

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB-BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude En vue de l'obtention du Diplôme :

Master II en génétique physiologie

Thème :

**Diagnostic sérologique et moléculaire de la
leishmaniose cutanée humaine**

Présenté et soutenu publiquement le 25 septembre 2013

Par :

M^{lle} : BELKACEM Karima

et M^{lle} : BESSACHI Somia

Devant le jury composé de :

M ^{me} Kebbas S.	MAA (USDB)	Présidente de jury
M ^{me} Boudjema L.	MAA (USDB)	Examinatrice
M ^{me} Bensalah L.	MAB (USDB)	Examinatrice
M ^r Abdelouahed K.	A (HCA)	Promoteur
M ^r Bessaad M-A.	MAB (USDB)	Co-Promoteur

2012-2013

Dédicaces

Dieu merci de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,

*La force d'y croire,
La patience, le courage et le bonheur
D'accomplir mes études et arriver à ce stade.*

Je dédie ce modeste travail :

*À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse et d'amour, qui
s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à **MA MÈRE**.
A **MON PÈRE**, école de mon enfance, qui a été mon ombre sur toutes
les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie
À m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.
Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices
que vous avez consentis pour mon bien être, et la poursuite de mes
études dans de bonnes conditions.*

*Aucune dédicace, ne saurait exprimer mes grandes admirations, mes
considérations et mes sincères affections pour vous.
Que Dieu vous garde, vous protège et vous offre une vie pleine de joie
et que vous habitiez le paradis.*

*A ma sœur **FATIMA***

*A mes frères **MOHAMED, BILLEL, OSSAMA, YUCEF***

*Je vous souhaite une bonne santé, une vie pleine de plaisir et de
réussite.*

*A ma chère tante **HOUDA**. A qui je souhaite une longue et heureuse vie.*

*A mes amies particulièrement **AMEL**.*

*A mon binôme dans ce travail, **KARIMA**.*

A toute ma famille.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

Je dédie ce travail.

Somia

Dédicaces

À L'ÉTERNEL NOTRE DIEU

Pour ce souffle de vie que Tu m'as donné et pour m'avoir permis d'en arriver jusque-là et de me permettre de m'en aller par-delà.

A ceux pour qui j'ai une grande gratitude et reconnaissance, pour l'amour et la patience qu'ils m'ont donnés afin que je sois là où je suis.

A ceux qui n'ont jamais cessé de me soutenir, de veiller sur moi durant toute la période de mes études.

Pour l'amour qu'ils me portent, pour toutes les peines et les sacrifices qu'ils se sont portés.

À

*Ma très chère **maman** et **belle maman**,*

*Que ce travail soit l'expression de mon attachement, de mon dévouement et de **mon grand amour**.*

À

*Mon très **cher père**,*

*Que ce travail soit la preuve de mon **grand amour**, de ma **grande reconnaissance** et de mon **attachement éternel**.*

À

*Mes **grandes mères**, **mon frère** et **mes sœurs**,*

*En **signe de mon profond attachement** et de ma **profonde tendresse**.*

*Je vous souhaite **longue vie**, **prospérité** et **réussite**.*

À

*Mes **oncles** et **tantes***

*Merci pour vos **prières** et vos **encouragements**.*

*À mes **cousins** et **cousines***

*À mes **neveux***

*Je vous **adore**.*

*A ceux qu'un jour, par un mot ou par un conseil m'ont aidé à me res-
sourcer et ainsi terminer mon projet de fin d'étude dans les meilleures
conditions.*

À tous mes enseignants

À tous mes amis (es)

A toutes ces personnes, je dédie le fruit de mon premier travail

*Je dédie ce petit travail aux leishmanies, ces fabuleuses petites bes-
tioles si intrigantes (qui pourraient être mes meilleures amies si elles
n'étaient pas si méchantes avec mes congénères).*

*À force de me mettre à leur place pour les comprendre, je crois parfois
en être une*

*En parlant d'elles, je ne peux oublier de parler de la plus précieuse
d'entre elles, **Sonia***

Karima

Remerciements

Louange à Dieu le clément, le miséricordieux, qui nous a donné le courage et la patience de mener à bien ce travail et pour sa grâce infinie pour nous

Nous avons le plaisir d'adresser notre profondes gratitudes et respects à :

*Madame le Professeur **ADJMI Hayet,***

Pour sa générosité, de nous avoir accepté au sein de son service, pour réaliser notre projet de fin d'étude.

Nous tenons à adresser notre profonde gratitude et respects à :

*Notre encadreur **Mr ABDELMAHED Khaled,***

Pour sa générosité, ses encouragements incessants, ses directives précieuses, sa patience, ses apports scientifiques qui étaient d'une grande aide pour l'élaboration de ce mémoire.

Pour l'esprit et la curiosité scientifiques qu'il a développés en nous, Pour tout le temps que vous nous a consacré malgré vous charges professionnelles.

*Notre Co-promoteur **Mr BESSAAD Mohamed Amine,***

Pour ses conseils, ses encouragements, sa gentillesse et pour nous avoir guidés ainsi que pour tout le temps qu'il nous a consacré.

***Mr Mohamed Saïd** chef d'option génétique et physiologie, Pour la qualité d'enseignant et pour l'esprit et la curiosité scientifiques qu'il a développés en nous.*

***Nos enseignants** du département de biologie,*

Pour la qualité de leur enseignement et leur disponibilité, leurs encouragements et leurs conseils

*Nous remercions très sincèrement, les membres de jury madame la présidente de jury **M^{me} Kebbas S.** et mesdames les examinatrices **M^{me} Boudjema L.** et **M^{me} Bensalah L.** d'avoir bien voulu accepter examiner ce travail.*

Ainsi nous adressons notre remerciement à :

Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce présent mémoire, particulièrement ;

M^{me} BOUDJARDA Souad,

Pour sa patience et pour nous avoir fait profiter de sa longue expérience.

Messieurs, SANDID A., LAZRI M.L., BAKHOUCHE S., BENCHIKH S., MANSOURI A.

Merci pour l'amabilité, la disponibilité l'aide et le soutien de tout toute la période expérimentale.

Mesdames, Zahra, Ahlem, Khadidja, Hala, Djoumouza, Kalthoum et Farida

Merci pour votre compagnie

À Tout notre entourage, qui nous a permis d'avancer tous les jours. Et à toute personne ayant contribué à la réussite de ce travail.

À Tous nos professeurs durant notre cursus universitaire.

A tous nos amis et collègues pour leur soutien moral et leur encouragement merci d'être nos amis !

Et tout ceux qui nous sont chers.

Merci à tous et à toutes

Résumé :

La leishmaniose cutanée constitue un problème de santé publique dans le monde de même en Algérie, où elle occupe la première place dans les maladies parasitaires représentant ainsi 35 % des maladies à déclaration obligatoire.

L'examen direct et la culture sont les tests de diagnostic classique et de référence mais par fois ils ne sont pas suffisants. Le besoin de recourir à d'autres techniques telles que sérologiques et moléculaires est évident. Ce travail donc se veut servir une réflexion autour de cette idée. Ainsi, le but est d'une part la mise en place de la technique d'amplification par PCR en utilisant une amorce qui cible les mini cercles de l'ADN kinétoplastique (K13A/K13B) et d'autre part de contrôler l'application de techniques sérologiques, Immunofluorescence indirecte (IFI) et Western Blot (WB) dans le diagnostic de la LC, en comparant les résultats obtenus par ces techniques moléculaires et sérologiques à ceux trouvés par les techniques classiques à savoir l'examen direct et la culture.

Cette étude a concerné quarante huit (48) patients recensés au niveau du service de parasitologie mycologie médicale de l'hôpital centrale de l'armée (HCA). La comparaison des résultats moléculaires et sérologiques a montré une discordance de sensibilité, le WB s'est avéré le plus sensible des deux techniques sérologiques (89%), néanmoins il engendre une difficulté d'affirmer ou d'infirmer un diagnostic de LC, comparée à la PCR (K13A/K13B), qui a montré une sensibilité de 82%, avec un résultat davantage sûr et précis. L'IFI s'est montrée peu contributive dans ce diagnostic, avec une sensibilité de 17%. L'examen direct et la culture malgré leurs faibles sensibilités restent les techniques de référence, ils devraient cependant être complétés par les techniques sérologiques et moléculaires.

Ce travail nous permet de recommander, pour un diagnostic de la LC précis et efficace, de procéder par un examen direct et une culture, en parallèle à un examen sérologique basé sur un WB et/ou une autre technique qui remplacerait l'IFI, suivis par une PCR. Ce protocole permet, en plus de la précision, de gagner du temps pour mettre en place une thérapie précoce.

Mots clés :

Leishmaniose cutanée, diagnostique, PCR, mini cercles, ADNk.

Summary:

Cutaneous leishmaniasis is a public health problem in the world even in Algeria, where it ranks first in parasitic diseases and represent 35 % of diseases with compulsory notification.

Direct examination and culture are classical and reference diagnosis tests, but often they are not enough. Therefore, there is a need to use other techniques such as serological and molecular .So our work aimed firstly to install the gene amplification techniques (PCR) using a primer targeting mini circles of Kinetoplastic DNA (K13A/K13B) and secondly to assess the contribution of serological techniques, indirect fluorescent (IFI) and western blot (WB) in the diagnosis of CL, by comparing the results of these molecular and serological techniques to those found by conventional techniques namely the direct examination and culture.

This study concerned forty eight (48) patients collected from the parasitology and mycology department of the military central hospital (MCH).The comparison of molecular and serological results showed a discrepancy of sensitivity, the WB has proved to be the most sensitive (89%), but it creates difficulty to confirm or refute diagnosis of CL, compared to PCR (K13A / K13B), which showed a sensitivity of 82%, with more certainty. The IFI has shown little contributing in this diagnosis, with a sensitivity of 17%. Direct examination and culture, despite their low sensitivities, are reference techniques, but they should be supplemented by serological and molecular techniques.

This work enables us to recommend for a precise and effective diagnosis of CL, to proceed by a direct examination and a culture, simultaneously with a serological examination based on a WB and/or another technique which would replace the IFI, followed by a PCR. This protocol allows, in addition to the precision, to save time in order to set up an early therapy.

Keywords:

Cutaneous leishmaniasis, diagnosis, PCR, mini circles, kDNA.

ملخص:

داء الليشمانيا الجلدي هو مشكلة صحية عامة في العالم و حتى في الجزائر حيث أنها تحتل المرتبة الأولى في الأمراض الطفيلية والتي تمثل 35% من الأمراض السارية.

الفحص المجهرى المباشر والزراعة هي الطرائق التشخيصية المرجعية ولكن في كثير من الأحيان هي غير كافية، ما تطلب استخدام تقنيات أخرى مثل المصلية والجزئية. ولذلك يسعى هذا العمل إلى البحث في موضوع تطبيق هذه التقنيات وبالتالي فإن الهدف من ذلك هو من جهة : وضع تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) باستخدام البادئة (K13 B/K13A) التي تستهدف الحلقات الصغيرة لـ DNA الكينيتوبلاستي و من جهة أخرى دراسة مساهمة التقنيات المصلية (IFI, W B) في تشخيص داء الليشمانيا الجلدية بمقارنة كل من نتائج هذه التقنيات الجزئية والمصلية مع هته المتحصل عليها بالتقنيات الكلاسيكية المتمثلة في الفحص المجهرى المباشر والزراعة والاستنتاج.

شملت هذه الدراسة 42 مريضاً تم إحصائهم في قسم الطفيليات و الفطريات للمستشفى المركزي للجيش (م. م. ج). أظهرت المقارنة بين نتائج الجزئية و المصلية وجود تباين في تحسس هذه التقنيات و قد ثبت أن الـ WB هو الأكثر تحسسا من بين التقنيتين المصليتين (89%). إلا أنها تخلق صعوبة لتأكيد أو استبعاد تشخيص الليشمانيا الجلدية مقارنة بالـ PCR (K13B/K13A) التي أظهرت تحسسا يقدر بـ 82% مع نتائج أكثر موثوقية ودقة. أظهرت تقنية الـ IFI مساهم غليلة في هذا التشخيص، بتحسس قدره 17%. على الرغم من التحسس المنخفض لتقنيتي الفحص المجهرى المباشر و الزراعة إلا أنها تقنيات مرجعية ، مع ذلك ينبغي أن تدعم بالتقنيات المصلية والجزئية.

هذا العمل يتيح لنا وضع إستراتيجية مبدئية من أجل تشخيص دقيق وفعال و التي تقوم أولاً على البدء بالتقنيات الكلاسيكية المتمثلة في الفحص لمجهرى المباشر والزراعة بالموازاة مع الاختبارات المصلية التي تركز على الـ WB و/أو تقنية أخرى لتحل محل الـ IFI بواسطة بتقنية الـ PCR. هذا البروتوكول و علاوة على دقته يسمح باختصار الوقت للإسفاة من علاج مبكر.

الكلمات الدالة :

الليشمانيا الجلدية، تشخيص، التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR، الحلقات الصغيرة AND، الكينيتوبلاستي.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucleique
ADNr : ADN ribosomal
ADNk : ADN kinétoplastique
ARN : Acide Ribo-Nucleique
AL: Azote Liquide
ARNg: ARN guides
ARNr: ARN ribosomal
ARNsn: Small Nuclear RNAs
ATB : Antibiotique
AU : Albumen-Urine
BET : Bromure d'Ethidium
Cyt b : Cytochrome b
ddl : degré de liberté
dNTP: Deoxynucleoside triphosphate
ED: Examen Directe
EDTA: Ethylene Diaminetetra acetic Acid
GIPL : Glycoinositol-Phospholipides
Gp63 : Glycoprotéine 63 KDa
H₀ : Hypothèse nulle
H₂O_{DS} : Eau distillé stérile
IFI : Immuno-Fuorescence Indirecte
IgH : Immunoglobuline Humain
ITS1: Internal Transcribed Spacer
L : *Leishmania*
LC : Leishmaniose Cutanée
LCN : Leishmaniose Cutanée du Nord
LCU : Leishmaniose Cutanée Urbaine
LCZ : Leishmaniose Cutanée Zonotique
LMC : Leishmaniose Mucocutanée
Lmj : *Leishmania major* Friedlin
LP : Lipophosphoglycane
LSA : *Leishmania* soluble antigen
LST : leishmanin Skin Test
LV : Leishmaniose Viscérale
MØ : Macrophage
MLEE : Multi Locus Enzym Electrophoresis
Mon : Montpellier
NNN: Nicolle-Mac Neal-Novy
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate
ORF: Open Reading Frame
PBS: Phosphate Buffer saline
PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG: Polyéthylène Glycol
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PTP: Protéines Tyrosine Phosphatases
RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphisms
rK39: recombinant Kinésine
PK: protéinase K
RNAP II: ARN polymérase II
RPMI: Rosewald Park Memorial Institut
SVF: Sérum de Vœu Fœtal
TAE: Tris/Acétate/EDTA
TE : Tris/EDTA
Tm : Meelting Température (température d'hybridation)
TNN: NaOH/Tween20/Nonidet NP
TNNT: NaOH/Tween20/Nonidet NP/Tris
U/μl : Unité par microlitre
VU: Vitellus-Urine
WB: Western Blot
×G: Grossissement.

Sommaire

Introduction.....	01
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
I Définition	02
II Historique	02
III Épidémiologie	03
III.1 L'agent pathogène	03
III.1.1 Taxonomie	03
III.1.2 Morphologie	04
III.1.2.1 La forme promastigote.....	04
III.1.2.2 La forme amastigote.....	05
III.1.3 Génome	05
III.1.3.1 Génome nucléaire	05
III.1.3.2 Génome kinétoplastique	06
III.1.4 Organisation du génome	07
III.1.5 Transcription	07
III.1.6 Biologie	08
III.2 Le vecteur.....	08
III.2.1 Taxonomie	09
III.2.2 Morphologie	09
III.3 Réservoir	10
III.4 Cycle évolutif	11
IV Répartition géographique.....	12
IV.1 Dans le monde	12
IV.2 En Algérie.....	12
IV.2.1 La leishmaniose cutanée du Nord (LON)	12
IV.2.2 La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)	13
IV.2.3 La leishmaniose cutanée urbaine (LCU)	13
V Etude clinique	13
V.1 Diagnostic	13
V.1.1 Orientation clinique	14
V.1.2 Diagnostic biologique	14
V.1.2.1 Le prélèvement	14
V.1.3 Méthodes de diagnostic direct	14
V.1.3.1 L'examen direct	14
V.1.3.2 Culture du parasite	14
V.1.3.3 Immunohistochimie	14
V.1.3.4 Extraction d'ADN	15
V.1.3.5 La Polymerase Chain Reaction (PCR)	15
V.1.3.6 La PCR quantitative en temps réel	15
V.1.3.7 Le typage iso-enzymatique	15
V.1.3.8 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	16

V.1.4 Méthodes de diagnostic indirect.....	16
V.1.4.1 Diagnostic sérologique	16
• Immunofluorescence indirecte (IFI)	16
• Western blot (WB)	16
• Enzyme like immuno-sorbent assay ELISA.....	16
• Électrosynérèse (ES).....	17
• Test d'agglutination directe (DAT)	17
• Héماغglutination indirecte (HAI)	17
• Test d'immuno-diffusion (IDA).....	17
• Intradermo-réaction à la leishmanine (Monténégro)	17
VI Traitement des leishmanioses cutanées	17
VII Prophylaxie	18
VII.1 Lutte antivectorielle	18
VII.2 Lutte contre les réservoirs	18
VII.3 Prophylaxie humaine	19
VIII Physiopathologie et réponse immunitaire de l'hôte.....	19
VIII.1 Effet de la salive du vecteur	19
VIII.2 Relations hôte-parasite.....	19
VIII.2.1 Immunité humaine face à la Leishmaniose	19
VIII.2.2 Interactions leishmanies/macrophages	20
VIII.2.3. Co-infection Leishmaniose cutanée/VLC.....	21

Chapitre II : Partie expérimentale

I Matériel et méthodes	22
I.1 Matériel	22
I.1.1 Matériel non biologique	22
I.1.1.1 Milieux de culture.....	22
I.1.1.2 Réactifs	22
I.1.2 Matériel biologique	22
I.1.2.1 Souche	22
I.1.2.2 Prélèvements	23
I.2 Méthodes	23
I.2.1 Diagnostic direct.....	23
I.2.1.1 Examen direct	23
I.2.1.2 La culture	25
I.2.2 Diagnostic séro-immunologique	26
I.2.2.1 immunofluorescence indirecte	26
I.2.2.2 Western blot	27
I.2.3 Diagnostic moléculaire	28
I.2.3.1 L'extraction	28
I.2.3.2 Polymérase chaine réaction « PCR »	31

Résultats et Discussion

I.1 Résultats	36
---------------------	----

I.1 Caractéristiques de la population	36
I.2 Résultats globaux	39
I.2.1 Résultats des examens parasitologiques	39
I.2.1.1 Résultats de l'examen direct (ED)	39
I.2.1.2 Résultats de la culture	39
I.2.2 Résultats des examens sérologiques	41
I.2.2.1 Résultats de l'IFI	41
I.2.2.2 Résultats de Western Blot.....	42
I.2.3 Résultats moléculaires.....	44
I.2.3.1 Résultats de la PCR	44
Discussion.....	47
Conclusion.....	56
Références bibliographiques	
Annexes	

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques de l'amorce K13A/ K13B.....	32
Tableau II : Les composants de MIX de l'amorce K13A/K13B Selon le protocole L. Lachaud 2002.....	22
Tableau III : Conditions d'amplification cité par L. Lachaud 2002 avec une température d'hybridation 57C°.	33
Tableau IV : Répartition des cas selon la localisation des lésions.	38
Tableau V : Répartition des cas selon le délai d'apparition des lésions avant la présentation au laboratoire.....	38
Tableau VI : Comparaison des résultats de l'ED et de la culture.....	40
Tableau VII : Comparaison des résultats de l'IFI versus l'ED.....	41
Tableau VIII : comparaison des résultats de l'IFI versus la culture.....	41
Tableau IX : Comparaison des résultats de WB et de l'ED.....	43
Tableau X : Comparaison des résultats de WB et de la culture.....	43
Tableau XI : Comparaison des résultats de WB et de l'IFI.....	43
Tableau XII : Comparaison entre les deux techniques d'extraction kit et classique.....	45
Tableau XIII : Comparaison des résultats de la PCR et de l'ED.....	45
Tableau XIV : Comparaison des résultats de la PCR et de la culture.....	45
Tableau XV : Comparaison des résultats de la PCR et de l'IFI.....	45
Tableau XVI : Comparaison des résultats de WB et de PCR.....	45
Tableau XVII : Sensibilité et Spécificité de cinq techniques.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie des leishmanies (O.M.S, 1990).....	4
Figure 2 : formes promastigotes de <i>Leishmania</i> en culture in vitro	5
Figure 3 : formes amastigotes intramacrophagiques de <i>Leishmania</i>	5
Figure 4 : Organisation génique et maturation des ARNm chez <i>Leishmania</i>	8
Figure 5 : Phlébotome femelle gorgé de sang.....	10
Figure 6 : Le cycle évolutif de <i>Leishmania</i>	11
Figure 7 : Distribution de la leishmaniose cutanée dans le monde.....	12
Figure 8 : Interaction entre le MØ et <i>Leishmania</i> via leurs molécules de surface et des protéines solubles.....	20
Figure 9 : Réalisation des frottis cutanés à partir des lésions cutanées.....	23
Figure 10 : Frottis cutanés.....	24
Figure 11 : Coloration des frottis par Giemsa.....	24
Figure 12 : Formes amastigotes sur un frottis coloré en Giemsa.....	24
Figure 13 : Formes promastigotes colorées au Giemsa GX100.....	25
Figure 14 : Réalisation de l'IFI.....	26
Figure 15 : Résultats du WB.....	27
Figure 16 : Différents composant du Kit Qiagen.....	30
Figure 17 : Migration des amplicons à travers l'agarose.....	35
Figure 18 : Dépôt des amplicons additionnés sur une plaque de méthylène.....	35
Figure 19 : Produits PCR sous lumière UV.....	35
Figure 20 : Prévalence de la LC dans la population étudiée.....	36
Figure 21 : Répartition des cas selon le sexe.....	36
Figure 22 : Représentation des cas selon l'âge.....	37
Figure 23 : Répartition des cas selon la région de séjour.....	37
Figure 24 : Représentation des résultats de l'examen direct.....	39
Figure 25 : Formes amastigotes de <i>Leishmania</i> colorées au Giemsa.....	39
Figure 26 : résultats des cultures.....	40
Figure 27 : Représentation des résultats d'IFI en termes de cas positifs et négatifs....	41
Figure 28 : représentation des résultats du WB en termes de cas positifs et négatifs.	42
Figure 29 : Résultats de la PCR.....	44
Figure 30 : Diagramme récapitulatif pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée.	57

Introduction :

La leishmaniose est une anthroponose cosmopolite qui touche l'homme et l'animal dans différentes régions du globe. Cette parasitose causée par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, et transmise à l'homme, par un insecte vecteur hématophage (le phlébotome ou mouche des sables femelle) ; se développe au sein des cellules du système des phagocytes mononuclées. Les réservoirs de parasite sont généralement des rongeurs sauvages, le chien, et l'homme. Elle présente des formes cliniques et un polymorphisme très varié (**Dedet ,2001**).

La leishmaniose est largement répandue dans le monde, et connaît une aire géographique très large. Elle est présente sur quatre continents avec 88 pays affectés, dont 72 parmi les plus faiblement développés (**Rapp, 2001;Dedet,2001**).

Les formes cutanées de la leishmaniose sont les plus courantes et représentent 50-75 % de tous les nouveaux cas(**OMS, 2002 in Famakan, 2005**).

En Algérie ; la leishmaniose cutanée (LC) est connue depuis longtemps sous le nom de clou de Biskra ou Hab-es-sana (bouton d'un an) décrit par Hamel en 1860 (**Ser-gent et Gueidon, 1923 in Barchiche et Madion, 2008**). La LC a une extension géographique large avec apparition de nouveaux foyers.

Le diagnostic de la LC repose sur la mise en évidence directe ou indirecte du parasite par différentes techniques.

Les techniques classiques consistées par celles sérologiques et moléculaires devraient présenter un outil performant pour le diagnostic de la LC, dans le cas de portage asymptomatique de cette dernière mais surtout pour pallier au problème de répondre dans un délai le plus court possible au diagnostic afin de pouvoir lancer une thérapie précocement souvent impuissante d'une guérison.

En Algérie ces techniques sérologiques et moléculaires ne trouvent pas encore leur place dans le diagnostic de la LC, pour cela nous nous sommes intéressés à ce sujet en évaluant l'analyse sérologique et moléculaire en les comparant aux techniques classiques, l'ED et la culture.

En effet l'analyse sérologique a été effectuée via deux techniques, IFI et WB puis nous avons procédé à l'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR) à partir des sérosités, ensuite comparé ces résultats avec d'une part les résultats de l'examen direct et d'autre part ceux de la culture.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I Définition :

La leishmaniose cutanée (LC) est une parasitose à transmission vectorielle, transmise par la femelle de phlébotome du genre *Phlébotomus* ou *Lutzomyia* et due à un protozoaire intracellulaire du genre *Leishmania* (**Rapp et Roué, 2001 ; Fourati, 2011**).

II Historique :

Les formes des leishmanioses cutanées sont une des premières parasitoses décrites par l'observation des lésions qui remonte à la plus haute Antiquité aussi bien dans l'Ancien que dans le Nouveau Monde.

Au X^{ème} siècle, le médecin arabe Al Boukhari, décrit des affections dermatologiques, qui présentent des leishmanioses tégumentaires (**Dedet, 1999**) et aucune ne fait le lien entre ces affections cutanées et la piqûre de moustique (**Estevez, 2009**).

Guilhou, en 1833 décrit pour la première fois des cas de leishmanioses tégumentaires ou "bouton d'orient" (**Estevez, 2009**).

La découverte des parasites à l'intérieur des macrophages d'une lésion cutanée a été faite en 1882 par Mac-Naught et en 1885 par Cunningham (**Mitsubi et al., 2006**).

En 1898, à Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans des prélèvements d'ulcère, sans déterminer le statut taxonomique (**Mazelet, 2004**). Jusqu'à l'année 1901, qui est célèbre par l'identification de certains organismes dans les frottis tirés de la rate d'un patient, qui était mort de « fièvre dum-dum » par Leishman et en 1903 le capitaine Charles Donovan décrit comme étant de nouveaux organismes (**Hider, 2004**). Après, Ronald Ross établit le lien avec la maladie et nom de l'organisme " *Leishmania donovani* " (**Dedet, 1999**).

Nicolle et Sicre en 1908 font la première culture, ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate au point de la morphologie qui ont la même identité. En même année, Nicolle et Comte découvrent les mêmes protozoaires chez le chien, puis chez le cheval et le chat. Ils font ainsi de cette affection une maladie commune à l'homme et aux autres mammifères et ouvrent la voie aux recherches épidémiologiques (**Mazelet, 2004**).

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 des scarifications cutanées.

A partir de 1970, la caractérisation isoenzymatique des espèces responsables des LC a été établie grâce à l'analyse isoenzymatique (**Estevez, 2009**).

III Épidémiologie :

Compte tenu de la diversité des vecteurs, ainsi que de la variabilité de son agent pathogène, la leishmaniose cutanée a une écologie et une épidémiologie complexe.

III.1 L'agent pathogène :

C'est un protozoaire flagellé affectant de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages (Marty, 2007).

La classification des leishmanies était basée sur la comparaison de facteurs extrinsèques tels que les données cliniques et épidémiologiques, la répartition géographique ; les caractéristiques biologiques et morphologie, le comportement du parasite dans le vecteur, le pouvoir pathogène expérimental, les caractères culturels, et les critères immunologiques (Hide, 2004).

III.1.1 Taxonomie :

Les leishmanies appartiennent à l'ordre des *Kinetoplastida* de la famille des *Trypanosomatidae* et depuis 1903, au genre *Leishmania*. Ce genre *Leishmania* a été divisé en 2 sous-genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur (Bachi, 2001) (Fig. 1).

Le sous-genre *Leishmania* est caractérisé par un développement supra-pylorique (jonction intestin moyen-intestin postérieur du vecteur) et le sous-genre *Viannia* par un développement péripylorique (n'importe quel point de l'intestin) (Bachi, 2001; Hide, 2004; Bachi, 2006).

La leishmaniose cutanée en Algérie, avec ses trois formes distinctes ont dues a trois espèces différentes, la *L. major* pour la ECZ, la *L. infantum* pour la LCN, et en enfin la *L. killicki* pour la nouvelle forme urbaine de Ghardaïa (Boubidi, 2010).

La biologie moléculaire et la biochimie ont remplacé les facteurs phénotypiques extrinsèques par des critères intrinsèques non modifiés par des facteurs environnementaux.

Plusieurs techniques ont permis de reclasser les leishmanies selon ces nouveaux critères dont l'électrophorèse iso-enzymatique (ou MLEE « Multilocus Enzyme Electrophoresis »), qui est la méthode de référence du typage de souches et qui permis de définir des zymodèmes, qui constituent l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique.

Il existe aussi, la PCR (Polymerase Chain Reaction), les RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms), la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), qui sont des techniques plus résolutive permettant d'affiner la classification (Hide, 2004).

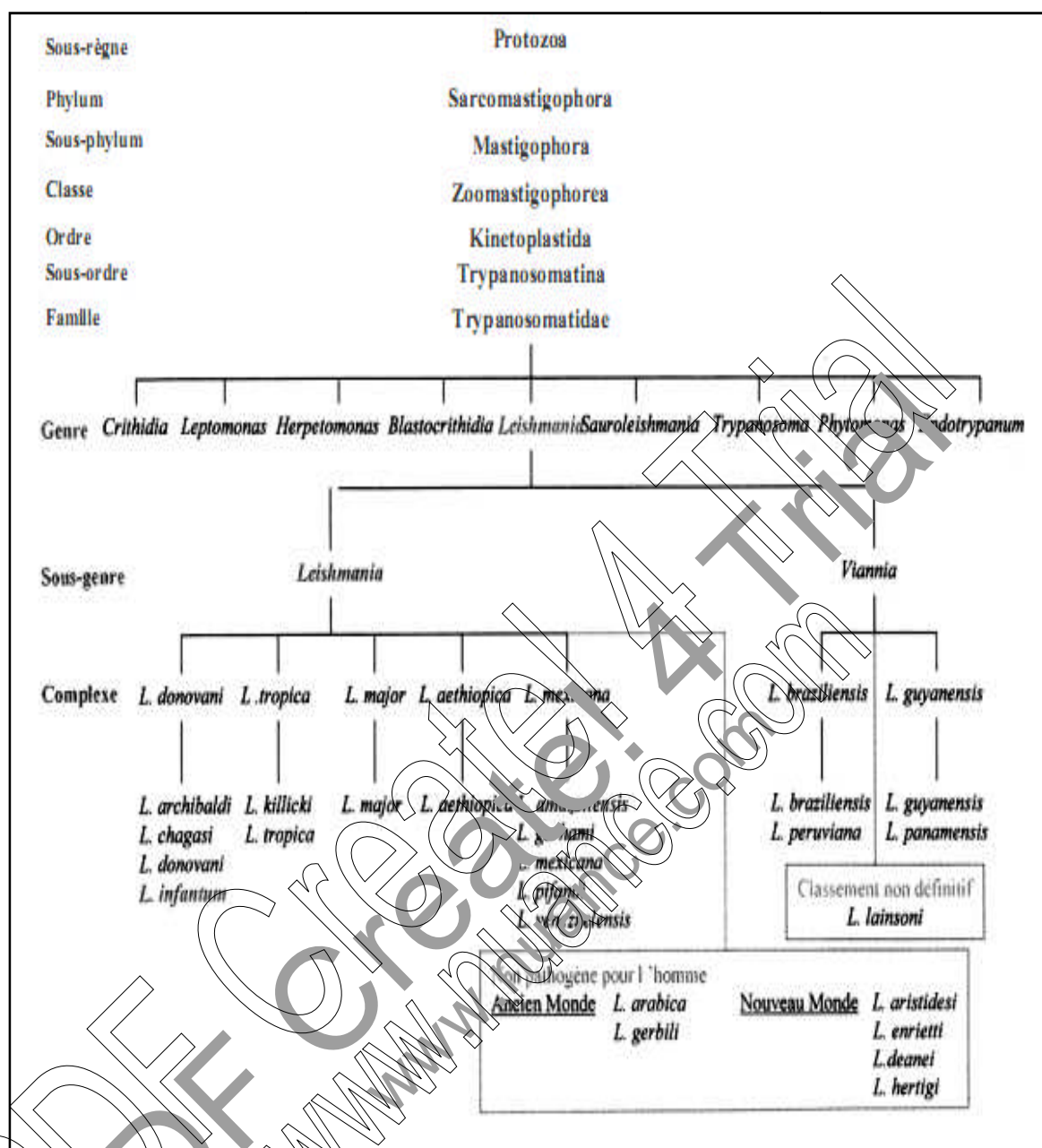


Figure 1 : Taxonomie des leishmanies (O.M.S, 1990).

III. 2 Morphologie:

Les leishmanies sont des parasites unicellulaires dimorphiques qui présentent principalement deux stades morphologiques au cours de leur développement : le stade promastigote, et le stade amastigote.

III.1.2.1 La forme promastigote (Leptomonas):

Il est un organisme allongé fusiforme et très mobile, mesurant environ 10 à 25µm de longueur sur 4 à 5 µm. Le noyau est approximativement central, le Kinétoplaste est situé en position antérieure. Le flagelle libre de 10 à 15 µm inséré sur le kinétoplaste par le blépharoblaste (Fig. 2). C'est le stade que présente le parasite dans le tube digestif du phlébotome et en culture (Dedet, 2001; Meghamla, 2007; Estevez, 2009).

III.1.2.2 La forme amastigote :

Il est un petit corpuscule ovalaire ou arrondi, immobile et aflagellée (**Fourati, 2011**), d'environ 4 μm de long et de 2 μm de large, présentant un noyau, un kinétoplaste, et un appareil flagellaire rudimentaire (**Hassam, 1991**).

C'est le stade du parasite, intracellulaire, à l'intérieur des cellules du système des phagocytes mononucléés des mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores (**Dedet, 2001**). Ces formes peuvent se trouver libres après éclatement des cellules hôtes (**Fig. 3**).

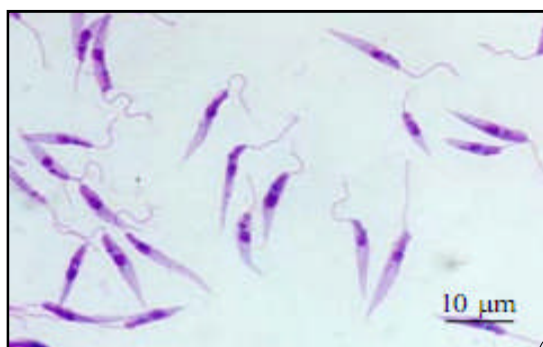


Figure 2 : formes promastigotes de *Leishmania* en culture in vitro (**Holzmueller in Hide, 2004**).

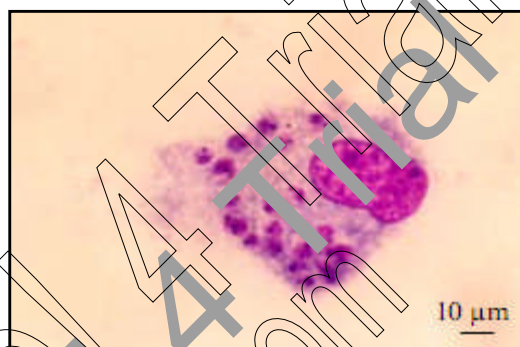


Figure 3 : formes amastigotes intramacrophagiques de *Leishmania* sous microscopie optique, fixées au méthanol et colorées au Giemsa (**Holzmueller in Hide, 2004**).

III.1.3 Génome :

Le projet de séquençage de *Leishmania* ou *Leishmania* Genome Network est né en avril 1994 à Rio de Janeiro (Brésil). Ce projet de séquençage a commencé avec la souche *Leishmania major* MH DM/IL/31/Friedlin (LmjF) qui a été définie comme la souche de référence pour le génome de *Leishmania* (**De Toledo et al., 2010**).

III.1.3.1 Génome nucléaire :

La taille du génome leishmanien haploïde est d'environ 36 megabase (Mb) avec une variation de ± 0.5 Mb selon la souche (**Hide, 2004**), et il est de 32.8 Mb pour la souche de référence LmjF (**Ivens et al., 2005**) découpé en 36 chromosomes (**annexe 5**) avec une taille de 0,3 à 2,8 Mb (**Ouellette et al., 2003**).

Certains génomes d'autres espèces de *Leishmania* ne sont repartis que sur 34 ou 35 chromosomes à cause des différents remaniements chromosomiques (36 chromosomes pour les espèces de l'Ancien Monde appartenant aux complexes *L. donovani* et *L. major*, et 34-35 chromosomes pour celles du Nouveau Monde).

Ce manque est causé par la fusion des chromosomes 8+29 et 20+36 deux à deux dans le complexe *L. mexicana* et les chromosomes 20+34 dans le complexe *L. braziliensis* (**Dedet, 2001; Ivens et al., 2003**). Cette variation offre aux leishmanies une plasticité génétique et des caractéristiques très originales (**De Toledo et al., 2010**).

Le nombre de chromosomes a resté longtemps indéterminé, en raison de l'absence de condensation des chromosomes durant le cycle cellulaire ou la mitose et de l'impossibilité d'effectuer des études génétiques classiques chez ce parasite (**Bastien, 1992**). Le caryotype moléculaire a été déterminé grâce à une technique de biologie moléculaire qui est l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (*annexe 5*).

La densité de ce génome est appréciée de 1 gène/3,5 kb avec très peu de séquences répétées, ce qui permet d'estimer initialement le nombre total de gènes de 8000 gènes (**Ouellette et al., 2003**).

Ce nombre de gènes de *LmjF* a été réapprécié et prédit plus précisément de 911 gènes codants pour des ARN, 39 pseudo-gènes et 8272 gènes codants pour des protéines, dont 36% avec une fonction inconnue. Ceux-ci incluent les gènes impliqués dans les interactions hôte-parasite, tel que les enzymes protéolytiques, et les autres éléments de la machinerie transcriptionnelle (**Ivens et al., 2003**) (*annexe 6*).

En 2007, **Peacock et al.** annoncent 8298 gènes codants pour des protéines et 97 pseudogènes pour *L. (L.) major* (**De Toledo et al., 2010**). Ce nombre élevé de gènes par rapport au nombre de protéines est due à l'absence d'épissage alternatif qui est dû à son tour à l'absence d'introns dans le génome de *Leishmania* (**Ouellette et al., 2003**).

III.1.3.2 Génome kinétoplastique :

Le kinétoplaste est un organe unique caractéristique aux kinétoplastidés, localisé en position antérieure à la base du flagelle. Il présente une portion particulière de l'unique mitochondrie (**Meghamla, 2007**).

Il représente, selon le genre, de 10 à 20 % de l'ADN total de la cellule, (**Simpson, 1987 in Meghamla, 2007**), et englobe deux types de molécules d'ADN circulaires entrelacés les uns dans les autres, les maxi-cercles et les mini-cercles.

◆ Les maxi-cercles :

L'équivalent de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. Les maxi-cercles sont de 20 à 40 kb de taille selon les espèces, formant 10-30 maxi-cercles identiques.

Ils codent pour les gènes mitochondriaux classiques (ARNr, la chaîne de transport des électrons), comme ils codent également pour les ARN guides (ARNg) qui participent dans un processus très original et particulier de modification post transcriptionnelle des ARNm appelé ARN editing. Ils sont formés d'une région variable de 3 à 6 Kb et d'une région conservée de 17 Kb (**Kouato, 2005**).

◆ Les mini-cercles :

Les mini-cercles, d'une taille d'environ 1 Kb, présentés par 5000 à 10000 copies. Ils ont une très grande variabilité extra- et intra-spécifique contrairement aux maxi-cercles (**Meghamla, 2007**).

Les mini-cercles contiennent une région variable de 850 à 900 pb et une région conservée de 100 à 150 pb, qui comporte une séquence de 12 nd appelée « la séquence universelle des minicercles », qui est hautement préservée d'une espèce à l'autre (**Kouato, 2005**).

En 2007, **Kothari et al.** citent que les mini-cercles comportent 1 à 4 régions conservées selon les espèces et une régions variable. Ils sont impliqués dans l'editing (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN, en codant des ARNg, qui s'ancrent sur les ARN pré-édités permettant ainsi l'expression des transcrits des maxi-cercles (**Hide, 2004 ; Meghamla, 2007**).

III.1.4 Organisation du génome :

Leishmania est essentiellement diploïde, où deux knock-out ont été nécessaires pour supprimer l'expression génique de certains gènes. Il faut noter la présence d'une aneuploïdie (**Hide, 2004**) où certains chromosomes existent sous forme trisomique, ce qui varie selon les souches (**Meghamla, 2007**).

Le génome leishmanien est particulièrement riche en CG qui atteint 60 % ou plus dans les régions codantes. Peu complexe, où il comprend 50 à 65 % de séquences uniques, 13% de séquences moyennement répétées, environ 12 % de séquences fortement répétées (**Meghamla, 2007**), et très peu (<0.1%) de séquences polymorphiques (**Ivens et al., 2003**).

L'organisation des gènes est particulière où ils sont structurés en unités polycistroniques (**Ouellette et al., 2003**). Le génome de *L. major* est organisé en 133 unités de 10 – 100 gènes codants des protéines, avec une fonction inconnue. Une unité peut contenir 1259 kb. Les unités sont séparées par 0,9 à 14 kb de régions switch convergentes ou divergentes (**Ivens et al., 2003**).

III.1.5 Transcription :

La transcription polycistronique ou la co-transcription par l'ARN polymérase II (RNAP II), commence d'une manière bidirectionnelle dans les régions switch divergentes et se termine dans les régions switch convergentes qui contiennent souvent des gènes codants des ARNt, ARNr, et/ou ARNs (small nuclear RNAs) (**Ivens et al., 2003**).

La maturation des pré-ARNm se fait par deux processus majeurs couplés. Le premier est présenté par l'épissage en trans qui consiste en l'addition en 5' d'une coiffe mini-exon de 39 ncd et le deuxième présenté par une polyadénylation en 3' (**Fig. 4**).

Après la maturation, les unités polycistroniques deviennent monocistroniques représentés par un seul ARNm entouré du splice-leader en 5' et d'une queue polyA en 3'. Cette maturation, la stabilité des messagers et la régulation de la traduction jouent un rôle crucial dans la modulation de l'expression génique (**Ouellette et al., 2003**).

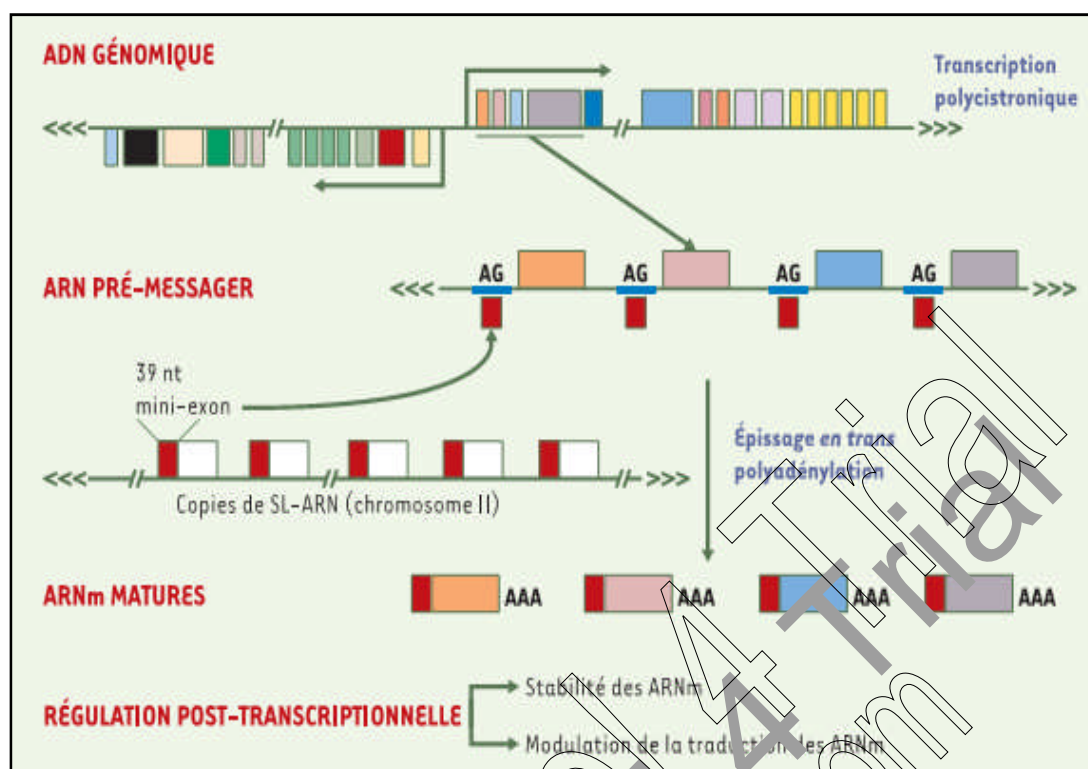


Figure 4 : Organisation génique et maturation des ARNm chez *Leishmania* (Ouellette et al., 2003).

III.1.6 Biologie :

La cellule des leishmanies est composée des organites classiques présentés par le noyau, le flagelle et sa poche flagellaire, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, et une mitochondrie unique (Meghamla, 2007). Elles ont un fragment d'ADN extranucléaire située en position antérieure qui est le kinétoplaste.

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, le rate, le foie et la moelle osseuse, exceptionnellement dans les monocytes sanguins. Elles s'adaptent et résistent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage. Leur multiplication provoque la lyse du macrophage. Les parasites alors se trouvent libres pour être phagocytés par d'autres macrophages et c'est ainsi qu'elles assurent leur diffusion dans l'organisme (Tulasne, 2009).

III.2 Le vecteur :

Les phlébotomes (qui signifie littéralement «coupeurs de veines») (Izri et al., 2006) ou mouches des sables sont les uniques vecteurs de LC établis et connus des protozoaires du genre *Leishmania* avec certitude (Boukraa et al., 2011 ; Briffod, 2011), signalés pour la première fois en Algérie en 1912 par Foley et Leduc (Dedet, 1984).

Il existe une relation entre la transmission des espèces de *Leishmania* et l'espèce du vecteur (Estevez, 2009). Les phlébotomes ont une distribution géographique très large, étalée sur les cinq continents (Bachi, 2006).

III.2.1 Taxonomie :

Le phlébotome est un *Eucaryote, Métazoaires, Eumétazoaires, Bilateria, Coelomata, Protostomia, Panarthropoda, Arthropoda, Mandibulata, Pancrustaceae, Hexapoda, Insecta, Dicondylia, Ptérygota, Neoptera, Endopterygota, Diptera, Nematocera, Psychomorpha, Psychodoïdeae, Psychodidae, Phlebotominae, Phlebotomus Larroussius* (Mazelet, 2004).

La sous-famille des *Phlebotominae*, regroupe environ 800 espèces réparties en 6 genres (Fourati, 2011). Les genres caractéristiques de l'ancien monde sont le *Phlebotomus* et *Sergentomyia* et pour le nouveau monde, on trouve les genres *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya* et *Hertigia*. (Izri et al., 2006 ; Fourati, 2011).

Parmi ces genres, deux (*Phlebotomus* et *Lutzomyia*) présentent un intérêt médical a raison de leur rôle dans la transmission de plusieurs maladies vectorielles dont les leishmanioses (Dedet., 2001; Izri et al., 2006). Seul environ 70 espèces constituent des vecteurs confirmés ou soupçonnés des leishmanioses (Ben Ghazi, 2010).

En Algérie 22 espèces de phlébotome ont été répertoriées dont 12 *Phlebotomus* et 10 *Sergentomyia* (Bachi, 2006). Les phlébotomes de sous-genre *Larroussius* (*Phlebotomus perniciosus*) sont les vecteurs de *L. infantum* MON-1 et le *Phlebotomus perfiliewi*, vecteur de *L. infantum* MON-24. Pour la *L. infantum* MON-25, le phlébotome *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* est défini comme vecteur (Izri et Belazzoug, 2007). La *L. killicki* est transmise par *P. sergenti* (Harhal et al., 2010 ; Boubidi et al., 2010).

Les taxonomies classiques sont basée beaucoup plus sur des caractères purement morphologiques. Récemment, la biologie moléculaire a permis de réaliser des études populationnelles ou l'identification des phlébotomes, grâce à l'étude des isoenzymes ou des séquences d'ADN dont le rythme de mutation est élevé (Izri, 2006).

Bien que les phlébotomes sont les seuls vecteurs biologiques des leishmanioses établis avec certitude, certains ectoparasites hématophages comme les tiques ou les puces sont fortement suspectées dans la transmission de ces parasitoses, notamment en ce qui concerne *Phlebotomus papatasi* ou *Ctenocephalides felis* (Ben Ghazi, 2010; Brito et al., 2011 ; Solano-Gallego et al., 2012).

Il existe des cas exceptionnels, très rare de transmission non vectorielle tel que, la transmission congénitale de la mère à l'enfant, le passage transplacentaire, la transfusion sanguine, partage de seringue chez les toxicomanes, transplantation d'organe et d'autre facteur de risque (Dedet., 2001; Buffet, 2008 ; Briffod, 2011).

III.2.2 Morphologie :

Les phlébotomes sont des insectes, nématocères, de petite taille (moins de 5 mm de long), ils sont velus, bossus, de couleur claire généralement jaune pâle, avec des gros yeux noirs (Marty et al., 2009 ; Izri et al., 2006). Leurs ailes, de forme lancéolée, se dressent en V sur le dos au repos (Izri et al., 2006)(Fig. 5).

En raison de la nécessité du sang pour le développement des œufs, qu'il assure les protéines nécessaire à l'évolution, seule la femelle est hémaphage, pourvue des mandibules dentelées, alors que les mâles s'alimentent simplement de la sève des plantes (Sabbahi, 2006 ; Estevez, 2009).



Figure 5 : Phlébotome femelle gorgé de sang (Izri, 2007).

III.3 Réservoir :

Le réservoir est une espèce qui héberge les leishmanies et qui permet leur survie à long terme ainsi que leur expansion (Nadai, 2005). Ces réservoirs sont variables et dépendent de l'espèce en cause et de son foyer géographique. On distingue :

- Les réservoirs primaires : constitué par des mammifères sauvages (rongeurs, paresseux, primates ou canidés), qui ne présentent pas généralement les symptômes.
- Les réservoirs secondaires : constitués par des mammifères domestiques (canidés) comme le chien.
- Les réservoirs tertiaires : constitués par l'homme où il devient un hôte accidentel (Estevez, 2009 ; Fourati, 2011).

Pour la LC, la quasi-totalité des mammifères est susceptible aux espèces de leishmanies en cause. De nombreux Muridés tels que le rat ou la souris sont réceptifs pour la *L. major*, contrairement à *L. infantum* où seuls l'homme et les canidés sont réceptifs (Nadai, 2005).

Au Sahara algérienne, les rongeurs sauvages et principalement le *Psammomys obesus* ou le « rat des sables » est le réservoir de la LCZ à *L. major* (Bachi, 2006 ; Izri et al., 2006 ; Boukraa et al., 2011 ; Boudrissa et al., 2012), ainsi que le *Meriones shawi* (Bachi, 2006). Pour la LCN à *L. infantum*, le chien est confirmé comme réservoir (Benikhlef et al., 2004 ; Bachi, 2006) .

Il est admis que le rongeur *Gundi Massoutiera mzabi* est le réservoir pour la LCU à *L. killicki* (Harrat et al., 2010 et Boubidi et al., 2010).

III.4 Cycle évolutif :

Leishmania a un cycle de vie hétéroxène qui nécessite deux hôtes, l'insecte phlébotomes, le vecteur qui abrite les formes promastigotes et un mammifère qui héberge les formes amastigotes et qui peut être l'homme ou un autre animal (Fourati, 2011).

Le vecteur infecté inocule les promastigotes métacycliques infectants dans le derme de l'hôte pendant un repas sanguin, ciblant ainsi les cellules macrophagiques et se transforment en amastigotes. Ou cours de la pique infectante la salive des phlébotomes favorise l'infection en produisant une vasodilatation et une immunodépression locales grâce a ces substances pharmacologiques actives (Dedet, 2001).

Il se forme alors un phagolysosome, a fin d'éliminer les leishmanies à l'aide de divers mécanismes de défense non spécifiques impliquant surtout l'oxyde nitrique ou la libération d'hydrolases lysosomiales. Les leishmanies échappent à ces mécanismes, et se multiplient dans les vacuoles parasitophore des macrophages (Briffod, 2011).

Une fois les macrophages saturés d'amastigotes, ils éclatent et libèrent les amastigotes qui vont être internalisées par d'autres macrophages sans. Les macrophages infestés sont réabsorbés par la femelle phlébotome lors d'une deuxième pique. Les amastigote intra-macrophagiques se libèrent et migrent tout le long du tube digestif du phlébotome avec des modifications morphologiques et génétiques.

Ces amastigotes se transforment en promastigotes en passant par différents stades dont les promastigotes procycliques, les metacomonades, et les haptomonades, pour être inoculés encore une fois a un autre hôte (Sékou Diarra, 2008) (Fig. 6).

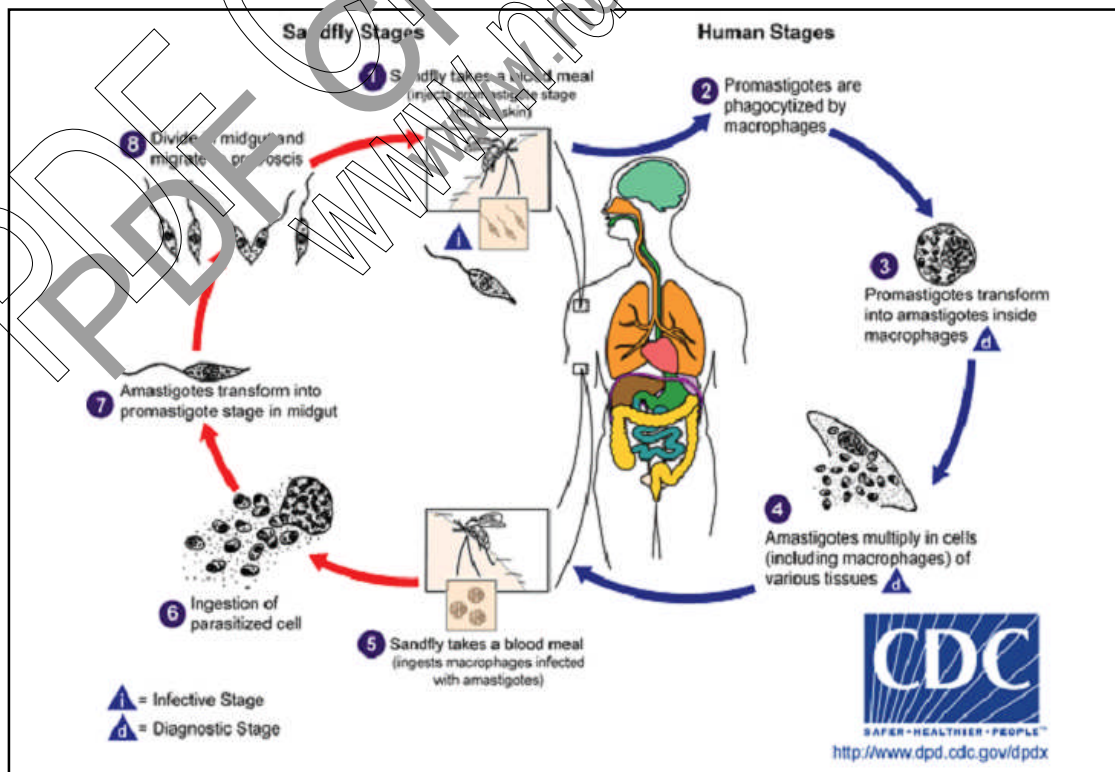


Figure 6 : Le cycle évolutif de *Leishmania* (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

IV Répartition géographique :

La répartition géographique de la leishmaniose est directement liée à l'aire de répartition du vecteur et du réservoir.

IV.1 Dans le monde :

La LC est endémique dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales de l'Ancien comme du Nouveau Monde, avec une incidence annuelle de 1-1,5 million cas (Hide, 2004 ; Yannick, 2009 ; Odonne, 2010 ; Briffod, 2011).

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), pour laquelle la leishmaniose est une préoccupation majeure, 90% de cas de LC se concentrent dans 8 pays, dont 6 du l'Ancien Monde (Afghanistan, Algérie, Arabie Saoudite, Iran, Iraq et la Syrie) et deux du Nouveau Monde (Brésil et Pérou) (Clémence, 2009; Yannick, 2009) (Fig. 7).

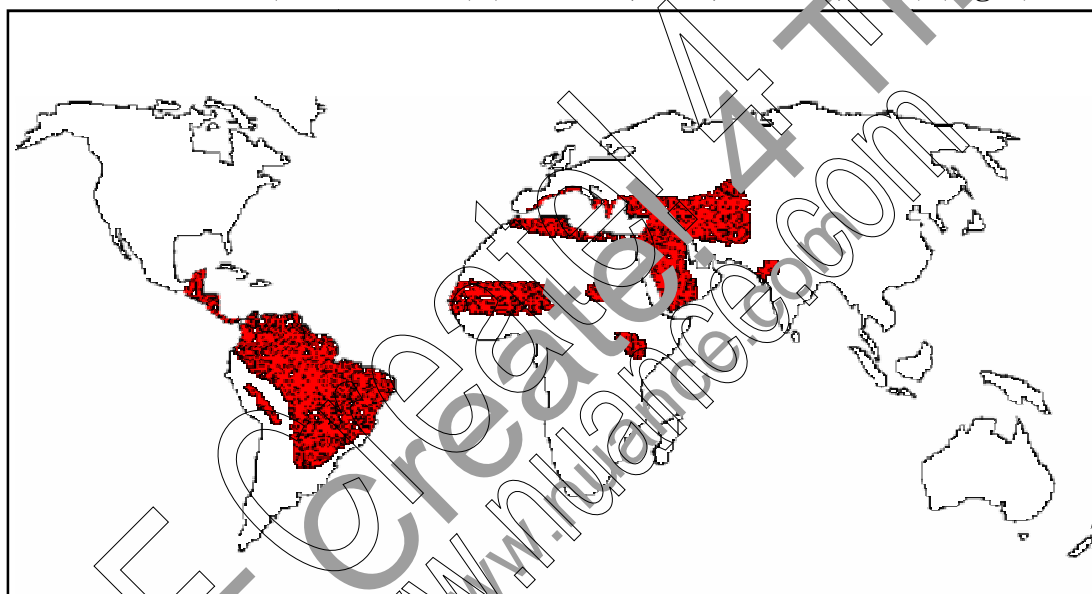


Figure 7 : Distribution de la leishmaniose cutanée dans le monde (www.who.int/tdr).

IV.2 En Algérie :

La leishmaniose cutanée est endémique et très répandue en Algérie, avec une extension géographique large et apparition de nouveaux foyers. L'incidence annuelle de cette maladie est de 2000 cas par an (Harrat et al., 1996).

Elle est présente sous trois formes cliniquement différentes : leishmaniose cutanée du Nord due à la *L. major*, leishmaniose cutanée zoonotique due à *L. infantum* et récemment, la leishmaniose cutanée urbaine due à *L. killicki* (Barchiche et Madiou, 2008).

IV.2.1 La leishmaniose cutanée du Nord (LCN) :

Bénigne et moins fréquente connue sous le nom de "clou de Mila", décrite pour la première fois par Sergent et Gueidon en 1923 dans la région de Mila. Elle se répartit sur toute la partie nord présentée par le littoral et le Tell avec une distribution géographique variable (Belazzoug et al., 1984 ; Harrat, 2005 in Mihoubi, 2005).

IV.2.2 La leishmaniose cutanée zoonotique(LCZ) :

La plus fréquente, répandue au centre et au sud du pays (**Zait et Hamrioui, 2008**). La LCZ dénommée aussi "clou de Biskra" décrite pour la première fois par **Hamel** en 1860. Elle s'observe à l'étage bioclimatique aride et semi-aride dans différents foyers (**Bachi, 2006; Izri et Belazzoug, 2007**), avec une fluctuation d'incidence durant l'année.

Longtemps confiné au Sahara, principalement cantonnée aux deux foyers de Biskra à l'Est et d'Abadla à l'Ouest. Des nouveaux foyers sont apparus avec une extension vers les hauts plateaux (**Mihoubi et al., 2006**).

IV.2.3 La leishmaniose cutanée urbaine (LCU) :

Une nouvelle forme clinique émergente, avec un profil épidémiologique caractéristique. Cette forme est apparue à Ghardaïa (LC urbaine à *L. killicotti*) (**Parchiche et Madiou, 2008**).

V Étude clinique :

La plupart des formes de la leishmaniose cutanée siègent préférentiellement aux zones accessibles et découvertes du corps. Elles peuvent être classées, selon leur localisation géographique, en deux entités principales : la leishmaniose cutanée de l'ancien-monde (LCAM) et la leishmaniose cutanée du nouveau-monde (LCNM).

La LCAM est classiquement connue sous le nom de "bouton d'Orient" ; "bouton de Bagdad" ; "bouton de Delhi" ; "bouton d'Alep" ; et enfin "clou de Biskra" en Algérie. Elle se présente sous différentes formes dont la leishmaniose cutanée anthroponotique (LCA) ou urbaine, la leishmaniose cutanée zoonotique(LCZ) ou rurale.

La LCNM est classiquement connue sous le nom d' "ulcère des Chicleros" (au Pérou et au Venezuela) ; "pian-bois" (Brésil et en Colombie) ; et "uta" (au Pérou). Il existe une autre forme de la LC, la leishmaniose cutanée diffuse (LCD) qui se trouve aussi bien dans l'ancien monde comme dans le nouveau. Ces appellations ne correspondent à aucune réalité anatomo-clinique ou épidémiologique.

Il existe plusieurs d'autres formes cliniques de la leishmaniose cutanée dans l'ancien comme dans le nouveau monde, dont la forme LCN ou LCS, LCR, la forme tubéreuse, verruqueuse, végétante, nodulaire, infiltrée en nappe, nécrotique, et la forme lipoïde pour l'ancien monde ; et l'ulcère de Barru, l'ulcère de chicleros, le pian-bois, et en fin la leishmaniose cutanée eczématiforme, pour le nouveau monde.

V.1 Diagnostic :

Le diagnostic de la LC repose sur la mise en évidence directe du parasite, ou de son ADN, et indirectement sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée (**Le Fichoux, 1999 in Dedet, 2001**).

V.1.1 Orientation clinique :

Le diagnostic clinique est basé sur l'observation des symptômes généraux et spécifiques présentés par les patients atteints après les 2 à 3 mois suivant la piqure de phlébotome (période d'incubation) (**Zait et Hamrioui, 2007**).

V.1.2 Diagnostic biologique :

Les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la LC sont insuffisantes pour justifier un traitement car la présentation clinique est évoquée par plusieurs maladies. A cette raison des techniques parasitologiques de référence plus spécifiques ont été utilisées (**Tália Santana et al., 2008**).

V.1.2.1 Le prélèvement :

C'est la première étape de diagnostic biologique, d'où l'importance de choisir le type de prélèvement, pour la LC et la LMC (muco-cutanée), les frottis à partir des lésions sont notamment utilisés. Des méthodes immunologiques ou moléculaires à partir différents prélèvements sont effectuées.

V.1.3 Méthodes de diagnostic directes :

V.1.3.1 L'examen direct :

Il se base sur la visualisation des formes amastigotes du parasites, intramacrophagiques ou libres à l'immersion sous microscope optique, sur des frottis cutanée après fixation par May-Grünwald ou l'alcool et coloration par Giemsa. La coloration des frottis peut se faire aussi par le kit RA1155 (**Famakan, 2005**).

V.1.3.2 Culture du parasite :

A) Culture in vitro :

Le parasite est cultivé dans différents milieux (Schneider Drosophila, NNN, RPMI, et d'autres) à partir d'une aspiration aseptique de sérosité à l'aide d'une seringue. Elle nécessite quelques semaines d'incubation pour permettre la confirmation du diagnostic. On observe des formes fusiformes flagellées (les promastigotes).

B) Culture in vivo :

L'inoculation à l'animal permet le diagnostic et la caractérisation biochimique des souches, mais elle n'est réalisée que par de rares laboratoires spécialisés. Les animaux de choix sont les Hamsters dorés syriens et le cobaye, plus réceptifs à l'infection par les leishmanies après inoculation par voie intra-péritonéale (**Izri et al., 2007**).

V.1.3.3 Immunohistochimie :

C'est une méthode complémentaire pour confirmer un diagnostic, lorsque les parasites ne sont pas clairement identifiables au microscope.

Cette technique est appliquée sur le derme, sur les sites privilégiés de piqûre des phlébotomes. Elle repose sur l'utilisation de tissus fixés dans de la formaline puis enrobés dans de la paraffine pour être mis en présence avec un système dit «biotine/ streptavidine-peroxidase» et un sérum hyper-immun utilisé comme anticorps primaire, des anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-leishmanies (**Maia et Campino, 2008**).

V.1.3.4 Extraction d'ADN :

L'extraction d'ADN est la première étape pour plusieurs de technologies basées sur l'ADN. Pour extraire l'ADN, plusieurs techniques sont requises pour séparer de façon adéquate l'ADN des autres composantes de la cellule. Cette extraction se fait à partir de différents prélèvements (**Irwin et al., 2001**).

V.1.3.5 La Polymerase Chain Reaction (PCR) :

L'utilisation de la PCR pour la détection de la LC a grandement amélioré la sensibilité et la spécificité du diagnostic parasitaire (**Irwin et al., 2001**).

C'est la technique la plus sensible et de choix pour mettre en évidence l'ADN de *Leishmania* par amplification génique. Son principe est d'utiliser de façon répétitive l'activité enzymatique pour copier de manière exponentielle, une portion spécifique du génome dont la séquence est au moins partiellement connue (**Leite et al., 2010**).

Plusieurs techniques PCR disponibles participant le même principe, dont la PCR quantitative en temps réel (ou real time-PCR), qui présente plusieurs avantages sur la PCR classique : résultat quantitatif ; meilleures sensibilité et spécificité ; diminution des risques de contamination (une seule étape) et automatisation.

V.1.3.6 La PCR quantitative en temps réel :

Elle permet un suivi continu de l'amplification de séquences d'ADN spécifiques pendant la réaction. L'utilisation de sondes fluorescentes, permet d'obtenir la cinétique complète de la polymérisation, ceci permet la quantification précise du matériel génétique présent initialement et donc une estimation de la charge parasitaire dans les différents échantillons. (**Briffod, 2011**).

V.1.3.7 Le typage iso-enzymatique :

Il a consisté en un ensemble d'électrophorèses sur gel épais d'amidon pour étudier par rapport à des souches de référence, la mobilité électrophorétique des 15 systèmes enzymatiques.

Les souches présentant un même profil enzymatique (électromorphe) sont regroupées dans un même zymodème ou unité taxonomique (**Boni, 1999**).

V.1.3.8 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) :

Elle consiste en une digestion d'ADN extrait par une enzyme de restriction spécifique pour produire un ensemble de fragments de restriction de différentes longueurs. Ces fragments vont être comparés avec des profils de bandes de référence après électrophorèse sur gel d'agarose.

Le nombre de sites de restriction et leurs positions diffèrent en fonction des espèces donnant ainsi un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (**Bouratbine et al., 2005**).

V.1.4 Méthodes de diagnostic indirectes :

Le diagnostic indirect se base sur la mise en évidence des immunoglobulines issues de la réponse immunitaire humorale.

V.1.4.1 Diagnostic sérologique :

De nombreuses techniques sérologiques sont utilisées dans le diagnostic de la LC. Elles font appel à des Ag ou des extraits antigéniques de nature et de modalités de préparation variées qui participent à des réactions immunologiques (**Dedet, 2001**).

- **Immunofluorescence indirecte (IFI) :**

Elle présente la technique qualitative, qualitative de référence en diagnostic sérologique où elle est utile dans les études épidémiologiques, la pratique clinique et également dans le suivi du traitement (**Leja et Camino, 2008**).

Elle consiste à mettre en contact des dilutions successives d'anticorps sériques de sérums suspects avec un antigène fixe. Le complexe Ag-AC formé est révélé grâce à des anti-Ig fluorescents sous microscope à lumière ultraviolette (**Mihoubi, 2006**).

- **Western blot (WB) :**

Le WB ou immuno-empreinte est une technique qualitative de référence en sérodiagnostic *in vitro*, introduite pour la première fois en 1979 par **Towbin et al.** Cette technique est très spécifique et très sensible permettant ainsi de détecter les anticorps contre la *Leishmania sp.* préalablement séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et fixés par électro-transfert sur la surface de bandelettes de nitrocellulose (**Tulasne, 2009**). Le WB présente un outil performant pour mettre en évidence la réponse humorale contre *Leishmania sp.*

- **Enzyme like immuno-sorbent assay ELISA :**

C'est une technique immunologique utilisée pour détecter des antigènes par des anticorps conjugués à une enzyme (phosphatase ou peroxydase). La réaction est révélée par un substrat chromogène qui permet une lecture quantitative (**Louis, 2009**).

- **Électrosynérèse (ES):**

Nommée aussi Contre-immunoelectrophorèse (CIE). C'est une technique d'immunoprécipitation qui consiste à faire migrer conjointement l'Ag et l'AC sous une différence de potentielle. Au point de rencontre, entraînant la formation d'arcs de précipitation qui témoignent de la présence du complexe Ag-Ac. (Bachi, 2001).

- **Test d'agglutination directe (DAT) :**

le DAT a été validé comme un test sensible et spécifique pour les investigations de terrain car elle reste stable à des températures élevées et adaptée dans les conditions difficiles (Meredith et al., 1995 ; Schallig et al., 2002).

Elle est basée sur l'utilisation des promastigotes entiers comme antigènes, colorés, en suspension ou sous forme sèche congelée récoltés à partir de cultures. L'épreuve est lue à l'œil nu contre un fond blanc. Les réactions positives sont indiquées par une tache claire tranchant sur le bleu (Boelaert et al., 1999).

- **Hémagglutination indirecte (HAI) :**

C'est l'agglutination des anticorps sériques spécifiques à des érythrocytes sensibilisés par un antigène leishmanien. Le complexe AC-Ag formé s'exprime par un tapis d'Hémagglutination et dans le cas d'absence des anticorps, les cellules se déposent au fond des cupules sous forme d'un bouton (Bachi, 2001).

- **Test d'immuno-diffusion (IDA) :**

Elle est réalisée grâce à l'utilisation des échantillons de sérum et un antigène leishmanien soluble (LSA). Cette technique consiste à une double immunodiffusion en gel d'agarose à 1% contenant 3% de polyéthylène glycol (PEG). Un résultat positif se révèle par la présence d'un arc de précipitation (Maia et Campino, 2008).

- **Intradermo-réaction à la leishmanine (Monténégro) :**

Nommée aussi "leishmanin skin test" (LST), il consiste en une inoculation intradermique d'une suspension diluée dans du phénol ou une solution saline de merthiolate de promastigotes inactivés (Maia et Campino, 2008).

Un résultat positif se traduit par une induration d'au moins 5 mm de diamètre, 48 à 72 h après, permettant ainsi de mettre en évidence une hypersensibilité de type retardée (type IV) vis-à-vis d'antigènes de leishmanies (Briffod, 2011). Ce test n'est pas utile dans le diagnostic des leishmanioses viscérales (Manson-Bahr et al., 1987).

VI Traitement des leishmanioses cutanées :

Les LC se manifestent de différentes manières selon l'espèce ce qui conditionne le choix de traitement et l'efficacité de celui-ci (Minodier et al., 2010).

Le traitement local peut se faire avec le Glucantimes[®] en cas de lésion unique. De nombreux moyens physiques ont été également proposés dont la cryothérapie. La cryothérapie associée aux infiltrations périlésionnelles d'antimoniés représente le mode de traitement local le plus efficace (**Bachi, 2001**).

Le traitement général, indiqué dans les formes à lésions multiples, est fait d'une crue de dérivés stibiés pentavalents (**Bachi, 2001**).

Ils présentent toutefois des limites, dont l'apparition de résistances, la toxicité envers l'hôte traité et l'absence de guérison totale (**Clémence, 2009 ; Buffet et al., 2010**).

L'administration intralésionnelle de ces médicaments réduit les effets secondaires (**Baubion et al., 2008**), sauf qu'elle peut entraîner d'autres effets indésirables comme la fibrose musculaire et la formation d'abcès, des perturbations gastro-intestinales, des douleurs musculaires et des raideurs articulaires (**Clémence, 2009**).

À cause de ces inconvénients, le traitement des leishmanioses propose récemment des produits alternatifs, font l'objet d'essais thérapeutiques sont diverses molécules déjà connues et utilisées hors leishmanioses (**Dedet, 2001**).

Des traitements physiques ont été dévoilés aussi, tels que la cryothérapie par azote liquide (AL), la chaleur, l'électrocoagulation, le laser ou la photothérapie dynamique (**Baubion et al., 2008**).

VII Prophylaxie :

La prophylaxie contre les leishmanioses comprend 3 grands axes (**Carré et al., 2010**):

VII.1 Lutte antivectorielle

Elle se fait par des répulsifs, moustiquaires imprégnées d'insecticides et la destruction du phlébotome et leur gîte. (**Buffet, 2008 ; Aubry, 2012**).

Les insecticides jouent un rôle important dans la destruction des phlébotomes en pulvérisant l'intra et péri domiciliaire et dans les lieux de concentration humaine en zone rurale (**Bachi, 2001**).

VII.2 Lutte contre les réservoirs :

Elle se fait par dépistage des animaux malades et leurs traitement (**Safi et al., 1996**). Le dépistage séro-épidémiologique des animaux et l'abattage de ceux atteints en raison du danger qu'il présente pour la communauté du fait que le traitement de la leishmaniose canine est longue et décevant et la lutte contre les rongeurs est difficile, avec la mise en place d'un système de surveillance permanent (**Bachi, 2001**).

VII.3 Prophylaxie humaine :

Elle se fait par le dépistage et le traitement des cas malades, la vaccination contre la leishmaniose notamment chez les sujets immunodéprimés et la sécurité transfusionnelle (**Carré et al., 2010**). La préparation des vaccins consiste à l'utilisation de parasites tués et génétiquement modifiés (**Anonyme, 2009**).

VIII Physiopathologie et réponse immunitaire de l'hôte:

La compréhension des mécanismes immunopathologiques de la LC qui s'appuie, en grande partie, sur ce qui est démontré dans des modèles expérimentaux murins et canins, est nécessaire pour mieux comprendre l'immunité de l'hôte face aux organismes pathogènes et de pouvoir alors développer des vaccins contre ces maladies parasitoses (**Filippi et al., 2001**).

VIII.1 Effet de la salive du vecteur :

Lors de la piqûre, le phlébotome injecte de la salive au site, qu'elle soit infestée ou non de leishmanies, elle conçoit des homogénats de glandes salivaires avaient un pouvoir immunomodulateur (**Quitterie, 2005**).

Si le phlébotome est infecté, cette salive augmente la taille de la lésion et la charge parasitaire provoqué par une augmentation de la sécrétion d'IL4 et à une inhibition de plusieurs fonctions importantes du macrophage telles que la présentation de l'antigène, la production de monoxyde d'azote (NO) et la prolifération de lymphocytes T spécifiques aux parasites (**Quitterie, 2005 ; Diarra, 2007**).

VIII.2 Relations hôte-parasite :

VIII.2.1 Immunité humaine face à la Leishmaniose :

Cette réponse immunitaire se caractérise par une dichotomie Th1/ Th2.

- **Réponse immunitaire de type Th2 :**

Elle est associée à une réponse humorale intense mais non protectrice, qui se caractérise par la production d'interleukines 4, 5, 10 et 13 (IL-4, -5, -10 et -13), par les cellules Th2 conduisant ainsi à la survie du parasite (**Hide, 2004 ; Quitterie, 2005**).

- **Réponse immunitaire de type Th1 :**

Elle est associée à une réponse de type cellulaire protectrice, dépendante des lymphocytes LT CD4⁺, et caractérisée par la sécrétion de cytokines telles que l'interféron-gamma (INF γ), l'IL-2 et le facteur de nécrose tissulaire α (TNF α), par les cellules Th1 responsables de l'activité anti-leishmanies des macrophages (**Quitterie, 2005 ; Briffod, 2011**).

VIII.2.2 Interactions *Leishmania*/macrophages :

Suite à leur inoculation dans un hôte, les promastigotes doivent échapper à la lyse par le complément jusqu'à ce qu'ils soient phagocytés par un macrophage où ils pourront se répliquer (Diarra, 2007; Anonyme, 2009).

Deux antigènes majeurs de surface des leishmanies, la gp 63 (en grande quantité au stade promastigote, et en faible quantité au stade amastigotes) et le LPG (n'est présent qu'au stade promastigotes) ont un rôle cruciale dans la protection des promastigotes de la lyse par le complément (Quitterie, 2005).

La gp 63 convertie le C3b en C3bi inactivant ainsi le complément, tout en favorisant l'opsonisation et la phagocytose du promastigote. Par contre le LPG active le complément en inhibant l'accès des complexes lytiques C5-C9 à la membrane plasmique. Également grâce à ses protéines kinases, le parasite inhibe en phosphorylant les protéines du système du complément, la cascade d'activation (Berdan et Rölinghoff, 1998).

Des récepteurs membranaires variés interviennent dans l'adhésion sur la membrane du macrophage: récepteurs de type lectine, récepteur de la fibronectine, de l'intégrine et récepteurs du complément CR1 et du CR3 (Dedet, 2001).

L'internalisation du parasite se fait dans des phagolysosomes de pH très acide, qui se forment après la fusion d'une vacuole parasitophore avec des lysosomes. Pour survivre, une transformation de forme promastigote en forme amastigotes intracellulaires qui présente la forme de résistance aux radicaux oxygénés et aux mécanismes de destruction (Quitterie, 2005)

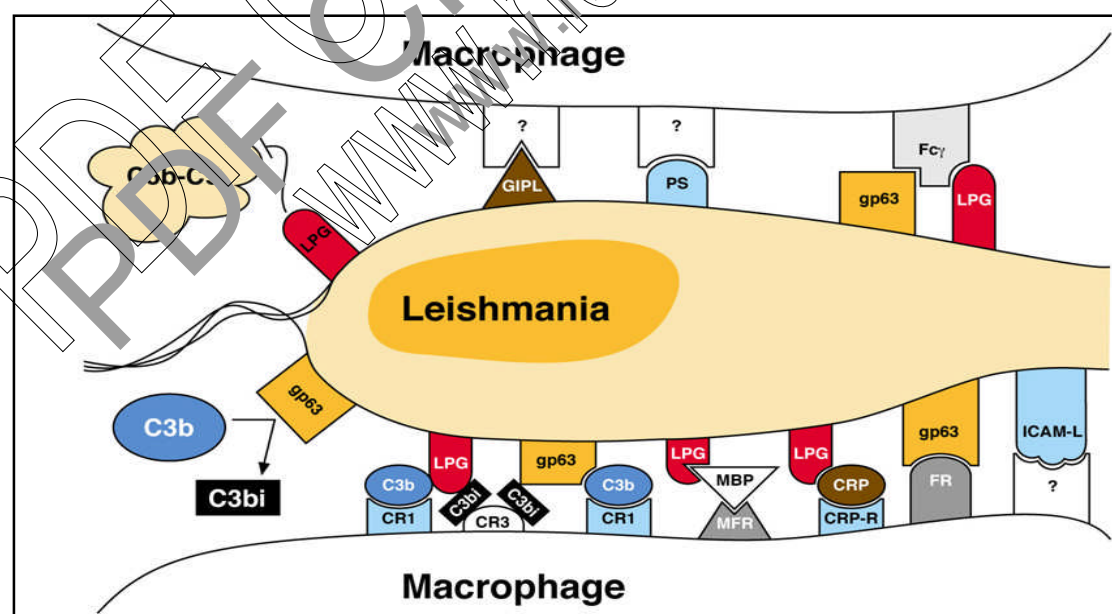


Figure 8 : Interaction entre le MØ et *Leishmania* via leurs molécules de surface et des protéines solubles. PS: phosphatidylsérine, MBP: mannose binding protein, MFR: mannose fucose receptor, CRP: C-reactive protein, CRP-R: C-reactive protein receptor, FR: fibronectine receptor ([http : //www.theses.ulaval.ca/2004/21419/ch01.html](http://www.theses.ulaval.ca/2004/21419/ch01.html)).

Le parasitisme entraîne une baisse de capacité des macrophages en inhibant plusieurs fonctions de celui-ci, essentiellement présentées par : les fonctions microbicides (production des dérivés oxygénés et nitrogénés NO), la production de cytokines (particulièrement les médiateurs d'inflammation tel que IL-1 et TNF α ou celle qui activent des LT tel que IL-12), la présentation d'antigène et l'activation de cellules effectrices pour développer une réponse spécifique) (**Bogdan et Rölinghoff, 1998 ; Dedet, 2001**).

Cette inhibition s'effectue par des modifications de l'expression génique, ainsi que post-transcriptionnel et post-traductionnel (**Diarra, 2007**), et se traduit par l'altération de plusieurs voies de signalisation dépendantes du Ca²⁺ et des PKCs.

- **voies de signalisation calcium-dépendante :**

L'infection leishmanienne des macrophages augmente la concentration basale de Ca⁺⁺ intracellulaire, mais la voie de signalisation dépendante du Ca⁺⁺ est inactivée à cause de l'inaccessibilité de ce dernier qui reste séquestré par le LPG.

- **voies de signalisation dépendantes de la protéine kinase C (PKC) :**

Également, le LPG interagit avec la PKC au niveau de ses sites de liaison du DAG (diacylglycérol) membranaire, du Ca⁺⁺ et des phospholipides, ce qui l'inhibe et empêche son insertion dans la membrane.

VIII.2.3 Co-infection Leishmaniose cutanée/VIH :

Elle est beaucoup moins fréquente que la co-infection LV/VIH. Le VIH favorise la propagation de la leishmaniose par le processus d'immunodépression qui laisse le champ libre aux leishmanies pour s'installer (**Hide, 2004 ; Yannick, 2009**) et de la même manière, les leishmanies chez un sujet VIH vont accélérer la répllication du virus du VIH (**Desjeux et al., 2001**).

Le SIDA multiplie par mille, le risque de leishmaniose dans les zones d'endémie (**OMS, 2000**). Ces deux affections conjuguées provoquent une double immunodéficience car elles ont les mêmes cibles cellulaires (**Hide, 2004**), de sorte que la gravité de la maladie et ses conséquences augmentent de façon exponentielle (**OMS, 2000**).

Les manifestations cliniques sont des lésions graves extensives d'évolution lentes avec une possibilité de se récidiver. Dans la co-infection leishmaniose/SIDA, les patients courent un risque d'emblée d'une visualisation sans épisode cutané préalable même avec des souches dermatropes.

En Algérie cette co-infection est connue depuis longtemps où trois cas de LC ont été apportés par Ammar Khoudja en 1990, chez trois sujets immunodéprimés dont un associé au SIDA, un greffé rénal sous immunosuppresseur et un enfant immunodéprimé (**Bachi, 2001**).

Chapitre II : Partie expérimentale

I Matériel et méthodes :

Il s'agit d'une étude prospective réalisée de 20 Février 2013 à 30 juillet 2013. Quarante huit (48) cas suspects de leishmaniose ont été recensés pendant cette période.

Nous avons réalisé cette étude au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie médicale de l'hôpital central de l'armée (HCA) Dr : MOHAMED SEGHIR NEK-KACHE.

Le diagnostic classique de certitude de la LC repose essentiellement sur la mise en évidence des leishmanies soit par l'examen direct (ED) soit par la culture. Dans ce travail nous avons introduit d'autres techniques de diagnostic indirect : immunofluorescence indirecte (IFI) et Western blot (WB) afin d'évaluer leurs aspects dans le diagnostic de la LC, enfin nous avons comparé les résultats de chaque technique avec la technique Polymerase Chain Reaction (PCR).

Pour tous nos patients, nous avons précisé les données épidémiocliniques suivantes : l'âge, le sexe, l'origine géographique, les régions de séjour, la durée d'évolution, la notion de pique, le nombre, la forme clinique et le siège des lésions.

I.1 Matériel :

I.1.1 Matériel non biologique :

I.1.1.1 Milieu de culture :

Pour un diagnostic nous avons utilisé différents milieux de culture (RPMI, Albumine-urine "AU" et vitellus-urine "VU") pour l'isolement des leishmanies.

I.1.1.2 Réactif :

La réalisation des différentes techniques (extraction, amplification ...) nécessite la présence de réactifs spécifiques (**annexe 1**).

I.1.2 Matériel biologique :

I.1.2.1 Souches :

Dans ce travail nous avons utilisé des souches de *Leishmania*, isolées à partir des sérosités.

Ces souches ont été entretenues sur différents milieux de culture par un repiquage hebdomadaire. Ces dernières ont servi à préparer nos témoins positifs pour la technique PCR.

I.1.2.2 Prélèvements :

Quarante-huit (48) patients suspectés de LC ont été adressés à notre laboratoire pour une confirmation biologique.

Pour chaque patient, différents prélèvements ont été réalisés à savoir :

- Un prélèvement de sang périphérique sur un tube gélosé a été centrifugé à 2500 trs/mn pendant 3 mn puis traité par les différentes techniques sérologiques.
- Grattage de lésion pour réaliser des frottis sur des lames : trois lames pour chaque patient, deux colorées en Giemsa et une en RAL555.
- Aspiration de sérosités à partir des lésions pour cultiver les leishmanies sur différents milieux de culture.
- Un prélèvement de sérosités a été récupéré sur un eppendorf, contenant des gouttes d'eau physiologique pour la technique PCR.

I.2 Méthodes :

I.2.1 Diagnostic direct :

I.2.1.1 Examen direct :

Il repose sur la visualisation de la forme amibigote, par des prélèvements cutanés, après coloration par Giemsa, suivie d'une lecture sous microscope optique ($G \times 100$) (Famakan, 2005).

➤ Prélèvement Cutanés :

D'abord nous avons rempli une fiche de renseignements qui comprend des données cliniques pour chaque patient. Le prélèvement se déroule comme suit :

- Grattage de la lésion cutanée avec un vaccinostyle au niveau des bordures inflammatoires de la lésion.
- Réalisation des frottis par étalement sur des lames référencées.



Figure 9 : Réalisation des frottis à partir des lésions cutanées (Photo originale).

➤ Coloration :

Nous avons utilisé deux types de coloration, la coloration Giemsa et une variante rapide de cette dernière, RAL555.

➤ **Principe :**

La coloration en azur de méthylène des constituants cellulaires acides, et en éosine les structures cellulaires basiques.

➤ **Étapes de réalisation de la coloration Giemsa :**

- Fixation, par l'éthanol pendant 5'.
- Préparation d'une dilution 1/5^{ème} de Giemsa par PBS.
- Coloration pendant, 1heure.
- Rinçage à l'eau courante de robinet.
- Séchage à l'air libre.

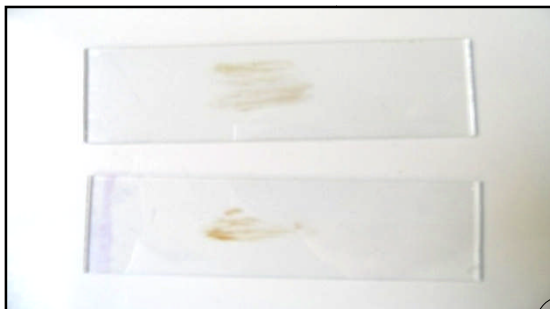


Figure 10 : Frottis cutanés (Photo originale).

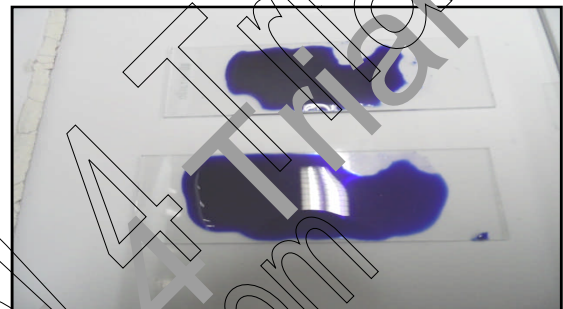


Figure 11 : Coloration des frottis par Giemsa (Photo originale).

➤ **Étapes de réalisation de la coloration RAL 555 :**

Plonger la lame à lire 5 fois pendant une seconde dans les trois flacons pour :

- Fixation par FIX-RAL555.
- Coloration des organites acides par EOSINE RAL555.
- Coloration des organites basiques par BLEU-RAL555.
- Rinçage et séchage.

Égoutter l'excédent sur papier filtre avant d'introduire la lame dans le flacon suivant.

➤ **Lecture :**

La lecture se fait par microscope optique ($G \times 100$) à immersion.

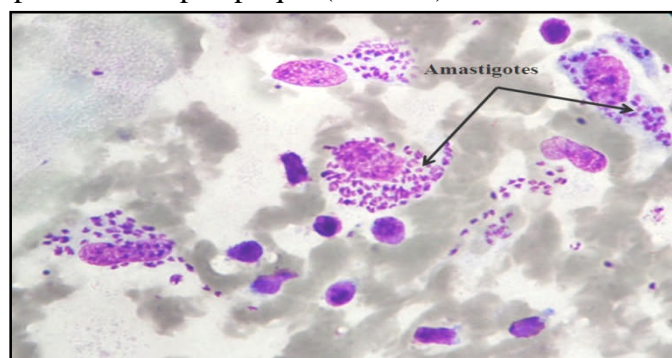


Figure 12 : Formes amastigotes sur un frottis coloré en Giemsa ($G \times 100$) (Photo originale).

I.2.1.2 La culture :

Elle consiste à mettre en évidence les formes promastigotes après isolement à partir des lésions cutanées.

Nous avons utilisé différents milieux culture dont : RPMI, AU et VU (**annexe 22**).

➤ Mode opératoire :

À l'aide d'une seringue on aspire aseptiquement le maximum de sérosités afin de les déposer sur les différents milieux de culture.

La croissance des promastigotes apparaît après différentes périodes d'incubations (selon les propriétés de chaque milieu) à 27°C.

Le délai de positivité des milieux AU et VU est de 6 jours, par contre celui de milieu RPMI est de 3 jours.

➤ Lecture :

La lecture des résultats des différentes cultures s'effectue par la prise d'une goutte à partir de milieu à l'aide d'une pipette pasteur stérile entre lame et lamelle. L'observation des formes promastigotes flagellés et mobiles se fait sous microscope optique, objectif G $\times 40$. La culture n'est considérée comme négative qu'après environ 4 semaines.



Figure 13: Formes promastigotes colorées au Giemsa GX100.

I.2.2 Diagnostic séro-immunologique :

I.2.2.1 Immunofluorescence indirecte :

➤ Principe :

Il consiste à mettre en présence un antigène figuré avec des dilutions successives de sérum. La fixation des anticorps spécifiques sur l'antigène figuré correspondant, forme le complexe Ag-Ac révélé par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à l'isothiocyanate de fluorosceine. (Maia et Campino, 2008).

➤ Mode opératoire :

D'abord, nous avons fait sortir les lames en nombre nécessaire et nous les avons laissées environ 15' à température ambiante ; le temps de préparer les échantillons.

- Réalisation des dilutions pour chaque sérum (1/20, 1/40, 1/80, 1/160) (fig 14).
- Dépôt de 10µl de chaque dilution des différents sérums sur les spots.
- Incubation des lames en chambre humide dans l'étuve pendant 30' à 37°C.
- Rinçage par le PBS puis, passage deux fois dans un bain de PBS pendant 5'.
- Séchage à 37°C pendant au moins 30'.
- Remettre les lames dans la chambre humide : l'ajout de 10µl de conjugué anti-immunoglobuline humaine (IgH) contenant le R'eu d'Evans, sur chaque spot.
- Incubation, lavage et séchage comme précédemment.
- Dépôt de fluoprep et des lamelles sur les lames.

➤ Lecture :

La lecture des lames a été effectuée par microscope à épifluorescence en lumière UV (G ×40).

➤ Interprétation :

Les résultats sont considérés comme positifs lors de la présence des promastigotes fluorescents au seuil 1/40, et négatifs lors de la présence de fluorescence rouge.

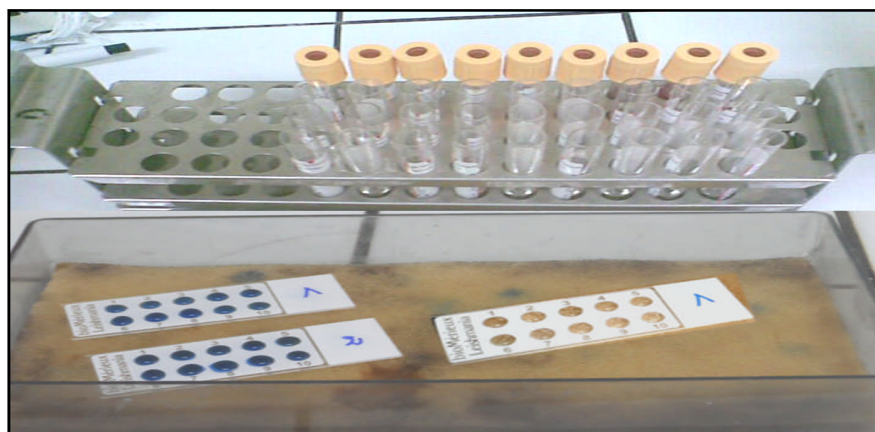


Figure 14 : Réalisation de l'IFI (Photo originale).

I.2.2.2 Western blot :

➤ Principe:

L'extrait protéique 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 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 (Tulasne, 2009).

➤ Mode opératoire :

- Distribuer 1200µl de tampon de dilution dans chacun des puits.
- Placer une bandelette de nitrocellulose sensibilisée numérotée, face vers le haut, dans chacun des puits. Agiter doucement la cuve pour immerger la bandelette.
- Distribuer les échantillons (25µl de sérum) et le contrôle positif (25µl). Agiter doucement la cuve après chaque dépôt. Puis incubation 90' sur agitateur.
- Laver trois fois avec le tampon de lavage dilué au 1/10.
- Distribuer 1200µl de conjugué anti-IgG, incuber 60' sur agitateur, puis refaire les trois lavages.
- Distribuer 1200µl de substrat, incuber 20-60' mn sur agitateur.
- Arrêter la réaction par deux lavages à l'eau distillée.
- Transférer les bandelettes sur un papier filtre. Laisser sécher à l'air 15 mn.

➤ Résultats et interprétation :

Le résultat s'effectue par la comparaison entre le profil de l'immunoblot de chaque échantillon avec celui du contrôle positif. Le sérum est considéré comme positif lors de la présence des bandelettes 14KDa et/ou 16KDa sur la bande antigénique.

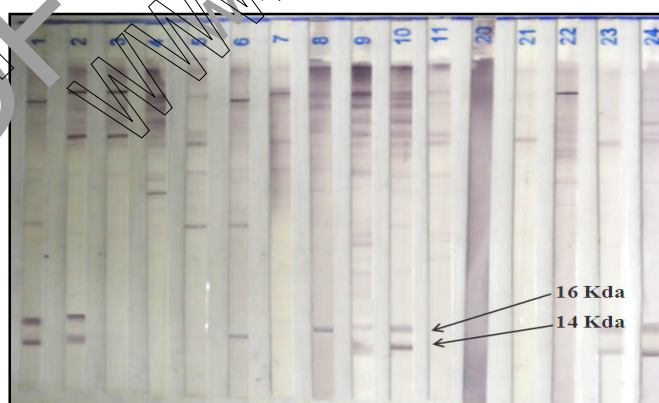


Figure 15: Résultats du WB (Photo originale).

NB : nous avons travaillé avec 25 µl de sérums selon le protocole mais pour des résultats plus précis nous avons essayé d'utiliser 50 et 100 µl de chaque sérum et nous avons remarqué que l'intensité des bandes s'améliore avec l'augmentation de volume des sérums.

I.2.3 Diagnostic moléculaire :

Le diagnostic s'effectue par plusieurs techniques qui se déroulent en trois principales étapes : l'extraction, l'hybridation et la révélation.

La PCR est la technique la plus utilisée. Elle consiste en l'amplification des séquences de l'ADN en plusieurs copies à partir d'une quantité minime.

➤ L'extraction :

Afin de mettre au point notre PCR, nous avons utilisé deux types d'extraction, l'extraction classique par «phénol/chloroforme/isoamyl alcool» et l'extraction par Kit «Qiagen». Nous avons réalisé :

- 48 extraits par la méthode phénol/chloroforme/isoamyl alcool.
- 21 extraits par kit Qiagen.

NB : Avant d'entamer l'extraction classique recommandée avec la protéinase K (PK), à défaut de cette dernière, nous l'avons remplacée par la pronase et nous avons pratiqué 4 extractions phénol/chloroforme/isoamyl alcool pronase afin de préparer nos témoins positifs.

➤ L'hybridation :

Les 48 hybridations ont été réalisées par le morce K13A/K13B ciblant l'ADN kinétoplastique des mini-cercles selon les protocoles **Keer, 2006** et **Lachaud, 2002**.

➤ La révélation :

Nous avons révélé les amplicons sous une lumière UV, après une électrophorèse dans un tampon sur un gel d'agarose à 2% incluant le bromure d'éthidium.

I.2.3.1 Extraction :

A) L'extraction classique de l'ADN (phénol/chloroforme/isoamyl alcool) :

➤ Principe :

L'extraction classique est basée sur la solubilité différentielle des acides nucléiques entre deux phases non miscibles.

Cette réaction se passe en plusieurs étapes :

- Lyse cellulaire par la solution de lyse TNNT.
- Dégradation des membranes cellulaires par la protéinase K.
- Extraction de l'ADN par le phénol/chloroforme/isoamyl alcool.
- Précipitation à l'aide des sels (Acétate de sodium).
- Lavage par des alcools (Méthanol).

- Resuspension de l'ADN dans un tampon TE ou dans l'eau des ampoules de préparation injectable stérile.
 - **Étapes pratiques :**
- Allumer le bain marie à 56° le temps de préparer les échantillons.
- Prélever 1 volume d'échantillon (de sérosité ou à partir des milieux de culture) dans des eppendorfs numérotés.
- Ajouter 2-3 volumes de solution de lyse TNNT (TNN+Tris).

Le volume de solution de lyse ajoutée dépend de la nature de l'échantillon lui même.

- Rajouter la PK (20 mg/ml) en raison de 2 µl pour 100 µl d'échantillon.
- Incuber au bain marie à 56° au moins 2 heures en agitant chaque 30 mn à l'aide d'un agitateur pendant 30 secondes.
- Faire bouillir 10 mn au bain marie d'ébullition, pour désactiver la PK.
- Rajouter un volume de phénol/chloroforme/isoamyl alcool (1/25/24).
- Appliquer une agitation vigoureuse des eppendorfs ensuite centrifuger à 14000 trs/min durant 10 mn.

Enfin, trois phases visibles ont été obtenues : Une phase superficielle aqueuse contenant l'ADN; une phase intermédiaire contenant les protéines ; et une troisième phase contenant le phénol/chloroforme/isoamyl alcool et d'autres débris.

- Récupérer soigneusement la phase aqueuse à l'aide d'une pipette dans un nouvel eppendorf.
- Pour une meilleure pureté, répéter la dernière étape (l'ajout de phénol/ chloroforme/ isoamyl alcool, centrifugation, récupération de la phase aqueuse).
- Rajouter un volume de chloroforme froid (1V/1V) pour éliminer le phénol qui est un puissant inhibiteur.
- centrifuger à 14 000 trs/min 10 mn.
- Récupérer soigneusement la phase aqueuse dans un nouvel eppendorf sans toucher le culot.
- Rajouter un volume d'acétate de sodium 3M qui alourdit l'ADN.
- Pour avoir une meilleure précipitation ; on laisse les eppendorfs une nuit a 4°C.
- Le lendemain, ajouter 2-3 volumes de l'éthanol absolu froid (-20°C), (l'ADN sous forme d'une méduse est visible à l'œil nu).
- Centrifuger 14 000 trs/mn pendant 20 mn.
- Éliminer soigneusement le surnageant sans toucher le culot(ADN),
- Appliquer trois lavages par 500 µl d'éthanol a70% pour éliminer les sels; chaque lavage est poursuivi par une centrifugation a 14000 trs/mn pendant 5 mn.
- Laisser sécher les culots durant 12-24 h a température ambiante en recouvrant les eppendorfs ouverts par le parafilm puis perçant un trou ; permettant ainsi l'évaporation de l'éthanol.

Le volume initial de l'échantillon prélevé conditionne tous les volumes des différents composants et réactifs utilisés dans les différentes étapes de l'extraction.

➤ **Resuspension de l'ADN :**

Après séchage ; l'ADN est resuspendu en ajoutant 100 µl de tampon TE (Tris/EDTA) a pH 8, ou l'eau des ampoules de préparation injectable stérile. La resuspension se fait 2 h à température ambiante ou 30 mn à 37°C.

B) Extraction d'ADN par kit Qiagen (protocole pour les tissus) :

➤ **Principe :**

L'isolement de l'ADN sur une membrane de nature silice-silica grâce à la charge entre les deux molécules par des centrifugations successives, cette méthode d'extraction assure la pureté de l'ADN par des solutions de lavage et des sels fournis avec le kit permettant d'éliminer les protéines et d'autres contaminants.

➤ **Étapes pratiques :**

- Allumer le bain marie à 56°C.
- Verser 200 µl de l'échantillon (sérosité) dans un eppendorf.
- Rajouter 100 µl de tampon AL et 10 µl de protéinase K et bien agité.
- Incuber à 56°C pendant 30 mn avec vortex (Le temps de l'incubation varie en fonction du type d'échantillon traité).
- Rajouter 200 µl d'éthanol absolu (pour précipiter l'ADN), puis vortexer et transférer le contenu sur une colonne Qiagen.
- Centrifuger la colonne 3 mn à 10 000 trs/mn, puis jeter la poubelle et remettre la colonne sur une nouvelle poubelle.
- Faire un premier lavage par 500µl de tampon de lavage AW1 avec centrifugation 3 mn à 10 000 trs/mn, puis remettre la colonne sur une nouvelle poubelle.
- Faire un deuxième lavage avec le tampon de lavage AW2 comme précédemment.
- Ajouter 200 µl d'eau distillée stérile ou le tampon AE et laisser les tubes en position verticale durant 3 mn et après, centrifuger 3 mn à 10 000 trs/mn pour libérer l'ADN fixé à la membrane de silice.



Figure 16 : Différents composants du Kit Qiagen (Photo originale).

➤ **Conservation :**

La conservation de l'ADN se fait dans le tampon TE (Tris 10mM pH8 /EDTA 10mM pH8) après une simple agitation pour homogénéiser le mélange. Pour un usage a court terme ; conserver les extraits a +4°C et a -20°C, pour un usage a long terme.

I.2.3.2 Polymérase chaine réaction « PCR » :

➤ **Principe :**

La PCR ou réaction d'amplification en chaîne par polymérase *in vitro*, permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN de quelques centaines de paires de bases. Cette réaction enzymatique se déroule en plusieurs cycles successifs pour donner à la fin un grand nombre de copies d'ADN identiques à notre fragment d'intérêt afin de pouvoir le caractériser. Pendant les 20 à 40 cycles de chauffage, la polymérase utilise les nucléotides libres disponibles dans le milieu réactionnel pour copier la séquence cible (Irwin *et al.*, 2001).

➤ **Étapes de réaction :**

La PCR se déroule en trois principales étapes :

La dénaturation thermique de l'ADN cible par rupture des liaisons hydrogènes H entre les bases nucléotidiques des deux brins complémentaires ;

La stabilisation et l'hybridation des amorces dans une température adéquate par une complémentarité avec des régions bien précises dans les monobrins d'ADN cible.

La polymérisation et l'élongation, grâce à la Taq polymérase, qui incorpore les nucléotides pour élonger et synthétiser des deux brins d'ADN à la fin de chaque cycle.

➤ **Composants de la PCR :**

La PCR exige six composants primordiaux (Irwin *et al.*, 2001) :

• **ADN polymérase thermostable :**

Elle est utilisée pour catalyser la réaction de polymérisation. La concentration de la Taq polymérase est donnée en U/μl ce qui définit la quantité d'enzyme nécessaire pour l'incorporation de 10 nmoles de dNTP à une température de 70°C pendant 30'.

• **Les nucléotides dNTPs (désoxynucléotides triphosphates) :**

Les quatre dNTPs(dATP, dTTP, dCTP et dGTP) sont utilisés avec une quantité équimolaire dans une solution pré-mélangée et prête à l'emploi.

• **Paire d'amorces (Primers):**

Ce sont des oligonucléotides synthétiques sens et anti-sens, complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier, pour amorcer la synthèse d'ADN.

Une concentration élevée d'amorce favorise un amorçage aléatoire ce qui peut provoquer des amplifications non spécifiques.

- **Cations divalents :**

Les ions Mg^{++} stabilisent les nucléotides et facilitent l'hybridation des amorces sur la matrice en se fixant sur les groupements phosphates chargés négativement de ces derniers diminuant ainsi la répulsion entre l'amorce et la matrice.

Le Mg^{++} est un cofacteur de la Taq pol, qui influence la reconnaissance des dNTPs et de la matrice par cette enzyme.

- **Tampon (Buffer) :**

Il maintient un pH stable correspondant au pH optimal de la Taq pol, il stabilise les hybrides, comme il fournit les sels nécessaires en concentration adéquate pour le déroulement de la réaction.

- **L'ADN :**

Il représente la matrice à partir de laquelle l'amplification se fait. La concentration et la qualité de cette dernière dépend de la nature des prélèvements et du type d'extraction.

La concentration idéale d'ADN leishmanien à rajouter dans le mélange réactionnel (MIX) afin d'obtenir une bonne amplification n'est pas mentionnée dans la littérature alors que la majorité des auteurs s'accordent pour un volume de 10 μ l d'ADN extrait.

- **L'amplification :**

L'amorce K13A/ K13B cible les gènes qui codent pour une région répétée (10 000 copies) des minicircles de l'ADN kinétoplastique, la taille de cette séquence est de 120pb.

K13A : 5'-GTGC GGGAGGGGCGTTCT-3'

K13B : 5'-ATTTTACACCAACCCCGATT-3'

Tableau I : Caractéristiques de l'amorce K13A/ K13B.

Caractéristiques	K13A	K13B
Longueur	18 pb	21 pb
%GC	72%	43%
Tm	57	50
PM	5658	6285
DO de 1PicoMolaire	5157	4645
Taille de la cible	120pb	

Le protocole PCR a été réalisé initialement comme décrit par **Keer et al. en 2006**, malheureusement nous avons obtenu des résultats décevants lors de sa réalisation, pour

cela nous l'avons remplacé par le protocole décrit par **Lachaud et al. en 2002**, même avec ce protocole nous avons eu une série de résultats négatifs inexpliqués. Et pour cela nous avons procédé à une optimisation qui a concerné la température d'hybridation.

La température d'hybridation retenue pour notre amplification est de 57°C au lieu de 56 °C proposé par L. Lachaud et *al.* en 2002.

Nos PCR ont été réalisés suivant les conditions qui figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Les composants de MIX de l'amorce K13A/K13B Selon le protocole L. Lachaud 2002.

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale*	Volume prélevé pour 1 PCR
Tampon x10	10×	1μl	5μl
Mgcl ₂	3 mM	3mM	3μl
dNTP Mm	200 μM	200μM	1μl
Amorce S	1μM	1μM	2,5μl
Amorce R	1μm	1Mm	2,5μl
Taq poly U/μl	1,5U/μl	1,5U	0,3μl
H ₂ O			25,7μl
ADN		10μ	
Total			40μl

* : concentrations utilisées dans le protocole **Lachaud 2002**.

Tableau III : Conditions d'amplification citée par L. Lachaud 2002 avec une température d'hybridation 57C°.

Protocoles	Lachaud 2002
Dénaturation initiale	94°C (4 mn)
Dénaturation	94°C (30S)
Hybridation	57°C (30S)
Élongation	72°C (30 S)
Élongation finale	72°C (10 mn)
Nombre de cycles	40

Afin d'éviter les contaminations, nous avons utilisé des salles séparées et un matériel spécifique pour chaque étape de la PCR (extraction, préparation du MIX et électrophorèse), avec une décontamination par exposition de consommable et de matériel ainsi qu'une désinfection des surfaces avec l'eau de javel.

➤ La révélation :

Elle se fait par une électrophorèse sur gel d'agarose au bromure d'éthidium. Cette méthode permet de contrôler la spécificité de l'amplification, et de vérifier que le produit de l'amplification correspond bien à la taille attendue.

➤ **Principe de l'électrophorèse :**

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur taille. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose, les molécules de petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

➤ **gel d'électrophorèse :**

C'est un support de migration composé essentiellement de l'agarose qui est un polymère à base d'agar purifié, dont la concentration dépend de la taille du fragment à amplifier par proportionnalité inverse (plus le fragment est long, le gel est moins condensé). La concentration adéquate du gel pour l'amorce K13A/K13B est de 2%.

Le bromure d'éthidium est couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique pour visualiser les amplicons sur le gel, lorsqu'il est exposé aux UV, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée (annexe 16).

➤ **Tampons:**

Le choix du tampon est en fonction de la taille du fragment à révéler. Dans notre travail nous avons utilisé le Tris/Acétate/EDTA (TAE), car il nous a donné des résultats satisfaisants, il présente aussi l'avantage d'être réutilisable plusieurs fois. (Annexe 15)

➤ **Préparation et dépôts des amplicons :**

Dans les puits d'une plaque de microtitration, déposer un colorant le bleu de bromophénol à raison de 3 μ l par cupule.

Rajouter 7 μ l d'eau injectable dans chaque cupule. Mettre dans la dernière 14 μ l, cette cupule sera réservée au marqueur de taille.

Ensuite rajouter 10 μ l des produits PCR tout en commençant par le témoin négatif puis les échantillons et les témoins positifs. Enfin, rajouter 1 μ l de marqueur de taille moléculaire dans la cupule qui contient 3 μ l de bleu de bromophénol additionné à 14 μ l d'eau injectable.

Déposer les échantillons dans le gel du côté de la cathode, la migration se faisant vers l'anode.

➤ **Migration :**

La durée de la migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel, à la quantité de tampon dans la cuve et la taille de la séquence à révéler. La durée moyenne de migration est d'environ 45 minutes pour l'amorce (K13A/K13B) 120pb à 70V. Quand le front

de migration atteint l'extrémité du gel à environ 2 cm, la migration est arrêtée (Fig. 18).

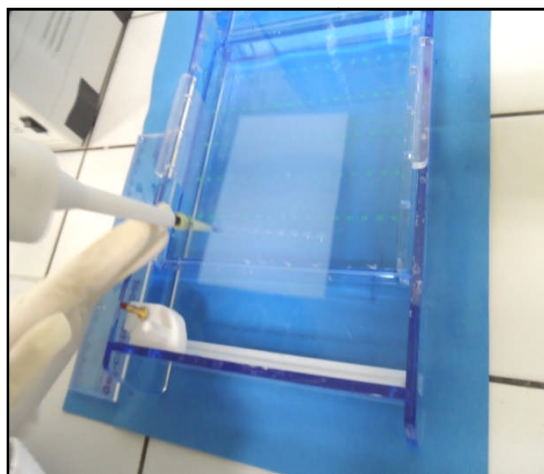


Figure 17 : Migration des amplicons à travers le gel d'agarose (Photo originale).

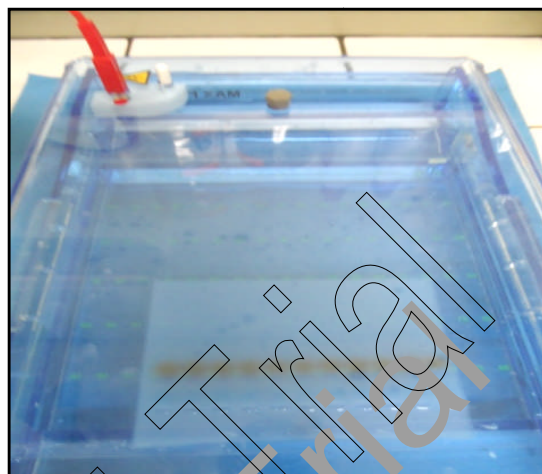


Figure 18 : Dépot des amplicons additionnés au bleu de méthylène (Photo originale).

➤ **Lecture et analyse des résultats :**

Le gel est transféré sur la table UV, cette manipulation doit être faite avec soin car le gel est très fragile et peut glisser très facilement de son support.

Le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes grâce à l'absorption des UV par le bromure d'éthidium intégré entre les bases nucléotides. La validation de la technique se fait par rapport au témoin positif, témoin négatif et le marqueur de taille (Fig. 19).

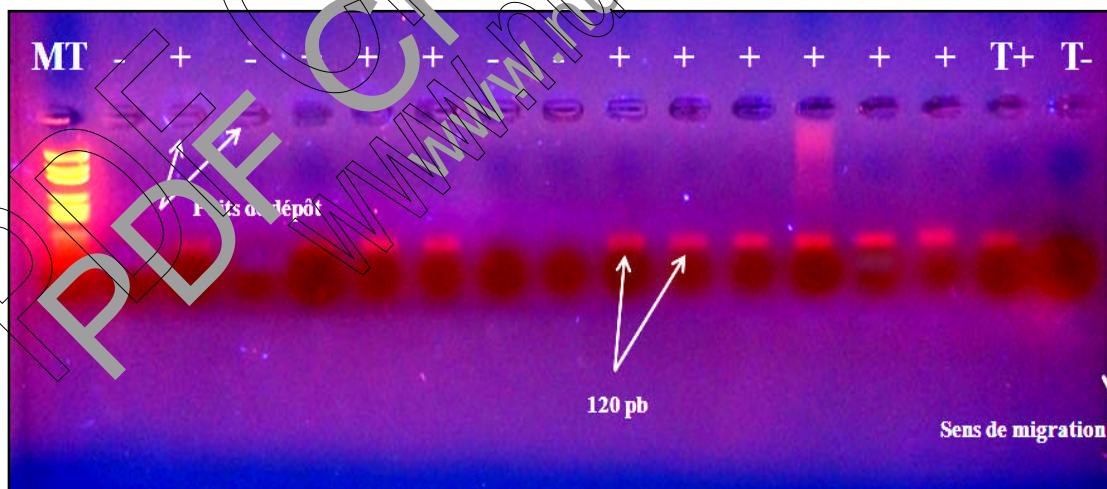


Figure 19 : Produits PCR sous lumière UV, après une électrophorèse sur gel d'agarose 2% ,17 puits avec le tampon TAE, Voltage 70V, MT de 100 à 1000 pb et une coloration au bromure d'éthidium (photo originale).

Résultats et discussion

Résultats

I Résultats :

I.1 Caractéristiques de la population :

Sur la totalité des 48 patients suspects, une fiche de renseignement a été bien établit (**annexe 9**), le diagnostique biologique de la LC a été confirmé dans 36 cas soit 75% voir figure 20.

Le diagnostic positif de la LC est retenu soit par l'ED, soit par culture, soit par une PCR positive.

Parmi ces 48 patients, 42 étaient de sexe masculin et 6 de sexe féminin avec un âge moyen de 25,73 ans et des extrêmes allant de 2 ans à 53 ans (**Fig. 21**).

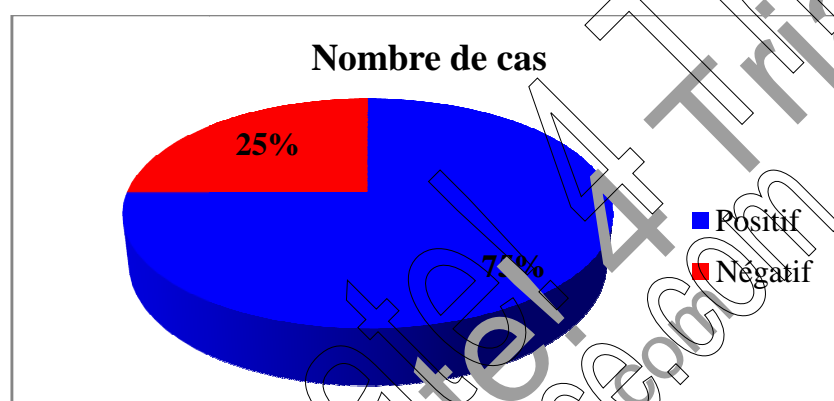


Figure 20 : Prévalence de la LC dans la population étudiée.

➤ Répartition des cas selon le sexe et l'âge :

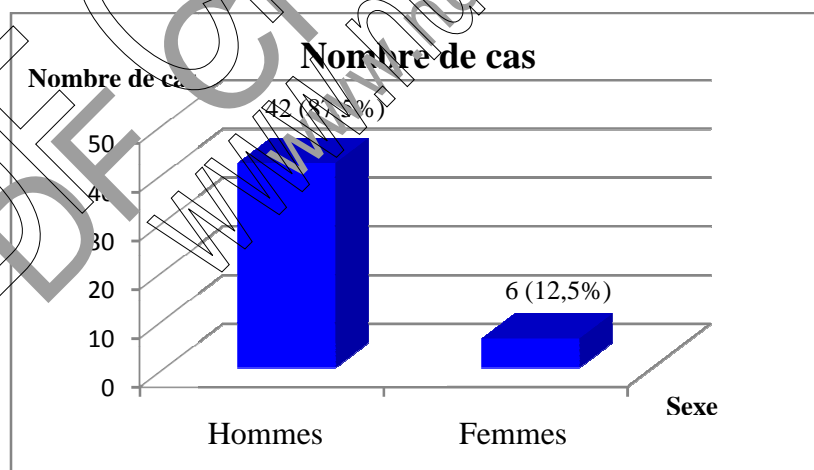


Figure 21 : Répartition des cas selon le sexe.

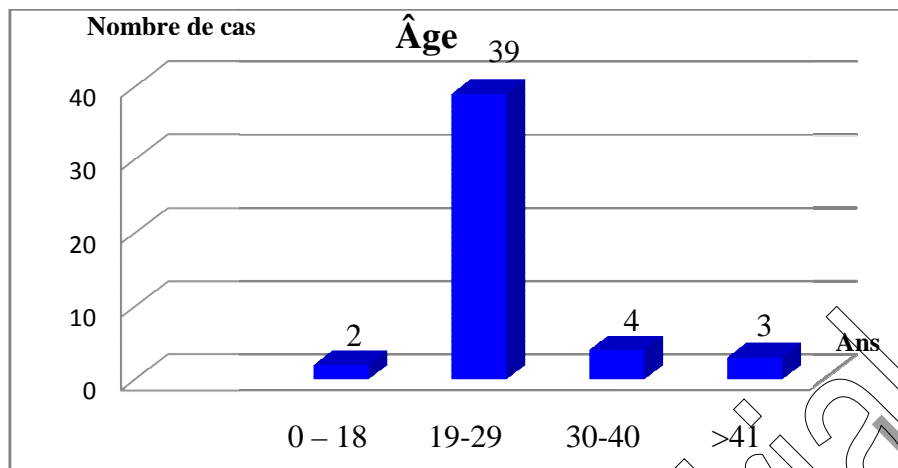


Figure 22: Représentation des cas selon l'âge.

La tranche d'âge la plus touchée est située entre 19 et 29 ans soit 81,25%.

Nous avons cherché à partir des renseignements fournis par nos patients, nous avons constaté que la majorité ont fait un séjour dans la wilaya de BISKRA comme le montre la figure ci-dessous.

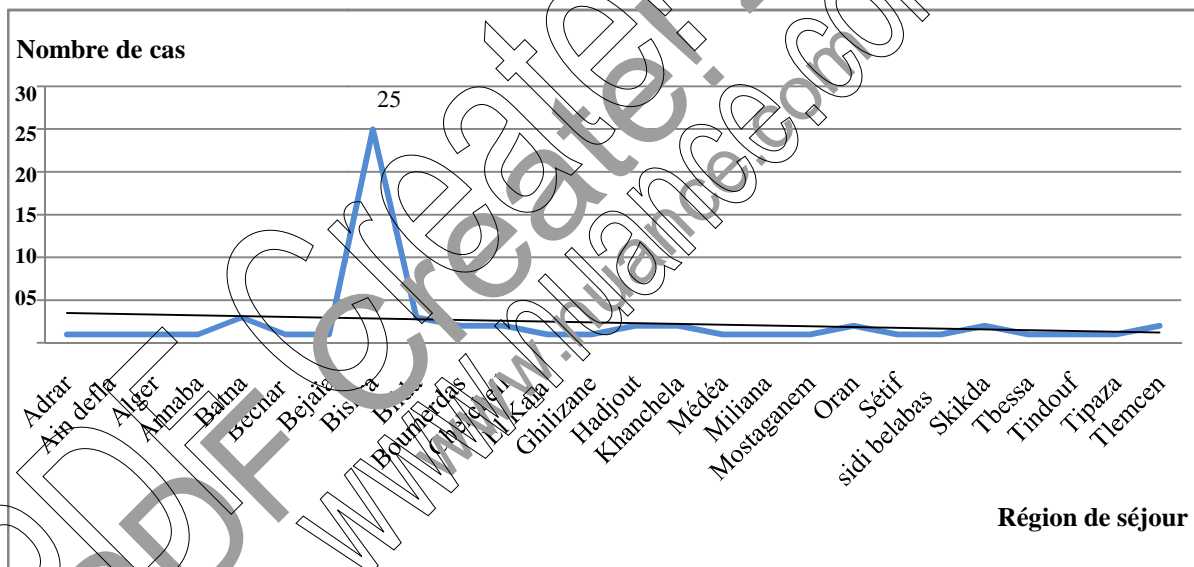


Figure 23: Répartition des cas selon la région de séjour.

➤ Répartition des cas selon la localisation des lésions :

Tableau IV: Répartition des cas selon la localisation des lésions.

Localisation	Nombre de cas	Pourcentage(%)
Visage	04	8,33%
Membres supérieures	18	37,50%
Membres inférieures	20	41,67 %
Membres supérieures et inférieures	03	6,25%
Dos	01	2,08%
Abdomen	01	2,08%
Membres supérieures et Inférieures/ dos	01	2,08%
Total	48	100%

➤ Répartition des cas selon le délai d'apparition des lésions :

Tableau V: Répartition des cas selon le délai d'apparition des lésions avant la présentation au laboratoire.

Délai d'apparition des lésions	Nombre des cas
< 1 mois	04
[1 mois-2 mois [18
[2 mois-3 mois [17
[3 mois-4 mois [04
[4 mois-5 mois [04
[5 mois-18 mois [11
Total	48

La plupart des cas (29 cas) soit 37,5% avaient une incubation allant de un à trois mois, en faveur d'une LCZ par contre, chez 11 patients avaient une incubation au delà de 5 mois correspondant à la classique incubation d'une LCS, et enfin 8 patients ont présentait une incubation située entre 3 à 5 mois

I.2 Résultats globaux :

I.2.1 Résultats des examens parasitologiques :

I.2.1.1 Résultats de l'examen direct (ED) :

L'examen direct à la recherche des corps de leishmanies est effectué systématiquement chez tous nos patients, les résultats sont exprimés dans l'histogramme ci-dessous (Fig.24).

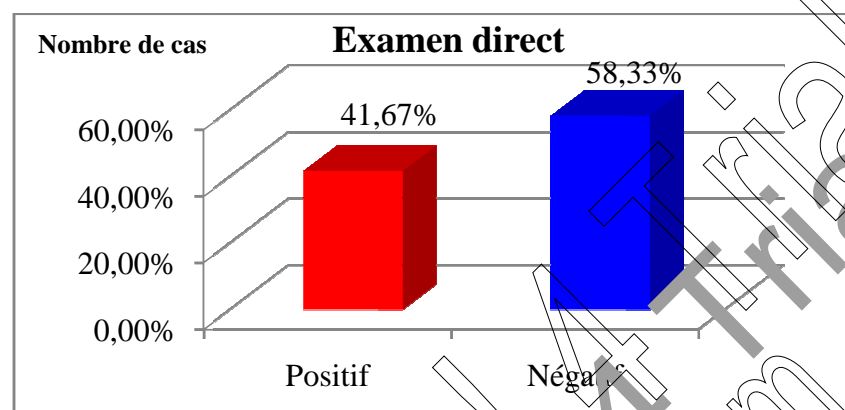


Figure 24: Représentation des résultats de l'examen direct.

Sur les 48 frottis réalisés l'ED était positif chez 20 patients soit 41,67% par contre chez 28 patients est négatif soit 58%.

Nous considérons un examen direct positif une fois les formes amastigotes sont visualisé sous microscope après coloration au Giemsa (Fig. 25).

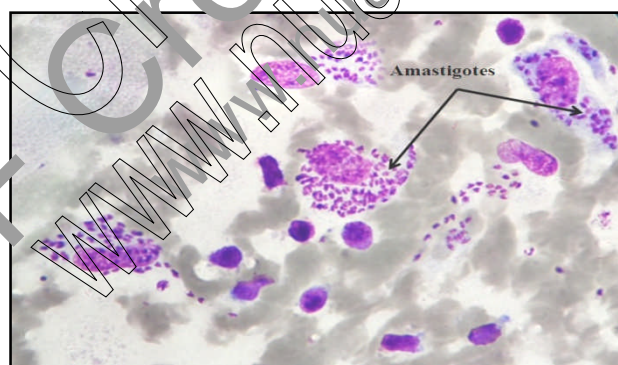


Figure 25: Formes amastigotes de *Leishmania* colorées au Giemsa (Gx100).

I.2.1.2 Résultats de la culture :

La culture a été pratiquée régulièrement chez tous nos patients, nous avons utilisé trois milieux de culture (RPMI, AU et VU). Les résultats sont exprimés dans la figure ci-dessous (Fig.26).

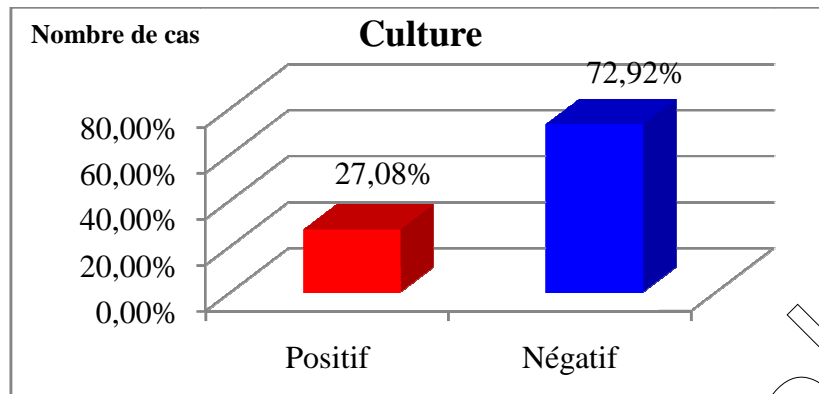


Figure 26: résultats des cultures.

La culture nous a permis de confirmer le diagnostique chez 13 patients soit 27% des cas, par contre elle a montrée un taux de négativité important de 73% soit 35 malades.

➤ **Comparaison des résultats de l'ED et de la culture :**

Tableau VI : Comparaison des résultats de l'ED et de la culture.

		Culture		Total
		Positif	Négatif	
ED	Positif	10	10	20
	Négatif	03	25	28
	Total	13	35	48

L'ED a corrigé 10 cas initialement négatifs en culture, par contre cette dernière nous a redressée 03 ED faussement négatifs.

Pour comparer ces deux techniques, nous avons utilisé le test statistique Khi deux χ^2 .

Le χ^2 ($\chi^2=2,23 < \chi^2_{5\%}=3,841$) calculé a montré un taux de positivité comparable entre ces deux techniques avec un risque d'erreur de 5% ($p < 0.05$) et un degré de liberté (ddl) $(2-1) \times (2-1) = 1$, retenant ainsi l'hypothèse nulle H_0 disant que « le taux de positivité de l'ED et celui de la culture sont comparables ».

I.2.2 Résultats des examens sérologiques :

I.2.2.1 Résultats de l'IFI :

L'IFI a été faite systématiquement chez tous nos patients, les résultats sont exprimés dans la Fig. 27.

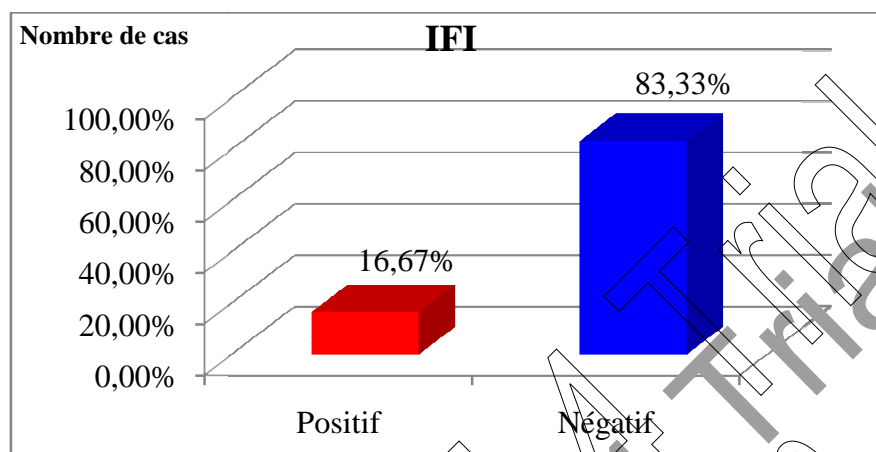


Figure 27 : représentation des résultats d'IFI en termes de cas positifs et négatifs.

La sérologie IFI est revenue positive uniquement chez 8 patients soit 17% au seuil de 1/40 versus 83% sérologies négatives soit 40 patients.

➤ Comparaison des résultats de l'IFI avec ceux de l'ED et la culture :

Afin de vérifier l'apport d'IFI dans le diagnostic de la LC nous avons comparé ses résultats avec ceux de l'ED et la culture voir tableaux VII et VIII.

Tableau VII : Comparaison des résultats de l'IFI versus l'ED.

		ED		Total
		Positif	Négatif	
IFI	Positif	06	02	08
	Négatif	14	26	40
	Total	20	28	48

L'IFI permet de corriger 2 résultats négatifs en ED, mais elle est revenue faussement négative 14 fois.

Tableau VIII : comparaison des résultats de l'IFI versus la culture.

		Culture		Total
		Positif	Négatif	
IFI	Positif	07	01	08
	Négatif	06	34	40
	Total	13	35	48

L'IFI a permis de redresser un seul résultat initialement négatif en culture, mais elle est revenue négative dans 6 cas.

La comparaison des résultats de l'IFI avec ceux de l'ED et la culture a montré un taux de positivité significativement inférieur à celui de l'ED avec un $\chi^2=7,261$, au risque de 5% et un ddl = 1, par contre ce taux de positivité était similaire entre l'IFI et la culture avec un $\chi^2=1,524$ inférieur à celui de la table.

I.2.2.2 Résultats de Western Blot :

Le WB a été fait régulièrement chez tous nos patients, les résultats sont exprimés dans le Fig. 28.

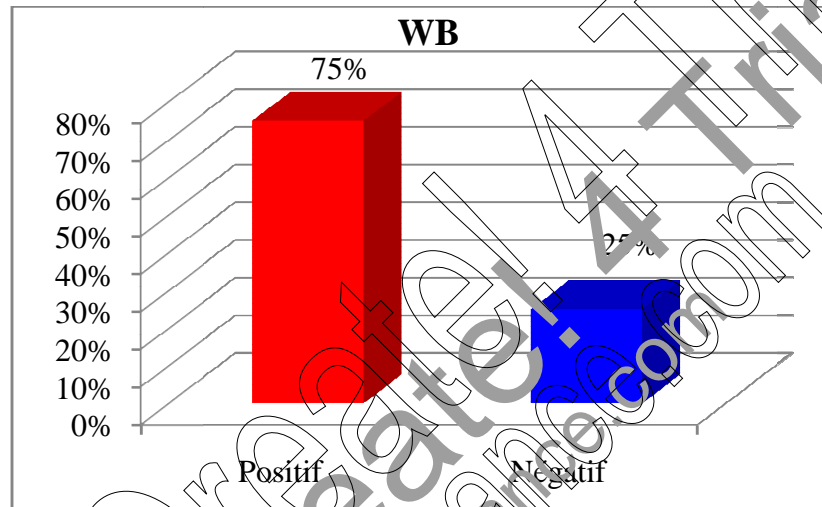


Figure 28 : représentation des résultats du WB en termes de cas positifs et négatifs.

Sur les 48 prélèvements analysés par le WB, 36 cas sont revenus positifs soit un taux de positivité de 75%, ce qui montre la performance de cette technique dans le diagnostic de la LC par rapport aux techniques citées auparavant.

Un résultat est considéré comme positif lors de la présence des deux bandes 14 Kda et/ou 16 Kda.

➤ Comparaison entre les résultats de WB versus de l'ED, la culture et l'IFI :

Afin d'évaluer l'apport de WB dans le diagnostic de la LC nous avons comparé ces résultats avec ceux de l'ED, la culture et l'IFI. Les résultats sont indiqués dans les tableaux IX, X et XI.

Tableau IX: Comparaison des résultats de WB et de l'ED.

WB	ED		Total
	Positif	Négatif	
Positif	16	20	36
Négatif	04	08	12
Total	20	28	48

Le WB a rectifié 20 résultats négatifs en ED, par contre il s'est révélé faussement négatif 4 fois par rapport à l'ED.

Tableau X : Comparaison des résultats de WB et de la culture.

WB	Culture		Total
	Positif	Négatif	
Positif	11	25	36
Négatif	02	10	12
Total	13	35	48

Le WB a corrigé 25 résultats négatifs en culture, mais il est a été corrigé par la culture pour deux résultats négatifs.

Tableau XI : Comparaison des résultats de WB et de l'IFI.

WB	IFI		Total
	Positif	Négatif	
Positif	06	30	36
Négatif	02	10	12
Total	08	40	48

Le WB a corrigé 30 résultats négatifs en IFI, cependant il est 2 fois faussement négatif selon l'IFI.

Le taux de positivité de WB a été significativement supérieur à celui des trois techniques avec un χ^2 égale à 10,971, 22,051 et 32,895 avec l'ED, la culture et l'IFI respectivement.

I.2.3 Résultats moléculaires :

Chez les 48 patients, des PCR ont été réalisées à partir des sérosités avec l'amorce kénitoplastique K13A/K13B.

Une PCR est considérée positive s'il y a apparition d'une bande de 120 pb, après une électrophorèse à 70 V sur gel d'agarose 2%.

I.2.3.1 Résultats de la PCR :

Sur les 48 PCR, seulement 9 sont revenue négatives versus 39 PCR positives. Cela montre clairement la supériorité de cette technique (81,25%) par rapport aux techniques utilisées auparavant (**Fig. 29**).

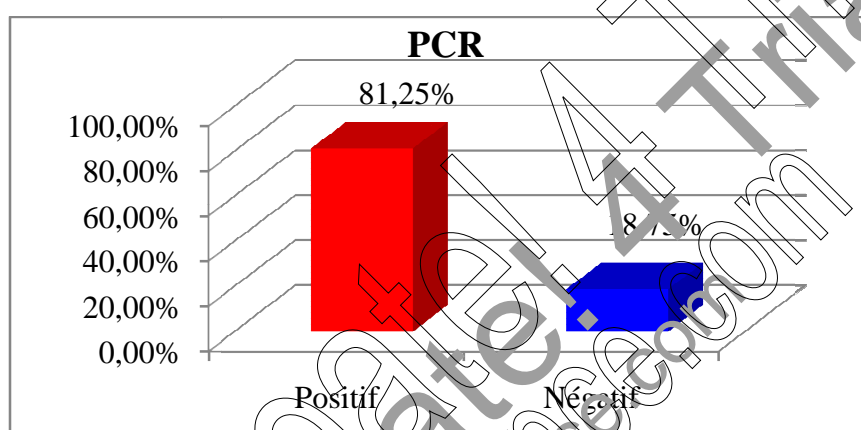


Figure 29 : Résultats de la PCR.

➤ Comparaison entre les deux techniques d'extraction classique et par kit:

Afin de vérifier l'influence de types d'extraction sur les résultats de nos PCR, 21 PCR effectuées par deux techniques d'extraction (la méthode classique, extraction kit) ont été comparées. Les résultats sont indiqués dans les tableaux ci-dessous.

Tableau VII : Comparaison entre les deux techniques d'extraction kit et classique.

		PCR _K		Total
		Positif	Négatif	
PCR _C	Positif	13	02	15
	Négatif	02	04	06
	Total	15	06	21

PCR_K : PCR à partir d'extraction Kit.

PCR_C : PCR à partir d'extraction classique.

D'après ce tableau nous constatons que les deux types d'extractions ont permis de redresser deux diagnostics.

Le χ^2 calculé entre les résultats des deux types d'extractions est de 0,252 ; montrant ainsi une reproductibilité similaire se référant à la table de χ^2 .

➤ **Comparaison des résultats de la PCR avec chaque technique :**

La PCR a positivé 23 résultats négatifs en ED, et ce dernier à redressé 04 résultats (Tableau XIII).

Tableau XIII : Comparaison des résultats de la PCR et de l'ED.

PCR	ED		
	Positif	Négatif	Total
Positif	16	23	39
Négatif	04	05	09
Total	20	28	48

La PCR a positivé 27 résultats négatifs en culture et elle est revenue une seule fois négative (Tableau XIV).

Tableau XIV : Comparaison des résultats de la PCR et de la culture.

PCR	Culture		
	Positif	Négatif	Total
Positif	12	27	39
Négatif	01	08	09
Total	13	35	48

La PCR a corrigée 32 résultats initialement négatifs en IFI et elle est redressée une seule fois par l'IFI pour un résultat négatif (Tableau XV).

Tableau XV : Comparaison des résultats de la PCR et de l'IFI.

PCR	IFI		
	Positif	Négatif	Total
Positif	07	32	39
Négatif	01	08	09
Total	08	40	48

La PCR a rectifié 10 résultats négatifs en WB, par contre elle a donné 07 résultats faussement négatifs (Tableau XVI).

Tableau XVI : Comparaison des résultats de WB et de PCR.

PCR	WB		
	Positif	Négatif	Total
Positif	29	10	39
Négatif	07	02	09
Total	36	12	48

➤ **Comparaison de taux de positivité de la PCR et l'ensemble des quatre autres techniques :**

Le calcul de χ^2 a montré une différence significative entre le taux de positivité de la PCR et celui de l'ED, la culture et l'IFI avec un χ^2 de 15, 875 ; 28,364 et 40,059 respectivement, en faveur de la PCR.

Le χ^2 comparant la PCR et le WB était de 0,549, inférieur à celui tabulé, retenant ainsi l' H_0 disant qu'il n'existe aucune différence significative entre le rendement de ces deux techniques.

Le calcul de ces paramètres passe par la connaissance des définitions suivantes :

VP : vrais positif : représente le nombre de patients positifs avec la technique en question et avec au moins une autre technique.

FP : faux positif : représente le nombre de patients positifs seulement avec la technique en question, les autres techniques étant négatives.

FN : faux négatif : représente le nombre de patients négatifs avec la technique en question et avec au moins une autre technique positive.

VN : vrais négatif : représente le nombre de patients négatifs avec la technique en question et avec toutes les autres techniques.

Pour connaître réellement le rendement de ces techniques, nous avons calculé la sensibilité et la spécificité pour chacune d'elles et que nous rapportons dans le Tableau XVII.

Tableau XVII : Sensibilité et Spécificité des cinq techniques.

Technique	Sensibilité(%)	Spécificité(%)
ED	42,55	100
Culture	27,56	100
IFI	17,02	100
WB	89	67
PCR	82	41,67

Sensibilité= ———

Spécificité= ———

Discussion

Discussion :

La leishmaniose cutanée constitue un problème majeur de santé publique dans plusieurs pays dont l'Algérie.

Le diagnostic classique repose sur les techniques directes, les progrès actuels proposent la détection d'ADN par des techniques moléculaires ainsi que par la détection des anticorps circulants (**Dedet 1999 ; Marty, 2007**).

Dans notre étude, la quasi-totalité de l'échantillon était de sexe masculin, en raison de la catégorie socioprofessionnelle à laquelle appartenaient nos patients, ce qui explique le sex-ratio de 7. Ces résultats sont proches de ceux apportés par **Er-Rami et al. 2012** à l'hôpital militaire Moulay Ismaïl de Meknès au Maroc où ils notent un sex-ratio de 11 (45 hommes/ 4 femmes).

Également, les patients appartiennent presque à la même tranche d'âge, avec un âge moyen de 26 ans, à l'exception de cinq patients : deux enfants et trois sujets âgés.

Sur les 48 patients, 43 étaient des militaires de profession. La nature de cette profession se traduit par des déplacements au niveau de zones endémiques, stage de performance (Biskra), des missions de ratissage et des embuscades nocturnes qui les exposent aux piqûres de phlébotomes, en plus les militaires des contingentes ont un statut immunitaire naïf vis-à-vis de l'infection leishmanienne.

Les patients suspectés cliniquement de la LC, généralement sont orientés vers un diagnostic biologique environ deux mois après la piqure, particulièrement dans la durée allant de Décembre à Avril.

Cette observation est pareille à celle publiée dans l'étude réalisée par **Zait, Hamrioui en 2009**, dans laquelle ils certifient le caractère saisonnier estivo-automnal de la LC en Algérie.

Cette période vient deux mois après la fin de la saison estivale où le phlébotome devient actif et dynamique, favorisé par la présence de réservoirs qui incubent l'agent pathogène, ainsi le cycle se complète d'après **Izri et Belazzoug (2007)**.

Concernant la répartition des lésions nous avons constaté que les membres inférieures sont les plus touchés avec 41,67 % ce qui rejoint les résultats apportés par **Er-Rami et al. 2012** au Maroc, contre les données apportées par **Zait 2009**, qui montre l'atteinte faciale de 52,5% à l'interface des localisations les plus touchées.

Dans ce travail l'examen direct a confirmé la présence de corps de leishmanies dans 41,67% (20/48) des cas. Ces résultats sont proches de ce qui est cité dans la littérature où le taux de positivité de cet examen direct n'est que de l'ordre de 48,25% (69/143) selon **Mihoubi et al. (2006)** à Constantine, de l'ordre de 38,13% (114/299) selon **Néfati et al. (2009)** en Tunisie.

L'examen direct est rapide et facile à réaliser, mais il est fréquemment moins sensible ne permettant pas de déceler le parasite de manière efficace. Cette faible sensibilité est liée aux conditions de déroulement de ce test, la compétence de l'examineur (**Mihoubi et al., 2006 ; Zougaghi et al., 2009**). Rajouter à cela, les surinfections et l'ancienneté des lésions et le traitement reçu qui risque de diminuer la charge parasitaire (**Chargui et al., 2005 ; Troncarelli et al., 2009 ; Kone et al., 2011**).

La sensibilité de l'ED trouvé dans ce travail était de 42,55%. Cette sensibilité est faible en la comparant avec celles notée en Tunisie par **Chargui et al., 2005** pour la LC et **Kaouech et al. 2008** pour la leishmaniose viscérale (LV) où elles étaient de 80,8% et 97% respectivement, mais elle est proche de celle citée en France par **Costa et al., 1996** où elle était de 51%, pour la LV.

Sa spécificité était de 100% concordante aux données de la littérature, elle que celle trouvée par **Troncarelli et al., 2009**.

La mise en culture des sérosités cutanées sur les différents milieux préparés à permis d'augmenter les chances d'isoler le parasite.

Dans notre étude la culture est donnée positive dans 27% des prélèvements. Cette positivité est relativement similaire à celle citée par **Chargui et al., 2005** où elle été de 20,50% (88/430), mais elle est différente de celle apportée par **Rodrigues(2002)** au Brésil où elle était de 46.5% (40/86) pour la LC un résultat qui éventuellement pourrait revenir à la situation géographique du pays.

Elle nous a permis de corriger le diagnostic chez trois malades présentant un examen direct négatif. Toute fois elle compte aux résultats faux négatifs.

Les faux négatifs de cette technique peuvent être expliqués par le risque important de contamination, la viabilité des parasites après isolement, l'exigence des souches, l'évolution des lésions, les caractéristiques des milieux de culture utilisés qui répondent ou pas aux exigences des différentes espèces (**Anders, 2003 ; Zait et Hamrioui; 2009 ; Octoa et al., 2011**).

Ce qui nous à mener à tester deux milieu de culture (vitellus-urine et albumine-urine) de recette propre au laboratoire. Ces deux milieux ne sont pas des milieux de référence, mais ils ont donné des bons résultats avec un risque de contamination faible par rapport à le RPMI.

La sensibilité de la culture été de 27,56% ,comparable aux résultats de **Chargui et al., 2005** qui a trouvé une sensibilité de 29% pour la LC, mais relativement inférieure à celle apportée par **Belhadj et al., 2002** et **Kaouech et al.,2008** dans la LV en Tunisie, qui ont été de 59,18 % a partir de la moelle osseuse et de 57,14 % a partir du sang pour le premier , de 69,8% pour le deuxième. Toute fois il faut noter qu'il paraît que la leishmaniose viscérale répond bien à la culture et donne souvent de bonnes positivités.

Sa spécificité est de 100%, identique à celle de **Shahbazi et al., 2008 (in Marty, 2008)**, elle est de 50.9% pour **Pourmohammadi et al., 2010**.

Les résultats fournis par chacune de ces deux techniques directes (ED et culture) restent insuffisants. À partir de ces constatations, les deux examens doivent être complémentaires, vu les cas positifs dans l'ED et négatifs en la culture et inversement. Selon **Murray (2005)**, la combinaison de l'ED avec la culture, augmente la sensibilité du diagnostic à plus de 85%.

La culture exige un temps relativement long pour rendre le résultat (une culture n'est déclarée négative qu'après un mois), ce qui prolonge et étend le traitement et la prise en charge des malades (**Anders, 2003 ; Kazemi-Rad et al., 2007; Carr et al., 2010**).

Pour surmonter certaines complications de ces tests classiques, et surtout pour faire un diagnostic plus rapide, nous avons consolidé le diagnostic par des techniques sérologiques telles que l'immunofluorescence indirecte (IFI) et le Western Blot (WB).

Ces dernières révèlent les anticorps spécifiques synthétisés par l'organisme après une stimulation du système immunitaire par les agents pathogènes.

L'IFI est considérée comme le « Gold Standard » de diagnostic sérologique (**Maia et Compino, 2008**), c'est une méthode qualitative et quantitative la plus couramment utilisée dans le sérodiagnostic de la leishmaniose viscérale à titre d'exemple.

L'apport de l'IFI dans le diagnostic de la LC reste controversé, selon **Bailey et Lockwood., 2007, Kone et al., 2011**, son rôle est limité où elle est majoritairement négative et peu rentable par contre **Mosleh (1995) et Marty 2007 et De Assiseta et al., (2008)**, considèrent qu'au lieu de surmonter certaines limites des techniques classiques, le diagnostic de la LC est consolidée par cette technique.

Ils attribuent une sensibilité variable allant de 42% selon **Marty et al., 2007**, jusqu'à 93-95% selon **De Assiseta et al. (2008)** passant par 81% selon **Mosleh (1995)**.

Ces sensibilités sont nettement supérieures à celle trouvée dans notre étude (17,02%), par contre notre sensibilité est similaire à l'étude réalisée par **Kone et al., 2011**, 17%, et de l'étude réalisée par **Dondji et al., 2001** 18,39% au Cameroun pour une raison qu'on n'a pas pu cerner.

En ce qui concerne la spécificité qui est de 100% dans notre étude, elle est proche des données de la littérature, 99%, 95% et 100% dans les études respectives de **Marty et al., 2007, Mosleh, 1995 et Camargo et al., 2010**.

Cependant, cette technique a permis de corriger trois résultats initialement négatifs avec les techniques classiques (deux en ED et un en culture), et elle a montré un rendement comparable à celui de la culture avec un $\chi^2=1,524$ inférieur à celui de la table.

La comparaison des résultats de cette technique avec celle de l'ED a révélé une différence significative en faveur de l'ED avec un $\chi^2=7,261$.

Le faible rendement de cette technique est peut être due au titre élevé de réactions croisées (**Rodrigues et al. 2002 ; Marty et al., 2007**), ce qui engendre selon **Wilson,1995** des difficultés d'interprétation des résultats (**Wilson,1995 in Anders, 2003**).

Selon **Zougaghi et al., 2009** et **Ben Ghazi, 2010**, l'état de compétence immunitaire des patients (corticothérapie, immunodépression) et le stade précoce de la maladie influence le taux d'anticorps sécrétés. En plus de ces inconvénients, la nature d'antigènes utilisés, la réalisation pratique de la technique, influencent considérablement la sensibilité de cette technique (**Marty et al., 2007 ; Maia et Campino, 2008**).

L'IFI est de plus en plus supplantée par les techniques sérologiques automatisées telle que l'ELISA et le WB dont la spécificité et la sensibilité sont beaucoup plus élevées (**Marty et al, 2007**).

Le WB est une technique de sérodiagnostic qui met en évidence de la réponse humorale qualitative du sujet en analysant la spécificité d'anticorps sériques retrouvés (**Ben Ghazi, 2010**), en effet il a montré une sensibilité de 89 %, la plus élevée de toutes les techniques appliquées dans ce travail. Les auteurs le considèrent comme technique de référence en matière de sensibilité qui est de 90,9% pour **Ferroglio et al., 2007** et de 100% pour **Bachi, 2001** et **Marty et al. 2007**.

Les anticorps spécifiques anti-*Leishmania* reconnaissent des fractions antigéniques de 14 et/ou 16 Kda. Nos patients avaient tous des bandes 14 KDa et/ou 16 KDa, la présence de ces fractions antigéniques de petite taille prouve la sensibilité et la spécificité de ce test (**Riera et al., 2004 ; Kaniel et al., 2007**).

Le WB nous a permis de corriger 28, 25 et 30 faux négatifs avec l'ED, la culture et l'IFI respectivement, ainsi il a dominé significativement toutes les autres techniques avec des χ^2 respectifs de 10,971, 22,051 et 32,895 avec l'ED, la culture et l'IFI.

Desjeux et al., 2001 apporte un taux de positivité de WB égale à 68,38% (173/253) chez des patients co-infectés par *Leishmania*/VIH, sachant que dans notre étude le statut immunitaire de nos patients été inconnu.

La spécificité de 67% retrouvée dans notre série ne s'accorde pas avec celle de l'étude réalisée par **Marty et al., 2007** et celle réalisée par **Ferroglio et al., 2007** qui ont été respectivement de 99% et de 100%.

Cette faible spécificité s'est expliquée selon **Riera et al., 2004** et **Biglino et al. 2010**, par sa grande capacité de détection des titres très bas d'AC ce qui engendre parfois une interprétation difficile d'un résultat positif qui ne représente pas nécessairement une infection active et peut juste indiquer une ancienne exposition (Ac résiduels) dû à un contact antérieur avec les leishmanies notamment dans les régions endémiques.

Il faut noter la présence d'une différence au niveau des profils immunologiques présentés par les différents patients où selon **Maia et Compino, 2008**, à ce jour, il n'y a pas un accord sur les bandes typiques de référence qui permettent la distinction des leishmanioses évolutives que ce soit cutanée ou viscérale.

Le diagnostic de la LC est enrichi ces dernières années par les techniques Polymerase Chain Reaction (PCR), qui permettent la détection des quantités minimales d'ADN parasitaire dans différents prélèvements.

La PCR est une méthode très onéreuse et très complexe mais extrêmement sensible (**Boni, 1999 ; Solano-Gallego et al., 2001 ; Riera et al., 2004**).

La plasticité génomique des parasites, en général et celle des *kinétoplasts* en particulier, laisse le champ libre à la recherche des cibles génétiques ainsi qu'aux techniques de leur mise en évidence.

La PCR classique reste empirique, car elle dépend de plusieurs facteurs et chaque facteur est en relation directe ou indirecte avec un autre pour une étape donnée (**Besnières et al., 2005**). La mise au point d'une PCR doit respecter essentiellement deux étapes ; l'extraction de l'ADN qui doit être la plus rentable exempte de contaminations, et l'amplification en utilisant les cibles les plus sensibles et les plus spécifiques.

Reithinger et al., 2000 et **Maia et al., 2000** approuvent que l'efficacité de la technique dépendra de différents facteurs tels que le choix des amorces, le nombre de copies de la cible, la méthode d'extraction d'ADN conditionne la quantité et la qualité de l'ADN, le protocole PCR, et la nature du matériel biologique.

Toutes nos PCR ont été réalisées à partir des prélèvements dermiques (grattage cutané des lésions sur des épondes contenant de l'eau physiologique 9%).

En ce qui concerne l'extraction, la méthode la plus choisie est l'extraction classique Phénol/chloroforme/isoamylalcool qui reste la plus utilisée (**Van Eys et al., 1992 ; Lachaud et al., 2001 ; Neffati et al., 2009**), et pour cela nous avons utilisé cette méthode d'extraction sur les 48 patients, dont 21 ont été traités par le kit Qiagen.

Nous avons trouvé que les résultats sont comparables entre les deux méthodes, à l'exception de quatre cas, où les PCR des deux méthodes n'étaient pas en concordance.

Cette extraction, en matière de diagnostic de la leishmaniose, a fait l'objet d'une étude comparative d'abord par l'équipe de **Reithinger et al., 2000** qui ont montré l'influence du protocole d'extraction d'ADN et les amorces utilisées sur la sensibilité de la PCR, ensuite par **Lachaud et al., 2001** qui ont comparé six méthodes différentes d'extractions d'ADN.

Les deux auteurs s'accordent pour dire que la méthode d'extraction classique donne de bons résultats avec parfois des sensibilités identiques à celle du kit d'extraction,

par contre **Hagardson et al., 2006** ont comparé quatre techniques et ont conclu pour les bons résultats du Kit Qiagen par rapport aux autres techniques d'extraction.

L'extraction classique est réalisée généralement par la protéinase K qui assure la dégradation des protéines, dans ce travail nous avons lancé quelques extractions avec la pronase, sans aucune conséquence sur les résultats de nos PCR.

Reithinger et al. en 2000 ; Bensoussan et al., 2006 et **Néffati et al., 2009** ont ainsi prouvé l'influence des amorces sur la sensibilité de la PCR.

Bensoussan a comparé la sensibilité et la spécificité de la PCR en utilisant trois amorces ciblant trois régions différentes dans le génome *Leishmania* (K13A, K13B, SLME et ITS1), il a montré que la sensibilité la plus élevée 98,7% (77/78) est obtenue avec l'amorce K13A/K13B ciblant ADNk, suivi par l'amorce ITS1 ciblant l'ARNr et SLME ciblant les mini-exons qui ont été de 91,0 % (71/78) et de 52,8% (42/78) respectivement.

Selon **Bensoussan et al., 2006**, la Sensibilité est en corrélation avec le nombre de copies de la région amplifiée. La PCR K13A/K13B est considérée comme la méthode la plus sensible pour le diagnostic de la leishmaniose en raison des 10.000 copies conservées des mini-cercles entre toutes les espèces de *Leishmania* (**Anders, 2003**).

Dans notre étude, nous avons utilisé la paire d'amorce K13A/K13B ; K13A (5'-GAG GGG GGG GTG CGT TCT-3') et K13B (5'-ATT TTC CAC CAA CCC CCA GTT-3'), ciblant l'ADN kinétoplastique (ADNk), cette amorce a été introduite par **Rodgers et al. en 1990 (Anders, 2003)**.

Cette amorce, et bien qu'elle répond aux critères de choix pour être utilisable, elle présente deux inconvénients majeurs:

Elle est très sensible 10 000 copies elle présente donc un grand risque de faux positifs (risque de contamination très élevé).

Elle est responsable de la formation de bandes aspécifiques et cela est dû à plusieurs facteurs, en particulier à l'amorçage au hasard.

La PCR a montré une positivité de 81,25% (39/48) dans notre série, dominant ainsi toutes les autres techniques utilisées. Cette positivité est relativement comparable à celle apportée par **Kone et al., 2011** au Mali où il a trouvé une positivité de 85,7% (12 / 14) mais ne concorde pas avec celle apportée par **Néffati et al., 2009** où elle était de 98,93(186/188) en Tunisie.

Dans notre étude la sensibilité de la PCR était de 82 %. Cette sensibilité ne s'accorde pas avec celle apportée par l'équipe de **Bensoussan et al., 2006** où ils ont trouvé une sensibilité de 98,7% mais elle est relativement comparable avec celle apportée par **Wang et al., 2011** qu'a été de 87.30%.

Pourmohammadi et al., 2010, apportent une sensibilité de 93.61% dans la LC, avec la paire d'amorce LINR4/ LIN17 ayant la même cible, les mini-cercles de l'ADNk, et **Shahbazi et al., 2008** trouvent 98,8%.

La PCR a confirmé le faible rendement des techniques classique (ED, culture et IFI), et elle a corrigé un nombre considérable de cas révélés négatifs au moins avec l'une des trois techniques, elle a positivé 23 cas en ED, 27 en culture, 32 en IFI et 10 en WB.

Les cas rectifiés peuvent être expliqués par plusieurs facteurs à savoir la faible charge parasitaire qui réduit les niveaux d'anticorps anti-*Leishmania*, l'ancienneté des lésions, les surinfections, le traitement reçus et les techniques de prélèvement (**Néffati et al., 2009 ; Wang et al. 2011**).

La positivité de la PCR est 81,25%, supérieure à celles obtenus par les différents autres techniques, où elles étaient 75% en WB (comparable à la positivité générale), 16,67% en IFI et dans l'ED, la culture est égale 41,67%. 27% respectivement.

La spécificité trouvée pour cette amorce est de 41,67%, plus faible comparative-ment à celle des autres techniques. Elle est identique à celle rapportée par **Rodgers et al., 1990** et qui est de 66,3% avec une sensibilité de 55%. **Paiva-Cavalcanti et al., 2010** rapportent une sensibilité et une spécificité de 100% et de 83,33% respectivement.

Cette différence en termes de positivité, sensibilité et spécificité peut être expliquée d'une part, par la taille de l'échantillon étudié, d'une autre part et selon **Maia et al., 2008** par la méthode d'extraction d'ADN, le matériel biologique et le protocole de PCR utilisé par chaque laboratoire.

Lachaud, 2002b a trouvé une sensibilité de 81% supérieure à l'IFI (15± 5 %) mais avec des spécificités identiques.

Manna et al., 2001 dans le sud de l'Italie, a obtenu 85,3% de résultats positifs par IFI et 93,7% par la PCR utilisant cette paire d'amorces K13A et K13B sur le sang périphérique des chiens infectés.

Papadopoulou et al., 2005 dans une enquête menée en Grèce utilisant la PCR ont décrit une prédominance des symptomatiques avec 12,6 % des cas contre 0,5% de sujets asymptomatiques. **Dedet et al., 1999** avaient déjà signalé la fréquence des personnes infectées asymptomatiques par rapport aux cas cliniquement patents (partie émergée de l'iceberg). Dans notre cas la PCR a révélé plusieurs cas positifs déclarés négatifs par les autres techniques, ceci est probablement en relation avec le fait que certains patients seraient asymptomatiques. Cette hypothèse devrait être vérifiée auprès des patients dans le cadre d'une enquête, chose pas faite par nos soins.

Marty et al., 2009 ont noté que ce portage asymptomatique détecté par le WB varie de 10 à 38 % selon les localités. Au Sud de la France la recherche faite sur des échan-

tillons de sang d'un centre de transfusion a montré que 13 % présentaient des anticorps anti-leishmanies et que 3 % contenaient de l'ADN parasitaire (**Dedet et al, 2009**).

La sensibilité flagrante du WB et de la PCR, apportée dans notre étude, prouve et démontre le grand apport de ces deux dernières dans le diagnostic de la LC. En effet le WB constitue un marqueur épidémiologique pour identifier tous les individus exposés ; la PCR kinétoplastique, grâce à sa sensibilité élevée, constitue également un outil plus performant dans les enquêtes épidémiologiques car elle ramène la preuve de la présence du parasite dans l'hôte (**Biglino et al, 2010**).

Conclusion

PDF Creator! 4 Trial
www.nuance.com

Conclusion

La leishmaniose cutanée constitue un problème de santé publique dans l'Ancien tout comme dans le Nouveau monde. Elle est largement rependue avec l'apparition de nouveaux foyers. En Algérie ; la LC est connue depuis longtemps sous ces deux formes classiques LCZ et LCN et récemment une troisième la LCU. Le diagnostic précoce est primordial pour une meilleure prise en charge et nécessite une détection précoce de l'infection, raison pour laquelle nous avons travaillé sur le développement d'un protocole qui combine différentes techniques afin d'avoir un outil de diagnostic performant.

Le manque de standardisation nous a mené à comparer cinq techniques de diagnostic directes et indirectes afin de chercher les techniques les plus fiables dans le diagnostic de la LC.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'examen direct et la culture, étant les techniques classiques et d'autres techniques performantes telles que les techniques sérologiques (IFI, WB) et moléculaires, qui sont sensibles et permettent, de plus, une détection rapide la présence de l'agent pathogène.

D'après les comparaisons entre ces différentes techniques l'IFI été la moins rentable de toutes les techniques de diagnostic. Par contre le WB a montré un rendement intéressant. Et enfin nous avons constaté que la PCR a dominé toutes les autres techniques avec sa sensibilité élevée.

Ces constatations nous mènent à dire qu'il serait judicieux d'abandonner l'IFI au bénéfice de la WB et probablement d'autres techniques sérologiques à titre d'exemple l'ELISA. L'idéal en effet est de combiner les techniques classiques ED et culture avec en parallèle WB et ou une autre technique sérologique fiable suivies par une PCR. Cette combinaison nous offre un outil de diagnostic sûr et optimisé et particulièrement rapide pour une décision de traitement précoce souvent nécessaire pour l'efficacité thérapeutique. Pour cela nous avons proposé le diagramme suivant :

Devant un cas suspecté d'une leishmaniose cutanée, on commence toujours par un examen direct (ED), et si ce dernier se révèle négatif on devra le compléter par une culture, en même temps on fait appel aux techniques sérologiques à savoir l'immunofluorescence indirecte (IFI) qui avec sa faible sensibilité et si elle nous donne un résultat positif, on devra le confirmer par une Polymerase Chain Reaction (PCR) pour plus de certitude.

En cas d'une PCR négatif, on exclut le diagnostic en considérant le cas comme un vrai négatif (VN).

Si l'IFI est négative le rôle de Western blot (WB) devient indispensable. En cas d'un WB négatif, on peut exclure le diagnostic tout en considérant le cas comme un vrai

négatif (VN), mais s'il est positif, il est nécessaire de refaire un ED, une culture et même une PCR.

Ce diagramme résume l'importance de techniques sérologiques et moléculaires dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée.

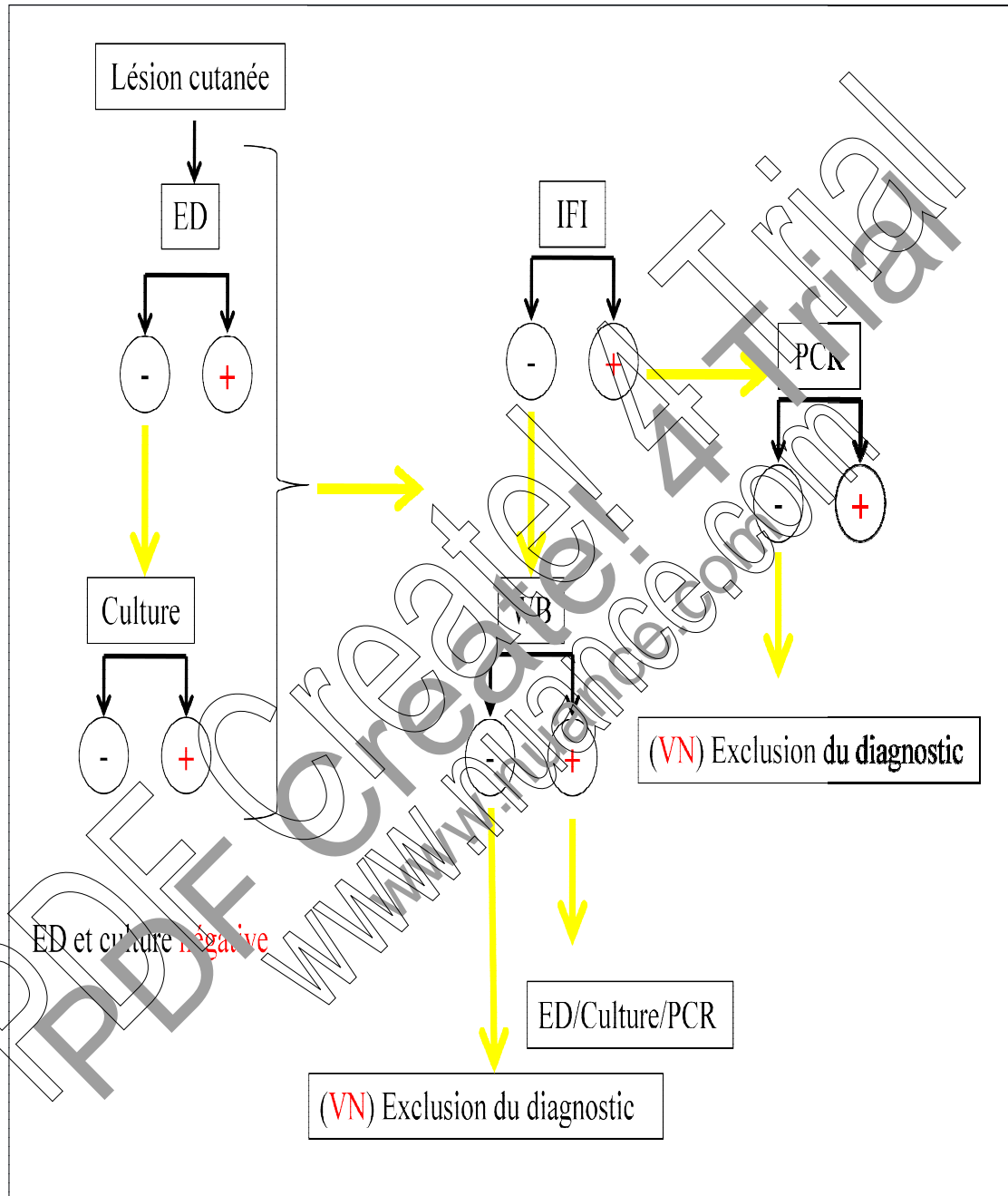


Figure 30 : Diagramme récapitulatif pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée.

Références bibliographiques

Bibliographie électronique

[http : //www.theses.ulaval.ca/2004/21419/ch01.html](http://www.theses.ulaval.ca/2004/21419/ch01.html)

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>

www.genedb.org

www.dpd.cdc.gov/dpdx

www.who.int/tdr

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com

Bibliographie

1. **Anonyme.** (2009). Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience Horizons* .
2. **Anonyme.** Simple Probabilistic Reasoning. 6.873/HST951 Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology HST.951J: Medical Decision Support
3. **Aoun K., Jeddi F., Amri F., Ghrab J., Bouratbine A.** (2009). Actualités épidémiologiques de la leishmaniose viscérale en Tunisie . *Médecine et maladies infectieuses* 39 , 775–779.
4. **Aubry P.** (2012). Leishmanioses Actualités . *Médecine tropicale* .
5. **Bachi F.** (2001). *Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en Algérie.* (Vol. p.111). Alger: thèse de Doctorat en science médicales.
6. **Bachi F.** (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'Infectiologie* , p.7.
7. **Barchiche Achour N., Madiou M.** (2008). Recrudescence des leishmanioses cutanées: à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathologie Biologie* , p.6.
8. **Barroso-Freitas A., Passos S., Mouta-Rofo E., Madeira M., Schubach A., Santos G.P.L., Nascimento L.D, Marzochi M.C.A.** (2009). Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence to the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 103,383—389.
9. **Bastien P., Blaineau C. and Pages M.** (1992). Leishmania: Sex, Lies and Karyotype . *Parasitology Today* , 174,197.
10. **Baubion E., Doutre M.-S., Beylot-Barry M.** (2008). Traitement de la leishmaniose cutanée par cryothérapie associée ou non au Glucantime® intralésionnel ; Service de dermatologie, hôpital du Haut-Lévêque, avenue de Magellan, France. *J. an. der*
11. **Belaizoug.S ; Dedet. Jean-Pierre ; Kamel. Addadi** -Les phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d'Algérie. *Entomologie médicale et Parasitologie. Algérie 1984, Vol 22, N 02 : pp 99-127.*
12. **Bouyer Jean.**(1996). Méthodes statistiques Médecine-biologie . *Aubin Imprimeur*, p354.
13. **Belhadj S., Toumi N.H., Dakhli H., Kallel K., Boussen N., Ben chaabane T., Chaker E.**(2002).La culture du sang peripherique comme moyen diagnostique de la leishmaniose viscerale : a propos de 61 cas.*Med Trop*,62 : 155-157.

- 14. Ben Ghazi M.A.** (2010). La leishmaniose viscérale de l'adulte (Étude de 18 observations en médecine interne). *Université SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH. Thèse en vue de l'obtention Doctorat en médecine* . FES.
- 15. Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M.** (2004). Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Belkaid Med Trop* , 64 : 381-38.
- 16. Bensoussan E., Naserddine A., Jonas F., Schnur L.F., Jaffe C.L.,** (2006). Comparaison des tests PCR pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée : *J Clin Microbiol* 2006 Avril; 44 (4): 1435-1439.
- 17. Berdjane Brouk Z., Remi N. Charrel , Boussad Hamrioui et Mezki Izri.** (2012). First detection of DNA in Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Parasitol Res* , 111:419–422.
- 18. Bessières M-H., Cassaing S., Berry A., Fabre R., Magnaval J-F.** (2005). Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des parasitoses Contribution of molecular diagnosis in clinical parasitology.
- 19. Biglino Cesare, Bolla Erika, Concialdi Anna, Triscioglio Angelo, Romano, Ezio Ferroglio** .Asymptomatic *Leishmania infantum* Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Non-endemic. *J. Clinical. Microbiology* 2010, Vol 48, N 01, pp 131–136.
- 20. Boelaert M., El-safi S., Jacquet P., De muynck A., Van Der Stuyft P., Le ray D.** (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 129–134.
- 21. Bogdan Christian, J. P.** (1998). The immune response to *Leishmania* : mechanisms of parasite control and evasion . *International Journal of Parasitology* , 28:121-134.
- 22. Boni M.; Bernard Davoust ; Jacques. Dereure** -Intéret des techniques de laboratoire dans le diagnostic de la leishmaniose canine. *Rev. Fran. Lab* 1999, Vol 310.
- 23. Boubidi SC, B. K.** (2010). *Phlebotomus sergenti* (parrot, 1917), vecteur confirmé de *Leishmania killicki* en Algérie. *Communications affichées 2010*, (p. P17).
- 24. Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R.; Arrar L.; Hamrioui B.; Harrat Z.** (2012). Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie . *Bull.Soc.Pathol.Exot.* , 105:30-35.
- 25. Boukraa S., Saïd-Chawki Boubidi, Jean-Yves Zimmer, Frédéric Francis, Eric Haubruge, Zohra Alibenali-Lounaci et Salaheddine Doumandji** (2011). Surveillance des populations de phlébotomes (Diptera: Psychodidae), vecteurs des agents responsables des leishmanioses dans la région du M'Zab-Ghardaïa (Algérie). *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* , 63, 97-101.

- 26. Bouratbine A., Aoun K., Gharbi M., Haouas N., Zaroui J., Harrat Z., Baba H. et Darghouth M.A.** (2005). Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques sur la leishmaniose générale canine en Tunisie . *Parasitologie* .
- 27. Briffod C.** (2011). Revue actuelle en matière de leishmaniose canine. *Université Paul-Sabatier de Toulouse. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire* .
- 28. Buffet P.** (2008). *Leishmania cutanée* . 98-395.
- 29. Camargo JB., Langoni H., Troncarelli MZ., Machado JG., Lucheis SB., Padovani CR.** (2010). Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* , pages 414-420.
- 30. Carré Nathalie, Marianne Collot, Pauline Guillard, M. Hilde Morellou, Jean-Pierre Gangneux.** (2010). La leishmaniose viscérale . *Journal de Pharmacie Clinique* , 121-48 .
- 31. Chargui N., Bastien P., Kallel K., Haouasa N., Mejaïdi F. Akrouf, Masmoudi A., Zili J., Chaker E., Dhahri Ben Othman A., Azaiez R., Crebu L., Mezhoud H., Babba H.**(2005). Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99:762—768.
- 32. Clémence Louis** (2009). *Leishmanioses Canine : ce que doit savoir le Pharmacien d'officine* . Université Henri Poincaré – Nancy 1. thèse en vue de l'obtention de Diplôme /Etat de Docteur en Pharmacie .
- 33. Costa Jean-Marc, Durand Remy, Deniau Michele, Rivollet Daniele, Izri Mohand, Houli Rene, Vidaud Michel, Bretagne Stephane.**(1996). PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Journal of clinical microbiology*, 1831–1833
- 34. Dedet J-P.** (1999). Les leishmanioses. *Edition marketing/Ellips* , pp. 9.
- 35. Dedet J-P.** (2001). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* , 11p.
- 36. Dedet. J-P.** (2009). Les leishmanioses en France métropolitaine. *Bulletin épidémiologique Spécial zoonoses 2009*, 38 : pp 9-13.
- 37. Delaunay, M. P., C. Fissore, Y., & fichoux, L.** (2007). La leishmaniose méditerranéenne due à leishmania infantum mise au point - intérêts des tests de diagnostic rapide: it-leish et id-pagia leishmaniasis. *Med Trop* , 67 : 79-85.

38.Desjeux P., Piot B., O’neill K., Meert J-P. (2001). co-infections a leishmania/VIH dans le sud de l’Europe ; *Med. Trop.*2001; **61** : 187-193.

39.De Toledo, J. S., Vasconcelos, E. J., & Ferreira, T. R. (2010). Using Genomic Information to Understand Leishmania Biology . *The Open Parasitology Journal* , 156-166 .

40.Diarra, S. S. (2008). Étude de l’incidence de l’exposition au parasite et les aspects épidémiocliniques de la leishmaniose cutanée en zone endémique de Barouéli (Kéména et Sougoula) Région de Ségou (MALI) . *Université de Bamako pour l’obtention du grade de docteur en Médecine* . Mali.

41.Djezzar-Mihoubi, I. (2005). Étude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire ben baddis de Constantine . *Thèse en vue de l’obtention du diplôme : Doctorat d’état es-microbiologie* .

42.Djezzar-Mihoubi, I., De Monbrison F., Romeuf N., Mouhahem T., Picot S. (2006). Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de constantine (Algérie). *Med Trop* , 66 : 39-4 .

43.Er-Rami M., Benjelloun S., Lahlou H., Khaloufi A., El Kartouti A., Zeroual A., Jakar A., El Haouri M.(2012). La leishmaniose cutanée à l’hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès (Maroc):a propos de 49 cas diagnostiqués entre 2005 et 2011. *Pathologie Biologie*,P5.

44.Estevez, Y. (2009). Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité. *Thèse de Docteur en Pharmacie*. Toulouse, France.

45.Famakan, K. (2005). La leishmaniose cutanée chez les patients recus a l’unité biologie du chien de janvier 2002 a octobre 2004. *Université de Bamako.Thèse. Pour l’obtention du grade de docteur en pharmacie* . Bamako, Mali.

46.Ferroglio .E; Centaro .E; Mignone.W; Trisciuglio. A - Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 2007, Vol 144. pp 162–166.

47.Filippi Christophe; Malherbe Laurent; Julia Valérie; Glaichenhaus Nicolas. (2001). L’immunité contre les leishmanies . *médecine/sciences* , 17 : 1120-8.

48.Fourati, E. (2011). Analyse des modalités d’adaptation aux effets sur la santé des . *Thèse en vue de l’obtention de la Licence appliquée en Protection de l’environnement dans la spécialité «Environnement et sécuritaire»* . Sidi Bouzid, Tunisie.

49.Gerlind Anders.(2003).PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and the West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies.

Pour l'obtention du grade de docteur en médecine. vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

50.Gomes Aparecida H.S., Armelin Izabel M., Menon Sueli Z., Pereira-Chiocola Vera L. (2008). *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 119:319–324

51.Hagardson. Karin .(2006).Comparison of DNA isolation methods to detect *Leishmania* parasites in blood samples- *Uppsala University. - Athens: Department for medical biochemistry and microbiology, 15 ects, 2006. - pp. 7-22.*

52.Harrat Z. et al.(23 – 24 Mai 2010). Conférence 26 Société Algérienne de Biologie Clinique. *Particularités écologiques et épidémiologiques du foyer de leishmaniose cutanée de Ghardaia*, (p. 2ème Congrès).

53.Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Douai M., Rioux J. A., Belkaid M. and Dedet J. P. (1996). *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria . *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine and hygiene* , 90,625-6.

54.Harrat Z. et Belkaid M. (2002). Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. . *6ème congrès international francophone de médecine tropicale "Santé et urbanisation en Afrique"* , p.3.

55.Hassam B., Senouci K., Bennouna-Briz F. (1991). La leishmaniose cutanée expérience du service de dermatologie d'Algerie - Kabat . *Médecine du Maghreb* , 37-38.

56.Hide M. (2004). Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania (Leishmania) donovani*, agent de la leishmaniose viscérale.Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique. *Universite de montpellier II.Pour l'obtention du grade de Docteur de l'universite de Montpellier II* . Franc.

57.Hubert D. (2006). Comment diagnostiquer la leishmaniose canine. *Le Point Vét* , 270, 54-57

58.Jugantobler, F. (2012). Engineered lactococcus lactis live vaccines against leishmania major. *McGill University, Montreal, Canada thèse pour l'obtention du grade de docteur en philosophie* . Canada.

59.Irwin Nina, A.Janssen Kaaren. (2001). *Molecular cloning A laboratory manual third edition* .New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

60.Ivens, Alasdair C.; Peacock1, Christopher S.; Worthey, Elizabeth A. et al. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major* . *Science* . , 436–442.

61.Izri A., Depaquit J., Parola P. (2006). Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Med Trop* , 66 : 429-435.

62. Izri Arezki; Belazzoug Smail. (2007). Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie . *Revue Francophone des laboratoires* , p.8.

63. Kallel K. L ., Ammari L. , Belhadj S. , Kaouech E. , Anane B.S ., Kilani B. , Chaker E. Portage asymptomatique de *Leishmania infantum* chez des malades tunisiens infectés par le VIH. *Pathologie Biologie* 2007, Vol 55 : pp 521–524.

64. Kazemi- Rad E., Mohebbali M., Hajjaran H., Rezaei S., Mamishi S.(2008). Diagnosis and Characterization of Leishmania Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health*, Vol. 37, No.1, pp.54-60.

65. Kaouech.E ; Kallel.K ; toumi N.H ; Belhadj.S ; anane. Babba H; Chaker.E .(2008). Pediatric visceral leishmaniasis diagnosis in Tunisia: comparative study between optimised PCR assays and parasitological methods. *J. Soc. Fran Parasitol. Paris* 2007,15: 143-150.

66. Kerr Sara f., Emmons louise h., Melby peter c., Liu chang, Perez luise., villegas maria, and Robert Miranda.(2006). *Leishmania amazonensis* infections in oryzomys acritus and oryzomys nitidus from Bolivia. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene?* 1069–1073.

67. Kone A.K., Delaunay P., Djimdé A.A., Tene a M.A. , Giudice P.D., Coulibaly D. Abathina A., Izri A., Marty P., Koumbo O.K., Traoré K., Goita S.M.(2011). Épidémiologie clinique et parasitologique de la leishmaniose cutanée dans cinq villages du Pays Dogon, Mali. *Zul. Soc. Pathol. Exot.*

68. Kothari Hema; Kumar Pranav; Saluja Rohit; Sundar Shyam; Singh Neeloo. (2007). Translation of open reading frame in kinetoplast DNA minicircles of clinical isolates of *L. donovani* . *Parasitol Res* , 100:893–897.

69. Kouato Bachir Souley. (2005). Evaluation du diagnostic par PCR directe et PCR-ELISA sur les LFB des trypanosomes pathogènes du bétail . *Universite Cheikh Anta Diop de Dakar. Thèse*

70. Lachaud Laurence; Chabbert Elisabeth; Du-bessay Pascal; Reynes Jacques; Lamothe Jacques; and Bastien Patrick. (2001). Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. *Journal Of Clinical Microbiology*, Feb , p.613–617.

71. Lachaud. Laurence; Sarah. Marchergui-Hammami; Elisabeth. Chabbert; Jacques Dereure; Jean Pierre.Dedet; Patrick.Bastien. (2002). Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Clini. microbiol* 2002 a, Vol 40, N 02: p.210-215.

72. Lachaud Laurence, Chabbert E., Dubessay P., Dereure J., Lamothe J., Dedet JP., Bastien P. (2002b) . Value of two PCR methods for the diagnosis of canine vis-

ceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology Cambridge University Press, Vol 125*: pp 197-207.

73. Laurent M. I. (2012). Développement d'outils chimiométriques pour l'étude des traitements anti-leishmaniens . *Université Paris-Sud 11 .Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur de l'université Paris-Sud .*

74. Leite R. S., Ferreira S. A., Ituassu T., Melo M. N., Andrade S. R. (2010). PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology* , 170 201–206.

75. Maia C., Campino L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection . *Veterinary Parasitology* 158 , 274–287.

76. Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone LM., Monte PD. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol* 2004, Vol 251, N°62; pp 123.

77. Manson-Bahr R., P.C. Peters W. et Killick-Kendrick. (1987). Diagnosis. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Clinical Aspects and Control. *Academic Press, London* , 703–729.

78. Marcos J. Marques; Angela C. Volpini; George L.L. Machado-Coelho; Jackson Machado-Pinto; Carlos A. da Costa; Wilson Mayrink; Odair Genaro; Alvaro J. Romanha. (2006). Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diag. Microbiol. Infec. Dis*, vol 54: pp 37–43.

79. Marty Pierre. (2008). Quelle procédure diagnostique pour quelle leishmaniose ? *.Parasitologie Mycologie.*

80. Marty P., Fontores-Estran C., Housseine L., Delaunay P., Haas H., Rosenthal E. (2009). Actualités sur les leishmanioses en France. *24es Journées annuelles du GPC* , 95s-100s.

81. Marty P., Delaunay P., Fissore C., Le Fichoux Y. (2007). La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum* mise au point - intérêts des tests de diagnostic rapide: it-leish et id-pagia leishmaniasis. *Med Trop* , 67 : 79-85.

82. McDonagh P. D., Myler P. J. and Stuart K. (2000). The unusual gene organization of *Leishmania major* chromosome 1 may reflect novel transcription processes . *Nucleic Acids Res* , 28, 2800-3.

83. Meghamla S. (2007). Caractérisation des protéasomes chez *Leishmania major*. *Université Montpellier II. Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes .*

84.Meredith S., Kroon N., Sondorp E., Seaman J., Goris M., Ingen C., Oosting H., Schoone G., Terpstra W., Oskam L. (1995). Leish- KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* , 33, 1742–1745.

85.Minodier P., Jurquet A.-L., Noël G., Uters M., Laporte R., Garnier J.-M. (2010). Le traitement des leishmanioses . 17:838-839.

86.Murray Henry. W, Jonathan. D Berman, Clive. R Davies, Nancy. G Saravia .(2005) .Advances in leishmaniasis. *TheLance 2005, Vol 366, N 29: pp11*

87.Myler PJ., Audleman L., deVos T., Hixson G., Kiser P., Lemley C., Magness C., Rickel E., Sisk E., Sunkin S., Swartzell S., Westlake T., Bastien P., G., Ivens A., Stuart K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein coding genes. *Proc Natl Acad Sci US.* , 96, 2902-6.

88.Nadau, Quitterie, Laure, Odette, Christel. (2005). Étude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le test d'intradermo-réaction de la leishmaniose canine . *École Nationale Vétérinaire de Toulouse.Thèse en vue de l'obtention Docteur vétérinaire .*

89.Neffati A., Kallel K., Anene S., Kaouech E, Belhadj S, Ennigrou S., Chaker E. (2009). Choix des amorces: élément de marqueur dans le diagnostic moléculaire de la Leishmaniose cutanée . *Pathologie Biologie* . p.5.

90.Nicolas L., Prina E., Lang T., Milon G. (2002). Real-Time PCR for detection and observations . *Médecine du Meurr b.*

91.Odonne G. (20 0). Approche ethnopharmacologique comparative des traitements phytothérapeutiques de la leishmaniose en Amazonie. *Thèse pour obtenir le grade de Docteur en chimie des substances naturelles.* Cayenne .

92.Quellec Marie : Olivier Martin; Sato Sachiko et Papadopoulou Barbara. (2003). Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *M/S : médecine sciences* . p. 100-109. Manson-Bahr P.C. Peters W. et Killick-Kendrick (1987). Diagnosis. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine. Clinical Aspects and Control. Academic Press, London* , 703–729.

93.Paiva-Cavalcanti; M. Regis-da-Silva CG; Gomes. YM .(2010).Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection.*The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, Vol 16, N 04: pp 537-542.*

94.Papadopoulou C., Kostoula A., Dimitriou D., Panagiou A., Bobojianni C., Antoniadis G. (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection* , 50,53–60.

95.Pourmohammadi B., Motazedian MH., [...], and Sarkari B.(2010).Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis . *Iran J Parasitol*, 5(4): 1–8.

96.Rapp C., Roué R. (2001). Leishmanioses. *AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine* , 4-1310.

97.Reithinger. Richard; Bronwene. Lambson; Douglas. C; Barker and Clive R. Davies .(2000).Use of PCR to Detect *Leishmania (Viannia) spp* in Dog Blood and Bone Marrow.*journal of clinical microbiology 2000, Vol 38, N 02: pp 748–751.*

98.Riera.C; Fisa.R ; Udina.S; M. Gállego; M. Portus,M - Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans. Ro. Soc. Trop. Med. Hyg 2004, Vol 98 : pp 102-110.*

99.Rodgers. MR; Popper. SJ; Wirth. DF - Amplification of Kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol 1990, Vol 71, N 03: pp 267-75.*

100.Rodrigues Eduardo Henrique Gomes, Maria Edileuza Felintode Brito, Mitz iGuedes Mendonca, Roberto P.Werkhauser, Erican M.Coutinho, Wayner V. Souza,Maria de Fatima P. Militao de Albuquerque, Marcio L. Jardim, and Frederico G.C. Abath. (2002). Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil.*Journal of clinical microbiology*.p.3572–3574.

101.Sabbahi R. (2006). La mouche des sables joue-t-elle un rôle dans la leishmaniose ? . *Bulletin de la société d'entomologie du Québec* , p.5.

102.Safi S., Tati Z., Adnaoui M., Mohattane A., Aouni M., Maaouni A., Bennani A., Berbich A. (1996). La leishmaniose viscérale de l'adulte étude de 7 observations, *Médecine du Maghreb*, n°59.

103.Schellig L., Schoone G., Beijer E., Kroon C., Hommers M., Ozbel Y., Ozerbay S., Silva E., Cardoso L., Silva E. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet. Parasitol.* , 109, 1–8.

104.Solano-Gallego Laia, Rossi Luca, Scroccaro Anna Maria, Montarsi Fabrizio, Caldin Marco, Furlanello Tommaso et Trotta Michele. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. (s.d.). *Parasites & Vectors*;5:98.

105.Talia Santana Machado de Assis, Rachel Basques Caligorne, Gustavo Adolfo Sierra Romero, Ana Rabello. (2008). Detection of *Leishmania* kDNA in

human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , p.4.

106.Tamar S., Dumas C. and Papadopoulou B. (2000). Chromosome structure and sequence organization between pathogenic and non-pathogenic *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* , 401-414.

107.Toumi A., Kilani B., Ammari L., Tiouiri H., Kanoun F., Belhadj S., Chaker E. et Ben Chaabene T. (2006). Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques de la leishmaniose viscérale de l'adulte à l'hôpital de la Rabta à Tunis (Tunisie) entre 1983 et 2002. *Santé publique* , p.5.

108.Troncarelli Marcella Zampoli, Camargo Janaina Biotto, Machado Juliana Giantomassi, Lucheis Simone Baldini, Langoni Helio.(2009)*Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and non endemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*,118–125.

109.Tulasne L. (2009). Actualités dans la lutte contre la leishmaniose canine . *Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort* .

110.Van Eys. Gj; Gerard. Schoone; Nel C.M. Kroon; Saskia B. Ebeling - Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992, Vol 51: pp 133-143.

111.Wang Jun-Yun, Ha Yu, Gao Chun Hua, Wang Yong, Yang Yue-Tao, and Chen Hai-Tang. (2011). The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. *Parasites & Vectors* , 4:69.

112.Wincker P.; Raye C.; Elaineau C.; Pages M.; Jauffret Y.; Dedet J-P. and Bastien P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species . *Nucleic Acids Research* , 1688–1694.

113.Zait Hourii, Hamrioui Bousaad. (2009)Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 380 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue française de microbiologie des laboratoires*, 33-39

114.Zougaghi L., Moutaj R., Chabaa L., Agoumi A. (2009).Leishmaniose viscérale infantile: profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. *Archives de pédiatrie*, 1513–1518.

Annexes

PDF Creator! 4 Trial
www.nuance.com

Annexes

Annexe 1 : Réactifs nécessaire pour la PCR.

Réactifs de l'extraction	Réactifs de l'amplification	Réactifs de l'électrophorès
Tween 20, Nonidet (NP 40), NaOH10N, Tris 1M, Protéinase k (20mg/ml), Pronase (20mg/ml), Phénol/chloroforme /isoamylalcool, Chloroforme, Isopropanol, Éthanol absolu, Acétate de sodium 3M, Eau distillée stérile et filtrée, Eau physiologique 9%, PBS pH 7, 4, QIAamp DNA Blood Mini kit (KIT Qiagen), EDTA 10 Mm.	Amorces K13A/K13B, dNTP, Taq polymérase, Tampon 10x, MgCl ₂ .	TAE, Agarose, Bleu de bromophénol, Bromure d'éthidium, Marqueur de taille.

Annexe 2 : Consommable et appareillage

Consommable	Appareillage
Gants propres, Eppendorf (0,2µl et 1,5µl), Portoir Eppendorf pour tube 10 ml, Tube gélifié, Tube EDTA, Parafilm, Tube conique 50 ml, Pipettes, Micropipette, Papier aluminium, Des lames, Des lamelles, Vaccinostyle, Aiguilles, Cuve, Embouts.	Microscope optique, Hôte, Ultracentrifugeuse, Centrifugeuse, pH-mètre, Bain-marie, Balance de précision, Etuve, Thermocycleur, Cuve de migration, Support de coulage, Peigne, Microonde, Agitateurs, Appareil photo.

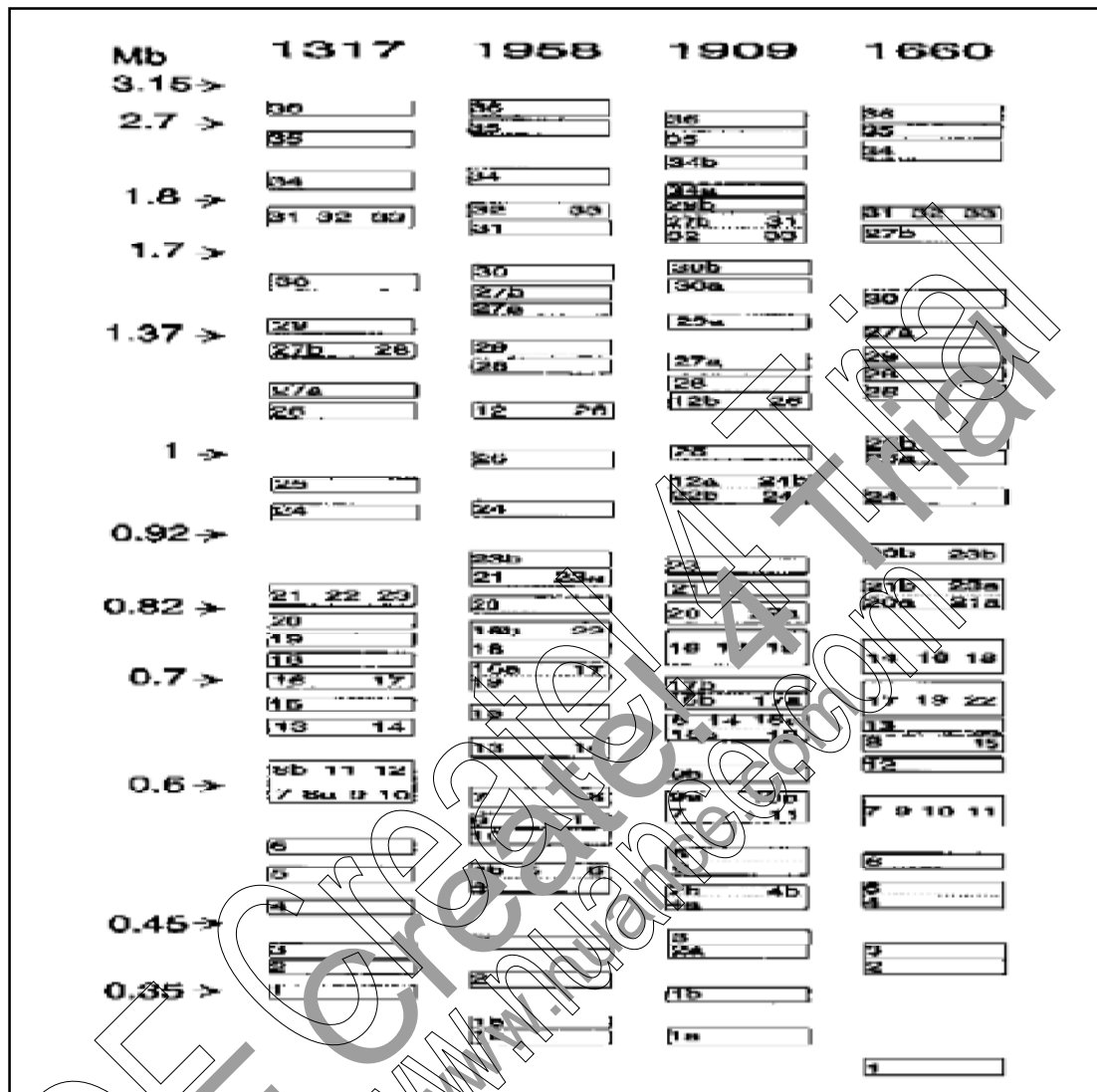
Annexe 3 : Code d'espèce.

La technique isoenzymatique caractérise chaque isola de leishmanie par un code international O.M.S. unique qui lui est propre. Par exemple, le code O.M.S. de la souche de référence de *Leishmania infantum* LEM75 est MHOM/FR/78/LEM75. Ce code se compose de 4 informations à savoir, le type d'hôte sur lequel a été isolé le parasite (MHOM = Homme), le pays d'origine (FR =France), l'année d'isolement (78) et enfin le nom donné à l'isolat (LEM75) (M. Hide, 2004).

Annexe 4: Photos de distinctes lésions de la LC (Photos originales).

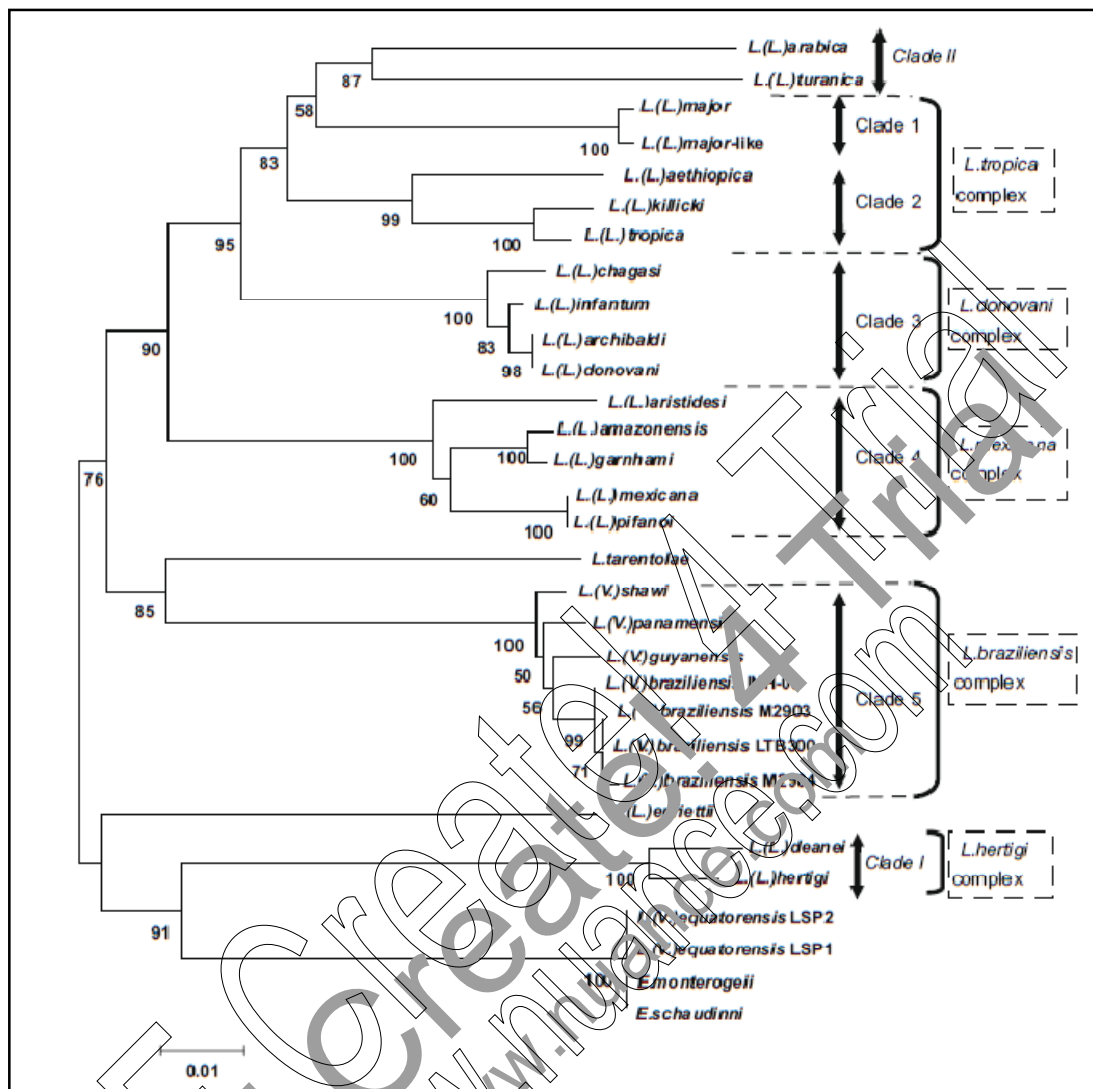


Annexe 5: Représentation schématique de caryotype moléculaire de quatre espèces de *Leishmania*.



Représentation schématique de caryotype moléculaire de quatre espèces de *Leishmania*. *L.infantum* (LEM 1317), *L.major* (LEM1958), *L.tropica* (LEM1909) et *L.aethiopica* (LEM 1660). Chaque rectangle présente une bande chromosomique, avec à l'intérieur, le numéro des chromosomes correspondants. Lorsque deux chromosomes homologues d'une même souche se différencient dans la taille, ils sont indiqués par "a" et "b". Le marqueur de taille moléculaire à gauche correspond aux chromosomes de *S.cerevisiae* et *H.wingei* (P.Wincker et al, 1996).

Annexe 6: Taxonomie des leishmanies d'après l'analyse du gène cytochrome b.



Taxonomie des leishmanies d'après l'analyse du gène cytochrome b (Yutaka Asato et al, 2009). Les parenthèses et les lignes pointillées représentent les complexes de *Leishmania* comme décrits par Lainson et Shaw (1987). Les flèches représentent les phylums formés et basés sur l'analyse du gène Cyt b. les phylums étiquetés par les chiffres arabes sont des leishmanies pathogènes pour l'homme.

Annexe 5: Résumé du genome de *L.major* (Ivens et al, 2005).

Parameter	Number
The genome	
Size (bp)	32,816,678
G+C content (%)	59.7
Chromosomes	36
Sequence contigs	36
Percent coding	47.9
Protein-coding genes	
Genes	8272
Pseudogenes	39
Mean CDS length (bp)	1901
Median CDS length (bp)	1407
G+C content (%)	62.5
Gene density (genes per Mb)	252
Intergenic regions*	6
Mean length (bp)	215
G+C content (%)	57.5
RNA genes	
tRNA	83
rRNA [†]	13
siRNA [†]	63
snRNA	6
snoRNA	695
srpRNA	1
* Region between protein-coding CDS.	
† The exact number cannot be determined because of misassembly.	

Annexe 6: Mécanismes d'échappements de *Leishmania*. (cité par C. Bogdan et M. Röllinghoff,1998).

Strategy	Mechanism	Example
Alteration of the host complement system	Inactivation of complement components by phosphorylation (C3, C5, C9) Shedding of the lytic membrane attack complex (C5b-C9) Protease-catalysed conversion of C3b to C3bi on the parasite surface → parasite uptake by macrophages via CR3	Leishmanial protein kinases (LPK-1, c-lpk2) (<i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i>) <i>L. major</i> promastigotes gp63 metalloproteinase
Protection against antileishmanial products	Invasion of host cells lacking leishmanicidal effector mechanisms ("safe targets") Inhibition of phagolysosomal fusion Inhibition of degrading phagolysosomal enzymes Scavenging of reactive oxygen intermediates Transformation into amastigotes	Immature or stromal macrophages, Langerhans cells, dermal or lymph node fibroblasts <i>L. donovani</i> LPG gp63 LPG; leishmanial superoxide dismutase Enhanced resistance against low pH, H ₂ O ₂ , NO, lysosomal enzymes All <i>Leishmania</i> spp.; LPG; gp63
Suppression of the synthesis of anti-leishmanial products	Inhibition of oxidative burst (abnormal PKC activation) Inhibition of iNOS expression or activity	<i>L. major</i> parasite: GPIs; phosphoglycan; KMP-113
Cytokine modulation	Induction of cytokines inhibiting/deactivating macrophages Suppression or lack of induction of activating cytokines	Modulation of TGF- β by <i>L. braziliensis</i> ; differential induction of IL-10 by DCL and LCL <i>L. esmeroyana</i> Impaired IL-1/TNF- α production by <i>L. donovani</i> -infected macrophages; lack of IL-12 expression in <i>L. major</i> infected macrophages
Inhibition of antigen-presentation and T cell stimulation	Suppression of MHC class II expression Internalization and degradation of MHC class II expression Downregulation or lack of induction of B7-1 Inhibition of antigen processing, peptide loading of MHC molecules Sequestration of <i>Leishmania</i> mastigote antigens from presentation	<i>L. donovani</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> , <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. mexicana</i>
Alteration of T cell differentiation/function	Induction of a disease-exacerbating T cell response (Th ₁)	Induction of an early IL-4 peak by the <i>L. major</i> LACK antigen; counter-protective T cell epitopes (<i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i>)

Préparation des réactifs :

Annexe 8: preparation de Giemsa.

- 1g de Giemsas Azur-Eosin-Methylen bleu
- 54 ml Glycérol
- 84ml méthanol

La préparation :

Dans un mortier, on dissoudre 1g de Giemsa Azur-Eosin-Methylen bleu par 54ml Glycérol (l'ajout de la quantité peu à peu avec écrasement des petites grains) et fusionner par 84ml méthanol (additionner en deux fois) , agiter bien par un agitateur pour fondre la poudre ensuite filtrer la solution 3fois par filtre triple à chaque fois puis incubé dans l'étuve environ 15jours .

Annexe 9: Préparation de l'Éthanol 70° .

Pour préparer l'éthanol 70°, et selon la table de mouillage de l'alcool, ajouter 40,85ml d'eau distillée à 100ml d'éthanol 96%, ou 47,75ml d'eau distillée à 100ml d'éthanol 100%.

Préparation des tampons :

Annexe 10: PBS 7,2

Dissoudre un flacon du PBS base dans un litre (1L) d'eau distillée .La conservation se fait dans un frigo.

Annexe 11: Tampon de lyse TNNT

TNNT = TNN (NaOH + Tween20 + Nonidet NP) + 10µl Tris1M

10µl de NaOH (10mM)

50µl de Tween 20

50µl de Nonidet NP.

Préparation :

On mélange dans un bécher le Na OH, le Tween20 et le Nonidet NP et on complète jusqu'à 100ml, par 989ml d'eau distillée puis on ajoute 10µl de Tris 1M pH 7,2.

Annexe 12: Tampon TE (Tris/EDTA) , ajuster le pH à 8 par le NaOH 100%

[Tris (hydroxyméthyl) aminométhane] 1 mol/l (121 g).

EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique) 1 mol /l (292 g).

Annexe 13: TAE(Tris/Acétate/EDTA).

Pour préparé 100 ml de TAE :

24,2g de Tris base 2M

5,71ml Acide acétique

10ml EDTA 0,5M

84,29 ml d'eau distillée pour complété la quantité à 100ml.

Annexe 14: Préparation de gel de migration.

20ml de TAE

980ml eau distillée

TAE : 20ml de TAE complété jusqu'à 1000ml par l'eau distillée.

2% Agarose (2g) → 100ml Tampon TAE dilué

4g → 200ml Tampon TAE dilué

Préparation de gel :

Fondre complètement la quantité d'agarose (4g) dans le tampon TAE (200ml) par une micro-onde pendant 2' environ (le gel devient translucide). Rajouter 10µl de BET puis laisser la solution à refroidir en quelque minute.

Annexe 15: Bromure d'éthidium

C'est un composé organique aromatique possédant un ammonium quaternaire, c'est un produit dangereux qui doit être manipulé avec précautions. Les résidus doivent être éliminés comme un déchet dangereux. Le bromure d'éthidium ayant la faculté de se lier à l'ADN, possède un effet mutagène important et pourrait être également cancérigène et tératogène par ses effets d'hyperalation. Il est couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires

de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

BET

$V_1 = ?$ $C_1 = 10\mu\text{g/ml}$

$V_2 = 200\text{ml}$ $C_2 = 0,5\mu\text{g/ml}$

$0,5 * 10 / 10 = 10\mu\text{l}$ de BET (0,5mg/ml) pour 200ml d'Agarose.

Annexe 16: Préparation du moule pour couler le gel :

Après avoir obturé les deux extrémités du moule avec un scotch, placer le moule sur une surface bien horizontale et disposer dans les encoches prévues à cet effet les peignes nécessaire à la réalisation des puits dans le gel, Il faut qu'ils soient au minimum à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.

Annexe 17: Coulage du gel :

Verser lentement le gel dans le moule sans dépasser le niveau supérieur des dents du peigne.

Laisser refroidir à température ambiante 30 mn environ avant d'enlever délicatement les peignes. Les puits sont alors prêts pour recevoir les dépôts d'ADN et le scotch fermant la cuve peut-être enlevé.

Annexe 18: Mise en place du gel dans la cuve

Découper le gel selon le nombre de puits qui est en fonction du nombre d'échantillons. Les puits sont placés du côté de la cathode et la cuve est remplie de tampon TBE jusqu'au niveau supérieur du gel.

Le reste du gel non utilisé, peut être conservé à +4°C plusieurs jours en prenant le soin de l'emballer dans un film plastique rapidement, avant qu'il ne perde trop d'eau par évaporation.

Annexe 19: Caractéristiques de la PK et la pronase.

La pronase et la protéinase K sont des enzymes protéolytiques spécifiques de l'hydrolyse de liaisons peptidiques entre acides aminés particuliers, elles ont été utilisées dans l'extraction d'ADN (www.roche-appli-science.com/support).

Caractéristiques	Protéinase K	Pronase
Tm optimal	25 à 65°C	40 à 60°C
Temps	minimum 2h	2h
Ph	7,5	7,5
Conservation	(-15 à -25°C) pendant une année	(-15 à -25°C) pendant une année
Stabilité de la forme lyophilisée	(+2 à +8°C)	(+2 à +8°C)
Solubilité	20mg/ml	10 à 20mg/ml
Dénaturation	>65°C	80°C
Poids moléculaire	28930 Da	20 000 à 60 000 Da

Annexe 20: Préparation des différents milieux de culture.

Milieu albumen-urine (AU)	Milieu vitellus-urine (VU)	Milieu RPMI (avec L-glu)	Milieu RPMI (sans L-glu)
Blanc d'œuf recueilli aseptiquement + 40% d'urine	Blanc d'œuf recueilli aseptiquement + 40% d'urine	1,64g de RPMI poudre a L-glu	Flacon de RPMI poudre sans L-glu
↓	↓	↓	↓
Agitation manuelle simple	Agitation manuelle simple	Fonte dans 90ml d'H ₂ O _{DS}	Fonte dans 800ml d'H ₂ O _{DS}
↓	↓	↓	↓
Addition de l'antibiotique	Addition de l'antibiotique	Addition de 10% (10ml) de SVF	Addition d'un flacon de SVF puis un flacon de L-glu
↓	↓	↓	↓
Distribution dans des tubes pyrex stériles à raison de 5m/tube	Distribution dans des tubes pyrex stériles à raison de 5m/tube	Ajout de 4-5 gouttes d'ATB (pénicilline-streptomycine)	Ajout d'1ml d'ATB (pénicilline-streptomycine)
↓	↓	↓	↓
Solidification au bain marie en position inclinée.	Solidification au bain marie en position inclinée.	Agitation par agitateur magnétique pdt 30'	Agitation a l'aide d'un agitateur magnétique pdt 30'
		↓	↓
		Distribution dans des tubes pyrex a vis stériles à raison de 5-6ml	Distribution dans des tubes pyrex a vis stériles a raison de 5-6ml

La conservation se fait a +4° pendant un mois.

Annexe 21: Les composants de MIX de l'amorce K13a/K13b selon le Protocol S. Kerr 2006.

Constituants	Concentration initiale	Concentration finale*	Volume prélevé pour 1 PCR
Tampone X10	10x	1µl	5µl
MgCl ₂	2,5Mm	1,5mM	3µl
dNTP Mm	10mM	200µM	1µl
Amorce S	20mM	0,4µM	1µl
Amorce R	20Mm	0,4µM	1µl
Taq poly U/µl	5U	1,5U	0,3µl
H ₂ O			28,7µl
ADN		10µl	10µl
Total			50µl

* : concentrations utilisées dans le protocole S.Kerr 2006.

Annexe 22: Conditions d'amplification selon le protocole S.Keer 2006.

Protocoles	Keer 2006
Dénaturation initiale	94°C 5 mn
Dénaturation	94°C 60 sec
Hybridation	65°C 60 sec
Extension ou Elongation	72°C 90 sec
Elongation finale	72°C 7 mn
Nombre de cycles	30

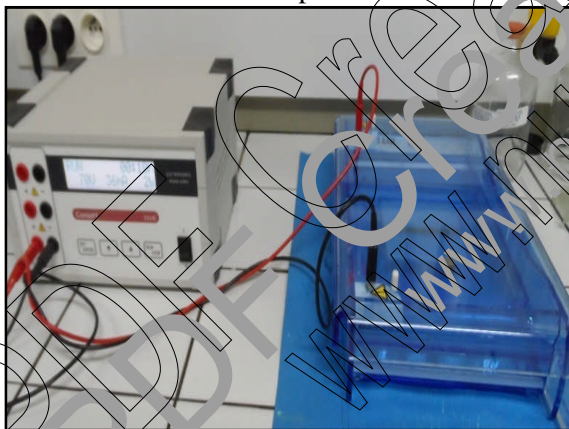
Annexe 23: Photos d'appareillages (Photos originales)



Microscope à UV



Ultracentrifugeuse



Générateur



Thermocycleur



Agitateur magnétique



Centrifugeuse

PDF Create! 4 Trial
www.nuance.com