Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France

3. - Réceptivité comparée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921
et *Rhipicephalus turanicus* Pomerancev et Matikasvili, 1940
vis-à-vis de *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903)

par J.-A. RIOUX, G. LANOTTE, H. CROSET, R. HOUIN,
Y. GUY et J.-P. DEDET

(Collaboration technique de A. BRÈS et A. MARTINI-DUMAS)

Ecologie médicale et pathologie parasitaire (F^r J.-A. RIOUX)
Faculté de Médecine, F. 34 - Montpellier
Station expérimentale de la Borie-Nouvelle, F. 34

Résumé

En complément de leurs recherches écologiques sur les foyers leishmaniens du bassin méditerranéen, les auteurs étudient la réceptivité comparée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Rhipicephalus turanicus* Pomerancev et Matikasvili, 1940. 223 Phlébotomes femelles et 489 Rhipicéphales aux stades larvaire, nymphal et imaginal, sont mis à gorger sur un même chien spontanément atteint de Kala-azar, puis mis à incuber aux températures de 20°, 25° et 30° C. La recherche des parasites est effectuée après dissection ou écrasement, sur le frais (eau salée à 7‰) et sur frottis colorés (technique de Parrot et Lestoquard). Dans les conditions de l'expérimentation, *Phlebotomus ariasi* s'infeste dans la proportion de 75 % alors qu'aucune multiplication ni conservation du parasite n'est constatée chez *Rhipicephalus turanicus*. L'hypothèse de l'intervention des Tiques dans le cycle de la leishmaniose viscérale est, une fois encore, infirmée.

Summary

Following their ecological research on the leishmaniasis foci in the Mediterranean basin, the authors compared the receptivity of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Rhipicephalus turanicus* Pomerancev et Matikasvili, 1940. 223 *Phlebotomus* ♀ and 489 *Rhipicephalus* in the larval, nymphal and imaginal stages were fed on a dog naturally infected with Kala-azar, and incubated at temperatures of 20°, 25° and 30° C. Preparations were examined after dissection or crushing in the fresh (7 % saline) and after staining (method of Parrot and Lestoquard). In the conditions of the experiment, 75 % of *Phlebotomus ariasi* became infected whereas no multiplication or survival of parasite was seen in the *Rhipicephalus turanicus*. The hypothesis of the role of the tick in the cycle of visceral leishmaniasis is, once again, invalidated.

Malgré l'importance et la qualité des travaux consacrés à l'épidémiologie des leishmanioses, une incertitude semble encore persister quant aux modalités de la transmission.

Certes, la plupart des auteurs n'accordent qu'une importance mineure à la contamination directe cutanéomuqueuse et, par-là même, considèrent comme nécessaire l'intervention d'un Arthropode vecteur. Certes, la plupart sont également convaincus du rôle primordial des Phlébotomes. Quelques-uns cependant continuent de défendre la « théorie de la Tique » et accusent en particulier les Rhipicéphales d'intervenir de manière non négligeable dans le fonctionnement de certains foyers.

La présente note se propose d'exposer les résultats d'une expérimentation infirmant une nouvelle fois le rôle des Tiques et confirmant celui des Phlébotomes, en particulier de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, Vecteur hautement probable du Kala-azar en Cévennes méridionales.

Rappel historique

A. — RÔLE DES PHLÉBOTOMES.

Depuis les travaux princeps de E. Sergent et coll. (1915), les arguments confirmant l'intervention des Phlébotomes dans le cycle des leishmanioses n'ont cessé de s'accumuler. Pour ce qui concerne la seule leishmaniose viscérale, un grand nombre de preuves ont été apportées par les auteurs les plus divers. Ainsi, en Inde, R. Knowles, L. Napier et R. Smith obtiennent, dès 1924, l'infestation de *Phlebotomus argentipes* Annandale et Brunetti, 1908. En Chine, C. W. Young et M. Hertig démontrent deux ans plus tard le rôle de *Phlebotomus chinensis* Newstead, 1916 et de *Phlebotomus morio* Sinton, 1928. En 1930, S. Adler et O. Theodor infestent à leur tour *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911. En Algérie, L. Parrot, A. Donatien et E. Plantu-

reux (1941) constatent l'infestation spontanée de *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930. L. M. Deane (1956) fait la même observation au Brésil sur *Phlebotomus longipalpis* Lutz et Neiva, 1912, ainsi que D. M. Minter et coll. (1962) au Kenya sur *Phlebotomus martini* Parrot, 1936, et H. Hoogstraal et coll. (1969), au Soudan sur *Phlebotomus langeroni orientalis* Parrot, 1936. Récemment, l'infestation naturelle est observée en Ethiopie par R. W. Ashford sur *Phlebotomus longipes* Parrot et Martin, 1939 (communication personnelle).

B. — RÔLE DES TIQUES.

En 1930 et 1931, deux articles de G. Blanc et J. Caminopetros attirent l'attention sur le rôle vecteur de la Tique du Chien, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Dans un premier temps, les auteurs font gorgier les Tiques d'élevage sur des Spermothiles de Macédoine (*Citellus citellus* L.) expérimentalement infestés. Après un délai variable, et dans certains cas suffisant pour permettre la mue, les Acariens sont broyés puis inoculés ; l'infestation des Rongeurs réceptifs est régulièrement observée. En 1964, I. A. Sherlock apporte un argument en faveur de la thèse précédente, en mettant en évidence des « formes *Leptomonas* » chez des *Rhipicephalus sanguineus* prélevées sur des chiens spontanément atteints de Leishmaniose.

Toutefois, en opposition avec ces résultats, plusieurs auteurs échouent dans leur expérience de passage sur les Tiques. Utilisant *Ornithodoros savignyi* (Audouin, 1827), C. Donovan (1913) ne parvient pas à transmettre le parasite. A leur tour, C. Nicolle et C. Anderson (1926) font état de la négativité de leurs essais sur *Rhipicephalus sanguineus* s. l. En 1931 L. Parrot, A. Donatien et F. Lestoquard n'observent « ni flagellés, ni *Leishmania* » à l'examen direct ou après coloration du contenu du tube digestif de 15 *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) ♀ fixés sur un chien leishmanien. L'année suivante, S. Adler et O. Theodor gorgent sans succès douze nymphes de cette même « espèce » sur un chien leishmanien (dissection aux 6^e et 14^e jour) ; à l'inverse, 26 *Phlebotomus perniciosus* gorgés sur le même animal, s'infestent dans la proportion de 65 %. En 1938, B. Malamos échoue également dans ses essais d'infestation de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. Dans ces expériences, les Tiques sont inoculées au Hamster sous forme de broyat, soit au 14^e jour du repas infestant (larves), soit après la mue (nymphe et imago). En 1938, C. Joyeux et J. Sautet rapportent une dernière expérience : sur 200 larves de *Rhipicephalus sanguineus* s. l. correctement gorgées sur chien leishmanien, aucun parasite n'est mis en évidence après dissection.

Protocole expérimental

Plutôt que de reprendre l'expérimentation de G. Blanc et J. Caminopetros, qui eût nécessité un élevage contrôlé de Spermothiles, il nous a paru aussi démonstratif de comparer, à l'instar de S. Adler et O. Theodor, les possibilités d'infestation des Phlébotomes et des Tiques nourris conjointement sur un même chien leishmanien (fig. 1).

Le **Chien leishmanien** (Olga), utilisé au cours de ce travail, est originaire de Lugné, petite localité du nord-ouest de l'Hérault. Son infection, de type chronique, a débuté trois mois auparavant. Depuis lors, aucune thérapeutique spécifique n'a été mise en œuvre. Au moment de l'expérimentation, l'état général est satisfaisant, mais les déterminations cutanées sont assez marquées : pityriasis diffus, dépilation et ulcères. L'adénoculture est positive ; la réaction d'immunofluorescence est positive au 1/2560.

Les **Phlébotomes** proviennent de la station expérimentale de La Borie-Nouvelle (Hérault), village abandonné situé à 15 km de Lugné. Il s'agit de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 dont le rôle vecteur a déjà fait l'objet de plusieurs séries de travaux (J.-A. Rioux et coll., 1969). Son infestation est réalisée sous moustiquaire le soir-même de la capture. Le lendemain, les femelles gorgées sont récupérées et placées en pots, par lots de 5 à 10, puis conditionnées en insectarium aux températures de 20°, 25° et 30° C. Après un temps d'incubation déterminé, elles sont prélevées, anesthésiées au CO₂ et disséquées dans une goutte d'eau salée à 7 ‰. L'intestin est extrait d'une seule tenue par traction sur les derniers segments abdominaux. L'observation est réalisée directement, par transparence, entre lame et lamelle, à l'objectif 20 et 40 (Leitz). Dans les cas de faible infestation, le tube digestif est dilacéré à l'aide de fines aiguilles de manière à libérer totalement les flagellés. Cet examen est parfois complété par une coloration sur frottis (technique de Parrot et Lestoquard, fig. 2).

Les **Tiques** proviennent des environs immédiats de Tunis. Il s'agit de *Rhipicephalus turanicus* Pomerancev et Matikasvili, 1940 (1), espèce retenue pour des motifs d'ordre biogéographique et éthologique : d'une part, sa distribution est très semblable à celle du Kala-azar méditerranéen, alors que *Rhipicephalus sanguineus*, en situation exclusivement domestique, débordé largement sur les secteurs atlantiques et médio-européens (P.-C. Morel et G. Vassiliades, 1962) où la leishmaniose est rare, sinon absente. D'autre part, la grande plasticité trophique de *Rhipicephalus turanicus* l'amène à exploiter successivement les Rongeurs et les Canidés, lui permettant ainsi de jouer le rôle éventuel de « Vecteur de liaison ». A l'opposé, la stricte cynophilie de *Rhipicephalus sanguineus* le condamne à n'intervenir que dans la seule transmission de chien à chien.

Notre élevage provient de femelles gravides mises à pondre en tube de Borrel. Lors de l'expérimentation, les larves, les nymphes et les adultes, aptes à se fixer, sont déposés sur le chien leishmanien et maintenus jusqu'à complète réplétion sanguine (2° au 5° jour). Ils sont alors récoltés, soit directement sur l'animal à la pince souple,

(1) A M. P.-C. Morel qui a bien voulu identifier cette espèce et nous a aimablement prodigué ses conseils, nous adressons nos plus vifs remerciements.

FIG. 1. — Infestation comparée de *Rhipicephalus turanicus* (1) et *Phlebotomus ariasi* (1') vis-à-vis d'une souche canine de *Leishmania donovani* (chien Olga 2 et 2'). Les vecteurs gorgés sont conditionnés en tubes humides (3 et 3') et maintenus à 20-30° C. Après incubation de 3 à 20 jours, ils sont examinés sur le frais (6) et sur frottis colorés (5) ou inoculés au Rat épineux *Arvicanthis niloticus* (4).

soit sur un plan d'eau placé sous la cage. Mis en tube par lot de 20 à 30, ils sont transférés en insectarium et conditionnés à 25° et 30° C.

La recherche des parasites s'effectue selon un protocole voisin du précédent. Toutefois, la dissection du tube digestif est remplacée par le simple écrasement dans l'eau salée à 7 ‰ et l'examen des frottis colorés est réalisé de manière systématique. Certains lots font également l'objet d'une inoculation au Rongeur *Arvicanthis niloticus* (Desmarest, 1822) (1).

FIG. 2. — Bouquet de formes promastigotes s'échappant de l'intestin moyen à travers le sphincter œsophagien (note : *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 ; dissection au 9^e jour de l'infestation ; 1^o d'incubation : 25 °C

Résultats

1^o INFESTATION DE *Phlebotomus ariasi* TONNOIR, 1921.

223 imagos femelles, gorgés sur le chien leishmanien et conditionnés à 20°, 25° et 30° C ont été examinés après un temps d'incubation de 7 à 10 jours. Dans les cas positifs, les formes promastigotes ont été observées dans l'intestin moyen, plus rarement dans l'intestin postérieur, jamais dans le jabot.

(1) Souche Lomo, originaire d'Ethiopie.

- Lot n° *PI*: 36 ♀. Incubation: 7 jours à 20° C. Nombre d'individus infestés: 26 (72 %).
- Lot n° *PII*: 61 ♀. Incubation: 9 jours à 20° C. Nombre d'individus infestés: 44 (72 %).
- Lot n° *PIII*: 45 ♀. Incubation: 7 jours à 25° C. Nombre d'individus infestés: 36 (80 %).
- Lot n° *PIV*: 53 ♀. Incubation: 10 jours à 25° C. Nombre d'individus infestés: 40 (75 %).
- Lot n° *PV*: 28 ♀. Incubation: 7 jours à 30° C. Nombre d'individus infestés: 20 (71 %).

En regroupant les résultats des cinq lots précédents, on obtient un taux moyen d'infestation de 75 %, chiffre très élevé d'autant que dans la majorité des exemplaires positifs, la densité des formes promastigotes est telle, qu'elle ne permet plus leur libre évolution dans la lumière intestinale et entraîne la formation d'un véritable « bouchon parasite » au niveau du sphincter œsophagien (fig. 3).

FIG. 3. — Formes promastigotes intestinales obtenues au 10^e jour de l'infestation (note: *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921; t° d'incubation: 25 °C; coloration; méthode de Parrot et Lestouard)

2° INFESTATION DE *Rhipicephalus turanicus* POMERANCEV ET MATISKAVILI, 1940.

A. — *Stade larvaire* :

Trois lots de larves, totalisant 252 individus, ont été examinés 3 et 9 jours après leur repas sur le même chien leishmanien.

Lot n° R I : 100 larves gorgées. Incubation après le repas sanguin : 3 jours à 25° C.
Examen sur frottis colorés : résultat négatif.

Lot n° R II : 100 larves gorgées. Incubation après le repas sanguin : 9 jours à 25° C.
Examen dans l'eau salée à 7‰ : résultat négatif.

Lot n° R III : 52 larves gorgées. Incubation après le repas sanguin : 9 jours à 30°.
Examen dans l'eau salée à 7‰ : résultat négatif.

B. — *Stade nymphal* :

Cinq lots de nymphes, totalisant 200 individus, déjà nourris au stade larvaire sur le chien leishmanien, ont été examinés soit à jeun, soit après un repas de sang sur le même animal.

Lot n° R IV : 25 nymphes gorgées, 3 jours après la mue. Incubation à 25° C.
Examen sur frottis colorés : résultat négatif.

Lot n° R V : 25 nymphes non gorgées, 3 jours après la mue. Incubation à 30° C.
Examen sur frottis colorés : résultat négatif.

Lot n° R VI : 50 nymphes gorgées. Incubation après le repas sanguin : 4 jours à 25° C.
Examen sur frottis colorés : résultat négatif.

Lot n° R VII : 75 nymphes gorgées. Incubation après le repas sanguin : 13 jours à 25° C.
Examen dans l'eau salée à 7‰ : résultat négatif.

Lot n° R VIII : 25 nymphes gorgées. Incubation après le repas sanguin : 10 jours à 25° C.
Inoculation du broyat à cinq *Arvicanthus niloticus* : résultat négatif.

C. — *Stade imaginal* :

Les adultes, déjà nourris sur le chien leishmanien aux stades larvaire et nymphal, sont à nouveau gorgés dans les mêmes conditions.

Lot n° R IX : 37 adultes gorgés. Incubation après le repas sanguin : 20 jours à 25°.
Examen sur frottis colorés : résultat négatif.

En définitive, quel que soit le stade, aucune forme amastigote ou promastigote n'a pu être décelée chez les Tiques tant à l'examen direct qu'après inoculation. Les conditions de la transmission ont toutefois été correctes puisqu'à plusieurs reprises, les larves de la filaire *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911, ainsi que des sporozoïtes de l'Hématozoaire *Hepatozoon canis* James, 1905, ont été observés dans les frottis de larve, de nymphe ou d'imagos.

Conclusion

L'étude de la réceptivité expérimentale comparée de *Phlebotomus ariasi* et *Rhipicephalus turanicus* vis-à-vis d'une même souche de *Leishmania donovani* montre donc que seuls les premiers s'infestent massivement et, partant, sont susceptibles de jouer le rôle de Vecteur.

A supposer d'ailleurs que l'infestation des Rhipicéphales ait été effective sous la forme de quelques rares promastigotes échappés à nos investigations, la transmission proprement dite eût nécessité obligatoirement la conservation du parasite au cours des diverses phases de la métamorphose, puisqu'un seul hôte est exploité à chaque stade. Or, le passage à travers les mues successives pourrait être assuré soit par la forme promastigote, l'intestin moyen n'étant pas affecté par les processus d'histolyse (Y. S. Balasof, 1963), soit par la forme amastigote, de localisation intracellulaire. En fait, les résultats de nos expériences infirment l'une et l'autre de ces hypothèses.

Une telle conclusion confirme la plupart des données écologiques réunies à la suite d'une récente enquête sur le foyer leishmanien des Cévennes méridionales. A cette occasion, un ensemble d'observations portant sur la localisation géographique, la densité relative et le comportement trophique de la faune phlébotomienne locale avait en effet attiré l'attention sur l'importance épidémiologique de *Phlebotomus ariasi* (J.-A. Rioux et coll. 1967). Les possibilités d'infestation de cette espèce sont à présent démontrées. A l'opposé, *Rhipicephalus turanicus* apparaît comme totalement réfractaire au parasite.

En bref, le Phlébotome demeure, comme ailleurs, le « Vecteur habituel » des leishmanioses viscérales en France.

Bibliographie

- ADLER (S.) et THEODOR (O.), 1930. — Infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead with *Leishmania infantum*. *Nature*, 126, 437.
- , —, 1932. — Investigations on Mediterranean Kala-Azar. VI. Canine visceral Leishmaniasis. *Proc. R. Soc.*, 110, 402-412.
- , —, 1935. — Investigations on Mediterranean Kala-azar. IX. Feeding experiment with *Phlebotomus perniciosus* and other species of Animals infected with *Leishmania infantum*. *Proc. R. Soc.*, 116, 516-542.
- BALASOF (Y. S.), 1963. — Anatomo-histological peculiarities of moulting of *Hyalomma asiaticum* Lichs. *Zoll. Z.*, 42, 345-358.
- BLANC (G.) et CAMINOPETROS (J.), 1930. — La transmission du Kala-azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 191, 1162-1164.
- , —, 1931. — Quelques expériences sur la transmission du Kala-azar par la Tique du Chien *Rhipicephalus sanguineus*. *C.R. Séanc. Soc. Biol.*, 107, 1493-1495.

- DEANE (L. M.), 1956. — Leishmaniose visceral no Brasil. — Estudos sobre reservatorios e transmissores realizados no estado do Ceara. *Serv. Nac. Educ. Sanit. éd., Rio de Janeiro*, 162 p.
- DONAVAN (C.), 1913. — Kala-azar, its distribution and the probable modes of infection. *Indian J. Med. Res.*, 1, 177-184.
- FELDMAN-MUSHSAM (B.), 1956. — Host specificity of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) and *R. secundus* Feldman-Mushsam in Israel, *Bull. ent. Res.*, 1956, 47, 187-194.
- HOOGSTRAAL (H.) et HEYNEMAN (D.), 1969. — Leishmaniasis in the Sudan Republic 30. Final epidemiologic report. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, 18, 1091-1210.
- JOYEUX (C.) et SAUTET (J.), 1938. — Observations sur la leishmaniose canine méditerranéenne. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 31, 487-490.
- KNOWLES (R.), NAPIER (L.-E.) et SMITH (R. O.), 1924. — On a *Herpetomonas* found in the gut of the sandfly *Phlebotomus argentipes*, fed on Kala-azar patients. *Indian Med. Gaz.*, 59, 593-597.
- MALAMOS (B.), 1938. — Versuche mit Leishmanien IV. Versuche der Kala-azar übertragung durch zecken (*Rhipicephalus sanguineus*). *Arch. Schiffs Tropenhyg.*, 42, 22-23.
- MINTER (D. M.), WIJERS (D. J.), HEISCH (R. B.) et MANSON-BAHR (P. E), 1962. — *Phlebotomus martini*, a probable vector of Kala-azar in Kenya. *Br. med. J.*, 2, 835.
- MOREL (P.-C.) et VASSILIADES (G.), 1962. — Les *Rhipicephalus* du groupe *sanguineus* : espèces africaines (Acariens : *Ixodoidea*). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays tropicaux*, 15, 343-386.
- NICOLLE (C.) et ANDERSON (C.), 1926. — Recherches expérimentales sur le mode de transmission du Kala-azar. Quatrième série d'expériences. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 15, 114-117.
- PARROT (L.), DONATIEN (A.) et PLANTUREUX (E.), 1941. — Sur l'infection naturelle des Phlébotomes par la leishmaniose générale de l'homme et du chien en Algérie. *Arch. Inst. Pasteur Algér.*, 19, 209-217.
- , LESTOQUARD (F.), 1925. — Sur quelques détails de la structure des *Leishmania*. *Arch. Inst. Pasteur Algér.*, 4, 327-332.
- , DONATIEN (A.) et LESTOQUARD (F.), 1931. — Observations nouvelles sur le développement du parasite de la leishmaniose viscérale du chien chez un Phlébotome (*Phlebotomus perniciosus*). *Arch. Inst. Pasteur Alger*, 9, 438-441.
- POMERANCEV (B. J.), 1950. — Ixodid ticks (*Ixodidae*) Fauna S.S.S.R. Trad. anglaise de A. Elbl. G. Anastos. éd. *Ann. Inst. Biol. Sci.*, Washington, 199 p.
- RAGEAU (J.) et MOUCHET (J.), 1970. — Les Tiques de la Camargue (Acariens : *Ixodoidea*) et leur rôle éventuel dans l'épidémiologie des Arbovirus. *Folia Parasitologica*, 17, 349-353.
- , —, 1967. — Les Arthropodes hématophages de Camargue. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. méd.*, 5, 263-281.
- RIOUX (J.-A.), GOLVAN (Y.-J.), CROSET (H.), HOUIN (R.), JUMINER (B.), BAIN (O.) et TOUR (S.), 1967. — Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. — Les Phlébotomes. Echantillonnage-Ethologie. *Ann. Paras. Hum. Comp.*, 42, 561-603.

- , —, —, TOUR (S.), HOUIN (R.), ABONNENC (E.), PETITDIDIER (M.), VOLLHARDT (Y.), DEDET (J.-P.), ALBARET (J.-L.), LANOTTE (G.) et QUILICI (M.), 1969. — Épidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. *Monographie I.N.S.E.R.M.*, n° 37, 220 p.
- SERGEANT (Ed.), SERGEANT (Et.), LE MAIRE (G.) et SÉVENET (G.), 1915. — Hypothèse sur le Phlébotome « transmetteur » et la Tarente « réservoir de virus » du Bouton d'Orient. *Arch. Inst. Past. Algérie*, 29, 309-323.
- SHERLOCK (I. A.), 1964. — Notas sobre a transmissao da Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Bras. Malar.*, 16, 19-26.
- YOUNG (C. W.) et HERTIG (M.), 1926. — The development of flagellates in chinese sandflies (*Phlebotomus*) fed on Hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 23, 611-615.
-