence and diversity of Babesia, Hepatozoon, Ehrlichia, and Bartonella in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. *Parasitol. Res.* 113 (3), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3722-7>.
- World Organisation for Animal Health (OIE), 2018. Chapter 3.1.11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. <http://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne>.

RESEARCH ARTICLE

Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial

Hacène Medkour^{1,2,3}, Idir Bitam^{4,5}, Younes Laidoudi^{1,2,3}, Ismail Lafri^{4,6,7}, Abdelaziz Lounas^{6,7}, Hamza Karim Hamidat⁸, Abdeslam Mekroud³, Marie Varloud⁹, Bernard Davoust^{1,2}, Oleg Mediannikov^{1,2*}

1 IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France, **2** Aix Marseille Univ., IRD, AP-HM, MEPHI, Marseille, France, **3** PADESCA Laboratory, Veterinary Science Institute, University Constantine 1, El Khroub, Algeria, **4** Aix-Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Marseille, France, **5** Superior School of Food Sciences and Food Industries of Algiers, Algeria, **6** Institute of Veterinary Sciences, University of Blida 1, Algeria, **7** Laboratory of Biotechnology related to Animal Reproduction (LBRA), University of Blida, Blida, Algeria, **8** Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Boumerdes, Algeria, **9** Ceva Santé Animale, Libourne, France

* olegusss1@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Medkour H, Bitam I, Laidoudi Y, Lafri I, Lounas A, Hamidat HK, et al. (2020) Potential of Artesunate in the treatment of visceral leishmaniasis in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: Efficacy evidence from a randomized field trial. *PLoS Negl Trop Dis* 14(12): e0008947. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947>

Editor: Johan Van Weyenbergh, KU Leuven, BELGIUM

Received: August 6, 2020

Accepted: November 3, 2020

Published: December 18, 2020

Copyright: © 2020 Medkour et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This study was supported by the Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection, the National Research Agency under the program « Investissements d'avenir », reference ANR-10-IAHU-03, the Région Provence-Alpes-Cote d'Azur and European funding FEDER PRIM1. The

Abstract

Leishmaniasis is among the world's most neglected diseases. Dogs are the main reservoirs/hosts of *Leishmania infantum*, causative agent of both canine and human visceral leishmaniasis. Canine leishmaniasis (CanL) represents a public health problem as one of the most prevalent zoonotic diseases worldwide. Current therapeutics present drawbacks; thus, there is a need for more effective, safer, and cheaper drugs. The aim of this study was to evaluate and to compare the efficacy of oral administration of artesunate or meglumine antimoniate/allopurinol in dogs with clinical leishmaniasis. Forty-two dogs with naturally occurring clinical leishmaniasis were included in this open-label, simple randomized positive-control clinical field trial with 6 months of follow-up. Dogs received meglumine antimoniate 100 mg/kg/day and allopurinol 30 mg/kg/day for 28 days (control group, n = 26) or artesunate 25 mg/kg/day for 6 days (test group, n = 16). The animals were evaluated for their clinical evolution, parasite load (by qPCR) and humoral response at different time points: 0, 30, 90, and 180 days after treatment. Data analyses showed a significant improvement in both groups in clinical scores, parasitemia and antibody titers after treatment. Compared to the control group, the artesunate group showed significantly lower clinical score (P = 0.0001), lower parasitemia (P = 0.0001) and antibody titers after 6 months of follow-up. Compared to baseline values, a rapid, significant reduction (P < 0.012) in antibody levels, 2.28- versus 3.04-fold for the control versus artesunate groups, respectively, was observed 30 days after treatment. Antibody levels continued to decrease further in the artesunate group, where 58% of cases became seronegative at the 6-month follow-up. All qPCR-positive dogs were negative after treatment with artesunate, while 14.3% remained positive with the appearance of two new cases in the control group. Artesunate was well tolerated, and no side effects were recorded. Treatment failures were similar in both groups with 27.27% (6/22),

funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

including 18.18% (4/22) mortality in the control group, *versus* 26.66% (4/15), including 13.33% (2/15) mortality in the artesunate group. This is the first report showing the potential of artesunate in the treatment of dogs with clinical leishmaniasis. Artesunate showed higher efficacy than the current first-line treatment for CanL without any adverse effects. It could be a good alternative chemotherapy for CanL, and may be considered for further studies in human leishmaniasis. Further clinical trials are needed to confirm these findings, to determine if there are relapses after treatment and if dogs remain infective to sandflies, to define the ideal therapeutic dosage and duration of treatment with artesunate.

Author summary

Canine leishmaniasis (CanL) is a fatal, zoonotic vector-borne disease caused by *Leishmania infantum*, a common pathogen for both humans and dogs. Most CanL therapeutics are toxic, expensive, or ineffective. Artemisinin and derivatives have recently demonstrated potent antileishmanial activity in vitro and in experimental models. In this study, dogs with clinical leishmaniasis were randomly included in one of the treatment groups: meglumine antimoniate/allopurinol (control) or artesunate (alternative). Dogs were followed up for 6 months for their clinical score, parasitemia and *Leishmania* antibody levels. Both groups showed improved clinical scores, parasitemia and antibody titers after treatment. After six months of follow-up, treatment success was very similar in both groups, and 72.73% (16/22) of the controls *versus* 73.34% (11/15) in the artesunate group had clinical improvement. All dogs initially seropositive by PCR became negative after artesunate treatment, while 14.3% remained positive with the appearance of new cases in the control group. Antibody titers decreased rapidly (from day 30) from baseline especially in the artesunate group, where 58% of the dogs converted to seronegative after 6 months. Artesunate could be a good alternative for treatment of leishmaniasis. Additional clinical trials are needed to obtain more data on this drug.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious, vector-borne, chronic, systemic disease. It is a major zoonosis with significant clinical and epidemiological control priority in the world. The domestic dog is the main animal reservoir, while other wild animals, such as foxes, play a role in sylvatic transmission. *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) is the causative agent of both human VL and canine leishmaniasis (CanL) [1]. In the last few decades, epidemiological changes in VL, including increases in incidence and mortality rate and its spread to new and even urban areas, have been observed [2–7]. As the dog is the main reservoir for human infection, there is a significant overlap between areas of high prevalence of CanL and human mortality attributed to this parasitosis [8,9]. Among the reasons led to its spread: the lack of vaccines, failures in controlling vectors and the increasing selection of drug-resistant parasites [10].

CanL is a severe disease that affects several million domestic dogs in countries on both sides of the Atlantic Ocean (mainly Europe and South America, but spreading in Africa and Asia as well) and may kill infected dogs when left untreated [11,12]. In Mediterranean countries, where infection rates are up to 63% including at least 2.5 million seropositive dogs [13–15], CanL represents one of the leading causes of death in dogs [16,17]. It is a growing disease that

has become one of the most important canine diseases imported to Central Europe [18]. North Africa is highly endemic and important prevalence of CanL were reported in Algeria [19,20], Tunisia [21,22] and Morocco [23]. In addition, *L. infantum* has been well described in wild animals in Algeria, such as the jackal [24].

Clinical manifestations in *L. infantum*-infected dogs are very wide and variable. Consequently, several CanL forms can be typified by their numerous clinical signs, including cutaneous, mucocutaneous and visceral forms [25]. In addition, *L. infantum* infection in dogs can manifest as subclinical infection, a self-limiting illness or a serious life-threatening disease [26].

Treatment of CanL is a challenge because of the intracellular localization of the parasite [27]. Moreover, the World Health Organization (WHO) has suggested reserving antileishmanial drugs used for human VL for exclusive use in human leishmaniasis and not for veterinary medicine because of suspected drug-resistance development from use in animals [20]. Despite this, the first-line treatment for CanL is currently the combined use of leishmanicidal agents used as second-line drugs for humans (e.g., pentavalent antimonials, miltefosine) and allopurinol [25,28–31]. Some of the chemotherapeutic compounds used for CanL are included within the 19th edition of WHO Model List of Essential Medicines (April 2015) against leishmaniasis: pentavalent antimonials, miltefosine, amphotericin B deoxycolate or liposomal formulations, and paromomycin. However, some other drugs are also effective, such as allopurinol, pentamidine, enrofloxacin, marbofloxacin, metronidazole, spiramycin, and ketoconazole [32]. Determination of the best drug is based on clinical examination and staging of CanL, according to immunodiagnostic test results, clinical signs, clinicopathological abnormalities and parasite load [29,25]. Most of these treatments are expensive and do not achieve complete cure of the disease, and some of them can cause important side effects [31,33]. Vomiting, lethargy, diarrhea and nephrotoxicity are common during the current treatments with pentavalent antimonials and miltefosine [27,31,33–36]. Prolonged administration of allopurinol frequently induces xanthine urolithiasis [37]. Thus, there is an urgent need for new, efficient, safe, and affordable drugs for the treatment of canine leishmaniasis.

Artemisinin and derivatives (ARTs) have demonstrated efficacy against protozoan parasites, such as *Plasmodium* [38] and *Perkinsus* species [39]. The antiparasitic activity of ARTs against other human and animal protozoans, namely, *Leishmania* spp., has scarcely been explored. Chollet et al. [40] reported on the activity of fluoroartemisinins against promastigote forms of *L. donovani* (at micromolar concentrations). Other compounds, such as artesunate, deoxygenated artesunate, dihydroartemisinin, and deoxygenated dihydroartemisinin, have shown in vitro activity against *L. infantum* life stage forms (promastigote and amastigote) [41]. In addition, ARTs showed efficacy for the treatment of murine visceral leishmaniasis [42–45].

In this study, we explored for the first time the efficacy of artesunate in the treatment of VL in *L. infantum* naturally infected dogs. Our study is an open-label simple randomized field trial includes two groups of sick dogs: i) control: dogs treated with the current chemotherapy (antimoniate of meglumine/ allopurinol); and ii) test, alternative chemotherapy: dogs treated with artesunate. Dogs were followed up for their clinical, parasitological and serological status.

Materials and methods

Ethics statement

The study protocol was also approved by the scientific college (Procès-Verbal du CSI N°6, 2018) at the Veterinary Science Institute, University Constantine 1, Algeria. To facilitate field work, collaborations were established with veterinary doctors and their assistants working in these establishments. All dog owners gave their verbal informed consent, and samples were

collected by veterinarians. Risk assessment was also submitted to and approved by the decision board of the veterinary practitioners from the wilayas of northern Algeria affiliated with the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development (Directions des Services Vétérinaires). No infected untreated dogs, as control, were involved in this study for ethical reasons.

Study design

The objective of the study is to test efficacy of artesunate in the treatment of CanL. We performed an open-label randomized, efficacy evidence clinical field trial conducted in the Kabylia, North of Algeria. We performed an imbalanced simple randomization. All animals in this study were exposed to the same epidemiological pressure and CanL prevalence recently observed in this area was 36% [19]. Client-owned dogs of any age, breed, or gender were enrolled, and 11 veterinary practitioners were responsible for the monitoring. The dogs were fully monitored, and treatment could be switched to antimonial meglumine/allopurinol at the owner's request if any clinical impairment was noticed. A total of 187 dogs were screened for compliance with the inclusion criteria. Among them, 42 sick adult dogs (30 males and 12 females), average age 3.8 years (min = 1, max = 11 years), weighing between 3–37 kg and of different breeds (8 German shepherd, 1 Belgian Malinois shepherd, 2 Sloughi, 5 pointer, 6 Braques, 1 Bagnole, 1 American Staffordshire terrier, 1 beagle and 17 mixed breeds) were selected for this study.

Inclusion, exclusion and efficacy criteria

The main inclusion criteria were: i) dogs with at least two clinical manifestations related to CanL (Table 1) and ii) dogs with positive serology for *Leishmania* by immunochromatographic-based qualitative rapid WITNESS *Leishmania* test (Zoetis, France) and/or quantitative indirect immunofluorescence antibody test (IFAT \geq 100) or positive PCR result obtained from a blood sample.

The dogs with significant alterations in renal and/or hepatic function or with other clinically evident infectious diseases were excluded. The dogs were excluded if they had been vaccinated against or had been treated with leishmanicidal agents less than 3 months before preinclusion in the present study or with a leishmanistatic 1 month before preinclusion. Finally, no previous treatment with systemic antibiotics or antifungals within 7 days or with

Table 1. Manifestations related to CanL defined to evaluate the clinical scores of dogs.

Symptoms	Number of signs	Clinical manifestations
General conditions	5	Emaciation, anorexia, abatement, anemia, hyperthermia
Cutaneous signs	6	Localized alopecia, pruritus, squamosis, hyperkeratosis, onychogriphosis, ulcers
Visceral lesions	4	Lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, renal disorders
Ophthalmic level	4	Depilation around the eyes "in glasses", mucopurulent conjunctivitis, keratitis and/or uveitis
Oral level	1	Oral erosions
Skeletal level	3	Arthrites, synovitis, diffuse pain of the posterior train
Others	3	Epistaxis, chronic diarrhea, neurological signs

Each manifestation was assigned a severity score ranging from 0 to 3, where 0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe. Clinical scores varied [3–21]. Mortality related to CanL was assessed by the highest score (22).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.t001>

systemic long-acting corticosteroids within 1 month prior to preinclusion was allowed. Dogs were also free from other haemoprotozoan infections such as *Babesia* and *Trypanosoma* spp.. Pregnant and lactating dogs were excluded. Dogs could be withdrawn from the study at any time if they showed intolerance to the treatment or if requested by the owner.

The efficacy criteria were determined by reduction in clinical scores (i.e., the sum of clinical scores was lower than before treatment) [16,36,46], which was a decrease in parasite DNA and *Leishmania*-specific antibody titers. The score was defined according to the severity of each clinical sign, and the final value was obtained from the sum of all the values (Table 1). Quantitative parasite load was estimated through qPCR and antibody titers through quantitative IFAT.

Experimental design

Selected dogs were randomly included in one of the two treatment arms (Table 2). Dogs (N = 26) in **Group 1** (positive control) received 100 mg/kg antimoniato of meglumine (Glucantime, Merial, France) daily for 28 days, subcutaneously, and 30 mg/kg allopurinol (Alloporinol Arraw 300 mg, France) daily for one month, orally. Dogs (N = 16) in **Group 2** (test group) received 25 mg/kg artesunate (Asu-Denk; Denk Pharma, Germany) daily for 6 days, orally. After each administration, the dogs were observed for 30 min to monitor for reactivity, vomiting and/or regurgitation to ensure complete absorption of the drug. The dogs were followed up for 180 days (Fig 1). To facilitate the trial, we performed an imbalanced simple randomization. This last was more balanced at the end of the trial and allowed environ 98% efficient as a balanced simple randomization.

Visit schedule and sample collection. The animals were checked on days D0, D+30, D+90 and D+180 after the treatment had started, and blood samples were collected at each time point. Clinical signs and lesions associated with leishmaniasis, infection status (parasite load-qPCR and antibody titers) were evaluated and monitored at these points.

Clinical evaluation. The efficacy of treatments was assessed at each time point based on the clinical response to treatment (evolution of clinical scores (CS) over time and the percentage reduction of the total clinical score). For each dog, the same veterinarian conducted all

Table 2. Characteristics of dogs assigned to each treatment arm and homogeneity analysis data, expressed as the mean \pm standard deviation and frequencies (%).

Variable	Control treatment (Glucantime+ Allopurinol) (n = 26)	Test treatment (Artesunate) (n = 16)
Age, year	3.71 \pm 2.11	3.94 \pm 1.45
(min- max)	(1–11)	(2.5–8)
Gender, male (%)	17 (65.39)	13 (81.25)
Breed		
Breeder (%)	17 (65.39)	8 (50)
Mongrel (%)	9 (34.61)	8 (50)
Clinical score: points	7.46 \pm 4.04	6.67 \pm 2.30
(min- max)	(3–21)	(3–11)
No. of positive by PCR (%)	7 (26.92)	5 (31.25)
qPCR-Parasitemia (Leish/mL)	1108.72 \pm 4154.5	78.04 \pm 98.98
(min- max)	(0–21000)	(0–233)
No. Positive PCR (%*)	7 (26.92)	5 (31.25)
Leishmania Antibody titers	476.92 \pm 448.38	390.62 \pm (507.35)
(min- max)	(100–1600)	(50–1600)

*%: (Number of positive by PCR/Number of total positive) x 100.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.t002>

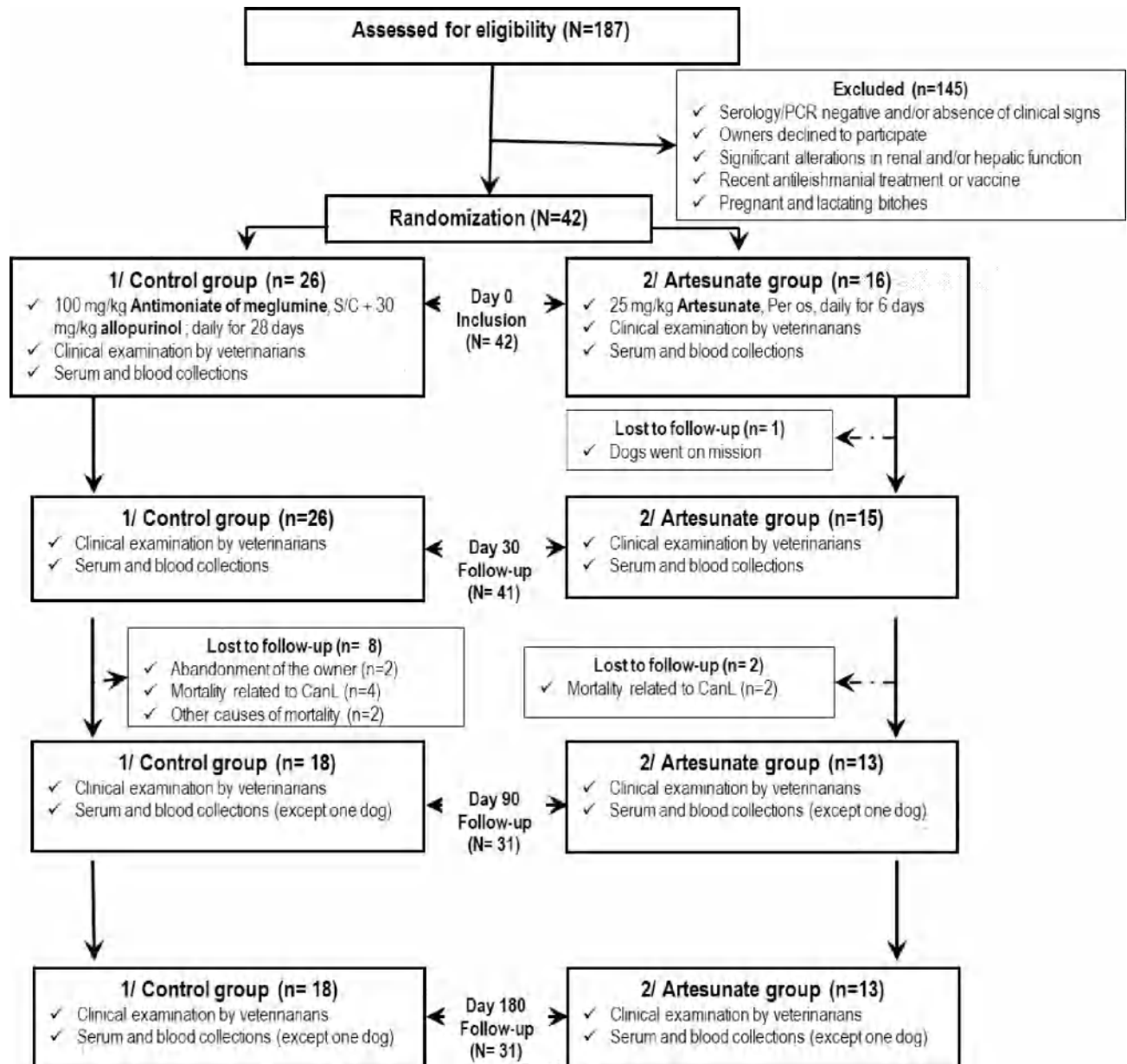


Fig 1. Consort flow diagram showing the therapeutic protocols and dogs with leishmaniasis in each stage of the study. Over all the 42 dogs included at D+0, one dog from the Group 2 was lost to follow-up before the D+30 time point. During the 6-month follow-up, four dogs from Group 1 were lost to follow-up two months after the beginning of treatment, and two of these were due to failure of clients to return for the final revisits on D+90 and D+180. Two others were because of death not related to CanL. In addition, six dogs died in the period between D+60 after the beginning of treatment and before the D+90 visit with increase in clinical signs related to CanL. Four of these were in Group 1, and two were in Group 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.g001>

clinical evaluations to maintain consistency. Veterinarians complete a questionnaire, of the clinical signs that we can found, at each clinical examination (S1 Table). The CS were calculated according to the severity of clinical signs listed in Table 1, as reported previously [33,46]. Each manifestation was assigned a severity score ranging from 0 to 3, where 0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe (maximum total clinical score = 21). Mortality related to CanL was assessed by the highest score (22). The CS is the sum of scores of clinical signs. The reduction percentage was calculated according to the formula:

Percentage reduction of CS % = (CS at D+xx- CS at D+0)/CS at D+0) x 100.

CS: clinical score; D+xx: at Day xx post-treatment (D+30, D+90 or D+180), D+0: at the inclusion (day 0).

Clinical signs found during clinical examination, their scores, clinical scores and the reduction percentages of clinical signs, for each dog at each time-point, are presented in the [S2 Table](#).

Parasite load-qPCR. Blood samples collected at each time point were analyzed for quantification of parasitic load by qPCR using primers and probe for detection and quantification of *L. infantum* DNA, targeting a conserved region of the kinetoplast minicircle DNA (kDNA) (several 1000-fold repeated sequence) [47]. Prior to DNA extraction, 200 μ L of blood was digested with proteinase K and incubated at +56°C overnight. Extraction was performed using a commercial DNA extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit, [Qiagen, Courtaboeuf, France]) and was performed on a BIOROBOT EZ1 (Qiagen, Qiagen, Courtaboeuf, France) per the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 200 μ L of distilled water and stored at -20°C until analysis. The qPCR was prepared and performed as described in [6]. Briefly, 20 μ L final volume containing 10 μ L of Eurogentec Master Mix Roche (Eurogentec, Liège, Belgium), 0.5 mM of each primer and the probe, 0.5 μ L UDG, 3 μ L of distilled DNase- and RNase-free water, and 5 μ L of the DNA sample was amplified in a CFX96 Real-Time system (BioRad Laboratories, Foster City, CA, USA) using the following thermal profile: one incubation step at 50°C for two minutes and an initial denaturation step at 95°C for three minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing and extension at 60°C for 30 seconds. Quantification was based on a standard curve, which was an 8-fold serial dilution of 10⁸ copies of plasmid DNA/mL from the kDNA region, equivalent to 10000 parasites/mL, and 5 μ L of serial dilutions ranging from 10000 to 0.001 parasites/mL was introduced into reaction tubes. The results were expressed as the number of *Leishmania* parasites present in 1 mL of blood, taking into account the volume (200 μ L of blood) and the elution (200 μ L) introduced during the extraction process. The percentage reduction in parasite load (PL%) was calculated according to the formula:

$$PL \% = (PL \text{ at } D + xx - PL \text{ at } D + 0) / PL \text{ at } D + 0) \times 100.$$

PL: blood parasite load (Leish/mL); D+xx: at Day xx post-treatment (D+30, D+90 or D+180), D+0: at the inclusion day.

Serological monitoring. At day 0, the immunochromatographic-based qualitative rapid WITNESS *Leishmania* test (Zoetis, France) was performed according to the manufacturer's instructions using one drop (10 μ L) of whole blood from each dog directly after sampling. Quantitative IFAT for the titration of anti-*L. infantum*-specific immunoglobulins G (IgG) was performed on sera for monitoring as described previously [19]. Briefly, plate wells were coated with 20 μ L of *L. infantum* commercial antigens (Zoetis, France). After dilution to 1:50, 20 μ L of every serum dilution was applied per well, and plates were incubated for 30 min at 37°C. Plates were washed twice with PBS for 5 min and once with distilled water. Then, 20 μ L of anti-dog IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were added into each well. The plates were incubated for 30 min at 37°C in the dark. After another washing step, drops of mounting medium were added to the cover slips, and reading was performed. To avoid observation errors, all samples were examined by two different investigators, and positive and negative controls were added to each plate. All samples negative at 1:50 were considered negative. Positive results were further investigated using a five-fold serial dilution IFAT at 1:100 to 1:1600. At the greatest dilution, the samples were

classified as high positive for *L. infantum* ($> 1:1600$). In addition, in the manner as for the parasite load, we calculated the percentage reduction in antibody titers.

To evaluate efficacy of treatments, we performed comparison of averages CS, parasitemia and antibody titers taken at different time points for both groups, Group 1 alone, and Group 2 alone. Treatments were compared between us by comparison of percentage reduction of CS, parasite load and *Leishmania* antibodies at each time point of the follow-up.

Data analysis

XLSTAT Addinsoft version 2018.7 was used for the statistical analysis. A descriptive analysis of the data was performed according to the nature of the variables for each follow-up visit and assigned treatment. The nonparametric Kruskal-Wallis/bilateral test was used for comparison of averages taken at evaluation time points for both groups, Group 1 alone, and Group 2 alone. Multiple pairwise comparisons following the Dunn/bilateral test procedure was used for the CS, parasitemia and antibody titers. Treatment effects were compared between the two groups by analysis of percentage reduction of CS, parasite load and antibody titers at each time point of the follow-up. The Mann-Whitney test was used to compare the efficacy of treatments using the difference in percentage reduction of CS, parasitemia and antibody titers between D0 and D+30 days, D0 and D+90 days, D0 and D+180 days. The significance level used for the tests was 5% (Bonferroni Correction level of significance was 0.0083).

Results

Included dogs and monitoring

No significant difference was found for age, gender, breed (mongrel or purebred), clinical status of dogs, and mean parasitemia and *Leishmania* antibody titers between the two groups at the inclusion day (P-value > 0.05) (Table 2).

The clinical examination allowed estimation and monitoring of the clinical outcome of the selected dogs (S2 Table). It revealed the presence of general signs in 92.85% (39/42), cutaneous in 83.33% (35/42), visceral in 38.1% (16/42), ophthalmic in 23.8% (10/42), and musculo-skeletal in 4.76% (2/42). One dog (2.3%) showed oral erosion, another presented epistaxis, and two dogs (4.76%) had neurological disorders.

Statistical analysis was performed on the number of dogs present at each time-point. Over all the 42 dogs included at D+0, one dog from the Group 2 was lost to follow-up before the D+30 time point. During the 6-month follow-up, four dogs from Group 1 were lost to follow-up two months after the beginning of treatment, and two of these were due to failure of clients to return for the final revisits on D+90 and D+180. Two others were because of death not related to CanL. In addition, six dogs died in the period between D+60 after the beginning of treatment and before the D+90 visit with increase in clinical signs related to CanL. Four of these were in Group 1, and two were in Group 2 (Fig 1).

Clinical outcomes

Compared to the initial clinical score, improvement in total clinical scores in both treatment groups was observed throughout the study. Given the mortality outcome of the higher score (22), mean clinical scores decreased over time from 7.16 ± 3.47 at D0 to 4.24 ± 4.37 at visit D+30, increased again slightly at D+90 (5.75 ± 8.25), and then decreased below the level at D0 and remained constant (5.60 ± 8.35) until D+180. The same clinical score kinetics were observed in the two groups, separately (Fig 2).

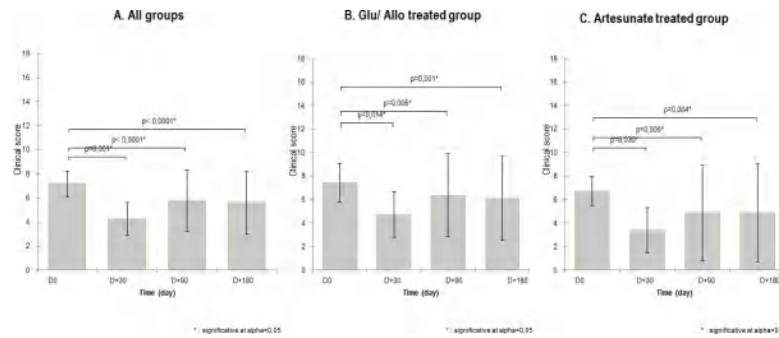


Fig 2. Time course of total clinical score (Kruskal-Wallis test). Clinical scores (mean ± SD) of the dogs (n = 42) were assessed by veterinarians at the time of scheduled visits at D0, D+30, D+90 and D+180. **A.** All treated groups. **B.** Glucantime/Allopurinol-treated group. **C.** Artesunate-treated group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.g002>

Taking the CS at D0 and D+30 as the starting and end points, respectively, the mean percentage of reduction in clinical score was 43.3±47.8%. At each time point, D+30, D+90 and D+180, a statistically significant difference (p<0.0001) in mean percentage of reduction in clinical score was observed between the two groups. More improvement was noted in Group 2 than in Group 1 (Fig 3). At the level of individual response, approximately 26.66% (4/15) of Group 2 dogs complete recovered (CS of 0) versus 18.18% (4/22) in Group 1, while approximately 50% of the dogs showed partial amelioration at 6 months of follow-up in both groups with 54.54% (12/22) and 46.66% (7/15) in the control and test groups, respectively. At D+180, clinical worsening rates were similar in both groups at 27.27% (6/22), including 18.18% (4/22) mortality in the control group, versus 26.66% (4/15), including 13.33% (2/15) mortality, in the test group. Details on clinical changes over time for the dogs followed are described in Table 3.

Adverse events

No major side effects related to these treatments were reported in any dog. Both study compounds were well tolerated in all dogs, except for two dogs that had slight local pains and pruritus with 15 days of treatment with Glucantime/allopurinol.

Quantitative real-time PCR kinetic parasitemia

At D0, 28.5% (12/42) dogs were positive by qPCR from a blood sample. Parasitic clearance was observed over time after treatment with artesunate, and all initially positive dogs (5/5) turned

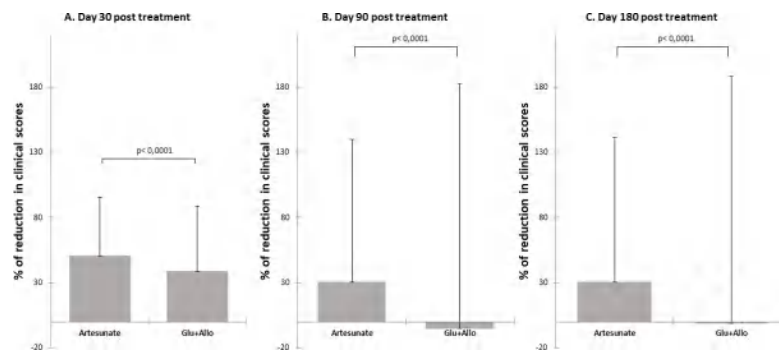


Fig 3. Comparison of the mean percent reduction in clinical score between groups (Mann-Whitney test); **A.** Day 30 posttreatment; **B.** Day 90 posttreatment; **C.** Day 180 posttreatment. Mortality was taken into consideration (mortality score = 22). The mean percent reduction in clinical score is higher in the artesunate-treated group than in the Glucantime/allopurinol-treated group at all time points.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.g003>

Table 3. Individual clinical changes in dogs over time.

Groups	Visit	Complete amelioration (%)	Partial amelioration (%)	No change (%)	Aggravation (%)
Artesunate treated dogs	D+30 (n = 15)	-	12 (80)	-	3 (20)
	D+90 (n = 15)	3 (20)	8 (53.33)	1 (6.66)	3 (20)
	D+180 (n = 15)	4 (26.66)	7 (46.66)	-	4 (26.66)
Glucantime/allopurinol treated dogs	D+30 (n = 26)	2 (7.69)	17 (65.38)	1 (3.84)	6 (23.07)
	D+90 (n = 23)	3 (13.04)	13 (56.52)	1 (4.34)	6 (26.08)
	D+180 (n = 22)	4 (18.18)	12 (54.54)	-	6 (27.27)
Total dogs	D+30 (N = 41)	2 (4.87)	29 (70.73)	1 (2.44)	9 (21.91)
	D+90 (N = 38)	6 (15.79)	21 (55.26)	2 (5.26)	9 (23.68)
	D+180 (N = 37)	8 (21.62)	19 (51.35)	-	10 (27.02)

Mortality related to CanL had been included.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.t003>

out to be *Leishmania*-negative. In contrast, 6/7 PCR-positive dogs treated with Glucantime/allopurinol turned out to be negative, and 1/7 dogs remained positive. In addition, two dogs treated with Glucantime/allopurinol were found to be positive, whereas they had been negative before. Individual evolution of parasitemia over the follow-up is shown in Table 4.

Serological status

Initially, all dogs were positive by both Witness test and IFAT, and no significant difference ($P > 0.05$) was observed between groups. The mean *Leishmania* antibody titers decreased over time (mean \pm SD, 444.05 \pm 467.50 at D0, 181.25 \pm 234.71 at D+ 30, 120.69 \pm 298.36 at D+ 90 and 118.97 \pm 297.73 at D+ 180) after treatment (Fig 4). Compared to baseline values, significant reductions ($P < 0.012$, IFAT serology) were observed in both groups at D+30 days

Table 4. Individual change in parasite load, number of parasites per mL of blood and percentage reduction over time.

Dog's ID	Treatment	Parasitemia No. Leish/mL of blood (% of reduction)				
		D0	D+ 30	D+ 90	D+ 180	
13	Glucantime/ Allopurinol	1500	288,7 (80,75)	30,28 (97,98)	357 (76,2)	
5		0	0 (0,00)	176 (-100)*	177 (-100)*	
A11N12		0	46,6 (-100) *	N/A*	N/A*	
S26		2400	19,8 (99,18)	2 (99,92)	0 (100)	
S27		3800	0 (100)	0 (100)	0 (100)	
S33		21000	0 (100)	0 (100)	N/A	
S54		7,7	0 (100)	0 (100)	N/A	
C4P2G2		101	16,2 (83,96)	0 (100)	0 (100)	
C1G2P4		18	0 (100)	0 (100)	0 (100)	
10		Artesunate	6,8	0 (100)	0 (100)	0 (100)
S50			17,4	14 (19,54)	29 (-66,67)	0 (100)
A9N9			122	44 (63,93)	N/A	N/A
T11C2P1			233	1,7 (99,27)	0 (100)	0 (100)
A8 N8	11		0,17 (98,45)	0 (100)	0 (100)	

All the other dogs were negative and remained negative during all of the follow-up.

N/A*: Mortality related to CanL

N/A: Lost to follow-up

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.t004>

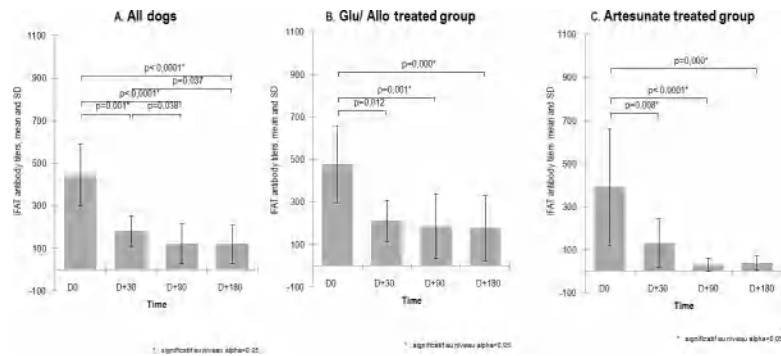


Fig 4. Serology monitoring. Antibody titers (mean \pm SD) of the dogs ($n = 42$) were assessed by quantitative IFAT at the time of scheduled visits at D0, D+30, D+90 and D+180 (Kruskal-Wallis test/bilateral). A. All dogs. B. Glucantime/allopurinol group. C. Artesunate group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008947.g004>

(mean \pm SD, artesunate 128.57 ± 212.78 ; Glucantime/allopurinol 209.61 ± 244.96). These levels continued to decrease (mean \pm SD, artesunate 37.50 ± 60.77 ; Glucantime/allopurinol 176.471 ± 379.604) at D+ 180 (Fig 3). When groups were compared, the artesunate group showed a higher percent reduction in antibody titers at the end of the study ($P < 0.0001$) (S1 Fig). At the individual level, 78.57% (11/14) of dogs treated with artesunate showed a decrease in antibody titers at D+30, and 50% (7/14) of them became absolutely seronegative. In contrast, in the Glucantime/allopurinol group, 57.7% (15/26) showed a decrease in serology at D +30, and only 15.38% (4/26) became seronegative. At the end of the follow-up, 41.37% (12/29) of dogs became seronegative, including 29.41% (5/17) in Group 1 *versus* 58.33% (7/12) in Group 2 (P -value, Z test/bilateral = 0.227).

Discussion

Today, there is lack of an effective and safe therapy against canine visceral leishmaniasis. New drugs, delivery systems and treatment strategies are necessary to achieve a cure in infected dogs [48]. This is important not only for dogs but also as a part of the fight against human leishmaniasis (reservoir sanction). Here, we compared the efficacy of artesunate as an alternative chemotherapy and Glucantime/allopurinol, which is currently the most effective treatment against CanL [49]. The treatment responses were determined using a comprehensive clinical score, which was based on the main clinical signs associated with CanL, i.e., parasite load evolution using qPCR and serological monitoring by measurement of antibody titers through quantitative IFAT [25,50,51]. This is the first report on the efficacy of artesunate (an artemisinin derivative) in the treatment of CanL in dogs under field conditions.

Both treatments led to clinical improvement and reduced parasite burden and *Leishmania* antibody titers, but a greater improvement in clinical signs was observed with artesunate. Artemisinin and its derivatives have proven therapeutic potential against malaria and have also demonstrated effectiveness in experimental models of leishmaniasis [42,52]. Artemisinin was active against six strains of *Leishmania* responsible for diverse forms of leishmaniasis [42]. In this study, artesunate was well tolerated without any adverse effects. In one study, artesunate was used in dogs as an anti-cancer treatment; dogs exhibited no adverse effects at all [53]. Two dogs in the control group showed local pain at the site of injection. Treatment in the control group was by injection+ oral administration, while artesunate was given by oral administration. Side effects after treatment with meglumine antimoniate/allopurinol that have been previously demonstrated were mainly as follows: local pain, pancreatitis, panniculitis and

nephrotoxicity for meglumine antimoniate, and xanthinuria, urolithiasis and renal mineralization for allopurinol [31,33], where it has been observed that 16% of dogs developed adverse events after treatment with Glucantime.

A rapid improvement in general conditions was observed a few days after treatment with artesunate. At the D+30 visit, 80% of dogs in the test group *versus* 73% in the control group showed clinical amelioration. Clinical improvement occurred rapidly in dogs 30 days after meglumine antimoniate/allopurinol therapy in several studies [27,49,54–56]. Treatments were successful in almost $\frac{3}{4}$ of cases and failed in almost $\frac{1}{4}$ of the cases after six months follow-up in both groups. Worsening was observed in 6 dogs *versus* 4 dogs (including the deaths of 4 dogs *versus* 2 dogs) in the control *versus* test groups. In one study, 10 months after the end of combined meglumine and allopurinol treatment in 6 dogs, 4 dogs had no clinical signs, 2 had relapsed, and the amastigote forms of *Leishmania* were present in the spleen of 5 dogs [49]. In addition, we estimate that Glucantime/allopurinol treatment is at least 10-fold more expensive than artesunate. In this study, artesunate showed a greater reduction in clinical scores than Glucantime/allopurinol. Compared to the current treatment, which is very burdensome and complicated in practice, artesunate treatment could be a good alternative chemotherapy, especially because it is cheap and easy to use (*per os*) for a short period (6 days of treatment in the present study) [31]. Furthermore, its efficacy can be improved by adjusting the dose or period of treatment, and further investigations can be used to determine the best regimen.

The blood PCR technique used had less diagnostic value than quantitative serology, and only 12/42 of sick seropositive dogs were found to be PCR-positive. This finding is in agreement with other authors [26,57] the fact that it is well known that blood parasitemia might be intermittent [30,58,59], and the blood *Leishmania* parasite load is much lower than the load found in other tissues, such as bone marrow in dogs with clinical leishmaniasis [57,60,61].

Parasitemia decreased continuously after treatment with artesunate until its total disappearance (100% parasite clearance, 180 days post-treatment), suggesting a leishmanicidal activity for this compound. The leishmanicidal activity of artemisinin and derivatives against *Leishmania* spp., causative agents of New World and Old World leishmaniasis (including *L. infantum*), have been demonstrated *in vitro* [41] and in a mouse experimental model [42]. In this study, Glucantime/allopurinol greatly reduced the parasite load at the end of treatment (4/7 initially positive dogs became PCR negative at D+ 30). A significant decline in the blood parasite load during the first 30 days using this combination therapy has been reported [26,62]. In addition, all PCR-negative dogs remained negative after treatment with artesunate; in contrast, two dogs in the control group became PCR-positive with worsening of clinical signs at D+ 90 follow-up. Failures of the combination Glucantime/allopurinol therapy have been reported, mainly due to the drug-resistance of *Leishmania*, but time to relapse in treated dogs has not been documented [31]. In our case, relapse started the second month posttreatment.

The present study showed that 30 days following the initiation of treatment, there was an important significant decline (2.28- *versus* 3.04-fold, for control *versus* test group) in *L. infantum*-specific antibody titers corresponding with clinical improvement as has been reported in previous studies [26,63]. Antibody levels continued to decrease more in the test group, where 58% of cases became seronegative 6 months posttreatment (Fig 3). This indicates a regression in antigenic stimulation [48,64]. A positive association has been found between antibody levels and parasitic dissemination to different tissues [65,66]; therefore, it might be hypothesized that the decrease in antibody levels implies that there is no parasitic dissemination. Compared to other studies, the antibody level continued to decrease progressively but slowly during the treatment period [55,67,68]. As has been shown in previous studies, when compared to the baselines, only a minority of dogs became seronegative during the first year of treatment, but almost all of them reached much lower antibody levels [69,70]. Our finding showed that

artesunate induces a rapid and greater reduction in antibody levels than the combination therapy Glucantime/allopurinol. Moreover, compared to day 0, clinical worsening and death in all cases were associated with increasing or at least stable antibody levels without any serological resolve. Therefore, we corroborate that serological monitoring is very useful for the detection of clinical relapse and prognosis after treatment since it correlates with an increase in antibody titers [25,26,29,55].

Study limitations

The study is innovative because it uses an antiprotozoal drug that has never been used to treat CanL. However, it presents certain limits that were required to us by the difficulties encountered in the field: i) the number of dogs followed remains insufficient (42 dogs at the beginning and only 31 at the end of the follow-up). ii) We carried out an imbalanced simple randomization, it would be better to do a balanced randomization with equal number of dogs in each group. Another weakness of this study is the use of blood for parasite load since it is known that *L. infantum* is a parasite of mononuclear phagocyte system cells and it has a tropism for bone marrow, lymph node and other internal organs like spleen and kidney. The number of parasites in blood is low and it was not possible to carry out other sampling type, so most of dog owners refused it. For this reason, we do not have many positive cases in blood PCR. Another point, biochemical analysis, especially creatinine and urea dosage, haven't been performed. Ultimately, co-infection can influence the clinical course of CanL. We looked at co-infections with other protozooses, such as *Babesia* spp. and *Trypanosoma* spp. Dogs in this trial were not co-infected at the time of inclusion. Unfortunately, we did not look at *Ehrlichia canis* infection, which also may influence the clinical course of CanL. We would like to see these limitations taken into account in future studies to better confirm the results on the efficacy of artesunate in the treatment of CanL.

Conclusions

These findings indicate that artesunate as well as combination meglumine antimoniate/allopurinol are effective treatments against canine visceral leishmaniasis. Artesunate was safer and more effective in controlling and reducing the clinical signs of leishmaniasis, parasite load and antibody titers than meglumine antimoniate/allopurinol. Furthermore, it is cheaper and easier to administrate (orally) with a short treatment period.

Now, it is important to obtain more data on oral artesunate treatment in other trials with a larger number of dogs and long-term follow-up. Further clinical trials are needed to confirm our results, also to determine if there are relapses after treatment and if dogs remain infective to sandflies, to define the ideal therapeutic dosage and duration of treatment. Finally, because the dog is an ideal model for human visceral leishmaniasis (VL) studies, the efficacy of artesunate in the treatment of VL should be evaluated.

Supporting information

S1 Fig. Comparison of mean percent reduction in IFAT antibody titers in dogs with leishmaniasis treated with artesunate or Glucantime/allopurinol. Data are reported as the mean \pm SD, artesunate versus Glucantime/allopurinol (Mann-Whitney test) 30-, 90- and 180-days posttreatment. (TIF)

S1 Table. Questionnaire completed by veterinarians about dog information and clinical manifestations.

(DOCX)

S2 Table. Individual clinical signs and calculation of clinical scores (CS) and percentage reduction of CS at each time-point.

(XLSX)

Acknowledgments

We are grateful for all veterinarians and dog owners for their kind help in the monitoring of dogs. We thank C. Sokhna, B. Pradine and E.H. Amadou Niang for their help to get medicaments.

Author Contributions

Conceptualization: Hacène Medkour, Oleg Mediannikov.

Data curation: Hacène Medkour.

Formal analysis: Hacène Medkour.

Funding acquisition: Marie Varloud.

Investigation: Hacène Medkour, Younes Laidoudi, Ismail Lafri, Abdelaziz Lounas, Hamza Karim Hamidat, Bernard Davoust.

Methodology: Hacène Medkour, Bernard Davoust, Oleg Mediannikov.

Project administration: Hacène Medkour, Idir Bitam, Abdeslam Mekroud, Marie Varloud, Bernard Davoust.

Software: Hacène Medkour.

Supervision: Abdeslam Mekroud, Marie Varloud, Bernard Davoust, Oleg Mediannikov.

Validation: Hacène Medkour.

Visualization: Hacène Medkour.

Writing – original draft: Hacène Medkour.

Writing – review & editing: Idir Bitam, Ismail Lafri, Marie Varloud, Bernard Davoust, Oleg Mediannikov.

References

1. Caixeta I, Helena L, Coura-vital W, Macedo G, Magalhães C, Almeida T, et al. Effectiveness of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Programme in reducing the prevalence and incidence of *Leishmania infantum* infection. *Parasites & Vectors*; 2018; 1–12.
2. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48(3):151–156. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652006000300007> PMID: 16847505
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. 2004; 27: 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004> PMID: 15225981
4. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Martins M, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. 2015; 110: 831–846. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150207> PMID: 26517497
5. Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *Plos Neg Trop Dis*. 2010; 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584> PMID: 20098726

6. Medkour H, Davoust B, Dulieu F, Maurizi L, Lamour T, Marié J-L, et al. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e0007456. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007456> PMID: 31216270
7. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*. 2002; 125(Pt 5):407–414. <https://doi.org/10.1017/s0031182002002238> PMID: 12458824
8. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548
9. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014; 6: 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267> PMID: 24833919
10. Freitas-junior LH, Chatelain E, Andrade H, Siqueira-neto JL. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. Australian Society for Parasitology; 2012; 2: 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003> PMID: 24533267
11. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J*. 2008; 175: 14–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.011> PMID: 17215150
12. Ribeiro RR, Suzan M, Michalick M, Da Silva ME, Peixoto CC, Santos D, et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int*. 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893> PMID: 29789784
13. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002; 18: 399–405. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02347-4) PMID: 12377257
14. Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. 2002; 109: 19–27. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00201-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00201-7) PMID: 12383622
15. Miró G, López-Vélez R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet Parasitol*. Elsevier; 2018; 254: 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002> PMID: 29657002
16. Nogueira S, Avino VC, Galvis-ovallos F, Pereira-chioccola VL, Antonio M, Moreira B, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*; 2019; 0: 1–11.
17. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1013–1018. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071589> PMID: 18598618
18. Pineda C, Aguilera-Tejero E, Morales MC, Belinchon-Lorenzo S, Gomez-Nieto LC, Garcia P, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PLoS One*. 2017 Oct 5; 12(10):e0185981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185981> PMID: 28982165
19. Medkour H, Laidoudi Y, Lafri I, Davoust B, Mekroud A, Bitam I, et al. Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. Elsevier; 2020; 19: 100353. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100353> PMID: 32057382
20. Adel A, Abatih E, Speybroeck N, Soukehal A, Bouguedour R, Boughalem K, et al. Estimation of canine *Leishmania* infection prevalence in six cities of the Algerian littoral zone using a Bayesian approach. *PLoS One*; 2015; 10: e0117313–e0117313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117313> PMID: 25793942
21. Zoghalmi Z, Chouih E, Barhoumi W, Dachraoui K, Massoudi N, Helel K Ben, et al. Interaction between canine and human visceral leishmaniasis in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta Trop*. 2014; 139: 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.012> PMID: 25004438
22. Gharbi M, Jaouadi K, Mezghani D, Darghouth A. Symptoms of Canine *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp in Tunisian Dogs. 2018; 51–55. <https://doi.org/10.3166/bspe-2018-0017> PMID: 30763509
23. Boussaa S, Kasbari M, Mzabi A El, Boumezzough A. Epidemiological Investigation of Canine Leishmaniasis in Southern Morocco. *Advances in Epidemiology*. 2014; 104697. <https://doi.org/10.1155/2014/104697>
24. Bessad A, Mouloua K, Kherrachi I, Benbetka S, Benikhlef R, Mezai G, et al. *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull la Soc Pathol Exot*. 2012; 105: 5–7. <https://doi.org/10.1007/s13149-011-0182-4> PMID: 21874583

25. Cardoso L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2011; 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86> PMID: 21599936
26. Solano-Gallego L, Di Filippo L, Ordeix L, Planellas M, Roura X, Altet L, et al. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites & Vectors*; 2016; 9: 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1519-0> PMID: 27160317
27. Oliva G, Cruz I, Veterinaria M, li F, Animal P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. 2009; 397–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x> PMID: 20178476
28. Committee WHOE. Control of the leishmaniasis. 2010; 22–26.
29. Cardoso L, Pennisi MG, Solano-gallego L, Koutinas A, Miro G, Ferrer L, et al. Veterinary Parasitology Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. 2009; 165: 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022> PMID: 19559536
30. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(1):e0006082. Published 2018 Jan 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082> PMID: 29324838
31. Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-gallego L, et al. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniasis. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2017; xx: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005> PMID: 28601528
32. Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*. 2005; 16(4):213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x> PMID: 16101793
33. Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. 2009; 155–162. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1375-3> PMID: 19238439
34. Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, et al. Toxicologic Pathology. 2009; <https://doi.org/10.1177/0192623309344088> PMID: 19690151
35. Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2009; 182: 441–445. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.009> PMID: 18818112
36. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun H. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. 2009; 463–469. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1404-2> PMID: 19322588
37. Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of Allopurinol Treatment on the Progression of Chronic Nephritis in Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). 2006; 228–233. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[228:eoatot\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[228:eoatot]2.0.co;2) PMID: 16594576
38. Loo CS, Lam NS, Yu D, Su XZ, Lu F. Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. *Pharmacol Res*. 2017; 117:192–217. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.012> PMID: 27867026
39. Araujo NCP, Afonso R, Bringela A, Cancela ML, Cristiano MLS, Leite RB. Parasitology International Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of *Perkinsus olseni*, the causative agent of Perkinsosis in bivalves. *Parasitol Int*; 2013; 62: 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.010> PMID: 23831484
40. Bories C, Chollet C. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*. 2008; 62: 462–465. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.04.003> PMID: 18538529
41. Cortes S, Albuquerque A, Cabral LIL, Lopes L, Campino L, Cristiano LS. In Vitro Susceptibility of *Leishmania infantum* to Artemisinin Derivatives and Selected Trioxolanes. 2015; 59: 5032–5035. <https://doi.org/10.1128/AAC.00298-15> PMID: 26014947
42. Sen R, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier B.V.; 2010; 36: 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.008> PMID: 20403680
43. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, Dasgupta AK, et al. Therapeutic efficacy of artemisinin-loaded nanoparticles in experimental visceral leishmaniasis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V.; 2015; 130: 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.013> PMID: 25936561
44. Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003321> PMID: 25568967
45. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, Chattopadhyay AP, et al. Nanoliposomal artemisinin for the treatment of murine visceral leishmaniasis. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 2189–2204. <https://doi.org/10.2147/IJN.S106548> PMID: 28356736

46. Manna L, Reale S, Vitale F, Elio A. Research in Veterinary Science Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*. Elsevier Ltd; 2009; 87: 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.009> PMID: 19178919
47. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5249–5255. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004> PMID: 15528722
48. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2002; 106(4):315–324. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00115-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00115-2) PMID: 12079737
49. Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*; 2015; 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0896-0> PMID: 26017164
50. Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, et al. Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2013; 198: 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.001> PMID: 23680263
51. Segarra S, Miró G, Montoya A, Pardo-marín L, Boqué N, Ferrer L, et al. Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. Elsevier; 2017; 239: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.014> PMID: 28495197
52. Yang DM, Liew FY. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 1993; 106 (Pt 1):7–11. <https://doi.org/10.1017/s0031182000074758> PMID: 8479804
53. Rutteman GR, Erich SA, Mol JA, et al. Safety and efficacy field study of artesunate for dogs with non-resectable tumours. *Anticancer Res*. 2013; 33(5):1819–1827. PMID: 23645726
54. Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*. 1999; 13 (5):413–415. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(1999\)013<0413:caatv>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(1999)013<0413:caatv>2.3.co;2) PMID: 10499722
55. Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniasis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2011; 188: 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.025> PMID: 20594876
56. Alvar J, Molina R, San Andrés M, et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994; 88(4):371–378. <https://doi.org/10.1080/00034983.1994.11812879> PMID: 7979624
57. Rodríguez-cortés A, Ojeda A, Francino O, López-fuertes L, Timón M, Alberola J. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard.” 2010; 82: 251–256. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0366> PMID: 20134001
58. Manna L, Gravino E, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. Leishmania DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. 2008; 360: 358–360. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.018> PMID: 19120249
59. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*. 2016; 45: 552–578. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413> PMID: 27805725
60. Solano-gallego L, Rodriguez-cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Elsevier B.V.*; 2007; 147: 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.013> PMID: 17532143
61. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*. 2009; 179: 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009> PMID: 17936654
62. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: The key points for qPCR result interpretation. *Parasites and Vectors*. 2011; 4: 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-1> PMID: 21205315
63. Oliva BYG, Gradon LI, Cortese L, Ella PC, Medica C, li ÁF, et al. Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Volume 92, Number 2, 1 March 1998, pp. 165–171(7). <https://doi.org/10.1080/00034989860003> PMID: 9625912
64. Altet L, Solano-gallego L, Sa E, Timo M, Francino O, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. 2007; 37: 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.007> PMID: 17239885

65. Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 48(3–4):209–220. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05434-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05434-8) PMID: 8578681
66. Solano-gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Farmacologia D De. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. 2006; 39: 560–563. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560>
67. Solano-gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Enric J. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas Evolution in the course of infection and after treatment. 2001; 96: 265–276. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00446-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00446-5) PMID: 11267753
68. Pasa S, Ozensoy S, Voyvoda H, Ozbel Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. 2005; 128: 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.002> PMID: 15740861
69. Vercammen F, DeDeken R. Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1996; 139(11):264. <https://doi.org/10.1136/vr.139.11.264-a> PMID: 8888563
70. Rodríguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A. Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med.* 2006; 20(3):495–498. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[495:dolijj\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[495:dolijj]2.0.co;2) PMID: 16734080



Article

Molecular Approach for the Diagnosis of Blood and Skin Canine Filarioids

Younes Laidoudi ^{1,2,3} , Samia Bedjaoui ⁴, Hacène Medkour ^{1,2,3} , Maria Stefania Latrofa ⁵ , Abdeslam Mekroud ³, Idir Bitam ^{6,7}, Bernard Davoust ^{1,2} , Domenico Otranto ^{5,8} , and Oleg Mediannikov ^{1,2,*}

- ¹ IRD, AP-HM, Aix Marseille Univ, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; younes.laidoudi@yahoo.com (Y.L.); hacenevet1990@yahoo.fr (H.M.); bernard.davoust@gmail.com (B.D.)
- ² Microbes, Evolution, Phylogeny and Infection (MEPHI), IHU Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France
- ³ PADESCA Laboratory, Veterinary Science Institute, University Constantine 1, El Khroub 25100, Algeria; mekroudabdeslam@gmail.com
- ⁴ Laboratory of Food Hygiene and Quality Insurance System (HASAQ), Higher National Veterinary School, Issad Abbes, Oued Smar, Algiers 16000, Algeria; sbedjaoui@hotmail.com
- ⁵ Department of Veterinary Medicine, University of Bari, 70010 Valenzano, Italy; maria.latrofa@uniba.it (M.S.L.); domenico.otranto@uniba.it (D.O.)
- ⁶ IRD, AP-HM, SSA, VITROME, Aix-Marseille Univ, 13385 Marseille, France; idirbitam@gmail.com
- ⁷ Superior School of Food Sciences and Food Industries, Algiers 16004, Algeria
- ⁸ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Felestin Sq, 6517658978 Hamedan, Iran
- * Correspondence: oleguss1@gmail.com

Received: 4 October 2020; Accepted: 21 October 2020; Published: 28 October 2020



Abstract: The zoonotic *Onchocerca lupi* and tick-transmitted filarioids of the genus *Cercopithifilaria* remain less well known due to the difficulties in accessing to skin samples as target tissues. Here, we proposed a molecular approach relying on multiplex qPCR assays that allow the rapid identification of filarioids from canine blood, skin, and tick samples. This includes two newly developed duplex qPCR tests, the first one targeting filarial and *C. grassii* DNA (CanFil-C. *grassii*), and the second qPCR assay designed for the detection of *Cercopithifilaria bainaie* and *Cercopithifilaria* sp. II DNAs (C. *bainaie*-C.spII). The third one is a triplex TaqMan *cox 1* assay targeting DNA of blood microfilariae (e.g., *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema reconditum*). The novel duplex qPCRs developed were validated in silico and by screening of known DNA collection. The qPCR assays were also used for screening the blood and tick samples of 72 dogs from Algeria. This allowed the identification of canine filariasis infection with 100% of specificity and 89.47% and 100% of sensitivity from naturally infected blood and tick samples, respectively. The prevalences of 26.39% for *D. immitis* and 5.56% for both *D. repens* and *A. reconditum* were reported in blood and tick samples. *Cercopithifilaria* DNAs were detected only in tick samples, with a prevalence of 4.17% and 5.56% for *C. bainaie* and *Cercopithifilaria* sp. II, respectively. Co-infections were diagnosed in 6.94% and 13.89% of blood and tick samples, respectively. Whereas all samples were negative for *C. grassii* DNA. The use of engorged ticks instead of blood and skin samples could be an easier option for the surveillance of all canine filarioids herein investigated. The multiplex qPCR assays herein validated were shown to be useful in the detection of filarial co-infections by overcoming sequencing of positive samples.

Keywords: Canine filarioses; *Dirofilaria immitis*; *Dirofilaria repens*; *Cercopithifilaria bainaie*; *Cercopithifilaria grassii*; *Cercopithifilaria* sp. II; *Onchocerca lupi*; skin; ticks; multiplex qPCR

1. Introduction

Canine filarioses are a group of diseases caused by arthropod-borne filarioids (Spirurida: Onchocercidae) belonging to the genera *Dirofilaria*, *Acanthocheilonema*, *Cercopithifilaria*, *Brugia*, and *Onchocerca* [1–3]. In addition to their veterinary importance, many of them are zoonotic. The adult filarioids live in different districts from the hearth (*Dirofilaria immitis*) to the ocular cavities (*Onchocerca lupi*) and, many of them, in the subcutaneous tissues (i.e., *Cercopithifilaria grassii*, *Cercopithifilaria* sp. I and *Cercopithifilaria* sp. II, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema reconditum*). Once mature, the viviparous nematodes produce blood or cutaneous microfilariae (mfs), which are available to an arthropod vectors for their cycle to complete to the infective third stage larvae [1]. The availability of the microfilariae in different animal tissues and anatomical regions is related to their detection [4] and, therefore, to their diagnosis. For example, microfilariae in the subcutaneous tissues such as *Cercopithifilaria* spp. and the zoonotic *O. lupi* are less diagnosed or completely non-diagnosed in comparison to those circulating in blood such as *D. immitis*, *D. repens*, *A. reconditum* and *Acanthocheilonema dracunculoides*, where they are routinely diagnosed by several assays such as morphological identification, molecular and serological tests [5]. Recently, great importance has been given to cutaneous filariases caused by *O. lupi* and *Cercopithifilaria* spp. [6–9]. These latter are transmitted by hard ticks belonging to Ixodidae family [10], whilst for the first one pathogen the vector is still unknown. *Onchocerca lupi* was firstly detected from a Caucasian wolf (*Canis lupus*) in Georgia [11] and subsequently diagnosed in domestic animals (i.e., dogs and cats) from European countries (i.e., Hungary, Greece, Germany and Portugal) and USA [12–19]. At present, the diagnosis of *Cercopithifilaria* spp. and *O. lupi* is based mainly on microscopic examination of dog skin snip sediments and the identification of adults embedded in cutaneous/ocular nodules [3]. However, this method is quite invasive since it requires a skin biopsy, therefore representing a major limitation to this diagnosis technique in the clinical routine [20]. Molecular techniques have recently been standardized for the detection of *O. lupi* DNA [3].

After the first description of *Cercopithifilaria grassii* in 1907 by Noè in dogs in Italy, this filariasis remained mysterious until 1982, when larvae of a *Cercopithifilaria* spp. were observed in ixodid ticks in Switzerland [21], then in the brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in northern Italy [22]. In 1984, Almeida and Vicente managed to identify another cutaneous canine filarial species, *Cercopithifilaria binae*. Later, Otranto et al. (2011), reported the same species from a Sicilian dog and gave it the name *Cercopithifilaria* sp. I. Subsequently, the same author provided the full description of the species and the name *Cercopithifilaria binae* was formally retained [10]. A third species of *Cercopithifilaria* sp. mfs have been identified as *Cercopithifilaria* sp. II as a formal description was not carried out since adult specimens have never been detected [10,23]. In 2012, Otranto et al. have morphologically and molecularly characterized *C. grassii* and *Cercopithifilaria* sp. II mfs from samples derived from European dogs. This extensive study has shown that dogs can be parasitized by three dermal species namely, *C. grassii*, *C. binae*, and *Cercopithifilaria* sp. II [7,24]. In 2014, Solinas et al. conducted a study whose objective was to determine the genetic constitution of *C. binae* and *Cercopithifilaria* sp. II. [25].

To improve the molecular diagnosis of canine filariasis and to better understand the interactions of the filarioids among them, we propose in this study a novel multiplex qPCR approach. It consists primarily of two duplex and one triplex TaqMan *cox-1*-based qPCR assays for the simultaneous detection and differentiation of *D. immitis*, *D. repens*, *A. reconditum*, *C. grassii*, *C. binae*, and *Cercopithifilaria* sp. II DNA. The approach was completed by PCR/sequencing assay to detect the other canine filarioids having blood and skin mfs. Secondly, the approach was standardized on ticks infesting dogs as a suitable sample to molecularly explore all etiological agents of canine filariasis.

2. Materiel and Methods

2.1. Design Protocol and Specificity-Based Principles of the Duplex Real Time qPCRs

The mitochondrial gene encoding for the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox 1* gene) was targeted for its presence in several copies by cell and described as a “barcode gene” for filarial nematodes [26]. PCR design was performed according to the criteria for primers and probes protocol [27]. Briefly, primers and probes of two duplex qPCR assays (Table 1) targeting filarial nematodes and *C. grassii* DNA (i.e., CanFil-*C. grassii*) and those of *C. bairnae* and *Cercopithifilaria* sp. II (i.e., *C. bairnae*-C. sp. II), were designed by alignment of sequences from representative members of Onchocercidae family available from GenBank database, using primer3 software v. 0.4.0 (<http://primer3.ut.ee>). Subsequently, all possible combinations of forward-reverse and probe-reverse of each qPCR system were checked within the DNA databases of metazoans (taxid:33208), vertebrates (taxid:7742), bacteria (taxid:2), Canidae (taxid:9608), Felidae (taxid:9682), and humans (taxid:9605) using primer-BLAST [28]. Primers and hydrolysis probes were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) and Applied Biosystems™ (Foster City, CA, USA), respectively.

Table 1. Primers and Probes Designed for Duplex qPCR Assays accordingly to Species Examined.

Assay Name	Sequences Names	Sequences	Specificity
CanFil- <i>C. grassii</i>	C. Fil.354f	GATCGTAATTTTARTACYCTTTTTATGA	Filaria/ <i>C. grassii</i>
	Can-fil.411p	6VIC-TATCAGCATTTGTTTTGGTTTT-TAMRA	
	<i>C. grassii</i> .433p	6FAM-GGAAGGGTGGTAATCCTCTCTTT-TAMRA	
	C. Fil.564r	CAGCAATCCAAATAGAAGCAAAA	
<i>C. bairnae</i> -C.spII	T-Fil-62f	TTGTCITTTTGGTTTACTTTTGTGG	<i>C. bairnae</i> / <i>Cercopithifilaria</i> sp. II
	<i>C. bai</i> .121p	6FAM-AGGGGGTGCTGGTAGCAGG-TAMRA	
	C. sp. II.116p	6VIC-GTTGGTAGAGCCCTGGGAGT-TAMRA	
	T-Fil-337r	GAAGTCAAATAAGAAGTRCAAACAAACA	

2.2. Run Protocols

Both duplex qPCR reactions were carried out in a total volume of 20 µL. The reaction mixture contained 10 µL of Master Mix Roche (Eurogentec), 2 µL of ultra-purified water DNase-RNase free, 0.5 µL of each primer (20 µM of concentration), and 0.5 µL for both UDG and each probe (5 µM of concentration). Finally, 5 µL of DNA template was added to the mixture. The TaqMan cycling protocol included two hold steps at 50 °C for 2 min followed by 15 min at 95 °C, and 39 cycles of two steps each (95 °C for 30 s and 60 °C for 30 s). These reactions were performed in a thermal cycler CFX96 Touch detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

2.3. Assays Validation

2.3.1. Specificity Validation

Duplex-qPCR assays were challenged against two DNA collection: (i) A total of 46 genomic DNA, consisting of 34 samples from adult or larval filarioids from 14 species (i.e., *Cercopithifilaria* sp. II, *C. grassii*, *C. bairnae*, *Onchocerca lupi*, *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema reconditum*, *Setaria digitata*, *Mansonella* sp., *M. perstans*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, *Brugia* sp., *B. malayi*), 2 DNA samples from the thelazoid eye worm (*T. callipaeda*), and 10 filarial free samples (5 skin samples and 5 ticks), and (ii) 57 DNA samples (Supplementary Table S1) that consist of non-filarial nematodes, arthropods, laboratory-maintained colonies, as well as human, monkey, donkey, horse, cattle, mouse, and dog DNAs.

2.3.2. Limit of Detection and Efficiency Assessment

The analytical sensitivity of the newly developed qPCRs was assessed using a serial 10-fold dilutions of both single-species and spiked DNAs. The DNA of *O. lupi* and *C. grassii* as well as the spiked DNA from both species were used for the duplex qPCR CanFil-*C. grassii* while the DNA from

C. baina and *Cercopithifilaria* sp. II and the spiked DNA samples were used for the duplex qPCR *C. baina*-*C. sp. II*. The sensitivity of each assay was assessed by generating the standard curves and by analyses of the derived parameters (i.e., efficiency, slope, Y-intercept, and correlation coefficient) within CFX Manager Software Version 3 [29].

2.3.3. Microfilariae Quantification Protocol

The quantification protocol has been performed for the duplex qPCR filaria-*C. grassii* to evaluate the detection limit in term of mfs concentration from biological samples. A serial 10-fold dilutions of *D. immitis* DNA extracted from 200 μ L of infected canine blood [5] containing 470 mfs per mL (i.e., 94 mf/200 μ L of eluted DNA and 2.35 mfs/5 μ L of qPCR reaction) were tested. In addition to the standard curves, the relative fluorescence units (RFUs) from the dye (VIC, Table 1) were used to evaluate the qPCR efficiency in detecting the related mfs DNA as previously described [5]. The cut-of value was determined with a tolerance coefficient of 5% according to the formula described [29].

2.4. Set Up of a Molecular Approach for the Diagnosis of Blood and Skin Filarioids

2.4.1. Samples Collection

During an expedition to the Northern Algeria canine samples (blood and ectoparasites) have been collected [30]. The study area was known to be endemic for ticks and tick-borne pathogens such as [30] *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii*, and *Ehrlichia canis* [31]. A total of 567 ticks were collected from 72 (32%) dogs out of 227 animals sampled [30]. Ticks from each dog were kept in tubes containing 70° of ethanol and were conducted to our laboratory for further analysis. One engorged tick and blood samples of each infested dog ($n = 72$) were subjected to molecular analysis.

Genomic DNA was extracted individually from all tick body and blood samples. In order to minimize PCR inhibitors from tick samples, we followed the extraction protocol described by Halos et al., 2004 [32]. Briefly, a bead-based physical disruption of the tick body within the Tissue-Lyser apparatus (Qiagen, Hilden, Germany), and 24 h of enzymatic digestion at 56 °C using buffer G2 supplemented with 25% of proteinase K were performed prior DNA extraction. Meanwhile, blood samples were subjected only to the enzymatic digestion prior to DNA extraction. The extraction was performed using the EZ1 DNA tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), in line with the manufacturer's instructions. DNA was eluted in a final volume of 200 μ L and stored at -20 °C until analysis.

2.4.2. Ethics Approval and Consent to Participate

Dogs were examined by veterinarians with the assistance and acceptance of their owners. Ethical aspects related to dog sampling were treated in accordance with Algerian legislation guidelines. Risk assessment was submitted to and approved by the ethics committee and decision board of the veterinary practitioners from the wilayas of the North of Algeria. These institutions are affiliated with the Algerian Ministry of Agriculture and Rural Development (Directions des Services Vétérinaires). Protocol of the study was also approved by the scientific college (Procès-Verbal du CSI N°6, 2018) at the Veterinary Science Institute, University Constantine 1, Algeria. To facilitate field work, collaborations were established with veterinary doctors and their assistants working in these establishments.

2.4.3. Diagnostic Approach Standardization on Biological Samples

To gain further insight into the diagnosis value of filarial infection from canine samples, we assessed a multiplex qPCRs approach based on two duplexes qPCRs (CanFil-*C. grassii* and Cerco spI-spII) herein developed and another multiplex qPCR system (Triplex TaqMan *cox 1*) [5]. The approach was proposed to explore the presence of filarial DNA followed by species-level identification of *C. grassii*, *C. baina*, *Cercopithifilaria* sp. II, *D. immitis*, *D. repens* and *A. reconditum*. The amplification and sequence typing approach using filaria generic PCR primers and probes [Pan-fil *cox 1* PCR] [5] targeting the partial (509 bp) *cox 1* gene of filarial nematodes have been used. Sequencing analysis was performed

to achieve the identification at the species level. Briefly, PCR positive products were resolved in 0.5x GelRed stained (Biotium, Fremont, CA, USA) agarose gels (2%), then purified using NucleoFast® (Macherey Nagel, Düren, Germany) 96 PCR DNA purification plate prior to run on the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The BigDye products were purified on the Sephadex G-50 Superfine gel filtration resin (Cytiva, Formerly GE Healthcare Life Sciences, Sweden) prior the sequencing on the ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finally, *cox 1* nucleotide sequences were edited using ChromasPro 2.0.0 (Technilysium Pty Ltd., Brisbane, Australia), aligned against the closely related species using MAFFT [33]. Best fit model and maximum likelihood phylogeny were performed on MEGA 6 [34]. Phylogram was edited using iTOL v4 software [35].

Standardization of the assays was performed on two different panels of canine samples (i.e., blood and tick samples). However, because the gold standard tests (dog necropsy, blood concentration test and tick dissection) were absent, filarial true-positive dogs were considered if at least one DNA sequence was obtained from at least one sample (i.e., tick or blood) of each dog. However, samples that had yielded unreadable DNA sequences (overlapping peaks in the electropherograms) from both tick and blood samples of the same dog were removed from the analysis. Finally, prevalence, correct classification, misclassification, sensitivity, specificity, false positive rate, false negative rate, positive and negative predictive value, and Youden index were calculated for each approach [36–38].

3. Results

The in-silico and in-vitro validations revealed that, the newly designed duplex-qPCRs were specific for the target species. The duplex COI-based qPCR for *C. grassii* and canine filarioids amplified all filarial species ($n = 14$) and the thelazioid nematode (*T. callipaeda*) assessed from different biological sources discriminating *C. grassii* DNA (Table 2). The duplex COI-based qPCR for *Cercopithifilaria* spp. was able to detect and discriminate between *C. baina* and *Cercopithifilaria* sp. II. No DNA amplification was obtained from both free-filarial tick and skin samples as well as from the panel of negative controls summarized in Supplementary Table S1.

Table 2. In-vitro validation of the newly customized duplex qPCRs through the DNA panel of filarioids and negative hosts (dogs and ticks).

Panels of Tested DNA from Filarioids			CanFil- <i>C. grassii</i>		<i>C. bairnei</i> - <i>C. sp. II</i>	
Species Name	Specimens	Tested Samples (n)	Filarial DNA	<i>C. grassii</i>	<i>C. bairnei</i>	<i>C. sp. II</i>
<i>C. bairnei</i>	Adult worms	1	1	Negative	1	Negative
	Larva F1 "Microfilaria"	2	2	Negative	2	Negative
	Infected ticks	5	5	Negative	5	Negative
<i>Cercopithifilaria sp. II</i>	Larva F1 "Microfilaria"	1	1	Negative	Negative	1
<i>C. bairnei</i> + <i>C. sp. II</i>	Mixed DNA	3	3	Negative	3	3
<i>C. grassii</i>	Larva F1 "Microfilaria"	1	1	1	Negative	Negative
<i>C. grassii</i> + <i>C. bairnei</i>	Mixed DNA	3	3	3	3	Negative
<i>C. grassii</i> + <i>C. sp. II</i>	Mixed DNA	2	2	2	Negative	2
<i>O. lupi</i>	Larva F1 "Microfilaria"	1	1	Negative	Negative	Negative
	Infected skin	6	6	Negative	Negative	Negative
<i>D. immitis</i>	Adult worms	2	2	Negative	Negative	Negative
<i>D. repens</i>	Adult worms	1	1	Negative	Negative	Negative
<i>A. reconditum</i>	Blood microfilaria	1	1	Negative	Negative	Negative
<i>T. callipaeda</i>	Adult worms	2	2	Negative	Negative	Negative
<i>S. digitata</i>	Adult worms	2	2	Negative	Negative	Negative
<i>Mansonella sp.</i>	Blood microfilaria	1	1	Negative	Negative	Negative
<i>M. perstans</i>	Blood microfilaria	1	1	Negative	Negative	Negative
<i>W. bancrofti</i>	Blood microfilaria	2	2	Negative	Negative	Negative
<i>Loa loa</i>	Blood microfilaria	1	1	Negative	Negative	Negative
<i>Brugia sp.</i>	Infected mosquitoes	3	3	Negative	Negative	Negative
<i>B. malayi.</i>	Infected mosquitoes	3	3	Negative	Negative	Negative
Filarial free samples	Ticks	5	Negative	Negative	Negative	Negative
	Dog skin	5	Negative	Negative	Negative	Negative

Analytical Sensitivity and Assay Performance Characteristics

The analytical sensitivity of each duplex qPCR was confirmed by qPCR efficiencies values ranging from 99.3% to 104.9%, with slope from -3.34 to -3.21 , Y-intercept values from 40.541 to 45.792 with an $R^2 \geq 0.99$ for all qPCR reactions (Table 3, Supplementary Figure S1 and S2).

Table 3. Analytical Sensitivities and Performance Characteristics of the Duplex qPCRs in Detecting Single Species and Pooled DNAs.

Assays	DNA Target	Efficiency (%)	Coefficient of Determination (R^2)	Slope	Y-Intercept	
CanFil-C.grasii	Single-species DNA	<i>Onchocerca lupi</i>	103.2	0.994	-3.247	40.541
		<i>Cercopithifilaria grassii</i>	99.3	0.999	-3.38	41.018
	Pooled DNAs	<i>O. lupi</i>	103.8	0.993	-3.235	43.74
		<i>C. grassii</i>	99.3	0.996	-3.34	45.107
C. bainaе-C.sp.II	Single-species DNA	<i>Cercopithifilaria bainaе</i>	100.3	0.996	-3.314	43.902
		<i>Cercopithifilaria</i> sp. II.	100.3	0.997	-3.315	45.792
	Pooled DNAs	<i>C. bainaе</i>	99.5	0.995	-3.334	44.918
		<i>Cercopithifilaria</i> sp. II.	104.9	0.994	-3.21	43.694

Results of the detection limit of the duplex qPCR targeting canine filarioids and *C. grassii* are detailed in Table 4. The assay was able to detect up to 4.7×10^{-2} mfs/mL (i.e., corresponding to 2.35×10^{-4} mfs/5 μ L) with an efficiency of 99.8% and a slope of -3.327 and with a perfect adjustment ($R^2 = 0.999$) (Supplementary Figure S3).

Table 4. Sensitivity and Assay Performance Characteristics of the Duplex COI-based System in Detecting *D. immitis* Microfilariae.

SQ mfs/mL	SQ Per qPCR Reaction from mfs/5 μ L	Ct Mean	E-RFU	SCRS
$4.7 \times 10^{+2}$	2.35×10^0	24.26	1554	
$4.7 \times 10^{+1}$	2.35×10^{-1}	27.35	1363	
4.7×10^0	2.35×10^{-2}	31.03	1046	
4.7×10^{-1}	2.35×10^{-3}	34.02	596	
4.7×10^{-2}	2.35×10^{-4}	37.92	175	[E = 96.9%]
4.7×10^{-3}	2.35×10^{-5}	N/A	N/A	[S = -3.398]
4.7×10^{-4}	2.35×10^{-6}	N/A	N/A	[Y.int = 33.2]
4.7×10^{-5}	2.35×10^{-7}	N/A	N/A	[$R^2 = 0.998$]
4.7×10^{-6}	2.35×10^{-8}	N/A	N/A	
4.7×10^{-7}	2.35×10^{-9}	N/A	N/A	
Cut Off Value		38.0	161	
Negative Control		N/A	6.09	

SQ: Starting Quantity, **mfs:** microfilaria, **Cq:** cycle quantification value; **N/A:** No amplification, **E-RFU:** End of relative fluorescence unit, **SCRS:** Standard Curve Results Spreadsheet, **E:** Efficiency, **S:** Slope, **Y.int:** Y-intercept.

The following figure (Figure 1) shows the suitable samples and the principles of multiplex qPCRs design based on specificity in the current approach to diagnose canine filariasis. PCR systems are classed according to their specificity from exploring to species-specific resolution.

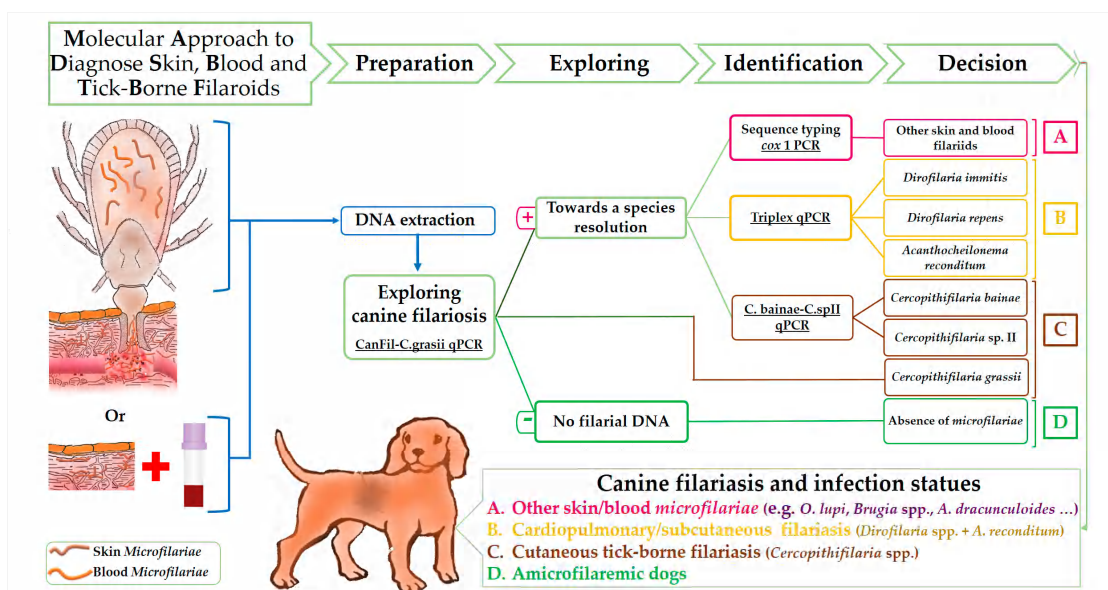


Figure 1. Flow Diagram showing the specificity-based principles of the proposed molecular approach in detecting canine filarioids.

The detailed results of molecular identification of filarial DNA from blood and tick samples are shown in Table 5. Overall, the multiplex qPCR approach allowed the identification of 22 (30.55%) filarial-positive samples. In particular, 14 (19.44%), two (2.78%) and one (1.39%) blood samples were positive for *D. immitis*, *D. repens* and *A. reconditum*, respectively, and five (6.94%) were coinfecting, two (2.78%) with *D. immitis* and *D. repens* and three (4.17%) with *D. immitis* and *A. reconditum*. All blood samples were negative for *Cercopithifilaria* spp. Accordingly, all filarial species identified in the blood of dogs were also detected in their ticks. Whilst, *Cercopithifilaria* spp. DNA was found in six ticks, four (5.56%) *D. immitis* positive samples and one (1.39%) *D. immitis*-*D. repens* coinfecting sample were also positive for *C. bainaе*. *Cercopithifilaria* sp. II was detected in 3 (4.14%) ticks, one among them was also positive for *D. immitis*.

Table 5. Distribution of Positive Samples Detected by Each Molecular Assay (i.e., Multiplex qPCRs and PCR/Sequencing) from Canine Blood and Tick Samples.

Filarial Species	Multiplex qPCR		PCR/Sequencing	
	Blood	Tick	Blood	Tick
Single-species DNA				
<i>D. immitis</i>	14	9	14	9
<i>D. repens</i>	2	2	2	2
<i>A. reconditum</i>	1	1	1	1
<i>C. bainaе</i>	0	0	0	0
<i>Cercopithifilaria</i> sp. II	0	2	0	2
Total	17	14	17	14
Multi-species DNA				
<i>D. immitis</i> and <i>D. repens</i>	2	1	2 ur	1 ur
<i>D. immitis</i> and <i>A. reconditum</i>	3	3	3 ur	3 ur
<i>D. immitis</i> and <i>C. bainaе</i>	0	4	0	4 ur
<i>D. immitis</i> and <i>Cercopithifilaria</i> sp. II	0	1	0	1 ur
<i>D. immitis</i> , <i>D. repens</i> and <i>C. bainaе</i>	0	1	0	1 ur
Total	5	10	5 ur	10 ur

ur: PCR positive samples that yielded unreliable DNA sequences.

Accordingly, all filaria-positive samples by the qPCR were also amplified by filaria generic PCR [Pan-fil *cox 1* PCR]. High quality DNA sequences were obtained from 17 (23.61%) blood samples, including 14 (19.44%) *D. immitis*, two (2.78%) *D. repens* and one (1.39%) *A. reconditum* and 14 (19.44%) tick samples, including nine (12.5%) *D. immitis*, two (2.78%) *D. repens*, one (1.39%) *A. reconditum* and two (2.78%) *Cercopithifilaria* sp. II. Whilst five (6.94%) and 10 (13.89%) samples have yielded unreadable DNA sequences (overlapping peaks in the electropherograms) from blood and ticks respectively (Table 5). Phylogenetic analysis confirmed the molecular identification of each filarial detected from blood and/or tick samples by clustering the representative sequences within the clades of the same reference species (Figure 2). DNA sequences generated during the present study were deposited in GenBank under the accession number from MW138005 to MW138035.

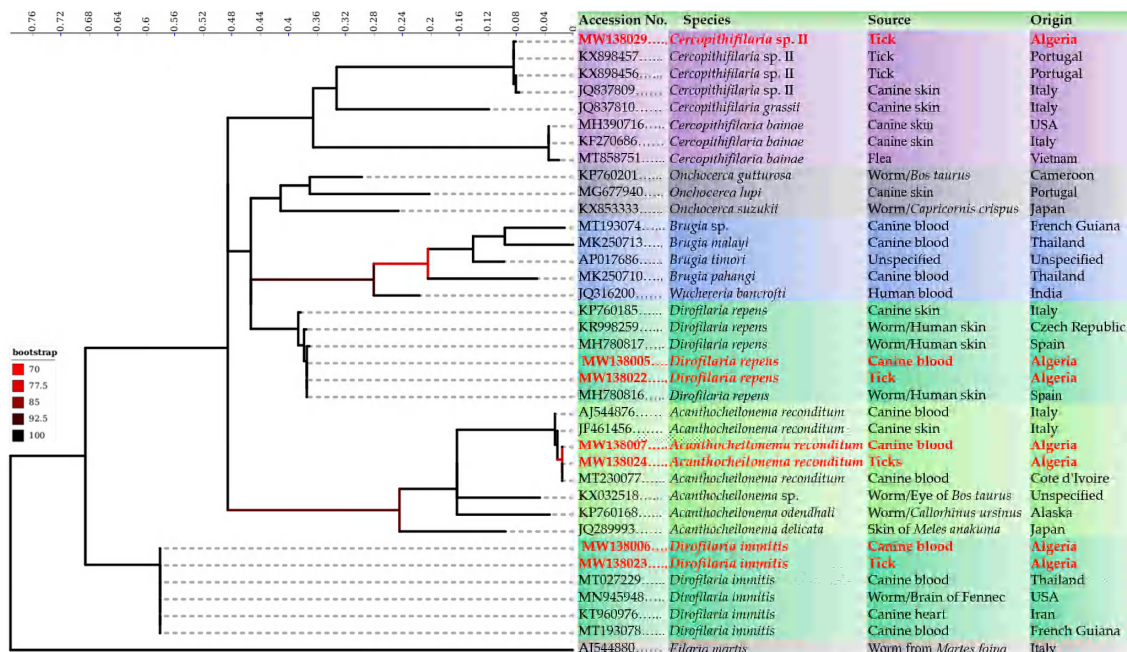


Figure 2. Phylogenetic tree showing the clusterization of filarial genotypes identified in the present study with the other filarioids. The tree was inferred using the Maximum Likelihood method based on 1000 bootstraps and the Tamura-Nei model. The analysis involved 36 partials (453 bp) *cox 1* sequences of filarioids. Outgroup taxons *Filaria martis* (AJ544880) is drawn at root. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.5779)). The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable ([+I], 49.5935% sites). Log likelihood was -2738.5083. The axis showed the global distance observed throughout the trees. The identity of each taxa is color-coded according to the genus. Branches are color-coded according to the bootstraps percent.

Despite the successful species resolution of the multiplex approach from tick and blood samples of all filarial positive dogs ($n = 24$), specificity and sensitivity analysis involved only 19 among them (Supplementary Table S2). These latter were considered as filarial true positives dogs, from which at least one DNA sequence was obtained from their blood and/or tick samples (Supplementary Table S2). A total of 48 dogs were negative for filarial DNA from both blood and tick samples. Five dogs were excluded from the analysis because they were coinfecting and have yielded unreadable DNA sequences (overlapping peaks in the electropherograms) from their blood and tick samples.

Compared to the gold standard (Table 6), the multiplex qPCRs approach combining the identification of *D. immitis*, *D. repens*, *A. reconditum*, *C. grassii*, *C. bainaie*, and *Cercopithifilaria* sp. II allowed the diagnosis of canine filarioids with 100% of specificity in 89.47% and 100% of cases from their blood and ticks respectively (Youden index of 0.86 and 1, respectively). While the sequence typing

approach allowed the diagnosis of canine filariasis with 100% of specificity in 89.47% and 73.68% of cases from their blood and ticks respectively (Youden index of 0.86 and 0.74, respectively).

Table 6. Performance Characteristics of Molecular Assays in Identifying Filarial DNA from Canine Blood and Ticks.

Performances (in % Unless Specified)	Multiplex qPCRs Approach		Sequence Typing Approach	
	Ticks	Blood	Ticks	Blood
True positive ($n = 19$)	19	17	14	17
True negative ($n = 48$)	48	48	48	48
False positive (n)	0	0	0	0
False negative (n)	0	2	5	2
Total	67	67	67	67
Sensitivity	100	89.47	73.68	89.47
Specificity	100	100	100	100
Predictive positive value (PPV)	100	100	100	100
Predictive negative value (PNV)	100	96	90.57	96
False positive rate	0	0	0	0
False negative rate	0	4	9.43	4
Correct classification	28.36	28.36	28.36	28.36
Prevalence	28.36	25.37	20.9	25.37
Youden index	1	0.86	0.74	0.86

4. Discussion

In this study we assessed a molecular approach relying on multiplex qPCR assays that allow the rapid identification of filarioids from canine blood, skin, and tick samples. Canine filarial agents such as the zoonotic *O. lupi* and tick-transmitted filarioids of the genus *Cercopithifilaria* spread in many areas of Europe, Mediterranean Basin and several part of the world [39,40]. Furthermore, their life cycle, vectors as well as the parasites themselves are less or completely unknown for some of them [3,7]. Depending on monitoring progress and vector surveillance, their detection contributes in avoiding the introduction and/or spread of these vector-borne helminths causing diseases [41]. Therefore, considering the zoonotic role for some of these parasites with an increasing of the public health implications, the diagnosis and/or the monitoring assays must provide species-level identification to properly assist in decisions for medical and preventive treatments. The identification of filarial agent provides a better understanding on the distribution and prevalence of the disease. In addition to the poorly developed veterinary diagnostic services [41], diagnosing skin filarial agents remains laborious and difficult because of the limited access to skin samples and parasite material. As a consequence, the approaches for managing these health threatening parasites might be incomplete and need more development.

Molecular detection of the majority of canine filariasis of the genus *Cercopithifilaria* relies heavily on sequence typing method. This method is based on the use of filaria generic primers for DNA amplification and sequencing analysis [8,42], since filaria generic primers can theoretically amplify any filarial DNA [5]. However, as we demonstrated here and elsewhere [5,43], the sequence typing method may not allow species identification when the samples are coinfecting with two or more species. Our findings showed that, the new duplex-qPCRs (CanFil-C. *grassii* and C. *bainae*-CspII) were specific to the target species without failure. A high analytical sensitivity was provided by each duplex qPCR in detecting single-species and/or pooled DNA with an efficiency ranged from 99.3% to 104.9% and a coefficient of determination (R^2) greater than 0.99. Furthermore, the duplex CanFil-C. *grassii* also explore the presence of filarial DNA, which assist in decision for further investigations and allowed rapidly information about the presence/absence of filarial DNA, an important step when the diagnosis approach relies on several species-specific assays. Although when used together, the novel duplex qPCRs and the triplex TaqMan *cox 1* assays allowed the identification of canine filariasis caused

by *C. baina*, *Cercopithifilaria* sp. II, *D. immitis*, *D. repens* and *A. reconditum* with 100% of specificity and 89.47% and 100% of sensitivity from naturally infected blood and tick samples, respectively. These features were higher than those of the sequence typing approach, which consolidates the usefulness of multiplex qPCR in the detection of filarial co-infections and reinforces the previous studies [5,44].

Another limitation of either molecular or parasitological diagnosis of canine filariasis is the choice of samples, since both methods are often targeting mfs specimens. However, these larvae have different locations in the host. Indeed some of them such as *D. immitis*, *D. repens* and *A. reconditum* are located in the bloodstream with a different density, while *Cercopithifilaria* spp. and other skin mfs are distributed unevenly in superficial dermal tissues [4]. The only two reports of the blood *C. baina* DNA remain inconclusive and could just be an accidental detection of micro-fragments from dead microfilaria [43,45]. These features indicating that the exhaustive diagnosis of canine filariasis should rely on both blood and skin samples.

Data presented here demonstrated that, tick samples are more suitable for exploring both blood and skin microfilaria when the assay is able to discriminate at the species-level the coinfections. In addition to their role as vector for *Cercopithifilaria* spp. [25], ticks are co-evolved with these filarioids and shown the same predilection sites on their hosts (dogs) [4], which indicates the close contact of *Cercopithifilaria* microfilaria and ticks within infected dogs. The recent study of Lineberry et al., (2020), reported the DNA of *C. baina* in ticks infesting positive dogs [42]. Furthermore, several studies reported the presence of filarial DNA from ticks infesting animals [46,47], indicating that ticks could be considered as equivalent to blood sample in detecting filarioids. The use of the hematophagous arthropod as an alternative blood sampling method was demonstrated for Triatomine bugs. This sampling method was advantages in obtaining blood samples without anaesthesia from animals where veins are inaccessible [48]. Notwithstanding the absence of skin from sample panels herein tested, which may represent a limitation of the multiplex qPCR approach, the use of ticks infesting dogs provides an alternative to the complicated sampling methods requiring both blood and skin samples from the same dogs. Thereby, exploring filarial DNA from engorged ticks offers the possibility to detect both skin and blood mfs and reduces the sampling and analyzing steps.

In this study, we observed 29% and 33% prevalence of filarial infections from blood and tick samples from Algerian dogs, respectively, which are almost identical to those previously observed in dog blood samples from India (26.5%) [49] and from Italy (23%) [50,51]. In addition to *D. immitis* already described, for the first time, we report the presence of *D. repens*, *A. reconditum*, *C. baina* and *Cercopithifilaria* sp. II in Algeria. Here the prevalence observed for *D. immitis* was 23.61%, which is close to that reported from the same study area (Northern Algeria) by Ben-Mahdi and Madani (2009), where 24.46% of dogs were *D. immitis*-antigens positive [52], but it was higher than that reported by Tahir et al. in 2015, who reported a prevalence of 1.4% for *D. immitis* in dog blood samples by molecular tests [53]. A very high prevalence of canine microfilaraemia of 42.68% was observed in Cherthala in the state of Kerala, a southern area of India [2]. In Northern Virginia, 0.74% *Amblyomma americanum* ticks carried filarial nematode DNA [54]. In Southern Connecticut, infection rate of *Acanthocheilonema* filarial nematode in *Ixodes* ticks is relatively high with 22% and 30% in nymph and adult ixodid ticks, respectively [46]. The overall prevalence of *Cercopithifilaria* sp. in the sampled animal populations was 13.9% and 10.5% by microscopy of skin sediments and by PCR on skin samples, respectively. The higher prevalence rate of infested animals was recorded in Spain either by microscopical examination of skin sediments (21.6%) or by molecular detection on skin samples (45.5%) whereas the lower positivity rate was in Greece (4.3%). In Italy, according to the sites and to the diagnostic tests employed, the prevalence of *Cercopithifilaria* spp. infestation in dogs varied from 5.3% up to 19.5% [10]. Differences in reported prevalence levels among studies may due to diagnosis tool performances, the different tissues sampled, the number of animals tested, but also due to the geographical distribution of tick vectors transmitting pathogens.

5. Conclusion

The diagnosis approach combining species-specific multiplex qPCR assays allowed the identification of *D. immitis*, *D. repens*, *A. reconditum*, *C. grassii*, *C. bainae*, and *Cercopithifilaria* sp. II despite the presence of coinfection. The use of ticks infesting dogs instead of blood and skin samples could be an easier way that contribute to disease progress monitoring and to the surveillance of canine filariasis. This would be particularly relevant, since most of them are pathogenic for dogs and constitutes an emergent zoonosis. Although the new qPCR assays standardized for specific detection of *Cercopithifilaria* species may ultimately assist in the quest to identify the elusive adult *Cercopithifilaria* sp. II. We demonstrated the pressure caused by canine vector-borne filariasis and how intense the challenge was for dogs in Algeria. We draw general attention to public health risks, since dogs are sentinels for potential zoonosis. There is an urgent need for the implementation of preventive strategies against canine vector filarioids. Finally, we encourage researchers to follow the molecular procedure summarized in Figure 1 to explore, diagnose, and monitor canine filariasis from ticks infesting dogs unless combining blood and skin samples.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1671/s1>. Table S1: Negative control DNA used for specificity determination of designed qPCR systems; Table S2: Molecular identification of filarial DNA from positive samples (tick/blood). Figure S1: Analytical sensitivity of the CanFil-C. *grassii* assay in detecting (a) filarial DNA (i.e., *Onchocerca lupi*), (b) *Cercopithifilaria grassii* and (c) pooled DNA of *O. lupi* and *C. grassii*. Figure S2: Analytical sensitivity of the C. *bainae*-C.sp.II assay in detecting (a) *Cercopithifilaria binae*, (b) *Cercopithifilaria* sp. II and (c) pooled DNA of *C. binae* and *Cercopithifilaria* sp. II. Figure S3: Analytical sensitivity and detection limit of the CanFil-C. *grassii* assay using a serial 10-fold dilution of single-species-DNA of *Dirofilaria immitis microfilariae*.

Author Contributions: Y.L., B.D. and O.M. designed the study; Y.L. performed the lab work and data analysis; Y.L., H.M., I.B., and A.M. field investigations; Y.L., S.B., H.M., M.S.L., D.O., and O.M., writing—review and editing the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, the National Research Agency under the program “Investissements d’avenir”, reference ANR-10-IAHU-03, the Région Provence-Alpes-Côte d’Azur and European funding FEDER PRIMI.

Acknowledgments: We thank veterinarians and dog owners for their valuable help with the field work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Anderson, R.C. *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*; C.A.B. International: Wallingford, UK, 1992; p. 578.
2. Ravindran, R.; Varghese, S.; Nair, S.N.; Balan, V.M.; Lakshmanan, B.; Ashruf, R.M.; Kumar, S.S.; Gopalan, A.K.K.; Nair, A.S.; Chandrasekhar, L. Canine filarial infections in a human *Brugia malayi* endemic area of India. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Latrofa, M.S.; Annoscia, G.; Colella, V.; Cavalera, M.A.; Maia, C.; Martin, C.; Šlapeta, J.; Otranto, D. A real-time PCR tool for the surveillance of zoonotic *Onchocerca lupi* in dogs, cats and potential vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Otranto, D.; Brianti, E.; Abramo, F.; Gaglio, G.; Napoli, E.; Latrofa, M.S.; Ramos, R.A.; Dantas-Torres, F.; Bain, O. Cutaneous distribution and localization of *Cercopithifilaria* sp. microfilariae in dogs. *Vet. Parasitol.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Laidoudi, Y.; Davoust, B.; Niang, E.H.A.; Varloud, M.; Fenollar, F.; Mediannikov, O. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 1–15. [[CrossRef](#)]
6. Sréter, T.; Széll, Z. Onchocercosis: A newly recognized disease in dogs. *Vet. Parasitol.* **2008**, *151*, 1–13. [[CrossRef](#)]
7. Otranto, D.; Brianti, E.; Dantas-Torres, F.; Miro, G.; Latrofa, M.S.; Mutafchiev, Y.; Bain, O. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitology* **2013**, *140*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Cortes, H.C.E.; Cardoso, L.; Giannelli, A.; Latrofa, M.S.; Dantas-Torres, F.; Otranto, D. Diversity of *Cercopithifilaria* species in dogs from Portugal. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cantey, P.T.; Weeks, J.; Edwards, M.; Rao, S.; Ostovar, G.A.; Dehority, W.; Alzona, M.; Swoboda, S.; Christiaens, B.; Ballan, W. The emergence of zoonotic *Onchocerca lupi* infection in the United States—A case-series. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 778–783. [[CrossRef](#)]
10. Otranto, D.; Brianti, E.; Latrofa, M.; Annoscia, G.; Weigl, S.; Lia, R.; Gaglio, G.; Napoli, E.; Giannetto, S.; Papadopoulos, E.; et al. On a *Cercopithifilaria* sp. transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*: A neglected, but widespread filarioid of dogs. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)]
11. Rodonaja, T.E. A new species of Nematode, *Onchocerca lupi* n. sp., from *Canis lupus cubanensis*. *Soobscenija Akademii Nauk Gruzinskoj SSR* **1967**, *45*, 715–719.
12. Otranto, D.; Giannelli, A.; Trumble, N.S.; Chavkin, M.; Kennard, G.; Latrofa, M.S.; Bowman, D.D.; Dantas-Torres, F.; Eberhard, M.L. Clinical case presentation and a review of the literature of canine onchocercosis by *Onchocerca lupi* in the United States. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 1–8. [[CrossRef](#)]
13. Hermosilla, C.; Hetzel, U.; Bausch, M.; Grübl, J.; Bauer, C. First autochthonous case of canine ocular onchocercosis in Germany. *Vet. Rec.* **2005**, *156*, 450–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Széll, Z.; Erdélyi, I.; Sréter, T.; Albert, M.; Varga, I. Canine ocular onchocercosis in Hungary. *Vet. Parasitol.* **2001**, *97*, 245–251. [[CrossRef](#)]
15. Labelle, A.L.; Daniels, J.B.; Dix, M.; Labelle, P. *Onchocerca lupi* causing ocular disease in two cats. *Vet. Ophthalmol.* **2011**, *14*. [[CrossRef](#)]
16. Labelle, A.L.; Maddox, C.W.; Daniels, J.B.; Lanka, S.; Eggett, T.E.; Dubielzig, R.R.; Labelle, P. Canine ocular onchocercosis in the United States is associated with *Onchocerca lupi*. *Vet. Parasitol.* **2013**, *193*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maia, C.; Annoscia, G.; Latrofa, M.S.; Pereira, A.; Giannelli, A.; Pedroso, L.; Otranto, D. *Onchocerca lupi* nematode in cat, Portugal. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 2252–2253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Otranto, D.; Dantas-Torres, F.; Giannelli, A.; Latrofa, M.S.; Papadopoulos, E.; Cardoso, L.; Cortes, H. Zoonotic *Onchocerca lupi* infection in dogs, Greece and Portugal, 2011–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 2000–2003. [[CrossRef](#)]
19. Miró, G.; Montoya, A.; Checa, R.; Gálvez, R.; Mínguez, J.J.; Marino, V.; Otranto, D. First detection of *Onchocerca lupi* infection in dogs in southern Spain. *Parasites Vectors* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)]
20. Otranto, D.; Dantas-Torres, F.; Giannelli, A.; Abramo, F.; Ignjatović Čupina, A.; Petrić, D.; Cardoso, L.; Mutafchiev, Y.; Cortes, H. Cutaneous Distribution and Circadian Rhythm of *Onchocerca lupi* Microfilariae in Dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**. [[CrossRef](#)]
21. Bain, O.; Aeschlimann, A.; Chatelangat, P. Présence, chez des tiques de la région de Genève, de larves infestantes qui pourraient se rapporter à la filaire de chien *Dipetalonema grassii*. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* **1982**. [[CrossRef](#)]
22. Pampiglione, S.; Canestri Trotti, G.; Marchetti, S. Ritrovamento di *Dipetalonema grassii* (Noè, 1907) in *Rhipicephalus sanguineus* su cane in Italia e descrizione di alcuni suoi stadi larvali. *Parassitologia* **1983**, *25*, 316.
23. Otranto, D.; Varcasia, A.; Solinas, C.; Scala, A.; Brianti, E.; Dantas-Torres, F.; Annoscia, G.; Martin, C.; Mutafchiev, Y.; Bain, O. Redescription of *Cercopithifilaria baina* Almeida & Vicente, 1984 (*Spirurida*, *Onchocercidae*) from a dog in Sardinia, Italy. *Parasites Vectors* **2013**. [[CrossRef](#)]
24. Otranto, D.; Latrofa, M.S.; Brianti, E.; Annoscia, G.; Parisi, A.; Dantas-Torres, F.; Bain, O.; Gasser, R.B. An assessment of genetic variability in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene of *Cercopithifilaria* sp. (*Spirurida*, *Onchocercidae*) from dog and *Rhipicephalus sanguineus* populations. *Mol. Cell. Probes* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Solinas, C.; Varcasia, A.; Brianti, E.; Giannetto, S.; Pipia, A.P.; Columbano, N.; Tosciri, G.; Dantas-Torres, F.; Garippa, G.; Otranto, D.; et al. *Cercopithifilaria* spp. in dogs in Sardinia Island (Italy). *Parasitol. Res.* **2014**. [[CrossRef](#)]
26. Ferri, E.; Barbuto, M.; Bain, O.; Galimberti, A.; Uni, S.; Guerrero, R.; Ferté, H.; Bandi, C.; Martin, C.; Casiraghi, M. Integrated taxonomy: Traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Front. Zool.* **2009**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)]
27. SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*, 134. [[CrossRef](#)]

29. Bio-Rad Lab. *Real-Time PCR Applications Guide*; Bio-Rad Lab. Inc.: Hercules, CA, USA, 2006; Volume 41.
30. Medkour, H.; Laidoudi, Y.; Lafri, I.; Davoust, B.; Mekroud, A.; Bitam, I.; Mediannikov, O. Canine vector-borne protozoa: Molecular and serological investigation for *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., and *Hepatozoon* spp. in dogs from Northern Algeria. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2020**. [[CrossRef](#)]
31. Bessas, A.; Leulmi, H.; Bitam, I.; Zaidi, S.; Ait-Oudhia, K.; Raoult, D.; Parola, P. Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *45*, 23–28. [[CrossRef](#)]
32. Halos, L.; Jamal, T.; Vial, L.; Maillard, R.; Suau, A.; Le Menach, A.; Boulouis, H.J.; Vayssier-Taussat, M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.* **2004**, *35*. [[CrossRef](#)]
33. Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.I.; Miyata, T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yule, G.U. On the methods of measuring association between two attributes. *J. R. Stat. Soc.* **1912**, *75*, 579–652. [[CrossRef](#)]
37. Bonett, D.G.; Price, R.M. Statistical inference for generalized Yule coefficients in 2×2 contingency tables. *Sociol. Methods Res.* **2007**, *35*, 429–446. [[CrossRef](#)]
38. Warrens, M.J. On association coefficients for 2×2 tables and properties that do not depend on the marginal distributions. *Psychometrika* **2008**, *73*, 777. [[CrossRef](#)]
39. Otranto, D.; Dantas-Torres, F.; Brianti, E.; Traversa, D.; Petrić, D.; Genchi, C.; Capelli, G. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites Vectors* **2013**, *6*, 1–14. [[CrossRef](#)]
40. Dantas-Torres, F.; Otranto, D. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Vet. Parasitol.* **2020**, *282*. [[CrossRef](#)]
41. Otranto, D.; Dantas-Torres, F.; Breitschwerdt, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: Part one. *Trends Parasitol.* **2009**, *25*, 157–163. [[CrossRef](#)]
42. Lineberry, M.W.; Sundstrom, K.D.; Little, S.E.; Stayton, E.M.; Allen, K.E. Detection of *Cercophithifilaria bairnei* infection in shelter dogs and ticks in Oklahoma, USA. *Parasites Vectors* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
43. Laidoudi, Y.; Mari, J.; Tahir, D.; Watier-grillot, S. Detection of Canine Vector-Borne Filariasis and Their *Wolbachia* Endosymbionts in French Guiana. *Microorganisms* **2020**, *8*, 770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Almeida, M.; Nascimento, F.S.; Mathison, B.A.; Bishop, H.; Bradbury, R.S.; Cama, V.A.; da Silva, A.J. Duplex Real-Time PCR Assay for Clinical Differentiation of *Onchocerca lupi* and *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**. [[CrossRef](#)]
45. Rojas, A.; Rojas, D.; Montenegro, V.M.; Baneth, G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Namrata, P.; Miller, J.M.; Shilpa, M.; Reddy, P.R.; Bandoski, C.; Rossi, M.J.; Sapi, E. Filarial nematode infection in *Ixodes scapularis* ticks collected from Southern Connecticut. *Vet. Sci.* **2014**, *1*, 5–15. [[CrossRef](#)]
47. Beaver, P.C.; Burgdorfer, W. A microfilaria of exceptional size from the ixodid tick, *Ixodes dammini*, from Shelter Island, New York. *J. Parasitol.* **1984**, *70*. [[CrossRef](#)]
48. Voigt, C.C.; Peschel, U.; Wibbelt, G.; Frölich, K. An alternative, less invasive blood sample collection technique for serologic studies utilizing Triatomine bugs (*Heteroptera; Insecta*). *J. Wildl. Dis.* **2006**, *42*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Abd Rani PA, M.; Irwin, P.J.; Gatne, M.; Coleman, G.T.; McInnes, L.M.; Traub, R.J. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites Vectors* **2010**, *3*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Magi, M.; Guardone, L.; Prati, M.C.; Tozzini, G.; Torracca, B.; Monni, G.; Macchioni, F. Canine filarial infections in Tuscany, central Italy. *J. Helminthol.* **2012**, *86*, 113. [[CrossRef](#)]
51. Latrofa, M.S.; Dantas-Torres, F.; Giannelli, A.; Otranto, D. Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)]

52. Meriem-Hind, B.-M.; Mohamed, M. Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *Afr. J. Agric. Res.* **2009**, *4*, 1097–1100.
53. Tahir, D.; Damene, H.; Davoust, B.; Parola, P. First molecular detection of *Dirofilaria immitis* (*Spirurida: Onchocercidae*) infection in dogs from Northern Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *51*. [[CrossRef](#)]
54. Henning, T.C.; Orr, J.M.; Smith, J.D.; Arias, J.R.; Rasgon, J.L.; Norris, D.E. Discovery of filarial nematode DNA in *Amblyomma americanum* in Northern Virginia. *Ticks Tick Borne Dis.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

IX. RESUME - ABSTRACT

RESUME

La leishmaniose est l'une des maladies les plus négligées au monde. Les chiens sont les principaux réservoirs/hôtes de *Leishmania infantum*, agent causal de la leishmaniose viscérale canine et humaine. La leishmaniose canine (LCan) représente un problème de santé publique car c'est l'une des zoonoses les plus répandues dans le monde. De plus, les chiens sont des réservoirs/hôtes compétents de plusieurs protozoaires pathogènes transmis par des arthropodes hématophages. Tout au long de leur longue histoire de domestication, ils ont participé dans l'échange de parasites entre le bétail, la faune sauvage et les humains et restent donc une source importante de maladies émergentes et réémergentes. En Algérie, alors que la LCan est bien connue pour être endémique, aucune donnée n'est disponible sur les autres hémoprotozoaires à transmission vectorielle. **Dans un premier temps**, nous avons étudié la présence et la diversité des trypanosomes, des piroplasmes et des *Hepatozoon* spp. et mis à jour le statut épidémiologique de la LCan chez les chiens de la Kabylie au nord de l'Algérie. Un total de 227 chiens provenant de trois régions de la Kabylie ont été analysés, dont 77 chiens présentant des signes cliniques. Les chiens ont été examinés cliniquement et testés pour la présence d'anticorps anti-*L. infantum* à l'aide d'un test d'immuno-migration rapide (RIM™) et d'un test quantitatif d'immunofluorescence indirecte (IFAT). Un dépistage par PCR et un séquençage ont été effectués pour les hémoprotozoaires à transmission vectorielle. Soixante-deux pour cent (141/227) des chiens présentaient au moins une infection, tandis que 26% (59/227) étaient co-infectés. Les anticorps anti-*L. infantum* ont été détectés chez 35,7% (81/227) des chiens, dont 88,7% (68/77) des chiens malades. L'étude moléculaire a révélé une prévalence de : 6,6% (15/227), 13,2% (30/227), 41% (93/227) pour *Trypanosoma* spp, *B. vogeli* et *H. canis*, respectivement. *T. evansi* (3,1%) et une nouvelle potentielle sous-espèce de *T. congolense* ont été identifiés. Une corrélation positive a été observée entre l'état clinique du chien, les titres d'anticorps anti- *L. infantum* et la présence des co-infections. La sensibilité à LCan variait selon l'aptitude du chien et les chiens de garde étaient plus infectés (51%) (Valeur P = 0,001). L'infection par *B. vogeli* était plus fréquente chez les jeunes que chez les adultes (32% versus 9%, Valeur P < 0,001) et chez les femelles que chez les mâles (21% versus 10%, Valeur P = 0,02). A notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur les hémoprotozoaires à transmission vectorielle chez les chiens en Algérie. Les résultats actuels sont importants non seulement pour la santé animale, mais aussi pour éviter de graves problèmes de santé publique et d'élevage. Des plans rigoureux de surveillance et de contrôle de ces maladies canines doivent se mettre en place dans cette région pour les contenir, ou du moins réduire leur propagation.

En outre, les thérapeutiques actuelles de la LCan présentent pas mal d'inconvénients. Elles sont toxiques, coûteuses ou inefficaces, il est donc nécessaire de trouver des médicaments plus efficaces, plus sûrs et moins chers. **Deuxièmement**, nous avons évalué et comparé l'efficacité de l'artésunate ou d'antimoniote de méglumine/allopurinol chez des chiens atteints de leishmaniose clinique. Quarante-deux chiens atteints naturellement de leishmaniose clinique ont été inclus dans cet essai clinique du terrain, ouvert, simple, randomisé, avec contrôle positif, et de 6 mois de suivi. Les chiens ont reçu de l'antimoniote de méglumine 100 mg/kg/jour et de l'allopurinol 30 mg/kg/jour pendant 28 jours (groupe témoin, n = 26) ou de l'artésunate 25 mg/kg/jour pendant 6 jours (groupe test, n = 16). Les chiens ont été évalués pour leur évolution clinique, la charge parasitaire (par qPCR) et la réponse humorale (dosage des IgG) à différents points de temps : 0, 30, 90 et 180 jours après le traitement. Les analyses des données ont montré une amélioration significative dans les deux groupes des scores cliniques, de la parasitémie et des titres d'anticorps après le traitement. Par rapport au groupe témoin, le groupe artésunate a présenté un score clinique (Valeur P = 0,0001), une parasitémie (Valeur P = 0,0001) et des titres d'anticorps significativement plus faibles après 6 mois de suivi. Par rapport aux valeurs de base, une réduction rapide et significative (Valeur P < 0,012) des niveaux d'anticorps, 2,28 fois versus 3,04 fois pour le groupe témoin versus le groupe artésunate, respectivement, a été observée 30 jours après le traitement. Les taux d'anticorps ont continué à diminuer dans le groupe artésunate, où 58% des cas sont devenus séronégatifs après les 6 mois du suivi. Tous les chiens positifs à la qPCR sont devenus négatifs après le traitement à l'artésunate, tandis que 14,3% sont restés positifs avec l'apparition de deux nouveaux cas dans le groupe témoin. L'artésunate a été bien toléré, et aucun effet secondaire n'a été enregistré. Les échecs thérapeutiques étaient similaires dans les deux groupes avec 27,27% (6/22), dont 18,18% (4/22) de mortalité dans le groupe témoin, contre 26,66% (4/15), dont 13,33% (2/15) de mortalité, dans le groupe artésunate. Il s'agit de la première étude montrant le potentiel de l'artésunate dans le traitement des chiens atteints de la LCan. L'artésunate a montré une plus grande efficacité que le traitement actuel de première intention de la LCan sans aucun effet indésirable. Il pourrait être une bonne alternative chimiothérapeutique pour la LCan, et pourrait être envisagé pour des études supplémentaires dans les leishmanioses humaines. D'autres essais cliniques sont nécessaires pour confirmer ces résultats, pour déterminer s'il y a des rechutes après le traitement, si les chiens restent infectieux pour les phlébotomes, pour définir la durée et la dose thérapeutiques idéales du traitement par l'artésunate. Nous recommandons l'utilisation de l'artésunate dans le traitement de la LCan, jusqu'à l'évaluation du risque de la résistance de *Plasmodium* spp. à l'artésunate liée à cette utilisation, dans les régions indemnes du paludisme comme l'Algérie voir tout le bassin méditerranéen.

ABSTRACT

Leishmaniasis is among the world's most neglected diseases. Dogs are the main reservoirs/ hosts of *Leishmania infantum*, causative agent of both canine and human visceral leishmaniasis. Canine leishmaniasis (CanL) represents a public health problem as one of the most prevalent zoonotic diseases worldwide. In addition, dogs are competent reservoirs/hosts of several protozoan pathogens transmitted by blood-feeding arthropods. Throughout their long history of domestication, they have served as a link for the exchange of parasites among livestock, wildlife, and humans and therefore remain an important source of emerging and re-emerging diseases. In Algeria, while CanL is well known to be endemic, no data are available on other vectorborne protozoans. **First**, we investigated the occurrence and diversity of trypanosomes, piroplasms and *Hepatozoon* spp. and update the epidemiological status of CanL in dogs from Kabylia, northern Algeria. A total of 227 dogs from three regions of Kabylia were enrolled, including 77 dogs with clinical signs. Dogs were clinically examined and were tested for *L. infantum* antibodies using a Rapid Immuno-Migration (RIM™) and a quantitative indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). PCR screening and sequencing were performed for vectorborne protozoa. Sixty two percent (141/227) of dogs presented at least one infection, whereas 26% (59/227) were co-infected. *L. infantum* antibodies were detected in 35.7% (81/227) of dogs including 88.7% (68/77) of sick dogs. Molecular investigation revealed prevalence of: 6.6% (15/227), 13.2% (30/227), 41% (93/227) for *Trypanosoma* spp., *B. vogeli* and *H. canis*, respectively. *T. evansi* (3.1%) and potential new subspecies of *T. congolense* had been identified. Dog's clinical status correlates positively with *L. infantum* antibody titers and the presence of co-infections. Susceptibility to CanL varied according to the dog's aptitude and guard dogs were more infected (51%) (P-value = 0.001). *B. vogeli* infection was more frequent in juveniles than adults (32% versus 9%, P-value <0.001) and in females than males (21% versus 10%, P-value = 0.02). To our knowledge, this is the first report on vector-borne protozoa infected dogs in Algeria. Current results are important not only for animal health, but also to avoid serious public health and livestock problems. Rigorous surveillance and control plans for these canine diseases are required in this area to contain them, or at least reduce their spread.

In addition, current CanL therapeutics present various drawbacks. They are toxic, expensive or ineffective, thus, there is a need for more effective, safer, and cheaper drugs. **Second**, we evaluated and compared the efficacy of oral administration of artesunate or meglumine antimoniate/ allopurinol in dogs with clinical leishmaniasis. Forty-two dogs with naturally occurring clinical leishmaniasis were included in this open-label, simple randomized positive control clinical field trial with 6 months of follow-up. Dogs received meglumine antimoniate 100 mg/kg/day and allopurinol 30 mg/kg/day for 28 days (control group, n = 26) or artesunate 25 mg/kg/day for 6 days (test group, n = 16). The dogs were evaluated for their clinical evolution, parasite load (by qPCR) and humoral response at different time points: 0, 30, 90, and 180 days after treatment. Data analyses showed a significant improvement in both groups in clinical scores, parasitemia and antibody titers after treatment. Compared to the control group, the artesunate group showed significantly lower clinical score (P-value = 0.0001), lower parasitemia (P-value = 0.0001) and antibody titers after 6 months of follow-up. Compared to baseline values, a rapid, significant reduction (P-value < 0.012) in antibody levels, 2.28- versus 3.04-fold for the control versus artesunate groups, respectively, was observed 30 days after treatment. Antibody levels continued to decrease further in the artesunate group, where 58% of cases became seronegative at the 6-month follow-up. All qPCR-positive dogs were negative after treatment with artesunate, while 14.3% remained positive with the appearance of two new cases in the control group. Artesunate was well tolerated, and no side effects were recorded. Treatment failures were similar in both groups with 27.27% (6/22), including 18.18% (4/22) mortality in the control group, versus 26.66% (4/15), including 13.33% (2/15) mortality in the artesunate group. This is the first report showing the potential of artesunate in the treatment of dogs with clinical leishmaniasis. Artesunate showed higher efficacy than the current first-line treatment for CanL without any adverse effects. It could be a good alternative chemotherapy for CanL, and may be considered for further studies in human leishmaniasis. Further clinical trials are needed to confirm these findings, to determine if there are relapses after treatment and if dogs remain infective to sandflies, to define the ideal therapeutic dosage and duration of treatment with artesunate. We recommend the use of artesunate in the treatment of CanL, until the risk of *Plasmodium* spp. resistance to artesunate related to this use is assessed, in malaria-free regions such as Algeria or even the entire Mediterranean basin.