

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

Etudes des différents aspects épidémiologiques de la
leishmaniose canine de l'Algérois

Date de soutenance : 15-09-2022

Présenté par : M^r Menad Mehdi

Devant le jury :

Mme Chelghoum H.	MAA/USDB1	Présidente
Mme Challal N.	MAA/USDB1	Examinatrice
Mme Benikhlef R.	CR/IPA	Promotrice
Mme Eddaikra A.	MAA/USDB1	Co-promotrice

Promotion 2021-2022

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à la directrice de ce mémoire, Dr Benikhlef Razika pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je tiens à remercier spécialement Dr Eddaikra Naouel, qui fut la première à me faire découvrir le sujet qui a guidé mon mémoire.

Un grand merci à ma Co promotrice Dr Eddaikra Atika pour ses conseils et son apport pour mon travail.

Je désire aussi remercier les professeurs de l'université de Blida, qui m'ont fourni le savoir nécessaires à la réussite de mes études universitaires.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers Toutes l'équipe du Laboratoires d'éco épidémiologies parasitaires de l'institut pasteur d'Algérie pour leur bienveillance et leur gentillesse durant toute la période de mon stage pratique

Je te tiens à remercié les membres du Jury pour avoir honoré l'examinassions de ce travail

DEDICACES

Je Dédie ce modeste travail comme témoignage d'affection, de respect et d'admiration

A MES CHERS PARENTS Pour tout l'amour que vous m'avez donné, pour tout ce que vous avez fait pour moi, je ferais de mon mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir.

A Ma Sœur et Ma Grand-mère et Toutes Ma Famille Pour leurs soutiens indéfectibles durant toute cette année je vous remercie du fond du cœur

A MES AMIS Amine, Smail,, Fodil, Abderrahmane, Pour Leurs Encouragements et à qui je souhaite plus de succès

Liste des Figures

Figure 1: Formes de Leishmania : à gauche la forme amastigote, à droite la forme promastigote.....	5
Figure 2 : Classification de <i>Leishmania</i>	8
Figure 3 : Phlébotomes Femelle	9
Figure 4 : le cycle évolutif de la leishmaniose	11
Figure 5 : Répartition géographique de diverses <i>Leishmania</i> spp. ; Phlébotomes et réservoirs animaux dans l'Ancien et le Nouveau Monde).....	12
Figure 6 : Répartition géographique des leishmanioses dans le monde	14
Figure 7 : Cas de leishmanioses viscérales anthroponotiques ou Kala azar.	15
Figure 8 : Leishmaniose cutanée	16
Figure 9 : A gauche chancres d'inoculation après morsures de phlébotomes. A droite lésion ulcérate en voie de guérison sur un chien atteint de leishmaniose.	18
Figure 10 : Distribution des Isolats sélectionnés dans les wilayas d'Alger et Tizi-Ouzou	21
Figure 11 : A gauche Boite et tiges contenant les souches a droite Fut d'azote liquide	23
Figure 12 : Culture de leishmanies sur tubes RPMI et NNN	24
Figure 13 : Tubes eppendorf contenant les culots parasitaires dédiés a l'extraction	25
Figure 14 : Préparations du mix.....	28
Figure 15 : Introduction des amplifias dans les puits du gel d'agarose 1%.....	29
Figure 16 : Observation de la souche LIPA2091 sous le microscope optique Gr×40. A gauche le premier jour de décongélation, à droite après 7 jours du premier repiquage sur NNN.....	33
Figure 17 : Observation de la souche LIPA2091 sous le microscope optique Gr×40. A gauche le premier jour de décongélation, à droite après 7 jours du premier repiquage sur NNN.....	34
Figure 18 : Distribution Géographique des 3 zymodèmes des souches canines appartenant à <i>L. infantum</i> au nord de l'Algérie.....	37
Figure 19: Profils de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR-ITS1	38
Figure 20 : Profils de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR-Hsp70	39
Figure 21: Milieu NNN Figure 22 : RPMI 1640.....	52

Liste des Tableaux

Tableau I: Profil électrophorétique des souches de *Leishmania* typées36

Tableau II : Les Tailles de bandes censées être obtenue apres la digestion enzymatique par HaeIII.....40

Liste des Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucleique
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ARN: Acide Ribonucleique
HCL: hydrochloric acid
HSP 70 : Heat Shock Protein
IPA : Institut pasteur d'algerie
ITS1 : Internal transcribed spacer
LC : Leishmaniose Cutanée
LCan : Leishmaniose Canine
LCL : **Leishmanioses** Cutanées Localisées
LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuses
LV : Leishmaniose Viscerale
LVA : Leishmaniose Viscerale anthroponotique
LVH : Leishmaniose Viscerale Humaine
MLEE: multilocus enzyme electrophoresis
MLMT: multi-luminance mobility test
NADH: nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)
NNN : Novy–MacNeal–Nicolle
OMS : Organisation Mondial de la Santé
PCR: Polymerase Chain Reaction
PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PH: Potential Hydrogen
PK: Protein Kinase
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SVF : sérum de veau foetal
TAE : Tris, Acétate, EDTA
UV : ultraviolet

Résumé

La leishmaniose à *Leishmania infantum* est une parasitose due à un protozoaire flagellé et transmise à son hôte par un insecte vecteur, le Phlébotome. Le chien est la principale espèce parasitée par *L. infantum* et constitue son principal réservoir. S'agissant d'une zoonose, l'homme peut être lui aussi infecté.

En Algérie, la LCan constitue un problème de santé publique. Vu le potentiel zoonotique de la maladie, il est important de contrôler l'infection chez le chien réservoir pour prévenir la leishmaniose viscérale zoonotique humaine mortelle en absence de traitement et la leishmaniose cutanée sporadique qui laisse des cicatrices indélébiles.

Les souches canines utilisées dans ce travail proviennent de la cryo banque du LEEPGP de l'IPA. Trois zymodèmes MON-1, MON-80 et MON-34 de plusieurs régions d'Alger et de Tizi-Ouzou ont été sélectionnés pour identification moléculaire par PCR-ITS1 et PCR-Hsp70.

La PCR-RFLP du gène ITS1 à confirmer les résultats du typage iso enzymatique longtemps utilisés dans la caractérisation taxonomiques des espèces de *Leishmania*. Cependant il n'a pas pu révéler une discrimination des différents variant généralement rencontrés chez *L. infantum* de l'Algérie, nécessitant de cibler d'autres marqueurs moléculaires comme la HSp70.

Mots clés : leishmaniose canine, MLEE, ITS1, HSP70, épidémiologie, Algérie

Abstract

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is a parasitosis caused by a flagellate protozoan and transmitted to its host by an insect vector, the sandfly. The dog is the main species parasitized by *L. infantum* and constitutes its main reservoir. Being a zoonosis, humans can also be infected.

In Algeria, CanCL is a public health problem. Given the zoonotic potential of the disease, it is important to control the infection in the reservoir dog to prevent zoonotic human visceral leishmaniasis which is fatal in the absence of treatment and sporadic cutaneous leishmaniasis which leaves indelible scars.

The canine strains used in this work come from the IPA LEEPGP cryobank. Three MON-1, MON-80 and MON-34 zymodemes from several regions of Algiers and Tizi-Ouzou were selected for molecular identification by PCR-ITS1 and PCR-Hsp70.

PCR-RFLP of the ITS1 gene confirmed the results of iso-enzymatic typing long used in the taxonomic characterization of *Leishmania* species. However, it could not reveal a discrimination of the different variants generally encountered in *L. infantum* from Algeria, requiring the targeting of other molecular markers such as HSp70.

Keywords: canine leishmaniasis, MLEE, ITS1, HSP70, epidemiology, Algeria

ملخص

داء الليشمانيات الناجم عن الليشمانية الطفيلية هو طفيلي يسببه طفيلي سوطي ينتقل الى مضيفه عن طريق ناقل الحشرات . ذبابة الرمل . الكلب هو النوع الرئيسي الذي يتطفل عليه *L.infantum* ويشكل خزانه الرئيسي. كونه مرض حيواني المصدر ، يمكن أن يصاب البشر أيضاً

في الجزائر ، تعتبر LCan مشكلة صحية عامة. بالنظر إلى الإمكانيات الحيوانية المصدر للمرض ، من المهم السيطرة على العدوى في الكلب المستودع للوقاية من داء الليشمانيات الحشوي البشري الحيواني الذي يكون قاتلاً إذا ترك دون علاج وداء الليشمانيات الجلدي المتقطع الذي يترك ندوباً لا تمحى.

سلالات الكلاب المستخدمة في هذا العمل تأتي من بنك الجليد IPA LEEPGP تم اختيار ثلاثة أنواع من أنظمة Zymodemes MON-1, MON-80, MON-34 من عدة مناطق من الجزائر العاصمة وتيزي وزو لتحديد الهوية الجزيئية بواسطة PCR-ITS1 و PCR-Hsp70

أكدت PCR-RFLP لجين ITS1 نتائج الكتابة الإنزيمية المتساوية المستخدمة منذ فترة طويلة في التوصيف التصنيفي لأنواع الليشمانيا. ومع ذلك ، فإنه لا يمكن أن يكشف عن تمييز بين المتغيرات المختلفة التي تمت مواجهتها بشكل عام في الجزائر ، مما يتطلب استهداف الواسمات الجزيئية الأخرى مثل Hsp 70

الكلمات المفتاحية: داء الليشمانيات الكلاب ، MLEE ، ITS1 ، HSP70 ، علم الأوبئة

Sommaire

Liste des Figures	4
Liste des Tableaux	5
Liste des Abréviations	6
Résumé	7
Introduction	1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES.....	3
1 Epidémiologie	4
1.1 Agent Pathogène.....	4
1.1.1 Morphologie	4
1.1.2 Génome de <i>Leishmania</i>	5
1.1.3 Classification	7
1.2 Les Vecteurs	8
1.3 Réservoirs	9
1.4 Cycle Parasitaires	10
1.5 Répartition géographique	11
1.5.1 Dans le monde	11
1.5.2 En Algérie.....	13
1.6 Formes clinique de la leishmaniose	15
1.6.1 La leishmaniose humaine.....	15
1.6.2 La Leishmaniose canine	16
1.7 Traitement	18
1.8 Prévention et contrôle	18
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	20
2 Matériels.....	21
2.1 Matériels non biologique	21
2.2 Matériels biologique	21
2.3 Méthodes	22
2.3.1 Culture des parasites	22
2.3.2 Extraction de l'ADN par Phénol chloroforme iso-amylque	25
2.3.3 La PCR (Polymérase Chain reaction)	26

2.3.4	Mode Operatoire.....	26
2.3.5	PCR RFLP.....	29
CHAPITRE III : RESULTATS.....		31
3	Culture des parasites:.....	32
3.1	Aspect épidémiologique de la LCan.....	35
	Profils electrophoretiques des souches.....	35
3.1.1	Distribution géographique.....	36
3.2	Identification moléculaire des espèces de <i>Leishmania</i>	38
3.2.1	PCR ITS1.....	38
3.2.2	PCR Hsp70.....	39
3.2.3	PCR-Rflp :.....	39
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....		41
4	Discussion.....	42
	Conclusion.....	45
	References Bibliographique.....	47
	Annexes.....	49

Introduction

Les leishmanioses sont des parasitoses (zoonoses) du système monocytes macrophages provoquées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*. Ces parasites affectent les mammifères ; ils sont transmis par la piqûre infestante d'un moucheron hématophage qui est « phlébotome femelle ».

Les leishmanioses incluent trois types de manifestations clinique : les leishmanioses viscérales (LV) mortelles en l'absence de traitement ; les leishmanioses cutanées (LC), localisées(LCL) ou diffuses (LCD) et les leishmanioses cutanéomuqueuses (LCM). Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces leishmaniennes et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

Le chien est la principale espèce parasitée par *L. infantum* dans le pourtour méditerranéen et constitue son principal réservoir. S'agissant d'une zoonose, l'homme peut être lui aussi infecté **(Akhoundi et al., 2016)**.

Les différentes investigations épidémiologiques se basent généralement sur plusieurs outils de diagnostic et d'identification comme les outils moléculaires qui sont essentiels pour détecter l'infection par *leishmania* tant chez les chiens cliniquement suspects que chez les chiens apparemment sains **(Campino, Maia., 2013)**.

La PCR (polymerase chain reaction) est aujourd'hui un outil moléculaire, simple sensible et spécifique permettant de détecter la présence du parasite *Leishmania* très rapidement sur les différents échantillons cliniques (biopsie, sang et suc dermique), sans la nécessité de l'isolement du parasite et ainsi identifier les espèces en causes **(Schönian et al., 2003)**.

Ainsi notre étude a été axée sur l'étude épidémiologique de la LC dans la région de l'Algérois à travers l'utilisation de ces techniques (PCR, PCR RFLP) dans l'identification des espèces de *Leishmania*, en se basant sur les résultats du typage isoenzymatique appelé aussi Multi-locus

Enzyme Electrophoresis « MLEE » de quelques isolats de *L. infantum*. Trois zymodèmes ont été sélectionnés MON-1, MON-34 et MON-80 et deux marqueurs génétiques ont été ciblés à savoir l'ITS1 et la Hsp70.

Notre étude s'articule autour de 4 chapitres. Le premier est consacré à une revue bibliographique sur les leishmanioses. Le deuxième chapitre est dédié à la présentation du matériel et des méthodes utilisées tout au long de cette étude. Le troisième chapitre qui est consacré à l'interprétation des résultats obtenus et enfin un quatrième chapitre qui est réservé à la discussion des résultats.

CHAPITRE I : GENERALITES

1 Epidémiologie

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par des protozoaires du genre *Leishmania*, qui comporte de nombreuses espèces communes à l'homme et certains animaux. Elles sont transmises par la pique d'un petit moucheron appelé phlébotome (Dedet, 2009).

1.1 Agent Pathogène

1.1.1 Morphologie

Les leishmanies se présentent sous 2 formes :

a)- Le stade amastigote : Petit corpuscule arrondi ou ovalaire de 2 à 6 μ m de diamètre possédant un noyau, un kinétoplaste et un flagelle interne (**figure 1**). L'amastigote est situé à l'intérieur des cellules du système de phagocytes mononuclés du vertébré mammifère. Cette forme se retrouve dans les histiocytes, macrophages et les cellules de Kupffer (Phagocyte mononuclée spécifique au tissu hépatique), au sein d'une vacuole parasitophore. On retrouve donc ces parasites dans la peau, les nœuds lymphatiques, les cellules souches de la moelle osseuse et divers organes tels que le foie ou la rate. Le sang est pauvre en leishmanies, de très rares monocytes peuvent être parasités.

b)- Le Stade Promastigote : Forme allongée mobile de 10-20 μ m, qui possède un noyau, un kinétoplaste et un flagelle (**figure 1**). Cette forme est présente chez l'hôte vertébré.

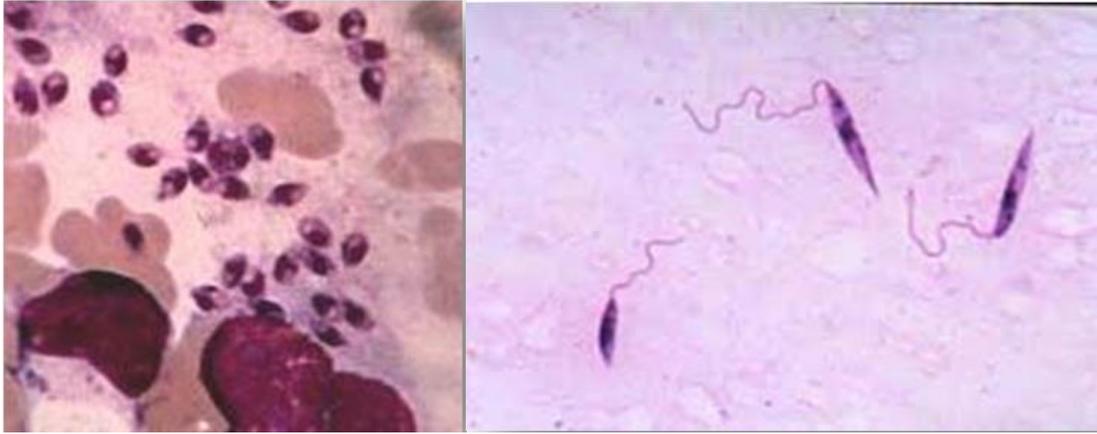


Figure 1 : Formes de *Leishmania* : à gauche la forme amastigote, à droite la forme promastigote
(www.parasitologie.univ-montp1.fr , www.alae.iquebec.com)

1.1.2 Génome de *Leishmania*

L'organisation et le contenu du génome sont très conservés, que ce soit entre les différentes espèces ou même au niveau de la famille des *Trypanosomatidae*. En 2005 le premier génome de *Leishmania* fût séquencé, celui de *L. major*, et par la suite 36 autres génomes furent séquencé qui se sont ajoutés en provenance de 16 espèces de *Leishmania* différentes.

1.1.2.1. Génome Nucléaire

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

1.1.2.2. Génome Kinetoplastique

Le kinétoplaste représente de 10 à 20% de l'ADN total de la cellule, et il est considéré comme un ADN mitochondrial. C'est en effet une portion particulière de l'unique mitochondrie (**Gott , 2003**). Il est constitué de deux types de molécules d'ADN circulaire : les maxi-cercles (environ de 10 à 30 par cellule) et les mini-cercles (de 5000 à 10 000 par cellules) entrelacés les uns dans les autres constituant un réseau complexe et condensé (**Ivens et al, 2005**).

Les maxi-cercles d'une taille 20 à 40 kb selon les espèces sont identiques dans un même réseau, et sont équivalents de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. Ils contiennent des gènes classiques de la mitochondrie qui codent pour l'ARN ribosomique (ARN), des gènes qui codent pour les petits ARN appelés ARN guide (ARN), qui interviennent dans un processus très original de modification appelé l'ARN éditing, et codent aussi pour des gènes de la chaîne de transports des électrons (cytochrome oxydase, complexe **NADH déshydrogénase...**), (**Gott, 2003**).

Les mini-cercles d'une taille inférieure à 1 Kb, codent également pour des ARNg. Mais contrairement aux maxi-cercles, leur séquences sont très variables au sein d'une même espèce et aussi d'une espèce à l'autre (**Ivens et al., 2005**).

1.1.2.3. Plasticité Génomique

Leishmania présente un remarquable polymorphisme caryotypique entre espèces ou au sein d'une même espèce (**Pagès et al., 1989; Blaineau et al., 1992**). Ce polymorphisme se manifeste par des variations de la taille des chromosomes, leur nombre et de leur intensité (intensité des bandes chromosomiques), les mécanismes générateurs de cette variabilité sont principalement associés à des amplifications géniques (extra ou intra chromosomiques), des translocations chromosomiques, des cassures et pertes de fragments chromosomiques ou à des variations de la taille des séquences télomériques et sub-télomériques (**Ravel et al., 1996**). Cependant la structure générale du génome est parfaitement conservée contrastant ainsi avec la plasticité génomique. Ce contraste a été mis en évidence par l'établissement de la cartographie physique du génome mettant en évidence la conservation des groupes de liaison dans les régions centrales des chromosomes et l'instabilité des régions sub-télomériques impliquées dans ce polymorphisme chromosomique.

1.1.3 Classification

Actuellement, 54 espèces de *Leishmania* sont connus et au moins 21 d'entre eux sont pathogènes pour l'homme (**Akhoundi et al., 2016**). Les parasites *Leishmania* appartiennent au :

Règne : Protista (Haeckel, 1866),

Classe : *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976),

Sous classe *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004),

Ordre *Trypanosomatida* (Kent, 1880),

Famille *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901),

Sous famille : *Leishmaniinae* (Maslov and Lukeš 2012),

Genre : *Leishmania* (Ross, 1903),

Le genre *Leishmania* est subdivisé en deux sous-genres selon que le parasite se développe chez le vecteur. Le sous-genre *Leishmania* (**Ross, 1903**), limité dans l'ancien monde, **où le parasite se développe** dans la partie centrale de l'intestin et le sous sous-genre *Vianna* (**Lainson et Shaw, 1987**) **où le parasite se développe** dans la partie postérieure du vecteur (**Lainson, Ryan et al. 1987**). Les espèces qui ne peuvent être classées dans aucun de ces sous-genres sont incluses dans la section *Paraleishmania*, (**Akhoundi, Kuhls et al. 2016**), les *Leishmania* infectant les lézards appartiennent au genre *Sauroleishmania* (**Saf'janova 1982**), (**figure 2**).

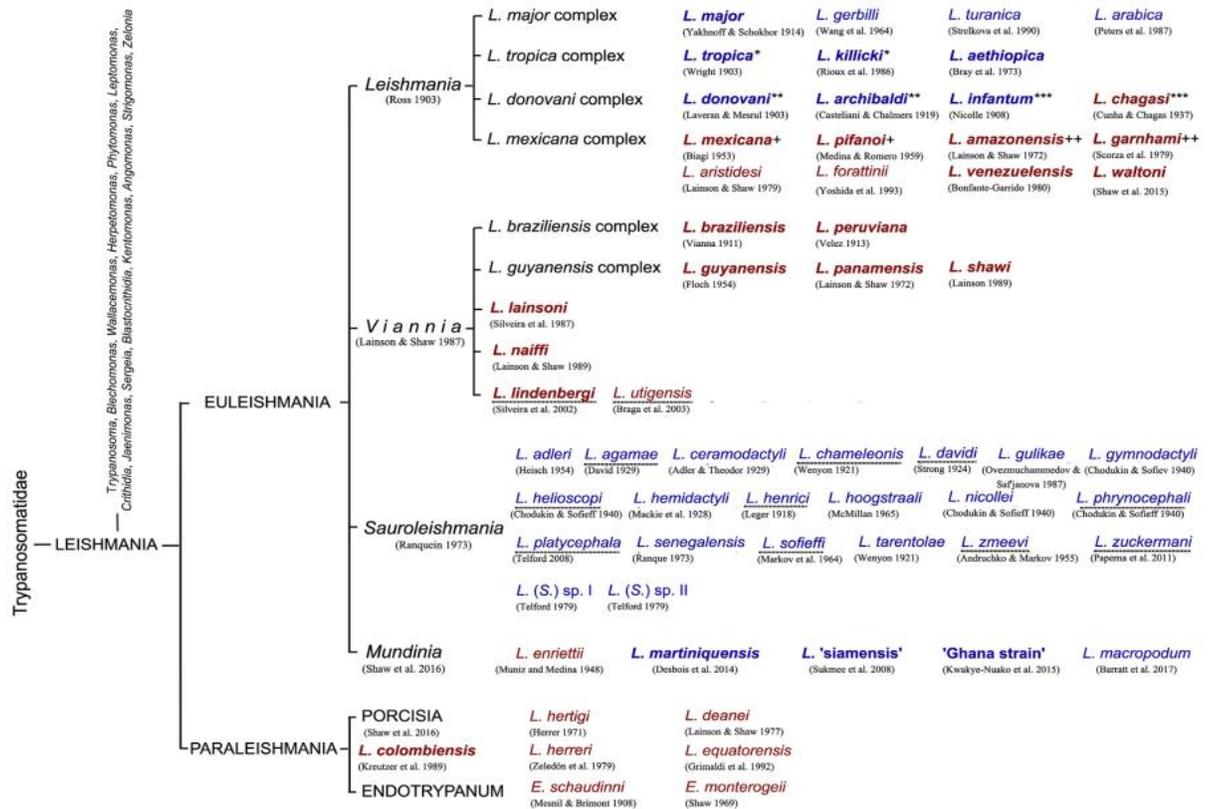


Figure 2 : Classification de *Leishmania* (Akhoundi, et al 2017)

1.2 Les Vecteurs

Nocturnes et silencieux, les phlébotomes sont de minuscules insectes (deux millimètres) de l'Ordre des Diptères appartenant à la famille des *Psychodidae*, (Bigot, 1845), sous famille des *Phlebotominae*. (Kertesz, 1904). Seule la femelle est hématophage.



Figure 3 : Phlébotomes Femelle (Hamlaoui et Hazhazi, 2014).

1.3 Réservoirs

Selon les régions et l'espèce, le réservoir de parasites est animal ou humain. Il y a deux entités :

- **La forme zoonotique** avec les petits rongeurs et les canidés (sauvages et domestiques) notamment le chien comme principal réservoir de parasites. La *Leishmania* en cause est *L. infantum* généralement retrouvée dans le Bassin méditerranéen, au Moyen Orient et *L. chagasi* en Amérique du Sud .

Le chien est le principal réservoir de l'agent appartenant à *L. infantum* dans le Bassin méditerranéen (réf). Le chien domestique est considéré comme le réservoir principal de *Leishmania infantum* en Chine, dans le bassin méditerranéen et en Amérique en raison :

- de sa forte réceptivité ;
- de la forte prévalence d'infection des chiens par *Leishmania infantum* (la plupart étant asymptomatiques) dans les zones d'endémie de leishmaniose humaine ;
- d'un parasitisme cutané intense chez les chiens infectés augmentant le risque de transmission.

- **La forme anthroponotique**, où l'homme est la seule source d'infection pour le vecteur. *Leishmania* en cause est *L. donovani*, rencontrée en Afrique de l'Est et en Asie (Bangladesh, Népal, Inde, Soudan).

1.4 Cycle Parasitaires

Les *Leishmania* sont des parasites protozoaires avec un cycle de vie complexe, impliquant plusieurs formes de développement. Ces formes représentent une adaptation à l'évolution des conditions environnementales rencontrées par les parasites au sein de leurs deux hôtes : l'hôte mammifère, pour lequel ils sont pathogènes, et l'hôte intermédiaire ou vecteur et inoculateur (phlébotome) du parasite au sein duquel, les Leishmanies sont flagellés, et donc activement mobiles au niveau de l'insecte (**Cantacessi et al ; 2018**). Deux formes principales peuvent être distinguées (même si plusieurs autres formes intermédiaires ont été rapportés : la forme multiplicative ou schizogonie, non infectieuse caractérisée par des promastigotes procycliques qui sont présents dans l'intestin moyen de l'insecte et la forme non multiplicative, mais infectieuse, caractérisée par des promastigotes métacycliques infectieuses, qui se trouvent dans l'intestin thoracique moyen et dans la trompe du phlébotome. Les promastigotes métacycliques une fois inoculés à l'hôte mammifère par la pique d'un phlébotome perdent leurs flagelles après avoir été phagocytées par un macrophage et se transforment en forme amastigote intracellulaire. Cette dernière résidera dans une vacuole dotée de fonctions lysosomiales que l'on appelle la « vacuole parasitophore » (**Besteiro, Williams. 2010**). Les phlébotomes s'infectent pendant un autre repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes. Les parasites sont libérés par des macrophages dans l'intestin du phlébotome, qui se multiplie et se différencie en promastigotes métacycliques, et migrent dans la trompe du phlébotome. Ces stades infectieux sont ensuite libérés dans un nouvel hôte de mammifères, et le cycle se répète à nouveau (**Cantacessi et al ; 2018**).

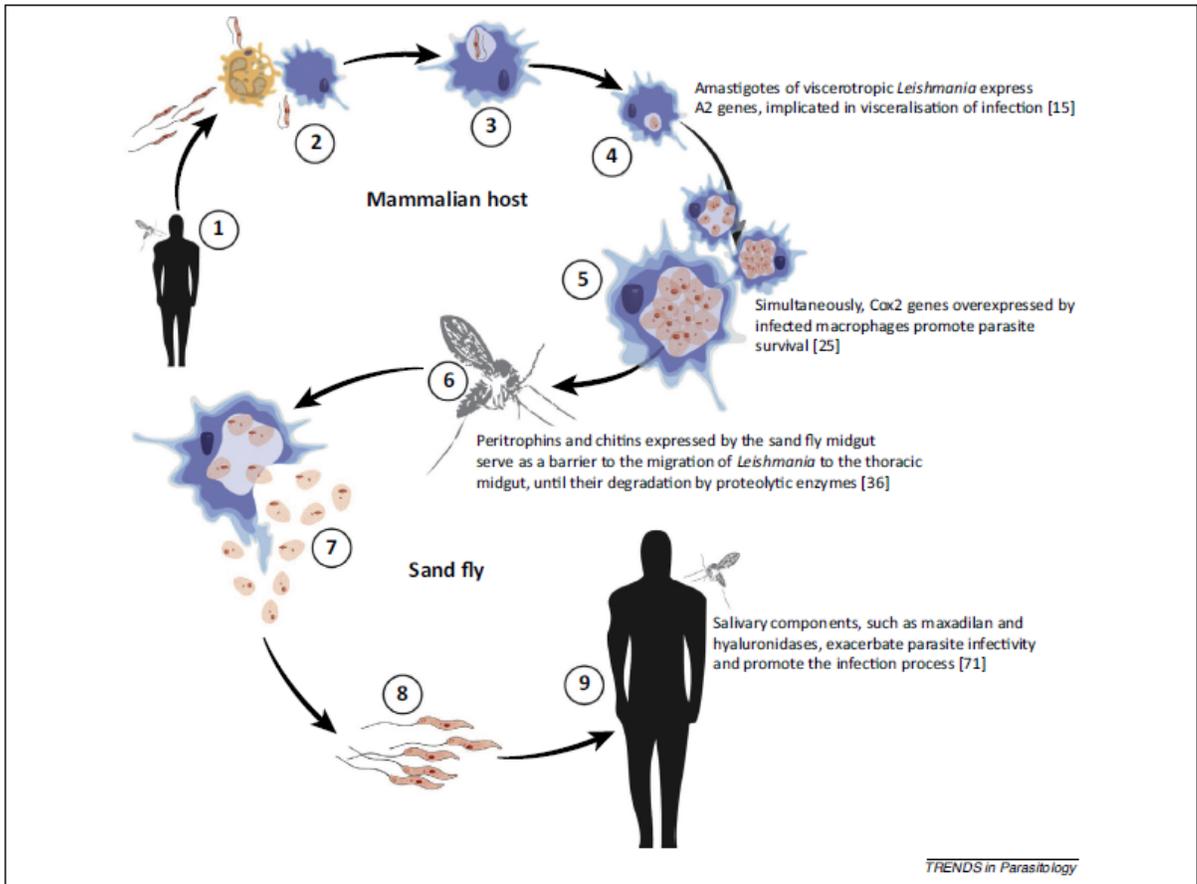


Figure 4 : le cycle évolutif de la leishmaniose (Cantacessi et al ; 2018).

1.5 Répartition Géographique

1.5.1 Dans Le Monde

Les leishmanioses affectent 4 continents (Asie, Amérique, Europe, et Afrique), dans les zones tropicales et subtropicales de 89 pays (OMS, 2021). Les foyers les plus touchés sont ; l'Asie du Sud-est (Inde, Népal, Bangladesh) ; l'Afrique de l'Est (Éthiopie, Soudan) ; le Bassin méditerranéen (France, Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Égypte, Turquie) ; et l'Amérique du Sud (Brésil). L'organisation mondiale de la santé a estimé au cours des 5 dernières années, plus d'un million de nouveaux cas de LC et environ 100 000 nouveaux cas de LV (OMS, 2021), avec une prévalence globale de 14 millions de personnes touchées par cette maladie dans le monde. On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien Monde (Sud de l'Europe), Afrique, Proche-Orient et Asie, et le Nouveau Monde (Amérique du

Nord, du Sud et Centrale). Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes, mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania*, propagées par différents genres et espèces de phlébotomes et réservoirs selon la région (figure 5). Environ 95% des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. Plus des deux tiers des cas surviennent dans les six pays suivants : l’Afghanistan, l’Algérie, le Brésil, la Colombie, la République arabe syrienne et la République islamique d’Iran. On estime qu’il y a 0,7 million à 1,3 million de nouveaux cas chaque année dans le monde (BAILEY, 2007; DAVID, 2009).

Fondamentalement, la leishmaniose canine à *L. infantum* est centrée sur le pourtour méditerranéen (sud de l’Europe, Afrique du Nord, Moyen-Orient), zone endémique stable avec des populations importantes et actives de phlébotomes infectés et infectants. Elle est présente également en Asie centrale, en Amérique latine où *L. chagasi* est considéré aujourd’hui comme synonyme de *L. infantum*, en Amérique du Nord (Bourdoiseau et Charmette , 2015). Elle touche environ 50 pays du monde. Les séroprévalences les plus élevées sont enregistrées au Venezuela (33%) et au Brésil (73%) (Zerpa , 2000, Silva et al, 2007)

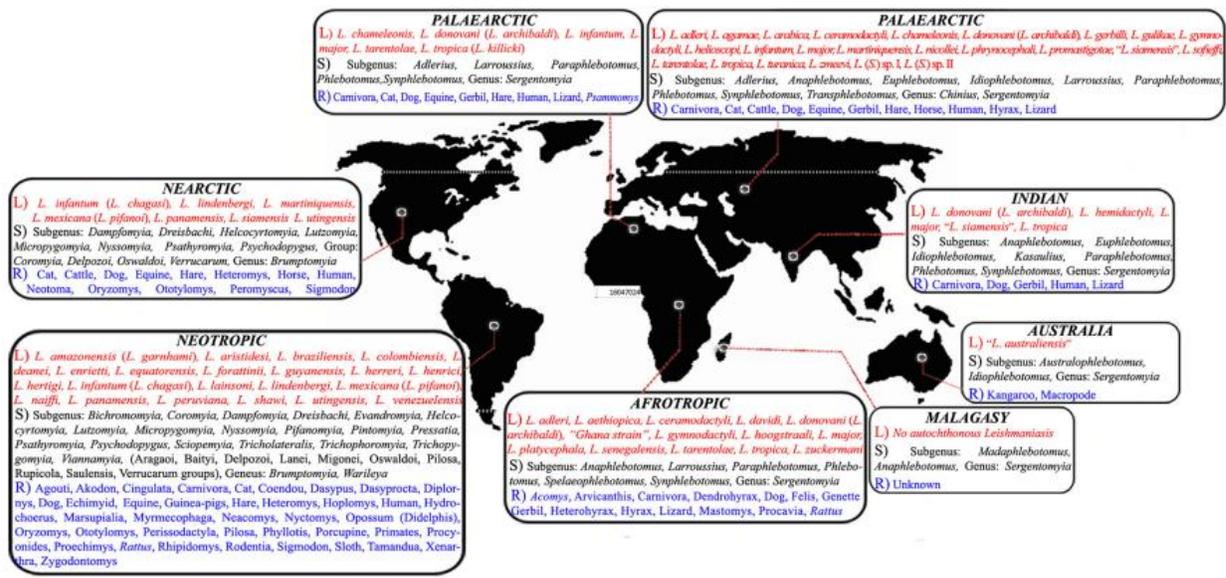


Figure 5: Répartition géographique de diverses *Leishmania spp.* ; Phlébotomes et réservoirs animaux dans l’Ancien et le Nouveau Monde. L : *Leishmania* (espèce), S : Sandfly/phlébotome (genre ou sous-genre), R : Réservoir (genre ou famille), (Akhoundi et al., 2016).

1.5.2 En Algérie

L'Algérie est classée deuxième après l'Afghanistan en terme de notification des cas dans le monde (OMS, 2021), avec plus de 25 000 cas déclarés chaque année et une incidence de 28,19 cas pour 100 000 habitants (Alvar, et al 2013 ; Eddaikra et al., 2018). La leishmaniose viscérale zoonotique (LVZ) est causée par *Leishmania infantum*, avec des chiens agissant comme réservoir principal et *Phlebotomus perniciosus* comme vecteurs primaires (Belazzoug, 1986 ; Izri 1990) . Historiquement présent principalement dans les régions humides et subhumides du nord de l'Algérie, il s'est étendu de ses foyers historiques de Kabylie (Tizi-Ouzou, Bejaïa) aux foyers de Blida, Chlef, Médéa et Tipaza. Une augmentation globale enregistrée de 1994 à 2003 a été suivie d'une diminution au cours de la décennie suivante (Eddaikra, et al 2018). En Algérie, la leishmaniose cutanée (LC) causée par *L. major*, *L. infantum* et *L. tropica* a une incidence 30 fois plus élevée que la forme viscérale (Eddaikra et al. 2018). La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), est causée par *L. major*, dont le vecteur et les réservoirs éprouvés sont respectivement *Phlebotomus papatasi*, *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* (Belazzoug, 1983 ; Belazzoug, 1986 ; Izri, 1992). La maladie sévit principalement dans 41 des 48 wilayas algériennes, couvrant la frange nord-saharienne et les zones bioclimatiques arides et semi-arides, notamment Biskra, M'sila, Batna, Ghardaïa et Béchar (Benikhlef et al., 2021). Une propagation de la maladie s'est observée vers les foyers du nord de l'Atlas tellien, dans le bassin de la Soummam (Boudrissa, A et al 2012). *Leishmania tropica* provoque la leishmaniose cutanée chronique (LCC), une forme avec moins de 100 cas par an, qui survient généralement en sympatrie avec *L. major* (Harrat et al 2009 ; Garni et al 2014). Elle est limitée Ghardaïa, avec quelques cas sporadiques signalés à Constantine, Annaba, et Tipaza (Harrat et al 2009 ; Mihoubi et al 2008 ; Izri et al 2014). *Phlebotomus sergenti* est considéré comme le vecteur éprouvé de *L. tropica* (Boubidi et al., 2011). L'homme étant le principal réservoir dans les pays du moyen orient et au Maroc. Néanmoins, certains animaux comme *Massoutiera mzabi* (le Mzab gundi de la famille des Ctenodactylidae) sont des réservoirs suspects supplémentaires (Jaouadi et al 2011 ; Maroli et al 2013 ; Benikhlef et al., 2020) . La leishmaniose cutanée sporadique (LCS) causée par *L. infantum* (Belazzoug et al. (1985) a été signalée pour la première fois par Sergent en 1923 (Sergent et al 1923). Les différentes investigations ont mis en évidence le rôle vectoriel de *P. perfiliewi* à Ténès (Izri et Belazzoug 1993). Elle est responsable d'infections cutanées sporadiques sur l'ensemble des régions côtières du nord-ouest algérien (Oran, Tlemcen) (Adel, et

al., 2014 ; Eddaikra et al., 2018) et du Tell Atlas algérien (Tizi-Ouzou, Bouira, Bord Menail, Tipaza, Blida et Alger).

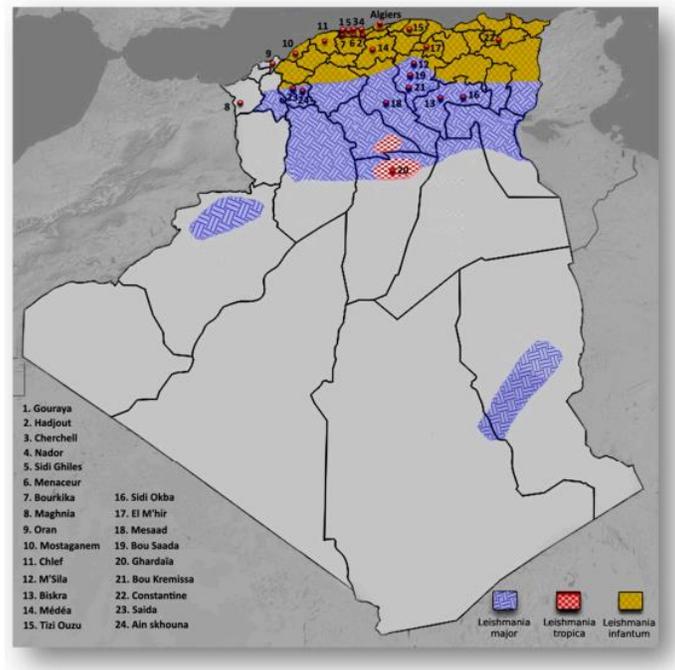


Figure 6: Répartition géographique des leishmanioses dans le monde (Izri, et al 2021)

1.6 Formes Clinique

1.6.1 La leishmaniose humaine

1.6.1.1. La Leishmaniose Viscérale

Elle se caractérise par une fièvre irrégulière, une pâleur, une splénomégalie (figure 8). Elle est fatale dans sa forme évolutive. Dans les régions où la LV est endémique, la maladie tend généralement vers la chronicité et fait ses principales victimes chez les enfants de la tranche d'âge de 1 à 4 ans avec *L. infantum* comme agent principal dans le bassin méditerranéen (OMS, 2010). En effet les enfants les plus jeunes sont considérés comme les plus sensibles, en particulier lorsqu'ils souffrent de malnutrition. On note généralement une triade clinique (fièvre-pâleur-splénomégalie), mais moins constante et l'immunodépression est permanente dans un cas sur deux. L'anémie est le signe le plus fréquent, mais est souvent discrète. Il existe fréquemment de porteurs asymptomatiques. Des formes aiguës sont possibles et la mortalité est habituellement

élevée. En Inde elle est due à *L. donovani* dans plus de 90% des cas mondiaux avec l'Homme comme réservoir.

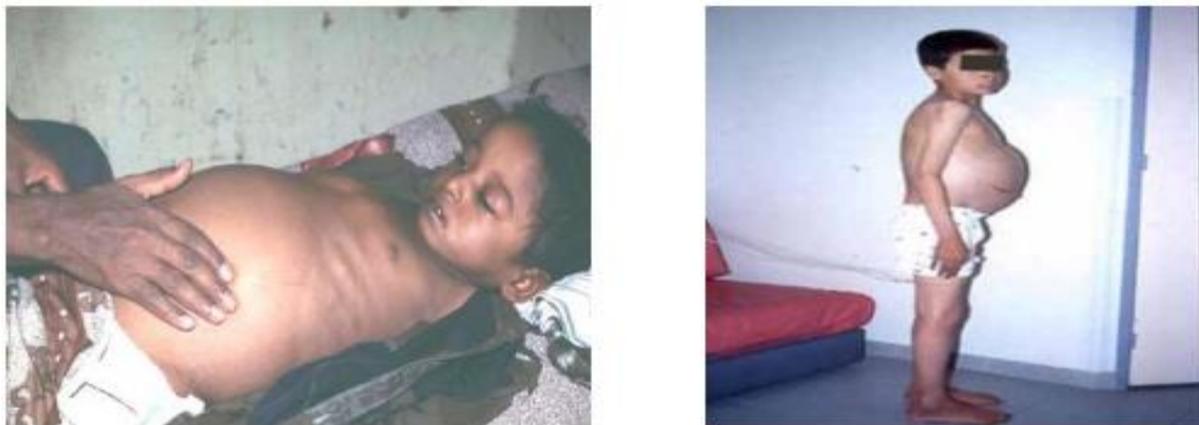


Figure 7: Cas de LV anthroponotique ou Kala azar (ANOFEL, 2014)

1.6.1.2. La Leishmaniose Cutanée

C'est la forme la plus fréquente, qui provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices définitives et des handicaps sévères (Mokni, 2019).



Figure 8: Cas de LC au niveau des membres (ANOFEL 2014)

1.6.2. La Leishmaniose Canine

Cette maladie se caractérise par un tableau clinique protéiforme intéressant la peau, les muqueuses, le système lymphatique et potentiellement tout tissu ou appareil. La leishmaniose évolutive est mortelle en l'absence de traitement ; malgré celui-ci, les rechutes ne sont pas rares. Chez le chien les phlébotomes effectuent jusqu'à 100 piqûres par heure au niveau du museau, du pourtour des yeux, des pattes et des oreilles. La piqûre provoque une papule (lésion de l'épiderme), pouvant persister plusieurs jours, entraînant un grattage de modéré à sévère avec une possible surinfection bactérienne.

La période d'incubation de la leishmaniose canine varie de trois mois à sept ans, mais le chien peut aussi ne jamais déclarer la maladie. La leishmaniose canine est une maladie systémique présentant un polymorphisme clinique important et touchant n'importe quel organe ou tissu. Sur le plan histo-pathologique, il s'agit d'une réaction inflammatoire granulomateuse, associée à la présence de leishmanies dans les macrophages (**Briffod, 2011**).

La majorité des chiens qui déclarent la maladie présentent un mauvais état général, une léthargie plus ou moins prononcée parfois associée à une intolérance à l'effort, un mauvais état corporel (amyotrophie importante voire cachexie), on parle d'aspect de « vieux chien ».

Ce sont les lésions les plus fréquentes lors de leishmaniose clinique. Elles peuvent être associées ou non à d'autres types de lésions voire être inexistantes. Il s'agit de dermatites, qui peuvent être de différents types :

- Exfoliative non prurigineuse avec ou sans alopecie, généralisée ou localisée à la face le plus souvent autour des yeux (on parle de « lunettes leishmaniennes »), aux oreilles et aux membres.
- Ulcérative au niveau des saillies osseuses, des jonctions cutanéomuqueuses, des pattes et des pavillons auriculaires.
- Nodulaire focale ou multifocale
- Para ou hyperkératose (on parle de « furfur leishmanien »), pouvant être localisée sur tout le corps de l'animal
- Papuleuse ou pustuleuse stérile.

Certains chiens peuvent également présenter des manifestations plus rares telles que l'onychogryphose ou d'autres lésions cutanées atypiques (Solano-gallego et al, 2009)



Figure 9: A gauche chancres d'inoculation après morsures de phlébotomes. A droite lésion ulcérate en voie de guérison sur un chien atteint de leishmaniose (PECET Universidad de Antioquia 2016 ; Clinique Vétérinaire du Soleil, Porto Vecchio, Corse 2014).

1.7 Traitement

- *L'antimoniote de méglumine* est commercialisé sous le nom de Glucantime®. Les indications du laboratoire conseillent une dose de 200 à 300 mg/kg, toutes les 48 h, par les voies sous-cutanée (SC), intra musculaire (IM), intra péritonéale (IP) ou intraveineuse (IV), en série de 15 à 20 injections.(Tassi et al, 1994)
- *La pentamidine* est utilisée par la voie IM profonde, à la dose de 2 puis de 4 mg/kg, toutes les 48 h durant plusieurs mois. La toxicité n'est pas négligeable : locale d'abord (nécrose importante entraînant une perte massive de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané : abcès froid, douloureux), puis rénale, cardiaque et pancréatique (hypoglycémie précoce réversible, puis hyperglycémie tardive irréversible).
- *L'amphotéricine B* n'a pas d'AMM (Autorisation de mise au marché) chez le chien (recours aux présentations destinées à l'espèce humaine). Cet antibiotique se fixe de façon irréversible à l'ergostérol constitutif de la membrane du parasite, altérant ainsi les fonctions de perméabilité de celle-ci, provoquant par fuite du potassium intracellulaire la mort du parasite (leishmanie ou champignon) ; cette molécule est douée également de

propriétés immunostimulantes (activation des macrophages et des monocytes, des phénomènes oxydatifs, de l'excrétion de certaines interleukines) (**Jebbouri, 2013**)

- **L'enrofloxacin (Baytril®)**, à la dose de 10 mg/kg/j, a montré une certaine efficacité : amélioration clinique notable, augmentation de poids, reprise de l'appétit, diminution des titres en anticorps,... mais semble sans effet sur les ulcères cutanés (observations personnelles) ; en outre, après une amélioration clinique spectaculaire, il n'est pas rare d'observer une rechute deux mois après le début du traitement.

1.8 Prévention et contrôle

Le chien étant considéré comme le principal réservoir pour l'homme, il est nécessaire de mettre en place des mesures afin d'une part de protéger les chiens de l'infection par *Leishmania*, et d'autre part d'empêcher la ré-infestation des phlébotomes via des repas sanguins sur des chiens contaminés. Les anti-parasitaires externes ont été largement utilisées tels que :

- Les colliers (imprégnés de deltaméthrine) permettent une libération lente et prolongée du principe actif (**Solano-gallego et al, 2011**)
- Les « spot-on » (de perméthrine associée ou non à l'imidaclopride), assurent une protection très efficace des vingt-quatre à quarante-huit heures.
- Les sprays (icaridine, perméthrine associée au pyriproxifène), ont l'avantage d'être efficaces dès leur application

De plus, afin de limiter l'exposition des chiens aux vecteurs, il est préférable de garder les chiens à l'intérieur pendant les périodes d'activité du vecteur. Les phlébotomes sont de très petits insectes qui passent au travers des mailles des moustiquaires classiques et qui sont plus ou moins endophiles selon les espèces, ils rentrent donc dans les habitations. Afin que les chiens soient protégés, il est donc nécessaire de traiter l'intérieur des habitations ainsi que les niches et chenils avec des insecticides comme la deltaméthrine, organophosphorés en spray ou via des diffuseurs anti-moustiques (**Solano-gallego et al, 2011**).

Les mesures de prévention afin de limiter la contamination des chiens sont nombreuses mais elles ne sont pas efficaces à 100%.

- le **vaccin Leishmune®** est disponible pour les vétérinaires depuis 2004, il est à visée prophylactique et thérapeutique. Son taux de protection est de 92 à 95% selon les études et son efficacité de 80% (**Borja-Cabrera et al, 2002 et Olivera Da Silva et al, 2000**)
- le **Canileish®** a reçu une AMM (**autorisation de mise sur le marché**) depuis septembre 2011. Ce vaccin est destiné à protéger les chiens sains (il n'est recommandé que pour les chiens ayant obtenu un test sérologique négatif) contre des formes graves de la maladie.

Une étude récente (**Vellez-Gallego, 2020**) évaluant l'impact de la vaccination sur la transmission des leishmanies aux phlébotomes via les chiens infectés, n'a pas permis de conclure l'efficacité de ces vaccins. En revanche cette étude a montré que les chiens infectés et vaccinés et les chiens infectés non vaccinés sont des sources potentielles de leishmanies pour les phlébotomes. Cependant, la proportion de phlébotomes qui s'infectent au contact du premier groupe semble plus faible, et la charge parasitaire chez le vecteur semble plus faible également toujours dans ce premier groupe. Les traitements topiques visant à limiter les piqures de phlébotomes sont donc indispensables même si les chiens ont été vaccinés, d'une part pour protéger les chiens de l'infection et d'autre part pour réduire la contamination des phlébotomes.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1 Matériel

1.1 Matériel non Biologique

Différents appareillages et produits ont été utilisés dans la réalisation de notre étude (**annexe 1**).

1.2 Matériel biologique

Les souches utilisées dans ce travail proviennent des prélèvements de ganglions et de sang de chiens atteints de leishmaniose canine de différentes régions du nord de l'Algérie : Alger (n=1), Tizi-Ouzou (n=3), Azazga (n=1), Dely-Brahim (n=2), Zéralda (n=1), Bouzarea (n=1) (**figure 11**). Trois souches marqueurs ont été utilisées pour l'identification moléculaire. Il s'agit de : LIPA118 (LV du complexe *L. infantum*), MHOM/DZ/05/LIPA07/05(LC du complexe *L. tropica*) et MHOM/DZ/82/LIPA80 (LC du complexe *L. major*). Tous les isolats ont été typés auparavant par la technique biochimique MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) selon la technique de **Rioux (1990)**. Elles ont été conservés dans de l'azote liquide à -196° , dans des futs d'une crayobanque au niveau du laboratoire d'éco épidémiologie parasites et génétique des populations (LEEPGP) de l'Institut Pasteur d'Algérie (**IPA**).

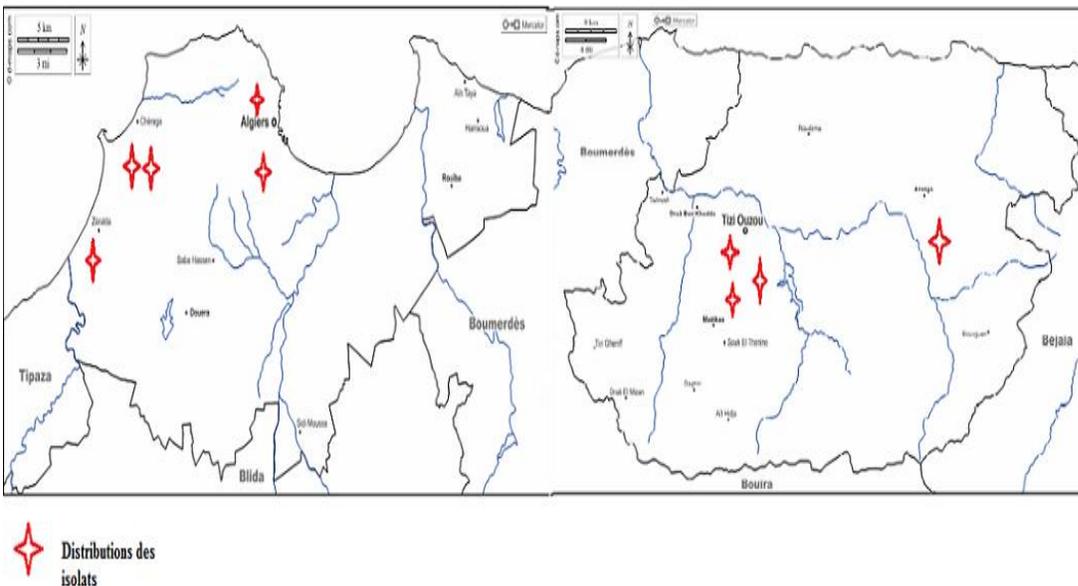


Figure 10 : Distribution des Isolats sélectionnés dans les wilayas d'Alger et Tizi-Ouzou

2 Méthodes

2.1 Culture des parasites

2.1.1. Décongélation

Les cryo-tubes contenant les parasites congelés dans de l'azote liquide à -196°C sont retirés de la cryo-banque du LEEPGP (figure 12). Les tubes sont déposés aussitôt dans un bain-marie à 37°C pour une minute et laisser à côté du bec benzène jusqu'à décongélation totale. Après décongélation et devant le bec benzène, la suspension parasitaire est mélangée à l'aide d'une poire et une pipette pasteur, puis récupérée et ensemencée dans un tube NNN et un autre tube de sérum de lapin. Le milieu NNN est un milieu qui est considérée comme semi solide, à base de gélose et de sang, et est utilisée dans le but d'isolement et l'entretien des leishmanies. Par ailleurs le sérum de lapin est un milieu solide à base de sérum de lapin et est utilisée pour les isolats à croissance difficiles.

Les deux tubes sont codifiés par le code de la souche et la date d'ensemencement. La dernière goutte restante dans la pipette pasteur est déposée sur une lame porte objet pour un contrôle au microscope optique GrX40. A l'aide du microscope, une observation minutieuse de l'état des parasites a été réalisée en évaluant la richesse, la mobilité et l'absence ou la présence de germes. Les deux tubes ensemencés sont aussitôt incubés à 25°C .



Figure 112 : Procédure de décongélation des souches de la cryo-banque de LEEPGP de l'IPA

2.1.2. Entretien des parasites

Après 4 à 8 jours d'incubation des souches décongelées (2 tubes : NNN, SLC), la suspension parasitaire est observée au microscope optique GRX40, afin d'évaluer la richesse, la mobilité et l'absence ou la présence de germes. Si la culture des deux tubes est positive (présence de parasites mobiles) et non contaminée, un repiquage est effectué sur deux autres tubes neufs codifiés et datés. Si la culture est négative, il faut laisser incuber jusqu'à 8 jours ou plus en vérifiant de temps en temps la poussée des cultures (figure 13).

Après 4 à 8 jours d'incubation, les 4 tubes contenant les suspensions parasitaires sont contrôlés comme précédemment. Si la culture des 4 tubes est positive (présence de parasites mobiles) et non contaminée, on procède à la culture en masse des parasites.

2.1.3. Culture en masse des parasites

Après une période d'incubation d'une durée allant de 6 à 8 jours, les leishmanies sont transférées dans plusieurs tubes de milieux liquides RPMI-1640 additionnée du SVF-10%, à raison de 0,5 ml de suspension parasitaire riche (10^8 parasites/ml) dans 5ml de RPMI-1640 (figure 13). Les cultures en masse sur milieu RPMI sont généralement destinées pour l'identification moléculaire des *Leishmania*.



Figure 123 : Culture de leishmanies sur tubes NNN et RPMI

2.1.4. Récolte

Après avoir obtenus 0,5 ml de culot parasitaire à raison de 10^8 parasite/ml à partir des tubes RPMI-1640 +SVF10%, on transfère ces dernières dans des tubes conique afin d'effectuer deux lavages consécutifs avec de l'eau physiologique 0.9%, suivi de deux centrifugations à 2500 tr/min pendant 10min. Un culot parasitaire est ainsi obtenu et conservé dans des tubes eppendorf à -20°C jusqu'au jour de l'extraction d'ADN.

2.2 Extraction de l'ADN par Phénol chloroforme iso-amylque

L'extraction au phénol-chloroforme iso-amylque est un procédé d'extraction utilisé pour extraire les acides nucléiques en les séparant des protéines. Ce procédé de séparation repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans une émulsion à deux phases : une phase aqueuse et une phase organique (Chomczynski et Sacchi, 1987).

2.2.1. Lyse Cellulaires

200 µl de tampon de lyse ont été ajoutés au tube eppendorf contenant le culot parasitaire, suivi de 20µl de SDS 10% afin de désagréger les membranes cellulaires et nucléaires et de libérer les contenus cytoplasmiques et nucléaires. 20µl de Protéine kinase (PK) sont ajoutées par la suite, pour digérer les protéines associées à l'ADN de *Leishmania*. Les tubes eppendorfs sont ensuite incubés dans un bain marie à 55° pendant une heure.

2.2.2. Déproteinisation

La majorité des étapes de déproteinisation se font sous la hotte chimique. 500µl de mélange phénol chloroforme isoamylique (25v/24v/1v) sont ajoutés pour dénaturer les protéines. Les tubes sont mélangés de façon délicate jusqu'à obtention d'un mélange laiteux. On laisse agir sur la paillasse pendant 5mn, puis une centrifugation est effectuée d'une durée de 10mn à la vitesse de 10 000 (tours/minutes). La phase aqueuse supérieure est récupérée délicatement à l'aide d'une micropipette et transférée dans un nouveau tube eppendorf étiqueté.

2.2.3. Précipitation

Un volume d'1/10 (du volume de l'échantillon) d'acétate de sodium 3M est ajouté aux tubes eppendorfs. Puis, 500 microlitres d'éthanol absolu sont ajoutés et les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 10mn à 10000 tour/min à 4°. Le surnageant est par la suite éliminé et 500µl d'éthanol 70° sont de nouveau ajoutés. Après une dernière centrifugation à 10000 tours/mn pendant 10mn à 4°C, les tubes sont laissés pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain 100µl de TE (Tris EDTA) sont ajoutés et les tubes sont aussitôt mis à -20°C jusqu'au jour de la PCR.

2.3. La PCR (Polymérase Chain reaction)

2.3.1. Le Principe de la PCR

La PCR est une technique d'amplification d'ADN in vitro, elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie (**Mullis, 1985**)

Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes :

- **Dénaturation** : La dénaturation thermique de l'ADN se fait à 95°C. Les 2 brins de l'ADN se séparent par rupture des liaisons hydrogènes. Nous obtenons alors des matrices simples brin.
- **Hybridation** : L'hybridation des amorces se fait à 50° à 65°C. Les deux amorces contenues en large excès s'hybrident lorsqu'elles rencontrent les séquences complémentaires. La température permet aux liaisons hydrogènes de se reformer.
- **Élongation** : Elle se fait à 72°C. La Taq polymérase (ADN polymérase), catalyse la réplication à partir des ADN monocaténares amorcés de façon sélective (la sélectivité découle du choix des amorces).

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cibles.

2.3.2. Mode opératoire

2.3.2.1. PCR ITS1 (Internal Transcrit Spacer 1)

La région ITS1 s'étend de 50 à 350 pb et est située entre les gènes ARNr 18S et ARNr 5.8S du chromosome 27 (Schönian et al., 2003). Cette région a une conservation suffisamment élevée pour être une cible PCR de *Leishmania*, son polymorphisme permet le typage de plusieurs espèces, comme *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. turanica*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* (Cupolillo et al., 1995, Schönian et al., 2001, Schönian et al., 2003, Mauricio et al., 2004, Odiwuor et al., 2011).

- **Préparation du Mix**

La PCR a été effectuée pour les 12 ADN de *Leishmania* (9 isolats à typer et les 3 souches marqueurs). La PCR-ITS1 a été fait selon le protocole de Schonian (2003), en utilisant les amorces LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') et L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT-3'), 4 µl de MgCl₂, 200 µl de dNTP's, 2 µl de Taq polymérase. 5 microlitres de l'ADN de *Leishmania* sont ajouté par la suite au 25 microlitres du mix préparé dans des micro-tubes destinés au thermocycleur (figure 14).



Figure 14 : Préparations du Mix

- **Amplification (PCR)**

Le thermocycleur a été programmé selon le protocole de **Schonian et al. (2003)**. Les conditions d'amplification étaient 94 °C pendant 4 min, suivies de 36 cycles de 95°C pendant 40s, 53°C pendant 30s, 72°C pendant 60s et 72°C pendant 6min. Les ADN des souches de référence et de l'eau ont été utilisés comme témoins positif et négatif.

- **Préparation du gel d'agarose**

Pour la préparation du gel d'agarose, 1g d'agarose ont été dissout dans 100 ml de tampon TAE (1X) selon le protocole de **Schonian (2003)** et chauffé dans le micro-onde jusqu'à ébullition. Après un léger refroidissement de la solution d'agarose, 5µl de bromure d'éthidium (BET) ont été ajouté dans le but de visualiser les produits amplifiés sous UV. Il s'agit d'un agent intercalant les acides désoxynucléotidiques. Le gel a été coulé dans la cuve d'électrophorèse, munie d'un peigne. Après polymérisation, le peigne a été enlevé et les ADN ont été spotés délicatement dans les puits. Une migration électrophorétique horizontale a été par la suite réalisée pour 40mn à

80volts. Il est à signalé qu'un témoin positif et un témoin négatif (H₂O) et des marqueurs de poids moléculaire (PM) ont été utilisé pour vérifier la présence ou l'absence du gène ITS1 amplifié. Les produits PCR ont été visualisés sous lumière UV (**Figure 15**).

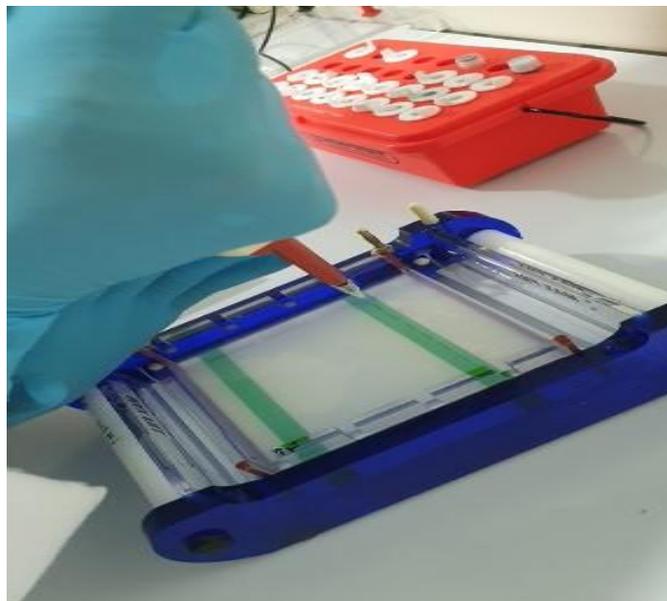


Figure 15 : Introduction des amplifias dans les puits du gel d'agarose 1%.

2.3.2.2. La PCR Hsp70

L'amplification de HSP70 a été réalisée en appliquant des amorces spécifiques de l'HSP70 selon le protocole d'Aiwera (2013). Les amorces HSP70 sen (5'- GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3') et HSP70 ant (5'- CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3') ont été utilisé (Garcia, et al. 2004). L'amplification a été réalisée à l'aide du Thermocycler selon le protocole décrit par Nemati et al. (2017). Le cycle de dénaturation initial pour les réactions de PCR été effectué à 94°C pendant 5min, suivi de 30 cycles à 94°C pendant 5min, 61°C pendant 1min et 72°C pendant 1 min, 72°C pendant 5 min. Les produits amplifias ont été passé sur un gel d'agarose à 1% comme précédemment et visualisés sous lumière UV.

2.4. PCR-RFLP

2.4.1. Principe

La Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), est une méthode d'analyse génétique utilisée pour la première fois en 1980 par **Botstein et al. (1980)**. Elle permet de détecter le polymorphisme génétique inter ou intra espèce dans les régions codantes et non codantes (**Rasmussen, 2012**).

2.4.2. Mode opératoire

Pour effectuer l'analyse PCR-RFLP, les produits de PCR-ITS1 ont été digérés en utilisant l'enzyme de restriction HaeIII, selon le protocole de **Schonian (2003)**. Les amplifias digérés ont été incubées pendant une nuit à 37°C. Les fragments de restriction résultants ont été séparés sur des gels d'agarose à 3% et la taille des fragments a été estimée par comparaison avec des bandes de taille d'ADN des souches marqueurs, ainsi que le marqueur de taille de 100 pb. Les distances de migration des différents bandes sont spécifiques des espèces de *Leishmania*.

CHAPITRE III : RESULTATS

1 Culture des parasites

La culture est une étape primordiale pour effectuer l'identification moléculaire des parasites. Quatre mois ont été consacrés pour la culture des parasites sur les trois milieux de cultures utilisés au cours de notre étude à savoir le NNN, le SL et le RPMI-1640.

Dans cette partie de notre mémoire, notre but été d'évaluer qualitativement le comportement des parasites dans ces milieux, sachant que les parasites du genre *L. infantum* sont très difficiles à entretenir et à croître.

L'observation a été faite après les sept premiers jours des repiquages sur milieux. Dans l'ensemble, la croissance des 9 isolats été très difficiles même avec utilisation de milieux très riches en compléments alimentaires comme le RPMI-1640. Cette croissance difficile a freiné l'obtention du culot parasitaire indispensable à l'identification moléculaire par PCR. De plus, nous avons observé une croissance différente d'une souche à l'autre et nous n'avons pas pu observer une corrélation entre le taxon (zymodème) et la croissance sur milieux. En effet, la croissance des souches LIPA118 (souche appartenant à une LV MON-1) et LIPA2091 (MON-80) été meilleur comparée aux souches LIPA250G, LIPA497 et LIPA472 du zymodème MON-1 et LIPA853 du zymodème MON-80. Ces dernières ont poussées légèrement bien les 2 premiers jours, puis ont connues une période de stagnation de 2 à 3 jours (figure 16 et 17). Par ailleurs, la souche 264 MON-1 a eu une croissance très difficile et une multiplication très lente des parasites. La souche LIPA 121 du zymodemes MON-34 a eu un tout autres comportement, les premiers jours les parasites semblé ne pas pousser mais au 3ème jour les parasites sont devenu actifs Par ailleurs, la souche LIPA 336 MON-1 a eu une croissance très difficile et une multiplication très lente des parasites. À partir de la troisième semaine le nombre de parasites a augmentée pour la majorité des souches. Le graphe suivant présente la croissance des leishmanies pendant les premiers jours du repiquage et après 7 jours sur milieux NNN.

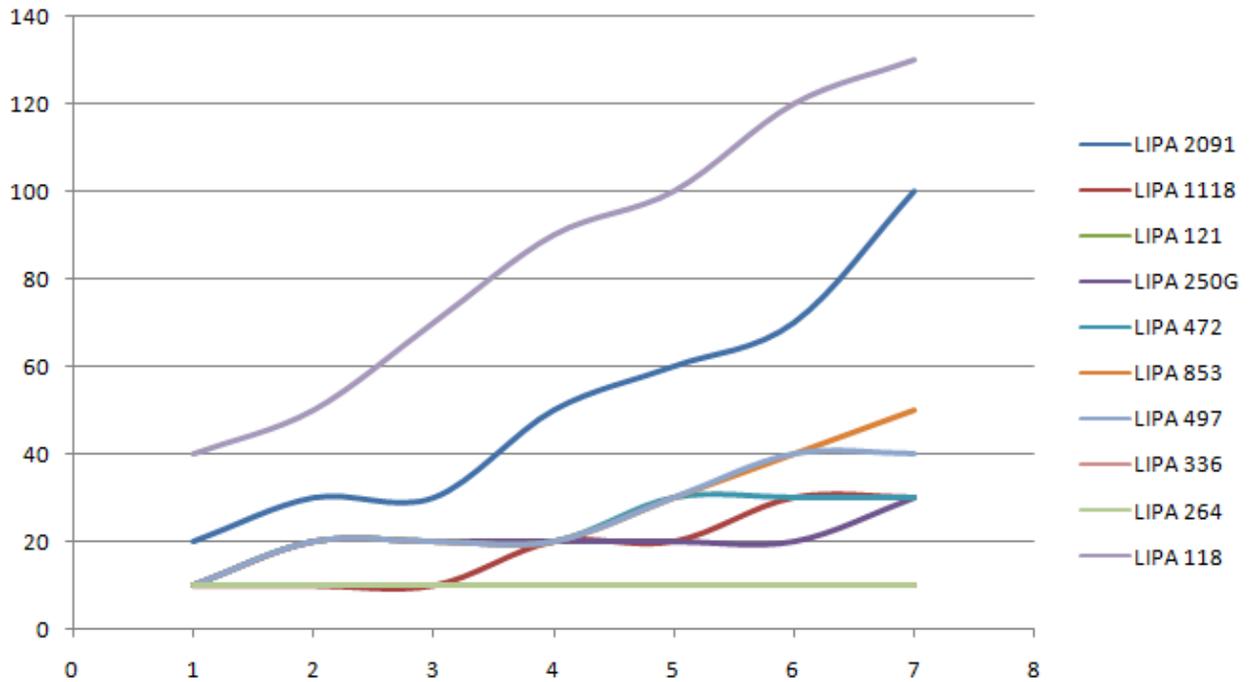


Figure 16 : Dynamique de croissance des souches sur le milieu NNN lors de la première semaine du 1er repiquage

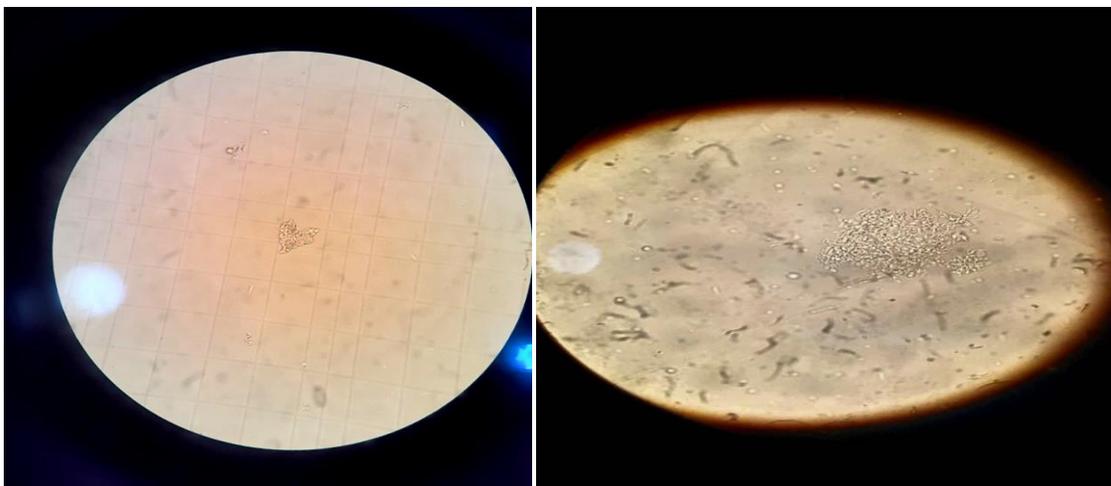


Figure 17 : Observation de la souche LIPA2091 sous le microscope optique Gr×40. A gauche le premier jour de décongélation, à droite après 7 jours du premier repiquage sur NNN.

Après 7 jours de croissance, un repiquage sur milieux liquides RPMI+SVF 10% a été effectué pour toutes les souches. Le milieu RPMI+SVF 10% est riche en facteurs de croissance qui accélère la vitesse de reproduction des parasites. La croissance des souches sur RPMI est meilleur que celle sur NNN et la richesse varie de 10^2 parasites/ml (+) à 10^4 parasites/ml (++) la première semaine, et a atteint les 10^6 parasites/ml (+++) la troisième semaine (figure 18 et 19). Dans l'ensemble, les parasites avaient un bon aspect, leurs tailles étaient similaires, et leurs flagelles très développés. Les résultats d'observation des souches cultivées sur RPMI-1640 sont illustrés dans les figures 18 et 20.

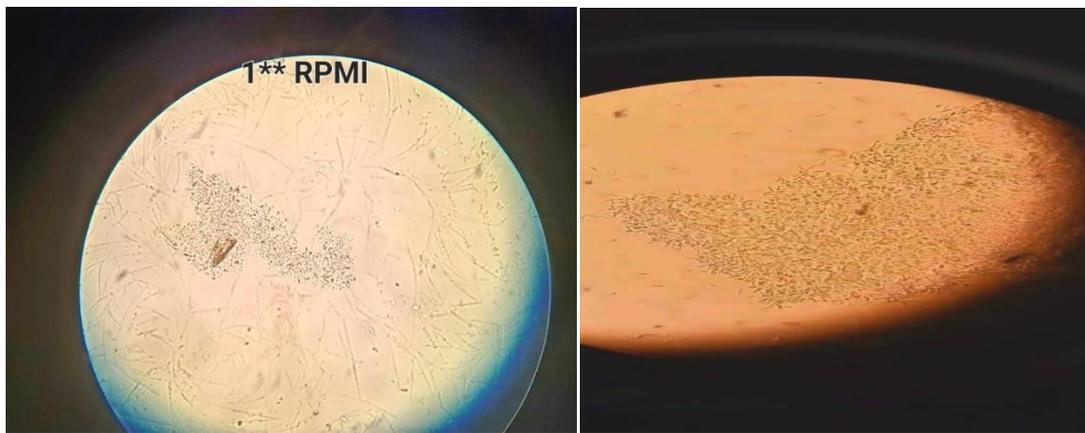


Figure 13 : Observation de la souche LIPA2091 et la souche de référence LIPA118 sous microscope optique au Gr×40, après 10 jours du deuxième repiquage sur RPMI-1640.

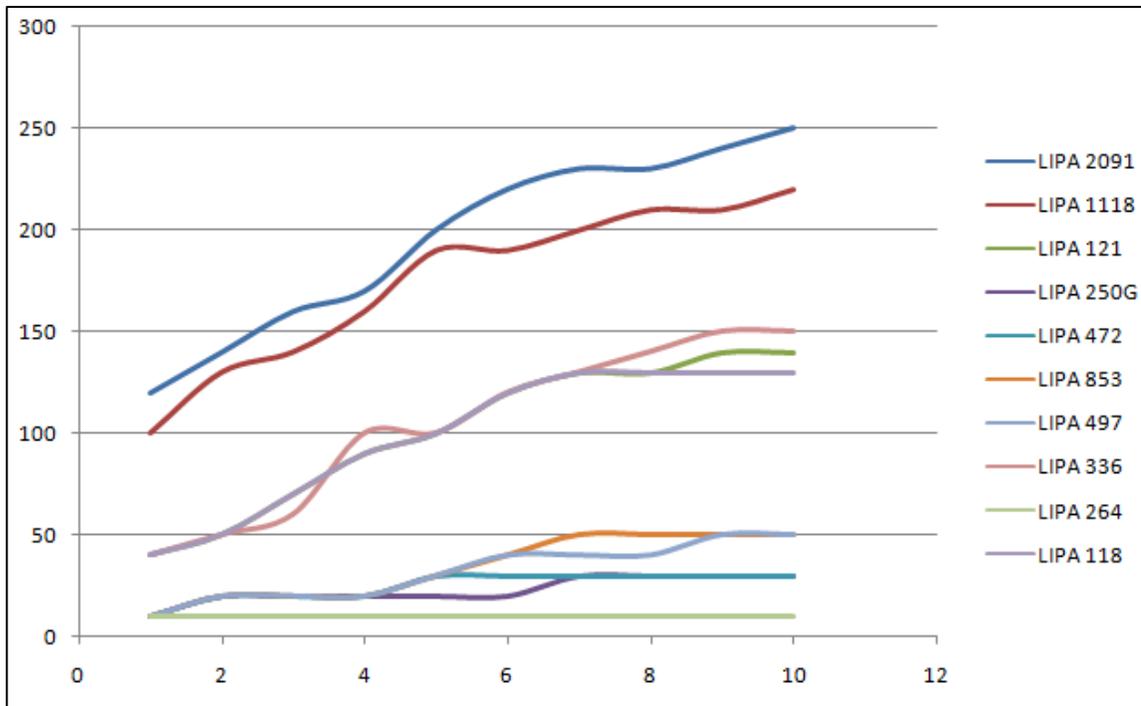


Figure 19 : Dynamique de croissance des souches sélectionnées sur le milieu RPMI-1640 après 10 jours de croissance (2eme repiquage).

2 Aspect épidémiologique et moléculaire de la LCan

Profils électrophorétiques des souches

L'électrophorèse des isoenzymes, révèle la présence de 3 zymodèmes MON-1, MON-80 et MON-34 chez 9 isolats sélectionnés. Le zymodème MON-1 est le plus abondant avec 55,6% des isolats typés, suivie du zymodème MON-80 chez 33,3% et enfin un seul zymodème appartient au MON-34 (11%) (Tableau 1).

Tableau I : Profil électrophorétique des souches de *Leishmania* typées (souches de références : LIPA118 (LV mon-1 du complexe *L. infantum*), MHOM/DZ/05/LIPA07/05(LC MON-301 du complexe *L. tropica*) et MHOM/DZ/82/LIPA80 (LC MON-25 du complexe *L. major*))

Code Souches	Localités	MDH	ME	ICD	PGD	G6PD	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT1	GOT2	PGM	FH	MPI	GPI	Zymodemes
LIPA 2091	Tizi Ouzou	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	MON - 80
LIPA 1118	Dely Ibrahim	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	MON - 80
LIPA 853	Alger	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	MON - 80
LIPA 121	Azazga	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 34
LIPA 472	Zeralda	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 1
LIPA 264	Tizi Ouzou	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 1
LIPA 497	Bouzareah	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 1
LIPA 336	Tizi Ouzou	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 1
LIPA 250G	Dely Ibrahim	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON - 1
LIPA 118	/	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	MON-1
MHOM/DZ/05/LIPA07/05	/	112	93	100	93	82	110	100	300	100	140	85	100	100	110	76	LC MON-301
MHOM/DZ/82/LIPA80	/	150	88	90	122	94	200	100	400	90	110	110	118	79	150	77	LC MON-25

2.2. Distribution Géographique

Les neuf (9) isolats correspondent à deux sites géographiques. Cinq (55,5%) sont groupés à Alger au nord du pays et quatre sont groupés à 30 km au sud des côtes méditerranéennes, et à 100 km à l'est de la capitale Alger. Cinq isolats appartenant au MON-1 se distribue à Tizi-Ouzou (2 isolats), Bouzarea (un isolat), Zéralda (un isolat^o et Alger (un isolat). 3 isolats MON-80 se distribue à Dely-Brahim (2isolats) et Tizi-Ouzou (un isolat). Enfin le Mon-34 est localisé à Azazga (figure 20)

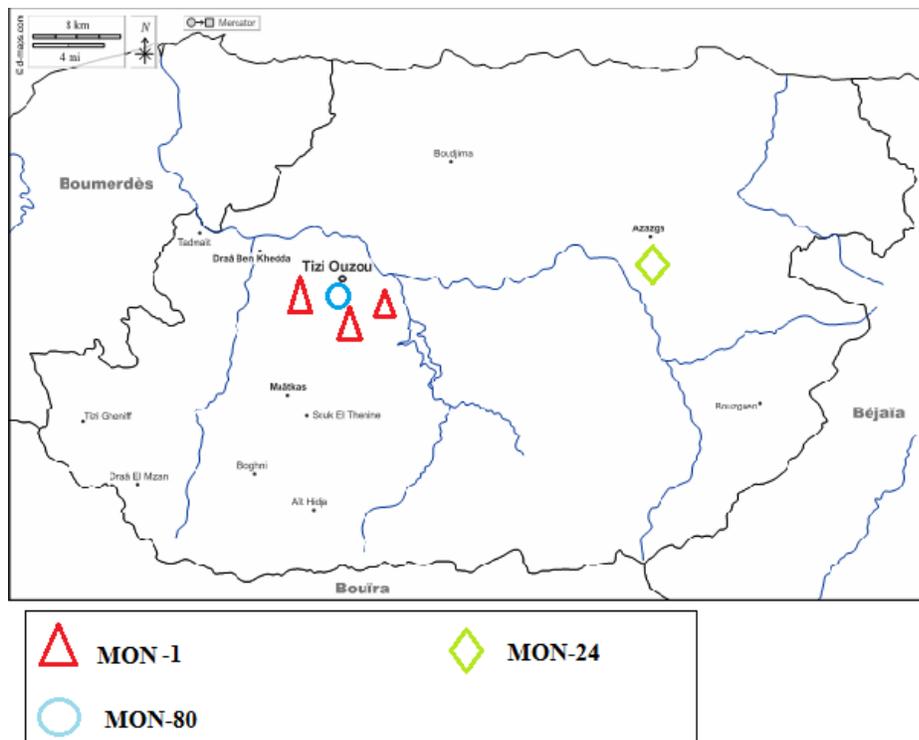
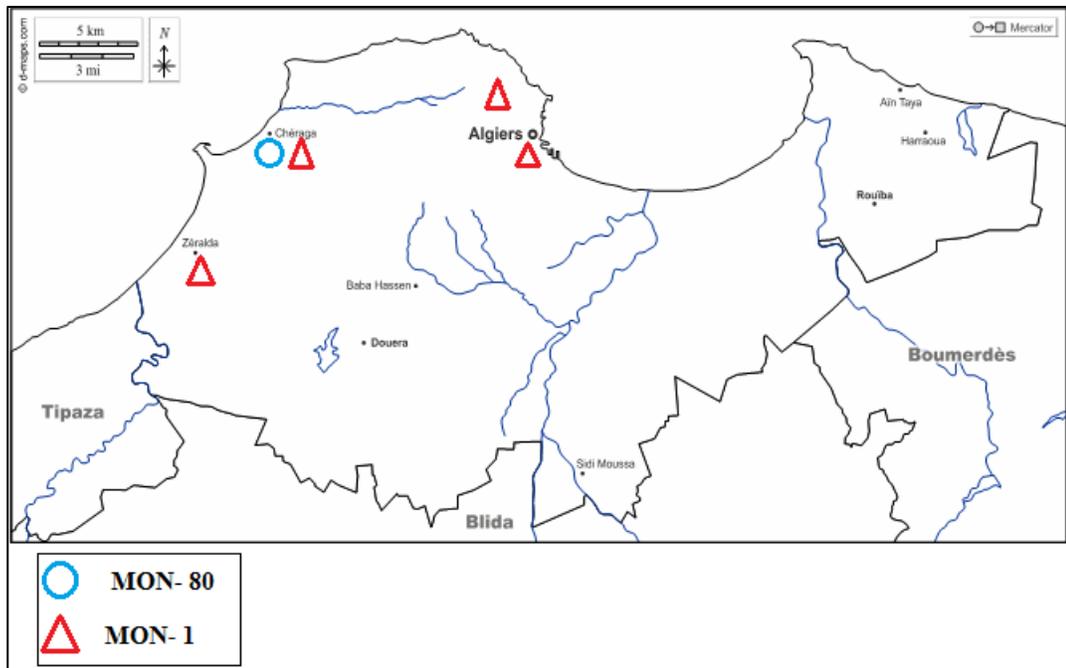


Figure 20 : Distribution Géographique des 3 zymodèmes des souches canines appartenant à *L. infantum* au nord de l'Algérie

3 Identification moléculaire des espèces de *Leishmania*

3.1 PCR ITS1

Les amplifiats PCR de la séquence ITS1 des souches de *Leishmania infantum* été obtenus chez 7 isolats sur les 9 étudiés, soit 77,7% (tableau 1). Nous n'avons pas obtenu d'amplifiât de 2 isolats (LIPA 472 et LIPA 121), probablement due à une mauvaise extraction ou quantité insuffisante de culot parasitaire. Les ITS1 des 7 isolats (**figure 21**), apparaît comme une bande distincte unique à environ 300pb. La comparaison de l'intensité de cette bande avec des bandes standard (marqueur de taille de 100pb), ainsi que les souches marqueurs (LEM75) nous a permis d'estimer la qualité d'ADN pour ces 8 échantillons.

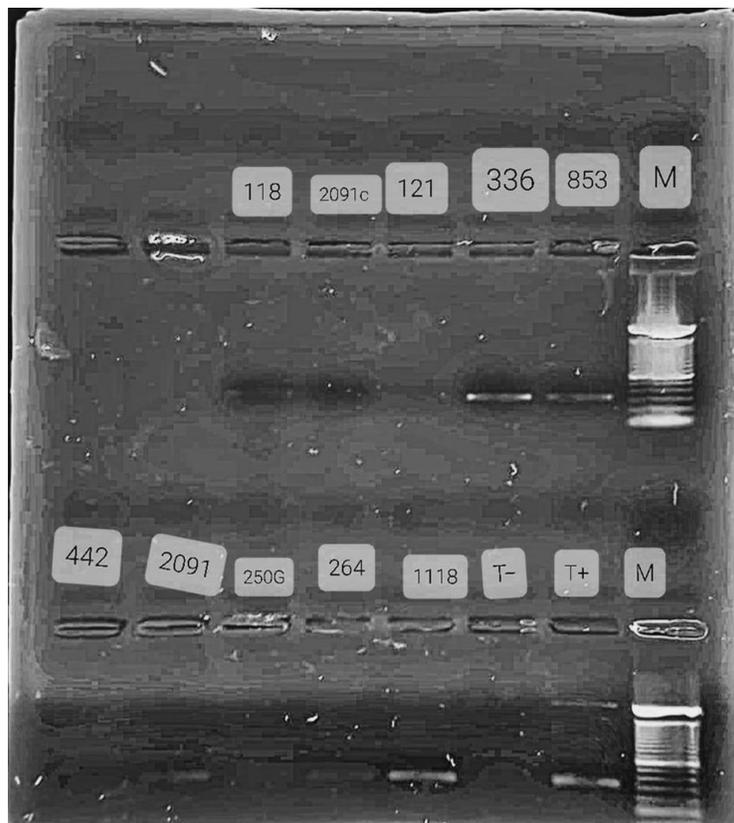


Figure 141 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR-TS1 (M : marqueurs, T+ Témoin positif T- Témoin négatif, LIPA1118, LIPA264, LIPA250G, LIPA2091, LIPA442, LIPA853, LIPA336, LIPA121, LIPA118, LIPA2091).

3.2 PCR Hsp70

Malgré plusieurs tentatives de changement du programme d'amplification de la région Hsp70 des extraits d'ADN des isolats *L. infantum*, aucune observation de bandes sur le gel ce qui signifie qu'il n'y a pas eu d'amplifications de la séquence ciblée (figure 22).

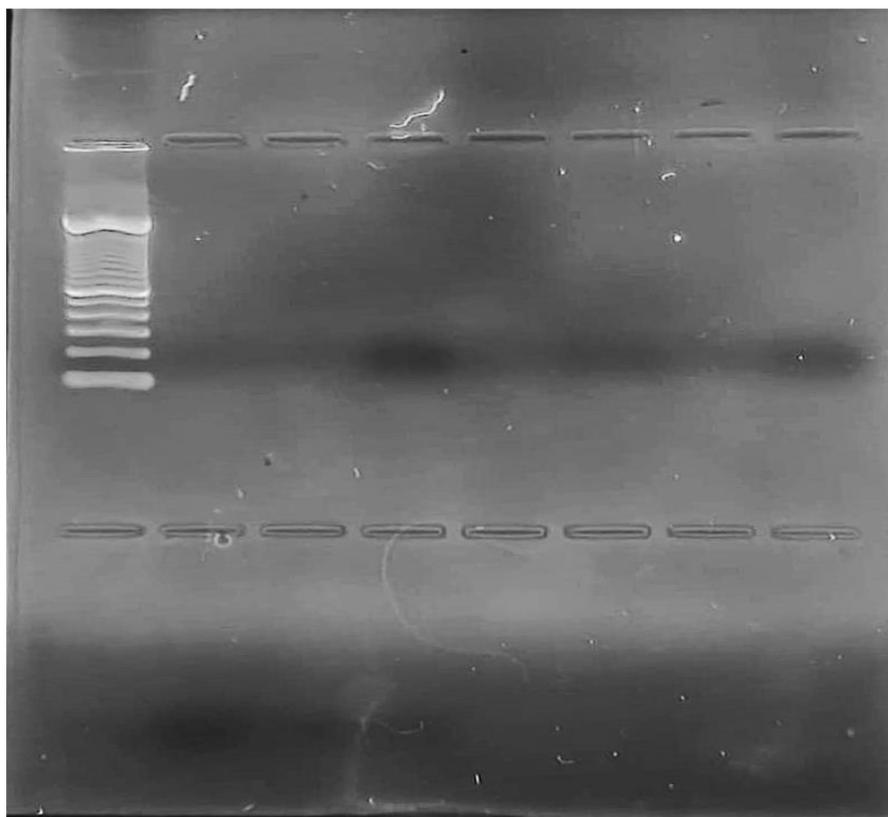


Figure 152 : Profils de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR-Hsp70

4 PCR-RFLP :

Les fragments de restriction résultants de la PCR-RFLP après digestion enzymatique par HaeIII, sont séparés sur un gels d'agarose à 3%. L'interprétation de ces résultats est effectuée en se basant sur l'observation directe dans le Trans illuminateur UV. Cet appareil nous permet de voir la taille des bandes. . L'ensemble de 7 PCR-ITS1 amplifiés se rapportaient au complexe *L. infantum*, avec apparition de trois bandes distinctes (**Tableau 2**).

Le résultat du typage moléculaire confirme le résultat du typage isoenzymatique, cependant le marqueur ITS1 ne permet pas de visualiser la variabilité des taxons 3 zymodèmes étudiés.

Tableau II : Les Tailles de bandes de *L. infantum* après digestion enzymatique par *HaeIII*

restriction enzyme × fragments (bp)	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. turanica</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamanensis</i>
	<i>HaeIII</i> (used in this protocol)	164 75 54	184 72 55	184 72 55	200 57 54 23	185 57 53 24	203 132	203 57 53 24	186 88 59	186 142	156 143	156 137

CHAPITRE IV : DISCUSSION

La leishmaniose viscérale canine est un problème majeur de santé publique, endémique dans les pays tropicaux et subtropicaux et mortelle chez l'homme et le chien (**Barati et al., 2015**). En plus des chiens symptomatiques, les chiens asymptomatiques semblent être une source d'infection à *Leishmania infantum*, agent causal de la LV humaine (LVH) dans l'ancien monde et les pays du bassin méditerranéen (**Pratlong et al., 2012**). Ainsi, l'identification des espèces en causes s'avèrent très indispensable dans les programmes de surveillance et de contrôle des hôtes réservoirs de la maladie.

En effet, **Pratlong et al (2012)** rapportent la présence de 12 zymodèmes appartenant au complexe *Leishmania infantum* chez le chien. Il s'agit des zymodèmes MON-1, MON-11, MON-24, MON-27, MON-30, MON-34, MON-77, MON-98, MON-108, MON-267, MON-278 et MON-281. Parmi ces taxons, MON-1 était largement prédominant, avec le plus grand nombre de souches (n = 1611, 78,2%) et la distribution géographique la plus large : l'Europe du Sud, l'Afrique et le Proche et Moyen-Orient. Ce zymodème était présent chez les humains, les chiens, les renards, les chats, les rats et les phlébotomes. Ce qui l'incrimine comme réservoir important dans la transmission de la maladie et plus particulièrement la LV qui est mortelle en absence de traitement. Dans les pays du Maghreb et particulièrement l'Algérie, Ce rôle de réservoir n'a été confirmé que suite aux travaux de **Belazzoug et al. (1984-1985 et 1987)**, qui ont signalé par typage isoenzymatique, la présence du zymodème MON-1 et l'ont incriminé dans le cycle de transmission et ainsi ils ont fait la corrélation entre le foyer de leishmaniose canine en Kabylie et la LVH. Il est a signalé que depuis les travaux des frères Sergent en 1910 (**Sergent et al., 1910**), le chien a été suspecté comme réservoir de la forme viscérale de la leishmaniose, et **Dedet et al., en 1977** ont montré que 11,4 % des chiens de la Grande Kabylie étaient atteints sans pouvoir isolé l'agent chez cet animal.

Dans notre étude, l'analyse des iso-enzymes effectuée au niveau du LEEPGP de l'IPA concorde avec ce qui a rapporté par **Pratlong et al. (2012)** et a différenciée les 9 souches étudiées en 3 zymodèmes de *L. infantum* (Tableau I, Figure 20). Il s'agit des zymodèmes MON-1, le plus identifié avec 56% des souches sélectionnées, suivi du MON-80 (33%) et MON-34 (11%). Ces deux derniers sont de petits variants du zymodème MON-1 dont la migration électrophorétique est différente au niveau d'une enzyme (MDH¹⁰⁴) pour le zymodème MON-34 à deux enzymes

(MDH¹⁰⁴ et NP₁¹³⁰) pour le zymodème MON-80 sur les 15 étudiées. Ces zymodèmes se distribuent plus particulièrement à Tizi-Ouzou (34%) et Dely-Brahim (22%). Ainsi la LCan, se localise dans le même territoire que la LVH avec une prévalence qui varie d'une région à une autre. En 2010, Adel avait rapporté une prévalence de 11,7% de LCan dans un groupe des chien errants, suivi de 9,7% de LCan chez les chiens de garde nationaux et 5,9% de LCan chez les chiens de ferme sur un ensemble de 462 chiens diagnostiqués. Plus récemment en 2015, Adel et al. (2015) rapportent une estimation de la prévalence de la leishmaniose du chien de 11 à 38% dans six localités le long d'un axe ouest-est dans la zone littorale algérienne sur un ensemble de 2184 chiens testés (Adel et al., 2015).

L'utilisation des cultures est utile non seulement pour confirmer le diagnostic mais aussi pour identifier l'agent causal. Il est à signalé qu'en Algérie, l'agent causal de la leishmaniose isolé chez le chien appartient au complexe *L. infantum* et plusieurs zymodèmes comme le MON-1, MON-24, MON-34, MON-77, MON-80 et le MON-269 ont été détectés chez le chien à ce jours (Belazoug et al., 1986; Harrat et al., 1996; Benikhlef et al., 2008; Ait-oudhia et al., 2011). La croissance de ces agents est très difficile dans les milieux de cultures et nécessite des repiquages successifs sur d'autres milieux comme le sérum de lapin coagulé additionnés avec le RPMI-1640 pour l'isolement du parasite (Jorge Alvar et al., 2004). Ainsi, l'identification rapide par les outils moléculaires s'avère très indispensable dans les situations d'isolement difficiles sur les milieux de cultures. Ces techniques permettent non seulement de détecter de très faibles quantités d'ADN protozoaire dans le matériel biologique, mais aussi permet de connaître l'espèce de *Leishmania* en cause et aide donc dans le traitement approprié (Aoun et al., 2012).

En plus de la MLEE, technique standard dans l'identification des espèces de *Leishmania*, nous avons aussi étudié les aspects épidémiologiques de la LCan dans l'Algérois en ciblant deux marqueurs moléculaires à savoir l'ITS1 et la HSP70. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et la RFLP qui sont considéré comme une simple et valable outil moléculaire pour détecter le parasite *Leishmania* et identifier les espèces en causes dans différents échantillons cliniques ont été utilisé (Muller et al., 2003 ; Schönian et al. 2003). La PCR ITS1 réalisées sur les 10 extraits d'ADN de *L. infantum* s'avère une technique prometteuse et a permis de confirmer les résultats de la MLEE, technique très lourde et nécessitant un isolement du parasite et de grande quantité du culot parasitaire qui est très difficile à réaliser pour les agents appartenant à *L.*

infantum. Cependant l'ITS1 ne permis pas de discriminer les différents variants de *L. infantum*, d'où la nécessité de trouver une autre cible comme la HSP70. **Garcia, et al., (2006)** ont été les premiers à identifier sa fonctionnalité pour diagnostiquer et différencier les espèces des sous-genres *Leishmania* et *Viannia*, complétées avec des techniques telles que le RFLP et le séquençage (**Cruz ML et al., 2015, Montalvo Am et al., 2010 , García AL et al., 2006, Montalvo AM et al., 2012-2014**).

Dans notre étude la PCR Hsp70 n'a pas donné de résultats, probablement due à une quantité très insuffisante de l'ADN parasites où la nécessité d'optimiser la technique. Il est signalé que **Van der Auwera, et al. (2013, 2015)** ont rapporté l'utilisation de cette cible dans la discrimination des variants de *plusieurs* espèces en circulation dans le monde, avec des résultats qui démontrent sa capacité discriminatoire (**Ovalle C et al., 2015, Montalvo Am et al., 2010, Saki J et al., 2010**). D'autres études avec un échantillon plus élevée est nécessaire afin d'évaluer cette cible moléculaire.

En Algérie, les chiens souffrant de leishmaniose ne sont généralement pas traités (**Eddaikra et al., 2018**), et les vétérinaires ont toujours recours à les euthanasiés. Au cours de la dernière décennie, des médicaments alternatifs au composés antimoniaux pentavalent tels que l'allopurinol (**Koutinas et al., 2001; Saridomichelakis et al., 2005**) sont devenu une arme thérapeutique efficace contre la LCan. En Algérie les vétérinaires administrent un traitement adéquat mais ce dernier n'est pas respecté par les propriétaires des chiens à cause de sa cherté, et son temps d'applications. Les vétérinaires sont donc souvent obligés d'euthanasier les chiens malades mais beaucoup d'étude récentes on prouvée que l'abatage des chiens pour but de contrôler la propagation de la leishmaniose a subis un échec cuisant et que ce n'est pas la méthode à suivre. Le contrôle efficace de la transmission de *L. infantum* nécessite des approches intégrées qui se concentrent non seulement sur le chien comme source indirecte, mais aussi sur le parasite et, surtout, sur le phlébotome vecteur (**Gálvez et al., 2018**).

Conclusion

La leishmaniose canine est une maladie grave, souvent mortelle pour le chien, elle occupe une place particulière parce qu'elle présente, dans de nombreux pays du pourtour méditerranéen et en Algérie particulièrement un vrai problème de santé publique. De nombreuses études épidémiologiques démontrent une étroite relation entre l'incidence des cas de leishmaniose viscérale et cutanée sporadique humaine et la prévalence clinique et sérologique observée chez le chien.

La LCan est en nette recrudescence en Algérie ; elle est présente aussi bien en ville que dans les zones rurales. Le risque de transmission de la maladie à l'homme est d'autant plus important que les mesures de prévention se font rares et sont anarchiques.

L'analyse et la compréhension de l'épidémiologie des aspects des leishmanioses dans notre pays sont basées sur la détermination des vrais réservoirs et vecteurs impliqués dans le cycle de transmission des différents agents pathogènes. Pendant longtemps, l'analyse des isoenzymes de *Leishmania* (MLEE) a contribué largement dans l'étude de la diversité de *Leishmania*. Cette technique reste la méthode standard pour l'identification précise des espèces avec une détermination du zymodème. A travers notre étude, nous avons pu évaluer le statut taxonomique de la MLEE, d'un nombre restreint d'isolats appartenant à *L. infantum*. Le zymodème MON-1 est le principal agent isolé à partir des cas canins sélectionnés (55,6%). Deux autres zymodèmes rares ont été signalés aussi chez cet animal à savoir le MON-80 (33,3%) et le MON-34 (11%), faisant du chien le principal réservoir de *L. infantum*. comme attendue, la distribution de ces zymodèmes suit la répartition de la LV dans la zone littorale algérienne.

Cependant, la MLEE présente certaines limites inhérentes car elle est laborieuse, longue et coûteuse, nécessitant l'isolement et la culture du parasite, d'où la nécessité d'un autre outil moléculaire complémentaire et plus rapide à réaliser comme les PCR-RFLP. Le gène ITS1 à confirmer le résultat de la MLEE, cependant il n'est pas discriminatif surtout avec le plus grand polymorphisme de *L. infantum* rencontré dans notre pays. Le marqueur Hsp70 semble être prometteur, cependant il nécessite une optimisation avec un plus grand nombre d'échantillon.

Références Bibliographique

- Achour-Barchiche N. et Madiou M. ; (2008)**: Recrudescence des leishmanioses cutanées .
- **Adel, A. et al, (2014)** Épidémiologie de Leishmaniose viscérale en Algérie : une mise à jour. PLoS ONE 2014, 9, e99207
- Akhoundi , M. et al, 2016)** A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis, 2016. 10(3): p. e0004349.
- Alvarez J, Conavate C, Molina R, Morino J et Nieto J. (2004)**: Canine leishmaniosis, advances in parasitology ; V57, 1-88
- Alvarez, J. ; Berne, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.** La leishmaniose dans le monde et les estimations mondiales de son incidence. PLoS ONE 2012, 7, 5671.
- Bachi F., (2006)**: aspect épidémiologique et clinique de la leishmaniose en Algérie, la lettre de l'infectiologue, N°1, 9-16.
- Barchiche, A.N.; Madiou, M.** Recrudescence des leishmanioses cutanées: À propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Foyer de leishmaniose cutanée : A propos de 213 cas dans la province de Tizi-Ouzou. Pathol. Biol. 2009, 57, 65–70
- Belazzoug, S.** Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie). Infection naturelle par *Psammomys obesus* (Rodentia Gerbilidae). Taureau. Soc. Pathol. Exode. Filiales 1983, 76, 146–149
- Belkaid, M.** Description de *Leishmania* proche de *Leishmania killicki* (Rioux, Lanotte et Pralong, 1986) en Algérie. Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg. Rév. 2009,

-Bourdoiseau G. et Charmette R., (2015): La leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: données actuelles sur une zoonose négligée, revue francophone des laboratoires, 477 ; 25-34.

-Boni M., et al (1999): intérêt des techniques de laboratoire dans le diagnostic de la leishmaniose canine; R.F.L; 310; 33-39.

-Carre, N. et al (2010): La leishmaniose viscérale : Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie Journal de Pharmacie Clinique. V 29, N° 3, 121-48,

-Cruz, M.L. et al (2015). Improving *Leishmania* species identification in different types of samples from cutaneous lesions. J Clin Microbiol. 2015;53:1339-41.
<https://doi.org/10.1128/jcm.02955-14>

-Cox , F.E ., History of human parasitology. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(4): p. 595-612.

-Desjeux P. (2001), The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95(3), 239-243.

-Eddaikra, N. ; Ait-Oudhia, K.; Kherrachi, I. ; Oury, B. ; Moulti-Mati, F.; Benikhlef, R.; Harrat, Z. ; Sereno, D. Sensibilité à l'antimoine des isolats de *Leishmania* collectés sur une période de 30 ans en Algérie. PLoS Négl. Trop. Cette. 2018, 12, e0006310

-Ferrer.L.M (1999): Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis an update. Proceeding of the international canine leishmaniasis form Barcelona, Span, p 6-10.

-Garni, R. ; Tran, A.; Guis, H.; Baldet, T.; Benallal, K.; Boubibi, S.; Harrat, Z. Télédétection, changements d'occupation du sol et maladies à transmission vectorielle: utilisation de l'imagerie satellitaire à haute résolution spatiale pour cartographier le risque d'occurrence de la leishmaniose cutanée à Ghardaïa, en Algérie. Infecter. Genet. Évol. 2014, 28, 725–734

-Garcia L., Kindt A., Bermudez H., Llanos-Cuentas A., De Doncker S., Arevalo J., Wilber Quispe Tintaya K., Dujardin JC 2004. Typage d'espèces indépendant de la culture des *Leishmanies* néotropicales à des fins cliniques validation d'un test basé sur la PCR ciblant les gènes de la

protéine de choc thermique 70. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2294-2297. doi:10.1128/jcm.42.5.2294-2297.2004.

-García AL, Parrado R, De Doncker S, Bermúdez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: Direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:368-71. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.06.009>

-Harrat, Z. et Belkaid, M., (2003): « Les leishmanioses dans l'Algérois : Données épidémiologiques » *Bull Soc PatholExot*, V. 96, n° 3, 212-214.

-Harrat, Z.; Boubidi, SC; Pratlong, F.; Benikhlef, R.; Selt, B.; Dedet, JP; Ravel, C. ;

-Ivens, A.C., et al., The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 2005. 309(5733): p. 436-42

-Izri A. et Belazzoug S., (2007): Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. *Revue Francophone des Laboratoires*, 396: 1- 10.

-Izri, A. ; Bendjaballah-Laliam, A.; Sereno, D.; Akhoundi, M. Mises à jour sur la dispersion géographique des parasites *Leishmania* causant des affections cutanées en Algérie. *Agents pathogènes* 2021, 10, 267

-Jaouadi, K. ; Haouas, N.; Chaara, D.; Gorcii, M.; Chargui, N.; Augot, D.; Pratlong, F.; Dedet, J.-P. ; Ettlijani, S.; Mezhoud, H.; et al Première détection de *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) chez *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), réservoir possible de la leishmaniose cutanée humaine en Tunisie. *Vecteurs parasites* 2011, 4, 159

-Lamonthe J; Quadrey C; Zarka P. ; (2004): Diagnostic de la leishmaniose canine; *prat.Méd.Chir. Anim. Cie*, V :39; N° 11; 41-46.

-Louis , C. ; (2009): La leishmaniose canine: ce que doit savoir le pharmacien d'officine

-Machado-Coelho G.L., et al., Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2005. 99(1): p. 55-61.

-Martinez-Calvillo, S., et al., Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*, 2004. 3(2): p. 506-17

-Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montaña I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*. 2010;137:1159-68. <https://doi.org/10.1017/s0031182010000089>

-Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1453-61. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>

-Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, et al. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: Evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;80:35-9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.012>

-Miai C et Campine L.; (2008): methodes for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection, *veterinary parasitology*; V.158; 274-287.

-Nemati S., Fazaeli A., Hajjarian H., Khamesipour A., Anbaran MF, Bozorgomid A., zarei F. 2017. Diversité génétique et analyse phylogénétique des parasites iraniens *Leishmania* basés sur la PCR RFLP du gène HSP70 et l'analyse de séquence. *Journal coréen de parasitologie* 55ÿ: 367-374. doi:10.3347/kjp.2017.55.4.367

-Oumeish , O.Y., Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol*, 1999. 17(3): p. 249-54. de doctorat en pharmacie, Université Nanvy-, p 108.

-Ovalle C, Díaz Y, Muvdi S. Polymerase chain reactionminiexon: A promising diagnostic method for mucosal leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2015;57:295-9. <https://doi.org/10.1111/ijd.12910>

-Saki J, Meamar A, Oormazdi H, Akhlaghi L, Maraghi S, Mohebbali M, et al. Mini-exon genotyping of *Leishmania* species in khuzestan province, southwest Iran. Iran J Parasitol. 2010;5:25-34

-Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, et al (2003) Diagnostic PCR et caractérisation de *Leishmania* dans des échantillons cliniques locaux et importés. Diag Microbiol Infect Dis 47ÿ: 349–358

-Schonian G, Fari ME, Lewin S, Schweynoch C, Presber W (2001) Molecular Epidemiol

Sergent, E.; Gueidon, E. Chronique duboutond’Orient en Algérie. «Le clou de Mila». Arch. Institut. Pasteur Algerie 1923, 1, 1–3

-Solano-Gallego L., Koutinas A., Miro G., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitology **165**, 1-18

-Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, et al. (2009) Leishmaniose en Turquie : Caractérisation moléculaire de la leishmanie à partir d'échantillons cliniques humains et canins. Trop Med Int Santé 14ÿ: 1–6.

-Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schonian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. J Clin Microbiol. 2014;52:1098-104.<https://doi.org/10.1128/jcm.02936-13>

-Worthey, E.A., et al., *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. Nucleic Acids Res, 2003. 31(14): p. 4201-10.

Annexes

Appareillages

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage : Agitateur magnétique, microscope optique (MOTIC), centrifugeuse (JOUAN), bec bunsen (PROPANGAS), balance de précision électronique, étuves réglées à 25°C, 26°C et à 37°C (JOUAN), hotte à flux laminaire (FASTER BH-EH 2004), bain-marie (MEMMERT), vortex (FISHERBRAND), et pipetus (JUNIOR), Thermocycleur.

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| -Microscopes Optique | -Etuves D'Incubation (a 37° C) |
| -Bec Bunsen | -Etuve Pasteur (a 25°C) |
| -Centrifugeuse | -Hotte a Flux Laminaire |
| -Bain Marie | -Thermocycleur |
| -Balance de précision électronique | -Vortex |
| -Pipetus | |

Verreries

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| -Tube a vis stériles | -Erlenmayer |
| -Lame et Lamelles | -Verre a pied |
| -Bécher | -Pipette Pasteur Steriles |

Réactifs et Solutions

Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau physiologique (0,9%), antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine : GECTAPEN), Formaldéhyde (formol) dilué à 4% (PANREAC), Acide Chlorhydrique (HCL), Hydroxyde de Sodium (NaOH), bleu de Trypan (RAL555), DMSO (Diméthylsulfoxyde), Sérum de veau Fœtal (SFV), alcool, sérum de lapin, Agar agar

Milieux de cultures

Les milieux de culture ayant servis à l'entretien des l'isolat sont : le milieu NNN (Novy Nicolle McNeal) **(Nicolle,1908)** et sérum de lapin **(Belkaid et al., 1996)**. , le milieu utilisé pour l'enrichissement des souches est le milieu RPMI (Roswell Park Mémorial Institute) 1640 +10% SVF (Sérum de Vœu fœtal).



Figure 16: Milieu NNN



Figure 17 :RPMI 1640