

## Profil particulier des zymodèmes de *Leishmania infantum* causant la leishmaniose viscérale en Tunisie.

K. Aoun (1), A. Bouratbine (1), Z. Harrat (2), M. Belkaïd (2) & S. Bel Hadj Ali (1)

(1) Laboratoire de parasitologie, Institut Pasteur de Tunis, 13 place Pasteur, BP 74,1002 Tunis, Tunisie. Tél : 00 216 1 801 376. Fax : 00 216 1 791 833.E-mail : Karim.Aoun@fmt.rnu.tn  
(2) Laboratoire de parasitologie, Institut Pasteur d'Alger, Algérie.

Manuscrit n°2349. "Parasitologie". Reçu le 6 août 2001. Accepté le 13 novembre 2001.

**Summary:** Original profile of *Leishmania infantum* zymodemes causing visceral leishmaniasis in Tunisia.

The isoenzymatic typing of 16 stocks of *Leishmania*, isolated from Tunisian visceral leishmaniasis (VL) cases, revealed that all strains belonged to *Leishmania* (*L.*) *infantum* species. Although zymodeme MON-1 was predictably the most frequent (9 cases), it came as a surprise that *L. infantum* MON-24 was responsible of about third of cases. This latter zymodeme, while previously reported in Tunisia, Algeria and Spain, was assumed to be a dermatropic and the few cases of VL that it caused occurred always in HIV infected patients. *L. infantum* MON-80, occasionally reported during both cutaneous and VL of immunocompetent infants was identified in 2 patients. This report confirms that in addition to the more common *L. infantum* MON-1, zymodeme MON-24 has a substantial role in generating VL in immunocompetent infants in Tunisia.

**Résumé :**

Le typage iso-enzymatique de 16 souches de leishmanies isolées chez des enfants tunisiens atteints de leishmaniose viscérale (LV) a révélé qu'en plus du classique *Leishmania* (*L.*) *infantum* MON-1, identifié chez 9 patients, le zymodème *L. infantum* MON-24 a été trouvé dans 5 cas. Bien que ce zymodème ait déjà été incriminé dans la genèse de quelques cas de LV infantile en Algérie, en Tunisie et en Espagne, une proportion aussi élevée, 31,2 %, était inattendue. En effet, *L. infantum* MON-24 a été jusque-là considéré comme plutôt dermatrope et les quelques cas de LV qui lui sont rapportés sont survenus le plus souvent chez des individus immunodéprimés infectés par le VIH. Par ailleurs, *L. infantum* MON-80, déjà signalé au cours de formes aussi bien cutanées que viscérales, a été identifié chez 2 patients.

*Leishmania infantum*  
visceral leishmaniasis  
zymodeme  
hospital  
Tunisia  
North Africa

*Leishmania infantum*  
leishmaniose viscérale  
zymodème  
hôpital  
Tunisie  
Afrique du Nord

### Introduction

L'hétérogénéité intraspécifique de *Leishmania* (*L.*) *infantum*, révélée par le typage isoenzymatique (13), a permis de distinguer plusieurs zymodèmes associés à des formes cliniques différentes, viscérales ou cutanées, de leishmaniose.

Les multiples typages réalisés sur des isolats provenant de la majorité des pays méditerranéens ont identifié le zymodème *L. infantum* MON-1 comme responsable de la presque totalité des cas de leishmaniose viscérale (LV) dans la région, alors que *L. infantum* MON-24 était essentiellement isolé à partir de lésions cutanées et quelquefois viscérales du sujet immunodéprimé (9, 11, 12, 13).

En Tunisie, bien que *L. infantum* MON-1 soit aussi largement prédominant au cours des LV (5), *L. infantum* MON-24, agent de leishmaniose cutanée sporadique dans le nord du pays (1), a été incriminé à deux reprises au cours de LV de sujets immunocompétents (3, 7).

Dans ce travail, nous rapportons les résultats du typage isoenzymatique de 16 souches de leishmanies isolées chez des enfants immunocompétents atteints de LV.

### Matériel et méthodes

#### Population étudiée

Seize souches de leishmanies ont été isolées chez des enfants hospitalisés entre 1993 et 2000 dans des services de pédiatrie des hôpitaux de Tunis, le Kef et Kairouan, qui centralisent la presque totalité des cas de LV en Tunisie. Il est à noter que 6 de ces souches ont été isolées en 1994 durant l'épidémie de LV qui a touché le gouvernorat de Kairouan (6).

Tous les enfants avaient moins de 11 ans et présentaient un tableau clinique fortement évocateur de LV avec fièvre, anémie et splénomégalie. Aucun n'avait de facteurs de risques pour le VIH; en particulier pas de transfusion sanguine antérieure, pas de multiplication des partenaires sexuels ni utilisation de drogues par voie intra-veineuse chez les deux parents.

#### Culture des leishmanies

Seize prélèvements de moelle osseuse ont été effectués dans le cadre du diagnostic de routine de la LV. Quinze isolats ont été obtenus sur milieu NNN et un seul a nécessité des repiquages sur milieu de sérum de lapin coagulé.

## Typage iso-enzymatique

Le typage iso-enzymatique a été effectué à l'Institut Pasteur d'Alger selon la méthode préconisée par RIOUX et coll (14). Quinze systèmes enzymatiques ont été étudiés; malate deshydrogénase (MDH, EC1.1.1.37), enzyme malique (ME, EC1.1.1.40), isocitrate deshydrogénase (IDH, EC1.1.1.42), 6-phosphogluconate deshydrogénase (6 PGD, EC1.1.1.44), glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PD, EC1.1.1.49), glutamate deshydrogénase (GLUD, EC1.4.1.3), NADH diaphorase (DIA, EC1.6.2.2), purine nucléoside phosphorilase (NP1, EC2.4.2.1. et NP2, EC2.4.2.), glutamate exalocétate transaminase (GOT1 et GOT2, EC2.6.1.1), phosphoglucomutase (PGM, EC5.4.2.2), fumarate hydratase (FH, EC4.2.1.2), mannose phosphate isomérase (MPI, EC5.3.1.8), glucose phosphate isomérase (GPI, EC5.3.1.9).

L'identification a été faite par rapport à des souches marqueurs de référence du complexe *L. infantum* dont MHOM/Fr/78/LEM75 (zymodème MON-1), MHOM/DZ/82/LIPA59 (zymodème MON-24) et MHOM/DZ/83/LEM425 (zymodème MON-80).

## Résultats

La caractérisation iso-enzymatique des 16 souches a montré qu'elles appartiennent toutes à l'espèce *L. infantum*. Neuf, soit 56 %, correspondaient au zymodème MON-1, 5, soit 31 %, au zymodème MON-24 et 2, soit 13 %, au zymodème MON-80 (tableau I).

## Discussion

Comme attendu, nos 16 isolats correspondaient à *L. infantum*, confirmant le rôle exclusif de cette espèce dans la genèse de la LV en Tunisie. Cependant, le zymodème *L. infantum* MON-1, rapporté comme agent presque exclusif de la leishmaniose viscérale méditerranéenne infantile (9, 11, 12, 13), n'a été identifié que chez 56 % des cas de notre série. Une proportion relativement élevée, 31 %, correspondait par contre au zymodème *L. infantum* MON-24. Il est à noter que, contrairement à nos confrères algériens (4, 9), nous n'avons pas rencontré de difficultés pour isoler ce dernier zymodème sur milieu NNN et que la seule souche qui a nécessité des repiquages sur le milieu de sérum de lapin coagulé correspondait à un zymodème MON-1. Il faut également préciser que, même si *L. infantum* MON-24 ne se distingue de *L. infantum* MON-1 que par la migration d'une

seule enzyme, la purine nucléoside phosphorilase (NPI), le risque d'erreur d'identification est peu probable.

Ces résultats inattendus rejoignent ceux des Algériens ayant récemment colligé 5 cas de LV dus à *L. infantum* MON-24 et correspondraient à une probable émergence de ce zymodème dans la région (4). Cependant, la considérable élévation du taux de ce zymodème dans notre série pourrait également être en rapport avec la composition de notre échantillon. En effet, 3 parmi les 5 souches de *L. infantum* MON-24 isolées, l'ont été à Kairouan en 1994. Ce zymodème aurait probablement joué un rôle important durant l'épidémie de LV qui a frappé ce gouvernorat cette année-là (6).

Le profil iso-enzymatique impliquant *L. infantum* MON-24 dans la genèse de cas infantiles de LV serait propre aux pays du Maghreb. En effet, ailleurs au nord de la Méditerranée et en dépit des très nombreuses identifications, ce zymodème n'a été rapporté qu'une seule fois, en Espagne (10), au cours de LV chez des sujets immunocompétents. D'ailleurs, il est considéré par tous les auteurs comme un zymodème plutôt dermatotrope et les quelques cas de LV qui lui sont rattachés sont survenus presque toujours chez des individus immunodéprimés infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (8, 9, 10, 13).

Le 3<sup>e</sup> zymodème de notre série, identifié chez 2 patients, est *L. infantum* MON-80. C'est un zymodème qui a déjà été rapporté de façon sporadique aussi bien au cours de formes cutanées que de formes viscérales de l'immunocompétent en Algérie (9), en Espagne (12), en Tunisie et en France (2, 11).

Ces résultats confirment qu'en plus de *L. infantum* MON-1, les zymodèmes MON-80, et particulièrement MON-24, jouent aussi un rôle non négligeable dans la genèse des cas de LV en Tunisie. Associés aux données algériennes, ils seraient en faveur de l'existence de particularités régionales voire locales de la transmission de *L. infantum*. L'exploration des réservoirs et vecteurs, encore méconnus en Tunisie, des 2 zymodèmes sus-cités permettra sûrement de mieux cerner l'épidémiologie de la maladie dans notre pays.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les Docteurs H. KHARRAT, S. BOUSNINA, S. BEN BECHER, F. KHALDI, S. BARSAOUI et tH. TOUMI, médecins traitants des enfants étudiés. Nous remercions aussi Mademoiselle R. BENIKHLEF pour sa précieuse collaboration technique dans le typage. Cette étude a bénéficié du support du programme spécial PNUD/World bank/OMS-TDR (Project ID n°930418).

Tableau I.

Profil iso-enzymatique des souches identifiées par rapport aux souches de référence.  
Isoenzymatic profiles of identified strains versus reference strains.

zymodème	souche n°	électromorphe														
		MDH	ME	ICD	PGD	G6PD	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT1	GOT2	PGM	FH	MPI	GPI
MON-1 (*)	MHOM/Fr/78/LEM 75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-24 (*)	MHOM/DZ/82/LIPA 59	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-80 (*)	MHOM/DZ/83/LEM 425	104	100	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV8	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-1	LV9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-24	LV10	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-24	LV11	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-24	LV12	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-24	LV13	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-24	LV14	104	100	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100
MON-80	LV15	104	100	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100
MON-80	LV16	104	100	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100

(\*) souches de référence ; LV : souches de l'étude

## Références bibliographiques

1. AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, GUIZANI I, MOKNI M *et al.*- Données épidémiologiques et parasitologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, **93**, 101-103.
2. AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, MEHERZI A, BELKAID M *et al.*- Confirmation de la présence de *Leishmania infantum* MON-80 en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999, **92**, 29-30.
3. BELHADJ S, PRATLONG F, MAHJOUR H, TOUMI NH, AZAIEZ R *et al.*- Leishmaniose viscérale infantile à *Leishmania infantum* MON-24 : une réalité en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, **94**, 14-16.
4. BENIKHLEF R, PRATLONG F, HARRAT Z, SEDIRI N, BEN DALI-BRAHAM S *et al.*- Leishmaniose viscérale infantile causée par *Leishmania infantum* zymodème MON-24 en Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, **93**, 101-110.
5. BEN ISMAIL R, GRAMICCIA M, GRADONI L & BEN RACHID MS - Identificazione biochimica di isolati di *Leishmania* della Tunisia. *Parassitologia*, 1986, **80**, 186-187.
6. BEN SALAH A, BEN ISMAIL R, AMRI F, CHELIF S, BEN RZIG F *et al.*- Investigation of the spread of human visceral leishmaniasis in central Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, **94**, 382-386.
7. GRAMICCIA M, BEN ISMAIL R, GRADONI L, BEN RACHID MS & BEN SAID M - *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in North Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, **85**, 370-371.
8. GRAMICCIA M, GRADONI L & TROIANI M - HIV-*Leishmania* co-infection in Italy. Isoenzyme characterisation of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1992, **86**, 161-163.
9. HARRAT Z, PRATLONG F, BELAZZOUG S, DEREURE J, DENIAU M *et al.*- *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 625-629.
10. JIMENEZ M, FERRER-DUFOL M, CANAVATE C, GUTTIERREZ-SOLAR B, MOLINA R *et al.*- Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, **131**, 197-204.
11. MARTY P, LE FICHOUX Y, PRATLONG F & GARI-TOUSSAINT M - Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**, 33-34.
12. PORTUS M, GALLEGO G, RIOUX JA, PRATLONG F, MORENO G *et al.*- Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in Catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol*, 1989, **49**, 209-218.
13. PRATLONG F, DEDET JP, MARTY P, PORTUS M, DENIAU M *et al.*- *Leishmania*-human immunodeficiency virus co-infection in the mediterranean basin: isoenzymatic characterisation of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infectious Dis*, 1995, **172**, 323-326.
14. RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P *et al.*- Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes, Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum comp*, 1990, **65**, 111-125.