

République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

N° d'Ordre : 83/ T.E/ 2006

N° de Série : 06/ SN/ 2006

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME :

Doctorat d'Etat es-Microbiologie

THEME

***ETUDE DES LEISHMANIOSES DIAGNOSTIQUES
AU CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE Ben Baddis
DE CONSTANTINE***

Présentée par

DJEZZAR-MIHOUBI Ilhem

Soutenue le : 07 Décembre 2006

Devant le jury :

Président :	Mr K. Louadi	Professeur	Université de Constantine
Directeur de thèse :	Mr S. Picot	Professeur	Université Claude-Bernard-Lyon1
Co-Rapporteur	Mr T. Moulahem	Professeur	C.H.U. de Constantine
Examineurs :	Mme D. Satta	Professeur	Université de Constantine
	Mr A. Touabti	Professeur	C.H.U. de Sétif
	Mme F. De Monbrison	M C	Université Claude-Bernard- Lyon1

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2006 - 2007

AVANT PROPOS

Je tiens, sincèrement, à remercier en tout premier lieu **Monsieur S. Picot**, Professeur au Laboratoire de Parasitologie - Mycologie Médicale (Université Claude-Bernard, Lyon1), d'avoir assumé la direction de cette thèse. Je lui suis très reconnaissante pour la compétence avec laquelle il m'a dirigé, pour sa grande disponibilité, ses précieux conseils et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée.

Ce travail a été réalisé, en partie, au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie (C.H.U. de Constantine) dirigé par **Monsieur T. Moulahem**. Je le remercie pour l'accueil qu'il m'a réservé et pour le temps qu'il m'a consacré afin de mener à bien et à terme cette thèse.

A **Monsieur K. Louadi**, Professeur au Laboratoire de Biosystématique et d'Ecologie des Arthropodes (Université Mentouri), qui a accepté la charge de présider mon jury. Je lui adresse mes vifs remerciements.

A **Madame D. Satta**, Professeur au Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Mentouri), qui a accepté de juger mes travaux en participant à mon jury. Ses conseils m'ont été bénéfiques et son soutien un grand réconfort.

A **Monsieur A. Touabti**, Professeur au Laboratoire de Parasitologie, C.H.U. de Sétif, qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

A Madame **F. De Monbrison**, Maître de Conférence au Laboratoire de Parasitologie - Mycologie Médicale (Université Claude- Bernard, Lyon1), qui a énormément contribué à la réalisation de cette thèse et qui a fait preuve d'une grande compétence technique dans le domaine de l'analyse moléculaire.

Mes remerciements vont également :

- à **Madame N. Romeuf** pour le temps qu'elle a généreusement consacré à m'initier à la PCR en temps réel.
- à toutes les personnes qui m'ont accompagné dans ce travail de recherche : médecins, TSS, administrateur, malades et collègues.

Liste des abréviations

LC : Leishmaniose cutanée.

LV : Leishmaniose viscérale.

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique.

LCN : Leishmaniose cutanée du nord.

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse.

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse.

ED : Examen direct.

PCR : Polymerase chain reaction.

HAI : Hémagglutination indirecte.

CNRL : Centre national de référence des *Leishmania*.

ND : Non déterminé.

n : Nombre de patients.

N : Nombre de patients positifs.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	08
 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Les leishmanioses.....	11
1- Définition.....	11
2- Historique.....	12
3- Etude du parasite.....	13
3-1- Taxonomie.....	13
3-2- Caractères morphologiques.....	16
4- Epidémiologie des leishmanioses.....	18
4-1- Distribution géographique.....	18
4-1-1- La leishmaniose cutanée.....	20
4-1-2- La leishmaniose viscérale.....	23
4-1-3- La leishmaniose cutanéomuqueuse	24
4-1-4- Co-infection Leishmania / VIH.....	24
4-1-5- La leishmaniose canine.....	26
5- Etude du vecteur.....	27
5-1- Les différents stades de développement.....	27
6- Etude du réservoir.....	30
7- Cycle de vie et transmission.....	31
8- Particularités des leishmanioses à Constantine.....	32
 Chapitre II : Formes cliniques des leishmanioses.....	 34
1- La leishmaniose cutanée.....	34
1-1- La leishmaniose cutanée zoonotique.....	34
1-2- La leishmaniose cutanée du nord.....	35
2- La leishmaniose viscérale.....	36
2-1- La leishmaniose viscérale infantile.....	36
2-2- La leishmaniose viscérale de l'adulte.....	37

3- Co-infection VIH / Leishmaniose.....	37
3-1- Leishmaniose cutanée et SIDA.....	37
3-2- Leishmaniose viscérale et SIDA.....	38
4- La leishmaniose cutanéomuqueuse.....	39
5- La leishmaniose canine.....	40
Chapitre III : Diagnostic biologique des leishmanioses.....	42
1- Mise en évidence du parasite.....	42
1-1- Examen microscopique.....	42
1-2- Culture.....	42
1-3- Inoculation aux animaux.....	43
1-4- Techniques modernes permettant la détection du parasite.....	43
2- Diagnostic sérologique.....	47
2-1- Hemagglutination indirecte.....	47
2-2- Immunofluorescence indirecte.....	48
2-3- ELISA.....	48
2-4- Agglutination directe.....	49
2-5- Test au latex.....	49
2- 6- Electrosynérèse.....	49
2-7- Western blot.....	49
3- Intra-dermo réaction à la leishmanine.....	50
4- Identification des <i>Leishmania</i>	51
4-1- Analyse biochimique des isoenzymes.....	51
4-2- Identification moléculaire par PCR séquençage.....	52
5- Génotypage.....	52
ETUDE EXPERIMENTALE	
Partie I : Patients.....	54
1- Données épidémiologiques et cliniques.....	54
1-1- Leishmaniose cutanée.....	56
1-2- Leishmaniose viscérale.....	57

Partie II : Méthodes.....	58
1- Echantillons.....	58
1-1- Souches de référence.....	58
1-2- Prélèvements cutanés.....	58
1-3- Moelle osseuse.....	59
2- Examen direct : coloration de Giemsa.....	59
3- Diagnostic moléculaire.....	59
3-1- Extraction d'ADN.....	60
3-1-1- Souches de référence.....	60
3-1-2- Papier buvard (Wathman 3MM).....	60
3-2- La PCR en temps réel.....	61
3-2-1- Principe de la technologie SyberGreen™.....	61
3-2-2- La PCR en temps réel genre.....	62
3-2-3- La PCR d'espèces en temps réel.....	64
4- Hemagglutination indirecte.....	65

RESULTATS ET INTERPRETATION

1- Leishmaniose cutanée.....	67
1-1- Patients.....	67
1-2- Examen parasitologique.....	69
1-3- La PCR en temps réel genre.....	71
1-4- La PCR d'espèces en temps réel.....	72
1-5- Analyse épidémiologique.....	74
2- Leishmaniose viscérale.....	77
2-1- Patients.....	77
2-2- Examen parasitologique.....	79
2-3- Hemagglutination indirecte.....	79
2-4- PCR en temps réel genre.....	79
2-5- PCR d'espèces en temps réel.....	81

DISCUSSION.....	83
CONCLUSION	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	89
ANNEXES.....	113

INTRODUCTION

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies parasitaires d'expression clinique variée, dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ces affections sont transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions (**Desjeux, 1996**).

L'Algérie, qui compte parmi les pays les plus touchés, est concernée par cette zoonose qui sévit à l'état endémique sous trois formes cliniques : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN) et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (**Harrat et Belkaïd, 2002**).

La leishmaniose cutanée occupe, en Algérie, deux zones bioclimatiques distinctes : au Sud, à l'étage aride, sévit la forme endémo-épidémique due à *Leishmania major* dont les principaux réservoirs sont *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* et l'insecte vecteur est *Phlebotomus papatasi* (**Izri et al, 1992**). Au Nord, à l'étage sub-humide, s'observe une forme endémique dont l'agent pathogène est un variant enzymatique de *Leishmania infantum* (**Belazzoug, 1985**) responsable de la LV et dont le réservoir est le chien.

Après s'être cantonnée aux deux foyers de Biskra et Abadla, la LCZ progresse vers les hauts plateaux et les régions steppiques du pays. Les souches isolées étant *Leishmania major* MON-25. Quant à la LCN, elle est de plus en plus fréquente et le parasite responsable appartient au complexe *Leishmania infantum*. La majorité des cas observés en Algérie ont été attribués aux zymodèmes dermatropes MON-24 et MON-80. Cependant, le zymodème MON-1 a été isolé de la majorité des cas de LV, mais aussi de quelques cas de LC (**Marty et al, 1998**).

La leishmaniose viscérale, en Algérie, est une affection de type rural affectant principalement le jeune enfant. Elle sévit à l'état endémique au nord du pays à l'étage bioclimatique sub-humide et semi-aride. Le nombre annuel de nouveau cas est estimé à 400 (**Harrat et al, 1995**). *Leishmania infantum* zymodème MON-1 est l'agent pathogène le plus

fréquemment isolé chez les enfants atteints de LV ; il a pour réservoir le chien (**Belazzoug, 1986**) et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus* (**Izri et al, 1990**). D'autres agents appartenant au même complexe : *Leishmania infantum* MON-34 et MON-80 ont été également signalés chez des patients immuno-compétents (**Harrat et al., 1996**).

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. Cette dernière étude est conditionnée par la disponibilité de milieux performants et faciles à préparer. Parmi les milieux, le milieu classique Novy Mac Neal et Nicolle (NNN) est une gélose au sang de lapin. Pour sa préparation, ce milieu nécessite une animalerie et une fois prêt à l'emploi, sa conservation n'est que de 4 semaines à 4°C. Ajouté à cela, le risque de contamination des cultures est très important.

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).

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. L'obtention de produits d'amplification spécifiques après PCR signe la présence de l'ADN du parasite dans les prélèvements.

Dans ce travail, nous nous proposons d'évaluer le nombre de malades positifs durant les trois années de l'étude et d'atteindre l'un de nos objectifs majeur, à savoir l'identification des différentes espèces de *Leishmania* à partir des lésions cutanées et des moelles osseuses grâce à l'outil moléculaire.

La PCR en temps réel à partir des buvards ayant été appliquée avec succès dans le cadre du paludisme (**De Monbrison et al, 2003**) et il nous semblait logique de tenter de l'utiliser pour le diagnostic de la leishmaniose et l'identification des souches. L'intérêt de cette méthode était de s'affranchir des contraintes techniques dans les laboratoires de zone d'endémie tout en bénéficiant de méthodes très performantes de diagnostic.

De plus, par ce travail, nous souhaitons acquérir des compétences en PCR temps réel de façon à pouvoir faire un transfert de technologie à Constantine et de chercher, si possible, des soutiens institutionnels visant à installer sur place une activité de diagnostic et de surveillance de la leishmaniose.

Chapitre I : Les leishmanioses

1-Définition

Les leishmanioses sont des anthroponoses dues à des protozoaires du genre *Leishmania* (Minodier et al., 1999 ; Basset et al., 2001 ; Dedet et Pratlong, 2001), famille des trypanosomatidae (Lightburn et al., 2000). Ce sont des maladies infectieuses dues au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaires flagellés (Del Giudice et al., 2001). Ces parasites obligatoires dihéteroxyènes (Marignac, 2003) affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme (Dedet, 2001), auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestante d'un insecte diptère vecteur hématophage de 2 à 4 mm de long (Marty, 2002) appartenant au genre *Phlebotomus* (Figure1) dans l'Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Osman et al., 2000).



Figure 1: Phlébotome femelle gorgé de sang

(ANOFEL 3)

2- Historique

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leur forme cutanée, comme en témoigne le nom sanscrit de Kala-azar (fièvre noire) qui désigne la leishmaniose viscérale indienne. En effet, la constatation des lésions cutanées bien évidente remonte à la plus haute antiquité aussi bien dans l'ancien que dans le nouveau monde, alors que l'individualisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pu se faire qu'au XIX^{ème} siècle.

Ainsi, les leishmanioses tégumentaires de l'ancien monde, sont des affections dermatologiques connues depuis très longtemps.

La première description clinique moderne est celle de McNaught en 1882 et c'est Cunningham en 1885 qui découvrit les parasites dans un prélèvement de « bouton d'Orient ». Le parasite *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (**Roberts et Janovy, 2000 ; cité par Forget, 2004**).

La première culture fut obtenue par Nicolle & Scire en 1908, ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903 et conclurent « la presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan et de celui de Wright n'est pas contestable. En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur les scarifications cutanées. Mais la transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler & Ber. Knowles, en 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot et Donatien le font pour la leishmaniose canine en 1930 (**Mazelet, 2004**).

Le parasite fût, donc, nommé *Leishmania donovani* en l'honneur de Leishman – Donovan et la forme amastigote du parasite fut communément appelé corps de Leishman-Donovan (**Roberts et Janovy, 2000 cité par Forget, 2004**). Ce protozoaire flagellé est transmis par un vecteur arthropode, le phlébotome, et infecte les vertébrés, principalement les mammifères, dont l'homme. Il est de l'ordre des Kinetoplastidae, famille des Trypanosomatidae et genre *Leishmania*. Les Trypanosomatidae étant des organismes unicellulaires très mobiles à certaines phases du cycle de développement, répartis en 8

genres : *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidae*, *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Trypanosoma*, *Phytomonas* et *Endotrypanum*.

Bien qu'il n'y ait qu'un genre appelé *Leishmania*, on différencie deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur respectivement. Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, causent une panoplie de manifestations cliniques allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. Elles incluent également d'autres affections rebelles à toute thérapeutique : leishmaniose cutanée diffuse : (LCD). Cette forme de LC particulière et rare correspond au parasitisme de sujets anergiques par les espèces *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde et *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde. Mais depuis que les états d'immunodépression acquise se multiplient, quelques cas de LCD ont également été signalés avec les espèces habituellement responsables de lésions localisées telles *L. major* ou *L. braziliensis*, voire *L. infantum* (Dedet, 2001).

Cette multiplicité des tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces leishmaniennes et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

3- Etude du parasite

3-1- 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. Dans le genre *Leishmania*, la taxonomie actuelle est basée sur trois sections (Maazoun, 1982) :

- Section Hypopylaria : ce sont les Leishmanies de l'Ancien Monde se multipliant dans la partie postérieure de l'intestin du vecteur ; parasite exclusif

des Lézards, leur forme est promastigote et/ou amastigote dans le sang ou les viscères de l'hôte. Ce dernier se contamine par prédation .

- Section Peripylaria : Leishmanies se développant dans l'intestin postérieur, moyen et antérieur du phlébotome. La section comprend deux groupes, l'un inféodé aux lézards qui s'infectent par prédation ou piqûre, l'autre inféodé aux mammifères, dont l'homme. Dans ce cas, la transmission est assurée par piqûre, le parasite est exclusivement amastigote dans les macrophages. La parasitose humaine est cutanée ou mucocutanée.
- Section Suprapylaria : les Leishmanies évoluent dans l'intestin moyen et antérieur du vecteur. L'hôte est un vertébré sauvage ou domestique, dont le parasite infeste les macrophages au niveau viscéral, sanguin ou cutané. La transmission est assurée par piqûre de différentes espèces de phlébotomes.

Cette classification était établie sur des données cliniques, épidémiologiques et sur les caractéristiques biologiques des parasites chez les animaux de laboratoire et chez les vecteurs (**Dumon et Piarroux, 1995**) ; tandis que la classification actuelle privilégie des critères biochimiques et immunologiques d'investigation.

L'électrophorèse des iso enzymes a connu depuis une vingtaine d'années une utilisation de plus en plus large et a servi à caractériser de nombreux isolats obtenus dans le monde entier (**Harrat et al., 1995**). Cette technique biochimique, par comparaison avec des souches de référence, permet de définir des zymodèmes qui constituent l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique.

On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en complexes selon la similarité biochimique de leurs isoenzymes (Figure 2).

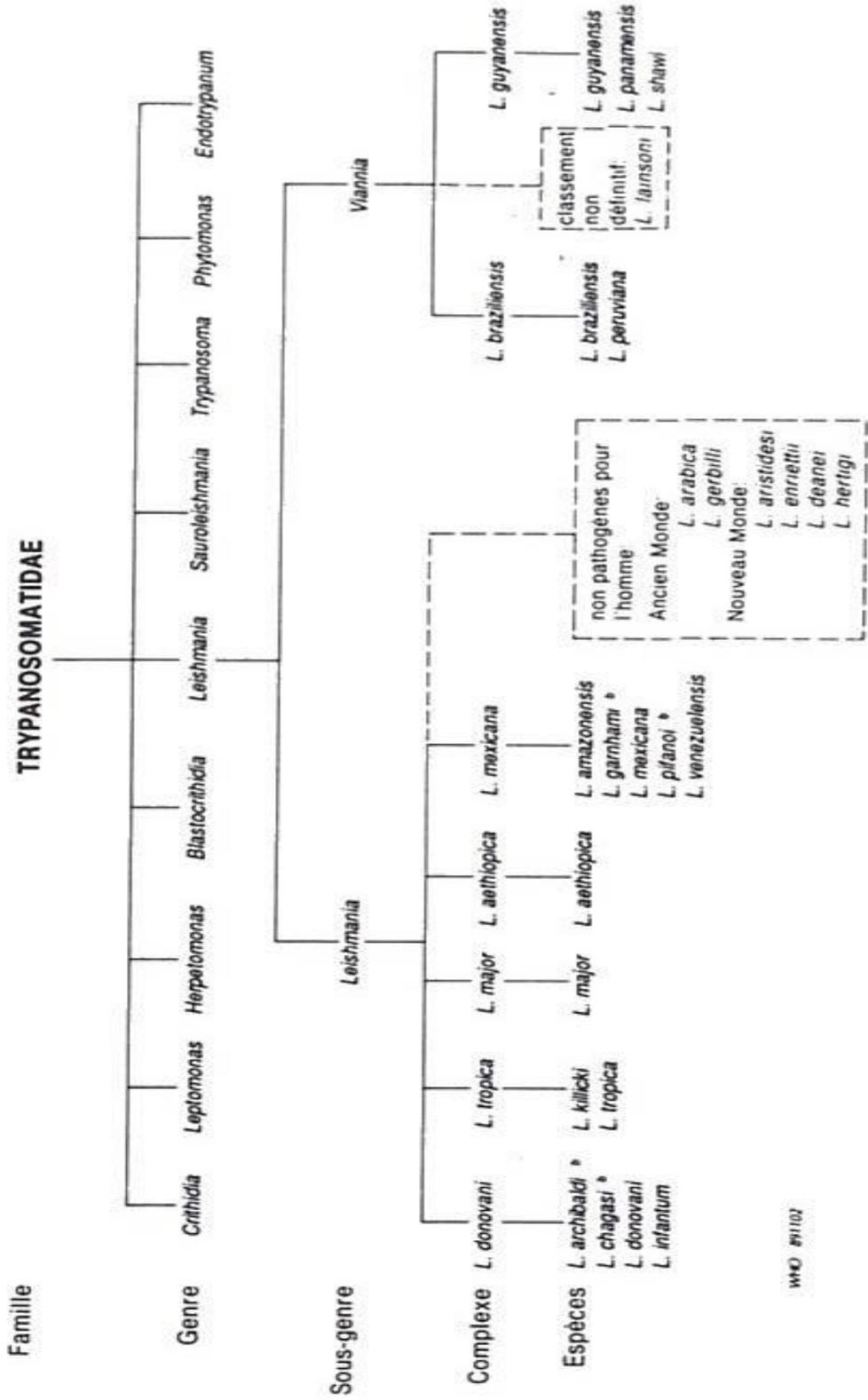


Figure 2 : Taxonomie des *Leishmania* (W.H.O.)

En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques de leishmaniose appartiennent à deux complexes distincts : le complexe *L. infantum* et le complexe *L. major* (**Harrat, 1996**).

Dans le complexe *L. infantum*, les zymodèmes responsables de la forme viscérale sont les MON-1 ; MON-24 ; MON-33 ; MON-34 ; MON-78 ; et MON-80. Quant à la leishmaniose cutanée, on trouve les zymodèmes MON-1 ; MON-24 et MON-80. Les zymodèmes MON-1, MON-34 et MON-77 étant isolés du réservoir canin et le MON-1 et le MON-24 de chez le vecteur ; toujours dans le complexe *L. infantum* (**Harrat et al, 1996**).

Dans le complexe *L. major*, un seul zymodème a été isolé chez l'homme, le rongeur et le vecteur : il s'agit du MON- 25. Ce dernier est, également, l'agent causal d la leishmaniose cutanée en Tunisie (**Kallel et al., 2005**).

Le complexe *L. infantum* a également été identifié dans d'autres pays parmi lesquels nous citons la Tunisie pour les zymodèmes MON-1, MON-24, MON-80 (**Aoun et al., 2001**) ; la France pour les MON-1, MON-80 (**Marty et al, 1994**) , MON-11, MON-29, MON-34, MON-108 (**Basset et al., 2004**) ; l'Espagne pour les zymodèmes MON-1 et MON-80(**Portus et al.,1989**). Quant à l'Italie et le Vénézuéla , les MON-1 et MON-80 sont les agents responsables aussi bien de la LV que de la LC (**Gramiccia, 1992 ; Zerpa et al., 2001**).

3-2- Caractères morphologiques

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle, deux stades évolutifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire simple (**Dedet, 2001**).

a) Le stade promastigote

Munie d'un flagelle antérieur, cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Il s'agit d'un organisme allongé, d'environ 10 à 25µm de longueur (Figures 3). Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure. Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au

pharynx. La durée de cette phase varie de 14 à 18 jours. Le parasite est régurgité par l'insecte au moment de son repas sanguin. C'est la forme que l'on retrouve dans les milieux de culture.

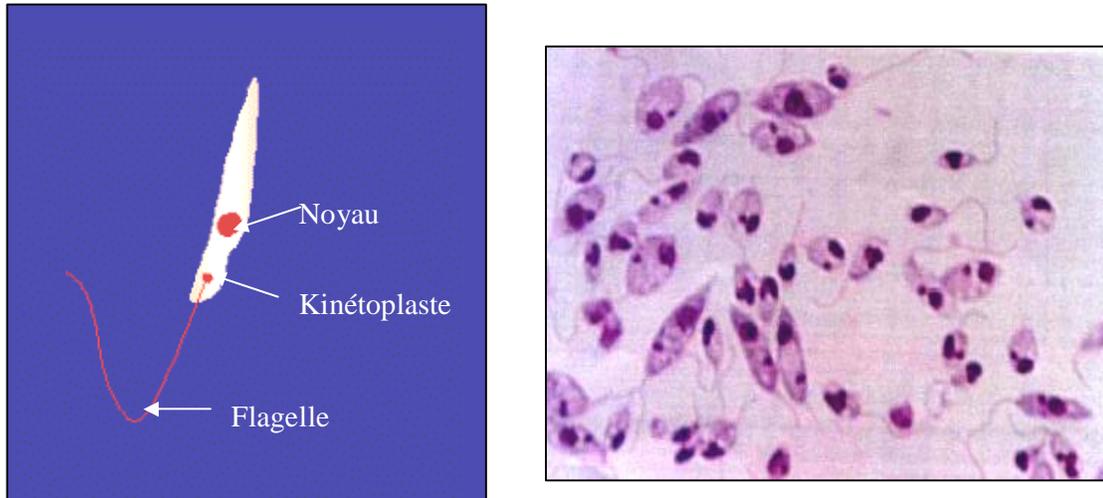


Figure 3 : Formes promastigotes de Leishmania

(www.alae.iquebec.com)

b) Le stade amastigote :

C'est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve dans les cellules du système réticulo-histocytaire des hôtes vertébrés et dans les cellules mises en culture. Ce sont de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2 à 6 μm de diamètre (Figure 4), immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentant un noyau, un kinétoplaste et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur.

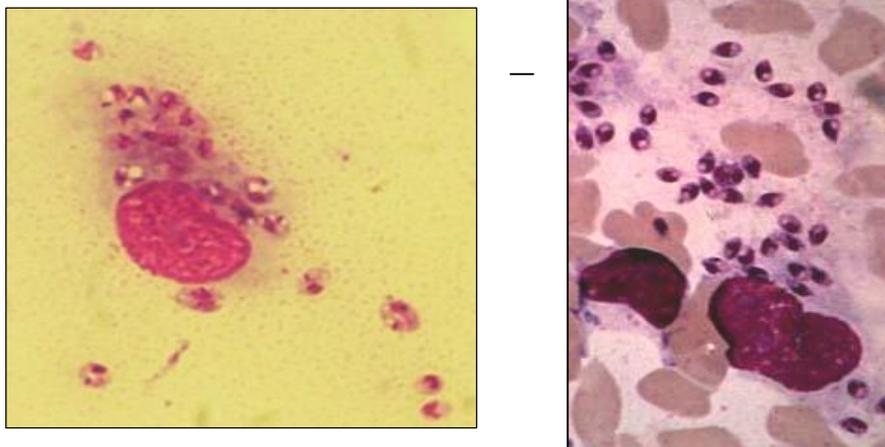


Figure 4 : Les formes amastigotes
www.parasitologie.univ-montp1.fr

4-Epidémiologie des leishmanioses

Les diverses espèces de *Leishmania* ont un cycle épidémiologique commun impliquant le passage alterné d'un hôte mammifère à un autre par l'intermédiaire du phlébotome vecteur.

4-1- Distribution géographique

Largement répandues à la surface du globe (Figure 5), les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe et d'Asie. Présentes sur cinq continents dans les zones tropicales et sub tropicales de 88 pays : 16 sont des pays industrialisés et 72 des pays en développement, dont 13 parmi les pays les moins développés (Desjeux et al., 2001).

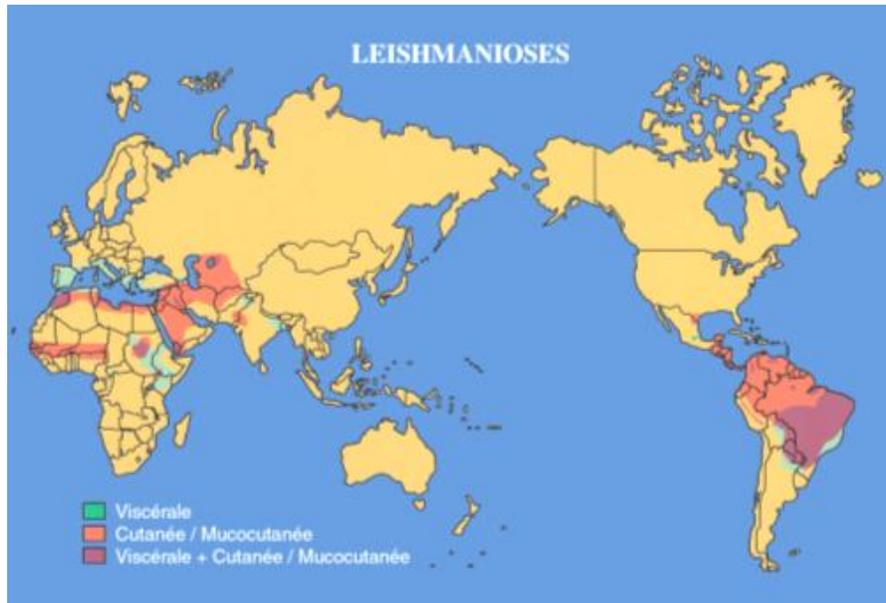


Figure 5 :Distribution de la leishmaniose dans le monde.

(www.who.int/fr)

On estimait à 12 millions le nombre de personnes infectées par les différentes espèces de *Leishmania* en 2000 avec une incidence d'environ 1.0 à 1.5 million de cas par an pour les LC et de 0.5 million de cas par an de LV dans 88 pays (WHO, 2000 ; Dedet, 2001 ; Croft et Yardley, 2002).

Plus de 90% des cas de LV proviennent du Bangladesh, de l'Inde, du Soudan et du Brésil, tandis que plus de 90% des cas de LC sont issus de l'Afghanistan, de l'Iran, de l'Arabie Saoudite et de la Syrie pour l'ancien monde, du Brésil et du Pérou pour le nouveau monde (Desjeux, 1999; WHO, 2000 ; Murray et al., 2005).

Parmi les deux espèces couramment responsables de LV, *L. donovani* est anthroponotique et sévit principalement en Inde et en Afrique de l'Est, alors que *L. infantum* est une espèce zoonotique (réservoir canin) s'étendant de la Chine à l'Amérique du sud. En ce qui concerne les LC, l'Ancien Monde présente des espèces à aire géographique vaste, telles *L. major* et *L. tropica*, et des espèces à distribution restreinte comme *L. killicki* (Tunisie), *L. aethiopica* (Ethiopie), *L. arabica* (Arabie Saoudite). Quant à *L. turanica* et *L. gerbilli*, elles parasitent uniquement des rongeurs en Asie Centrale. *L. major* est une espèce zoonotique des rongeurs terricoles des steppes per-arides, elle s'étend sur de vastes territoires : Afrique

occidentale sub-saharienne, Afrique du Nord, Afrique de l'Est centrale. *L. tropica* est une espèce anthroponotique urbaine dans de nombreux pays du Proche et du Moyen Orient, elle se rencontre également en Afrique du Nord (Maroc et Tunisie) où un réservoir animal est suspecté dans certains foyers (**Dedet et Pratlong, 2000**)

L'Algérie, comme d'autres pays méditerranéens, est fortement concernée par ces zoonoses qui sont classées dans notre pays parmi les maladies à déclaration obligatoire (**Harrat et al., 1995**). Les chercheurs français du siècle dernier, à ne citer que Hamel, Lemaire, les frères Sergent, Parrot, etc. et l'équipe de chercheurs du Laboratoire d'Ecologie Médicale et Parasitologie de la faculté de médecine de Montpellier, en collaboration avec leurs confrères algériens, ont beaucoup contribué et poursuivent leurs efforts pour une meilleure connaissance de l'éco-épidémiologie de ces affections qui restent cependant difficilement maîtrisables sur la plan prophylactique.

L'Algérie, de part sa situation géographique, caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques (**Stewart, 1974**), allant du climat méditerranéen au nord au climat saharien au sud, en passant par de vastes zones semi arides et arides, et d'autre part, par sa forte population rurale, présente un terrain favorable à l'émergence de plusieurs formes cliniques de la maladie.

Deux types de leishmanioses sévissent à l'état endémique en Algérie : la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. Elles rentrent dans des complexes épidémiologiques différents, faisant intervenir des vecteurs et des réservoirs de parasites bien distincts.

4-1-1- La leishmaniose cutanée

a-Dans le monde : Selon l'origine géographique on distingue dans l'Ancien Monde (Asie Centrale, Afrique du Nord, de l'Ouest et de l'Est, Proche et Moyen Orient) la leishmaniose cutanée zoonotique due à *Leishmania major* avec rongeurs réservoirs et la leishmaniose cutanée anthroponotique due à *Leishmania tropica* (Figure6). Elles sévissent par épidémie, s'opposant ainsi à la leishmaniose cutanée sporadique due à *Leishmania infantum*. En Afrique de l'Est on observe aussi *Leishmania aethiopica*.

Dans le Nouveau Monde, les LC sont principalement dues à des espèces à large distribution sud-américaine (*Leishmania amazonensis* et *Leishmania guyanensis*) ou à des espèces limitées à l'Amérique Centrale (*Leishmania mexicana* et *Leishmania panamensis*).

L'incidence annuelle mondiale est difficile à estimer (environ 1 million de cas nouveaux par an) (Marty et al, 2002).

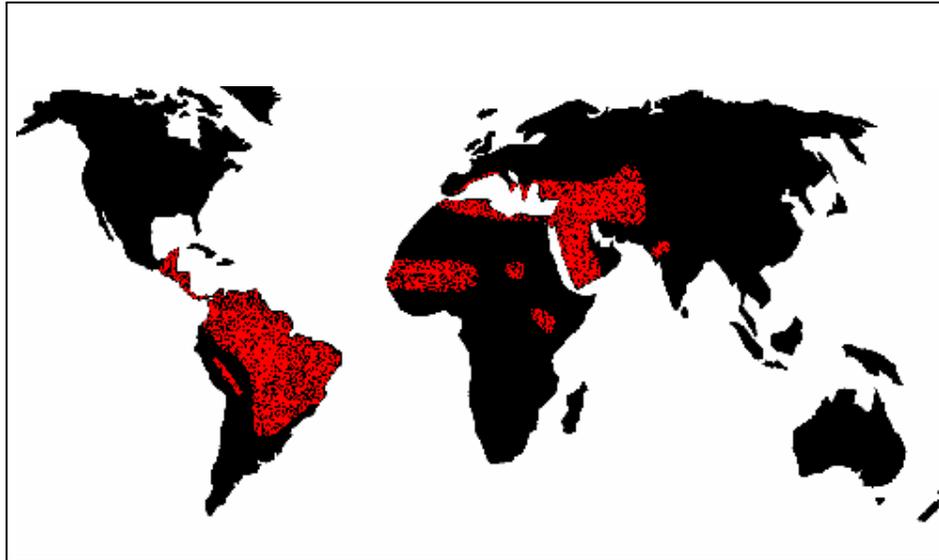


Figure 6 : La leishmaniose cutanée dans le monde

www.who.int/tdr

a- En Algérie : il existe deux entités nosoépidémiologiques distinctes. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) due à *L. major* et la leishmaniose cutanée du Nord (LCN) due à *L. infantum* variant enzymatique (Bachi, 2001).

La LCZ ou « clou de Biskra » sévit à l'état endémo-épidémique à l'étage bioclimatique aride et semi aride. Les foyers anciennement connus étant Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest (Figure 7). Cette forme cutanée connaît une véritable extension vers les hauts plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila (Belazzoug, 1982) suivie d'une autre en 1985 à Ksar chellal (Tiaret) (Belazzoug, 1986). Cependant, d'autres foyers sont apparus, notamment, ceux d'El Oued, Ghardaia, Bechar et Laghouat (Sud) et Batna, Médéa, Tiaret Borj Bou Ariridj (Nord).

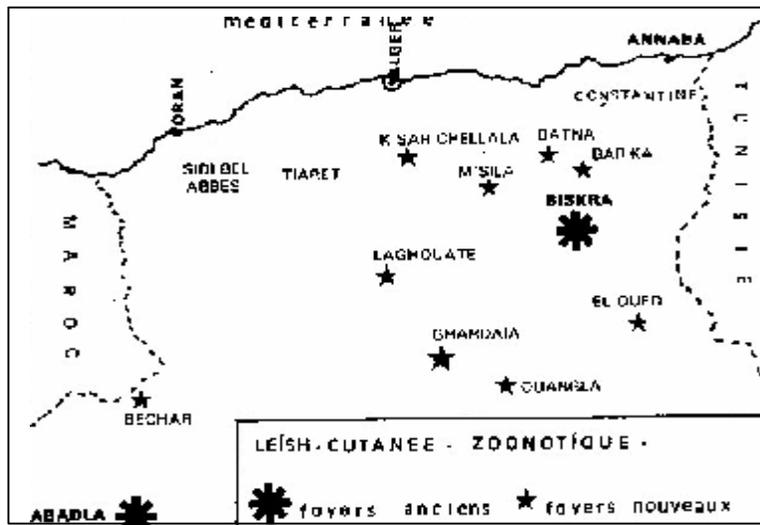


Figure 7 : La leishmaniose cutanée zoonotique (Harrat et al, 1995)

La LCN, décrite sous le nom de « clou de Mila » par **Sergent et Guéidon (1923)**, sévit à l'état endémique le long du littoral et du Tell algérien (Figure 8) et sa répartition géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale. Elle est signalée dans des régions qui, jusque là étaient indemnes (**Harrat et al., 1995**) : Oran, Tlemcen (Ouest), Annaba, Sétif, Collo (Est). Les foyers de Tizi Ouzou, Bouira, Béjaïa, Constantine, Jijel, Mila et Ténès étant responsables du plus grand nombre de cas signalés (**Harrat, IXème Journée Nationale de Parasitologie, Mai 2005**).

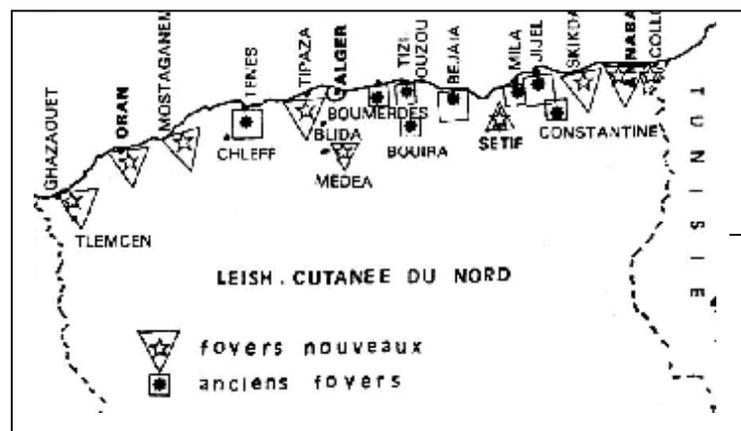


Figure 8 : La leishmaniose cutanée du nord (Harrat et al, 1995)

4-1-2- La leishmaniose viscérale

a- Dans le monde : On décrit la leishmaniose viscérale dans 61 pays sur 4 continents où environ 350 millions de personnes sont exposées au risque (**www.who.int**). Cette maladie est également appelée Kala-azar, un mot indien signifiant fièvre noire. Son incidence au niveau mondial est de 500 000 cas par an dont 90% sont recensés dans 5 pays seulement (Inde, Népal, Bangladesh, Soudan, Brésil) (**Marty et al, 2002**). La LV est causée par différents complexes dont *Leishmania donovani* dans le sub-continent indien et en Afrique de l'Est (LV anthroponotique) et *Leishmania infantum* dans le bassin méditerranéen (*L. infantum*) et dans le nouveau Monde (*L. chagasi*) (LV zoonotique) (**Guerin et al, 2002**).

b- En Algérie : La LV est fréquente dans le nord des 3 pays du Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie). Dans notre pays, elle s'étend sur toute la partie nord au niveau des étages bioclimatiques humide et sub-humide (Figure 9). Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de LCZ. En effet, 21 cas de LV ont été signalés par Belazzoug en 1986 à Biskra, foyer de LC. D'autres cas sont, également apparus, dans le Hoggar et Tassili N'ajjar (**Belkaid, 1997**). A coté des anciens foyers (Tizi Ouzou, Boumerdés, Médéa et l'Est de Constantine), des nouveaux sont apparus : Annaba et Collo (Est), Mitidja, la Chiffa, Chlef (Centre) et Tlemcen, Oran (Ouest) (**Harrat et al., 1995**). Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% de cas (**Harrat et al., 1992**) : il comprend la région de Tizi Ouzou, de Bouira et de Boumerdés. Le foyer de la Petite Kabylie englobe une partie de ces wilaya et s'étend jusqu'à Collo à l'Est, et déborde jusqu'à Sétif. Les zones les plus touchées concernent Jijel, Mila, Constantine et Skikda.

La LV humaine pose un réel problème de santé publique en Algérie ; on dénombre environ 400 nouveaux cas par an. Dans le foyer de Tizi Ouzou qui reste le plus actif dans le Maghreb, la maladie est responsable de 6% de décès (**Djrbouh et al, 2005**)

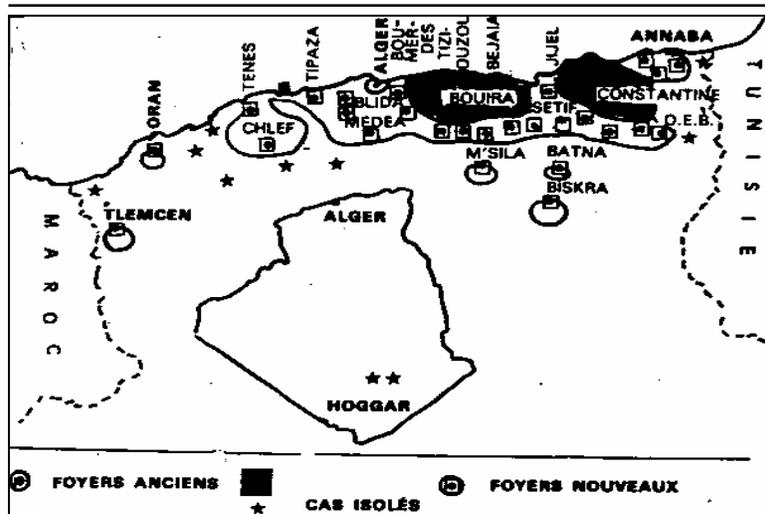


Figure 9 : La leishmaniose viscérale (Harrat et al, 1995)

4-1-3- La leishmaniose cutanéomuqueuse

La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM), encore appelée localement « Espundia » (Dedet, 2001), s’observe en Amérique du Sud, principalement au nord de l’Argentine, en Bolivie, Brésil, Colombie, Equateur, Paraguay, Pérou et Vénézuéla. Elle est relativement moins fréquente en Amérique centrale et est connue depuis l’époque précolombienne. Elle est causée principalement par différentes espèces de *Leishmania* : *L. (V.) braziliensis* (Desjeux et al., 1987), plus rarement par *L. (V.) panamensis* et *L. (V.) guyanensis*. Les phlébotomes vecteurs sont du genre *Lutzomyia* et *Psychodopygus*.

Dans les pays andins où 14 000 cas de LC ont été signalés annuellement entre 1996 et 1998, on estime le nombre de LCM à un millier par an soit environ 7 %. En Bolivie où approximativement 2500 cas de LC, dus en grande majorité à *L. (V.) braziliensis*, sont officiellement rapportés chaque année, on estime qu’environ 2 à 5% des cas évoluent vers la forme muqueuse. Même pourcentage pour le Paraguay (Marty et al., 2002).

4-1-4- Co-infection *Leishmania* / VIH

a- Dans le monde : La co-infection *Leishmania*/VIH est une nouvelle maladie extrêmement grave et de plus en plus fréquente, avec toutes les conséquences que cela impliquent tant sur le plan clinique, au niveau diagnostique, en chimiothérapie et sur le plan épidémiologique et économique. On signale de plus en plus souvent des cas de co-infection *Leishmania*/VIH dans différentes parties du monde (Figure 10). Le nombre de cas devrait continuer d'augmenter dans les années à venir car il semblerait que les cas ne soient plus confinés aux zones d'endémie.

Les co-infections *Leishmania*/VIH sont considérées comme une réelle menace, en particulier dans le sud-ouest de l'Europe. Sur les 1700 premiers cas notifiés par l'OMS dans 33 pays du monde jusqu'en 1998, 1440 provenaient de cette partie : Espagne (835) ; Italie (229) ; France (259) ; Portugal (117). Sur 965 cas analysés rétrospectivement, 83,2% étaient des hommes, 85,7% des jeunes adultes (des toxicomanes par voie intraveineuse pour la plupart).

La majorité des co-infections dans les Amériques sont signalées au Brésil, où l'incidence est passée de 0,8 cas pour 100 000 habitants en 1986 à 10,5 pour 100 000 en 1996. D'une manière générale, le nombre de cas déclarés en Afrique donne une estimation modeste et serait bien supérieur si l'on exerçait une surveillance active sur l'ensemble du territoire. L'Ethiopie a un système bien organisé de dépistage, de prise en charge et de notification des infections. Le Kenya et le Soudan ont mis en place une surveillance en 1998 et le Maroc a un centre à cet effet. Des cas ont été signalés en Algérie et au Maroc (W.H.O., 2000).

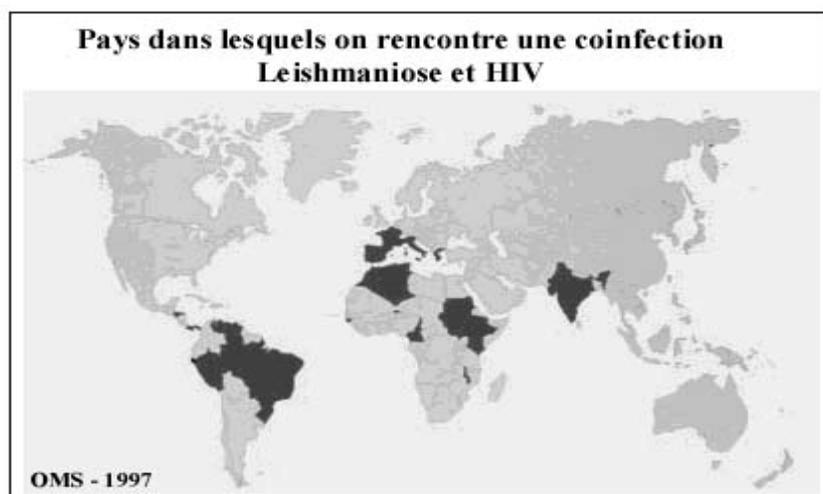


Figure 10 : Coinfection Leishmaniose/HIV dans le monde

www.who.org

b- En Algérie : Bien qu'une première mention de co-infection SIDA leishmaniose ait été rapportée en Algérie en 1987 (**Ammar-Khodja et al., 1987**), le nombre de cas de cette association, contrairement aux pays du sud de l'Europe, reste au dessous de la réalité. Un dépistage plus large permettrait sûrement le diagnostic de plusieurs autres cas. Il est à noter que près de 1500 personnes sont concernées par le SIDA dans notre pays (**Harrat et al., 1995**)

4-1-5- La leishmaniose canine

a- Dans le monde : Elle est répandue dans de nombreux pays du monde, notamment, en Italie, en Espagne et au Portugal, pays dans lesquels pratiquement toutes les régions sont fortement contaminées. Sa répartition géographique est liée aux zones d'habitat de l'insecte vecteur. Réclamant un climat chaud et un certain degré d'humidité, le phlébotome est localisé dans l'ensemble des villes de certains pays méditerranéens. Cette maladie s'étend progressivement vers les régions situées plus au nord (Nord de la France par exemple); notamment en faveur de déplacements d'animaux contaminés (retour de vacances, exposition canine).

c- En Algérie : Le chien reste le principal réservoir de la leishmaniose viscérale à *L. infantum* (Djerbouh et al, 2005). La leishmaniose canine est de loin plus importante que la leishmaniose viscérale humaine. Une enquête ponctuelle effectuée dans la localité de Draa el Mizane en 1992 (foyer de Grande Kabylie) a montré que 25% des chiens prélevés présentaient des anticorps spécifiques. La leishmaniose canine est de plus en plus fréquente à Alger, ce qui explique la survenue de cas de leishmaniose viscérale chez les enfants n'ayant jamais quitté la capitale. Cependant, il est tout indiqué actuellement de faire un dépistage beaucoup plus important pour situer la prévalence de la maladie chez le chien dans notre pays (Harrat et al., 1995).

5-Etude du vecteur

Il représente un maillon important dans la chaîne de transmission. Diptères nématocères de la famille des Psychodidae, 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, leur corps est couvert de soies et ils présentent des ailes lancéolées dressées. Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement pré-imaginal (œuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide. Mais les biotopes de reproduction sont connus pour peu d'espèces, ce qui constitue une limite très sérieuse à l'établissement de programmes de lutte.

Seule la femelle, hémaphage, assure la transmission de la leishmaniose. 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 (Dedet, 2001).

5-1- Les différents stades de développement

Les différents stades de développement des phlébotomes se déroulent selon la figure 11 représentée ci-dessous.

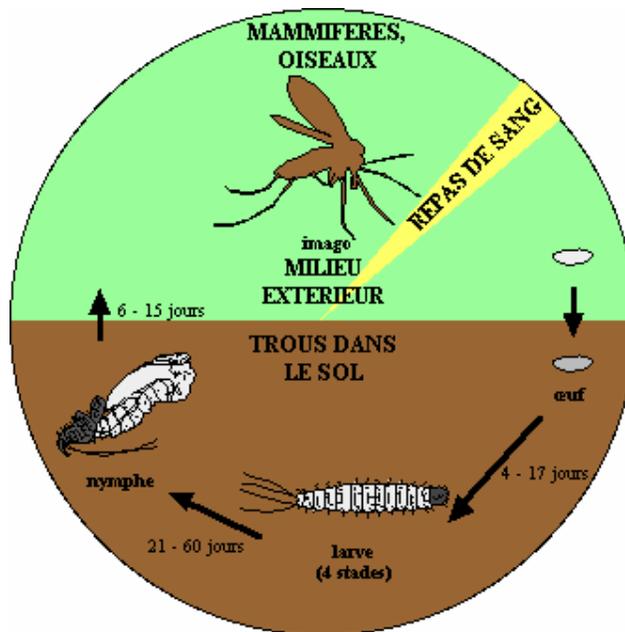


Figure 11 : Cycle de développement du phlébotome

(www.vet-nantes.fr)

a- L'œuf :

L'œuf de forme ellipsoïde, mesurant de 0,3 mm à 0,4 mm de long et 0,09 à 0,15 mm de large, de couleur blanc-jaunâtre au moment de son émission, se pigmente rapidement en brun au contact de l'air. L'embryon est enveloppé dans une mince membrane. L'endochorion est strié d'un fin réticulum limitant des cellules de formes variables, l'exochorion recouvre l'œuf d'une gaine translucide (Jamarin, 1991)

b- La larve :

Elle est vermiforme eucéphale, mesurant au 4^{ème} stade huit millimètres environ. Elle est formée de trois segments thoraciques et de neuf autres abdominaux dont les sept premiers

sont munis de fausses pattes locomotrices. Cette larve ressemble, en définitif, à une petite chenille (Figure 12).



Figure 12 : Stade larvaire de Phlebotomus
(ANOFEL 3)

c- La nymphe :

La nymphe éclôt par une déchirure dorsale des téguments larvaires. Elle ne s'en dégage pas entièrement, et porte à l'extrémité caudale l'exuvie larvaire avec les deux paires de soies, retournées comme une ancre de bateau. La nymphe mesure 3mm de longueur, de coloration blanc-jaunâtre, elle a un aspect claviforme avec la tête repliée sous les segments thoraciques masquant sa partie postérieure. Le tégument nymphal est mince et transparent et on peut apercevoir dans la nymphe l'imago en voie de développement. Les gaines antennaires sont enroulées, les ébauches de la trompe, des palpes, des ailes et des pattes sont très développées dans la partie antéroventrale. Le thorax est formé de trois segments (**Jamarin, 1991**).

d- L'adulte :

Insecte de 1 à 4mm de taille, de couleur jaune pâle, velu, d'aspect bossu, très fragile. Les antennes comportent 16 articles velus, les pattes sont longues et grêles, les yeux sont généralement gros et sombres. Quant aux ailes, elles sont, également, velues, de forme

lancéolée et habituellement relevées chez l'insecte au repos. L'abdomen comporte dix segments dont les trois derniers, modifiés, constituent les organes génitaux. Ceux ci, appelés coxites et styles, sont développés chez le mâle.

Il existe plus de 600 espèces de phlébotomes réparties dans presque toutes les régions biogéographiques du monde. Parmi elles, sur environ 70 espèces suspectées vectrices, une vingtaine seulement sont des vecteurs prouvés d'espèces anthropotropiques de *Leishmania*. Elles appartiennent aux genres *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (**Leger et Depaquit, 1999**).

En Algérie, 22 espèces de phlébotomes ont été recensées et identifiées par Belazzoug (1991), dont 12 du genre *Phlebotomus* et 10 du genre *Sergentomyia*. Concernant la leishmaniose viscérale, depuis les travaux de Parrot, Donatien et Lestoquard en 1930, le vecteur est identifié comme étant *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* (**Bachi, 2001**).

En 1990, Izri et al isolent chez *Phlebotomus perniciosus* (naturellement infesté) *Leishmania infantum* zymodème MON 1, agent de la leishmaniose viscérale.

Le vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique admis depuis les frères Sergent et Louis Parrot 1926 est *Phlebotomus papatasi* confirmé par **Dedet et al (1973)** et par **Izri et al (1992)**. Quant à la leishmaniose cutanée du Nord, **Izri et al (1993)** isolent l'agent responsable, pour la première fois, de chez *Phlebotomus (larrousius) perfiliewi* naturellement infesté à Ténès. Il s'agit de *Leishmania infantum* zymodème MON-24.

6- Etude du réservoir

Les réservoirs naturels des *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 ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (**Dereure, 1999**).

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet comme réservoir le chien. En effet, Dedet et al, 1977 ont déduit que 11,4% des chiens de la grande Kabylie étaient atteints de LV. Belazzoug et al, (1984, 1985 et 1987) ont confirmé le rôle joué par cet animal et ont fait la corrélation entre foyer de leishmaniose canine et leishmaniose viscérale humaine. La

leishmaniose canine concernant tout le territoire national avec une prévalence variant d'une région à l'autre.

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages gerbillidés. Le premier étant *Psammomys obesus*, naturellement infesté par *Leishmania major* (**Belazzoug, 1983**) et le second : *Meriones shawi* au niveau du foyer de Ksar Chellal (**Belazzoug, 1986**). Quant à la leishmaniose cutanée variant enzymatique de *L. infantum*, le réservoir demeure inconnu, bien que le chien soit fortement suspecté.

7- Cycle de vie et transmission

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, la mouche des sables et un mammifère (Figure 13). Lorsqu'une mouche des sables femelle infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, elle salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion le parasite sous sa forme promastigote. Il infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages) du système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote. S'en suit une multiplication du parasite par fission binaire dans phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par les cellules avoisinantes où le processus se poursuit. Le cycle est complété lorsqu'une mouche prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant des *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et motiles appelés nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle. A partir du 7^{ème} jour, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum qui sépare l'intestin médian de l'avant du système digestif. Les nectomades se transforment alors en heptomades, qui sont plus petits et plus arrondis, et en promastigotes métacycliques qui eux, ne se divisent plus, sont plus minces avec un long flagelle et hautement motiles. C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des métacycliques vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis (**Sacks et Kamhawi, 2001**).

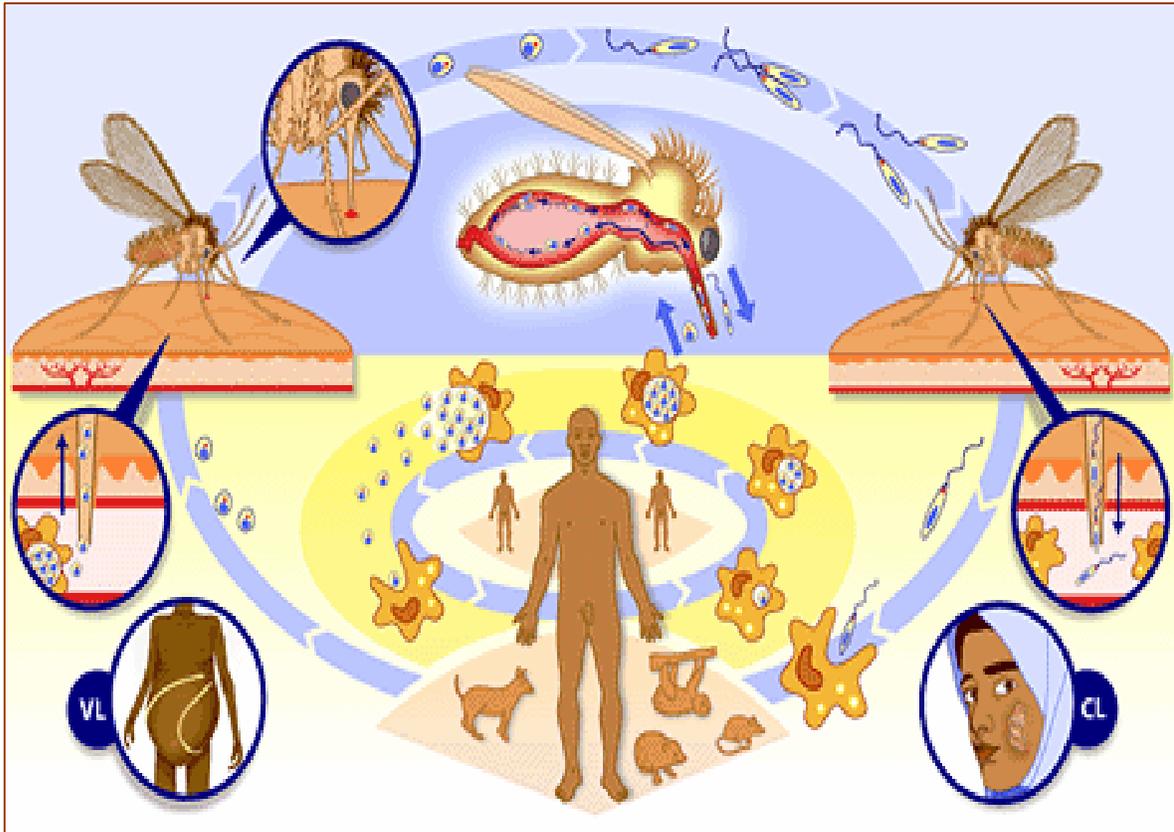


Figure 13 : Cycle de vie et transmission de la leishmaniose

(www.who.org)

8- Particularité des leishmanioses à Constantine

Aucune étude prospective n'a été réalisée à Constantine concernant l'incidence de la leishmaniose viscérale humaine et la leishmaniose cutanée.

Par ailleurs, aucune souche n'a été identifiée au sein de ce foyer sis à la jonction des hauts plateaux et de la partie Est du socle de la petite Kabylie. Cependant, une étude prospective concernant le vecteur et la leishmaniose canine a été menée (**Moulaheem, 1999**). Ce dernier a mis en évidence la présence de plusieurs espèces de phlébotomes à Constantine avec une prédominance de l'espèce *Phlebotomus perfiliewi* dans les captures (46,55%). Celle

de *phlebotomus perniciosus* représentant 35,53% contre 0,27% pour *Phlebotpmus longicuspis*. L'espèce *Sergentomyia minuta parroti* étant de 17,63%.

Quant à la leishmaniose canine, l'étude avait montré que 91% des chiens séropositifs étaient asymptomatiques. Selon l'auteur, ceci serait attribué au fait que l'infection était à son début.

Parallèlement, une étude rétrospective de la LV et la LC a été réalisée. Il en découle que la commune de Constantine offrait le plus grand nombre de cas de LV humaine, suivie des communes d'El Khroub et de Hamma Bouziane. Quant à la LC, elle serait, également, plus importante au niveau du foyer de Constantine (310/610 cas). Les régions de Zighoud Youcef, Ibn Ziad et Hamma Bouziane représentant respectivement 49/610 cas, 41/610 cas et 29/610 cas.

Chapitre II : Formes cliniques des leishmanioses

1- La leishmaniose cutanée

En général, les caractéristiques cliniques de la leishmaniose cutanée ne sont pas uniformes dans toutes les régions ni même à l'intérieur d'une région donnée, par suite de différences touchant à l'espèce parasitaire ou aux types zoonotiques en cause. La lésion classique débute sous forme d'un nodule au point d'inoculation. Une croûte se forme au centre et, si elle est arrachée, elle révèle une ulcération qui évolue vers la guérison au prix d'une cicatrice profonde présentant une altération de la pigmentation. Les nodules satellites au bord de la lésion sont caractéristiques.

1-1 - La leishmaniose cutanée zoonotique

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales. 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**). A côté de cette forme, la plus fréquente, s'observent les formes ulcéro-végétantes, verruqueuses et plus rarement lupoides (**Bachi, 2001**).

Les lésions peuvent se rencontrer sur une quelconque partie de la surface du corps (Figure 14), mais siègent en général sur les parties découvertes exposées au site de piqûre du phlébotome. Les formes cliniques multiples diffèrent d'un sujet à l'autre, d'une lésion à l'autre chez un même individu, selon la localisation sur le corps, d'une espèce à l'autre, d'un biotope à l'autre.

Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'importantes cicatrices disgracieuses ou invalidantes. Différentes appellations classiques ont été utilisées telles que bouton d'Orient (bassin méditerranéen), clou de Biskra (Algérie), bouton d'Alep (Syrie). Ces appellations ne correspondent à aucune réalité anatomo-clinique ou épidémiologique.

La durée d'évolution de la leishmaniose cutanée zoonotique est habituellement courte et l'agent pathogène est *L. major*.



Figure 14 : Différents types de lésions cutanées
(photo du haut : www.bioltrop.org; photos du bas : ANOFEL 3)

1-2 - La leishmaniose cutanée du Nord

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 (**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.

Ces deux formes de leishmanioses existent en Tunisie et au Maroc mais ces derniers se distinguent de l'Algérie par une troisième forme : la forme anthroponotique due à *L. tropica* (**Rioux et al., 1986**).

2- La leishmaniose viscérale

2-1- La leishmaniose viscérale infantile

C'est la forme la plus fréquente dans le pourtour méditerranéen, particulièrement en Afrique du Nord. Ce sont les jeunes enfants (92%) qui sont le plus souvent atteints, généralement, entre 6 mois et 5 ans (**Harrat, 1992 ; Belkaid, 1997**). Selon **Ben Ismaïl** (1989), la LV est infantile et 90% des cas concernent des enfants de moins de 5 ans au Maghreb.

Contrairement à la LC, la forme viscérale ne se présente pas par un ulcère cutané. En effet, les parasites injectés lors du repas sanguin du phlébotome sont ingérés par les phagocytes du système réticulo-endothélial mais ne restent pas au site de piqûre. Ils migrent plutôt vers les organes lymphoïdes tels que le foie, la rate et la moelle osseuse via les systèmes sanguin et lymphatique. La période d'incubation est d'une durée variable mais prend habituellement 2 à 4 mois. Les symptômes sont la fièvre, les frissons, la nausée, l'œdème facial, le saignement des muqueuses, la diarrhée et les difficultés respiratoires. La diminution du nombre de phagocytes due à l'infection provoque la surproduction de phagocytes au détriment de la production de globules rouges dans la rate et la moelle, ce qui entraîne l'anémie et l'émaciation. A l'opposé, le foie et la rate augmentent en volume (hépatomégalie et splénomégalie). La mort peut également être causée par des infections secondaires que le corps affaibli ne peut plus contrôler (**Forget, 2004**) (Figure 15). De plus, des adénopathies et des manifestations cutanées sous forme de tâches noirâtres ou bistres sont souvent associées, d'où le nom de Kala-azar (**Marty, 2002**).



Figure 15 : La leishmaniose viscérale infantile
(www.who.int/tdr)

2-2- La leishmaniose viscérale de l'adulte

Elle est peu fréquente en Algérie (**Harrat, 1992**). Le tableau clinique est moins typique que celui de l'enfant. Il peut s'agir de forme fébrile prolongée. La splénomégalie peut être absente ou constituer le seul élément clinique, de même que les adénopathies. Les signes cutanés sont prédominants, d'installation brutale rendant le diagnostic difficile (**Bachi, 2001**).

3- Coinfection VIH – leishmaniose

3-1- Leishmaniose cutanée et SIDA

La co-infection leishmaniose cutanée – SIDA est beaucoup moins fréquente que la co-infection leishmaniose viscérale-SIDA. Trois cas de LC chez 3 immunodéprimés, dont un associé au Sida, ont été rapportés par **Ammar-Khodja et al., 1990**). Pour les deux autres, l'un était un greffé rénal sous immunosuppresseurs et le deuxième étant un enfant immunodéprimé. Les manifestations cliniques sont des lésions graves extensives pouvant toucher les muqueuses et dont l'évolution est lente avec possibilités de récives.

Dans la co-infection leishmaniose- SIDA, les patients ont tendance à développer d'emblée une leishmaniose viscérale sans épisode cutané préalable même avec les souches dermatropes (**Pratlong et al., 1995**).

3-2- Leishmaniose viscérale et SIDA

La majorité des observations disponibles concernent l'association de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec la LV à *L. infantum* du bassin méditerranéen. Pourtant, des cas de LV apparaissent de plus en plus chez des patients immunodéprimés pour transplantation d'organe (rein principalement), au point qu'une sérologie leishmanienne devrait être incluse dans le bilan prégreffe des sujets en zone endémique. Le tableau clinique est typique de la LV dans 84,2% des cas (**Desjeux et al., 1996**), mais la fréquence des différents symptômes classiques est variable. Selon **Dedet et al. (1995)** les principaux symptômes rencontrés sont les suivants : fièvre (89,3%), hépatomégalie (59,2%), splénomégalie (54,4%) et adénopathies (22,3%).

Des symptômes atypiques sont observés dans 15,8% des cas (**Desjeux et al., 1996**). Il s'agit de symptômes cutanés, pulmonaires ou digestifs inhabituels, voire exceptionnels au cours de la LV de l'immunocompétent, et qui peuvent constituer le signal d'appel, ou même l'unique symptôme, de l'infection leishmanienne. Parmi les localisations inhabituelles du parasite figurent poumon, plèvre, oesophage, estomac, duodénum, jéjunum, côlon et rectum. Les anomalies hématologiques sont inconstantes, l'anémie étant la plus fréquente (**Dedet, 2001**). Belkaïd et al, 1997 rapportent 13 cas de co-infection VIH-leishmaniose viscérale en Algérie. Il s'agissait, dans la plupart des cas, d'immigrés algériens travaillant en France.

Les patients atteints de co-infection sont, préférentiellement, des adultes âgés de 20 à 40 ans et de sexe masculin corrélé à celui des patients séropositifs pour la VIH (**Pratlong et al., 1997**). De plus, la leishmaniose peut être transmise directement d'un individu à l'autre par le partage de seringues comme c'est souvent le cas chez les utilisateurs de drogues injectées par voie intraveineuse. La leishmaniose accélère la progression vers le SIDA et réduit ainsi l'espérance de vie des individus infectés par le VIH. A l'opposé, le VIH et le SIDA permettent la dissémination et l'augmentation du risque de contracter la leishmaniose viscérale (**WHO, 2000**).

4- La leishmaniose cutanéomuqueuse

C'est une des formes les plus sévères de la leishmaniose, les lésions muqueuses sont le plus souvent secondaires aux lésions cutanées initiales. Le délai d'apparition des localisations muqueuses est extrêmement variable allant de quelques semaines à plusieurs dizaines d'années mais le plus souvent de 1 à 5 ans. Les lésions muqueuses sont métastatiques par voie hématogène ou lymphatique.

Les localisations muqueuses sont, par ordre de fréquence, le nez, les lèvres supérieures et inférieures (Figure 16), la cavité buccale, le pharynx et le larynx.

Au niveau du nez, on observe tout d'abord de l'érythème avec des épisodes d'épistaxis ou seulement des sécrétions nasales sanguinolentes, une discrète infiltration du septum nasal, parfois une gêne respiratoire nocturne due à la congestion nasale fréquente. Par la suite, l'inflammation gagne le vestibule, les ailes du nez, le plancher de la cavité nasale, enfin avec le temps, on peut observer la perforation puis la destruction du septum nasal. Cela provoque un affaissement de la pyramide nasale qui s'incurve d'où la dénomination du « nez de tapir » ou « bec de perroquet ». A un stade plus tardif, on peut observer une infiltration globale des régions nasogéniennes et des lèvres supérieures puis inférieures. Elle peut s'étendre au palais, aux piliers, à la luette puis gagne le pharynx, le larynx, la trachée et même les bronches.

Infections et mutilations résultant de ce processus destructif sont à l'origine d'importants stigmas esthétiques avec fréquemment un isolement et une exclusion sociale dramatique. Le décès, par trouble de la respiration ou de la déglutition, est exceptionnel ; il peut toutefois se produire en cas de maladie associée telle que la tuberculose ou une surinfection broncho-pulmonaire massive (David et al., 1993).



Figure 16 : Différentes lésions de la leishmaniose cutanéomuqueuse (ANOFEL 3)

5- La leishmaniose canine

Il peut d'écouler plusieurs mois à plusieurs années avant que l'animal contaminé ne manifeste des symptômes ou des lésions. Dans la majorité des cas, il est possible d'observer ce qu'on appelle un chancre d'inoculation, c'est-à-dire une sorte de « bouton » surélevé avec un cratère en son centre. Cette lésion constitue le point d'inoculation des leishmanies par le phlébotome. Elle apparaît en moyenne 3 mois après la piqûre et évolue sur une période de 6 mois.

Ensuite plusieurs signes peuvent être observés : une perte importante des poils, essentiellement au niveau de la tête, du cou et du poitrail. Une forte dépilation autour des yeux donne l'impression que le chien porte des lunettes. La peau devient sèche avec de très nombreuses pellicules que les shampooings ne font pas disparaître. Peu à peu, la peau devient cartonnée. Des ulcères peuvent se former au niveau des pattes, des oreilles ou la truffe (Figure 17). En même temps, l'animal maigrit et l'évolution entraîne des complications : insuffisance rénale, inflammation articulaire, gonflements des gonglions. En l'absence de traitement, le chien va devenir cachectique, la mort est souvent de règle.



Figure 17 : Chiens atteints de leishmaniose
(photos G. Bourdoiseau)

Chapitre III : Diagnostic biologique des leishmanioses

Le diagnostic des leishmanioses 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 (**Le Fichoux et al., 1999**).

1- Mise en évidence du parasite

1-1- Examen microscopique

Il permet la recherche des amastigotes intracellulaires (corps de Leishman-Donovan) dans les macrophages sur frottis. Les formes amastigotes sont, soit contenues dans les cellules histiocytaires, soit extracellulaires. On y reconnaîtra le noyau de couleur pourpre et le kinétoplaste juxta nucléaire plus foncé.

Dans les leishmanioses cutanées, les anticorps anti-leishmaniens des sérums peuvent être détectés avec une technique standard et sensible, cependant, en pratique le diagnostic est basé sur la microscopie par identification des amastigotes dans les biopsies, les produits de raclages ou les appositions ganglionnaires (**Murray et al., 2005**).

Les frottis seront faits à partir de matériel prélevé par ponction de moelle osseuse, de rate ou de lymphes dermiques. Pour les lésions cutanées, le prélèvement se fera par raclage au vaccinostyle à la périphérie de la lésion. Les frottis fixés au méthanol, seront colorés au May Grünwald Giemsa.

Réalisé par un opérateur expérimenté, la microscopie semble être le meilleur Examen pour le diagnostic (**Del Giudice et al, 1998**).

Il est parfois possible de trouver des amastigotes dans le sang.

1-2- Culture

Elle permet la croissance des formes promastigotes à partir des ponctions ou des

biopsies, dans des milieux d'isolement appropriés (**Wery, 1995**). Le milieu le plus utilisé est le milieu Novy-Mac Neal- Nicolle (N.N.N.). C'est un milieu diphasique composé d'une phase solide faite de gélose salée avec 10% de sang de lapin défibriné et une phase liquide constituée de l'exsudat produit à partir de la gélose au sang.

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI qui donne d'excellents résultats avec un minimum de risque de contamination. Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques : pénicilline streptomycine ou pénicilline- gentamycine et exceptionnellement d'antifongiques, la 5-fluorocytosine (**Bachi, 2001**).

L'ensemencement doit évidemment être fait à partir de matériel stérile au point de vue microbien et mycotique. La croissance apparaît après deux semaines environ à 26°C (**Choi et Lerner, 2001**). 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.

1-3- Inoculation aux animaux

Le hamster doré de Syrie et le cobaye sont les animaux les plus réceptifs. L'inoculation se fera dans le coussinet plantaire pour les parasites de la peau, par voie intra péritonéale pour les parasites viscéraux. Une période prépatente de plusieurs semaines est souvent observée. Les animaux sont aussi utilisés comme intermédiaire entre un prélèvement impossible à stériliser et la mise en culture, lorsqu'il est important d'isoler la souche (**Wery, 1995**).

1-4- Techniques modernes permettant la détection du parasite

Elles permettent de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie). Elles permettent aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable.

La détection des antigènes excrétés par les amastigotes se fera par des anticorps monoclonaux et celle des acides nucléiques du parasite, par hybridation moléculaire (sondes marquées aux isotopes) ou amplification de séquences identifiées (PCR) suivie d'hybridation.

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.

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.

Le processus est initié par la fixation d'amorces oligonucléotidiques (≈ 20 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 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 $\rightarrow 3'$.

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives. Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. En pratique, il n'est pas rare que les réactions de PCR en replica donnent des taux différents d'amplicons.

Le développement de la **PCR quantitative en temps réel** (utilisée dans notre étude) a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière.

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Figure 18). Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit le temps d'analyse. Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle.

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. **SYBR Green I**, utilisé dans notre étude) et les sondes fluorescentes. Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalants comme le SYBR Green I et les agents se fixant au sillon mineur comme le Hoeschst 33258. Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser et possède plus de sensibilité que d'autres agents sans inhiber la réaction d'amplification. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant

la réaction. La technologie basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces. Étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle (Poitras et Houde, 2002).

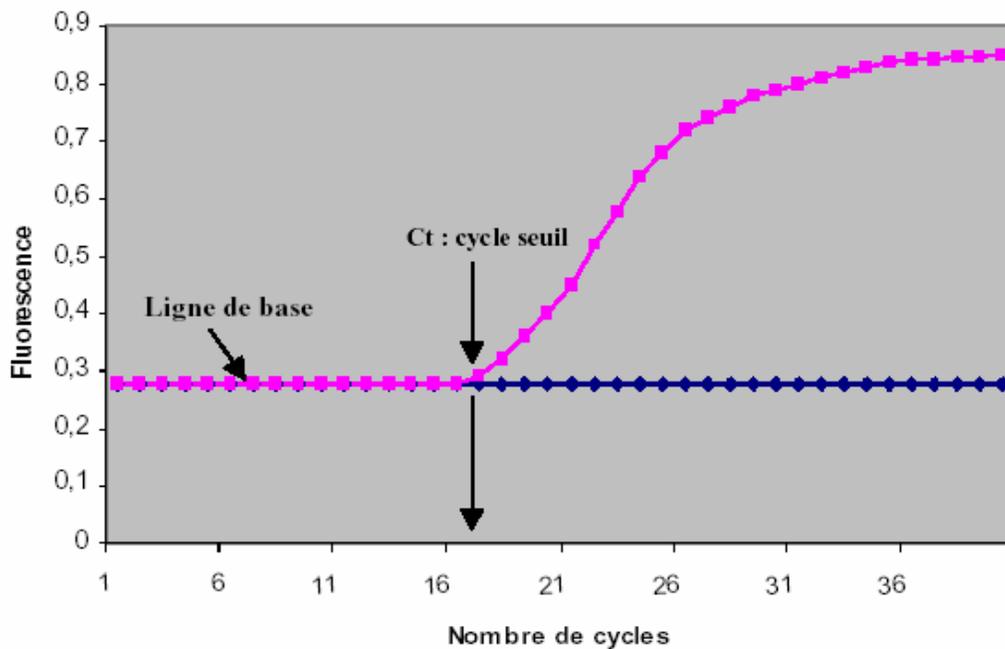


Figure 18 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (Poitras et Houde, 2002).

Les avantages de la PCR en temps réel :

- ❖ elle évite la phase post-PCR, c'est-à-dire la migration sur gel d'agarose, donc elle est plus rapide.

- ❖ la technique est automatisée : la plupart des calculs sont rendus par l'ordinateur après traitement informatique des données sous forme de courbe.
- ❖ Elle limite les risques de dissémination de l'ADN et des contaminations.
- ❖ Elle permet une évaluation quantitative de l'ADN contenu dans les prélèvements qui a un intérêt pour le suivi de la maladie.

Le rendement de la PCR en comparaison à celui de l'examen direct, de la myéloculture et de la sérologie a été comparé par **Piarroux et al., 1994** pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale chez les immunodéprimés. Il en résulte que le pourcentage de sensibilité de la PCR est de 80% par rapport à celui du myélogramme et de la myéloculture (55% respectivement).

2- Diagnostic sérologique

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées dans le diagnostic de la LV. Elles font appel à des antigènes de nature et de modalités de préparation variées. Les *kits* commerciaux ont détrôné les préparations d'antigènes fabriquées au laboratoire. Les antigènes sont couramment préparés à partir des formes promastigotes de culture d'espèces viscérotropes de *Leishmania*. Les préparations contiennent soit des antigènes figurés, soit des extraits antigéniques.

De nombreuses réactions immunologiques ont été utilisées. Les plus courantes, à l'heure actuelle, sont les réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI), d'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), d'électrosynérèse (ES), d'agglutination indirecte (DAT) et d'hémagglutination indirecte (HAI) (**Dedet, 2001**), le Western Blot (W.B.).

2-1-Hémagglutination indirecte

Elle consiste à mettre en présence des dilutions croissantes de sérum et des globules rouges sensibilisés par un antigène leishmanien. Si l'échantillon sérique contient des anticorps spécifiques, ceux-ci sont agglutinés par les érythrocytes sensibilisés. Dans le cas contraire, les cellules se déposent au fond des cupules sous forme d'un bouton.

C'est une technique qui est peu utilisée en raison de son défaut de sensibilité et de spécificité. Selon **Belazzoug et al., 1986** sa sensibilité est de l'ordre de 83,3% contre 98,3% pour l'IFI. Ces constatations ont été confirmées par **Gambarelli et al., 1987**). Ce dernier,

trouve une sensibilité moindre de l'H.A.I par rapport à l'IFI et l'ES. Quant à sa spécificité, elle est tout juste passable.

2-2-Immumofluorescence indirecte

Elle consiste à mettre en présence un antigène figuré avec 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 fluorosceine). A l'examen en lumière ultraviolette, le parasite apparaît fluorescent.

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**). Elle constitue la technique de choix dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale.

2-3- ELISA

C'est une technique qui utilise des antigènes solubles fixés par absorption sur l'alvéole des plaques de microtitration. Les anticorps qui viennent s'y fixer sont révélés par des antiglobulines humaines liées par une enzyme (souvent la peroxydase) qui, en agissant sur un substrat incolore entraîne l'apparition d'une coloration plus ou moins intense en fonction de la quantité d'enzymes présentes, donc du complexe anticorps-antiglobulines humaines fixés.

La lecture se fait à l'œil nu, après dilutions successives, le titre étant l'inverse de la plus forte dilution ayant donné un résultat encore positif, soit au spectrophotomètre, par la mesure d'une densité optique sur une seule dilution (**Kamoun et Fréjaville, 2002 ; Toga, 1984 cité par Bachi, 2001**).

Les avantages de cette technique sont nombreux : grande sensibilité, automatisation, détection sélective possible des immunoglobulines (IgE, IgM, IgA), économie de réactifs et de sérums.

2-4- Agglutination directe

Elle consiste à mettre en présence des dilutions successives de sérum avec des formes promastigotes de *Leishmania* trypsinées et colorées au bleu d'Evans ou au bleu de coomassie. Une réaction positive témoin de la présence d'anticorps s'objective 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. Proposée comme moyen de dépistage de la leishmaniose canine, Bensaïd et al, 1992, lui trouvent une concordance de 99,6% entre le D.A.T. et l'I.F.I. (**Bachi, 2001**).

2-5- Test au Latex

Il consiste à mettre en présence le sérum avec des billes de latex sensibilisées par l'antigène leishmanien. Une réponse positive donne une agglutination visible à l'œil nu. Ce test a été mis au point, par **Dereure** et al, 1998, et appliqué au cours des enquêtes épidémiologiques en Algérie, Maroc, Syrie, Yemen, et en France. Il aurait une sensibilité comparable, sinon supérieure à celle de l'I.F.I. avec cependant un inconvénient : test qualitatif seulement.

2-6- Electrosynérèse

C'est une technique d'immunoprécipitation, elle consiste à faire migrer conjointement l'antigène et l'anticorps sous une différence de potentielle. Au point de rencontre, il se forme un complexe Ag-Ac matérialisé par un arc de précipitation (**Bachi, 2001**).

2-7- Western Blot

La réponse humorale au cours de la LV est détectée en routine par des techniques immunologiques telle que l'IFI, l'ELISA et l'ES sensibles et spécifiques. Cependant, la survenue de cette affection sur des terrains immunologiques particuliers et la recherche plus systématique de cette affection chez les personnes atteintes de SIDA nécessitent la mise au point de moyens diagnostics encore plus sensibles tout en conservant une excellente spécificité.

Le Western Blot a été introduit pour la première fois en 1979 par **Towbin** et al puis perfectionné par en 1985 par **Pierce** et al.(cité par **Bachi, 2000**). L'extrait proteique résolu par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) est transféré sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse transversale permettant d'avoir une réplique fidèle des protéines transférées.

Les protéines ainsi transférées sont incubées avec les sérums et les couples Ag-Ac sont révélés par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à la phosphatase alcaline.

La révélation du ligand immunoenzymatique se fait par l'addition du substrat spécifique de l'enzyme.

3- Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée provoquée par l'injection intradermique de promastigotes de culture, lavés et mis en suspension dans une solution saline contenant 0,5% de phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). La « leishmanine » contient un million de parasites par ml. La dose individuelle comporte 0,1 ml, c'est-à-dire, 100.000 parasites. Une injection de 0,1 ml de solution phénolée sans parasites est faite à proximité, comme témoin d'une éventuelle sensibilité du patient au phénol.

Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème. On facilite la mesure en traçant au bic, sur la peau avoisinante et suivant les diamètres, des lignes qui s'arrêtent au bord de l'induration. Les degrés sont exprimés de 1 à 4, d'après le diamètre (de <4 mm à > 8 mm).

Cette réaction est positive chez les sujets ayant fait une leishmaniose viscérale antérieurement. Elle reste positive après la guérison pendant toute la vie du patient et est utilisée en épidémiologie du Kala-azar. Pour les leishmanioses cutanées, elle peut aider au diagnostic (**Wery, 1995**).

4- Identification des *Leishmania*

4-1- Analyse biochimique des isoenzymes

Impossible à distinguer morphologiquement, les *Leishmania* sont identifiées depuis une quinzaine d'années par l'analyse biochimique des isoenzymes. Celle-ci fait appel à deux techniques : l'électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques et l'isoélectrofocalisation. Ces techniques permettent à la fois des synthèses taxonomiques et l'étude des foyers naturels d'infection.

La méthode d'identification des *Leishmania* réalisée au Centre National de Référence des Leishmania de Montpellier, repose sur la caractérisation isoenzymatique par électrophorèse sur gel épais d'amidon avec 15 systèmes enzymatiques (**Rioux et al, 1990**). Cette technique malgré son ancienneté (24 années de pratique, plus de 4.600 souches identifiées), reste une technique de référence reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé.

En pratique, les protéines extraites sont préparées à partir de cultures en masse de promastigotes. Les isoenzymes sont séparées sous forme d'électromorphes après électrophorèse sur gel d'amidon avec les quinze systèmes enzymatiques. Les enzymes utilisés sont les suivants : malate déshydrogénase : MDH, EC 1.1.1.37 ; enzyme malique : ME, EC 1.1.1.40 ; isocitrate déshydrogénase : ICD, EC 1.1.1.42 ; 6-phosphogluconate déshydrogénase : PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose-6-phosphate déshydrogénase : G6PD, EC 1.1.1.49 ; glutamate déshydrogénase : GLUD, EC 1.4.1.3. ; NADH diaphorase : DIA, EC 1.6.2.2. ; purine nucléoside phosphorylase : NP 1, EC 2.4.2.1. ; purine nucléoside phosphorylase : NP 2, EC 2.4.2.* ; glutamate-oxaloactétate transaminase : GOT 1, EC 2.6.1.1. ; glutamate-oxaloacétate transaminase : GOT 2, EC 2.6.1.1. ; phosphoglucomutase : PGM EC 5.4.2.2. ; fumarate hydratase : FH, EC 4.2.1.2. ; mannose phosphate isomérase : MPI, EC 5.3.1.8. ; glucose phosphate isomérase : GPI, EC 5.3.1.9.

Après électrophorèse, les enzymes contenues dans les extraits protéiniques sont révélées par une « tâche colorée » appelée électromorphe. Celui-ci correspond à la distance parcourue par l'enzyme dans un gel d'amidon à un pH déterminé. Dans le cas des déshydrogénases, le produit de la réaction colorée est un précipité bleu de formazan. Le zymodème est établi après obtention de 15 électromorphes correspondant aux 15 isoenzymes utilisés. On définit par zymodème, l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique.

Les *Leishmania* se caractérisent par un grand polymorphisme. Plus de deux cents zymodèmes sont à ce jour individualisés. A chaque zymodème est affectée une souche marqueur dont l'une : MHOM/FR//LEM 75, *L. infantum* MON-1, est la souche étalon qui sert de référence pour identifier chaque électromorphe.

4-2- Identification moléculaire par PCR séquençage

C'est une identification moléculaire réalisée au CNRL depuis fin 1998. Elle est basée sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique d'une région de 1265 pb du gène de la RNA polymérase II, à partir d'un travail original de **Croan et al., 1997**. L'intérêt de cette approche, qui fait appel aux techniques d'amplification génétique et de séquençage, est d'utiliser des amorces « universelles », valables pour toutes les espèces du genre *Leishmania*. Cette méthode a nécessité préalablement le séquençage de cette région pour toutes les espèces de *Leishmania* connues. La banque du CNRL contient 31 espèces différentes de trypanosomatidés, parmi lesquelles 26 appartiennent au genre *Leishmania*. Ce travail a montré qu'il existe un polymorphisme nucléotidique de la région étudiée, permettant de distinguer spécifiquement chacune de ces espèces entre elles.

Ce programme a tout d'abord été appliqué à la différenciation entre les espèces *L. braziliensis* et *L. guyanensis*. Il est étendu à l'identification de l'ensemble des espèces reçues dans le laboratoire et une étude préliminaire a identifié 3 autres espèces (2 souches de *L. major* et 1 souche de *L. infantum*) à partir de prélèvements biologiques. L'amplification directe de l'ADN extrait de biopsies cutanées a été mise au point, ceci pour éviter la mise en culture des parasites.

5- Génotypage des Leishmania

Comme tous les Kinétoplastidés, les *Leishmania* ont un génome nucléaire et un génome kinétoplastique, qui ont tous deux des caractéristiques inhabituelles, en particulier dans les mécanismes de transcription. Certains mécanismes liés à l'expression de ces génomes sont originaux (transcription, polycistonique, épissage de transsystème, modification de l'acide ribonucléique transcrit (RNA editing) ce qui justifie l'intérêt de leur étude.

La bonne connaissance de la structure du génome de *Leishmania* obtenue ces dernières années fait de ce parasite un modèle pour la génomique des protozoaires. La taille du génome haploïde a pu être précisément déterminée par l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé (car les chromosomes ne se condensent pas au cours du cycle cellulaire). Elle est de 36 millions de paires de base, relativement constante selon les espèces . Le nombre de chromosomes est de 36 pour les espèces de l'Ancien Monde et 34 et 35 pour celles du Nouveau Monde. Un réseau international (*Leishmania* Genome Network : www.ebi.ac.uk/parasites/leish.html) réalise la cartographie et le séquençage systématique du génome. Le chromosome 1 a été séquençé, ce qui a doublé le nombre de gènes connus chez *Leishmania*. Trois autres chromosomes sont actuellement en cours de séquençage. De nombreux gènes potentiels vont, de ce fait, être identifiés. Dans les prochaines décennies, la génomique fonctionnelle devra les caractériser et identifier la fonction des protéines pour lesquelles ils codent (**Dedet, 2001**).

Partie I: Patients

1-Données épidémiologiques et cliniques

Il s'agit d'une étude réalisée de Septembre 2003 à Mai 2006. 660 cas suspects de leishmanioses ont été recensés pendant cette période : 489 cas de leishmaniose cutanée et 171 cas suspects de leishmaniose viscérale (Figure 19). Les 139 cas manquants de leishmaniose cutanée et les 54 cas de leishmaniose viscérale n'ayant pas été retenus dans notre étude.

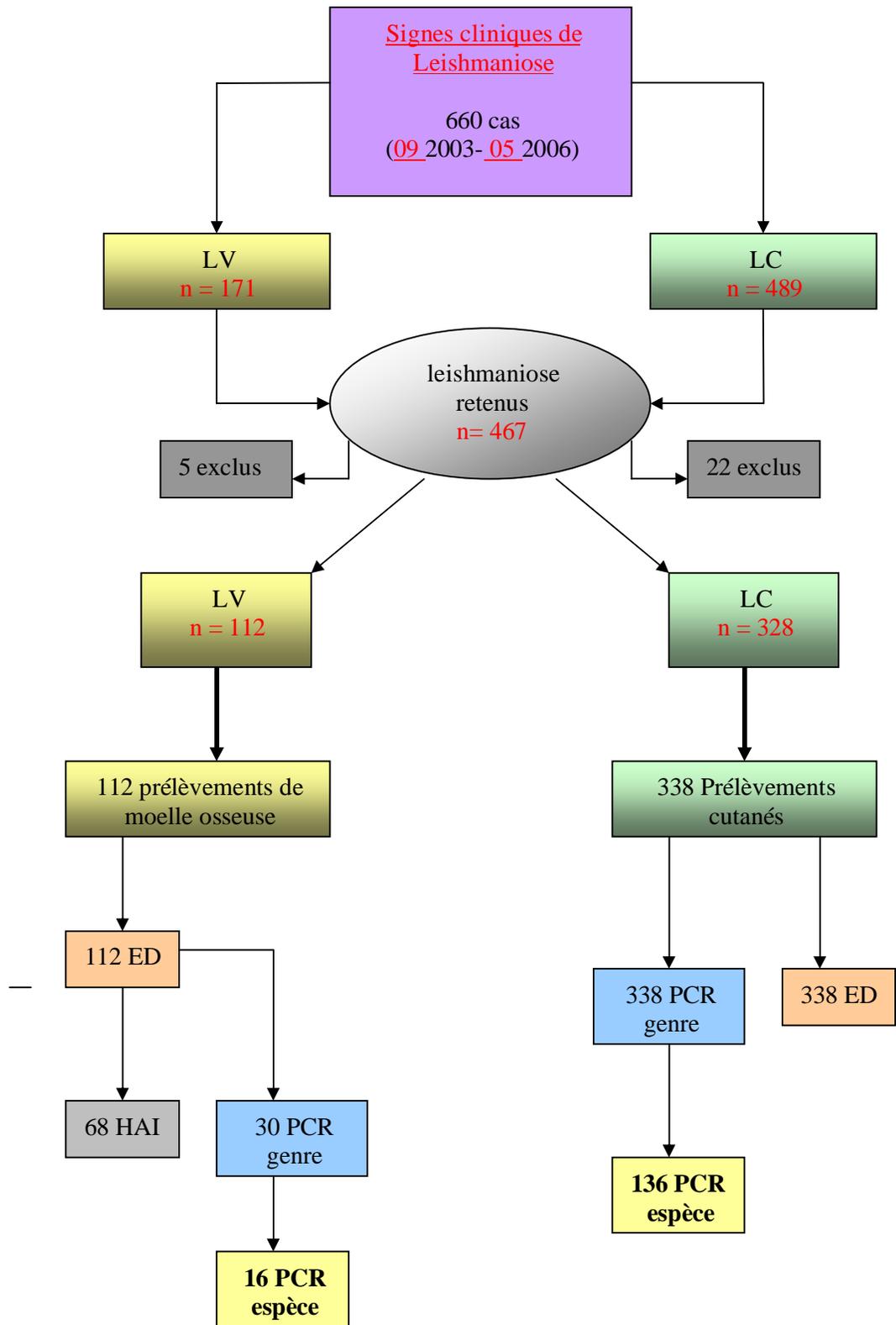


Figure 19 : Schéma pratique de l'étude

1-1- La leishmaniose cutanée

L'étude a concerné 328/489 (67%) sujets, orientés au laboratoire de parasitologie et mycologie du C.H.U. de Constantine, après diagnostic clinique d'une lésion évoquant une leishmaniose cutanée. Les critères d'exclusion étaient ; surinfection de la lésion, traitement anti-leishmanien dans les trois mois précédant l'étude ou des lésions dont l'aspect clinique évoquait une infection mycologique. Pour un même patient, plusieurs prélèvements ont pu être réalisés.

Les patients sont âgés de 1 an à 90 ans tout sexe confondu. Les enfants (moins de 16 ans) représentent 17,5 % de l'ensemble des malades. Les malades provenaient de Constantine (Constantine ville, Boussouf, Gammass, Daksi, Ziadia, Zouaghi) et de ses environs (Bekira, Ibn Ziad, Zighoud Youcef, Didouche Mourad, Beni H'miden, Hamma Bouziane, Athmania) ainsi que d'autres wilaya (Skikda, Jijel, Guelma, Sétif, Mila, Jijel, Oum El Bouaghi, Khenchla, Tebessa) et parfois des wilaya du Sud du pays tels que Biskra, El Oued, Adrar (Figure 20).

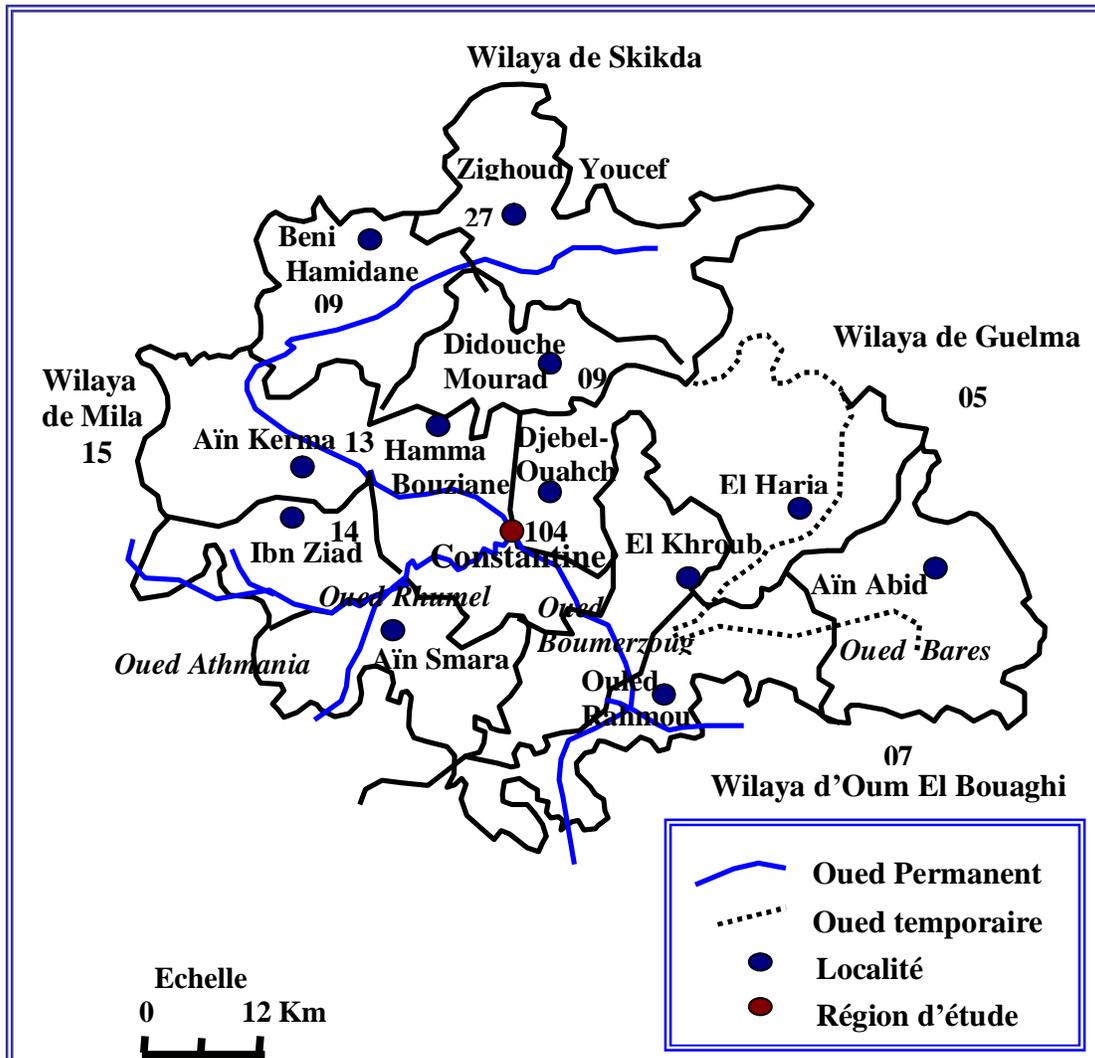


Figure 20 : Distribution géographique des cas de leishmaniose cutanée dans le foyer de Constantine

1-2- La leishmaniose viscérale

Durant cette étude, 112/171 (65,49%) patients ont été orientés au Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie du CHU Ben Badis par les services de pédiatrie pour la plupart. Les malades ont bénéficié d'une hospitalisation sur des arguments cliniques : fièvre anarchique, splénomégalie, hépatomégalie, pâleur cutanéomuqueuse et biologiques : anémie

normocytaire, pancytopenie, thrombopénie, syndrome inflammatoire, évoquant une leishmaniose viscérale.

L'âge moyen des enfants est de 7,2 ans. Les patients sont originaires aussi bien de Constantine que de ses environs (Ibn Ziad, Hamma Bouziane, Ain Abid, Chelghoum Laid). Certains d'entre eux résident au sein d'autres wilaya, notamment, Mila, Jijel, Skikda, Annaba, Guelma, Khenchla, Oum El Bouaghi, Batna, et Tabessa (annexe III).

Partie II : Méthodes

1- Echantillons

1-1- Souches de référence

Les souches de référence utilisées dans notre étude ont été fournies gracieusement par Marina Gramiccia (Institute Superiore di Sanita, Roma, Italy). Il s'agit de:

L. infantum (MOHM/TN/80/IPT1)

L. major : MOHM/SU/73/5-ASKH

L. tropica : MOHM/SU/74/K27

L. donovani : MOHM/IN/80/DD8

1-2- Prélèvements cutanés

Pour chaque patient, un prélèvement de sang et/ou de sérosités a été réalisé par application d'une bandelette de papier Whatman 3 MM, sur la lésion désinfectée et débarrassée de sa croûte. En parallèle, le produit de raclage de la lésion a été étalé sur lame porte-objet (3 lames/malade).

Les prélèvements sur papier sont complètement séchés à l'air libre et séparés les uns des autres avec du papier absorbant, afin d'éviter d'éventuelles contaminations. Les échantillons sont identifiés et conservés dans des sacs hermétiques, à l'abri de la chaleur et de l'humidité. Les sacs sont mis sous plis fermés, puis envoyés par courrier normal (voie aérienne), en vue du diagnostic

moléculaire au laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, Université Claude-Bernard-Lyon1.

1-3- Moelle osseuse

112 prélèvements ont été réalisés durant cette étude. Pour chaque malade, la moelle osseuse a été prélevée, par ponction sternale ou iliaque à l'aide d'un trocard, par un médecin pédiatre spécialisé. La moelle est étalée sur lame (3 à 4 lames), séchée à l'air libre puis envoyée au laboratoire de parasitologie pour une exploration microscopique (recherche de corps de Leishman). Deux lames, au minimum, sont réservées pour la coloration au Giemsa.

Le contenu des lames de 30 patients a été reconstitué avec quelques gouttes d'eau physiologique puis recueilli sur papier filtre Whatman 3MM en vue d'un diagnostic moléculaire.

L'ensemble des échantillons déposés sur papier buvard a été traité comme les biopsies cutanées (paragraphe 1-2)

2- Examen direct : Coloration de Giemsa

Les lames sont fixées par du méthanol pendant 1 minute puis colorées au Giemsa (dilué à 20%) (annexe I) pendant 20 minutes. L'observation microscopique au Grossissement X 100 permet de déceler la présence des formes amastigotes intracellulaires dans les prélèvements.

3- Diagnostic moléculaire

L'examen direct et les étapes du diagnostic moléculaire se déroulent selon le même protocole pour les biopsies cutanées et les moelles osseuses déposés sur papier Wathman 3MM.

3-1- Extraction d'ADN

3-1-1- Souches de référence

Après une culture sur milieu RPMI (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplémenté en sérum de veau fœtal à 15% et pénicilline (250 000 unités, Panpharma) l'ADN des 4 souches de référence a été extrait avec le kit QiaAmp DNA mini Kit Qiagen (Courtaboeuf, France) en respectant les conditions du fournisseur. Quelques modifications ont été cependant apportées. L'incubation initiale avec la protéinase K a été allongée à une heure et l'éluion finale se fait dans 50 µl d'eau stérile.

L'ADN extrait est aliquoté par volume de 10 µl en tube Eppendorf stérile et conservé à -20°C jusqu'à réalisation de la PCR.

3-1-2- Papier buvard (Wathman 3MM)

L'ADN a été extrait à partir des buvards en utilisant la résine chélatrice d'ADN, InstaGene (Biorad, Marnes la Coquette, France).

Les étapes sont les suivantes :

- 1- Découper, en petits morceaux, une zone imprégnée d'environ un centimètre de diamètre dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml.
- 2- Recouvrir les papiers par 1 ml de saponine à 5% et laisser incuber 1 heure à température ambiante en agitant par retournement en milieu et fin d'incubation.
- 3- Centrifuger 3 minutes à 8000 tours par minute. Eliminer le surnageant.
- 4- Après homogénéisation, ajouter 200 µl de résine Instagene.
- 5- Placer les tubes pendant 30 minutes à 56 °C au bain-marie. Mélanger en milieu et fin d'incubation.
- 6- A la fin de l'incubation, plonger immédiatement le tube dans de l'eau bouillante pendant 8 minutes.
- 7- Centrifuger 3 mn à 14000 tours/mn.
- 8- Récupérer le surnageant .Diluer le au 1/5 dans de l'eau stérile.
- 9- Conserver à – 20°C avant la PCR.

3-2- La PCR en temps réel

3-2-1- Principe de la technologie SybrGreen™

La PCR en temps réel du genre *Leishmania* a été réalisée sur Lightcycler™ (Roche Molecular diagnostics, Meylan, France) selon la technologie SybrGreen (Figure 21). Le SybrGreen est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence verte quand il est incorporé dans de l'ADN double brin. L'intensité lumineuse émise par le fluorochrome mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification, est donc proportionnelle à la quantité de l'ADN cible présent dans l'échantillon.

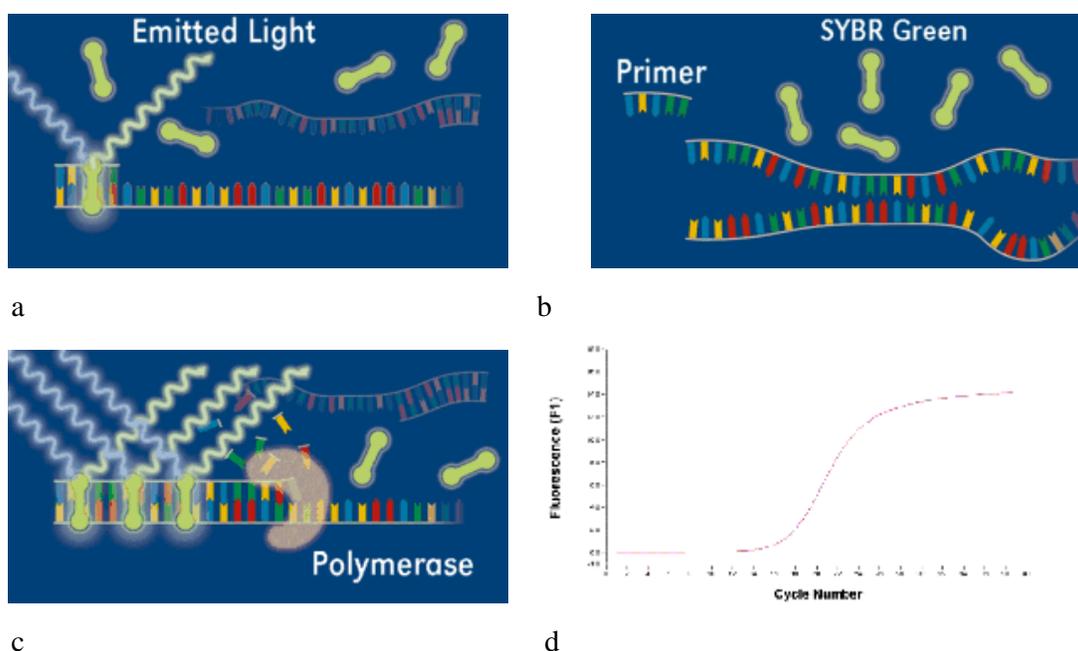


Figure 21 :Technologie SybrGreen (<http://biochem.roche.com/lightcycler/>)

Schémas d'incorporation du fluorochrome pendant la phase d'amplification de la PCR (a,b, c) et courbes d'amplification (d)

a phase d'amplification, étape de dénaturation

b phase d'amplification, étape d'hybridation

c phase d'amplification, étape d'élongation

d courbe d'amplification : intensité de fluorescence mesurée à la fin de chaque étape d'élongation

L'identification du produit de PCR est faite au cours d'une phase additionnelle ou phase de melting post amplification par l'analyse de la température de fusion spécifique du produit amplifié (Figure 22).

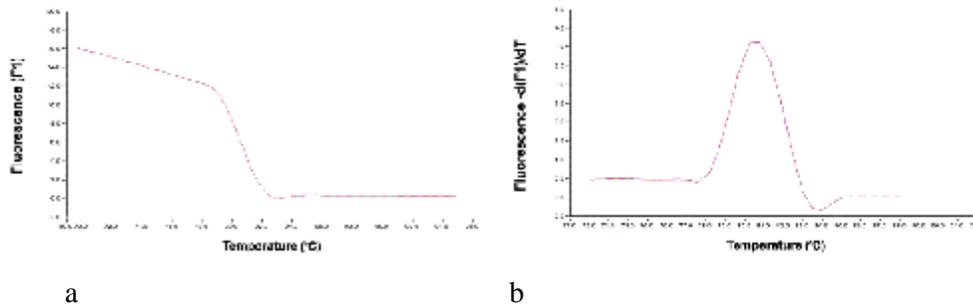


Figure 22 : Technologie SybrGreen :

Courbe de dénaturation (a) et Température de fusion (b) en fonction de la température

3-2-2- La PCR en temps réel genre

Le volume final par capillaire est de 20 μ l réparti entre 5 μ l d'ADN, 2 μ l de tampon Fast Start DNA master SybrGreen I (Roche applied Science), 4 mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de chaque amorce (JW11, JW12) et l'eau stérile.

Les amorces JW11 (5'-CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3') et JW12 (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3') ont été choisies sur la partie conservée de l'ADN des gènes codant les minicircles pour permettre l'amplification du genre Leishmanie (Nicolas et al., 2002).

Les conditions de la PCR sont les suivantes : après une dénaturation de 4 minutes à 95°C, l'amplification se déroule pendant 40 cycles avec une étape de dénaturation (95°C pendant 10 secondes), d'hybridation (62°C pendant 10 secondes) et d'élongation (72°C pendant 10 secondes). Elle est suivie d'une phase de fusion où la température passe de 67°C à 98°C à une vitesse de 0.1 °C par seconde.

La température de fusion du produit obtenu est 83.5 ± 0.5 . Un contrôle négatif (sang humain total non parasité) et un contrôle positif (*L. infantum* (MOHM/TN/80/IPT1)) sont inclus dans chaque série (Figure 23).

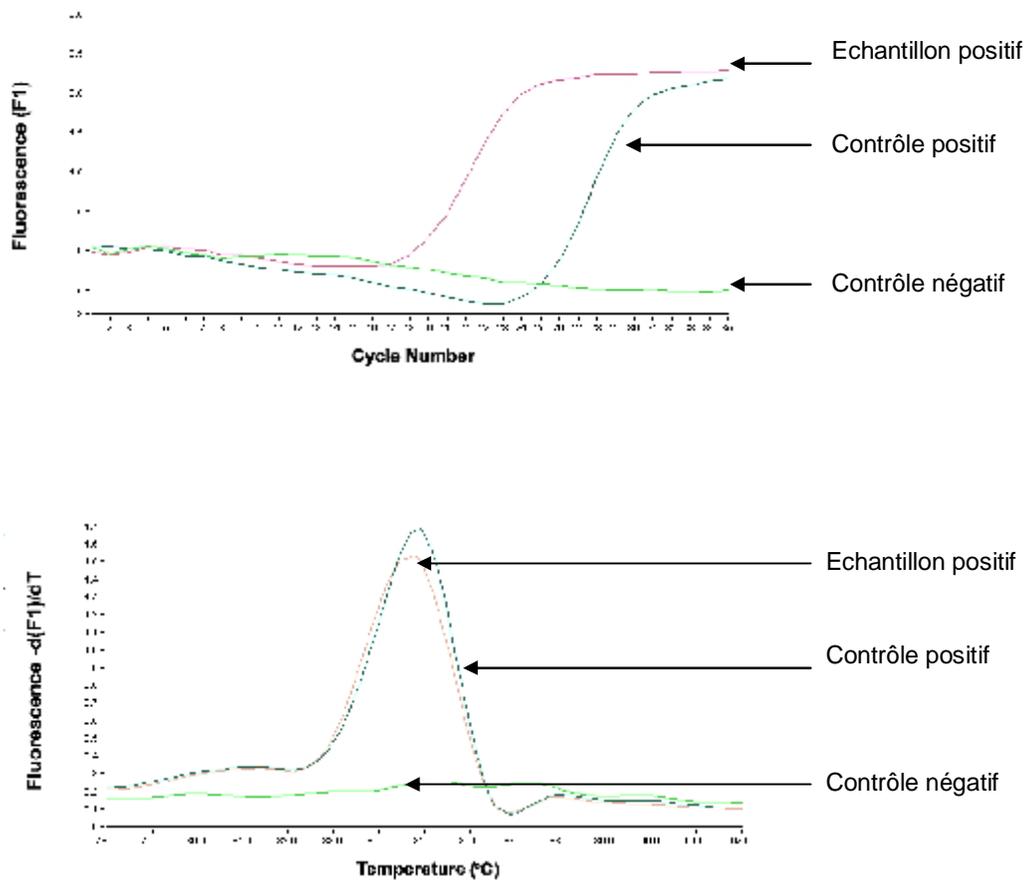


Figure 23 : Courbes d'amplification et de fusion obtenues avec les amorces JW11 et JW12

Haut : courbes d'amplification.

Bas : courbes de fusion et température de fusion spécifique du produit amplifié ($84,5^{\circ}\text{C}$).

Un témoin positif (*L. infantum*) et un témoin négatif (sang humain non parasité) sont inclus dans chaque série.

Un échantillon est positif quand il présente une courbe d'amplification et une température de fusion identiques à celles du témoin positif.

3-2-3- La PCR d'espèces en temps réel

La PCR d'espèce en temps réel se déroule dans les mêmes conditions que la PCR genre. Cependant, les amorces JW13 (5'-ACTGGGGGTTGGTGTAATAATAGG - 3') et JW14 (5'- TTTCGCAGAACGCCCTACCC - 3') (Nicolas et al., 2002) ont été choisies pour permettre l'amplification des espèces *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*. Le mélange réactionnel est identique à celui préparé pour la PCR genre. Sont inclus dans chaque série, un contrôle négatif (sang humain non parasité), un contrôle positif représenté par les quatre souches de référence.

Les températures de fusion obtenues sont respectivement de 87.5 +/-0.3 °C, 88.5 +/-0.4 C, 89.5 +/-0.2 °C et 90.5 +/-0.2 °C pour *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* et *L. infantum* (Figure 24).

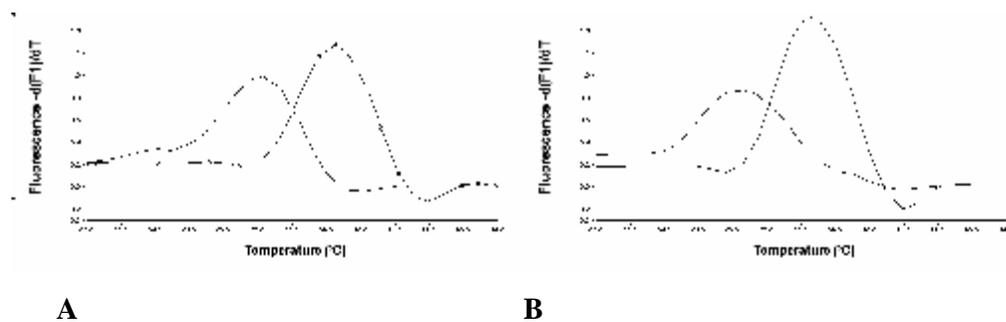


Figure 24: Identification des produits PCR avec la courbe de fusion

A : Courbes de fusion des produits PCR du complexe *L. donovani*.

Les températures de fusion sont respectivement $88.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ pour *L. donovani* et $90.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ pour *L. infantum*

B : courbes de fusion des produits PCR de *L. major* ($87,5 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) et *L. tropica* ($89.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$).

4- Hemagglutination indirecte

Le sérum de 68 patients suspects de LV avec un examen direct négatif, a été analysé en hémagglutination indirecte avec les Kits Cellognost Leishmaniasis (Dade Behring OSHL 21). Le sang des malades a été recueilli sur tubes secs, puis centrifugé. Les sérums recueillis sont récupérés dans des tubes Eppendorf en vue d'une éventuelle détection d'anticorps anti-leishmaniens par la méthode d'hémagglutination indirecte selon le protocole décrit ci-après (figure 25):

- 1- Déposer dans les cupules 1 des rangées A à H 100 μ l de sérum de contrôle positif puis des sérums de patients prédilués au 1/8 en solution tampon Tris (ex. 50 μ l de sérum + 350 μ l de tampon Tris), et dans la cupule A12 50 μ l de sérum de contrôle négatif prédilué au 1/6.
- 2- A l'aide d'une micropipette, établir des séries de dilutions en transférant pour chaque rangée 50 μ l d'une cupule à l'autre. Ne diluer le sérum ce contrôle positif de la rangée A que jusqu'à la cupule 11 (1/8192).
- 3- Ajouter 25 μ l de réactif HAI préparé dans les cupules 2 à 12, c'est-à-dire à partir des dilutions 1/16.
- 4- Mélanger soit manuellement soit à l'aide d'un agitateur, puis laisser reposer à la température ambiante pendant 2 à 3 heures.
- 5- Lecture se fait sur un fond blanc. La positivité des résultats se manifeste par la formation d'un voile qui traduit l'agglutination complète des cellules. Au contraire, la formation d'un bouton indique que le test est négatif (sédimentation des cellules).

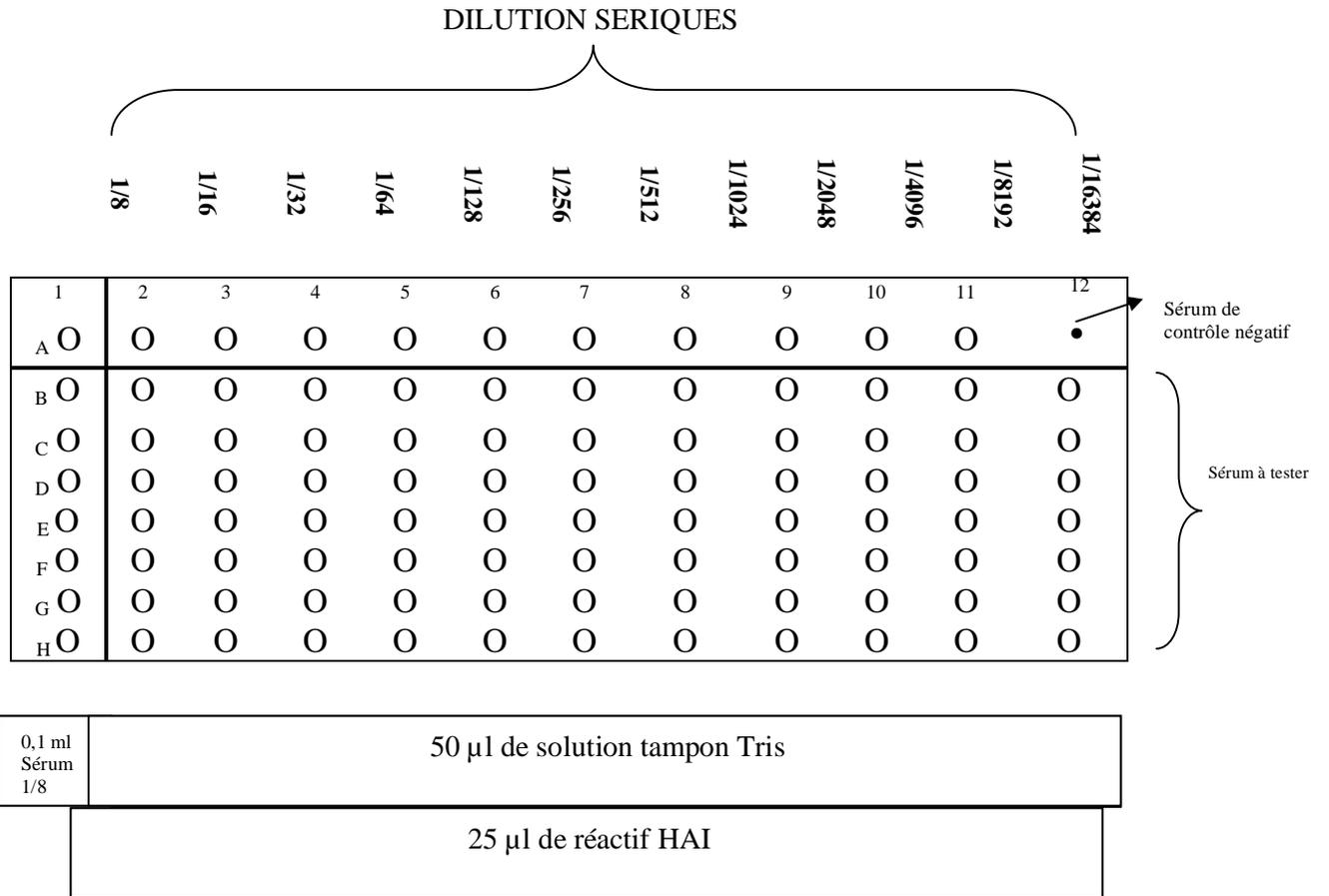


Figure 25 :Schéma du test d'Hémagglutination indirecte
(Dade Behring, OSHL 21)

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail est représenté dans la figure 26.

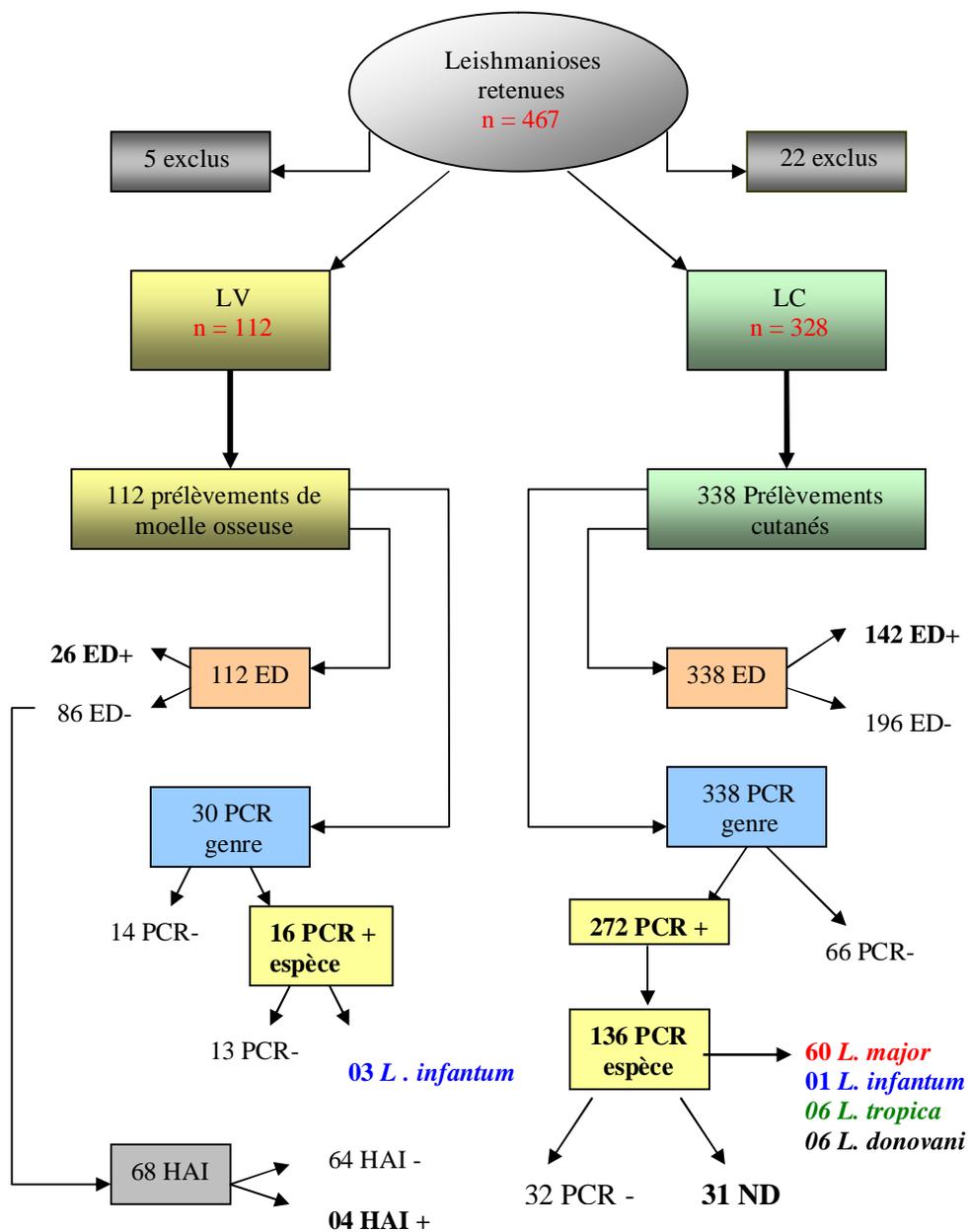


Figure 26 : Présentation schématique des résultats de l'étude.

1- Leishmaniose cutanée

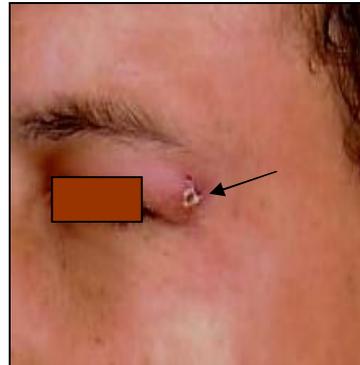
1-1- Patients

328 patients ont été inclus pendant la période de l'étude (annexe II). Le sexe ratio est de 1,48 (196 hommes/132 femmes). L'âge moyen des patients est $32,1 \pm 19,5$ ans (médiane : 27) avec $28,3 \pm 16,5$ ans (médiane : 24) pour les hommes et $35 \pm 8,5$ ans (médiane : 35) pour les femmes. Cliniquement, les lésions siégeaient le plus souvent, sur les parties découvertes : la face (203 patients ; 61,8 %) et les membres (124 patients ; 37,8 %). Les lésions étaient parfois multiples et présentaient différents aspects : ulcéro-croûteuses, érythémateuses, nodulo-croûteuses, verruqueuses (figure 27) et parfois lupoïdes. Elles variaient entre 1 et 4 cm de diamètre.

Les photos ont été prises après l'accord des patients.



a- Lésion verruqueuse
de la joue droite



b- Lésion ulcéro-croûteuse
de la paupière supérieure
gauche



c- Lésion nodulo-croûteuse du cou



d- Lésion érythémato-croûteuse du nez et de la lèvre supérieure

Figure 27 : Différents types de lésions cutanées dans le foyer de Constantine

1-2- Examen parasitologique

338 examens parasitologiques des lésions cutanées ont été réalisés pour les 328 patients suspects de leishmaniose cutanée, dont certains présentaient plusieurs lésions. Parmi les patients, 10% seulement ont pu être suivis.

L'examen microscopique a permis de mettre en évidence des formes amastigotes dans 142/338 échantillons (42%) soient 137 malades positifs sur 328. Les prélèvements ayant donné un résultat négatif étant au nombre de 196 (57,87%), soit un nombre de patients de 191/328 (Tableau 1).

	Cas clinique suspects
ED +	142
ED -	196
Total	338
Sensibilité	42

Tableau 1 : Sensibilité de l'examen direct dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée

Les régions de Constantine, de Zighoud Youcef et d'Ibn Ziad représentent les trois foyers les plus importants de notre étude (Tableau 2). Les autres régions comportent un nombre de patients variant de 2 à 5.

Régions	Nombre de patients positifs (ED+)	Pourcentage
Constantine	39	27,5%
Zighoud Youcef	15	10,6%
Ibn Ziad	11	7,7 %
Oum El Bouaghi	05	3,5%
Beni H'miden	05	3,5%
Guelma	05	3,5%
Didouche Mourad	04	2,8%
Hamma Bouziane	03	2,2%
Skikda	03	2,2%
Khenchla	03	2,2%
Grarem	03	2,2%
Jijel	03	2,2%
Mila	02	1,4%
Bekira	02	1,4%
Sigüs	02	1,4%
Barika	02	1,4%
Adrar	02	1,4%
Autres : El Khroub, M'sila,Sedrata, Biskra, El Oued, Aïn Baida, Oran, Alger etc...	33	23,2%
Total	142	100%

Tableau 2 : Distribution des examens directs positifs dans les foyers de leishmanioses cutanées

Par ailleurs, comme le nombre de malades suspects de leishmaniose cutanée varie d'une région à l'autre, le rapport nombre de positifs / nombre de malades suspects varie de 23 à 100% selon les régions (Tableau 3).

Région	Examen direct positif (nombre de patients)	Patients suspects de leishmaniose cutanée	Pourcentage
Constantine	39	104	37,5%
Zighoud Youcef	15	27	55,6%
Ibn Ziad	11	14	78,6%
Oum El Bouaghi	05	07	71,4%
Beni H'miden	05	09	55,6%
Guelma	05	05	100%
Hamma Bouziane	03	13	23%
Didouche Mourad	04	09	44,5%

Tableau 3 : Résultats de la microscopie optique

1-3- La PCR en temps réel genre

L'ensemble des PCR a été validé par l'amplification des 4 souches de référence et l'absence d'amplification du blanc réactif. De même, l'absence d'amplification du témoin ADN humain confirme la spécificité de notre méthode.

La PCR en temps réel du genre *Leishmania* a été positive pour 272/338 prélèvements (80,5%) correspondant à 266/328 patients (81,1%) (Tableau 4).

	Cas clinique suspects
PCR+	272
PCR -	66
Total	338
Sensibilité	80

Tableau 4 : Sensibilité de la PCR en temps réel dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée

Par ailleurs, les patients ayant une PCR positive et un examen direct positif représentent un taux de 41,8 % (137/328 patients). Comparativement, ceux qui étaient négatifs à l'examen direct et positif en diagnostic moléculaire sont au nombre de 126/328 (38,4 %), soit un nombre d'échantillons égal à 130/338 (38,5 %).

L'augmentation de la sensibilité du diagnostic biologique obtenue par l'utilisation de la PCR quantitative par rapport à l'examen direct est donc de 129/328 malades, soit 1,94 fois plus importante.

Tous les malades négatifs en PCR sont également négatifs en microscopie.

Enfin, les échantillons ayant aussi bien un ED qu'une PCR négative étaient au nombre 66/338 (19,5 %) (Tableau 5).

ED	PCR	Nombre
+	+	142
-	+	130
-	-	66
Total		338

Tableau 5: Comparaison des résultats de l'examen direct et de la PCR chez les malades suspects de LC

La PCR en temps réel par Light-Cycler montre qu'il existe une différence de quantité d'ADN parasitaire évaluée par le cycle de sortie entre les populations positives en PCR avec examen direct positif ou négatif. En effet, les malades pour lesquels l'examen microscopique était positif présentent une limite de détection moyenne de $20,78 \pm 4,666$ cycles de PCR pour une moyenne de $29,34 \pm 3,931$ chez les patients dont l'examen direct était négatif.

1- 4- La PCR d'espèces en temps réel

Le rendement de la PCR espèce étant inférieur à celui de la PCR genre du fait de la longueur du fragment amplifié (600 pb à 700 pb pour l'espèce, au lieu de 120 pb, pour le genre), nous avons sélectionné 136 échantillons dont le cycle de sortie était inférieur ou égal à 25 cycles afin de disposer d'une quantité d'ADN suffisante.

Les résultats obtenus dans cette analyse montrent que 73/136 (53,7 %) ont pu être identifiés selon leur température de fusion par comparaison aux souches de référence (Cf Figure 24).

Cette étude qualitative moléculaire a permis d'identifier 60 souches comme appartenant à l'espèce *L. major*, 6 souches appartenant au complexe *L. donovani*, 1 souche attribuée à l'espèce *L. infantum* et 6 autres appartenant au complexe *L. tropica*. Cette dernière espèce ayant un génome complexe, ce qui rend son identification difficile. Par conséquent, nous proposons de mettre en place une autre PCR avec d'autres amorces afin de confirmer ces résultats.

Quant à *L. donovani*, son identification n'a pas été confirmée par le CNRL. En effet, le laboratoire ne différencie pas les deux souches et les résultats sont toujours rendus *L. infantum* / *L. donovani*.

Par ailleurs, 31/136 (22,8 %) n'ont pas été déterminés. Ces échantillons présentaient une température moyenne de $84,5^{\circ}\text{C} \pm 0.42$. Cette dernière ne correspondait à aucune des températures des souches de référence (Figure 28). Ces échantillons sont notés ND (non déterminés) dans le tableau 6.

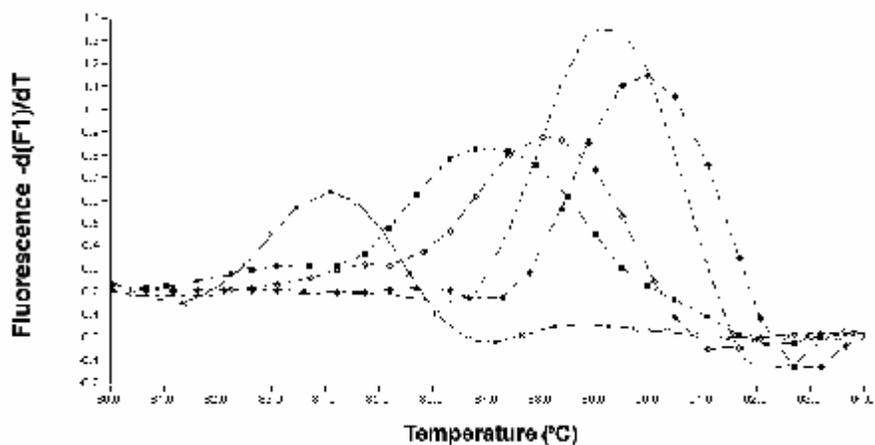


Figure 28 : Températures de fusion (TM) après amplification avec les amorces JW13 JW14.
De gauche à droite : Echantillon Non déterminé ($84,5 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$), *L. major* ($87,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), *L. donovani* ($88,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), *L. tropica* ($89,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), *L. infantum* ($90,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$)

Il est à noter que certains échantillons (5 non déterminés, 1 *L. donovani*, 2 *L. major*) ont été envoyés au Centre National de Référence des Leishmanies, Montpellier, France (**Docteur C. Ravel**) pour confirmation de l'espèce. L'identification de ces souches a été réalisée par PCR séquençage selon le protocole de **Croan et al ,1997** (Tableau 6).

Souches	PCR temps réel Labo. de Parasitologie, Lyon	CNRL , Montpellier PCR séquençage (Croan et al., 1997)
p18	Non déterminé	<i>L . infantum</i>
P52	Non déterminé	<i>L . infantum</i>
P72	<i>L. donovani</i>	<i>L . infantum/L. donovani</i>
P116	Non déterminé	<i>L . infantum</i>
P175	Non déterminé	<i>L . infantum</i>
P203	Non déterminé	<i>L . infantum</i>
P262	<i>L. major</i>	Non détectable
P272	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>

Tableau 6 : Identification des souches par PCR séquençage
et PCR en temps réel

1-5- Analyse épidémiologique

Dans notre étude, les espèces identifiées dans le foyer de Constantine sont réparties selon la figure ci-dessous.

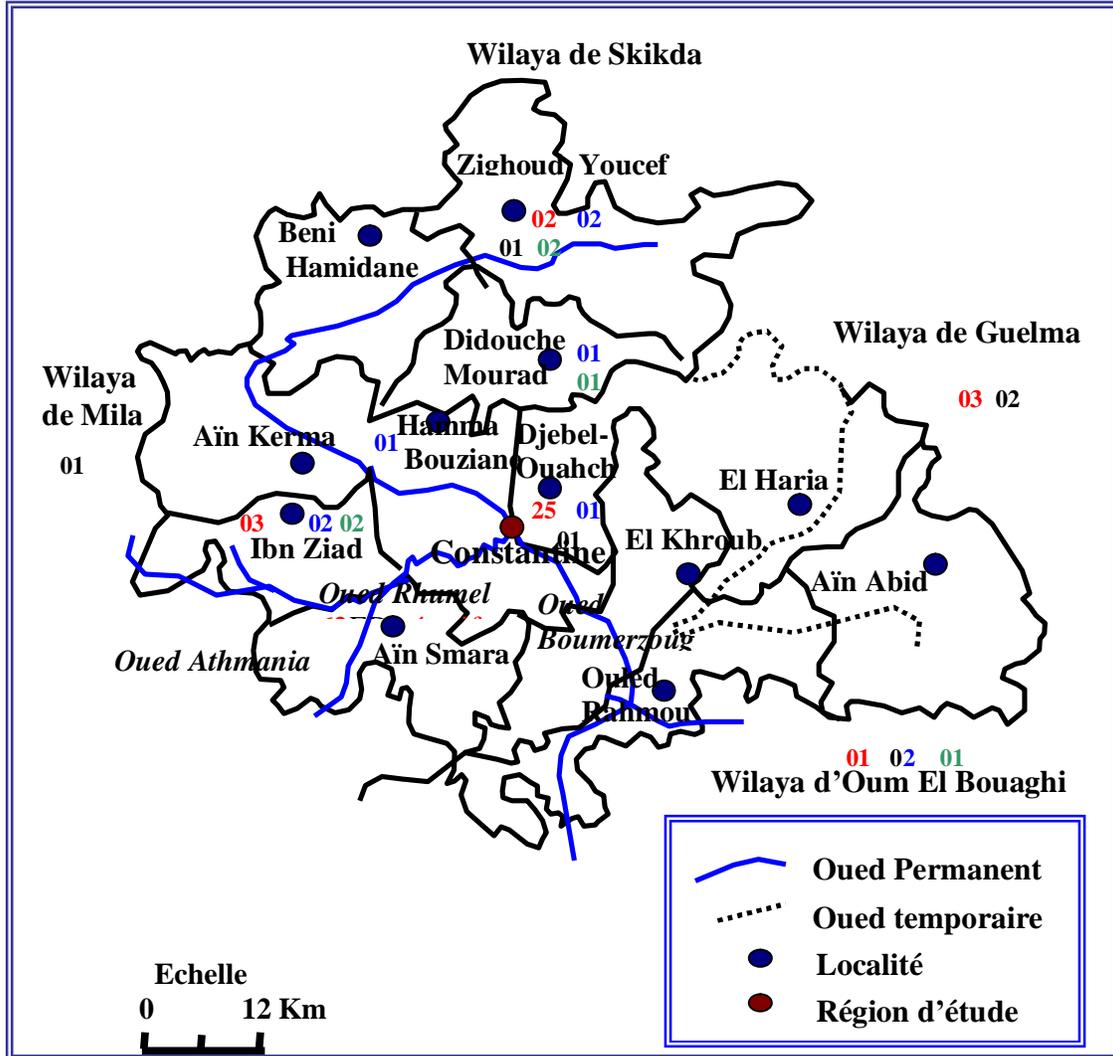


Figure 29 : Répartition des espèces identifiées dans le foyer de Constantine
 (rouge : *L. major* ; bleu : *L. infantum* ; noir : *L. donovani* ; vert : *L. tropica*)

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les malades porteurs du parasite *L. major* et qui proviennent de Constantine sont plus nombreux (25/60) que ceux originaires des autres régions du pays. D'après notre étude cette espèce est répartie au niveau des différentes localités selon le tableau 7.

Région	<i>L. major</i>		<i>L. infantum</i>		<i>L. donovani</i>		<i>L. tropica</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Constantine	25	41,6%			01	16,7%		
Khenchla	03	5%					01	16,7%
Ibn Ziad	03	5%	02	33,3%				
Guelma	03	5%			02	33,3%		
Zighoud Youcef	02	03,3%	02	33,3%	01	16,7%	02	33,3%
Batna	02	03,3%						
Bekira	02	03,3%	01	16,7%				
Aïn Baida	02	03,3%						
Oran	02	03,3%						
El Oued	03	5%						
HammaBouziane			01	16,7%				
DidoucheMourad							01	16,7%
Ferdjioua					01	16,7%		
Biskra	02	03,3						
Tamalous	01	1,6						
Tizi Ouzou	01	1,6						
Boussaâda	01	1,6						
Barika	01	1,6						
Tissemsilt	01	1,6						
Meskana	01	1,6						
Oum El Bouaghi	01	1,6					01	16,7%
Jijel							01	16,7%
Skikda	01	1,6						
Ben Boulaïd	01	16						
Sedrata	01	1,6						
Tebessa					01	16,7%		
Tamlouka	01	1,6						
Total	60	100%	06	100%	06	100%	06	100%

Tableau 7 : Répartition, des espèces de *Leishmania* selon l'origine des malades

L. infantum a été identifiée, uniquement, chez des patients provenant de la wilaya de Constantine. En effet, les foyers de Zighoud Youcef et Ibn Ziad comptent respectivement 02 espèces sur les 06 identifiées. Quant aux parasites *L. tropica* et *L. donovani*, ils sont répartis selon le tableau 7.

Nos résultats montrent que l'espèce *L. infantum* provient des régions semi-urbaines. Quant aux espèces *L. tropica*, *L. donovani* et *L. major*, elles ont été isolées à partir de patients originaires aussi bien des régions urbaines que des régions semi-urbaines ou rurales. Il en est de même pour les ND.

2- Leishmaniose viscérale

2-1- Patients

Les 112 malades inclus dans notre étude (annexe III) sont âgés en moyenne de $7,20 \pm 3,53$ ans avec une moyenne d'âge de $4,86 \pm 4,43$ ans pour les garçons et de $5,01 \pm 4,28$ ans pour les patients de sexe féminin. Le sex-ratio est de 1,3 (61 garçons / 45 filles).

Les patients sont pour la plupart originaires de la wilaya de Constantine (20/112), suivi des régions de Mila (17/112), de Skikda (16/112), de Oum El Bouaghi (14/112), de Jijel (12/112) malades et enfin Annaba et Tebessa avec un nombre respectif de 06/112. Les wilaya de Khenchla et Guelma ayant un nombre de patients de 05/112 chacune. Les autres patients sont répartis de façon homogène entre les différentes régions du pays (Tableau 8).

Wilayas concernées	Nombre de cas suspects de leishmaniose viscérale	Pourcentage
Wilaya de Constantine (Constantine, H.Bouziane, D. Mourad, I. Ziad, Z. Youcef, Athmania, Beni H'miden)	20	17,8%
Wilaya de Mila (Mila, Chelghoum Laid, Tedjnenet, Grarem, Ferdjioua)	17	15,2%
Wilaya de Skikda (Skikda, Collo,Tamalous)	16	14,3%
Wilaya de Oum El Bouaghi (Ain Mlila, Ain Baida, Souk Naamane, Ain Fakroun)	14	12,5%
Wilaya de Jijel (Jijel, El Milia, Taher)	12	10,7%
Annaba	06	5,4%
Tebessa	06	5,4%
Khenchla	05	4,5%
Guelma	05	4,5%
Biskra	02	1,8%
El Oued	02	1,8%
Autres : El Eulma, Batna, Barika, Ghardaia, Touggourt, ...)	07	6,3%
Total	112	100%

Tableau 8 : Répartition des cas de LV par région

2-2- Examen parasitologique

Parmi les 112 échantillons analysés, les 26 échantillons positifs (23,2%) avaient une charge parasitaire faible et des formes amastigotes de petite taille avec un noyau et un kinétoplaste bien visibles. Les résultats de l'examen direct sont donnés dans le tableau 9.

	Cas clinique suspects
ED +	26
ED -	86
Total	112
Sensibilité	23

Tableau 9 : Sensibilité de l'examen direct dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale

2-3- Hemagglutination indirecte

Cette méthode étant bien documentée (**Garcia et Bruckner, 1988**) ; seuls les échantillons avec un examen direct négatif ont été testés. Selon la disponibilité de réactifs, la sérologie leishmanienne a été réalisée sur 68/86 (79%) échantillons négatifs. 64/68 étaient négatifs (94,1%) et 04/62 positifs (5,9 %). Les titres des sérums allaient de 1/64 à 1/1024 avec un seuil de positivité de 1/32.

2-4- PCR en temps réel genre

Parmi les 30 échantillons traités par PCR en temps réel, 16/30 se sont révélés positifs, soient 53,4% et 14/30 ont été négatifs en diagnostic moléculaire (Tableau 10).

	Cas clinique suspects
PCR+	16
PCR -	14
Total	30
Sensibilité	53

Tableau 10 : Sensibilité de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale

La PCR a permis le diagnostic de 16 cas ce qui correspond à un gain de 16,7% (5/30) par rapport à l'examen direct seul. La sensibilité de l'examen moléculaire étant donnée dans le tableau 10

Afin d'établir le gain apporté par la PCR, nous avons comparé les résultats obtenus avec les deux méthodes pour ces 30 échantillons (Tableau 11).

Examen Direct	PCR	Nombre
+	+	11
-	+	05
-	-	14
+	-	0
Total		30

Tableau 11 : Résultats de l'examen direct et de la PCR pour les patients suspects de leishmaniose viscérale

Par ailleurs, parmi ces échantillons, 19/30 ont été analysés à la fois en microscopie, en PCR et en sérologie. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous.

ED	PCR	HAI	Nombre
-	+	+	01
-	+	-	04
-	-	+	0
-	-	-	14

Tableau 12 : Récapitulatif des différents diagnostics de la LV.

Nous notons que 04/19 échantillons étaient négatifs aussi bien en microscopie qu'en sérologie mais positifs en PCR. Par ailleurs, un seul échantillon a donné un résultat positif en PCR et HAI et négatif à l'examen direct.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'hémagglutination amène un gain de 01 échantillon sur les 19 testés par rapport à l'examen direct. Cet échantillon étant positif en PCR. La PCR a permis de diagnostiquer 04 échantillons supplémentaires par rapport à l'association ED et HAI, soit un gain de 04/19.

2-5- PCR d'espèces en temps réel

Dans cette analyse, seuls les échantillons ayant une PCR genre dont le cycle était inférieur ou égal à 25 ont été testés en PCR espèces.

La PCR en temps réel de l'espèce a été réalisée sur les 16 prélèvements positifs en PCR quantitative. Parmi les 16 échantillons testés, 03 correspondent à *L. infantum*. Pour les autres, dont la température de fusion était différente des souches de référence, ont été rendu non déterminés. Certains de ces échantillons sont en cours d'analyse au CNR leishmanies.

Les 03 espèces de *Leishmania infantum* identifiées appartiennent à des malades provenant de différentes régions de l'Est. En effet, les foyers concernés sont ceux d'Ibn Ziad (Sud Ouest de Constantine), de Aïn Baïda (Wilaya de Oum El Bouaghi) et celui d'El Milia (Wilaya de Jijel).

DISCUSSION

Aucune donnée prospective n'était disponible concernant l'incidence des leishmanioses dans la région de Constantine. Compte - tenu de la réémergence de cette maladie dans le monde, 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 cette zone. Cette première étude nous a permis de mieux cerner l'ampleur que prenait cette maladie au sein de ce foyer, très touché par cette zoonose.

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, les taux de positivité respectifs sont de l'ordre de 42% pour la leishmaniose cutanée et 23% pour la leishmaniose viscérale. Ce faible taux de positivité pourrait être en relation avec le fait que les prélèvements des patients soient pauciparasitaires. Par conséquent, le nombre de leishmanies peut différer d'un échantillon à l'autre.

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 LC (**Faber et al., 2002**). Par contre sa combinaison avec la culture, par exemple, augmenterait la sensibilité du diagnostic à plus de 85% (**Murray, 2005**). Mais cette dernière comporte 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.

La PCR en temps réel a été utilisée en raison de ses performances techniques et de la possibilité d'adapter cette méthode à différents types de prélèvements, au diagnostic d'espèce et la recherche de polymorphismes nucléotidiques (**Nicolas et al., 2002**) .

L'autre partie de notre étude, en l'occurrence, l'identification des espèces de *Leishmania* par PCR en temps réel ; cette dernière a montré que la majorité des souches identifiées à partir de nos prélèvements cutanés appartient au complexe *L. major*. Cette espèce

est prédominante dans différentes régions de notre pays (**Harrat et al., 1996**). Ce parasite, largement répandu, est également l'agent causal de la LC dans d'autres pays, tels que : la Jordanie (**Saliba, 2004**), l'Iran (**Yaghoobi, 2001**), le Maroc et la Tunisie (**Kallel et al., 2005**). Il a été identifié par PCR, à partir des différents prélèvements, au Soudan (**Elamin et al., 2005**) ainsi qu'en Egypte (**Dawoud, 2004**). Sa présence en milieu urbain nous amène à nous demander si le réservoir est autre que *Meriones shawi*, en l'occurrence le chien ou un autre rongeur tel que le rat gris.

Quant à *L. infantum*, plusieurs zymodèmes ont été identifiés dans l'algérois (**Harrat et al., 1996**) ainsi qu'au niveau d'autres pays du Maghreb, notamment, la Tunisie (**Aoun et al., 2001**) et le Maroc (**Rami et al., 2005**). Ce parasite identifié dans nos prélèvements cutanés et dans les moelles, est généralement responsable des LV. Cependant, le zymodème MON-1 a été isolé à partir des lésions cutanées, en Algérie (**Harrat et al., 1996**), en Espagne (**Portus et al., 1989**), en Italie (**Gramiccia, 1992**) et les zymodèmes MON-1 et MON-24 en Tunisie (**Aoun et al., 2000**).

L'identification de l'espèce *L. tropica* à partir de nos prélèvements est un résultat auquel nous nous attendions vu que cette anthroponose affecte nos voisins les tunisiens (**Gradoni et al., 1984**) et les marocains depuis plus d'une décennie. En effet, le parasite, *L. tropica* MON-102 a été incriminé, au Maroc, aussi bien dans les leishmanioses cutanées (**Chiheb et al., 1999 ; Rhajaoui et al., 2004**) que dans certains cas de leishmaniose canine (**Guessous-Idrissi et al., 1997**). Cette espèce admettant comme vecteur, *Phlebotomus sergenti*, est responsable de nombreux cas de LC en Israël (**Schnur et al., 2004**). Les zymodèmes identifiés dans le désert Judée (Israël) et également en Jordanie étant les MON-137 et MON-275. Par ailleurs, *L. tropica* étant une espèce génétiquement très hétérogène et le fait qu'elle soit incriminée dans quelques rares cas de LV infantile pousse les auteurs à se demander si cette anthroponose n'est pas entrain de devenir une zoonose et que l'homme ne serait pas le seul réservoir à envisager.

L. donovani est un parasite, généralement, localisée en Inde, en Chine, au Bangladesh, en Afrique de l'Est et admet comme réservoir l'homme. Cette espèce n'ayant jamais été retrouvée dans le pourtour méditerranéen, notamment, en Algérie. Sa présence dans nos échantillons a été bien mise en évidence par PCR en temps réel, d'où l'avantage de cette méthode. Les autres techniques d'identification récentes, notamment celles utilisées par le CNRL, ne faisant pas la distinction entre les espèces *L. donovani* et *L. infantum*. Ces deux espèces faisant partie du même complexe. Nous prévoyons dans un proche avenir d'utiliser

d'autres procédés d'analyse moléculaire afin de confirmer l'existence de cette espèce dans nos prélèvements.

Enfin, du point de vue sérologique, bien que l'hémagglutination indirecte ne soit pas la technique la plus adaptée en matière de diagnostic de la LV, elle nous a révélé des résultats fort intéressants dans notre étude. En effet, nous avons constaté que presque tous les résultats négatifs en microscopie ont été confirmés par la sérologie et par le diagnostic moléculaire. C'est ce que préconise la plupart des auteurs, à savoir, l'association de l'HAI avec un autre test immunologique ou comme technique complémentaire la PCR.

Enfin, les résultats obtenus dans cette étude montrent bien l'efficacité du diagnostic moléculaire dans la mise en évidence de l'ADN leishmanien dans les différents prélèvements. Les trois méthodes se complètent, mais il en ressort que la PCR est la technique qui offre le plus d'avantages surtout à partir des buvards. Selon **Rodriguez (1994)**, la collecte des exsudats sur buvards serait une meilleure alternative que les biopsies pour le diagnostic de la LC par PCR. Ces buvards étant pratiques et faciles à réaliser, notamment, dans les pays ne possédant pas d'équipements nécessaires pour établir un diagnostic spécialisé. Avec cette technique, il a été possible de pratiquer un prélèvement sur place à chaque malade moyennant un coût dérisoire. Les résultats sont obtenus dans un délai court, toujours inférieur à celui d'une culture. C'est une technique spécifique et sensible (**Piarroux et al.,1994 ; Ravel et al.,1995**). Par ailleurs, son application pour la détection des leishmanies, à partir des différents échantillons cliniques : sang, moelle osseuse, peau (**Vital et al., 2004**) des réservoirs et des vecteurs, trouve son intérêt dans les études épidémiologiques (**Silva et al., 2005**). Quantitativement, elle semble être le meilleur marqueur de l'efficacité clinique du traitement dans les LC (**Pennisi et al.,2005**). Qualitativement, elle permet l'identification des espèces de *Leishmania* sans avoir recours à la culture, à l'analyse isoenzymatique. 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. Les méthodes classiques demandent la présence d'un nombre relativement grand de parasites viables ou morphologiquement intacts. Ceci pose un problème surtout durant la phase chronique où le niveau de parasites dans les lésions, notamment, cutanées est très bas. En contraste, l'approche moléculaire est aussi bien sensible que spécifique (**Chargui et al., 2005**). Son taux de positivité est de 70% comparativement à

l'examen direct (57%) et à la culture (20.5%). L'avantage majeur de la PCR en temps réel, c'est qu'elle est extrêmement rapide et les résultats sont obtenus 1 heure après l'extraction d'ADN. Elle est moins laborieuse et diminue les risques de contamination (**Mortano et al., 2004**). Elle offre une sensibilité de 97% contre 78% pour la culture et 76% pour la microscopie (**Wortmann et al., 2005**). Par cette méthode, il est possible de quantifier et d'identifier les différentes espèces de *Leishmania*. Ce qui nous a permis d'atteindre l'objectif majeur de notre travail.

De plus, face à l'ampleur prise par cette zoonose dans le Maghreb, il serait intéressant de faire une étude multicentrique et exhaustive afin de mieux cerner le fonctionnement éco-épidémiologique de ce foyer et de définir une démarche prophylactique adéquate en plus d'une orientation diagnostique et thérapeutique contrôlée.

CONCLUSION

L'Algérie connaît ces dernières années une augmentation remarquable de l'incidence annuelle des deux formes cliniques de la leishmaniose. Cette extension est de plus en plus importante à travers tout le pays avec une coexistence des deux formes de la maladie au sein d'un même foyer.

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 fluctue autour de 42% pour les leishmaniose cutanées et 53% pour les leishmanioses viscérales. Cette différence pourrait être attribuée au fait qu'il n'est pas toujours réalisé par le même manipulateur, d'où l'utilité d'un éventuel diagnostic complémentaire.

La PCR en temps réel est une technique de diagnostic et d'identification très performante de la leishmaniose en zone d'endémie. Elle nous 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* et *L. donovani*).

Par ailleurs, le fait que *L. tropica* se retrouve dans nos échantillons et que *L. major* soit identifiée en milieu urbain, cela suppose une éventuelle modification de l'épidémiologie liée à ces deux parasites. D'où l'intérêt de rechercher ces agents pathogènes aussi bien chez les vecteurs que chez les autres réservoirs potentiels, à savoir le chien et d'autres rongeurs tel que le rat gris par exemple.

Au terme de cette étude sur le diagnostic de la leishmaniose, la PCR en temps réel 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. Cependant, elle pourrait être complétée par une analyse isoenzymatique qui nous permettrait d'identifier les différents zymodèmes existant au sein d'une même espèce de *Leishmania*. L'inconvénient est que ce genre de test est onéreux et reste souvent réservé aux pays riches qui ne sont pas les plus concernés par ce genre d'épidémie. D'où l'intérêt d'avoir mis en place cette collaboration Nord-Sud, basée sur des moyens simples de transmission des échantillons (buvards envoyés par courrier normal). Un tel partenariat a été efficace en terme de diagnostic quotidien. Il a été

également porteur d'avenir car il a favorisé la construction de réseau Nord-Sud et a préparé le transfert de technologie qui était le but à atteindre à terme.

Cependant, en vue de se préserver de cette maladie, il est impératif de prendre en considération certaines mesures, à savoir :

- ✓ Le dépistage et le traitement des personnes malades
- ✓ La lutte contre les réservoirs du parasite par l'abattage des chiens errants en zone d'endémie, et par le contrôle des rongeurs.
- ✓ La lutte contre les phlébotomes par :
 - Les aspersions intradomiciliaires d'insecticide à effet rémanent dans les étables, les bergeries, les volaillers, les chenils, les caves...
 - L'élimination des gîtes larvaires (déchets et ordures, etc...).
- ✓ Les moustiquaires habituelles laissent passer les phlébotomes compte tenu de leur petite taille. Les mailles doivent donc être serrées et doivent être imprégnées de pyréthriinoïdes rémanents pour assurer une bonne protection.
- ✓ Éviter de se promener à la tombée du jour en bordure des bois.

BIBLIOGRAPHIE

- **Aoun K., Bourabtine A., Harrat Z., Guizani I., Mokni M., Bel Hadj Ali S., Ben Osman A., Belkaïd M., Dellagi K. & Ben Ismail R. (2000).** Données épidémiologiques et parasitologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien *Bull Soc Pathol Exot* ; **93** (2) : 101-103

- **Aoun K., Bourabtine A., Harrat Z., Belkaïd M. & Bel Hadj Ali S. (2001).** Profil particulier des zymodèmes de *Leishmania infantum* causant la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot* ; 94 (5) : 375-377

- **Bachi F. (2001).** Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en ALGERIE. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.

- **Basset D., Pratlong F., Ravel C., Puechberty J., Dereure J. & Dedet J.P. (2001).** Les leishmanioses déclarées en France en 1999. *BEH* ; **5** :19-21

- **Basset D., Pratlong F., Ravel C., Dereure J. & Dedet J.P. (2004).** Les leishmanioses en France : synthèse des données recueillies de 2001 à 2003 au Centre National de Référence des *Leishmania*. (www.invs.sante.fr/publications/2005/snmi/pdf/leishmaniose.pdf)

- **Belazzoug S. (1982).** Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). *Bull Soc Pathol Exot* **75** : 497-504.

- **Belazzoug S. (1983).** Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie). Infestation naturelle de « *Psammomys obesus* » (rongeur, gerbillidé). *Bull Soc Pathol Exot*, **76** : 146-149.

- **Belazzoug S. (1985).** Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : Etude des réservoirs. Analyse chimiotaxonomique des parasites. Thèse de Doctorat en Sciences médicales.

- **Belazzoug S. (1986).** Découverte d'un *Merinos shawi* (rongeur, Gerbillide) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bull Soc Pathol Exot*, **79** : 630-633.

- **Belazzoug S., Bendali-Braham S., Lakhel Z. & Abdennebi H. (1986).** Hémagglutination indirecte dans le serodiagnostic de la leishmaniose viscérale, comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. *Arch Inst Pasteur d'Algérie*, **55** : 107-112.

- **Belkaïd M. & Harrat Z. (1997).** La leishmaniose en Algérie. Mise au point *Rev Méd Phar* ; 43-46.

- **Ben Ismail R. & Ben Rachid M.S. (1989).** Epidémiologie des leishmanioses en Tunisie. In *Maladies Tropicales Transmissibles*, Eds Gentilini M. & Viens P., 73-80. Paris.

- **Chargui N., Bastien P., Kakkel K., Haoues N., Akrouf M.F., Masmoudi A., Zili J. , Chaker E., Dhahri-Ben Othman A., Azaiez R., Crobu L., Mezhoud H.& Babba H. (2005).** Usefull of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia.*Trans R Soc Trop Med Hyg*, **99** (10): 762-768.

- **Chiheb S., Guessous-Idrissi N., Hamdani A., Riyad M., HAmrdani S.& Krimech A. (1999).** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*: clinical features in a new focus in northern Morocco. *Ann Dermatol Vénérol*, **126** (5): 419-425.

- **Croan D.G., Morrison D.A. & Ellis J.T. (1997).** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular Biochem Parasitol*, **89**: 149-159.

- **Croft S.L. & Yardley V. (2002).** Chemotherapy of Leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design.*; **8** (4):319-341

- **Choi C.M. & Lerner E.A. (2001).** Leishmaniasis as an Emerging Infection. *JID Symposium Proceeding*, **8** (3): 175-182.

- **David C., Dimier-David L., Vargas F., Torrez M.E. & Dedet J.P. (1993).** Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **87**: 7-9.

- **Dawoud, H.A. (2004).** Identification of cutaneous leishmaniasis in Egypt by hybridization of PCR amplified mini-exon repeats. *J Egypt Soc Parasitol*, **34**(3): 881-892.

- **Dedet J.P., Addadi K. & Tabet-Derraz O. (1973).** Epidémiologie des leishmanioses en Algérie ; capture des phlébotomes (Dipteria-Psychodide) à Biskra Présence de *Sergentomyia christophersi* (Sinton 1927) en Algérie ; *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* **51** : 183-194.

- **Dedet J.P. & Pratlong F. (2000).** Taxonomie des *Leishmania* et distribution géographique des leishmanioses. *Ann Dermatol Venerol*, **127** : 421-424.

- **Dedet J.P. (2001).** Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, **8** :506-510.

- **Dedet J.P. & Pratlong F. (2001).** Leishmanioses. In: Epidémiologie des maladies parasitaires. (Ripert C. Ed). Editions Médicales Internationales, **3** : 221-241

- **Dedet J.P., Lambert M. & Pratlong F. (1995).** Leishmanioses et infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Presse Méd*, **24** : 1036-1040

- **Del Giudice P., Marty P., Lacour J.P., Perrin P., Pratlong F. & Haas H. (1998).** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*, case report and review. *Arch Dermatol*; **134** : 193-198.

- **Del Giudice P., Marty P. & Lacour J.P.H. (2001).** Leishmaniose cutanée autochtone en France métropolitaine. *Ann Dermatol Venerol*, **128** : 1057-1062.

- **De Monbrison F., Angei C, Staal A., Kaiser K. & Picot S. (2003).** Simultaneous identification of the four human plasmodium species and quantification of plasmodium DNA load in human blood by real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **97**: 1-7.

- **Dereure J., Lanotte G., Pralong F., Gouvernet J., Majhour J., Belazzoug S., Khiami A., Rageh H., Jarry D., Periere J. & Rioux J.A. (1998).** Leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : Intérêt et réalisation du test au latex. Application en écoépidémiologie. *Bull. Soc ; Pathol Exot* **91**(4) : 300-305.

- **Dereure J. (1999).** In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses, 109-130

- **Desjeux P., Mplinedo S., Le Pont F., Paredes A. & Urgarte G. (1987).** Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department). Isomation and isoenzymes characterisation of 26 strains of *Leishmania braziliensis*. *Trans. R Soc. Tro. Med Hyg*; **81**: 742-746.

- **Desjeux P. 1996.** Leishmaniasis : public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* , **14** : 417-423

- **Desjeux P., Alvar J., Gradoni L., Gramiccia M., Medrano F.J., Deniau M. et al. (1996).** Epidemiological analysis of 692 retrospective cases of *Leishmania*/HIV co-infections. *WHO/LEISH* , **39**: 1-11

- **Desjeux P. (1999).** Aspects de santé publique et lutte. In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : AUPELF-UREFF– Ellipses ; 219-238

- **Desjeux P., Piot B., O'Neill K. & Meert J.P (2001).** Co-infection a *Leishmania*/VIH dans le sud de l'Europe. *Méd Trop*, **61**: 187-193.

- **Djerbouh A., Toudjine M., Djoudi M., Benikhlef R. & Harrat Z. (2005).** La leishmaniose canine en Algérie : essai de traitement par l'allopurinol. *Ann Méd Vét* , **149** : 132-134.

- **Dumon H. & Piarroux R. (1995).** Identification des leishmanies : outils actuels au service de la clinique et de l'épidémiologie. *Méd Trop.* ; **55** : 123-126

- **Elamin, E.M., Guerbouj S., Musa A.M., Guizani I., Khalil E.A.G., Mukhtadi M.M., Elkadaro A.M.Y., Mohamed H.S., Ibrahim M.E., Abdelhamid M.M., EL Azhari M. & EL Hassan A.M. (2005).** Uncommon clinical presentations of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **99**(11): 803-808.

- **Faber W.R., Oskam L., Van Gool T., Kroon; N.C., Knecht-Junk K.J., Hofwegen H., Van der Wal A.C. & Kager P.A. (2003).** Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* , **49**: 70-74.

- **Forget G. (2004).** Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. Thèse de Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine. Université Laval. France.

- **Gambarelli F., Dumon H., Franck J. & Dunan S. (1987).** L'hémagglutination indirecte dans le diagnostic immunologique de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Feuil. Biolo.* ; **XXVIII**. (156) : 33-37

- **Garcia L.S. & Bruckner D.A. (1988).** Diagnostic Medical Parasitology. Serodiagnostic of parasitic diseases. Elsevier, 311-325.

- **Guessous-Idrissi N., Berrag B., Riyad M., Sahibi H., Bichichi M. & Rhalem A. (1997).** *Leishmania tropica* : ethiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **57**: 172-173.

- **Gradoni L., Gramiccia M. & Pozio E. (1984).** Status of the taxonomy of *Leishmania* from the Mediterranean basin. *Parasitol*, **26**(3): 289-297.

- **Gramiccia M., Gradoni L. & Troiani M. (1992).** HIV : *Leishmania* coinfection in Italy : isoenzym characterization of *leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **86**: 161-136.

- **Guerin P., Olliaro P., Sundar S., Boeleart M., Croft S., Desjeux P., Wasunna M. & Bryceson A. (2002).** Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, **2**(8): 494-501.

- **Harrat Z., Addadi K. & Tabet Drraz O. (1992).** La leishmaniose viscérale en Algérie : recensement des cas de leishmaniose viscérale. *Bull Soc Path Exo* ; **85**: 296-301.

- **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

- **Harrat,Z., F. Pratlong, S. Belazzoug, J.M. Dereure, Deniau, J.A. Rioux, M. Belkaid and J.P. Dedet. (1996).** *Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**(6): 625-629.

- **Harrat Z. & Belkaid M. (2002).** Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot*, **96** : 212-214.

- **Harrat Z., Boudrissa A., Benhabyles N. & Harrat-Hammadi D.** Panorama des leishmanioses en Algérie. IXème Journée Nationale de Parasitologie, Alger le 18 Mai 2005.

- **Izri M.A., Belazzoug S., Boudjebba Y., Dereure ., Pratlong F., Belmonte A. & Rioux J.A. (1990).** *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie (Algérie). *Ann Parasitol Hum Comp*, **65** (3) : 151-152.

- **Izri M.A., Belazzoug S., Pratlong F. & Rioux J.A. (1992).** Isolement de *L. major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie). *Ann Parasitol Hum Comp*, **67**: 31-32.

- **Izri M., Belazzoug S. (1993).** *Phlebotomus (Laroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **87**: 399.

- **Jamarin C. (1991).** Leishmaniose et phlébotomes (Dipteria psychodidae) dans la région des Baronnies. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Pharmacie. Université Claude-Bernard-lyon1

- **Kallel K., Pralong F., Belhadj S., Cherif F., Hammadi M., Dedet J.P., Chaker E. (2005).** Cutaneous leishmaniasis in Tunisia: results of the iso-enzymatic characterization of 71 strains. *Ann Trop Med Parasitol*, **99** (1) :11-19.

- **Kamoun P. & Fréjaville J.P. (2002).** Guide des examens de laboratoire. 4^{ème} Edition Flammarion – Médecine. Science.

- **Le Fichoux Y., Marty P. & Kubar J. (1999).** Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses ; 190-203

- **Leger N. & Depaquit J. (1999).** Les phlébotomes. In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses ; 89-108.

- **Lefebvre A. M. & Rioux J.A. (1995).** *Leishmania* human immunodeficiency virus coinfection in the mediterranean basin. Isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis*; **172**: 323-326.

- **Lightburn E., Morand J.J. & Chouc C., 2000.** Leishmaniose tégumentaire du nouveau monde. *Nouv Dermatol*, **19** : 385.

- **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.

- **Marignac G., Lebastard M., Fall G., Nicolas L. & Milon G. (2003).** Exploration de la dissémination de *Leishmania*, un parasite délivré et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte vertébré. *Bull. Acad. Vét. France*, Tome 157, N° 2, 41-45.

- **Marques M.J., Volpini A. C., Machado-Coelho G.L.L., Da Costa C.A., Mayrink W., Genaro O. & Romanha A.J. (2006).** Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Parasitol*, **54**: 37-43.

- **Marty P., Le Fichoux Y., Pratlong F. & Gari-Toussaint M. (1994).** Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France : epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **88**: 33-34.

- **Marty P., Lacour J.P., Pratlong F., Perrin C., Del Giudice P. & Le Fichoux Y. (1998).** Leishmaniose cutanée localisée due à *Leishmania infantum* MON-1 contractée dans le Nord de l'Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, **91** : 146-147.

- **Marty P. & Rosenthal E. (2002).** Treatment of visceral leishmaniasis : a review of current treatment practices. *Expert Opin. Pharmacother.* **3**(8): 1101-1108.

- **Mazelet L. (2004).** La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen Français. Thèse de Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

- **Minodier P, Piarroux R., Garnier J.M. & Unal D. (1999).** Leishmaniose viscérale méditerranéenne : physiopathologie. *Presse Med* , **28**(1) : 28-33

- **Mortarino, M, A. Fransceschi, F. Manciante, C. Bazzocchi, C. Genchi and C. Bandi. (2004).** Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania* *Parasitologia* , **46**(1-2):163-167.

- **Moulaheem T. (1999).** Le foyer de leishmanioses de Constantine. Etude épidémiologique et entomologique. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université de Constantine

- **Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G. (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**: 1561-1577.

- **Nicolas L., Prina E., Lang T., Milon G. (2002).** Real-Time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol*, **40**: 1666-1669.

- **Osman O.F., Kager P.A. & Oskam L. (2000).** Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med International Health*, **5** (8): 553-562.

- **Pennisi M.G., Reale S., Giudice S.Lo., Masucci M., Caracappa S., Vitale M., Vitale F. (2005).** Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun*, **20**(2): 301-303.

- **Piarroux R., Gambarelli F., Dumo H., Fontes M., Dunan S., Mary C., Toga B.; Quilici M. (1994).** Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *J Clin Microbiol*, **32**: 746-749.

- **Pierce R.J. & Capron A.C., (1985).** Western blot: principe et méthodologie. *Soc. Fran. Immunol.*, 43-54.

- **Pirmez C., DA Silva Trajano V., Paes-Oliveira Neto M., DA Cruz A.M., DA Costa S.C.G., Cathano M., Degrave W., Fernandes O. (1999).** Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Braz *J Clin Microbiol*, **37**: 1819-1823.

- **Portus M., Gallego J., Rioux J.A., Pratlong F., Moreno G., Fisa R., Gallego M., Munoz C., Riera C., Sanchez C. & Sera T. (1989).** Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol* **49**, 278-289.

- **Pratlong F., Dereure J., Deniau M., Marty P., Faraut-Gambarelli F. & Dedet J.P. (2003).** Enzymatic polymorphism during *Leishmania* HIV/co-infection: study of 381

Leishmania strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Ann Trop Med Parasitol*, **97** (1): 47-56.

- **Pratlong F., Dedet J.P., Marty P., Portus M., Deniau M., Branches A., Reynes J., Martini (1995).** *Leishmania*-Human Immunodeficiency virus co-infection in the Mediterranean Basin: Isoenzymatic Characterisation of 100 isolates of the *Leishmania infantum* Complex. *J Infect Dis*, 172: 323-326.

- **Pratlong F., Lambert M., Bastien P. & Dedet J.P. (1997).** Leishmaniose et immunodépression : Aspects biochimiques actuels. *Rev. Fran. Lab.* ; (**291**) : 161-168.

- **Poitras E. & Houde A. (2002).** La PCR en temps réel : principe et applications. *Rev Biol Biotechnol.*, **2**(2) : 2-11.

- **Rami, M., T. Atarhouch and A. Dakkak. (2005).** Identification of two performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* **134**(1-2): 25-31.

- **Ravel S. , Cuny G. , Veas F. (1995).** A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop*, **59**: 187-96.

- **Rhajaoui M., Fellah H., Pratlong F., Dedet J.P. & Lyagoubi M. (2004).** Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **98** (5): 299-301.

- **Rioux J.A, Lanotte G., Petter G., Dereure J., Akalay O., Pratlong F., Velez I.D., Fikri N.B., Maazoun R., Denial M., Jarray D., Zahaf A., Ashford R.W., Cadi-Soussi M., Killick-Kendrick R., Ben Mansour N., Moreno G., Périères J. , Guilvard E., Zribi M., Kennou M.F., Rispaill P., Knechtli R. & Serres E. (1986).** Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique, l'exemple de trois foyers : Tunisien, Marocain et Français. *Coll Inter CNRS/INSERM 1984, IMEEE Montpellier* : 365-395.

-Rioux, J.A, G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong and B.J. Perieres. (1990). Taxonomy of *leishmania* use of isoenzymatic. Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* **65**: 111-125.

-Roberts, L.S. and Janovy, J.J. (2000). *Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Higher Education, Boston.

- Rodriguez N., Guzman B., Rodas H., Takiff H., Bloom B. R., Convit J. (1994) . Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* , **32**: 2246-2252

- Sacks D. & Kamhawi S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, **55** : 453-483.

- Saliba, E.K., J.P. Pratlong, N. Saleh., S.A. Khounry, O.Y. Oumeish, O. Batayneh and R. Al-Oran. (2005). Identification of *Leishmania* strain from Jordan. *Ann Trop Med Parasitol*. **98**(7): 677-683.

- Schnur L.F., Nasreddin A., Eisenberger C.L., Jaffe C.L., El Fari M., Azmi K., Anders G., Killick-Kendrick M., Killick-Kendrick R., Dedet J.P., Pratlong F., Kanaan M., Grossman T., Jacobson R.L., Schonian G. & Warburg A. (2004). Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *Am J Trop Med Hyg*, **70**(4): 364-372.

- Silva E.S., Gontijo C.M.F., Melo M.N. (2005) . Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania species*. *Trends in Parasitol* , **21** : 550-552.

- Sergent Et. & Gueidon E. (1923). Chronique du Bouton d'Orient en Algérie, Le « clou de Mila ». *Arch Inst Pasteur Alger*, **1** : 1-3.

- **Stewart P. (1974).** Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull Soc Hist Nat Af Nord*, 65: 239-252.

- **Singh S., Sivakumar R. (2003).** Recents advances in diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* , 49: 1-9.

- Vitale, F., S. Reale, M.Vitale, E. Petrotta, A. Torina and S. Caracappa. (2004).** TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. NY Acad Sci.* 1026: 139-14.

- **Werry M. (1995).** Protozoologie médicale. Edition De Boeck Université, 123-136.

- World Health Organization (1990).** Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert committee, WHO Technical Report Series, N° 793. Geneva

- **World Health Organization (2000).** Leishmaniose et les co-infections Leishmania / HIV. Aide mémoire N°116.

- **Wortmann G. W., Hochberg G.L., Houg H.H., Sweeny C., Zapor M., Aronson N., Wein P. & Ockenhouse C.F. (2005).** Rapid identification of Leishmania complexes by a Real-Time PCR assay. *Am. J Trop Med Hyg* 73(6): 999-1004.

- Yahhoobi-Ershadi M.R., Hanafi-Bojd A.A., Akhanavav A.A., Zaharai-Ramazi A.R. & Mohebbali M. (2001).** Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Ardestan town, central Iran. *Acta* 79(1): 115-121.

- Zerpa O., Pralong F., Ulrich M. & Convit J. (2001).** Isolation of *Leishmania infantum*, Zymodème MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96(7): 901-902.

Publication

- **Mihoubi I., De Monbrison F., Romeuf N., Moulahem T. & Picot S.** Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Méd. Trop.*, 2006, (**66**)1, 39-41.

Communications nationales

- **Mihoubi I., De Monbrison F., Romeuf N., Moulahem T. & Picot S.** Etude comparative de l'examen direct et de la PCR en temps réel dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée. IXème Journée Nationale de Parasitologie. Alger 18 Mai 2005.

- **Mihoubi I., De Monbrison F., Romeuf N., Moulahem T. & Picot S.** Analyse qualitative, par PCR en temps réel, de la leishmaniose viscérale à Constantine. 1^{ère} Journées Algéro-Françaises de Parasitologie – Mycologie (Xèmes Journées Nationales). Alger 15-16 Novembre 2006.

Communications internationales

- **De Monbrison F., Mihoubi I., Romeuf N. & Picot S.** Diagnostic et identification des leishmanioses cutanées par PCR en temps réel. Congrès de la Société Française de Parasitologie. Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale. Besançon 25- 27 Mai 2005.

- **Picot S., Mihoubi I., Romeuf N. & De Monbrison F.** Real time PCR or the identification of Leishmania parasite species from filter paper spots. ICOPA XI, Glasgow Scotland UK 6-11 Août 2006.

ETUDE COMPARATIVE DE L'EXAMEN DIRECT ET DE LA PCR EN TEMPS REEL DANS LE DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CUTANEE

I.Mihoubi, F. De Monbrison, N. Romeuf, T. Moulahem, S. Picot

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Constantine
Service de Parasitologie, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, France
EA 37-32, Université Claude Bernard LYON, France

Compte tenu de la réémergence de la leishmaniose dans le monde, de la variabilité géographique, de l'épidémiologie et de l'augmentation du nombre de voyageurs, une étude pilote sur la diagnostic de la leishmaniose cutanée a été réalisée à Constantine : l'un des foyers de l'Est Algérien.

Les prélèvements de sérosités ont été récoltés sur buvards et testés en PCR en temps réel et les résultats comparés à ceux de l'examen direct.

Sur 143 échantillons testés, 69 se sont révélés positifs à l'examen direct soit 48,25%. Quant à la PCR, elle offre un taux de positivité beaucoup plus important, environ 82%.

Les résultats présentés dans cette étude montrent l'efficacité et la sensibilité de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée à partir des sérosités recueillies sur buvards. Avec cette technique, il est possible de réaliser un prélèvement sur place et obtenir des résultats dans un délai court.

La PCR pourrait dans l'avenir compléter les techniques conventionnelles de diagnostic des leishmanioses et être utilisée à des fins épidémiologiques et expérimentales dans le cadre de l'évaluation de la charge parasitaire durant la phase post thérapeutique.

Mots-clés : Leishmaniose cutanée – Examen direct – PCR en temps réel – Constantine.

SOCIÉTÉ ALGÉRIENNE DE PARASITOLOGIE ET DE
MYCOLOGIE MÉDICALES

ATTTESTATION

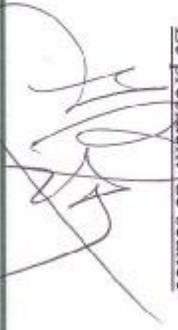
Madame.....*I. Mifoubi*.....

a participé à la IX^{ème} journée nationale de parasitologie, le 18 Mai 2005 au palais de la culture *Moufati Zakaria*,
Alger, en présentant une communication orale intitulée :

.....*Etude comparative de l'examen direct et de la PCR en temps réel dans
le diagnostic de la leishmaniose cutanée*.....

Coauteurs :*F. De Monbrisson, N. Romeuf, T. Moulalem, S. Picot*.....

Le président de séance



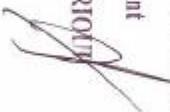
Le Secrétaire Général

Dr. I. ACHIR



Le Président

Prof. B. HAMRIOTI



ANALYSE QUALITATIVE, PAR PCR EN TEMPS REEL, DE LA LEISHMANIOSE VISCERALE A CONSTANTINE.

I. Mihoubi¹; F. De Monbrison²; N. Romeuf²; T. Moulahem³; S. Picot²

¹-Laboratoire de Biologie et Environnement ; Université Mentouri, Constantine.

²-Service de Parasitologie, Hôpital E. Herriot, Hospices Civils de Lyon, France
EA 37-32, Claude Bernard University LYON, France.

³- Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, C.H.U. Ben Baddis, Constantine.

La leishmaniose viscérale humaine pose un réel problème de santé publique en Algérie où elle s'étend sur toute la partie nord du pays, au niveau des étages bioclimatiques humide et sub-humide. Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% de cas. Par ailleurs, le foyer de la Petite Kabylie s'étend jusqu'à Collo à l'Est du pays et déborde jusqu'à Sétif. Les zones les plus touchées concernent Jijel, Mila, Constantine et Skikda.

L'identification des espèces impliquées dans la LV par la méthode classique de l'analyse isoenzymatique est longue, laborieuse et nécessite la culture des promastigotes. De plus, cette technique ne permet pas la prise en charge immédiate des patients sur le plan thérapeutique.

Dans ce travail nous nous proposons de faire une étude quantitative et qualitative des LV dans le foyer de Constantine à l'aide de la PCR en temps réel. En effet, 112 demandes de diagnostic de LV ont été adressées au laboratoire de Parasitologie et Mycologie du C.H.U. de Constantine durant la période 2003-2006. Le diagnostic a été posé par l'examen direct de la moelle osseuse et/ou une sérologie positive. Parmi ces 112 patients, 30 ont bénéficié d'une PCR en temps réel. Le taux de positivité de cette dernière étant de l'ordre de 53,33%. Les échantillons positifs en genre ont été analysés par PCR en temps réel espèce et les agents pathogènes identifiés. Le parasite responsable ayant été identifié comme appartenant au complexe *L. infantum*.

Mots-clés : Leishmaniose viscérale – PCR en temps réel – Constantine.

Annexe I

Composition du colorant May Grünwald Giemsa (MGG)

- Giemsa.....1g
- Glycérine.....54g
- Méthanol.....84g
- Eau distillée.....1000ml

Annexe II

Patients	Sexe	Age	Origine	Résultats			
				ED	PCR genre	PCR espèces	
P1a	M	21	El Oued	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P1b				Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P2a	M	19	Oum El Bouaghi	Négatif	Positive	Négative	
P2b				Négatif	Positive	Positive	> 25
P3	F	29	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P4	F	64	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P5	F	24	Batna	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P6	M	31	Hamma Biuziane	Négatif	Positive	Positive	> 25
P7	M	24	Constantine	Positif	Positive	ND	
P8a	M	30	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P8b				Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P9	M	46	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P10	F	37	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. donovani</i>
P11a	M	20	Biskra	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P11b				Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P12	F	4	Ibn Ziad	Négatif	Positive	Négative	
P13	M	30	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P14	M	23	Boussaâda	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P15	F	53	Sigüs	Positif	Positive	Négative	
P16	M	35	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P17	F	44	Ain Fakroun	Positif	Positive	Positive	> 25
P18	F	20	Hamma Bouziane	Positif	Positive	ND	
P19	F	48	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P20	M	6	Ibn Ziad	Positif	Positive	Négative	
P21	M	30	Constantine	Négatif	Positive	Positive	> 25
P22	M	17	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P23a	M	4	Boussaâda	Négatif	Positive	Négative	
P23b				Négatif	Positive	Négative	
P24	F	5	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P25	M	30	Chelghoum Laïd	Négatif	Négative		
P26a	F	20	M'Sila	Positif	Positive	Positive	> 25
P26b				Positif	Positive	Positive	> 25
P27	M	22	Guelma	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P28	M	26	Guelma	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P29	M	24	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P30	M	5	Didouche Mourad	Positif	Positive	Négative	
P31	M	31	Ain Fakroun	Négatif	Positive	Négative	
P32	M	53	Jijel	Positif	Positive	Négative	

P33	F	70	Chelghoum Laïd	Négatif	Positive	Négative	
P34	F	23	Oued Souf	Positif	Positive	Négative	
P35	F	11	Skikda	Positif	Positive	Négative	
P36	F	43	Hamma Bouziane	Positif	Positive	ND	
P37	M	55	Constantine	Négatif	Négative		
P38	M	15	Hassi Messaoud	Négatif	Négative		
P39	F	23	Constantine	Négatif	Négative		
P40	M	7	Ibn Ziad	Négatif	Positive	Négative	
P41	M	22	Hamma Bouziane	Négatif	Positive	Négative	
P42	M	28	Hamma Bouziane	Positif	Positive	ND	
P43	M	52	Ain M'Liha	Négatif	Négative	Négative	
P44	F	30	Ibn Ziad	Positif	Positive	Négative	
P45	M	30	Chelghoum Laid	Négatif	Négative		
P46	F	60	Constantine	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P47	F	20	Hamma Bouziane	Négatif	Négative		
P48	M	42	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
p49	M	13	Constantine	Négatif	Négative	Négative	
P50	F	20	M'Sila	Négatif	Positive	Négative	
P51	M	29	Hamma Bouziane	Positif	Positive	ND	
P52	M	27	Ibn Ziad	Positif	Positive	ND	
P53	F	52	Constantine	Positif	Positive	ND	
P54	M	8	Ibn Ziad	Positif	Positive	Négative	
P55	M	43	Constantine	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P56	F	30	Hamma Bouziane	Négatif	Positive	Négative	
P57	F	22	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P58	M	20	Ibn Ziad	Positif	Positive	ND	
P59 EN	F	52	Ibn Ziad	Positif	Positive	Négative	
P59 EX				Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P60	M	38	Ain Baida	Négatif	Positive	Négative	
P61	M	14 M	Zighoud Youcef	Positif	Positive	ND	
P62	M	22	Ibn Ziad	Positif	Positive	ND	
P63	F	41	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P64	F	77	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P65	F	29	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P66	F	20	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P67	M	64	Ibn Ziad	Négatif	Positive	Négative	
P68	F	57	El Khroub	Négatif	Négative		
P69	M	54	Constantine	Positif	Positive	ND	
P70	F	21	El Khroub	Négatif	Positive	Négative	
P71	F	69	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P72	F	60	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L.donovani</i>

P73	M	47	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Négative	
P74	M	36	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P75	F	27	M ila	Négatif	Négative		
P76	M	56	Grarem	Positif	Positive	Négative	
P77	F	21	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P78	M	37	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P79	F	22	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P80	M	68	Sétif	Négatif	Négative		
P81	M	23	Constantine	Positif	Positive	ND	
P82	M	2	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P83	M	18	Skikda	Positif	Positive	Négative	
P84	F	40	Grarem	Négatif	Positive	Négative	
P85	F	13	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P86	M	77	EL Athmania	Positif	Positive	ND	
P87	F	84	Jijel	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P88	M	16	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Négative	
P89	M	6	Constantine	Positif	Positive	ND	
P90	M	18	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P92	F	49	Didouche mourad	Négatif	Négative		
P93	M	29	Hamma Bouziane	Négatif	Positive	Négative	
P94	M	29	Constantine	Négatif	Négative		
P95	M	4	El Oued	Négatif	Positive	Négative	
P96	F	25	Ain m'lila	Négatif	Négative		
P97	F	60	Grarem	Négatif	Positive	Négative	
P98	F	19	Didouche mourad	Positif	Positive	Négative	
P99	F	27	Ferdjioua	Positif	Positive	Positive	<i>L. donovani</i>
P100	M	20	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P101	F	61	Constantine	Négatif	Négative		
P102	F	20	Constantine	Négatif	Négative		
P103	M	77	Athmania	Négatif	Positive	Négative	
P104	F	8	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P105	F	26	Constantine	Positif	Positive	ND	
P106	M	11 M	Chelghoum Laid	Négatif	Positive	Négative	
P107	M	24	Skikda	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P108	M	12	Skikda	Négatif	Négative		
P109	M	18	Constantine	Positif	Positive	ND	
P109 bis	M	47	Constantine	Négatif	Négative		
P110	M	3	Skikda	Négatif	Positive	Négative	
P111	M	62	Ghardaia	Négatif	Positive	Positive	> 25
P112	F	20	Constantine	Négatif	Négative		
P113	M	37	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P114	F	76	Constantine	Négatif	Négative		

P115	M	45	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P116	M	2	Zighoud Youcef	Positif	Positive	ND	
P117	M	47	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P118	M	20	Barika	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P119	M	21	Constantine	Positif	Positive	Positive	> 25
P120	M	18	Skikda	Négatif	Positive	Négative	
P120 Bis	M		Skikda	Négatif	Négative		
P121	F	17	Ain Baida	Négatif	Négative		
P122	F	28	Guelma	Positif	Positive	ND	
P123	F	50	Constantine	Positif	Positive	ND	
P124	M	2	Hamma Bouziane	Négatif	Positive	Négative	
P125	M	65	Tebessa	Négatif	Positive	Négative	
P126	M	41	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P127	F	36	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P128	F	68	Khenchla	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P129	M	17	Zighoud Youcef	Négatif	Négative		
P130	M	23	Boussaâda	Négatif	Négative		
P131	F	36	Constantine	Négatif	Négative		
P132	M	45	Hassi Messaoud	Négatif	Positive	Négative	
P133	F	21	Constantine	Négatif	Négative		
P134	F	67	Didouche mourad	Négatif	Positive	Négative	
P135	F	5	Tamalous	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P137	M		Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P138	M	26	Taref	Négatif	Négative		
P139	M	29	Jijel	Négatif	Négative		
P140	M	17	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P141	F	2 1/2	Tamalous	Négatif	Négative		
P142	F	53	Constantine	Négatif	Négative		
P143	F	42	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P144	M	12	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P145	F	6	Skikda	Négatif	Négative		
P146	M	23	Ain Baida	Positif	Positive	Positive	>25
P147	M	2	Hamma Bouziane	Négatif	Négative		
P148	M	34	Zighoud Youcef	Négatif	Négative		
P149	M	14	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P150	M	29	Oued Zenati	Négatif	Positive	Négative	
P151	F	40	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L. major</i>
P152	M	31	Skikda	Négatif	Négative		
P153	M	50	BeniH'miden	Positif	Positive	Négative	
P154a	F	25	Biskra	Négatif	Positive	Négative	
P154b	F	25	Biskra	Négatif	Positive	Négative	
P155	F	45	Constantine	Négatif	Négative		
P156	M	31	Mila	Négatif	Positive	Négative	

P157	F	65	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P158a	M	29	Tissemssilt	Négatif	Positive	Négative	
P158b	M	29	Tissemssilt	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P159	M	20	Adrar	Négatif	Négative		
P160	F	66	BeniH'miden	Négatif	Négative		
P161	M	27	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P162	F	65	Sedrata	Positif	Positive	Négative	
P163	M	15	Ibn Ziad	Positif	Positive	Négative	
P164	M	29	Skikda	Négatif	Positive	Négative	
P165	F	4	Ghardaia	Positif	Positive	Négative	
P166	M	22	Ain Baida	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P167	F	23	Barika	Positif	Positive	Négative	
P168	F	30	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	ND	
P169	F	45	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P170	M	24	Ain Baida	Positif	Positive	Négative	
P171	M	52	Constantine	Négatif	Négative		
P172	M	18	BeniH'miden	Négatif	Positive	Négative	
P173	M	34	Grarem	Négatif	Positive	Négative	
P174	F	2 1/2	Constantine	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P175	F	61	Bekira	Positif	Positive	ND	
P176	M	34	Tamlouka	Négatif	Négative		
P177	F	65	Meskana	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P178	F	30	Mila	Positif	Positive	Négative	
P179	M	18	Chelghoum Laid	Négatif	Négative		
P180	F	65	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P181	F	36	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P182	F	12	El Khroub	Négatif	Positive	Négative	
P183	F	4	Didouche mourad	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P184	F	18	Biskra	Négatif	Positive	Négative	
P185	F	2	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P186	M	23	BeniH'miden	Positif	Positive	Négative	
P187	F	50	Grarem	Négatif	Négative		
P188	M	69	Didouche mourad	Positif	Positive	Négative	
P189	M	22	Khenchla	Négatif	Positive	Négative	
P190	M	60	Oued Seguin	Positif	Positive	ND	
P191	M	15	Khenchla	Négatif	Négative		
P192	F	39	BeniH'miden	Positif	Positive	Négative	
P193	F	18	Bekira	Négatif	Négative		
P194	M	24	Bekira	Négatif	Positive	Négative	
P195	F	68	Didouche mourad	Négatif	Positive	Négative	
P196	F	51	Constantine	Positif	Positive	ND	
P197	M	14	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P197bis	M	14	Constantine	Négatif	Négative		
P198	M	51	El Khroub	Négatif	Négative		
P199	M	3	Grarem	Positif	Positive	Négative	

P200	M	23	Khenchla	Négatif	Positive	Négative	
P201	F	72	Mila	Négatif	Positive	Négative	
P202	M	42	Didouche mourad	Négatif	Positive	Négative	
P203	M	26	Zighoud Youcef	Positif	Positive	ND	
P204	M	89	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P205	F	50	Ain Baida	Négatif	Négative		
P206	M	2	Constantine	Négatif	Négative		
P207	F	2	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L.infantum</i>
P208	F	14	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	ND	
P209	F	20	Didouche mourad	Négatif	Positive	Négative	
P210	M	69	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P211	F	22	Ibn Ziad	Positif	Positive	ND	
P212	F	20	Hamma Bouziane	Négatif	Négative		
P213	F	31	Mila	Positif	Positive	Négative	
P215	M	23	Constantine	Positif	Positive	ND	
P215bis	M	12	Constantine	Positif	Positive	ND	
P216	M	76	Constantine	Négatif	Négative		
P217	M	17	Zighoud Youcef	Positif	Positive	ND	
P218	F	30	Mila	Négatif	Positive	Négative	
P219	F	11	BeniH'miden	Positif	Positive	Négative	
P220	F	26	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P221	M	23	BeniH'miden	Négatif	Positive	Négative	
P222	M	35	El Oued	Négatif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P223	F	22	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P224	F	8	Grarem	Positif	Positive	Négative	
P225	F	73	Collo	Négatif	Négative		
P227	F	71	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P228	M	24	Teleghma	Négatif	Positive	Négative	
P229	F	48	Skikda	Négatif	Positive	Négative	
P231	M	40	Constantine	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P232	M	30	Ain M'lila	Négatif	Positive	Négative	
P233	M	24	Teleghma	Négatif	Positive	Négative	
P234	M	21	Constantine	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P235	M	35	Khenchla	Positif	Positive	Négative	
P236	M	24	Alger	Positif	Positive	Négative	
P237	F	65	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Négative	
P238	M	25	Ibn Ziad	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P238bis	M	24	Ibn Ziad	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P239	F	11	BeniH'miden	Négatif	Négative		
P240	M	39	Khenchla	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P241	M	29	Khenchla	Négatif	Positive	Positive	>25
P242	M	22	Tizi Ouzou	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P243	M	42	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P244	M	17	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P245	F	61	Bekira	Négatif	Positive	Négative	
P246	M	29	Constantine	Négatif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P247	M	34	Khenchla	Négatif	Positive	Négative	
P248	F	70	Constantine	Négatif	Négative		
P248bis	F	69	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P249	F	42	Constantine	Négatif	Positive	Négative	

P250	M	22	Oran	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P251	F	20	BeniH'miden	Positif	Positive	ND	
P252	F	60	Bekira	Positif	Positive	Négative	
P253	F	80	Tedjnenet	Négatif	Négative		
P254	F	56	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P255	M	14	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P256	F	30	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P257	M	22	Oran	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P258	M	23	Khenchla	Positif	Positive	Négative	
P259	M	40	Jijel	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P260	F	65	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P261	M	31	Alger	Négatif	Positive	Négative	
P262	M	42	Constantine	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P263	M	21	Syrie	Négatif	Négative		
P264	M	62	Oum El Bouaghi	Négatif	Positive	Négative	
P265	M	32	Constantine	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P266	F	61	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P266bis	F	60	Constantine	Négatif	Négative		
P267	M	35	Bekira	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P268	M	2	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Négative	
P269	M	16	Annaba	Négatif	Négative		
P270	M	27	Khenchla	Négatif	Négative		
P271	F	90	Sedrata	Négatif	Négative		
P272	F	52	Guelma	Positif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P272bis	F	53	Guelma	Positif	Positive	positive	<i>L.donovani</i>
P273	M	5	Constantine	Négatif	Négative		
P274	F	22	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P275	M	4	Mila	Positif	Positive	ND	
P276	M	22	Ain Baida	Négatif	Positive	positive	<i>L.major</i>
P277	M	20	Khenchla	Négatif	Positive	Négative	
P278	M	34	Khenchla	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P279	M	22	Oran	Négatif	Positive	Négative	
P280	M	31	Oued Zenati	Positif	Positive	Négative	
P281	F	29	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P282	F	73	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P283	F	42	El Khroub	Négatif	Négative		
P285	M	35	Tebassa	Négatif	Positive	Négative	
P286	F	9		Négatif	Négative		
P/C146	M	22		Négatif	Positive	Négative	
P287	M	22	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P288	F	13	Constantine	Positif	Positive	Négative	
P289	M	40	Ben Boulaid	Négatif	Négative		
P290	F	14	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P291	F	35	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P292	M	22	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	Négative	
P293	F	41	Constantine	Négatif	Négative		
P294	F	13	Constantine	Négatif	Négative		
P295	M	40	Constantine	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P296	M	64	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P297	M	17	Constantine	Négatif	Positive	Négative	

P298	M	31	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P299	F	67	Batna	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P301	F	28	Jijel	Négatif	Positive	Négative	
P302	F	52	Sedrata	Négatif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P303	F	14	Constantine	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P304	M	39	Hamma Bouziane	Négatif	Positive	Négative	
P305	F	23	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P306	M	45	Tamlouka	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P307	M	30	Didouche mourad	Négatif	Positive	Positive	>25
P308	M	29	Zighoud Youcef	Négatif	Positive	Négative	
P309	M	18	Ain Abid	Positif	Positive	Négative	
P310	M	28	Tebessa	Positif	Positive	Positive	<i>L.donovani</i>
P311	M	20	Tiaret	Négatif	Positive	Négative	
P312	M	16	Ain Baida	Négatif	Positive	Négative	
P314	M	20	Khenchla	Négatif	Négative		
P315	F	10	Sigüs	Positif	Positive	Positive	<i>L.tropica</i>
P316	F	38	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P317a	F	21	Djelfa	Négatif	Positive	Négative	
P317b	F	21	Djelfa	Négatif	Positive	Négative	
P318	M	25	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	Positive	<i>L.major</i>
P319	M	23	Médéa	Négatif	Positive	Négative	
P320	M	40	Zighoud Youcef	Positif	Positive	Négative	
P321	F	41	Constantine	Négatif	Positive	Négative	
P322	M	20	Adrar	Négatif	Positive	Négative	
P323	M	29	Adrar	Positif	Positive	Négative	
P324	M	20	Adrar	Positif	Positive	Négative	
P325	M	20	Guelma	Positif	Positive	Positive	<i>L.donovani</i>
P326	M	3	Constantine	Négatif	Positive	Négative	

Tableau récapitulatif des patients suspectés de LC

Annexe III

Patients	Sexe	Age	Origine	Résultats			HAI
				ED	PCR genre	PCR espèces	
PM1	F	4	El Oued	Positif			
PM2	M	5	Jijel	Positif			
PM2 bis	F	2	Ain Baida	Négatif			
PM3	F	3	Skikda	Négatif			Négative
PM4	F	1	Constantine	Négatif			Négative
PM4 bis	M	2	Annaba	Positif			
PM5	M	1	Annaba	Négatif			Négative
PM6	M	6	Ferdjioua	Négatif			Négative
PM7	M	3	Grarem	Positif			
PM8	F	3,5	Jijel	Négatif			Négative
PM9	M	3	Annaba	Négatif			Négative
PM10	M	9M	Guelma	Positif			
PM11	M	13	Constantine	Négatif			Négative
PM12	M	5M	Skikda	Négatif			Négative
PM13	M	4,5	Annaba	Négatif			Négative
PM14	M	2	Constantine	Négatif			Négative
PM15	F	3	Mila	Négatif			Négative
PM16	F	6	Constantine	Négatif			Négative
PM17	F	1	Khenchla	Négatif			Négative
PM18	F	8	El Eulma	Négatif			Négative
PM19	M	1,5	Khenchla	Négatif			Négative
PM20	M	6	El Ouenza	Négatif			Négative
PM21	F	4	Ain Baida	Positif	Positive	Négative	
PM22	M	2	Meskana	Positif			
PM23	M	2,5	Annaba	Négatif			Négative
PM 24	F	1,5	Hamma Bouziane	Positif	Positive	Négative	
PM24 bis	M	1	Jijel	Négatif			Négative
PM25	F	7	Biskra	Négatif			Négative
PM26	M	4	Ferdjioua	Négatif			Négative
PM27	F	57	Ain Abid	Négatif			Négative
PM27 bis	M	5M	Skikda	Négatif			Négative
PM 28	M	2	Tebessa	Négatif	Positive	Négative	Positive
PM28 bis	F	4	Tabessa	Négatif			Positive
PM29	F	1,5	Mila	Positif	Positive	Négative	
PM30	F	35	Soun Naamane	Négatif			Négative
PM32	M	1,5	Barika	Positif	Positive	Négative	
PM40	F	NN	Constantine	Négatif			
PM41	M	17	Grarem	Négatif			
PM47	M	5	Tamalous	Négatif			Négative
PM48	M	9M	Constantine	Positif			
PM55	F	12	Ain Fakroun	Négatif			Négative

PM60	M	5	Tamalous	Négatif				
PM61	M	9M	Tebessa	Négatif				
PM64	M	12	Zighoud Youcef	Négatif				
PM69	F	1	Ain Baida	Négatif				Négative
PM70	F	9M	Skikda	Négatif				
PM72	M	6	Taher	Négatif				
PM81	F	35	Guelma	Négatif				Négative
PM84	F	5	Milia	Négatif				
PM85	M	9	Annaba	Négatif				Négative
PM87	M	11	Jijel	Négatif				Négative
PM97	F	8	Ain Baida	Positif	Positive	Positive	<i>L. infantum</i>	
PM101	F	2	Milia	Négatif				Négative
PM102	F	5	Jijel	Négatif				Négative
PM103	M	5	Jijel	Négatif				
PM108	M	7	Ain Mila	Négatif				Négative
PM110	M	9	Athmania	Négatif				
PM112	F	20	Constantine	Négatif				Positive
PM113	F	2	Ibn Ziad	Positif	Positive	Positive	<i>L. infantum</i>	
PM115	M	2	Sidi Maarouf	Positif				
PM117	F	4	Khenchla	Positif				
PM123	F	13	Khenchla	Négatif				
PM128	F	9	Ain Mila	Négatif				Négative
PM135	M	2	Ferdjiousa	Négatif				
PM136	F	12	Hamma Bouziane	Négatif				Positive
PM138	F	6	Guelma	Négatif				Négative
PM140	F	2	Mila	Positif				
PM142	F	2,5	Batna	Positif	Positive	Négative		Négative
PM151	M	1	El Harrouche	Négatif				Négative
PM156	M	8	Annaba	Négatif	Positive	Négative		Négative
PM160	M	28	Rahmounia	Négatif				Négative
PM164	M	3	Jijel	Négatif				Négative
PM166	M	12	Tamalous	Négatif				
PM191	M	2,5	Guelma	Négatif	Positive	Négative		Négative
PM208	M	3	Ghardaia	Négatif				Négative
PM212	M	2	Skikda	Négatif	Négative			Négative
PM216	M	14	Jijel	Négatif				Négative
PM223	F	16	Constantine	Négatif				Négative
PM227	F	1,5	Ain Baida	Négatif	Négative			Négative
PM229	M	14	Touggourt	Négatif	Négative			Négative
PM232	F	1	Jijel	Négatif	Négative			Négative
PM237	F	16	Ferdjiousa	Négatif	Négative			Négative
PM237 bis	F	16	Ferdjiousa	Négatif				Négative
PM238	M	16	Constantine	Négatif	Négative			Négative
PM238 bis	M	15	Constantine	Négatif				Négative

PM247	M	12	Tedjnet	Négatif	Négative			Négative
PM256	F	40	Ain Baida	Négatif	Négative			Négative
PM281	M	9	El Oued	Négatif				Négative
PM 359	M	2,5	BeniH'miden	Négatif	Positive	Négative		Négative
PM366	F	6	Khenchla	Négatif				Négative
PM367	F	2	Collo	Positif				
PM374	M	3,5	Skikda	Négatif				
PM376	F	8	Didouche Mourad	Négatif				
PM381	F	44	Constantine	Négatif				
PM 402	F	3	Skikda	Négatif	Négative			Négative
PM 412	F	2	Collo	Négatif	Négative			Négative
PM 420	F	6	Tebessa	Négatif	Négative			Négative
PM415	F	20	Ain Mila	Négatif				Négative
PM425	F	4,5	Skikda	Négatif				
PM427	F	1,5	Chelghoum Laid	Positif	Positive	Négative		
PM432	M	2,5	Guelma	Négatif				Négative
PV1	M	2	Constantine	Négatif	Négative			Négative
PV2	M	1,5	Mila	Positif	Positive	Négative		
PV3	F	1	Ain Baida	Négatif	Négative			
PV4	M	1	Oum El Bouaghi	Positif	Positive	Négative		
PV5	M	1,5	Mila	Positif	Positive	Négative		
PV5 bis	M	1,5	Mila	Positif	Positive	Positive	<i>L. infantum</i>	
PV6	M	4	Mila	Positif	Positive	Négative		
PV7	M	2	Ferdjioua	Positif	Positive	Négative		
PV8	M	3	Collo	Positif	Négative			
PV9	M	3	Mila	Négatif	Positive	Négative		Négative
PV10	M	9	Biskra	Négatif	Négative			Négative

Tableau récapitulatif des patients suspectés de LV

Study of Leishmaniasis wich diagnosticated in C.H.U. of CONSTANTINE

Abstract

Two forms of leishmaniose coexist in an endemic state in Algeria: the cutaneous leishmaniasis and the visceral leishmaniasis with *L. infantum*. This last caused a real problem of public health where it extends on all the northern part of the country. One counts approximately 400 new cases of LV per year. The LC is observed in our areas in two clinical and epidemiologic forms: the sporadic cutaneous form of North with *L. infantum* and the zoonotic cutaneous form with *L. major*. These zoonoses being observed in 41 wilayas out of 48 which account country. Taking into account the réémergence of the leishmaniasis in the world, of the geographical variability of the epidemiology and the increase in the number of travellers, a pilot study on the diagnosis of the cutaneous and visceral leishmaniasis was carried out in Constantine, one of the hearths of the East. 338 cutaneous taking away and 112 samples of born marrow were analyzed in microscopy and by real time PCR. The results obtained show that the number of positive patients to the direct examination is 137/328. As for those positive in real time PCR of the kind, it is of 266/328 patients. In addition, a real time PCR of the species was carried out on 136 cutaneous taking away and 30 others of born marrow. This technique made it possible to identify 73 stocks starting from the cutaneous lesions: 60 *L. major*, 06 *L. tropica*, 6 *L. donovani* and 1 stock belonging to the species *L. infantum*. As for the samples of born marrow, they enabled us to highlight the presence of the visceral species *L. infantum* among three patients reached of leishmaniasis.

Key words: cutaneous leishmaniasis – visceral leishmaniasis- diagnosis- Real time PCR- Constantine

دراسة اللشمنيات المشخصة بالمستشفى الجامعي بقسنطينة

الملخص

نوعين من اللشمانيا متوطنة في الجزائر : اللشمانيا الجلدية و اللشمانيا الحشوية لـ *L.infantum* هذه الأخيرة تطرح مشكلة بالنسبة للصحة العامة بحيث أنها تنتشر في كافة الجهة الشمالية للبلاد. يعد تقريبا 400 حالة للشمانيا الحشوية كل سنة. اللشمانيا الجلدية موجودة في مناطقنا تحت شكلين سريريين و وبائيين : الشكل الجلدي الشمالي الغير المنتظم لـ *L. infantum* و الشكل الجلدي الحيواني لـ *L.major*. هذه الأمراض المتنقلة عبر الحيوانات موجودة في 41 ولاية من ضمن 48 التي تعد في الجزائر. نتيجة لعودة ظهور داء اللشمنيات في العالم ، للتغيرات الجغرافية من حيث الإصابات وزيادة عدد المسافرين ، تمت دراسة لتشخيص هذا المرض الجلدي و الحشوي بقسنطينة التي تعتبر إحدى البؤر بالشرق الجزائري. تمت تحليل 338 عينة جلدية و 112 عينة من مخ العظام بواسطة المجهر و PCR في الوقت الحالي. النتائج المحصل عليها بينت بان عدد المرض ذو نتيجة اجابية يقدر بـ 137/328 بالنسبة للمجهر و بـ 266/328 بالنسبة لـ PCR في الوقت الحقيقي. نتيجة لذلك ، تم تحديد النوع لـ 136 عينة جلدية و 30 أخرى بالنسبة لمخ العظام بواسطة تقنية PCR في الوقت الحقيقي. النتائج المحصل عليها بينت بأن النوع السائد هو *L.major* بعدد 60، متبوع بـ 6 *L.tropica* و 6 *L.donovani* و 1 . *L.infantum* أما بالنسبة لعينات مخ العظام تبين بان *L.infantum* هو النوع المحصل عليه عند ثلاث مرضى للشمانيا الحشوية.

المفاتيح : اللشمانيا الجلدية - اللشمانيا الحشوية – تشخيص – PCR في الوقت الحالي - قسنطينة

Nom: **DJEZZAR-MIHOUBI**

Prénom: **ILHEM**

Thème

ETUDE DES LEISHMANIOSES DIAGNOSTIQUES AU CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE Ben Baddis DE CONSTANTINE

Résumé

Deux formes de leishmaniose coexistent à l'état endémique en Algérie : la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale à *L. infantum*. Cette dernière pose un réel problème de santé publique où elle s'étend sur toute la partie nord du pays. On dénombre environ 400 nouveaux cas de LV par an. La LC est observée dans nos régions sous deux formes cliniques et épidémiologiques distinctes : la forme cutanée sporadique du Nord à *L. infantum* et la forme cutanée zoonotique à *L. major*. Ces zoonoses étant observées dans 41 wilayas sur les 48 que compte le pays. Compte tenu de la réémergence de la leishmaniose dans le monde, de la variabilité géographique de l'épidémiologie et de l'augmentation du nombre du nombre de voyageurs, une étude pilote sur le diagnostic des leishmanioses cutanée et viscérale a été réalisée à Constantine, l'un des foyers de l'Est Algérien. 338 prélèvements cutanés et 112 échantillons de moelle osseuse ont été analysés en microscopie et en PCR en temps réel. Les résultats obtenus montrent que le nombre de patients positifs à l'examen direct est de 137/328. Quant à ceux positifs en PCR en temps du genre, il est de 266/328 malades. Par ailleurs, une PCR en temps réel de l'espèce a été réalisée sur 136 prélèvements cutanés et 30 autres de moelle osseuse. Cette technique a permis d'identifier 73 souches à partir des lésions cutanées : 60 *L. major*, 06 *L. tropica*, 6 *L. donovani* et 1 souche appartenant à l'espèce *L. infantum*. Quant aux échantillons de moelle osseuse, ils nous ont permis de mettre en évidence la présence de l'espèce *L. infantum* chez trois patients atteints de leishmaniose viscérale.

Mots-clés : Leishmaniose cutanée – Leishmaniose viscérale – Diagnostic – PCR - Constantine