

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :

N° de série :

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de
la Terre Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences
de la Terre

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : BAZINE Omar-elmokhtar HADJ MOHAMED Bakir

Thème

Polymorphisme de *Leishmania* dans la région de Ghardaïa.

Soutenu publiquement, le 09/2020

Devant le jury :

Mr. MAHAMED I. A. E.	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaïa	Président
M^{lle} BELABBASSI O.	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadreur
M^{me} KHERACHI I.	Chargée d'étude	Inst. Pasteur Alg.	Co-Encadrant
Mr. KHENE	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire : 2019 2020.

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la Santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail (**Hamdoulillah**) Au moment de mettre un point final à ce travail, nous tenons à adresser nos Remerciements à :

Notre maitre et encadreur de mémoire **Mlle. Ouarda BELABBASSI**, professeur à la faculté des sciences biologiques à l'université de Ghardaïa, pour avoir accepté de diriger ce travail avec une grande patience, ses encouragements, ses interventions, ses orientations ainsi ses conseils.

Profond respects et reconnaissance assurée de notre part à vous.

A **Mme Khirachi Ihen** Co encadreur et **Mr Harrat Zoubir** pour m'avoir accepté et de nous aider dans la réalisation de ce travail au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Je remercie vivement **Mr MHAMMEDI** d'avoir bien voulu présidé le jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement, **Mr KHAN** pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en participant au jury de cette thèse

Un grand merci s'adresse à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail.

**« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;
Sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries »**

Marcel Proust



**Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré ...**

Je dédie ce Mémoire à ...

A la mémoire de ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Rabi yarahmec

A la mémoire de mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Rabi yarahmec

A ma grand-mère maternelle mama lala

La grande dame qui a tant sacrifié pour nous.

A elle et mes enfant Rostoum et hafsa

A mes chers frères et chères sœurs

En témoignage de votre soutien et encouragements, un merci et un amour fraternel de ma part. N'oubliez-vous pas que l'union fait la force pour lever tous les défauts et les obstacles de la vie. Que DIEU nous protège

A mes oncles maternel Daoud et Brahim

Je vous remercie pour vos encouragements et je vous souhaite bonheur, santé et prospérité à vous et vos enfants.

A toute ma famille maternelle et paternelle.

Je ne saurai les citer tous de façon individuelle, cependant qu'ils soient rassurés du fait que toute ma reconnaissance leur est due.

A Mon chère amie

A Mon chère amie Hadj youb Slimen, je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur, et je te souhaite tout le bonheur du monde. Toute mon affection pour ton Admirable famille, que je remercie beaucoup.

A mes chers collègues A.Hadj youb, Z .hadj brahim

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amis sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A Omer mon binôme et toute sa famille, c'est un plaisir de travailler avec toi.

A tous mes collègues de travail polyclinique EPSP GHARDAIA

A tous les membres de ma promotion biologie Mater 2.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.



Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A ma mère : Halima

Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon père : Mustapha

L'homme qui m'a toujours aidé, l'homme qui m'a toujours guidé, à l'homme qui m'a tout le temps encouragé matériellement et moralement, l'homme dont je suis très fière, qui je dois tout

A mes chers frères et sœurs et particulièrement ma sœur « Aicha »

A Tous mes camarades de promotion, en souvenir des bons moments passés ensemble.

A tous mes enseignants au cours de notre cursus. Profonde Gratitude.

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur,

L'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous.

MORHAR

Résumé

La leishmaniose cutanée est une infection parasitaire due à un parasite flagellé du genre *Leishmania*. Elle est le plus souvent une maladie zoonotique transmise par la piqûre de phlébotomes. Bien que chaque espèce de leishmanie puisse avoir ses manifestations cutanées particulières et ses zones d'endémie, les présentations les plus communes sont les nodules ulcérocroûteux et les plaques. Cette maladie a une large distribution mondiale aux Amériques, en Asie, en Europe et particulièrement en Afrique. Son épidémiologie est influencée par les facteurs environnementaux, migratoires et climatiques. L'objectif de ce travail est de comprendre la dynamique de transmission, la distribution géographique et ainsi d'optimiser les approches épidémiologique et la caractérisation moléculaire des souches de *Leishmania* isolées de quelques patients dans la région de Ghardaïa.

De ce fait nous avons amplifié l'ADN de *Leishmania*, en utilisant des amorces spécifiques de l'espèce, obtenu du raclage des lames à partir de prélèvements cutanés de patients positifs avec une leishmaniose cutanée (LC) suspectée cliniquement au laboratoire EPSP EL-Atteuf Ghardaïa pour déterminer si d'autres espèces de *Leishmania* étaient responsables de LC à Ghardaïa et évaluer sa situation géographique.

Les résultats obtenus de l'étude épidémiologique montrent la LC dans notre région d'étude touche un plus les hommes que les femmes (30 hommes/18 femmes) dont l'âge moyen est de 26 ans. Cliniquement, les lésions siégeaient, le plus souvent, sur les parties découvertes principalement les membres inférieures (73,03%) et les membres supérieurs (30,33%) avec des lésions variant entre 1 et 5 cm de diamètre. Les régions d'El Atteuf, Ghardaïa centre (entourage du ksar) et Bonoura représentent les trois foyers les plus importants de notre étude.

L'examen parasitologique des 89 cas permet de mettre en évidence des formes amastigotes dans 48 échantillons (53.93%) alors que les 41 cas (46.06%) restent en donnant un résultat négatif. Parmi les 20% seulement les lames prélevées positives (10) utilisées pour l'étude de l'identification moléculaire par PCR et RFLP, *Leishmania* a été la seule espèce de *Leishmania* qui a pu être isolée et identifiée dans la région El-Atteuf de Ghardaïa et qui peut provoquer la leishmaniose cutanée (LC).

Mots clés: Algérie, répartition géographique, EL Atteuf, leishmaniose, Ghardaïa, *Leishmania tropica*, PCR, RFLP

Abstract

Cutaneous leishmaniasis is a parasitic infection caused by a flagellate parasite of the genus *Leishmania*. It is most often a zoonotic disease transmitted by the bite of sandflies. Although each species of *Leishmania* may have its own specific skin manifestations and endemic areas, the most common presentations are crusty nodules and plaques. This disease has a worldwide distribution in the Americas, Asia, Europe and particularly Africa. Its epidemiology is influenced by environmental, migratory and climatic factors. The objective of this work is to understand the dynamics of transmission, the geographical distribution and thus to optimize the epidemiological approaches and the molecular characterization of *Leishmania* strains isolated from a few patients in the Ghardaïa region

In this context, we amplified the DNA of *Leishmania*, using primers specific to the species, obtained by scraping slides from cutaneous samples of positive patients with cutaneous leishmaniasis (CL) clinically suspected at the EPSP EL-Atteuf Ghardaïa laboratory to determine whether other *Leishmania* species were responsible for CL in Ghardaïa and assess its geographical location.

The results obtained from the epidemiological study show that CL in our study area affects more men than women (30 men / 18 women) whose average age is 32.1 ± 19.5 years. Clinically, the lesions were most often found on the uncovered parts, mainly the lower limbs (73.03%) and upper limbs (30.33%) with lesions varying between 1 and 5 cm in diameter. The regions of El Atteuf, Ghardaïa center (surrounding the ksar) and Bonoura represent the three most important foci in our study.

Parasitological examination of 89 cases revealed amastigote forms in 48 samples (53.93%) while the remaining 41 cases (46.06%) gave a negative result. Among the only 20% of the positive samples (10) used for the study of molecular identification by PCR and RFLP, *Leishmania tropica* was the only *Leishmania* species that could be isolated and identified in the El-Atteuf region of Ghardaïa which can cause CL.

Keywords: Algeria, geographic distribution, ELAtteuf, leishmaniasis, Ghardaïa, *Leishmania tropica*, PCR, RFLP.

الخلاصة

داء الليشمانيات النفعي هو عدوى طفيلية تسببها طفيليات سوطية من جنس الليشمانيا. غالبًا ما يكون مرضًا حيوانيًا ينتقل عن طريق لدغة ذباب الرمل. على الرغم من أن كل نوع من أنواع الليشمانيا قد يكون له مظاهر جلدية خاصة به ومناطقه الموبوءة، إلا أن أكثر العروض التقديمية شيوعًا هي العقيدات واللويحات القشرية. ينتشر هذا المرض في جميع أنحاء العالم في الأمريكتين وآسيا وأوروبا وخاصة إفريقيا. انها يتأثر علم الأوبئة بالعوامل البيئية والمهاجرة والمناخية.

يهدف هذا العمل إلى فهم ديناميكيات الانتقال والتوزيع الجغرافي وبالتالي تحسين الأساليب الوبائية والتوصيف الجزيئي لسلاسل معزولة من عدد قليل من المرضى في منطقة غرداية

في هذا السياق ، قمنا بتضخيم الحمض النووي لليشمانيا ، باستخدام مواد أولية خاصة بالأنواع ، تم الحصول عليها عن طريق كشط الشرائح من العينات القاطعة لمرضى إيجابيين مصابين بداء الليشمانيات الجلدي (CL) المشتبه بهم سريريًا في مختبر EPSP EL-Atteuf Ghardaïa لتحديد ما إذا كانت أنواع الليشمانيا الأخرى كانوا مسؤولين عن CL في غرداية وتقييم موقعها الجغرافي.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة الوبائية أن CL في منطقة دراستنا تؤثر على الرجال أكثر من النساء (30 رجلاً / 18 امرأة) الذين يبلغ متوسط أعمارهم 19.5 ± 32.1 سنة. سريريًا ، تم العثور على الآفات غالبًا في الأجزاء المكشوفة، خاصة الأطراف السفلية (73.03٪) والأطراف العلوية (30.33٪) مع آفات تتراوح قطرها بين 1 و 5 سم. تمثل مناطق العطوف ومركز غرداية (المحيطة بالقصر) واليونورة أهم ثلاث بؤر في دراستنا.

كشف الفحص الطفيلي لـ 89 حالة عن وجود أشكال الماستيغوت في 48 عينة (53.93٪) بينما كانت النتائج الـ 41 المتبقية (46.06٪) سلبية. من بين 20٪ فقط من العينات الإيجابية (10) المستخدمة لدراسة التعريف الجزيئي بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) و RFLP ، كانت الليشمانيا المدارية هي النوع الوحيد من الليشمانيا التي يمكن عزلها وتحديدتها في منطقة العطوف في غرداية والتي يمكن أن تسبب CL.

الكلمات المفتاحية: الجزائر ، التوزيع الجغرافي ، العطف ، الليشمانيات ، غرداية ، الليشمانيا المدارية ، تفاعل البوليميراز المتسلسل، RFLP

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre.1. Généralités sur la Leishmaniose

1.1. Définition.....	04
1.2. Historique.....	04
1.3. La répartition géographique.....	05
1.3.1. Leishmanioses dans le monde.....	06
1.3.2. Leishmanioses en Algérie.....	07
1.3.3. Les leishmanioses à Ghardaïa.....	07
1.4. Les différentes formes de la leishmanios.....	08
1.4.1. Leishmaniose viscérale (LV).....	08
1.4.2. Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).....	08
1.4.3. Leishmaniose cutanée (LC).....	09
1.4.3.1. La physiopathologie de la leishmaniose cutanée.....	10
1.4.3.2. Formes cliniques de la leishmaniose cutanée.....	11
a) La leishmaniose cutanée localisée (LCL).....	11

b) La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)	12
--	----

Chapitre.2. Epidémiologie de la leishmaniose

2.1. L'agent Pathogène.....	15
2.1.1. Taxonomie.....	15
2.1.2. Morphologie.....	16
2.1.3. Biologie.....	18
2.1.4. Cycle évolutif et mode de transmission	18
2.2. Vecteurs.....	20
2.2.1. Taxonomie.....	20
2.2.2. Morphologie	20
2.2.3. Biologie	20
2.2.4. Habitat	21
2.2.5. Cycle de vie... ..	21
2.3. Réservoirs.....	22
2.4. Facteurs affectant la transmission.....	23
2.4.1. Facteurs socioéconomiques	23
2.4.2. Facteurs environnementaux	24
2.4.3. Mouvements de population.....	24

Chapitre.3. Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

3.1. Diagnostique.....	26
3.1.1. Diagnostique clinique.....	26
3.1.2. Diagnostique biologique.....	26
Examen direct	28
Culture	28
3.1.3. Diagnostique moléculaire	28
Principe de la PCR	28

Diagnostic immunologique.....	29
Immunofluorescence indirect.....	30
Test ELISA.....	30
Agglutination directe.....	31
Test au latex	31
3.2. Traitements.....	32
3.3. Pophylaxie.....	34
3.3.1. Prophylaxie individuelle.....	34
3.3.2. La prophylaxie collective.....	34
3.3.3. Vaccination.....	35

Deuxième partie : Partie experimental

1. Objectif de l'étude	37
1.1. Objectif principal	37
1.2. Objectif secondaire	37
2. Zone d'étude	37
2.1. Présentation de la zone d'étude.....	37
2.1.1. Le climat	48
2.1.2. Le couvert végétal.....	38
2.1.3. Du point de vue urbain	38
3. Méthode d'étude	

Première partie expérimentale

Démarche diagnostic de certitude dans laboratoire EPSP d,,El Atteuf

1. Présentation Etablissements publics de Santé de Proximité (EPSP) GHARDAIA	
1.1 . Le laboratoire EL-Atteuf de l'EPSP Ghardaia.....	40
2. Matériel.....	40
2.1. Matériel non biologique.....	40
2.2. Matériel biologique	40
2.2.1. Frottis.....	41
2.2.2. Culture.....	41
3. Méthode	41
3.1.Recueil des données.....	41
3.2.Prélèvement	41
3.3. Préparation des frottis.....	42
3.4. Visualisation des parasites	44
3.5. Acheminement des lames vers le laboratoire de référence	45

Deuxième partie expérimentale

Démarche diagnostic moléculaire pour l'identification d'espèce du parasite

1. Le diagnostic moléculaire par PCR.....	46
1.1. Présentation du laboratoire	46
1.2. L'identification moléculaire de l'espèce du parasite des frottis.....	46
2. Matériel.....	47
2.1. Matériel biologique	47
2.2. Souches.....	47
2.2.1. Culture.....	47
2.3. Matériel non biologique	47

3. Méthodes.....	47
3.1. Sélection des lames.....	47
3.2. Repiquage des Culture promastigotes in vitro.....	48
4. Caractérisation moléculaire des souches étudiées par PCR et RFLP.....	50
4.1. Extraction.....	50
4.2. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait	52
4.3. Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) ITS1.....	53
4.4. Électrophorèse	53
4.5. La PCR RFLP	54

Résultats et discussion

1. Démarche de certitude	57
1.1. Données épidémiologiques.....	59
1.1.1. Répartition des cas de leishmaniose par classes d'Age et par sexe	57
1.1.2. Répartition des cas de leishmaniose cutanée par région et type d'habitation.....	58
1.2. Examen parasitologique.....	60
2. Diagnostic moléculaire pour l'identification de l'espèce parasite	61
2.1. Control de la qualité de l'ADN parasitaire extrait.....	61
2.2. Résultats des produits PCR.....	62
2.3. Résultats de la digestion enzymatique PCR- RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction).....	63
Discussion	65
Conclusion.....	68
Références bibliographiques	71

Annexes

Résum

Liste des tableaux

Tableau 01 : Répartition géographique des cas suspectés de Leishmaninose cutanée confirmés par examen direct microscopic.....	59
Tableau 02 : Valeurs des DO des ADN extraits des différents frottis de patients.....	62
Tableau 03 : Résultats de l'électrophorèse des produits obtenus de l'amplification de l'ADN extraits des.....	64

Liste des figures

Figure 01: Répartition mondiale de la Leishmaniose... ..	06
Figure 02 : Répartition géographique de La leishmaniose cutanée en Algérie	07
Figure 03: Lésion typique de la leishmaniose cutanée localisée	12
Figure 04: Leishmaniose cutanée diffuse	13
Figure 05: La forme promastigote de <i>leishmania</i>	17
Figure 06: La forme amastigote de <i>Leishmania</i> sous le microscope (GR ×100) de patient numéro 106.....	17
Figure07 : Les premières étapes de l'invasion	18
Figure 08: Cycle parasitaire des Leishmanioses.....	19
Figure 09: Morphologie générale d'un phlébotome adulte	20
Figure 10: Cycle de vie de phlébotome.....	22
Figure 11: Photo montrant deux rongeurs réservoir : a) <i>Psammomys obesus</i> b) <i>Meriones shawi</i>	23
Figure 12: Cycle évolutif des leishmanioses en Algérie (Bachi, 2006)	23
Figure 13: Situation géographique de la wilaya et département de Ghardaïa avec ses communes ..	40
Figure 14: Vue satellitaire des quatre communes de la zone d'étude	41
Figure 15: Processus de prélèvement d'échantillon par grattage de la lésion à l'aide d'une lame ...	44
Figure 16: Lecture des frottis par microscope optique.....	46
Figure 17: Les formes amastigotes de <i>leishmania</i> du patient n° 152 (A : forme intramacrophagique ; B : forme libre).....	47
Figure 18 : La sélection des lames à partir des frottis de leishmaniose positifs.....	50
Figure 19: Les milieux de culture utilisé pour la culture de <i>leishmania</i>	50
Figure 20: Ensemencement	51
Figure 21 : Forme promastigote observée au G ×400	51
Figure 22: Grattages des lames	52
Figure 23: Schéma de l'étape de déprotéinisation lors de l'extraction de l'ADN	53

Figure 24: Cuve d'électrophorèse contenant nos échantillons	56
Figure 25: Répartition des cas de leishmaniose par classes d'âge et par sexe.....	58
Figure 26: Répartition des cas de leishmaniose cutanée par types d'habitation.....	60
Figure 27: Lésions : (A :Ulcéro-croûteuses, B : surinfecté).....	61
Figure 28 : Profils de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR-ITS1	63
Figure 29: Profil des amplifiats de la digestion enzymatique par HaiIII	65
Figure 30: Foyer de l'espèce identifiée dans la commune d'El Atteuf de la zone d'étude Ghardaïa	65

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ARN** : L'acide ribonucléique
- ATU** : Autorisation Temporaire D'utilisation
- BET** : Bromure d'Ethidium
- BSA** : Bovin Sérum Albumine
- DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane
- DEET**: N.N-diethyl-m-toluamide
- DNTP** : désoxyribonucléoside triphosphate
- DO** : Densité Optique
- ELISA** : Enzyme-linkedimmunosorbentassay
- EPSP** : Etablissement Publics de Sante de proximité.
- HAE III** : *Haemophilus aegypticus*3.
- IFI** : Immunofluorescence indirect
- IgE** : Immunoglobuline E
- ITS1**: Internal transcribed spacer
- L** : *Leishmania*
- IPA** : Institut Pasteur d'Algérie
- LC** : Leishmaniose cutanée
- LCD** : Leishmaniose cutanée diffuse
- LCL** : Leishmaniose cutanée localisé
- LCM** : Leishmaniose cutanéomuqueuse
- LCN (LCS)** : Leishmaniose cutanée du nord ou (sporadique)
- LCZ** : Leishmaniose cutanée zoonotique
- LITSR**: ribosomal internal transcribed spacer1
- LPG** : Lipophosphoglycane
- LV** : Leishmaniose viscérale

MGG: May Grünwald Giemsa

NNN: Novy - Mc. Neal & Nicolle

OMS : Organisation mondiale de la santé

PB : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Le potentiel hydrogène

PK : protéine kinase

PM: Poids Moléculaire

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SLP : Sérum de Lapin

TE : Tris-EDTA

UV : ultra-violet

VF : Veau Fœta

Introduction

Introduction

La pathologie infectieuse, qu'elle soit microbienne, virale ou parasitaire, est en pleine évolution. Dont Les maladies parasitaires sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité considérables dans le monde entier (**Bouzeriba et Rouaiguia, 2017**).

Entre autres, Les leishmanioses sont des maladies infectieuses communes à l'homme (anthroponose) et à certains animaux (anthropozoonoses), dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, transmise à l'homme par la piqûre d'un moucheron hématophage, le phlébotome femelle infecté. Cette dernière s'infeste en piquant un homme ou un animal malade, absorbant ainsi des monocytes sanguins ou des histiocytes dermiques parasités. Les réservoirs sont les rongeurs sauvages et le chien (**Mazalet, 2004 ; Denguezli, 2006**).

Ces maladies incluent des formes viscérales (LV), des formes cutanées localisées (LCL), cutanées diffuses (LCD) et des formes cutanéomuqueuses (LCM). Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté (**A.N.O.F.E.L, 2014**).

Malgré les avancées de la recherche, les leishmanioses restent encore un véritable problème de santé publique, d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé 350 millions de personnes de la population mondiale sont exposées à ce risque infectieux dans un total de 98 pays (**Aubry et al ,2020**). Selon les estimations, il y aurait chaque année entre 700 000 et 1 million de nouveaux cas et entre 20 000 et 30 000 décès (**OMS, 2018**).

Environ 20 espèces de *Leishmania* sont connues pour être pathogènes pour l'Homme, et l'espèce est le principal déterminant de l'évolution clinique (cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale) (**Desjeux, 2001 ; Coi et lerner, 2001 In Frahtia-Benotmane, 2015**).

La leishmaniose cutanée est un problème de santé publique majeur dans la Région de la Méditerranée orientale. Des nouveaux cas apparaissent dans des zones précédemment indemnes de la maladie. Plus de 100 000 nouveaux cas de leishmaniose cutanée sont notifiés chaque année à l'OMS par les pays de la Région Méditerranée orientale, mais les estimations relatives à l'incidence réelle sont de trois à cinq fois plus élevées car de nombreux patients ne consultent jamais un médecin ou un professionnel de santé et les cas ayant reçu un diagnostic de leishmaniose cutanée ne sont pas toujours notifiés aux autorités sanitaires (**OMS, 2014**).

Le diagnostic de certitude des leishmanioses repose encore sur la mise en évidence du parasite par examen direct et/ou après culture. Malheureusement l'examen direct du frottis après coloration au Giemsa n'est pas toujours fructueux pour peu que la lésion soit surinfectée ou le prélèvement mal fait. Pour cette raison, il est préférable de détecter en parallèle le produit pathogène par la mise en culture sur des milieux spécifiques. Mais le risque de contamination des cultures est très important aussi. Cependant, il existe une autre alternative concernant l'approche parasitologique directe et qui consiste en l'identification du parasite par l'utilisation de techniques moléculaires telle que la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction).

Dans la région de Ghardaïa, les travaux menés sur les leishmanioses restent fragmentaires et limités. C'est dans ce cadre-là que l'objectif de notre travail s'articule. Il a pour objectif la détermination de la répartition des cas de leishmaniose cutanée dans quatre communes de la wilaya et la caractérisation moléculaire de parasite à partir des lésions cutanées de quelques patients résidants dans la région de Ghardaïa.

Ce travail est subdivisé en deux parties :

Une partie théorique qui est consacrée à une synthèse bibliographique sur la leishmaniose et son vecteur (Phlébotome), ainsi son rongeur, rappelant les aspects épidémiologiques et cliniques, la systématique, le diagnostic, le traitement et la prophylaxie de cette parasitose dans le monde et en particulier en Algérie.

Une partie pratique où nous avons mis la méthodologie de travail, les résultats de cette étude discutés et enfin une conclusion générale clôturant ce présent document.

Chapitre. I. Généralités sur la Leishmaniose

1.1. Définition

Les leishmanioses sont des maladies infectieuses, parasitaires et d'expression clinique variée dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*. Les parasites sont transmis à l'homme et à divers mammifères par la piqûre d'un insecte vecteur : le phlébotome femelle hématophage (**Lachaud, 2007 ; Dedet, 2013**). Le phlébotome s'infeste en piquant un homme ou un animal malade, absorbant ainsi des monocytes sanguins ou des histiocytes dermiques parasités. Ce parasite se trouve dans des réservoirs dont les rongeurs sauvages et le chien (**Mazalet, 2004 ; Denguezli, 2006**).

1.2. Historique

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leur forme cutanée (**Jarry, 1999**). La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1882 et c'est Cunnigham en 1885 qui découvrit les parasites dans un prélèvement de bouton d'orient (**Dedet, 1999 ; Boussaa, 2008**).

En 1900, Sir William LEISHMAN eut découvert l'agent de la leishmaniose dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Les résultats de cette découverte n'ont été publiés qu'en 1903. La même année, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Ce parasite fut nommé *Leishmania donovani*.

En 1904, Rogers décrit dans une culture *in vitro* de sang citraté des formes flagellées, probablement des promastigotes. Alors que, la première culture fut obtenue par Nicolle et Sicre en 1908 (**Matte, 2003**).

En 1909, Nicolle décrit *Leishmania infantum* en Afrique du nord et en 1913, Chagas identifia la maladie, tandis que Migone retrouva le parasite, appelé *Leishmania chagasi*, en Amérique du sud. Toutefois, il s'avère qu'actuellement *Leishmania chagasi* appartient au même type parasitaire que *Leishmania infantum* et *Leishmania donovani*. Puis, Dans une même année, le même auteur démontra l'inoculabilité de *Leishmania infantum* au chien.

En 1910, la première observation sur la leishmaniose canine en Algérie était rapportée par les frères Sergent. Alors qu'en 1911, Lemaire découvrit le premier cas de LV (Leishmaniose viscérale) humaine en Algérie dans le foyer de la kabylie (**Benyahia, 2008**).

En 1921, en Algérie, les frères Sergent et leurs collaborateurs établirent le rôle du vecteur des phlébotomes en réussissant la transmission du bouton d'orient par application des broyats de ses insectes sur les scarifications cutanées (**Matte, 2003**).

Chapitre I : Généralités sur la Leishmaniose

La transmission par le phlébotome a été découverte en Inde en 1924 par les frères Sargent pour *L. donovani* et au Maghreb en 1926 par Parrot et Donatien pour *L. infantum*. Ces deux derniers ont aussi démontré les huit années suivantes le rôle des chiens dans le cycle de *L. infantum*. Alors que le cycle du parasite ainsi que sa répartition géographique furent étudiés de 1925 à 1928 par Alder, Théoder et Christopher (**Matte, 2003**).

En 1974, Chance, Gardener et Peters reconnaissaient l'appartenance de *Leishmania chagasi* au complexe donovani-infantum. La synonymie était établie entre *Leishmania chagasi* et *Leishmania infantum* en 1980.

La chimiotaxonomie, mise en place par Maazoom en 1981 s'est révélée performante en matière d'étude écoépidémiologique des foyers leishmaniens et d'un point de vue fondamental, elle a permis des études taxonomiques des leishmanies (**Touria, 2012**).

1.3. Répartition géographique

Largement répandues à la surface de la Terre, les leishmanioses possèdent une aire de répartition qui s'étend sur les cinq continents dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays : 16 sont des pays industrialisés et 72 des pays en développement, dont 13 parmi les pays les moins développés (**O.M.S., 2010**).

Selon l'O.M.S., 12 millions d'individus sont atteints de leishmaniose (**Clem, 2010**) et 2 millions de nouveaux cas sont répertoriés chaque année (O.M.S., 2010), avec une incidence d'environ 1,5 millions de cas par an pour la LC (leishmaniose cutanée) et de 0,5 million de cas par an de LV (leishmaniose viscérale) dans les 88 pays (**O.M.S, 2000 ; Dedet, 2001 ; Croft et Yardley, 2002**).

Les différentes formes (viscérales, cutanées ou cutanéomuqueuses) ont des territoires dont la délimitation dépend de facteurs intrinsèques liés aux espèces de parasite, de phlébotomes vecteurs et de mammifères réservoirs, mais également de facteurs extrinsèques environnementaux (**Dedet, 2001**).

La mortalité attribuable à la leishmaniose dans le monde ne peut être estimée car, dans beaucoup de pays, la maladie n'est pas soumise à déclaration obligatoire ou, bien souvent, n'est pas diagnostiquée, surtout dans les endroits où il n'y a pas de médicaments. Dans certains cas, pour des raisons culturelles et faute d'accès au traitement, le taux de létalité est trois fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes (**O.M.S., 2010**).

Chapitre I : Généralités sur la Leishmaniose

D'après l'O.M.S, on peut résumer la répartition géographique des leishmanioses comme suit :

- Leishmaniose viscérale : foyers indien, méditerranéen, chinois, américain et africain.
- Leishmaniose cutanée : foyers méditerranéen, américain et africain.
- Leishmaniose cutanéomuqueuse : foyer américain.

1.3.1. Leishmaniose dans le monde

Les leishmanioses sont des pathologies parasitaires de distribution ubiquitaire. Endémiques dans les régions tropicales et subtropicales du globe et touchent 98 pays dans le monde (**Figure 01**) (**Eugénie Gay, 2015**).

On distingue les leishmanioses de l'Ancien monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie), et celles du nouveau monde (Amérique du Nord, du Sud et Amérique centrale) (**O.M.S, 2011**).

La prévalence globale des leishmanioses est estimée à 12 millions d'individus, et environ 350 millions de personnes sont à risque d'infection. Elles constituent un véritable problème de santé publique en Inde, en Afrique du Nord, en Amérique du sud et en Europe (**Alvar *et al.*, 2012**).

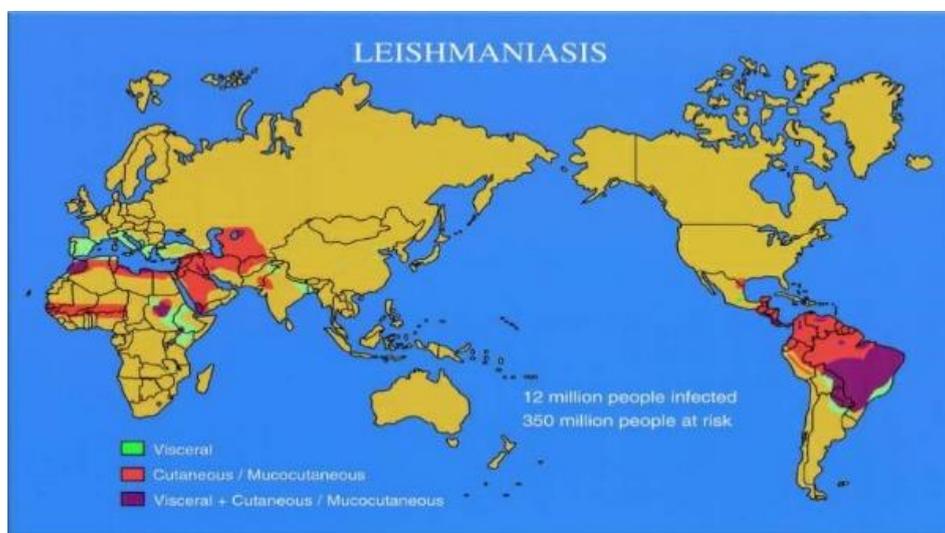


Figure 01: Répartition Mondiale de la Leishmaniose (Benyahia, 2009)

1.3.2. Leishmaniose en Algérie

L'Algérie est l'un des pays les plus touchés par la leishmaniose (BACHI, 2006), qui constitue un réel problème de santé publique (Harrat et Belkaid, 2002).

L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde, selon le Ministère de la santé, un totale de 7784 cas de leishmaniose a été déclaré en 2008 (Ramli, 2013). A côté des anciens foyers, Tizi-Ouzou, Boumerdès, Médea, Constantine, Jijel, de nouveaux foyers sont apparus ; à l'Est, Annaba et Collo ; au centre, la Mitidja, la Chiffa et Chlef, Tlemcen et Oran. (Figure 02). L'existence de leishmaniose canine dans la région de Tlemcen rend cette ville de l'Ouest un territoire potentiel pour cette forme viscérale (Moumni, 2015).

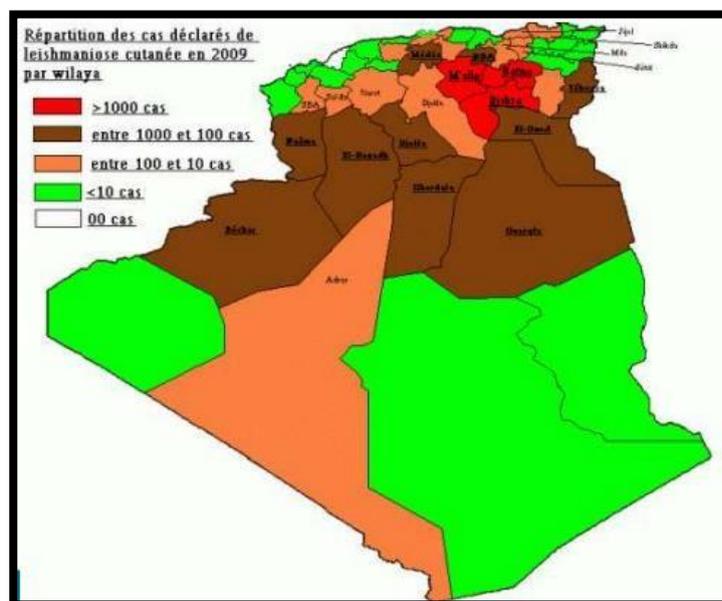


Figure 02 : Répartition géographique de la leishmaniose cutanée en Algérie (Loïc, 2012).

1.3.3. Leishmaniose à Ghardaïa

Outre les deux formes de leishmaniose cutanée précitées, la leishmaniose cutanée chronique est une forme récemment décrite à Ghardaïa, elle sévit de façon endémique et coexiste avec la LCZ à *L. major* dans le même foyer. L'agent causal est *L. killicki* et le vecteur prouvé est *P. sergenti* (Harrat et al., 2009 ; Boubidi et al., 2011 ; Garni et al., 2014), et le réservoir suspecté est *Masoutierra mzabi*, rongeur assez abondant dans les collines entourant la vallée du M'zab (Harrat, 2009).

1.4. Les différentes formes de la leishmaniose

La leishmaniose se décline en trois (03) formes principales : viscérale (la plus sévère souvent appelée Kala-azar), cutanée (la plus fréquente) et cutanéomuqueuse (Estevez, 2009).

1.4.1. La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale appelé également kala-azar "fièvre noire" ou fièvre "DumDum" (Hide, 2004 ; Estevez, 2009), représente la forme la plus grave de la maladie. Elle affecte les organes internes ou les organes du système des phagocytes mononuclées : la rate, le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (Dedet, 2009).

Les deux parasites causals sont le plus souvent *Leishmania donovani* ; espèce anthroponique dans les foyers Indien et Est-africain (l'homme comme seul réservoir) et *Leishmania infantum* ; espèce zoonotique dans les foyers Centre-asiatique, Bassin méditerranéen et American (avec comme réservoir du parasite le chien) (Dedet, 2009 ; Marty, 2010).

La maladie est plutôt chronique et touche principalement les enfants âgés de 1 à 15 ans (O.M.S, 2011). La période d'incubation est difficile à évaluer ; en moyenne elle est de 03 à 06 mois (Dedet et al, 1973). Cependant, les atteintes leishmaniennes peuvent se développer plus précocement et des durées d'incubation de plusieurs années ont également été rapportées (Bastien et Lachaud, 2016).

On distingue deux formes de leishmaniose viscéral;

- a) **Leishmaniose viscérale infantile** : La forme infantile est la plus fréquente dans le pourtour du Bassin méditerranéen, 92 % des patients ont moins de 5 ans (Belkaid et al., 1997).
- b) **Leishmaniose viscérale adulte** : La leishmaniose viscérale est relativement rare chez l'adulte ; revêtant un aspect sporadique et autochtone (Safi et al., 1996).

1.4.2. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) ou Espundia

Elle débute, aussi, par une lésion devenant ulcéreuse à l'endroit de la piqûre. Les lésions ulcéreuses s'étendent aux muqueuses du nez, de la bouche et du pharynx pour aboutir à une destruction tissulaire ou totale. 90% des cas de LCM se produisent en Bolivie, au Brésil et au Pérou (Evans, 1993 ; OMS, 2002).

1.4.3. Leishmaniose cutanée

C'est la forme la plus fréquente dans le monde, près de 90% des cas de leishmaniose cutanée surviennent dans ces pays : Afghanistan, Algérie, Brésil, Iran, Arabie Saoudite, Syrie et Pérou (**Eugenie Gray, 2015**).

C'est la forme la plus bénigne et guérissable, causée par *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana* et *Leishmania major*. Les réservoirs de la leishmaniose cutanée sont variés: l'Homme, les chiens et les rongeurs.

Les lésions cutanées sont, en générale localisées et siègent le plus souvent au niveau du site d'inoculation du parasite par le phlébotome femelle (**Dedet, 2001**). On estime qu'il y a 0,6 millions à 1 million de nouveaux cas chaque année dans le monde (**OMS, 2017**).

Elle existe en Algérie sous deux entités nosoépidémiologiques distinctes : la leishmaniose cutanée zoonotique, due à *L. major*, et la leishmaniose cutanée du Nord, due à *L. infantum*, variant enzymatique.

a) Leishmaniose cutanée

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales (autrefois dénommée "clou de Biskra") due à *L. major* (**Bachi, 2001**). Décrite pour la première fois par **Hamel** en **1860**, sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord saharienne correspondant à l'étage bioclimatique aride et semi-aride. Les foyers anciennement connus sont ceux de Biskra à l'Est et de Abadla à l'Ouest.

Cette forme cutanée connaît une extension vers le Nord (les hauts plateaux) avec la survenue d'épidémies. Ainsi, en 1982, M'sila a connu une épidémie au cours de laquelle 8 000 cas ont été diagnostiqués, suivie en 1985 d'une autre épidémie à Ksar chellala (Tiaret) avec 560 cas. D'autres foyers au niveau des étages arides sont apparus, ceux d'El-Oued, Ghardaïa, Béchar et Laghouat. Les nouveaux foyers au Nord concernent Batna, Médéa, Tiaret et Bordj Bou Arreridj (**Marty, 2002**).

Après une incubation courte, apparaît la lésion caractéristique : ulcération cutanée, à bords surélevés, avec une croûte centrale adhérente, indolore, de taille variable habituellement de 1 à 4 cm de diamètre, d'évolution chronique (**Marty, 2002**). Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'importantes cicatrices disgracieuses ou invalidantes. À côté de cette forme, la plus fréquente, s'observent les formes ulcérovégétantes, verruqueuses et plus rarement lupoides (**Bachi, 2001**).

b) Leishmaniose cutanée sporadique

Elle s'oppose à la leishmaniose cutanée zoonotique en tout point de vue. Sur le plan clinique, elle se présente sous forme d'une petite lésion unique, siégeant au niveau de la face, très inflammatoire, sans ulcération et sans croûte épaisse. Sa durée d'incubation est longue tout comme sa durée d'évolution qui est lente (**Bachi, 2001**).

La leishmaniose cutanée du Nord nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an (**Mihoubi, 2006**).

Le diagnostic n'est pas toujours évoqué d'emblée. Il l'est devant la persistance de la lésion malgré différents traitements à base d'antiseptiques, antibiotiques, voire même des anti-inflammatoires (**Rezalleh, 2009**).

1.4.3.1. Physiopathologie de la leishmaniose cutanée

La salive du phlébotome favorise les premières étapes de l'infection car elle contient des substances pharmacologiques actives qui produisent une vasodilatation et une immunodépression locales (**Kamhawi, 2000**).

Les promastigotes méta cycliques inoculés dans la peau au moment de la pique infectante sont phagocytés par des cellules hôtes à savoir les macrophages, monocytes, neutrophiles et les cellules dendritiques. L'interaction des leishmanies et des cellules repose sur la reconnaissance, à la face externe du parasite, de molécules de liaison par divers récepteurs de la fibronectine, de l'intégrine, du CR1 et du CR3. Parmi les molécules de liaison, le lipophosphoglycane apparaît de plus en plus comme la molécule clé de la virulence des leishmanies (**Buffet, 2008**).

À l'intérieur des cellules macrophagiques, plusieurs stratégies sont utilisées par le parasite pour persister dans ces cellules, puisque normalement celles-ci ont pour fonction de détruire les pathogènes et d'initier une réponse immune contre ceux-ci (**Bondan et al, 1990**) (**Olivier et al., 2005**).

Les amastigotes sont localisés dans une vacuole parasitophore de pH très acide, dans laquelle ils survivent à l'ingestion par les hydrolases lysosomales. Le parasitisme entraîne dans le macrophage une baisse des capacités de production de dérivés oxygénés et nitrogènes, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des leishmanies à la digestion cellulaire (**Antoine et al., 1999**).

Chapitre I : Généralités sur la Leishmaniose

Après multiplication intracellulaire et éclatement de la cellule hôte, les amastigotes infectent localement de nouvelles cellules phagocytaires et éventuellement migrent vers d'autres tissus. Les phénomènes inflammatoires et la réponse immunitaire spécifiques développés par l'hôte peuvent circonscrire et maîtriser l'infection chez les porteurs asymptomatiques (**Dedet, 1999**).

Les manifestations d'infection *Leishmania* peuvent varier d'asymptomatique à la maladie cliniquement patente qui peut rester localisée à la peau ou disséminer aux muqueuses orales et respiratoires supérieures ou partout dans le système réticulo-endothélial. L'expression clinique dépend à la fois du tropisme des espèces de *Leishmania* et du statut immunitaire de l'hôte, ainsi que des modalités de sa réponse immunitaire (**Faucher et Piarroux, 2001**).

En effet, même dans les cas de LC, les parasites peuvent également être transportés aux ganglions lymphatiques drainants et diffuser à d'autres sites cutanés comme dans la leishmaniose cutanée diffuse (LCD), ou aux muqueuses de la face comme dans la LCM. Mais les formes cliniques sont-elles mêmes différenciées suivant des facteurs liés à l'hôte, et tout spécialement sa réponse immunitaire (**Dedet, 2009**).

Enfin, l'immunosuppression, qu'elle soit de nature infectieuse ou d'origine médicamenteuse, influence notablement le cours de l'infection leishmanienne, soit qu'elle provoque la « patence » d'une infection leishmanienne inapparente et déclenche l'apparition des signes cliniques, soit qu'elle aggrave une forme évolutive (**Dedet, 2009**).

1.4.3.2. Formes cliniques de la leishmaniose cutanée

Le terme Leishmaniose Cutanée (LC) correspond à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses (**Salman et al., 1999**). On distingue deux (2) formes :

a. Leishmaniose Cutanée Localisée (LCL)

Elle résulte du parasitisme par n'importe quelle espèce anthropophile de *Leishmania*, y compris les espèces couramment viscérotropes *L. donovani* et *L. infantum*. Mais les espèces les plus constamment dermatotropes sont représentées, dans l'ancien monde, par *L. tropica* et *L. major* en Asie centrale, Afrique de l'Ouest, du Nord et de l'Est ; Proche et Moyen-Orient, *L. aethiopica* en Afrique de l'Est (**Boughellout et Boukrouma, 2016**).

Après une incubation d'un à quatre mois, les lésions cutanées débutent par un ou plusieurs petite(s) papule(s) inflammatoire (parfois vésiculaire, micronodules ulcère). Elles siègent le

Chapitre I : Généralités sur la Leishmaniose

plus souvent dans les zones découvertes et exposées au piqûre des phlébotomes principalement : visage, mains, avant-bras et membres inférieure (**Figure 03**) (**Bastien et Lachaud, 2016**). Dans cette forme de LC on distingue deux formes :

1) Forme humide :

La forme humide caractérisée par une ulcération centrale indolore plus au moins profonde. Elle est bordée par un bourrelet en relief congestif riche en parasites. L'ulcération est recouverte d'une croûte facile à arracher. L'évolution de la forme humide est de type torpide (**Dedet, 2009**).

2) forme sèche :

La forme sèche correspond à des lésions papulonodulaires de taille volontiers réduite, elle est recouverte de squames blanchâtres, elle est due à *Leishmania tropica* (**Bastien et Lachaud, 2016**). Ces lésions ont une évolution lente de 2 à 3 ans (**Cherrat et Sahnoun, 2015**).



Figure 03 : Lésion typique de la leishmaniose cutanée localisée (OMS, 2014).

b. Leishmaniose Cutanée Diffuse (LCD)

La leishmaniose cutanée diffuse à *L. aethiopica* d'Afrique de l'Est, nodulaire, non ulcérée, pseudo-lépromateuse, anergique, se rencontre dans les hauts plateaux du Kenya à l'Éthiopie, là où vit le réservoir de parasite : le daman qui est un petit mammifère ongulé. Il faut en rapprocher, la forme cutanée diffuse due à *L. amazonensis* des forêts tropicales d'Amérique du Sud. Mais, depuis que les états d'immunodépression acquise se sont multipliés, quelques cas de LCD ont été signalés avec des espèces telles que *L. major*, *L. braziliensis*, voire *L. infantum* (**Aubry et Gaüzère, 2020**).

Dans la LCD, la lésion élémentaire est un nodule non ulcéré. Les nodules sont, au début, de petite taille, isolés, très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps, aussi bien sur le visage

Chapitre I : Généralités sur la Leishmaniose

que sur les membres ou le tronc (**Figure 04**). Le nodule est riche en parasites et sa lésion histologique est un infiltrat homogène de l'épiderme et du derme composé d'histiocytes vacuolisés riches en parasites. Au fur et à mesure de l'évolution de l'affection, les nodules augmentent de taille, deviennent confluents et forment de larges plaques infiltrées. L'aspect du malade s'apparente dès lors à celui d'un lépreux lépromateux, en particulier le visage a un aspect léonin typique (**Dedet, 2009**).



Figure 04 : Leishmaniose cutanée diffuse (Meksi, 2012).

Chapitre. II. Epidémiologie de la leishmaniose

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

2.1. L'agent pathogène

2.1.1. Taxonomie

L'approche taxonomique des leishmanies se heurte essentiellement à des difficultés inhérentes au parasite lui-même : ressemblance morphologique et absence de reproduction sexuée. Par conséquent, les taxonomistes ont fait appel à un ensemble de caractères extrinsèques pour tenter de construire une classification cohérente. Ils se sont basés sur le comportement du parasite dans le vecteur, le pouvoir pathogène expérimental, les caractères culturels, les critères immunologiques, les données épidémiologiques et exceptionnellement, la morphologie comparée (Maazoun, 1982).

- Règne: *Protista* (Heackel, 1866)
- Embranchement: *Sarcomastigophora* (*Infantum et Balamuth*, 1963)
- Classe: *Zoomastigophora* (Calkins, 1909)
- Ordre: *Kinetoplastida* (Infantum 1963, Emend Vichekrman 1976)
- Famille: *Trypanosomatidae* (Dolffin 1901, Emend Grabben 1905)
- Genre: *Leishmania* (Ross, 1903).
- Sous genre : - *Leishmania* (Hide 2004, 2009).
- *Viannia* (Dedet, 2009)

Le genre *Leishmania* est divisé en deux sous genres selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur donnant ainsi respectivement :

- Le sous genre *Leishmania*, que l'on retrouve aussi bien dans l'Ancien que dans le Nouveau Monde, et regroupe des espèces dont les promastigotes se développent uniquement dans l'intestin moyen du phlébotome, en amont du pylore ; jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur : on parle donc de développement « suprapylarien ».
- Le sous genre *Viannia*, retrouvé en Amérique centrale et en Amérique du sud, et regroupe des espèces qui se développent aussi bien dans l'intestin moyen que dans l'intestin postérieur du phlébotome : ce développement est dit « péripylarien » (OMS, 2011 ; CVBD, 2012).

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

On dénombre à ce jour une trentaine des espèces de leishmanies, regroupées en complexes. Seulement une vingtaine d'entre elles sont pathogènes pour l'homme. Etant morphologiquement impossibles à distinguer les unes des autres, plusieurs techniques sont utilisées pour les reconnaître, le principe de base étant de comparer les souches inconnues avec les souches de référence déjà répertoriées. De ce fait, on trouve les :

- Techniques biochimiques, comme l'analyse des isoenzymes par électrophorèse. Elles permettent de déterminer des zymodèmes ; des populations parasitaires présentant des profils isoenzymatiques communs.
- Techniques génomiques, qui permettent de déterminer des schizodèmes ; des populations parasitaires définies par des « empreintes digitales » communes obtenues par une technique qui comporte la digestion de l'ADN kinétoplastique au moyen d'enzymes de restriction (OMS, 2011).

2.1.2. Morphologie

Les leishmanies sont des protozoaires (unicellulaires) flagellés, ils se caractérisent par la présence d'une organelle unique, le kinétoplaste qui est situé à la position basale adjacente au flagelle (près de la poche flagellaire), et qui représente de l'ADN mitochondrial. Ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades successifs distincts : le stade promastigote et le stade amastigote qui se multiplient tous les deux par division binaire (Touria, 2012).

a) Stade promastigotes

Les formes promastigotes ont des organismes extracellulaires allongés, flagellés à leur extrémité antérieure, et mesurent environ 10 à 25 μm de long (Figure 05), cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Le noyau est approximativement central avec un kinétoplaste situé en position antérieure. Ils se retrouvent dans le tube digestif du phlébotome et dans les milieux de cultures (Dedet, 2009 ; Bastien et Lachaud, 2016).



Figure 05 : La forme promastigote de *Leishmania* (Djezaar-Mihoubi, 2014).

a) Stade amastigote :

Les amastigotes sont des petits corpuscules arrondis ou ovalaires d'environ 4 μm de long et 2 μm de large ; possédant un flagelle très court (**Dedet, 1999**) qui ne dépasse pas le corps cellulaire. Les amastigotes présentent en microscopie optique, après coloration un noyau arrondi et un kinétoplaste en bâtonnet plus sombre (**Figure 06**), et se multiplient par scissiparité. Après éclatement du macrophage, elles parasitent d'autres macrophages sains (**Sacks et al., 2001**).

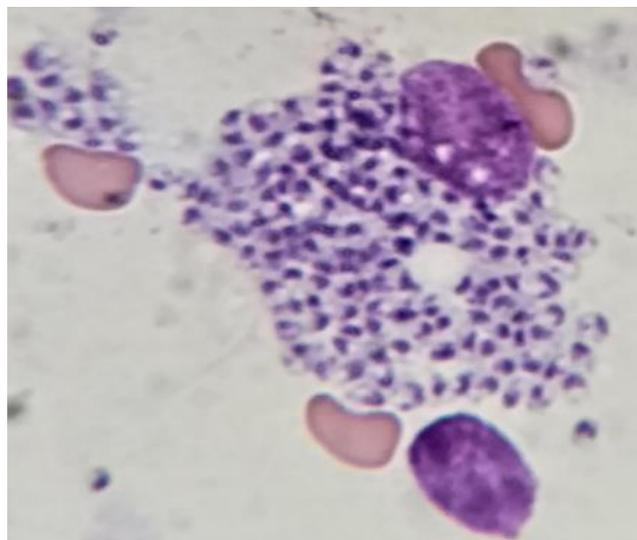


Figure 06 : La forme amastigote de *Leishmania* sous le microscope (GR $\times 100$) de patient numéro 106 (Cda).

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

2.1.3. Biologie

Les besoins énergétiques des leishmanioses sont satisfaits par glycolyse. En cas de carence glucidique, les leishmanies exacerbent leur métabolisme protéique et deviennent protéolytiques, elles effectuent donc un processus de néoglucogenèse à partir des acides aminés, par transamination. Les inhibiteurs du catabolisme glucidique ont une activité leishmanicide. Les leishmanies sont incapables de synthétiser les purines, celles-ci sont nécessaires à la vie des parasites, qui les trouvent sous forme d'adénine, hypoxantine, transformées en nucléoside par action enzymatique. Les analogues des purines, inassimilables par les amastigotes, ont des propriétés antileishmaniennes. L'équipement enzymatique glycolytique des leishmanies est très important et variable selon les espèces et les souches. D'où la notion de zymodèmes (Rioux *et al.*, 1990), est très importante en taxonomie et en (Emmanuel, 2012).

2.1.4. Cycle évolutif et mode de transmission

Le cycle du parasite nécessite 2 hôtes : les phlébotomes (le vecteur) et un mammifère (le réservoir) (Agharbi, 2013).

Les phlébotomes sont des moucheron hémaphages (1,5 mm à 4 mm) qui piquent surtout le soir et la nuit par temps calme. Seule la femelle, hémaphage, assure la transmission de la leishmaniose. Chez l'homme, lors de la piqûre du phlébotome, les Leishmanies sont inoculés sous forme de promastigotes qui vont envahir les macrophages dermiques, perdent leur flagelle et se transforment en amastigotes (Figure 07) (Aurbry, 2014).

Quand la multiplication intracellulaire des amastigotes reste localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, les réactions cellulaires générées et les diverses cytokines produites entraînent le développement d'une LC localisée (Agharbi, 2013).

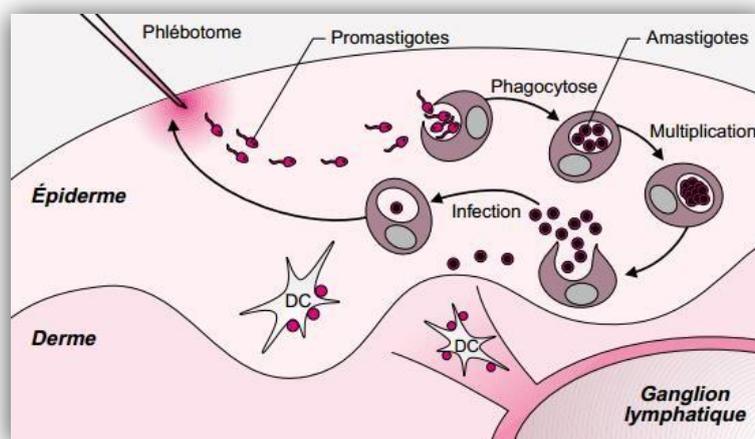


Figure 07 : Les premières étapes de l'invasion (Christophe *et al.*, 2001).

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

Les parasites peuvent également être transportés aux ganglions lymphatiques pour diffuser à d'autres sites cutanés comme dans la LC diffuse (LCD), ou aux muqueuses de la face comme dans la L. cutanéomuqueuse (LCM) (Agharbi, 2013).

Dans d'autres cas, les parasites s'étendent à tous les organes du système des phagocytes mononucléés provoquant la L. viscérale (LV). Dans ce cas, les organes les plus couramment atteints sont: la rate, le foie, les ganglions, la moelle osseuse et rarement le tube digestif et les poumons (Agharbi, 2013).

Le phlébotome se contamine en piquant un vertébré infecté. Les amastigotes absorbés en même temps que le repas sanguin se transforment en promastigotes qui est la forme infectieuse pour les mammifères (Figure 08) (Agharbi, 2013).

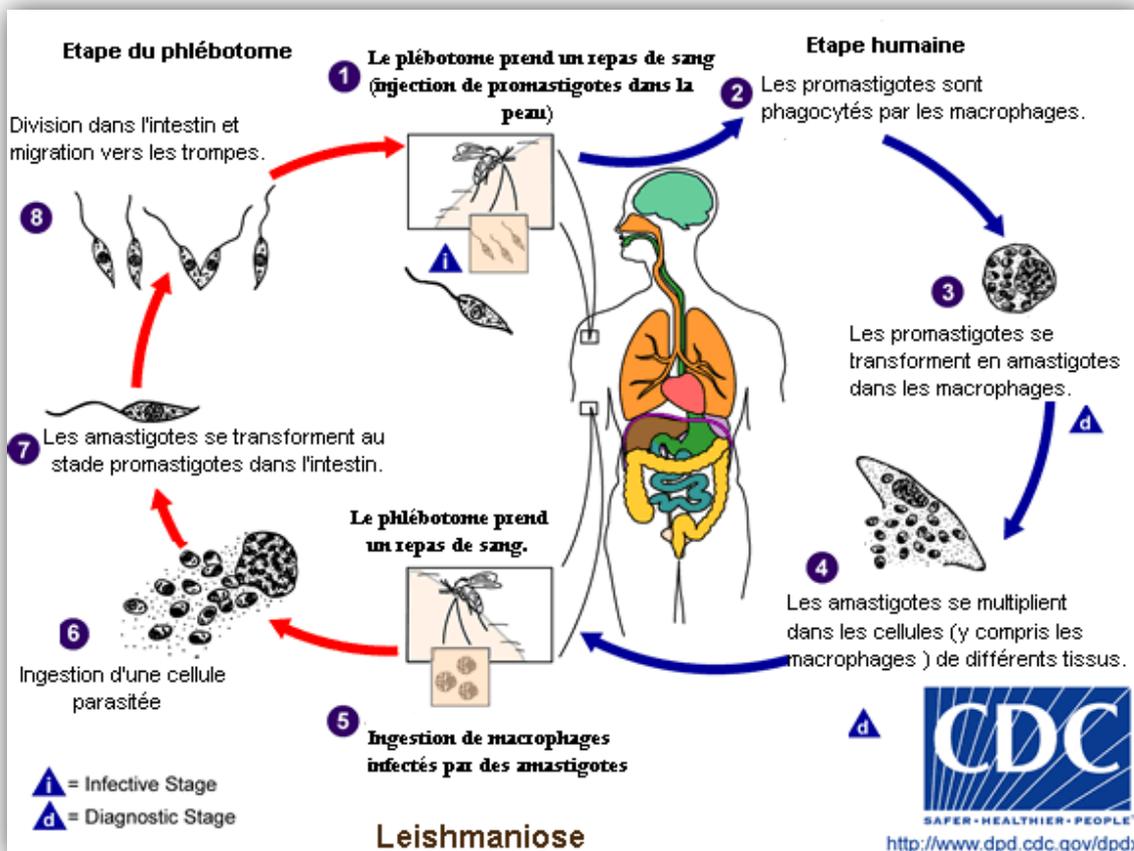


Figure 08: Cycle parasitaire des Leishmanioses (6).

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

2.2. Vecteurs

2.2.1. Taxonomie

L'identification des phlébotomes est souvent délicate, pour cela ; différentes classifications ont été proposées. Les espèces vectrices de maladies humaines sont réparties dans les genres *Phlébotomus* (vecteurs des leishmanioses eurasiatique et africaines) et *Lutzomyia* (vecteurs des leishmanioses américaines). Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous ordre des Nématocères (antennes filiformes), famille des Psychodidae (Boussaa, 2008) et à la sous famille des *Phlébotominae* comprend cinq genre: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* pour anciens monde et *Lutozomyia*, *Wrileya* et *Brumptomyia* pour le nouveau mond (Abonsec et Lleger, 1976 ; Locksely et Louis, 1992).

2.2.2. Morphologie

Les phlébotomes sont, à l'état adulte, des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps : 1,5 à 4mm). De couleur claire, en général jaune paille à brune, à peine visible à l'œil nu, leur corps est couvert de soies et ils présentent des ailes lancéolées dressées. Ils ont des yeux noirs avec 2 antennes à 16 segments qui sont velues et une longue trompe proportionnellement à leur taille (Figure 09) (Izri et al., 2006).

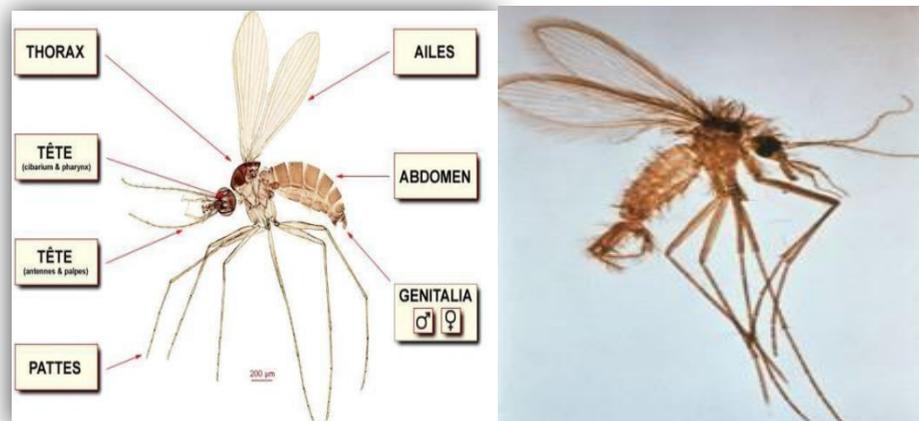


Figure 09: Morphologie générale d'un phlébotome adulte (Bounamous, 2010).

2.2.3. Biologie

Seule la femelle est hémaphage, et assure la transmission des leishmanies. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier. Il existe plus de 600 espèces

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

de phlébotomes réparties dans presque toutes les régions biogéographiques du monde. Parmi elles, sur environ 70 suspectées vectrices, trentaines seulement sont des vecteurs prouvés d'espèces anthropotropiques de *Leishmania* (Dedet, 2009).

2.2.4. Habitat

Le phlébotome apparait dans des zones qui offrent les conditions propices à son développement ; à savoir une température moyenne comprise entre 15 et 20 °C, une protection contre la lumière solaire directe, une humidité modérée et une abondance de débris organique. Ainsi les phlébotomes se trouvent dans les maisons, latrines, caves, étables, grottes, fissure dans les murs, les roches ou le sol, végétation dense, trous d'arbre et contreforts, terriers de rongeurs et d'autres mammifères et les nids d'oiseaux. De plus, les insectes vecteurs ont besoins d'hôtes vertébrés qui sont autant de réservoir de la maladie et garantissent ainsi que le cycle de vie de phlébotome ne sera pas interrompu (Ripert et Ladier, 2005).

2.2.5. Cycle de vie

Le développement des phlébotomes comporte une métamorphose complète comprenant les stades suivants: Œuf, larve, nymphe et imago (Figure 10) (Ba, 1999).

La femelle pond 18 à 100 œufs dans des endroits humides (Samake, 2006). En effet, la survie et le développement des œufs dépendent des conditions d'humidité et de température appropriées (26 à 30) (Bouchery, 2007).

Les œufs sont ovoïdes et mesurant 300 à 400 µm de longueur, ils éclosent au bout de 4 à 17 jours, la phase larvaire comporte 4 stades et dure 21 jours à 60 jours selon l'espèce. Les larves sont terricoles se nourrissant de débris organiques divers. Le dernier stade larvaire (L4) mue en nymphe la nymphe est fixé en position verticale par son extrémité postérieure et se rencontre au niveau des mêmes gîtes que ceux de la larve. Elle ne se nourrit pas et la durée du seul stade nymphal serait de 6 à 15 jours (Boulkenafet, 2006).

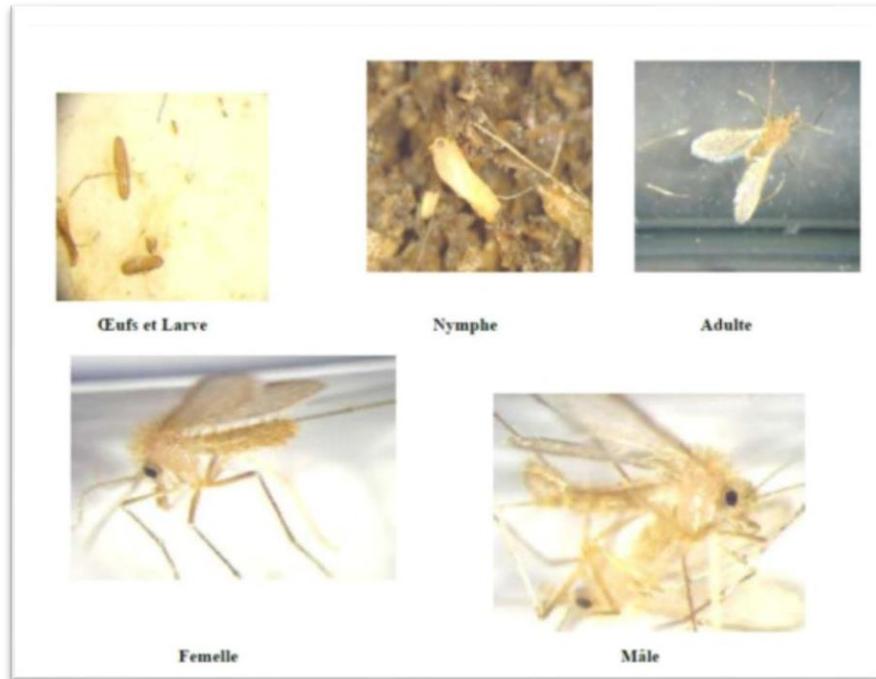


Figure 10: Cycle de vie de phlébotome (Pesson, 2014).

2.3. Réservoir

Les réservoirs naturels de *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates... ; dans ce cas, la leishmaniose est dite zoonotique. Lorsque l'Homme est l'unique réservoir du parasite, elle est dite anthroponotique (**Benyahia, 2009**).

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet le chien comme réservoir, depuis les travaux des frères Sergent en 1910 (**Sergent et al, 1910**). Plus tard, **Dedet et al. (1977)**, ont montré que 11,4 % des chiens de la Grande Kabylie étaient atteints (**Boughellout et Boukrouma, 2016**). Ce rôle de réservoir n'a été admis que par déduction, et ce sont les travaux de **Belazzoug et al. (1984, 1987)** qui ont confirmé le rôle joué par cet animal et fait la corrélation entre le foyer de leishmaniose canine et leishmaniose viscérale humaine.

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages gerbillidés. Le premier découvert est naturellement infesté par *L. major* au niveau du foyer de M'sila, le *Psammomys obesus* (**Figure 11A**), et le second, *Meriones shawi* (**Figure 11B**), au niveau du foyer de Ksar chellala (**Belazzoug, 1986**).

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose



Figure 11: Photo montrant deux rongeurs réservoir : A) *Psammomys obesus* ; B) *Meriones shawi* (Jebbouri, 2013).

Concernant le variant enzymatique de la leishmaniose cutanée, le chien, fortement suspecté, est confirmé comme réservoir (Benikhlef *et al.*, 2004). Les leishmanies circulent en Algérie entre l'homme et le chien, véhiculées par *Phlebotomus* pour les formes viscérale et cutanée à *L. infantum*, et entre l'homme et un rongeur sauvage pour la forme cutanée à *L. major* (Figure 12) (Bachi, 2006).

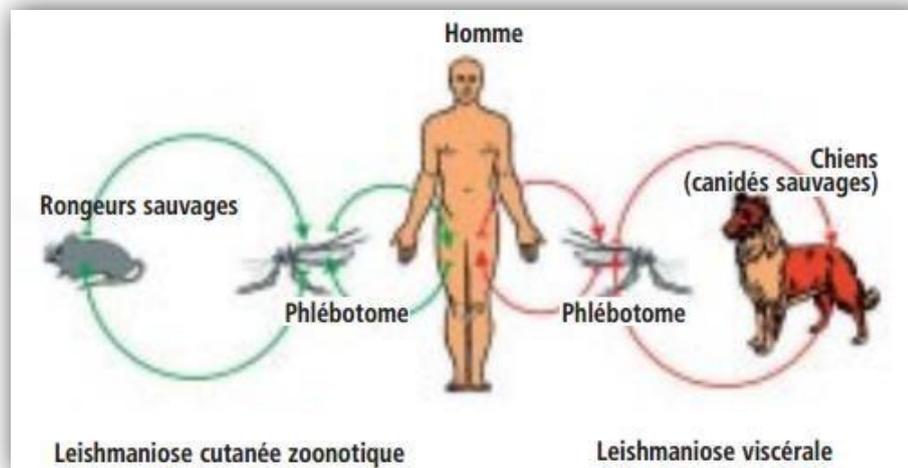


Figure 12 : Cycle évolutif des leishmanioses en Algérie (Bachi, 2006).

2.4. Facteurs affectant la transmission

2.4.1. Facteurs socioéconomiques

La pauvreté augmente le risque de leishmaniose de nombreuses façons. Les mauvaises conditions de logement et sanitaires (par exemple, absence de gestion des déchets, égouts à

Chapitre II : Epidémiologie de la leishmaniose

ciel ouvert) peuvent augmenter le nombre de phlébotomes, ainsi que leur accès à l'homme (O.M.S, 2020)

2.4.2. Facteurs de risque environnementaux

Un nombre élevé de patients atteints de leishmaniose cutanée ont été signalés quand les banlieues s'étendent sur des terres autrefois inhabitées hébergeant une forte densité de rongeurs (OMS, 2010).

Dans certaines situations épidémiologiques, la déforestation et la destruction des habitats naturels peuvent réduire la transmission de la leishmaniose cutanée. Toutefois, dans certains cas, la déforestation semble avoir contribué à l'augmentation plutôt qu'à la diminution de l'infection humaine (OMS, 2010).

2.4.3. Mouvements de population

Les épidémies de leishmaniose cutanée sont souvent associées à la migration et à l'introduction de personnes non immunes dans les zones de transmission existantes. La prédiction de telles épidémies dépend de la disponibilité de l'information écologique et de l'évaluation des zones de développement avant la mise en œuvre des projets ou des mouvements de population. (Abed et Kouani, 2017).

Chapitre. III. Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

2.5. Diagnostique

Le diagnostic des leishmanioses, orienté par le tableau clinique et des notions épidémiologiques, conforté par des données biologiques non spécifiques ou sérologiques, repose sur des arguments parasitologiques complétés, plus récemment, par ceux des techniques de biologie moléculaire (**Moumni, 2015**). De ce fait on trouve :

2.5.1. Diagnostic clinique

Elle est caractérisée par une ou plusieurs lésion (s) papuleuse (s) ou papulonodulaire (s) ulcérée (s) recouverte (s) d'une croûte adhérente qui ne guérit pas sous le traitement anti infectieux habituel. Cette lésion évolue pendant plusieurs semaines ou mois avec tendance à la guérison. Elle peut être surinfectée avec ou sans atteinte lymphatique. Un séjour en région d'endémie avec lésion ulcéreuse doit aussi orienter le diagnostic (**Thérèse et al., 2002**).

Il existe trois types de lésions :

- **Sèche ou nodulaire** : l'ulcération est croûteuse mal limitée, avec une évolution lente vers la guérison spontanée.
- **Humide ou creusant** : l'ulcération est plus profonde, plus grande, avec une évolution plus rapide.
- **Lipoïde** : nodule rouge-jaunâtre ferme et lisse qui en le pressant un peu, laisse apparaître des grains lipoïdes jaunâtres (**Schalling et al., 2000 ; Chouih et al., 2008**).

2.5.2. Diagnostic biologique

Ce type de diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son acide désoxyribonucléique (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection (anticorps circulants ou hypersensibilité retardée). Les possibilités de diagnostic varient suivant la forme de leishmaniose en cause (**Le Fichouxy et al., 1999**).

Examen direct

Les leishmanies sont recherchées au microscope optique (objectif 100) avec de l'huile à immersion. Elles se présentent sous forme amastigote ou micromastigote qui sont des éléments immobiles strictement intracellulaires. Lors de la confection du frottis, les cellules

Chapitre III: Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

macrophagiques hôtes peuvent éclater et les leishmanies s'en trouvent éparpillées sur le frottis **(EL Alami, 2009)**.

Le prélèvement peut être effectué au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion par ponction ou grattage au vaccinostyle ou par la biopsie. Il peut être aussi effectué sous la lésion par ponction à l'aide d'une seringue diabétique par ponction aspiration **(Smake, 2006)**.

Déposer le frottis sur lame, étalé au contact de l'arête d'une deuxième lame ou une lamelle couvre -objet tenu à 45 degrés. Puis, le frottis est séché rapidement à l'air libre et à l'abri des poussières. Pour la coloration, déposer 10 à 15 gouttes de May Grünwald Giemsa (MGG) sur le frottis et couvrir pour éviter l'évaporation pendant 3 mn. Pour la fixation, déposer 10 à 15 gouttes d'eau tamponnée et mélanger par rotation de la lame pendant 1 mn. Égoutter puis recouvrir de Giemsa dilué au 1/10ème pendant 30 mn. Egoutter et laver à l'eau neutre et enfin sécher au papier Joseph **(Smake, 2006)**.

Examiner à l'immersion au G 100 x et oculaires faibles à la recherche de la forme amastigote des leishmanies qui peuvent être intra ou extracellulaire **(Smake, 2006)**.

Culture

La culture permet la croissance des formes promastigotes à partir des ponctions ou des biopsies, dans des milieux d'isolement appropriés **(Wery, 1995)**. Elle n'est réalisée que dans les laboratoires spécialisée. Elle peut se faire sur milieu diphasique au sang de lapin : milieu Novy - Mc. Neal - Nicolle (NNN), ou sur milieu liquide (Milieu de Schneider ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) additionné de sérum de Veau Fœtal (VF). L'ensemencement doit évidemment être fait à partir de matériel stérile puis les cultures sont incubées à 27°C pendant 4 à 6 semaines et doivent être observées chaque semaine à la recherche de promastigotes mobiles **(Belaz, 2017)**.

En cas de positivité, les formes promastigotes flagellées mobiles sont visibles. Si le résultat est négatif, la phase liquide est transférée sur un milieu neuf et quatre à cinq repiquages sont effectués à une semaine d'intervalle avant de conclure à la négativité. Les souches isolées pourront alors faire l'objet d'un typage isoenzymatique **(Choi et Lerner, 2001)**.

2.5.3. Diagnostic moléculaire

Il s'est remarquablement développé au cours des 10 dernières années. Bien que différentes méthodes moléculaires aient été successivement évaluées, ce sont les techniques basées sur la PCR (Polymerase Chain Réaction) qui sont actuellement les plus utilisées. Leurs avantages, en effet, résident dans leur très grande sensibilité et leur spécificité théoriquement quasi absolue **(Reithinger et Dujardin, 2007)**.

En outre, elles permettent de détecter l'ADN parasite dans des échantillons ou des cultures contaminées par des bactéries ou des champignons. Elles assurent aussi un résultat rapide et offrent la possibilité de réaliser, sur le même échantillon, une identification de l'espèce de *Leishmania* en cause. Diverses cibles moléculaires sont utilisées, selon les équipes et l'espèce de parasite en cause **(Dedet, 2009)**.

La PCR s'avère être une méthode sensible lors du diagnostic des maladies parasitaires. Elle est plus sensible que la microscopie conventionnelle pour la détection des *Leishmania*, à cause de la rareté des parasites, surtout dans le cas de lésions anciennes **(Masmoudi et al., 2000)**.

En outre, la PCR a l'avantage de permettre l'identification d'espèces de la *Leishmania* au niveau des lésions. Des amorces basées sur l'ADN cytoplasmique sont utilisées. L'ADN cytoplasmique des parasites est amplifié par PCR, qui augmente notablement la sensibilité. Cependant, à cause de cette forte sensibilité de la PCR, il peut y avoir des faux positifs **(Salmanpour et al., 1999)**.

Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification de séquence nucléique, décrite par Mullis en 1985. Elle est devenue un outil quasi universel dans le domaine de la biologie. Elle permet d'obtenir en quelques heures plusieurs millions de copies d'une séquence donnée d'ADN **(Poitras et Houde, 2002)**.

Son principe est d'utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

Chapitre III: Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

Le processus est initié par la fixation d'amorces oligonucléotidiques ($\approx 20\text{pb}$) (primers), de séquences complémentaires de l'un et l'autre des brins à amplifier. Elles délimitent la longueur du fragment à amplifier.

La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes :

- **1^{ère} étape** : dénaturation thermique de l'ADN $\approx 94^\circ\text{C}$ ($>T_m$ de l'ADN). On sépare par la chaleur les 2 brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogène. L'ADN passe sous forme de simple brin et les 2 brins peuvent alors servir de matrice.

- **2^{ème} étape** : hybridation des amorces ≈ 45 à 65°C ($<T_m$ des amorces). Les amorces, en large excès, s'hybrident à tout l'ADN comportant la séquence complémentaire.

- **3^{ème} étape** : élongation (ou extension) des amorces $\approx 72^\circ\text{C}$. L'ADN polymérase (Taq Polymérase) allonge les amorces en incorporant des dNTP complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse se fait dans le sens 5' -3' (**Poitras et Houde, 2002**).

2.5.4. Diagnostic immunologique

Les titres d'anticorps de la *Leishmania* peuvent être mesurés par un test d'agglutination directe, un test d'immunofluorescence indirecte ou encore par ELISA. Ces titres sont de coutume bas quand ils sont détectables chez les personnes ayant une leishmaniose cutanée. En outre, ces anticorps peuvent avoir des réactions croisées avec la lèpre, la malaria, la trypanosomiase ainsi que d'autres infections et donc manquent de sensibilité et de spécificité (**Teklemariam et al., 1994**).

L'immunodiagnostic est peu opérant puisque la sérologie est rarement positive et à des taux d'anticorps très faible. Par contre pour la leishmaniose viscérale, la sérologie offre une approche de diagnostic très appréciable (**Dedet, 2009**).

Immunofluorescence indirect (IFI)

C'est la technique la plus fiable, elle utilise des Antigènes figurés (promastigotes homologués de culture). Les titres d'anticorps sont élevés dans la majorité des cas de leishmanioses. Sa spécificité reste très élevée et présente une bonne complémentarité avec l'ELISA. Néanmoins, c'est une technique de laboratoire hospitalier et nécessite la

Chapitre III: Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

disponibilité des réactifs et d'un microscope à source de lumière UV (**Nait kaci et Mouhaouche, 2017**).

Elle consiste à mettre en présence d'un antigène figuré des dilutions successives de sérum suspect. Si le sérum contient des anticorps spécifiques, ceux-ci se fixent sur les parasites puis retiennent le conjugué fluorescent (anti-immunoglobuline marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine). A l'examen en lumière ultraviolette, le parasite apparaît fluorescent (**Kamoun et Fréjaville, 2002**).

Cette technique élégante, rapide, qualitative et quantitative donne d'excellents résultats en parasitologie si l'on respecte certaines règles: utilisation d'un matériel parasitaire convenable, élimination des fluorescences non spécifiques, détermination des titres significatifs (**Kamoun et Fréjaville, 2002**). Cette technique a une sensibilité de 91% avec une spécificité de 99% (**Abed et Khouani, 2017**).

L'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

C'est technique immunologique, largement utilisée dans le sérodiagnostic de la LV, est basée sur la détection chez l'hôte, soit d'antigènes de Leishmania par l'utilisation d'anticorps anti-Leishmania ou bien la détection des anticorps anti-Leishmania par l'antigène total de promastigotes lysés conjugués à une enzyme (phosphate ou peroxydase). Cependant, la réaction immunologique croisée de Leishmania avec Trypanosoma cruzi pose un sérieux problème mais l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre Leishmania pourraient résoudre ce problème. En outre, la production et l'identification d'antigènes recombinants, plus précisément, l'antigène rK39 montre des résultats prometteurs. La réactivité avec les autres trypanosomatides est négative et la présence de l'anticorps, anti-rK39, indique une infection active ("**Ara et al., 2013** " **Morizot et al., 2007**").

La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 492 nm. Cette technique a l'avantage d'être automatisable et peut être répétée (avec un sérum précédent) pour le suivi post- thérapeutique, mais elle nécessite un matériel de lecture adapté ; ne facilite pas leur utilisation dans tous les laboratoires (**Bouree, 2004**)

Des approches nouvelles dans les techniques ELISA sont utilisées à la fois pour le diagnostic et l'appréciation du stade évolutif de la maladie, mettant en évidence les IgE anti-leishmaniens qui représentent un facteur pronostic. Ces derniers posent le diagnostic dans

Chapitre III: Diagnostic et prophylaxie de la Leishmaniose

100% des cas de leishmaniose viscérale. Leur disparition rapide après traitement, est un signe de bon pronostic (**Bachi, 2001**).

Agglutination directe

Elle consiste à mettre en présence des dilutions successives de sérum avec des formes promastigotes de *Leishmania* trypanosomées et colorées au bleu d'Evans ou au bleu de Coomassie. Une réaction positive témoin de la présence d'anticorps subjective par un tapis d'agglutination. Le titre seuil de cette technique se situe aux environs de 1/1 600 ou 1/3 200 : le seuil élevé fait perdre à la technique sa valeur. Elle se négativerait plus précocement en post thérapeutique (**Bachi, 2001**).

Test au latex

Une réaction positive visible à l'œil nu se traduit par une agglutination des particules de latex après rotation lente de la lame dans un temps n'excédant pas cinq minutes. Si le résultat est positif, le sérum doit être repris selon une méthode quantitative, selon le même principe et à partir de prélèvement.

La sensibilité du test au latex est comparable et, dans certains cas, supérieur à celle de l'IFL. Les avantages sont la rapidité et la simplicité de réalisation. Elle présente toutefois l'inconvénient de n'être que qualitative (**Harrat, 2006**).

2.6. Traitements

Un agent anti-leishmanien idéal devrait être efficace, sûr, facilement administré et abordable. En pratique, cependant, aucun agent de ce type n'est disponible. Le choix du traitement est influencé par la disponibilité de médicament particulier dans le pays affecté et les patients doivent être orientés vers des centres spécialisés ayant de l'expérience (**Marklr et Markhoul, 2004**).

Un grand nombre d'interventions thérapeutiques différentes, y compris les traitements locaux, systémiques et physiques (par exemple, cryothérapie, thermothérapie), ont été utilisés et testés pour la leishmaniose cutanée. Les espèces infectantes, la région géographique et le statut immunitaire du patient affectent l'efficacité des traitements (**O.M.S, 2014**).

Dans la leishmaniose cutanée due à *L. tropica* (leishmaniose cutanée anthroponotique), un

Traitement rapide est important pour améliorer la santé du patient et réduire la transmission du parasite. Du fait de la transmission essentiellement interhumaine de *L. tropica* (via les vecteurs), il semble y avoir un risque plus élevé de survie et de propagation de parasites résistants aux médicaments de cette espèce (O.M.S, 2014).

La leishmaniose cutanée n'est pas une maladie qui met la vie en danger et les complications graves sont rares. Cependant, étant donné que les infections secondaires superficielles peuvent compliquer la leishmaniose cutanée ulcérée, il est important de nettoyer les lésions. Le médicament ou le traitement recommandé dans la leishmaniose cutanée ne devrait pas induire des complications potentiellement mortelles, mais dans les cas graves, le rapport bénéfice-risque est différent (O.M.S, 2014).

IL existe plusieurs médicaments, on peut citer :

***Antimoniés pentavalents**

L'efficacité des antimoniés dans le traitement des leishmanioses est confirmée par près d'un siècle d'utilisation. Les produits disponibles sont l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) en France et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) dans les pays anglo-saxons. Le traitement se prescrit par voie intramusculaire, intraveineuse ou par voie sous-cutanée. La posologie est de 20 mg/kg par jour de dérivé pentavalent d'antimoine pendant 4 semaines.

En raison de sa toxicité cardiaque (conduction ventriculaire), rénale et pancréatique, ce traitement, peu onéreux par lui-même, impose un suivi biologique et clinique étroit. C'est le traitement de première intention dans les zones d'endémie à faibles revenus (A.N.O.F.E.L, 2014).

En Afrique du Nord, les composés antimoniaux pentavalents restent le traitement de première intention contre les formes à la fois cutanées et viscérales de la leishmaniose. Cependant, leur efficacité est actuellement menacée par l'émergence d'une résistance à l'antimoine (Soudani, 2019).

***Amphotéricine B**

L'amphotéricine B (Fungizone®), antifongique utilisé dans le traitement des mycoses systémiques, représente un antileishmanien puissant utilisé dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) ou résistantes aux antimoniés.

Bien que toxique pour la fonction rénale, du fait de son prix abordable, c'est l'une des solutions au problème de la résistance. La Fungizone s'administre en perfusion intraveineuse lente à la posologie maximum de 1 mg/kg par jour (un jour sur deux) sous surveillance médicale pendant 3 à 4 semaines (A.N.O.F.E.L, 2014).

***Pentamidine**

La pentamidine inhibe la synthèse de l'ADN parasitaire par blocage de la thymidine synthétase et par fixation de l'ARN de transfert (Dedet, 1995).

Il est aujourd'hui surtout utilisé comme médicament de première intention dans le traitement de certaines formes de leishmaniose cutanée en cure courte. Il s'administre par voie parentérale, à la dose de 4 mg base/kg et par injection. La pentamidine peut induire des effets secondaires immédiats, de type allergique ou local, surtout en cas de perfusion rapide.

Les effets toxiques survenant au cours d'une série d'injections sont dépendants de la dose et peuvent atteindre les muscles, le rein, les lignées sanguines, le pancréas et entraîner des diabètes insulino-dépendants (A.N.O.F.E.L, 2014).

***Miltéfosine**

La miltéfosine (Impavido®) est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. Il est efficace et moins toxique que la pentamidine ou les antimoniés. La dose recommandée est de 2,5 mg/kg par jour. La dose journalière totale maximum est de 150 mg. En France, il est possible de l'obtenir sous autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU). C'est une autre solution à la chimiorésistance, bien que la molécule soit abortive et tératogène (A.N.O.F.E.L, 2014).

Cependant, l'efficacité des substances diffère radicalement en fonction de la forme clinique de la leishmaniose, de l'espèce *Leishmania* et de la région géographique. Ainsi, il existe toujours un besoin continu de nouvelles substances chimiques avec un effet leishmanicide et pour des systèmes d'administration optimisés (Cruz et al., 2009).

La surinfection bactérienne est une complication rare de la leishmaniose cutanée. Toutefois, si les lésions montrent des signes évidents de surinfection bactérienne cliniquement significative, c'est à dire une zone rouge, enflée et sensible qui s'étend au-delà des frontières froides infiltrées de la lésion de leishmaniose elle-même (une complication rarement associée avec /yde la fièvre), il est alors justifié de mettre en route un traitement antibiotique par voie

orale efficace contre les streptocoques et staphylocoques communs, par exemple la cloxacilline, la pristinamycine, ou l'amoxicilline avec de l'acide clavulanique (O.M.S, 2014).

2.7. Prophylaxie

2.7.1. Prophylaxie individuelle

Les mesures prophylactiques individuelles aspirant à l'éviction de la piqûre des phlébotomes et ce au moyen d'installation de moustiquaires. Ces mesures peuvent être par :

- Utilisation de moustiquaires à mailles fines pour protéger les pièces et les lits.
- Utilisation de produits répulsifs tels que le DEET (N.N-diethyl-m-toluamide) et l'hexaméthylène benzamide.

Ces deux mesures sont particulièrement utiles pour la protection personnelle des gens qui visitent les zones d'endémie.

- L'élimination ; autour des habitations ; des déchets ; ordures et matières organiques ainsi que des briques ; bois de chauffage ou autres matériaux sur lesquels les phlébotomes peuvent se poser (Soudani, 2019).

2.7.2. La prophylaxie collective

La lutte anti-vectorielle diminue le risque de contamination mais n'a pas amené de succès durables à l'échelle des populations. Elle comporte la lutte contre les vecteurs par des insecticides à activité rémanente à l'intérieur et autour des habitations (sans oublier la niche du chien, les murs de pierre, ainsi que les poulaillers et clapiers où se reproduisent les phlébotomes...).

Elle doit tenir compte des différences de comportement des vecteurs liées aux différences d'espèces. L'utilisation massive de DDT (diméthylchloro.....) ou d'autres molécules a montré une efficacité certaine. L'aspersion péridomiciliaire de répulsifs, si le vecteur est domestique, a montré une efficacité partielle, au moins dans la leishmaniose cutanée, mais est difficile à appliquer sur de longues périodes (Moumni, 2015)

La lutte ciblant le réservoir a été essayée pour la zoonose à *Leishmania infantum*. La protection du réservoir canin par des colliers imprégnés de deltaméthrine, (Scalibor®) et

l'ectoparasiticide à base de perméthrine (Adventix®spot-on) est porteuse d'espoir sur la diminution de la LV humaine (**Moumni, 2015**).

2.8. Vaccination

Il n'y a pas de vaccin efficace disponible pour l'immunisation prophylactique contre les leishmanioses. Jusqu'à présent, la seule vaccination fiable contre les leishmanies était limitée à la protection de l'Homme contre *L.tropica* et *L.major*, par infection préalablement provoquée à la seringue. Les promastigotes sont injectés dans le bras ou une autre partie du corps. L'infection suit un cours naturel et après guérison, l'individu est solidement immunisé contre une infection postérieure avec les deux leishmanies. Ce type d'immunisation a été pratiqué sur une échelle limitée dans des régions hyper-endémiques de LC ; elle doit être seulement utilisée pour l'Homme se déplaçant dans des zones à haut risque. Il faut approximativement 3 mois avant que l'immunité soit acquise (**El idrissi et al., 2010**).

Les vaccins de première génération consistent en organismes leishmaniens tués mélangés avec une faible concentration de BCG comme adjuvant. Différentes préparations utilisant des promastigotes soit entiers (autoclavés) ou soit détruits par les ultrasons sont actuellement soumises à des essais pour l'immunisation contre les leishmanies de la LC chez l'Homme et contre la LV chez l'Homme et le chien. Des sous-unités thérapeutiques, candidates pour un vaccin, consistant en plusieurs antigènes clonés, l'un étant un puissant adjuvant, ont récemment été utilisées chez l'Homme au Brésil pour traiter *L. braziliensis* mucosal résistant au médicament (**Nait kaci et Mouhaouche, 2017**).

Les vaccins de seconde génération, qui sont actuellement au stade de pré-développement, consistent en une leishmanie génétiquement modifiée incapable de produire la maladie, en molécules recombinantes ou leurs ADN correspondant, ou en organismes recombinants portant des gènes de leishmanie et exprimant les antigènes du parasite (**Laamrani et al., 2010**).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

Devant l'importance cruciale du problème des leishmanioses en Algérie, nous sommes intéressés à cette parasitose et précisément dans la wilaya de Ghardaïa afin de donner un aperçu global sur la maladie.

1. Objectif de l'étude

1.1. Objectif principal

L'objectif principal de ce travail est de comprendre la dynamique de transmission, la distribution géographique et ainsi d'optimiser les approches épidémiologique et la caractérisation moléculaire des souches de *Leishmania* isolées de quelques patients dans la région de Ghardaïa.

1.2. Objectif secondaire

L'objectif de cette étude est comme suit :

- Déterminer la répartition de la leishmaniose cutanée dans la wilaya de Ghardaïa.
- Sensibiliser le personnel soignant sur l'apport du laboratoire dans le diagnostic de certitude
- Etudier les aspects cliniques et diagnostiques de la maladie de la leishmaniose cutanée afin de permettre une thérapie ciblée.
- Etablir la fréquence de la maladie se basant sur les résultats du diagnostic parasitologique et les fiches de renseignement.
- Etablir des recommandations afin de limiter la propagation de cette maladie.

2. Zone d'étude

2.1. Présentation de la zone d'étude

Ghardaïa se situe dans la région du M'Zab, dans la partie centrale du Nord du Sahara, à 600 km au sud d'Alger. C'est un plateau calcaire présentant des vallées et des ravins qui s'enchevêtrent les uns dans les autres (Boukraa, 2009). C'est une région désertique qui couvre une superficie de 86 650 km², située entre 1° et 5° de longitude Est (environ 200 km) et 31°30' et 33° de latitude Nord (environ 450 km), elle comprend 13 communes dont la principale est Ghardaïa, chef-lieu du département (Figure 13).

Partie expérimentale

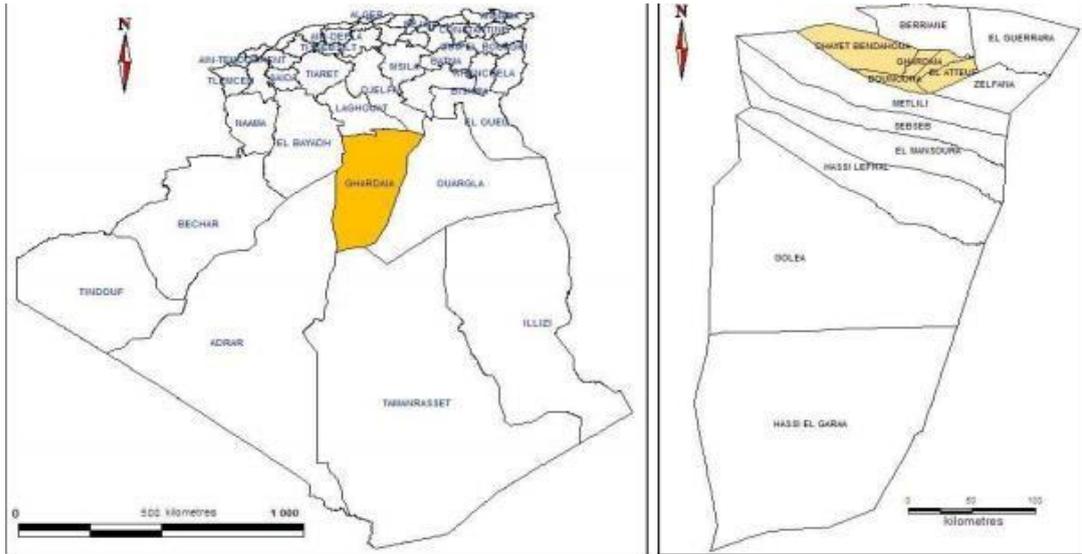


Figure 13 : Situation géographique de la wilaya et département de Ghardaïa avec ses communes (Garni *et al.*, 2012).

2.1.1. Le climat

Le climat est de type aride avec un couvert végétal pauvre, les précipitations sont faibles et irrégulières. Alors que La température mensuelle moyenne est maximale en Juillet (36°C) et minimale au mois de Janvier (12°C) (Harrat, 2009).

2.1.2. Le couvert végétal

La structure et la nature du sol ne sont pas favorables à l'existence d'une flore naturelle riche. Les principaux facteurs qui influent de manière significative sur la végétation sont le climat (précipitation, température, luminosité...), le sol et l'altitude (Abid, 2013).

2.1.3. Du point de vue urbain

Les agglomérations sont classées selon leur statut administratif, la taille (nombre d'habitants) et la localisation par rapport aux axes principaux (l'hierarchie fonctionnelle). De ce fait on a une ville d'importance nationale (Ghardaïa) avec des villes d'importance régionale (Guerrara, El-Menea, Metlili et Berriane) et des centres urbains d'importance locale (Bounoura, El-Atteuf et Hassi El-Gara) (Abid,2013).

La Wilaya de Ghardaïa compte aujourd'hui 13 communes dont les communes de la zone d'étude sont : Daya Bendahoua, Ghardaïa, Bounoura et El Atteuf (Figure 14).



Figure 14 : Vue satellitaire des quatre communes de la zone d'étude (Google Maps)

3. Méthode d'étude

Il s'agit d'une étude réalisée en deux parties, la première dans le laboratoire d'Établissement de Proximité de Santé Publique de Ghardaïa (EPSP Ghardaïa). Le diagnostic se fait sur des préparations réalisées par grattage à partir de lésions suspectes de patients, puis observées sous microscope optique après coloration au GIEMSA. Le prélèvement est considéré comme positif si la présence des formes d'amastigotes est confirmée ou une confirmation ultérieure par biologie moléculaire des quelques échantillons positifs au niveau du Laboratoire d'Éco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations à l'Institut Pasteur d'Alger comme une deuxième partie de notre étude pour distinguer entre les différentes espèces de leishmaniose existant dans notre zone d'étude.

Les patients inclus dans cette étude sont ceux résidants dans les quatre communes de la zone d'étude (Dhaya Bendahoua, Ghardaïa, Bounoura et El Atteuf) quel que soit l'âge et le sexe. Le dépistage et le diagnostic des patients par le laboratoire EPSP Al Atteuf a été réalisé sur la période du 01/10/2018 au 08/03/2020.

Partie expérimentale

Première partie expérimentale : Démarche diagnostic de certitude dans laboratoire EPSP d'El Atteuf

1. Présentation Etablissements Publics de Santé de Proximité (EPSP)

Ghardaïa :

C'est un établissement public qui est constitué d'un ensemble de polycliniques et de salles de soins couvrant un bassin de population de Daya Bendahoua jusqu'à la commune d'El- Atteuf.

Ils comprennent :

- 04 polycliniques sur le territoire du département et chaque polyclinique couvrant 15 à 25000 habitants. Ils sont des point de gardes 24H/24H, équipés de service laboratoire et radiologie: Dayat Bendahoua, Baba Saad, Thnea, El Atteuf.
- 32 centres ou salles de soins dont chacune d'elles couvrant : 6 à 7000 habitants.
- 01 Service de la prévention de la wilaya de Ghardaïa à El Atteuf.
- 104 Médecins.
- 810 paramédicaux

1.1. Le laboratoire EL-Atteuf de l'EPSP Ghardaïa :

Durant cette période d'étude, les cas suspect de leishmaniose humaine ont été colligés à partir des prélèvements des patients proviennent de plusieurs régions de la zone d'étude : Daya Bendahoua, Ghardaïa, Bounoura, El Atteuf.

2. Matériel

2.1. Matériel non biologique

Dans notre étude, le matériel utilisé dans le laboratoire d'EL-Atteuf EPSP Ghardaïa est donné en (**Annexe III**) :

2.2. Matériel biologique

Le matériel biologique obtenu des patients peut être étalé sur lame (frottis), mise en culture, fixé pour examen microscopique ou utilisé pour PCR ;

Partie expérimentale

2.2.1. Frottis

Le frottis est obtenu par la méthode de May-Grünwald-Giemsa (MGG). Les formes amastigotes, intracellulaires ou extracellulaires, sont recherchées sur les frottis, souvent après une recherche longue et orientée.

2.2.2. Culture

Le prélèvement peut être ensemencé sur un milieu gélose au sang : milieu NNN (NovyMcNeal-Nicolle) ou sur le milieu sérum de lapin à une température entre 24 °C et 28 °C (**Annexe I**).

La culture est lente et peut nécessiter trois repiquages à une semaine d'intervalle avant de conclure la négativité. Le parasite est, en culture, sous forme promastigote flagellée et mobile. La culture est utile pour :

- Le diagnostic par la mise en évidence de la forme promastigote après 7 à 30 jours de culture.
- Conservation des souches dans une cryobanque.
- L'identification d'espèces grâce aux des techniques biochimique et de biologie moléculaire.

3. Méthode

3.1. Recueil des données

Une fiche d'exploitation ou de renseignement Leishmaniose (fournie par Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'institut Pasteur d'Algérie) indiquant les informations du malade (âge, sexe, région, type d'habitation adresse (quartier)) a été remplie pour chaque patient. Cette fiche nous a permis de collecter les différentes données épidémiologiques, cliniques, para cliniques, thérapeutiques et évolutives de la maladie dans la zone d'étude.

3.2. Prélèvement

Le prélèvement des échantillons a été effectué au niveau de la bordure inflammatoire après décapage de la lésion en évitant les zones ulcérées ou surinfectées.

Partie expérimentale

Avant de commencer, on doit tout d'abord désinfecter le site de prélèvement à l'aide d'une compresse imbibée par un désinfectant « l'eau oxygénée ». Le prélèvement a été effectué pour chaque lésion à part pour le même patient tout en changeant le matériel utilisé à chaque fois. De ce fait, et à l'aide d'une pince, la croûte a été soulevée et éponger à l'aide d'une compresse stérile en cas de saignement. Puis, les bords ont été grattés (internes et au fond) avec un vaccinostyle (**Figure 15**).



Figure 15 : Processus de prélèvement d'échantillon par grattage de la lésion à l'aide d'une lame bistouri (Cds).

Les prélèvements doivent être nombreux pour augmenter les chances de mise en évidence des leishmanies.

Avant l'ensemencement, on réalise un deuxième prélèvement et ça par des mouvements de va et vient après l'ajoute sur la lésion un faible volume de l'eau physiologique puis on aspire dans la seringue les fragments tissulaires. Le contenu de la seringue est vidé et ensemencé en culture sur gélose au sang : milieu NNN (NovyMcNeal-Nicolle) ou sur sérum de lapin à une température de 25°C pendant 7 à 30 jours de culture.

Les milieux de culture présentent dans leur composition des antibiotiques qui freinent la prolifération microbienne au détriment du parasite.

3.3. Préparation des frottis

a) Etalement

Plusieurs lames ont été préparées et numérotées à l'aide d'un graveur avant de réaliser le prélèvement. En moyenne trois lames par patients sont réalisées.

Partie expérimentale

Les prélèvements pris des patients ont été utilisés afin de préparer des frottis les plus minces possibles. Pour cela, les prélèvements ont été bien écrasés par apposition sur 2 à 4 lames dégraissées.

b) Séchage

Le séchage des frottis a été effectué tout en posant les lames verticalement sur un portoir à l'air libre.

c) Fixation

Les frottis, après séchage, ont été fixés à l'alcool méthylique (méthanol absolu) pendant 2 à 5 minutes.

d) Coloration

Après séchage et fixation, les préparations de frottis ont été colorées pendant 20 minutes avec une solution de Giemsa diluée à 10 % dans une solution physiologique tamponnée à pH 6,8. En cas de manque, l'eau distillée à pH 6,8 peut être utilisée pendant 15 à 20 minutes.

Le pH du colorant est un facteur important pour obtenir des frottis bien colorés.

Le Giemsa dilué est utilisable pendant environ 8 heures, par conséquent, la dilution doit être préparée de façon extemporanée

e) Rinçage

Les frottis colorés ont été lavés à l'eau distillée ou l'eau du robinet (débit faible) pour enlever l'excès du colorant mais il faut prendre en considération de ne pas trop rincer les frottis minces puisque le colorant risque d'être éliminé.

f) Séchage

Après rinçage, les lames de frottis ont été séchées en les posant toujours verticalement sur un portoir à l'air libre pendant 15 minutes. Au cours du séchage, les lames sont mises à l'abri de la poussière et de tout autre débris qui pourrait tomber dessus et entraîner par la suite des problèmes lors du diagnostic.

Partie expérimentale

3.4. Visualisation des parasites

a) L'observation microscopique

Les lames colorées et séchées ont été observées à l'aide d'un microscope optique à l'objectif 100 tout en utilisant de l'huile à immersion (**Figure 16**). La lecture des frottis a été effectuée par balayage de toute la lame en zigzag horizontalement ou verticalement.

Il s'agit d'une étape cruciale du diagnostic. La sensibilité de l'examen microscopique dépend de la compétence du microscopiste et du temps de lecture d'une lame.



Figure 16 : Lecture des frottis par microscope optique (Cds).

b) Mise en évidence du parasite

Les leishmanies ou corps de leishmanie se trouvent soit groupés à l'intérieur des macrophages (**Figure 17A**) ou en apparence libre (**Figure 17B**). Ce sont des éléments ronds ou ovoïdes de 2 à 6 μm de diamètre. Le cytoplasme est bleu contenant 2 ponctuations : l'une est grosse excentrée, rouge violacée correspondant au noyau, l'autre est bacilliforme rouge vermeil correspondant au kinétoplast. Lors de la confection du frottis, les cellules macrophagiques hôtes peuvent éclater et les leishmanies se trouvent éparpillées sur le frottis.

Lorsque la lésion est assez récente, le diagnostic est facile car les leishmanies sont nombreuses dans les cellules macrophagiques. Dans les lésions anciennes, elles sont plus rares et elles deviennent extrêmement rares dans les lésions surinfectées par les bactéries et les champignons.

Partie expérimentale

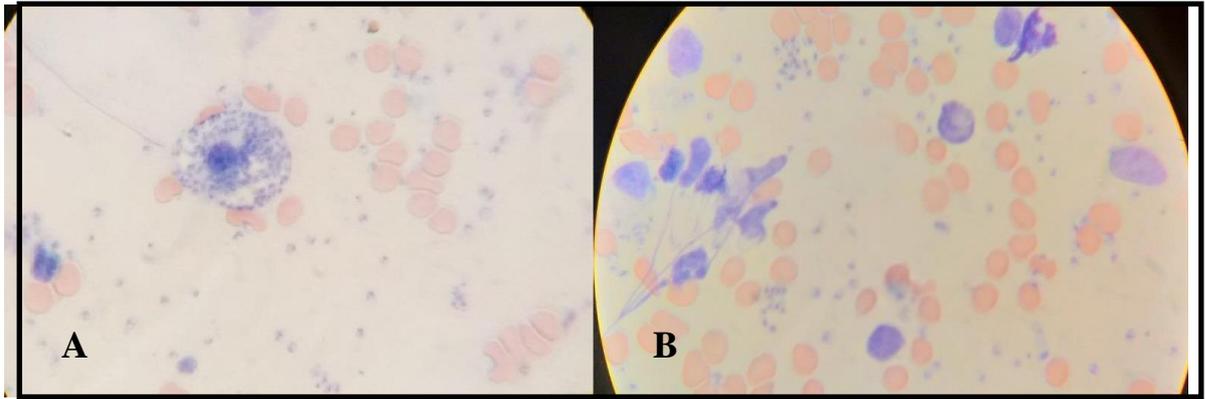


Figure 17: Les formes amastigotes de *leishmania* du patient n° 152 (A : forme intramacrophagique ; B : forme libre) (Cds).

c) Conservation des lames

Les lames ont été mises à l'abri de la poussière et de tout autre débris afin de les protéger contre les mouches et tous autres insectes susceptibles de les endommager.

3.5. Acheminement des lames vers le laboratoire de référence

Toutes les lames douteuses négatives et positives doivent être envoyées au laboratoire de référence d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations à l'institut Pasteur d'Algérie pour la confirmation dans un délai de 15 jours.

Les Lames destinées pour le laboratoire de référence doivent être :

- Etiquetées lisiblement au bord de la lame au moment où le prélèvement est réalisé et numérotées à l'aide du graveur sans écrire sur le frottis ;
- Dégraissées et rangées dans des boîtes étanches servant au transport avec le nom et l'adresse du Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire à l'institut Pasteur d'Algérie ;
- Accompagnées des fiches de renseignements des malades bien remplies.

Partie expérimentale

Deuxième partie expérimentale: Démarche diagnostic moléculaire pour l'identification d'espèce du parasite

1. Le diagnostic moléculaire par PCR

La deuxième partie expérimentale de notre étude a été réalisée au sein du Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

1.1. Présentation du laboratoire

Le laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie est un laboratoire dédié à la caractérisation et le contrôle des maladies à transmission vectorielle. Il assure les activités de diagnostic, de formation et de recherche.

Il se compose de 04 unités :

- Unité de biochimie de typage enzymatique (centre national de référence)
- Unité de biologie moléculaire
- Unité de sérologie
- Unité d'entomologie

Le laboratoire assure le diagnostic sérologique et moléculaire des différents types de Leishmaniose à savoir la leishmaniose cutanée, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose canine ; ainsi que la conservation des souches isolées après culture.

1.2. L'identification moléculaire de l'espèce du parasite des frottis

Afin d'identifier l'espèce parasitaire de certains de nos frottis, une amplification et une détection de l'ADN parasitaire par PCR ont été effectués. C'est une méthode sensible, spécifique, rapide et qui peut s'effectuer à partir de différents prélèvements (frottis et culture.....etc). Les frottis des patients prélevés au niveau du laboratoire de l'EPSP d'El Atteuf ont été utilisés pour l'identification de l'espèce parasitaire.

Partie expérimentale

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre étude pour l'identification de l'espèce parasitaire est composé de :

2.1.1. Souches

Toutes les souches de Leishmaniose cutané utilisées proviennent des frottis prélevés au laboratoire de l'EPSP El-Atteuf.

Les souches de *Leishmania infantum*, *Leishmania major* et *Leishmania tropica* utilisées comme référence ont été isolées au cours du diagnostic de la leishmaniose à partir de prélèvements humains, de rongeurs et de phlébotomes par le personnel médical du centre national de référence de la leishmaniose de l'Institut Pasteur d'Algérie. Elles ont été conservées dans la Cryo-banque du laboratoire d'Eco Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie dans de l'azote liquide.

2.1.2. Culture

Les cultures utilisées comme matériel biologique pour l'identification parasitaire dans notre étude sont toujours issues du Laboratoire d'EL-Atteuf de l'EPSP Ghardaïa. Pendant la durée de l'expérimentation (01 semaine), les cultures arrivées de Ghardaïa sont toujours négatives pas de forme promastigote ce qui nécessite un deuxième repiquage.

2.2. Matériel non biologique :

Les appareillages et les tampons utilisés pour l'identification moléculaire de l'espèce parasitaire des frottis au niveau du Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur sont donnés en (**Annexe III**).

3. Méthodes

3.1. Sélection des lames

La sélection des lames a été effectuée à partir des frottis des cas prouvés officiellement positifs de leishmanioses cutanées sur la période d'Octobre 2018 au Février 2020 du laboratoire d'EL-Atteuf de l'EPSP Ghardaïa (**Figure 18**).

Partie expérimentale

La sélection a été effectuée sur la base de :

- ✓ Régions fortement endémiques ; El atteuf, Bonoura, Ghardaïa centre-ville
- ✓ La charge de positivité et la qualité de frottis

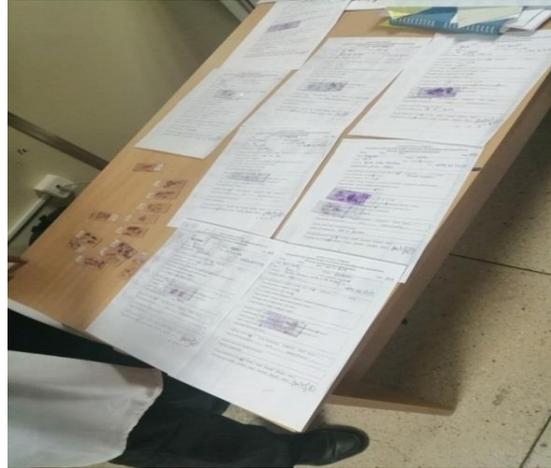


Figure 18: La sélection des lames à partir es frottis de leishmaniose positifs (Cds).

3.2. Repiquage des cultures promastigotes *in vitro*

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement et à l'enrichissement des souches arrivées de Ghardaïa sont : le milieu semi solide NNN (Novy Nicolle Mc Neal) et le sérum de Lapin (SLP) préparés au niveau du laboratoire d'Eco-Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie (**Figure 19**).



Figure 19 : Les milieux de culture utilisés pour la culture de *leishmania* (Cds).

Partie expérimentale

Le repiquage se fait à l'aide d'une pipette Pasteur tout en, prélevant quelques gouttes de l'ancien tube et les couler dans un milieu neuf (**Figure 20**).



Figure 20 : Ensemencement (Cds).

La lecture a eu lieu le 7^{ème} jour. La phase liquide est prélevée stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur pour la recherche des formes promastigotes mobiles au microscope, entre lame et lamelle au ($G \times 100$; $\times 400$) (**Figure 21**), la vitalité et l'absence de contamination sont ainsi contrôlées pour chaque milieu ensemencé.

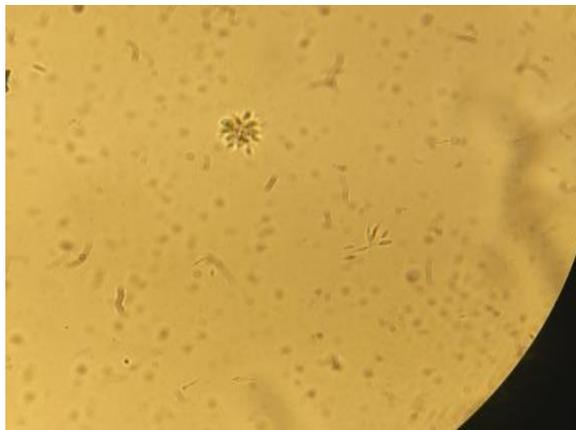


Figure 21 : Forme promastigote observer Gr $\times 40$ (Cds).

Partie expérimentale

4. Caractérisation moléculaire des souches étudiées par PCR et RFLP

Afin de réaliser l'identification moléculaire des frottis sélectionnés positifs lors du diagnostic de certitude, une extraction d'ADN a été effectuée en premier suivie par une amplification puis analyse par PCR et enfin une RFLP après digestion des amplifiats.

4.1. Extraction

Après la sélection des dix lames fortement positives, l'ADN des souches étudiées et des souches de référence a été extrait en respectant les conditions du protocole. L'extraction d'ADN s'est déroulée en plusieurs étapes :

1) Grattage des lames

Les dix lames sélectionnées ont été grattées à l'aide d'une lame bistouri (**Figure 22**), la suite matière grattée a été récupérée puis déposée dans un tube Eppendorf avec la numérotation de ces derniers selon le numéro de la lame (patient) correspondant.

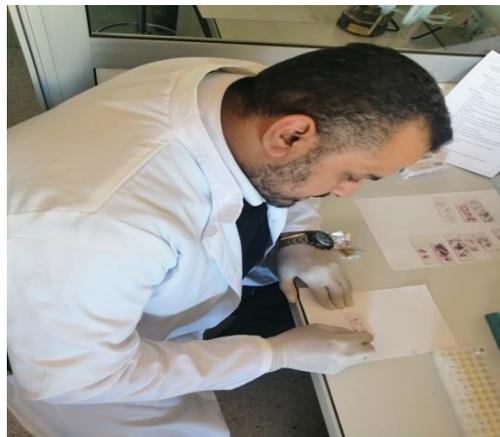


Figure 22 : Grattages des lames (Cds).

2) la lyse cellulaire

La procédure de lyse idéale doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériel de départ, mais également suffisamment douce pour préserver de l'ADN parasitaire. Pour cela, dix microlitres de SDS 0,5% (Sodium Dodécyl Sulfate) ont été ajoutées dans les tubes Eppendorf contenant la matière grattée afin de désagréger les membranes cellulaires et de libérer les contenus cytoplasmiques et nucléaires. Après, vingt microlitres de PK (Protéine

Partie expérimentale

Kinase) ont été ajoutées pour libérer l'ADN nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans les chromosomes eucaryotes). Finalement, les tubes Eppendorfs ont été incubés dans l'étuve à 55°C durant toute la nuit.

3) Déprotéinisation

Cinq cents microlitres de la solution phénol:chloroforme:alcool iso amylique (25:24:1, v/v) ont été ajoutés dans les tubes Eppendorfs contenant du culot parasite et les incubés pour dénaturer les protéines car non miscible à l'eau et de densité supérieure à cette dernière. Puis, les deux phases ont été mélangées délicatement pendant 2-3 min et laissées agir pendant 5 min sur la paillasse. Ensuite, les solutions issus dans les eppendorfs ont été centrifugées pendant 10 min à vitesse maximum et la phase aqueuse supérieure a été récupérée délicatement puisque les acides nucléiques n'y sont pas non plus solubles et restent dans le surnageant aqueux.

Ces étapes ont été répétées jusqu'à la disparition de l'interface protéique. L'élimination des protéines non digérées et des lipides se réalise par des précipitations et des extractions sélectives (**Figure 23**).

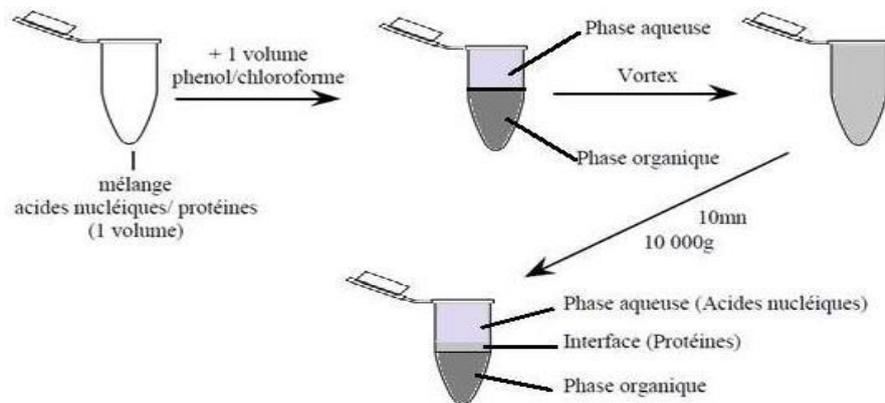


Figure 23 : Schéma de l'étape de déprotéinisation lors de l'extraction de l'ADN.

Partie expérimentale

4) Précipitation

La phase aqueuse a été récupérée en prenant soin de quantifier le volume récupéré puis ajouté un 1/10 de volume de l'acétate de sodium 3M et 2 volumes de l'éthanol absolu froids stocker à -20 C. Ensuite, l'ADN est précipité en mélangeant délicatement les deux phases dans le cas où la méduse n'apparaît pas. Par la suite, les tubes Eppendorfs ont été conservés au moins 1h jusqu'à 3h au congélateur (20°C) et centrifugés à froid à 4°C et à vitesse maximale 1200tr/min durant 30 min. Il faut faire attention à ne pas casser le culot qui peut être invisible.

Après centrifugation, le surnageant a été jeté délicatement et la solution contenant de l'ADN (le culot) a été rincée avec 500 µl de l'éthanol 70%. Ce dernier processus de centrifugation a été répété pour une deuxième fois. Finalement, les tubes Eppendorfs ont été séchés sur la paillasse à l'aire à température ambiante ou à l'étuve de manière que les tubes têtes en bas durant toute la nuit.

5) Elution de l'ADN

Le culot contenant de l'ADN récupéré de l'étape de précipitation a été solubilisé avec 50 µl de TE (Tris-EDTA pH 8) puis la suspension de l'ADN élu a été incubée à 37°C pendant 1h jusqu'à toute la nuit.

4.2. Contrôle de la pureté de l'ADN extrait

Le maximum d'absorption des acides nucléiques se situe à 260 nm alors que les protéines, principaux contaminant des préparations, absorbent aussi à 260 nm mais leur maximum d'absorption se situe vers 280 nm à cause des acides aminés aromatiques (absorbance 230nm).

Avant utilisation de l'ADN extrait de nos frottis positifs pour l'identification moléculaire de l'espèce par PCR, une étape de dosage de sa pureté est nécessaire. Pour cela, le rapport $R = A_{260nm} / A_{280nm}$ constitue alors un bon moyen pour apprécier une éventuelle contamination de la préparation d'ADN par les protéines ou par les ARN. A cet effet, et à l'aide d'un Nano drop, la densité optique (DO) des différentes solutions d'ADN élués de nos échantillons a été mesurée à 260nm et 280nm et 230nm.

Un rapport $1,8 < R < 2$ indique que l'ADN est pure alors que le $R < 1,7$ ou $R > 2$ indique que l'ADN est contaminé par les protéines ou par les ARN respectivement.

Partie expérimentale

Le tableau de control de pureté d'ADN extrait des frottis sélectionnés est présenté dans (Annexe IV).

4.3. Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) ITS1

La réaction d'amplification de l'ADN par PCR a été effectuée au moyen des amorces ITS1 (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') La PCR a été appliquée aux ADN purifiés extraits des 10 lames sélectionnées ciblant le gène ITS1 (ribosomal internal transcribed spacer1 ; le gène codant pour la petite sous unité ribosomal ARNr du gène leishmania), qui a été amplifié en utilisant les amorces LITSR et L5.8S pour générer des produits de PCR entre 300 et 350 pb.

La réaction a été réalisée dans un mélange réactionnel de volume 50 µl contenant 5 µl d'ADN purifié des échantillons, un tampon contenant du MgCl₂ (3µl), un mix des dNTP (2,5µl), LITSR anti sens et L5.8S (1 µl), 0,4 µl de Taq DNA polymérase (Invitrogen), 22,1µL de H₂O, 10µl de solution Q et 5 µl de Tampon.

Une fois la préparation et la distribution du mix PCR est terminée, les micros tubes ont été placé dans un thermocycleur (Gene Amp PCR, System 2400, Perkin Elmer) programmé selon le gène cible .La réaction de polymérisation en chaine est cyclique, elle se déroule en 3 étapes, selon les conditions de PCR décrites par **Schonian *et al.* (2003)** avec une dénaturation initiale de 3 min à 94°C suivie de 30 cycles comportant une étape de dénaturation pendant 1 min à 94°C, une étape d'hybridation des amorces pendant 1 min à 64°C et une étape d'élongation de 2 min à 72°C. Une étape d'élongation finale pendant 5 min à 72°.

A la fin de l'amplification, les échantillons ont été conservés dans une température de +4°C jusqu'à l'étape de révélation de l'ADN.

4.4. Électrophorèse

Les produits de l'amplification issus de la PCR (10µl), sont alors visualisés sur gel d'agarose à 1,5%, coloré par le bromure d'éthidium et comparés à un témoin positif, un témoin négatif (H₂O) et des marqueurs de poids moléculaire PM connu afin de vérifier la présence ou l'absence du gène ITS1.

Partie expérimentale

Pour la préparation du gel d'agarose de qualité biologie moléculaire, 1,5g d'agar a été dissout dans 100 ml de tampon TAE 1X (20 ml de TAE 10X + 980 ml d'eau distillée) puis laissé reposer pendant 10 min (éviter de l'homogénéiser). Par la suite, la solution d'agarose a été chauffée dans une microonde jusqu'à l'ébullition.

La cuve a été préparée avec un support de façon hermétique et tout en plaçant les peignes selon le nombre des échantillons (16 échantillons) 8/8.

Après un léger refroidissement de la solution d'agarose, 7 μ l de bromure d'éthidium (BET) a été ajouté pour éviter l'évaporation. Le gel a été coulé en évitant les débris et les bulles d'air et en attend la gélification. Ensuite, les peignes ont été enlevés en dernier lieu et le gel a été placé selon le sens de migration du pôle négative vers le positive puis nos échantillons ont été déposés et laisser migrer à 100 v pendant 30min (**Figure 24**).



Figure 24: Cuve d'électrophorèse contenant nos échantillons (Cds).

Après une durée suffisante de migration de nos échantillons, le gel d'agarose 1,5% coloré au BET a été visualisé sur une table contenant une lampe UV.

4.5. La PCR RFLP

Pour effectuer l'analyse PCR-RFLP, les échantillons confirmés positifs après l'électrophorèse (106, *majeur*, *tropica*, *infantum*) ont été digérés par l'enzyme de restriction « HAE III » dans un volume réactionnel de 15 μ l. de mix préparé contenant 3 μ l tampon, (1 μ l) de HAE III, BSA (3 μ l), multi-cor et 7,7 μ l de H₂O et 5 μ l d'ADN des échantillons amplifier.

Partie expérimentale

Le tampon de l'enzyme a été utilisé à une concentration finale de 1X et la réaction de digestion s'est déroulée pendant une nuit à 37°C.

Les produits de la digestion ont été ensuite séparés sur un gel d'agarose de 3 % dans du tampon TAE 1X en présence de 7µl de BET. La migration des échantillons s'est déroulée à 40 v pendant 1h30min et la taille des fragments a été estimée par comparaison avec des bandes de taille d'ADN de 50 à 100 pb Les distances de migration sont spécifiques des espèces de *leishmania*.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Démarche de certitude

1.1. Données épidémiologiques

Durant toute la période de l'étude 89 patients ont été reçus des différentes communes de la zone d'étude. Ces patients sont tous originaires de la Wilaya de Ghardaïa.

1.1.1. Répartition des cas de leishmaniose par classes d'Age et par sexe :

La maladie frappe sans distinction les deux sexes (**Figure25**) avec cependant une prédominance est notée en faveur du sexe masculin. Le sexe ratio est de 1,66 (30 hommes/18 femmes).

Toutes les tranches d'âges sont atteintes y compris celle supérieur à 60 ans. Les tranches d'âge jeunes enfant (5-14) et adulte jeune (20-29) (population active) sont les plus touchées. L'âge moyen des patients est de 26 ans (médiane : 20).

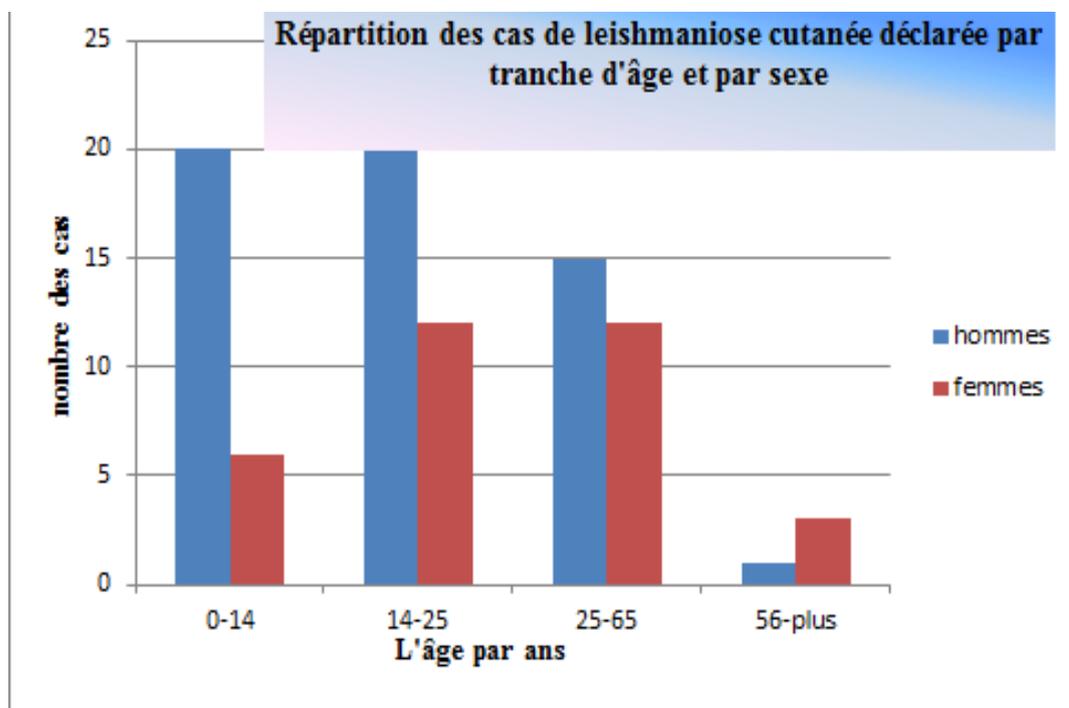


Figure 25 : Répartition des cas de leishmaniose par classes d'âge et par sexe.

Résultats et discussion

1.1.2. Répartition des cas de leishmaniose cutanée par région et type d'habitation

Les régions d'El atteuf, Ghardaïa centre (entourage du ksar) et Bonoura représentent les trois foyers les plus importants de notre étude comportent un nombre de patients variant de 08 à 14. Les autres régions comportent un nombre de patients variant de 2 à 6 (**Tableau 1**). Par ailleurs, comme le nombre de malades suspects de leishmaniose cutanée varie d'une région à une autre, le rapport nombre de positifs / nombre de malades suspects varie de 3,37% à 25,87% selon les régions

Tableau 1: Répartition géographique des cas suspectés de leishmaniose cutanée confirmés par examen direct microscope (Le codage couleur représente la fréquence des cas provenant de chaque quartier (0-2 cas : jaune / 3-6 cas : orange / 7-14 cas : rouge)).

Régions		Nombre de patients révélés positifs		Nombre de patients suspects recensés	Pourcentage (%)
El Atteuf		11	14	35	15,73%
Noumraat		3			
Bonoura		8	8	14	8,9%
Ghardaïa	Bensmara	3	23	36	25,87%
	Mermed	6			
	Hadj Messaoud	2			
	Ghardaïa Centre (entourage de ksar)	12			
Daya Bendahoua		3	3	4	3,37%
Total		48		89	53,93%

Résultats et discussion

La répartition des cas de leishmaniose cutané dans notre zone d'étude selon le type d'habitation sont présentés dans la **Figure 26**.

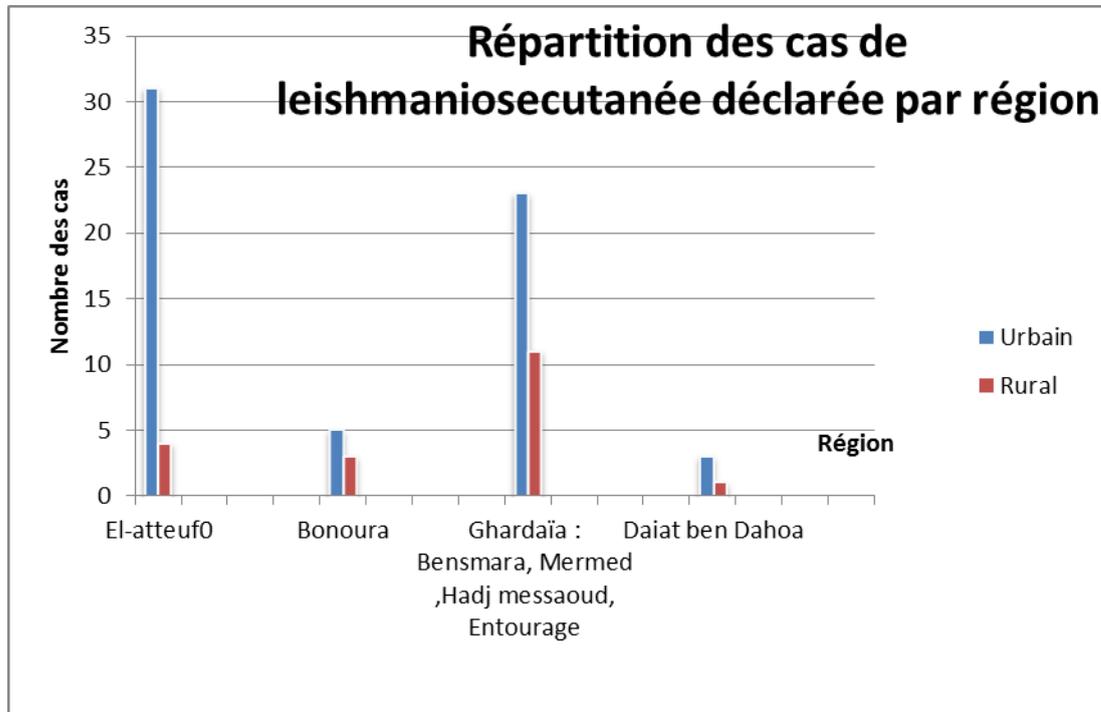


Figure 26: Répartition des cas de leishmaniose cutanée par types d'habitation.

De la lecture des résultats de de la **Figure 26**, il apparait que la leishmaniose a une répartition inégale entre les régions.

La maladie est à forte prévalence dans des communes plus que dans d'autres. Par ailleurs, les communes ayant des grandes agglomérations urbaines, comme El Atteuf, Ghardaïa centre (entourage du ksar) et Bonoura sont les plus affectées par la leishmaniose avec une prédominance des cas des zones urbaines que rurales pour les quatre communes de notre zone d'étude. Ces chiffres révèlent une urbanisation de la leishmaniose qui se déclare le plus souvent chez la population qui vit dans un milieu naturel urbanisé situant dans les palmeraies et les zones qui bordent l'oued du M'azab (beaucoup de personnes pratiquent l'agriculture ont une maison secondaire dans les palmeraies avoisinantes).

Cliniquement les lésions siégeaient, le plus souvent, sur les parties découvertes : le visage (6 patients ; 6,74 %), les membres inférieures (65 patients ; 73,03 %) et les membres supérieurs (27 patients ; 30,33 %).

Résultats et discussion



Figure 27: Lésions : (A : Ulcéro-croûteuses ; B : surinfecté) (Cds).

Les lésions étaient parfois multiples et présentaient différents aspects : ulcéro-croûteuses (**Figure 27A**), sèches, nodulo-croûteuses et parfois des lésions surinfecté (**Figure 27B**). Elles variaient entre 1 et 5 cm de diamètre.

1.2. Examen parasitologique

Un examen parasitologique des lésions cutanées a été réalisé pour les 89 patients suspects de leishmaniose cutanée dont certains présentaient plusieurs lésions.

L'examen microscopique a permis de mettre en évidence des formes amastigotes dans 48/89 échantillons (53,93%) soient 48 malades positifs sur 89. Les prélèvements ayant donné un résultat négatif étant au nombre de 41 (46,06%), soit un nombre de patients de 41/89 (**Tableau 1**).

Parmi les patients, 20% seulement des lames prélevées positifs (10) ont pu être suivis pour l'étude de l'identification moléculaire par PCR et RFLP.

Les résultats montrent aussi que 78, 65% des examens direct positifs ont été isolées à partir des patients originaires des habitations urbaines que des régions rurales 21,34%.

Résultats et discussion

2. Diagnostic moléculaire pour l'identification de l'espèce parasite

2.1. Contrôle de la qualité de l'ADN parasitaire extrait

Comme il est difficile de s'assurer de la pureté de l'ADN, il est primordial d'évaluer l'intégrité et le rendement des extractions de l'ADN à partir des lames sélectionnées par la mesure de la DO par Le Nanodrop.

Les résultats du dosage des échantillons après grattage et extraction d'ADN parasitaire et leurs rapports (R), (C) sont regroupés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Valeurs des DO des ADN extraits des différents frottis de patients.

Numéro de patient	260/280	260/230	(C)
N: 106	0,62	0,83	0,52
N: 109	0,02	0,61	0,20
N: 117	-1,19	1,10	0,438
N: 118	1,17	1,43	0,388
N: 123	1,42	1,46	0,528
N: 124	-1,14	2,89	0,566
N: 137	-0,63	-9,66	0,347
N: 145	-2,62	3,50	0,682
N: 149	0,57	1,27	0,328
N: 152	0,64	1,66	0,520

Selon les valeurs des résultats d'analyse spectrophométrique pour R=260/280, l'ADN extrait à partir des lames de patients sélectionnées présente des hauts niveaux de contaminants protéiques.

L'analyse du rapport 260/230 des échantillons indique la présence de contaminants phénoliques dans l'ADN des patients.

Résultats et discussion

Donc l'ADN obtenue par la technique du phénol-chloroforme (utilisée pour l'extraction de l'ADN des lames des patients) est de mauvaise qualité puisqu'il donne des valeurs significativement faibles de pureté.

2.2. Résultats des produits PCR

La série de PCR- ITS1 ciblant l'ADN parasitaire de *leishmania* a été réalisée sur les cas confirmés positifs qui sont de l'ordre de 10 (11,23% des cas) : N°106, 109, 117, 118, 123, 124, 137, 145, 149, 152

L'ensemble des PCR a été validé par l'amplification des 3 souches de référence *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* et le témoin négatif (eau distillée) afin de déterminer la contamination possible des réactifs.

Les résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR-ITS1 sont présentés dans la (Figure 28). Ces résultats assurent la présence ou l'absence de l'ADN parasitaire de *leishmania* dans les échantillons après le processus d'extractions d'ADN.

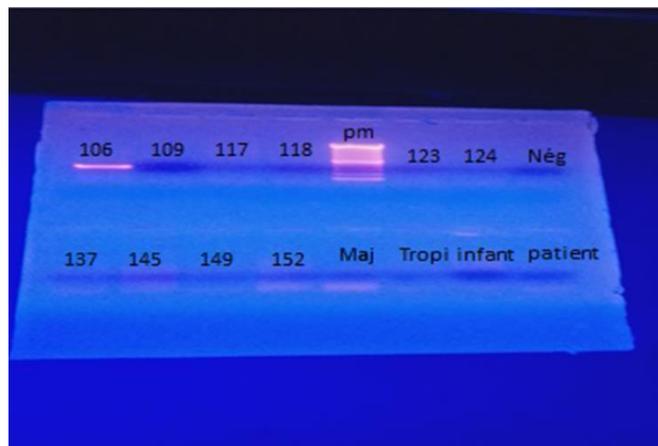


Figure 28 : Profils de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR-ITS1. (les échantillons des patients; 106,109,117,118,123,124,137,145,149,152,x ; Nég : Témoin négatif ; Maj, Tropi, infant : Témoin positifs).

La Figure 28 explique la sensibilité de la PCR-ITS1 dans la détection de l'ADN de *leishmania* dans les échantillons à analyser, si la bande attendue est absente, ou si des bandes supplémentaires sont présentes (possibilité de contamination).

Résultats et discussion

Lorsque on obtient une bande cela signifie que la réaction était positive et que l'amplification s'est bien effectuée, par contre si il y a absence de la bande cela signifie qu'il n'y a pas de l'ADN amplifié (les deux amorces n'étaient pas capable de s'hybrider à l'ADN cible).

Parfois on obtient des produits d'amplification de mauvaise taille, cela signifie que l'hybridation par les deux amorces a eu lieu mais pas sur le site cible de la molécule d'ADN souhaitée.

Les résultats de l'électrophorèse des produits obtenus de l'amplification de l'ADN extraits des 10 lames de frottis de patients sélectionnées des cas positifs au niveau du laboratoire EPSP El Atteuf indiquent que seul le patient 106 qui a révélé la présence du gène ITS1 de *Leishmania* alors que les 9 autres échantillons n'ont pas révélés. Cela ne veut pas dire que ces derniers ne sont pas de *Leishmania* mais peut être dû à la mauvaise extraction ou amplification de l'ADN.

Tableau 3: Résultats de l'électrophorèse des produits obtenus de l'amplification de l'ADN extraits des 10 lames sélectionnées de frottis positifs.

PCR-ITS1	positifs	Négatifs	Total
laboratoire EPSP d'El Atteuf Ghardaïa	1	9	10

En effet, sur un total de 48 examens directs positifs, 10 ADN ont été extrait à partir des lames provenant du grattage cutané des patients. Les patients ayant eu une PCR positive et un examen direct positif représentent un taux de 2 %. Comparativement, à ceux qui étaient positifs à l'examen direct et négatifs au diagnostic moléculaire par PCR-ITS1 sont au nombre de 09/48 soit un taux de (18,75 %).

2.3. Résultats de la digestion enzymatique PCR- RFLP

Les fragments de restriction résultants de la PCR- RFLP après digestion enzymatique par *HaiIII*, ont été séparés sur gel d'agarose 3% et les résultats sont présentés dans la **Figure 29**.

Résultats et discussion

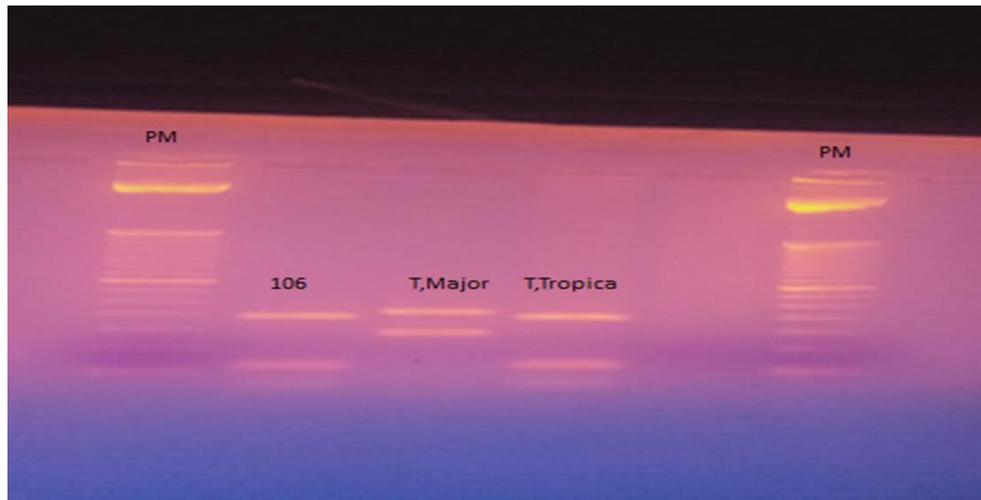


Figure 29: amplicons de la digestion enzymatique par l'enzyme *HaeIII*
(106 : échantillon du patient, T, *Major* et T, *tropica* : Souches de référence ; PM : marqueur de taille).

La visualisation du gel d'électrophorèse des amplifiats de la digestion enzymatique par *HaeIII* sur un trans-illuminateur UV a permis de voir la taille des bandes avant leur dégradation par UV., Selon le profil, le type parasitaire du patient 106 de la commune El Atteuf de notre zone d'étude Ghardaïa s'agit d'une *Leishmania tropica*.



Figure 30: Foyer de l'espèce identifiée dans la commune d'El Atteuf de la zone d'étude Ghardaïa (5).

Les patients 106 dans l'espèce *Leishmania tropica* ont été isolés est originaire des régions urbaines.

Résultats et discussion

Discussion

Compte-tenu de la réémergence de cette maladie dans le monde et précisément en Algérie, de la variabilité géographique de l'épidémiologie et de l'augmentation des voyageurs, il était important de réaliser une étude sur le diagnostic des Leishmanioses dans la région de Ghardaïa.

Cette étude nous a permis de mieux cerner l'ampleur que prenait cette maladie au sein de ce foyer, très touché par cette zoonose. Dans les zones endémiques où plus d'une espèce de *Leishmania* est présente, des outils de diagnostic sont nécessaires pour détecter les parasites directement dans les échantillons et distinguer toutes les espèces de *Leishmania* (Schonian *et al.*, 2003).

La répartition des cas par tranches d'âge, montre que les jeunes adultes et les enfants totalisent plus de 60 % des cas. Cette affection est prédominante chez les jeunes, car leur statut immunitaire est vulnérable. Cette tendance de la leishmaniose de toucher la frange juvénile est le propre des foyers anciens dont l'incidence suit le taux de natalité (Belazzoug, 1983).

La répartition de la leishmaniose par sexe montre que les deux sexes sont touchés par la leishmaniose. Si l'on se réfère aux USA et coutumes de notre société, qui font que les femmes sortent que rarement de leur maisons; le sexe ratio important des cas de leishmaniose cutanée noté reflète les conditions de transmission qui surviennent aussi bien intramuros qu'extramuros. Le vecteur de leishmaniose cutanée peut se multiplier à l'intérieur de la maison et boucle son cycle de développement sans qu'il ne soit obligé de sortir.

Les résultats obtenus de l'étude épidémiologique montrent aussi que la Leishmaniose est une maladie urbaine que rurale. Ce résultat indique, si on se réfère au nombre de cas enregistrés dans ces commune, que les facteurs de risque de transmission de la leishmaniose sont fortement présents dans ces espaces. En effet, plusieurs auteurs se concordent à dire que la leishmaniose est transmise à partir de petit « foyer d'infection », qui sont considérés comme un espace géographique où se trouvent réunis les facteurs biotiques et abiotiques nécessaires au fonctionnement du complexe pathogène et qui peuvent être une niche de chien, un abri pour animaux ou un terrier de rongeur. Donc tous lieux offrant une humidité et une litière de matière organique pourrait constituer un micro foyer de transmission et que le vecteur de transmission s'adapte aux nouvelles niches créées par l'Homme (Teodoro et Kuhl, 1997; Ximenes *et al.*, 2000).

Résultats et discussion

La tendance à l'urbanisation intéresse tous les pays et tous les continents (4), concomitamment à cela s'accroissent les maladies à transmission vectorielles dont la leishmaniose (O.M.S, 2004). En effet, la croissance non planifiée des villes, avec un manque de la maîtrise de la qualité de l'environnement devient un enjeu majeur de santé publique. La présence d'une hygiène défectueuse dans nombre d'espaces urbains offre des conditions biologiques favorables au développement de germes pathogènes responsables de nombreuses maladies.

Bien que l'examen direct après coloration soit l'examen le plus adapté pour le diagnostic de la leishmaniose en zone d'endémie (Marty *et al.*, 2002), son taux de positivité reste à l'appréciation de certains auteurs. Selon Singh et Sivakumar (2003), la positivité de la microscopie, n'est que de l'ordre de 20% alors qu'elle avoisine les 68% pour Marques *et al* (2006) et les 78% pour Wortmann *et al.* (2005).

Les résultats obtenus dans notre étude sont en corrélation avec ceux avancés par les auteurs. En effet, le taux de positivité dans notre étude est de 53.33% pour l'examen direct et de l'ordre de 2% pour l'examen de PCR. Ce faible taux de positivité pourrait être en relation avec le fait que les prélèvements des patients soient peu parasitaires. Par conséquent, le nombre de leishmanies peut différer d'un échantillon à l'autre.

En revanche, ce dernier comporte aussi un certain nombre d'inconvénients, notamment, lorsque les lésions sont surinfectées (Primez *et al.*, 1999). Il serait donc, intéressant, voire indispensable, de compléter cet examen par un diagnostic moléculaire.

Par ailleurs, d'autres chercheurs soutiennent l'idée que l'examen parasitologique seul n'est pas toujours concluant chez les patients présentant un diagnostic clinique de leishmaniose cutanée (Faber *et al.*, 2002). Par contre sa combinaison avec la culture, par exemple, augmenterait la sensibilité du diagnostic à plus de 85% (Murray, 2005). En raison du manque des moyens de milieu de culture dans les laboratoires d'EPSP Ghardaïa dès le début de notre étude, les cultures n'ont pas pu être réalisées et donc ce qui a probablement aussi participé au taux de positivité et à la sensibilité du diagnostic par l'examen direct de nos échantillons.

Résultats et discussion

L'examen moléculaire par PCR est utilisé en raison de ses performances techniques et de la possibilité d'adapter cette méthode à différents types de prélèvements, au diagnostic de l'espèce et à la recherche des polymorphismes nucléotidiques (Nicolas *et al.*, 2002). De ce fait, l'examen moléculaire dans notre étude, en l'occurrence, l'identification des espèces de *Leishmania* par PCR-ITS1 ; a montré que la souche identifiée à partir de nos prélèvements cutanés, particulièrement du patient 106, appartient à l'espèce *Leishmaniatropica*.

L'identification de l'espèce *L. tropica* à partir de nos prélèvements est un résultat auquel nous nous attendions vu que cette anthroponose a été aussi trouvée à Constantine par (Mihoubi *et al.*, 2008), et surtout du fait de l'isolement antérieur de souche identifiée comme *L. tropica* à Ghardaia et la découverte de son vecteur *Phlebotomus sergenti* et en Tunisie par (Gradoni *et al.*, 1984) et au Maroc depuis plus d'une décennie. Donc, les résultats obtenus dans cette étude montrent bien l'efficacité du diagnostic moléculaire dans la mise en évidence de l'ADN de *Leishmania* dans les différents prélèvements. Les deux méthodes se complètent, mais il en ressort que la PCR est la technique qui offre le plus d'avantages.

L'examen parasitologique est, en effet, un diagnostic indispensable mais sa fiabilité demeure en deçà de celle du diagnostic moléculaire. Il serait, donc, intéressant de le compléter par une PCR. Cette dernière a été largement appliquée pour la détection des agents infectieux tels que les virus, les bactéries et les protozoaires dans des échantillons cliniques. Par cette méthode, il est possible d'identifier les différentes espèces de *Leishmania*. Ce qui nous a permis d'atteindre l'objectif majeur de notre étude.

Conclusion

L'Algérie qui compte parmi les pays les plus touchés par la leishmaniose, certaines régions présentent des taux parmi les plus élevés au monde.

Les résultats obtenus de l'étude épidémiologique montrent la leishmaniose cutanée dans notre région d'étude touche un plus les hommes que les femmes (30 hommes/18 femmes) dont l'âge moyen est de 26 ans. Cliniquement, les lésions siégeaient, le plus souvent, sur les parties découvertes principalement les membres inférieures (73,03%) et les membres supérieurs (30,33%) avec des lésions variant entre 1 et 5 cm de diamètre. Les régions d'El Atteuf, Ghardaïa centre (entourage du ksar) et Bonoura représentent les trois foyers les plus importants de notre étude.

Par ailleurs, le fait que *L. tropica* s'est identifiée dans nos échantillons en milieu urbain à la région d'El Atteuf, cela suppose une éventuelle modification de l'épidémiologie liée à ce parasite. D'où l'intérêt de rechercher ses agents pathogènes aussi bien chez les vecteurs que chez les autres réservoirs potentiels, à savoir le chien et d'autres rongeurs.

L'examen direct représente un remarquable outil pour le diagnostic, mais il reste lié à certaines contraintes (lésion surinfectée, compétence du biologiste manipulateur, etc...). En effet, sa fiabilité est relative selon les différents auteurs. Dans notre cas, cette fiabilité varie autour de 53% pour la leishmaniose cutanée. Cette différence pourrait être attribuée au fait qu'il n'est pas toujours été réalisé par le même manipulateur, d'où l'utilité d'un éventuel diagnostic complémentaire.

La PCR est une technique de diagnostic et d'identification très performante de la leishmaniose en zone d'endémie. Elle a permis d'identifier des espèces de *Leishmania* dont certaines ont déjà été mises en évidence en Algérie (*L. major* et *L. infantum*) et d'autres qui ont été identifiées, dans notre étude, pour la première fois (*L. tropica*).

Au terme de cette étude sur le diagnostic de la leishmaniose, la PCR s'est révélée être une technique sensible, spécifique et rapide. Son application nous a été d'un grand intérêt dans le domaine de l'identification des espèces. L'inconvénient est que ce genre de test est onéreux

Malgré les efforts du ministère de la santé, la leishmaniose cutanée continue à poser un vrai problème de santé dans notre pays notamment à Ghardaïa. En effet, les différentes structures concernées par la lutte doivent multiplier et renforcer les mesures prophylactiques à travers la lutte contre les réservoirs et les vecteurs du parasite. Il est important d'attirer l'attention sur le rôle de l'urbanisation accélérée et non planifiée dans la persistance et l'extension des foyers ruraux de la leishmaniose vers les villes.

Cependant, la sensibilisation de la population au problème d'hygiène, l'éducation sanitaire et la lutte contre la pauvreté et les conditions d'insalubrité restent des actions importantes dans l'éradication de cette maladie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1- Aara N., Khandelwal K., Bumb RA., Mehta RD., Ghiya BC., Jakhar R., et al. (2013). Clinico- epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. *Am J Trop Med Hyg*; 89(1): 111-5.
- 2- ABED N, et Fatna K. (2017), *Etude in vitro de la toxicité du Glucantime sur le globule rouge*. Diss. diplôme de Master, Université Abous beker belkaid Tlemcen, Algérie.
- 3- Abed N, Khouani F. (2017). *Etude in vitro de la toxicité du Glucantime sur le globule rouge*. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master En Biologie, Tlemcen.
- 4- Agharbi. F. (2013). *La leishmaniose cutanée: aspects cliniques, thérapeutiques et évolutifs (à propos de 40 cas)*. diplôme de spécialité en médecine. Université SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH, Fès, Maroc.
- 5- Alvar J, et al (2012). *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence* *PLoS One*, 7(5): p : 35671.
- 6- ANOFEL (Association Françaises des Enseignants de parasitologie et mycologie),
- 7- Antoine J.C., Lang T., Prina E. (1999). *Biologie cellulaire de Leishmania*. In: Dedet JP, editor. *Les Leishmanioses*. Paris: Ellipses : p 41-62.
- 8- Antoine J.C., Lang T., Prina E., Courret N. & Hellio(1999). *R.H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of Leishmania-infected macrophages and internalize by amastigotes of L. amazonensis and L. mexicana*. *J Cell Sci*; 112: 2559-70.
- 9- Aubry P. 2012. *Leishmanioses, diplôme de médecine tropicale des pays l'océan indien*, P O1-08 .
- 10- Aubry P.2012. *Leishmanioses, diplôme de médecine tropicale des pays de l'océan indien*, P 01-08.
- 11- Ba Y (1999). *Phlébotomes du Sénégal : Dynamique des populations de trois régionsbiogéographiques - Rôle dans la transmission des Arbovirus*. Thèse docteur de troisième cycle de Biologie Animale ; Université Cheikh Anta Diop de Dakar Faculté des Sciences et Techniques : p154.
- 12- Bachi. F. (2008) *Amélioration des moyens diagnostiques des leishmanioses en Algérie*. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences Médicales, 2001.

Références bibliographiques

- 13- Bachi.F. (2001). Amélioration des moyens diagnostiques des leishmanioses en Algérie. Thèse de grade de docteur en science médicale.
- 14- Bachi F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La Lettre de l'Infectiologue - Tome XXI - n°01, 9-15.
- 15- Belazzoug Smail (1983).Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie) infestation naturelle de "Psammomys obesus" (rongeur ,gerbillide) .Bull Soc Pathol Exot 76:p146-149 .
- 16- Belkaid M. Belazzouq S. Hmrrioui B. (1997). Livre de Guide pratique du laboratoire de parasitologie (Tome 2), diagnostic immunologique. Page 84, 36.
- 17- Ben tayeb R. (2019). Etude épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans la province d'Errachidia entre 2012 et 2017. Thèse du grade doctorat en médecine.
- Université SIDI Benarab D, Dif S. (2015). Revue bibliographique sur les phlébotomes (Diptera :
- 18- Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M. (2004): Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le Chien. Médecine Tropicale, 64 (4): 381-383.
- 19- Benyahia. D. Mise au point de la leucocytoconcentration et son application dans le diagnostic de la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale humaine, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009.
- 20- Bouchery N. (2007) Soins des leishmanioses dans le sud du Honduras Une alternative : *Clematis dioica* . Université de Lille 2, 137.
- 21- Boughellout M, Boukrouma A (2016). Aspects clinique et génétique des leishmanioses cutanée et viscérale. Diplôme de Master. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.
- 22- Boulkenafet F (2006). Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Mémoire Soutenu en 2006 à l'Université Mentouri Constantine Algérie.
- 23- Bouree P , F. Botterel , P. Resende. (2004) Sérologies parasitaires en pratique courante
- 24- Boussaa S (2008). Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech. Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle de phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations : thèse de Doctorat en ecologie épidémiologie. Université louis pasteurs strasbourg I .217 :p 06-25.

Références bibliographiques

- 25- Bouzeriba S, Rouaiguia I. (2017). La leishmaniose cutanée dans la région de Guelma : Épidémiologie et diagnostic. Diplôme de Master, Université 8 Mai 1945, Guelma, Algérie.
- 26- Buffet. P. Leishmanioses cutanées ; revue med suisse ; 98-395-A-15.
Mohamed ben Abdullah, Errachidia, Marco. Psychodidae) et leur rôle dans la transmission de la leishmaniose. Mémoire de Master
- 27- C. Matte. L'impact du parasite *Leishmania donovani* sur les réponses à l'INF γ et la signalisation via la voie Jak.stat ; mémoire d'obtention de garde maitre ès sciences en virologie immunologie ;INRS, 2003.
- 28- Choi C.M. & Lerner E.A. (2001). Leishmaniasis as an Emerging Infection. J ID Symposium Proceeding, 8 (3): 175-182.
- 29- Christophe, F. Laurent, M. Valérie, J. Nicolas, G. (2001). L'immunité contre les leishmanies. médecine/sciences. 17, 1120-1128.
- 30- CNRL (centre national de référence des leishmanioses), 2018.
- 31- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH.(2002). Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev; 19(1):111e26.
- 32- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Canavate C, et al (2006). Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric mediterranean visceral leishmaniasis. J.C.Lin. Microbiol ; 44: p 2343-2347.
- 33- Dedet J.P. (2009). Leishmanies, Leishmanioses : biologie, clinique, thérapie ; Paris, maladies infectieuses, 8-506-A-10.
- 34- Dedet JP. (1999). Les leishmanioses tégumentaires In: Dedet JP. Les leishmanioses. Dedet. J.P. (2009).Leishmanies, Leishmanioses : biologie, clinique, thérapie ; Paris, maladies infectieuses, 8-506-A-10.
- 35- Dedet. J.P. Les leishmanioses, Ed, Ellips Paris 1999.
- 36- Desjeux P, Alvar J. (2001). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol; 97(Suppl.1):3-15.
- 37- Djeddar-Mihoubi I. (2006). Etude des leishmanioses diagnostiques au centre hospitalo-universitaire ben baddis de constantine ; thèse en vue de l'obtention du diplôme : doctorat d'état es-microbiologie.

Références bibliographiques

- 38- Djezzar-Mihoubi I. (2006). Etude des leishmanioses diagnostiques au centre hospitalo- universitaire Ben baddis de Constantine. diplôme : doctorat d'état es-Microbiologie, Université Mentouri, Costantine, Algérie.
- 39- Elghaidi M. (2016). Apport du laboratoire au diagnostic de la leishmaniose viscérale : Experience du service de Parasitologie de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech. doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie, Marrakech, Maroc.
- 40- Estevez Y (2009) .Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle péruvienne et de molécules de synthèse : Etude relation structure activité .Thèse de Doctorat en biologie Santé-biotechnologie . Université Toulouse III- paul sabtier 93 :p04-16.
- 41- Eugénie Gay, Hélène Guegan, Marie Ameline, Jean-Pierre Gangneux (2015). Les leishmanioses humaines : parasitoses importées et autochtones :p461-477.
- 42- Evans T.G. (1993). Leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. Vol. 7. Pages: 527- 46
- Faucher B. Piarroux R. , Actualités sur les leishmanioses viscérales, Volume 32, Issue 9, September 2011, Pages 544-551, P 547.
- 43- Google. (n.d.). [Google Maps : Wilaya de Ghardaïa]. Récupéré le 9 décembre 2018, Lien: <https://goo.gl/maps/BXdsUNzwHnzzeEes9>.
- 44- H.S. Touria. Profil épidémiologique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'ouest algérien, mémoire d'obtention de diplôme de magister option parasitologie, 2012.
- 45- Harrat Z., Boubidi S.C., Pralong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C., Belkaid
- 46- Harrat Z., Hamrioui B., Belkaïd M., Tabet-Derraz O. (1995): Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie Bull. Soc. Pathol. Exot. ; 88:180-184.
- 47- Hassam.B, Senouci.K. Benouna.B. (1991). Le leishmaniose cutanée expérience du service de dermatologie d'avicenne-Rabat. Médecine du Maghreb. 28, 37-38.
- 48- Hide M. (2004) : Variabilité pathogénique du complexe Leishmania.
- 49- Izri A., Depaquit J., Parola P. (2006) : Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. Médecine Tropicale, n°66. 429-435.
- 50- Izri, A. Bellazzoug. S. Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie ; dossier scientifique supplément au N°396, P 3-10.
- 51- Jabourri Y. (2013). Profil épidémio-clinique, thérapeutique et évolutif de la

Références bibliographiques

- leishmaniose cutanée (à propos de 52 cas).
- 52- Jarry D.M. (1999). Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. Kamhawi S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in establishment of Leishmania infections. *Microbes Infect*, 2: 1765-73.
- 53- Khemidja F. (2017). Etude rétrospective de la leishmaniose humaine et canine dans la wilaya Tizi-Ouzou. diplôme de docteur en médecine vétérinaire. Institut des sciences vétérinaire, Blida, Algérie.
- 54- Laamrani El Idrissi A, Lyacoubi M, Ayoujil M, Mouki B, Barkia A, Lhayati M. lutte contre les leishmanioses. Guide des activités 2010.
- 55- Lachaud L. (2007). Laboratoire de microbiologie, UF parasitologie. Mycologie, CHUNIMES et institut de botanique, CHU Montpellier, 233p.
- 56- Le Fichoux Y., Marty P. & Kubar J. (1999). Diagnostic des leishmanioses. In: Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses ; 190-203.
- 57- Loïc.E. (2012). Prise en charge de la leishmaniose en Algérie. Journées d'échanges scientifiques de l'Ouarsenis Tissemsilt, Algérie.
- 58- M. (2009) : Description of Leishmania close to L.killicki (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria ; Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg., 103 716-720.
- 59- Maazoun R. (1982). Identification des leishmanies dans l'ancien monde. Signification de la variation isozymique. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle en Parasitologie, Pathologie et Relation éco-physiologiques. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- 60- Markle MH, Markhoul K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Pharm Physician*,; 69:1455-60.
- 61- Marty p (2010). Leishmaniose viscérale : Epidémiologie , diagnostic et traitement . La lettre infectiologique (25) :p 186-190.
- 62- Mazelet L. (2004). La Leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français. Mémoire de Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie curie, Paris.31P.
- 63- Mouhaouche F, Nait kaci N. (2017). Contribution à la recherche des phlébotomes contaminés par des leishmanies dans la Wilaya de Tizi-Ouzou (Fréha). Diplôme de Mastère. Université Mouloud mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.
- 64- Mounni H. (2015). Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen. diplôme de docteur en pharmacie. Université Abou baker belkaid, Tlemcen, Algérie.

Références bibliographiques

- 65- O.M.S. (2010) : La lutte contre les leishmanioses. Rapport de la réunion du comité O.M.S. d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22 - 26 Mars 2010. O.M.S. Série de rapports techniques ; 949. 228p.
- 66- Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*, 18(2): p293-305.
- 67- OMS (Organisation mondiale de la Santé) 2011. La lutte contre les leishmanioses. Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève.
- 68- OMS (Organisation mondiale de la Santé) 2014. Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région OMS de la Méditerranée orientale.
- 69- OMS. (2002). Organisation Mondiale de la Santé. Stratégies recommandées par l'OMS contre les maladies transmissibles - prévention et lutte. [En ligne] 2002. http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CPE_SMT_2001.13.pdf.
- 70- Poitras E. & Houde A. (2002). La PCR en temps réel : principe et applications. *Rev Biol Biotechnol.*,2(2)2-11.
- 71- Reithinger R. et Dujardin J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis. Current status and future applications. *J Clin Microbiol*, 45: 21-5.
- 72- Rezalleh. L. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien Laghouat et Ain oussara, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009.
- 73- Rioux JA, Lanotte G, Petter F, Derreure J, Akalay O, Pratlong F, et al. Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques*. Coll. Int. CNRS/Inserm 1986b:365-379.
- 74- Sacks D and Kamhawi S (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction of leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55:p453-483.
- 75- Safi S., Tazi Z., Adnaoui M., Mohattane A., Aouni M., Maaoui A., Bennani A., Berbich A. (1996) : La Leishmaniose viscérale de l'adulte. Étude de 7 Observations. *Médecine du Maghreb* n°59: 18-22.
- 76- Salman S. M., Rubeiz N. G., Kibbi A. G., Dedet J. P. (1999). Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clinics in Dermatology*, 17: 291-6.

Références bibliographiques

- 77- Samake S. (2006). Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à kemena et sougoula (cercle de baroueli).Thèse de Doctorant en pharmacie . Université de Bamako 86p : 05-21.
- 78- Sorya B. (2017) Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose : caractérisation des effets et mode d'action. Thèse pour le grade de docteur, Université de rennes. France.
- 79- Soudani S. (2019). Profil épidémiologique des leishmanioses dans la région de TATA. Diplôme de doctorat en médecine, Faculté de médecine et de pharmacie Marrakech. Maroc.
- 80- Teklemariam S., Hiwot A. G., Frommel D., Miko T. L., Ganlov G., Bryceson A. (1994). Aminosidine and its combination with sodium stibogluconate in the treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. aethiopica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*,88: 334-9.
- 81- Thérèse D., Lucien D., Daniel A. (2002). Cours de parasitologie. Laboratoire de Parasitologie Faculté de Pharmacie Lille.
- 82 - Werry M. (1995). Protozoologie médicale. Edition De Boeck Université, 123-136.
- Youssef J. (2013). profil epidemio-clinique, therapeutique et évolutif de la leishmaniose cutanée. (A propos de 52 cas) Expérience du service de Dermatologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail-Meknès. Diplôme de doctorat en médecine, Université SIDI Mohammed ben abdullah, Errachidia, Maroc .

Références bibliographiques

Webographie

- (1) Adresse URL : <http://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>.(consulter le 20 février 2020).
- (2) Adresse URL : <https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/leishmaniose/quels-sont-symptomes-leishmaniose-viscerale> (consulter le 10 mars, 2020).
- (3) Adresse URL : <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=leishmaniose-les-symptomes-de-la-leishmaniose> (consulter le 22 juillet, 2020).
- (4) Adresse URL : <http://mirror.unhabitat.org/documents/SOWC10/FR/R4.pdf> (consulter le 10 aout, 2020)
- (5) Adresse URL : <https://fr.wikipedia.org/wiki/OpenStreetMap> (consulter le 22 Aout, 2020).
- (6) Adresse URL : <https://www.parasite-journal.org> (consulter le 19 Aout, 2020).

Annexes

Annexe I: Préparation du milieu de culture NNN :

1-La verrerie, soigneusement lavée, est stérilisée au Poupinel à 180°C pendant 40 mn.

2-Préparation de la gélose :

- Bacto-agar Difco 10g
- NaCl pur 06g
- Eau distillée 01 litre

- Mettre le NaCl dans l'eau froide et chauffer. Quand l'eau frémit ajouter le Bacto-agar et remuer avec un agitateur jusqu'à dissolution complète. Laisser bouillir 5 mn.

- Répartir en tubes à visse à raison de 8 ml de gélose par tube.

- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn.

- Conserver à +4°C.

Fiche de renseignements leishmaniose

Institut Pasteur d'Algérie
Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations
Fiche de renseignement Leishmaniose

Wilaya : Daira : Date : Code :

Nom :	Prénom :
Age :	Sexe : Féminin <input type="checkbox"/> , Masculin <input type="checkbox"/>
Adresse,	Tél :
Médecin traitant :	

Notion de séjour ces derniers 12 mois : Oui <input type="checkbox"/> , Non <input type="checkbox"/> , Si Oui lieu durée :
Type d'habitation : Urbaine <input type="checkbox"/> , rurale <input type="checkbox"/>
Présence d'animaux : Oui <input type="checkbox"/> , Non <input type="checkbox"/>
Si oui : chiens <input type="checkbox"/> , Chats <input type="checkbox"/> , Rongeurs <input type="checkbox"/> , Chèvres <input type="checkbox"/> , moutons <input type="checkbox"/> , hérissons <input type="checkbox"/> , renard <input type="checkbox"/> Autres
Signes cliniques : Fièvre <input type="checkbox"/> , Hépatosplénomégalie <input type="checkbox"/> , Autres
Entourage ayant la leishmaniose : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui : Famille <input type="checkbox"/> , voisins <input type="checkbox"/> , collègues <input type="checkbox"/> , amis <input type="checkbox"/>

Nombre de lésions : 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10
Localisation des lésions : Visage <input type="checkbox"/> , Membre supérieur <input type="checkbox"/> , Membre inférieur <input type="checkbox"/> Tronc <input type="checkbox"/>
Taille des lésions : moins de 1 cm <input type="checkbox"/> , de 1 à 3 cm <input type="checkbox"/> , de 3 à 5 cm <input type="checkbox"/> , plus de 5 cm <input type="checkbox"/>
Aspect : Ulcérocroûteuse <input type="checkbox"/> , noduleuse <input type="checkbox"/> , sèche <input type="checkbox"/> , surinfectée <input type="checkbox"/>
Date d'apparition de la 1 ^{ère} lésion :

Traitement : Oui <input type="checkbox"/> , Non <input type="checkbox"/> , Si oui : Glucantime <input type="checkbox"/> , Ampho B <input type="checkbox"/> , ATB <input type="checkbox"/> , Autres :
Date du début de traitement : Durée :, Nombre d'injection :

Rechute : Oui <input type="checkbox"/> , Non <input type="checkbox"/> , Nombre de rechute :
Date du 1 ^{er} prélèvement :

Type de prélèvement : Frottis <input type="checkbox"/> , Culture <input type="checkbox"/> , sang <input type="checkbox"/> , Exsudat <input type="checkbox"/> , Biopsie <input type="checkbox"/> , PMO <input type="checkbox"/>
Résultats (+ ou -): Frottis <input type="checkbox"/> , Culture <input type="checkbox"/> , sang <input type="checkbox"/> , Exsudat <input type="checkbox"/> , Biopsie <input type="checkbox"/> , PMO <input type="checkbox"/>

Annexe II: Equipements utilisé dans notre étude

Tableau A : Equipements utilisé au niveau du laboratoire de l'EPSP El Atteuf.

Équipements	Réactifs
<ul style="list-style-type: none">- Une centrifugeuse- Un réfrigérateur pour la conservation des milieux de culture et des réactifs- Deux étuves- un bec Benzènes- Un distillateur- Un bain marie- un microscope optique. -deux automates de biochimie et un hémogramme.- Support des lames pour la coloration.- Compresses purifiées.- Plateau- Lames - lamelles en verre- Dégraisseur- Microscope optique- Gants à usage unique- vaccinostyle ou lame bistouri.	<ul style="list-style-type: none">- Eau oxygénée (comme un désinfectant au cours du prélèvement).- Huile d'émersion (pour la lecture des lames)- Solution de May-Grunwald- Solution de Giemsa- Eau de robinet

Tableau B : Equipements utilisé au niveau du laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Équipements	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Micropipettes. - Balance. - Thermocycleur. - Centrifugeuse. - Bain-marie. - Table UV. - Cuve d'électrophorèse 	<ul style="list-style-type: none"> -Eau distillée - kit QUIAGEN -Tampon lyse -Détergent SDS. -Acétate de sodium. -Ethanol absolu. -Ethanol 70% ,tampon de charge TAE , -protéine K (Eurobio) -phénol chloroforme alcool, isoamylique(MERCK), TE, bleu de bromophenol, bromure d'ethidium, -Marqueur de poids moléculaire 50 pb et 100 pb

Annexe III:

Tableau 01 : Résultats dosage de pureté ADN par nanodrop .

Numéro de patient	DO	260/280	260/230	(C)
N: 106		0,62	0,83	0,52
N: 109		0,02	0,61	0,20
N: 117		-1,19	1,10	0,438
N: 118		1,17	1,43	0,388
N: 123		1,42	1,46	0,528
N: 124		-1,14	2,89	0,566
N: 137		-0,63	-9,66	0,347
N: 145		-2,62	3,50	0,682
N: 149		0,57	1,27	0,328
N: 152		0,64	1,66	0,520

Annexe IV:

Tableau 01 : Réactifs utilisé pour la PCR est réactifs de kit QUIAGEN

Produit	Rôle
Eau distillée	Délutions des réactifs à leur concentration optimale d'utilisation
Tampon	Stabiliser le PH de milieu réactionnel
dNTPs	Élongation des deux brins ADN
MgCl ₂	Cofacteur pour la Taq polymérase
Amorce 1	Amorce sens
Amorce2	Amorce reverse
Solution Q
Taq polymérase	Enzyme intervient dans l'hybridation ADN

Mode opératoire :

Une détection spécifique de l'ADN de *leishmania spp* a été réalisé en utilisant les amorce ITS1 (pour ciblé ADN génomique).

Tableau 02 : Amorces utilisée dans PCR ITS1

Amorce	Forward : LITSR	Reverse : L5 ,8s
ITS1	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'

Protocole ITS1

Tableau 03: Préparation du mix

produit	Volume =n	Volume =15n
H2O	22,1µL	331,5µL
dNTPs	2,5µL	37,5µL
Tampon	5µL	75µL
MgCL2	3µL	45µL
LITSR anti-sens	1µL	15µL
5,8s sens	1µL	15µL
Sol= quia Pen	10µL	150µL
Taq polymérase	0,4µL	6µL
Volume totale	45µL	675µL

Tableau 04: les volumes des réactifs de digestion nécessaire pour la PCR-RFLP

Réactifs de digestion	Volume
Hai3	1
Multi-core	3
BSA	0,3
Tampon	3
H2O	7,7

