

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البليدة I
Université Saad Dahleb Blida I



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de

Master en Biologie

Filière : sciences biologiques

Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème

Mise au point d'une QRT PCR (RV1, RV2) pour le diagnostic de la Leishmaniose

Présenté par :

Bendaikha Cirine

Mohammedi Sara

Soutenu le :22/06/2025

Devant les membres du jury :

Mme Kadri. F

Mr Benyahia. N

Mr Abdelouahed. K

Mme Hamzi.W

Mme Saadi.L

MCA/USDB1

MAA/USDB1

Pr /HCA

MCA /USDB1

Pr/USDB1

Présidente

Examineur

Promoteur

Co promotrice

Invité d'honneur

Année universitaire : 2024/2025

Remerciement :

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **Allah**, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la santé, la persévérance et le savoir nécessaires à l'accomplissement de ce mémoire.*

*Nous exprimons également notre sincère reconnaissance à **Pr Abdelouahed** notre promoteur, pour son accompagnement tout au long de ce projet. Son soutien, sa disponibilité et ses conseils avisés ont été essentiels à notre progression. Grâce à lui, nous avons pu acquérir de solides connaissances et développer nos compétences, notamment lors des manipulations. Nous le remercions chaleureusement pour son engagement et son aide précieuse.*

*Nos remerciements les plus sincères vont à Mme **Hamzi** notre co-promotrice, pour son soutien constant et ses conseils judicieux. Sa bienveillance et sa disponibilité nous ont été d'une grande aide, et son accompagnement a représenté un véritable atout pour mener à bien ce travail. Son implication et son sens du partage ont été très précieux pour nous.*

*Nous exprimons aussi notre gratitude à **Mme Kadri**, présidente du jury, et à **Mr Benyahia**, examinateur, pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour l'intérêt qu'ils y ont accordé.*

*Nous tenons à remercier **Mme Saadi**, chef d'option, Pour son soutien tout au long de notre parcours et pour l'attention qu'elle porte aux étudiants, sa disponibilité et son engagement sont très appréciés.*

*Nous adressons un immense merci à **Yasmine**, qui a été un véritable pilier durant toute la période de stage. Toujours présente pour nous épauler, répondre à nos questions et nous guider dans nos tâches, elle a fait preuve d'une générosité et d'un esprit d'entraide exceptionnels. **Hassina**, quant à elle, a su, par sa gentillesse et sa disponibilité, nous encourager et nous assister avec bienveillance tout au long de cette expérience. Leur soutien et leur patience ont rendu notre apprentissage plus fluide et plus agréable. Nous leur sommes profondément reconnaissantes.*

*Nous remercions également les résidents, **Dr Maiouh** et **Dr Rekaici**, pour leur patience et leur disponibilité, que ce soit pour répondre à nos interrogations ou nous accompagner lors des manipulations.*

Enfin, nous remercions chaleureusement tout le personnel du service de parasitologie et de mycologie, pour leur accueil, leur disponibilité et leur précieuse collaboration, qui ont grandement contribué à faire de cette expérience un moment formateur et enrichissant.

Dédicace :

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers **Allah**, le Tout-Puissant, pour ma avoir accordé la santé, la persévérance et le savoir nécessaires à l'accomplissement de ce mémoire.*

*À **ma chère mère et à mon père** adoré, les piliers de ma vie, dont l'amour incommensurable et le soutien indéfectible m'ont toujours portée et guidée. Votre présence est mon refuge, votre confiance, ma force, et vos prières, ma lumière.*

*À **mes sœurs**, Sana et Selma, et à **mes frères**, Alla et Sofiane, mes premiers amis, mes confidents, ceux qui partagent mes joies et allègent mes peines. Votre amour et votre présence illuminent mon quotidien et rendent chaque instant plus précieux.*

*À **mes nièces**, Israa, Maria et Raouene, et à **mes neveux**, Imad et Amine, ces petites étoiles qui apportent tant de bonheur et d'innocence dans ma vie. Que vos rires résonnent toujours et que vos rêves se réalisent.*

*À **ma binôme**, une alliée précieuse dans cette aventure. Grâce à notre complicité et à notre engagement, nous avons relevé chaque défi avec persévérance. Ce mémoire est le fruit d'un véritable travail d'équipe, et je suis fière du chemin parcouru ensemble.*

*À **mes amies** Lyna, Hanane, Zakia, Sirine et Zineb, pour votre amitié sincère, votre écoute et vos encouragements constants. Merci d'avoir été là, chacune à votre manière, dans les moments de doute comme dans ceux de joie.*

*Je dédie enfin ce travail à **ma grand-mère** bien-aimée, Rabeia, Allah yarhamha. Son amour et sa sagesse continuent de vivre en moi, et je sais qu'elle aurait été fière de moi aujourd'hui. Qu'Allah l'accueille en Sa miséricorde et lui accorde la paix éternelle.*

CIRINE

Dédicace :

*Tout d'abord, je tiens à remercier **ALLAH** le tout puissant, le miséricordieux de m'avoir accordé le courage, la force et surtout la santé d'accomplir ce travail.*

*Je dédie ce mémoire à **mes chers parents** quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai vous remercier comme il se doit. Votre amour, affection, soutien et bienveillance ont toujours été ma source de force et ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*À **mon frère et ma sœur**, qui mon toujours soutenu et consolé tout au long de cette aventure merci pour votre présence réconfortante, et votre amour inconditionnel.*

*À **mes amies** (Radia, Aya, Hanane, Nouhad, Lyna, Sirine, Hanane, Zakia, Zineb) merci pour votre présence, vos paroles réconfortantes, nos rires partagés qui ont illuminé mes journées.*

*À **ma famille**, toujours présente de loin comme de près votre soutien et invocations ont été d'une grande aide.*

*À **ma binôme Cirine**, merci pour ton sérieux, ta patience, ton implication et ta bienveillance. Ce mémoire nous l'avons porté ensemble. Ta présence a transformé les difficultés en force, je suis reconnaissante d'avoir partagé ce chemin avec toi.*

SARA

Résumé

Ce travail s'inscrit dans une démarche d'optimisation du diagnostic de la leishmaniose à travers le développement d'une qRT-PCR utilisant les amorces RV1/RV2 ciblant le kADN de *Leishmania* sp. Une étude a été menée sur un échantillon de 30 patients suspects, recrutés à l'Hôpital Central de l'Armée (HCA), combinant plusieurs techniques de diagnostic : les méthodes classiques (examen direct, culture), sérologiques (ELISA, Western blot) et moléculaires (PCR classique, RT-PCR par kit commercial, qRT-PCR avec SYBR Green).

L'examen direct a permis de détecter la présence de formes amastigotes dans 25% des cas, tandis que la culture sur milieux NNN n'a pas permis d'obtenir des résultats concluants en raison de contaminations fréquentes. Les tests sérologiques ont montré une sensibilité variable, avec un taux de positivité de 14% pour l'ELISA et de 29 % pour le Western blot.

Les résultats moléculaires ont révélé une nette supériorité des techniques en temps réel : la RT-PCR réalisée avec le kit Sacace Biotechnologies et la qRT-PCR utilisant SYBR Green ont détecté l'ADN parasitaire dans 43.33% des échantillons. Les courbes sigmoïdes franchissant nettement le seuil de fluorescence ont confirmé la présence du kADN de *Leishmania*. En revanche, la PCR classique n'a permis la détection que dans 23.33% des cas.

Ces résultats montrent une parfaite corrélation entre les deux méthodes de RT-PCR, avec une sensibilité de 100 % chez les cas confirmés, contre des performances moindres pour la PCR classique. La qRT-PCR avec SYBR Green constitue ainsi une méthode rapide, sensible et adaptée aux laboratoires à ressources limitées pour le diagnostic de routine de la leishmaniose.

Mots clés : *Leishmania* sp., RV1/RV2, PCR en temps réel, SYBR Green, kit Saccace, mise au point.

Abstract

This work is part of an effort to optimize the diagnosis of leishmaniasis through the development of a qRT-PCR using RV1/RV2 primers targeting the kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania* sp. A study was conducted on a sample of 30 suspected patients, recruited at the Central Army Hospital (HCA), combining several diagnostic techniques: classical methods (direct smear, culture), serological tests (ELISA, Western blot), and molecular techniques (conventional PCR, RT-PCR using a commercial kit, and qRT-PCR with SYBR Green).

Direct examination detected amastigote forms in 25% of cases, while culture on NNN medium failed to produce conclusive results due to frequent contaminations. Serological tests showed limited sensitivity, with a positivity rate of 14% for ELISA and 29% for Western blot.

Molecular results demonstrated the clear superiority of real-time techniques: RT-PCR using the Sacace Biotechnologies kit and qRT-PCR with SYBR Green detected *Leishmania* DNA in 43.33% of the samples. Sigmoid amplification curves crossing the fluorescence threshold confirmed the presence of kDNA. In contrast, conventional PCR only detected the parasite in 23.33% of cases.

These findings show a perfect correlation between both RT-PCR methods, with 100% sensitivity in confirmed cases, whereas conventional PCR showed lower performance. Thus, qRT-PCR with SYBR Green stands out as a rapid, sensitive, and suitable method for routine leishmaniasis diagnosis in resource-limited laboratories.

Keywords: *Leishmania* sp., RV1/RV2, real-time PCR, SYBR Green, Saccace kit, method development.

المخلص

يندرج هذا العمل في إطار تحسين تشخيص داء الليشمانيات من خلال تطوير تقنية qRT-PCR باستخدام البادئات RV1/RV2 التي تستهدف الحمض النووي الكينيتوبلاستي (kDNA) الخاص بـ *Leishmania sp.* تم إجراء دراسة على عينة مكونة من 30 مريضاً مشتبهاً في إصابتهم، تم اختيارهم من المستشفى المركزي للجيش (HCA) ، باستخدام عدة تقنيات تشخيصية: الطرق التقليدية (الفحص المباشر، الزرع)، الطرق المصلية (اختبار ELISA ، اختبار اللطخة الغربية (Western blot)، والتقنيات الجزيئية (PCR) التقليدي، RT-PCR باستخدام مجموعة تجارية، و qRT-PCR باستخدام صبغة SYBR Green).

سمح الفحص المباشر بالكشف عن الأشكال الأماسيتوغوتية في 25% من الحالات، بينما لم تُعطِ الزراعة على وسط NNN نتائج مؤكدة بسبب التلوث المتكرر. أظهرت الفحوصات المصلية حساسية منخفضة، حيث بلغت نسبة الإيجابية 14% لاختبار ELISA و 29% لاختبار Western blot.

كشفت النتائج الجزيئية عن تفوق واضح لتقنيات الوقت الحقيقي؛ حيث تمكنت RT-PCR باستخدام مجموعة Sacace Biotechnologies و qRT-PCR بصبغة SYBR Green من كشف الحمض النووي الطفيلي في 43.33% من العينات، من خلال منحنيات سيغمويدية تجاوزت عتبة الفلورية، مما أكد وجود الحمض النووي الخاص بالليشمانيا. في المقابل، تمكن PCR التقليدي من الكشف فقط في 23.33% من الحالات.

تُظهر هذه النتائج تطابقاً تاماً بين الطريقتين الجزيئيتين (RT-PCR) و (qRT-PCR)، مع حساسية بلغت 100% لدى الحالات المؤكدة، مقارنة بأداء أضعف لـ PCR التقليدي. وعليه، تُعد تقنية qRT-PCR باستخدام SYBR Green طريقة سريعة، حساسة، ومناسبة جداً للمختبرات ذات الموارد المحدودة من أجل التشخيص الروتيني لداء الليشمانيات.

الكلمات المفتاحية : *Leishmania sp.* ، RV1/RV2 ، تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي ، SYBR Green ، مجموعة Sacace ، تطوير الطريقة.

Sommaire

Résumé	1
Liste d'abréviation	
Liste des tableaux	
Liste des figures.....	
Introduction :	1
Premier chapitre : GÉNÉRALITÉS	
1.1 Les leishmanioses	3
1.1 Historique	3
1.1.1 Dans le monde.....	3
1.1.2 En Algérie :.....	3
1.2 Le parasite (<i>Leishmania sp</i>)	4
1.2.1 Taxonomie	4
1.2.2 La morphologie.....	4
1.2.3 Génétique de leishmania.....	6
1.2.4 Le vecteur	6
1.2.5 Cycle de vie et mode de transmission.....	7
1.3 Réservoir de leishmania	7
1.4 Répartition géographique	8
1.4.1 En Afrique du nord	8
1.4.2 En Algérie.....	8
1.5 Aspect Clinique (Type de leishmaniose).....	9
1.5.1 La leishmaniose viscérale	9
1.5.2 La leishmaniose cutanée	10
1.5.2.1 La Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ).....	10
1.5.2.2 La leishmaniose cutanée sporadique (LCS)	10
1.5.3 La leishmaniose cutanée muqueuse (LCM).....	10
1.6 Diagnostic	11
1.7 Traitement.....	11
1.7.1 Pour la leishmaniose cutanée	11
1.7.2 Pour la leishmaniose cutanéomuqueuse	11
1.7.3 Pour la leishmaniose viscérale	11
1.8 Prophylaxie	11
1.8.1 Prophylaxie individuelle	11

1.8.2	Prophylaxie collective.....	12
Deuxième chapitre : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		
2.1	Matériels.....	13
2.1.1	Période et lieu d'étude.....	13
2.1.2	Population d'étude.....	13
2.1.3	Échantillonnage.....	13
2.2	Méthodes.....	15
2.2.1	Examen direct.....	15
2.2.1.1	Examen microscopique.....	15
2.2.1.2	Culture.....	15
2.2.1.3	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	17
2.2.1.3.1	PCR classique.....	17
2.2.1.3.2	QRT PCR.....	21
2.2.1.3.3	Sybr Green.....	24
2.2.2	Examen indirect.....	26
2.2.2.1	TDR (test de diagnostic rapide).....	26
2.2.2.2	ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	26
2.2.2.3	Western BLOT (WB).....	29
2.3	Analyse statistique.....	31
Troisième chapitre : RESULTATS ET DISCUSSION.....		
3.1	Résultats.....	32
3.1.1	Résultats globaux.....	32
3.1.2	Résultats parasitologiques.....	32
3.1.3	Résultats sérologiques.....	33
3.1.3.1	Résultats d'ELISA.....	33
3.1.3.2	Résultats du Western-Blot.....	35
3.1.4	Résultats moléculaires.....	36
3.1.4.1	Résultats de la PCR classique.....	36
3.1.4.2	Résultats RT PCR.....	37
3.1.4.3	Résultats PCR SYBR GREEN®.....	38
3.1.5	Exploitation épidémiologique.....	44
3.1.5.1	Répartition des résultats positifs selon le sexe.....	44
3.1.5.2	Répartition des résultats positifs selon l'Age.....	44
3.1.5.3	Répartition des résultats positifs selon le type de leishmaniose.....	45
3.1.5.4	Répartition des cas positifs selon les régions.....	45
3.1.5.5	Répartition des cas positifs selon la localisation des lésions.....	46

3.2 Discussion :	48
Conclusion et perspective	56
Références bibliographiques	57
<i>Annexes</i>	

Liste des abréviations

AC : Anti corps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Tampon d'éluion

AG : Anti gène

ARN : Acide ribonucléique

ARNg : Acide ribonucléique guide

ATL : Tampon de lyse tissulaire

AW1 : Tampon de lavage 1

AW2 : Tampon de lavage 2

BET : Bromure d'éthidium

CP : Comburant positif

CN : Comburant négatif

CT : Seuil de threshold

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FIX-RAL : Fixateur RAL

FN : Faux négatif

FP : Faux positif

HCA : Hôpital central d'armée

IV : Intraveineuse

L.Donovani : Leishmania Donovanii

Leish Sp: Leishmaniose Sp

L.infantum: Leishmania Infantum

LCL : Leishmaniose cutanée localisée

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse

LCM : Leishmaniose cutané muqueuse

LCM : Leishmaniose cutané muqueuse

LC : Leishmaniose cutanée

LV : Leishmaniose viscérale

MGG : May Grünwald Giemsa

MM : Master mix

MT : Marqueur de taille

NNN : Novy-MacNeal-Nicolle

OMS : Organisation mondiale de la santé

P (1, 2,3) : Patient (1, 2,3)

PBS : Tampon phosphate salin

Protéinase K : Sérine protéase

qRT PCR : Réaction de polymérase en chaîne en temps réel \ quantitative

RV1 : Amorce sens

RV2 : Amorce anti sens

SUB : Substrat

T+ /- : Témoin positif / négatif

TDR : Test de diagnostic rapide

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

VN : Vrai négatif

VP : Vrai positif

WB: Western blot

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
Tableau I	L'amorce utilisée pour le diagnostic de leishmaniose.	17
Tableau II	La composition de Mix excluant l'ADN avec volumes et concentrations.	18
Tableau III	Le programme de la PCR standard sur le thermocycleur.	18
Tableau IV	Préparation du master mix de la qRT PCR.	21
Tableau V	Programmation du thermocycleur (qRT PCR).	22
Tableau VI	Préparation du MM de Sybr Green.	24
Tableau VII	Programmation du thermocycleur pour Sybr Green.	25
Tableau VIII	Répartition des résultats de la PCR classique.	36
Tableau IX	Répartition des résultats positifs de la PCR classique selon la nature du prélèvement.	36
Tableau X	Répartition des résultats de la RT PCR avec le kit saccace (<i>leishmania spp</i> REAL TM).	37
Tableau XI	Répartition des résultats positifs de la RT PCR selon la nature du prélèvement.	37
Tableau XII	Répartition des résultats de la RT PCR par SYBR GREEN®.	38
Tableau XIII	Répartition des résultats positifs de la RT PCR par SYBR GREEN® selon la nature du prélèvement.	38
Tableau XIV	Comparaison entre les deux techniques d'extraction d'ADN.	39
Tableau XV	Comparaison entre l'examen direct et la PCR.	40
Tableau XVI	Comparaison entre l'ELISA et le WB.	40
Tableau XVII	Comparaison entre la PCR classique et la RT PCR.	40
Tableau XVIII	Analyse des résultats en fonction des technique (PCR classique et RT PCR).	40
Tableau XIX	Analyse des résultats en fonction de la PCR classique et PCR SYBR GREEN®.	41
Tableau XX	Comparaison entre la RT PCR et la PCR SYBR GREEN®.	41
Tableau XXI	Analyse des résultats en fonction des technique RT PCR et PCR SYBR GREEN®.	42
Tableau XXII	Comparaison entre les résultats des différentes techniques utilisées.	43
Tableau XXIII	Tableau Récapitulatif des techniques et leurs taux de sensibilité et de spécificité.	43
Tableau XXIV	Prévalence des leishmanioses chez les patients positifs.	45
Tableau XXV	Répartition des cas positifs selon la localisation des lésions.	46

Liste des figures

N°	Titres	Pages
Figure 01	La forme amastigote et promastigote de <i>leishmania sp.</i>	5
Figure 02	Phlébotome hématophage (ancien monde).	6
Figure 03	Le cycle de vie du parasite <i>leishmania</i> (CDC).	7
Figure 04	Répartition géographique de la leishmaniose en Afrique du nord.	9
Figure 05	Les différentes formes de leishmanioses.	11
Figure 06	Les étapes de réalisation des frottis cutanés.	14
Figure 07	Les étapes de la culture des sérosités.	16
Figure 08	Les étapes d'amplification d'ADN extrait.	19
Figure 09	Les étapes de révélation.	20
Figure 10	Migration des bandes sur le gel d'agarose.	20
Figure 11	Les étapes de réalisation et lecture des résultats de la RT PCR.	24
Figure 12	Les étapes de réalisation et lecture des résultats de la RT PCR par Sybr Green®.	25
Figure 13	Les étapes de réalisation d'ELISA.	29
Figure 14	Les étapes de réalisation du Western Blot.	31
Figure 15	Résultats globaux à la recherche de <i>leishmania sp.</i>	32
Figure 16	Résultats de l'examen direct des frottis cutanés à la recherche de <i>leishmania sp.</i>	33
Figure 17	La forme amastigote observée sous MO après coloration par MGG GR*100.	33
Figure 18	Résultats de l'examen sérologique ELISA à partir des prélèvements LV.	34
Figure 19	Résultats obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre lors de l'examen sérologique ELISA.	34
Figure 20	Résultats de l'examen sérologique Western Blot à partir des sérums des patients suspects de leishmaniose viscérale.	35
Figure 21	Résultats du Western Blot présence des bandes spécifiques 14KDa et /ou 16KDa.	35
Figure 22	Résultats de la PCR classique RV1/RV2.	37
Figure 23	Résultats de la PCR en temps réel avec le kit Saccace (<i>leishmania spp</i> REALTM).	38
Figure 24	Résultats de la RT PCR Sybr Green avec l'amorce RV1/RV2.	39
Figure 25	Répartition des résultats positifs selon le sexe.	44
Figure 26	Répartition des patients positifs selon l'âge.	44
Figure 27	Répartition des leishmanioses chez les cas positifs.	45
Figure 28	La répartition géographique (lieu d'infection et origine) des patients ayants une leishmaniose cutanée et viscérale.	46
Figure 29	Les différentes localisations des lésions de la leishmaniose cutanée.	47

Introduction

Introduction

Introduction :

Les leishmanioses constituent un groupe de maladies parasitaires vectorielles provoquées par des protozoaires du genre *Leishmania*, transmis à l'homme par la piqûre de phlébotomes infectés (insectes hématophages). Elles sont classées parmi les 20 maladies tropicales négligées. **(Touhami *et al.*,2022)**

Elles touchent environ 700 000 à 1 million de personnes chaque année à travers le monde, avec une répartition endémique dans plus de 90 pays, particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales. **(World Health Organization : WHO., 2019)**

La leishmaniose se manifeste sous trois formes cliniques principales :

La leishmaniose cutanée, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanéomuqueuse.

Parmi ses formes cliniques, la leishmaniose cutanée (LC) représente la forme la plus répandue et connaît une résurgence préoccupante. Cette maladie vectorielle touche de plus en plus de populations vulnérables. L'Algérie, après l'Afghanistan, constitue le deuxième foyer mondial de LC, bien que les données épidémiologiques y soient encore limitées.

(Izri *et al.*,2014)

Initialement confinée aux zones steppiques des hauts plateaux à climat semi-aride et aride, la LC connaît depuis quelques années une extension géographique inquiétante vers le nord du pays. Ce phénomène d'extension est également observé dans d'autres régions du Maghreb et du Moyen-Orient. **(Benikhlef *et al.*,2021)**

La leishmaniose représente un véritable problème de santé publique. L'Algérie classée parmi les pays les plus touchés au monde, occupant la deuxième place en termes d'incidence. Le diagnostic repose encore majoritairement sur des méthodes classiques, qui présentent toutefois des limites en termes de sensibilité et de spécificité. Le diagnostic moléculaire, quant à lui, reste limité à certains laboratoires spécialisés.

Dans cette étude nous allons **mettre au point une technique moléculaire baser sur la quantification de l'ADN (qRT PCR) et optimiser le protocole de la PCR classique basé sur les amorces RV1 /RV2 en l'adaptant au format PCR en temps réel tout en utilisant la technologie Sybr Green.**

Introduction

Sachant que l'amorce RV1/RV2 cible la région conservée des minicircles du kDNA plus précisément la région LT1 de *Leishmania sp* hautement répétée et spécifique. Cette région est connue pour sa haute sensibilité diagnostique.

Nous avons commencé dans le chapitre 1 par une synthèse des connaissances sur les leishmanioses, puis dans le chapitre 2 les matériels et méthodes utilisés. Le chapitre 3 concerne la présentation des résultats et discussion.

Enfin, nous terminons notre travail par une conclusion avec quelques perspectives.

Chapitre 1

Généralités

Chapitre 1

Premier chapitre : GÉNÉRALITÉS

1.1 Les leishmanioses

Les parasites du genre *Leishmania* infectent le système des phagocytes mononucléés, transmis à l'homme par la pique d'un insecte diptère hématophage au genre phlébotomus.

Les réservoirs de la leishmaniose varient selon la forme clinique (cutanée ou viscérale) et la région géographique, il généralement, des canidés, des rongeurs, des hyracoïdes ou encore des édentés. (Mokni. M.,2019).

1.1 Historique

1.1.1 Dans le monde

- C'est en 1885, en Inde que Cunningham observe pour la première fois le parasite sur des coupes histologiques d'un **Bouton de Delhi**. (Bachi F.,2001)
- Le parasite *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Le 23 mai 1903 William Boog Leishman publie ses observations sur le parasite responsable de la fièvre dumdum.
- Charles Donovan (1863-1951), un médecin militaire irlandais qui a participé au service sanitaire de la Couronne britannique en Inde, identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Il s'agit de parasites ovales colorés par le Giemsa dans des macrophages d'Indiens atteints de kala-azar. Le parasite fut nommé *Leishmania Donovan* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan. (Torres-Guerrero *et al.*,2017)

1.1.2 En Algérie :

Leishmaniose cutanée (*L. major*) :

- 1856 – Laghouat : Premiers cas suspects d'ulcérations cutanées chroniques. (Sergent.,1923)
- 1880–1890 – Biskra, Ghardaïa, El Oued : Observations du bouton d'Orient. (Letulle et Sergent .1890)
- 1904 – Biskra : Observation clinique de cas probables de LC. (Laveran, A. 1904)

- 1921 – Alger, Mila : Transmission expérimentale par *Phlebotomus papatasi*. **(Sergent *et al.*, 1921)**
- 1923 – Mila : Étude du clou de Mila, forme locale de LC. **(Sergent & Guérin 1923)**

Leishmaniose viscérale infantile (*L. infantum*, supposée) :

- 1908 – Constantine : Cas suspects chez des enfants. **(Nattan-Larrier et Sergent 1908)**
- 1911 – Alger : Cas pédiatriques compatibles avec la LV. **(Sergent, E., 1911)**

La leishmaniose est une maladie tropicale et subtropicale, représente un grave problème de santé mondiale, présentant un large spectre de manifestations cliniques avec une issue potentiellement mortelle.

1.2 Le parasite (*Leishmania sp*)

Le genre leishmania appartient à la famille de trypanosomatides (ordre kinetoplastida) **(Alemayhu *et al.*,2017)**.

1.2.1 Taxonomie

Règne : Protista.

Sous règne : Protozoa.

Phylum : Sarcomastigophora.

Classe : Zoomastigophora.

Ordre : Protomastigida.

Famille : Trypanosomatidea.

Genre : *Leishmania*.

(Nadu q *et al.*,2005)

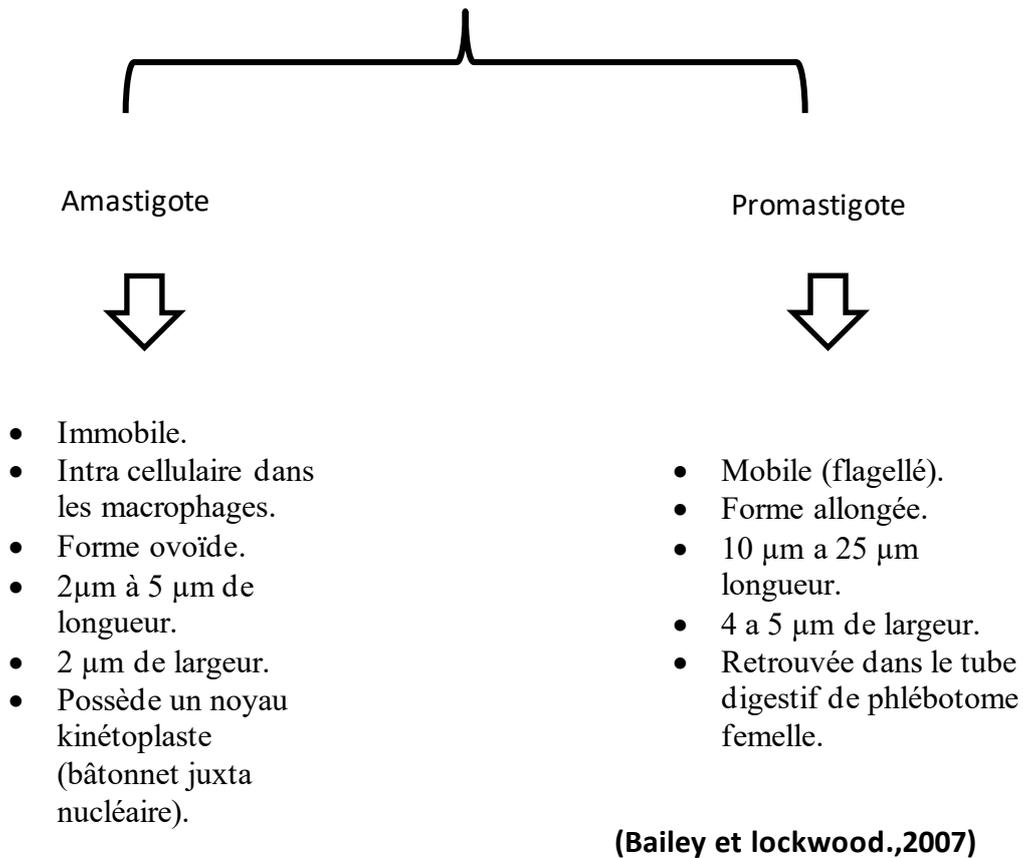
1.2.2 La morphologie

Les Leishmanies sont des protozoaires flagellés qui se présentent chez leurs hôtes

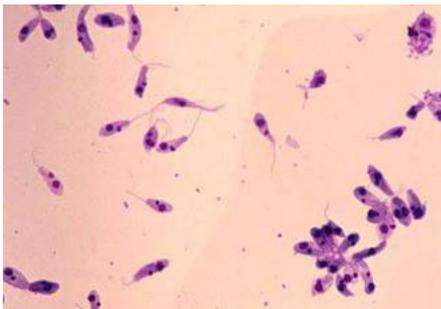
Successifs (Mammifères et insectes) sous **deux stades morphologiques distincts** :

- Une forme amastigote intracellulaire obligatoire retrouvé chez l'homme et le réservoir animal.
- Une forme promastigote extracellulaire retrouvé chez le vecteur et le milieu de culture.

Il existe deux formes de leishmanie :



(a)



(b)

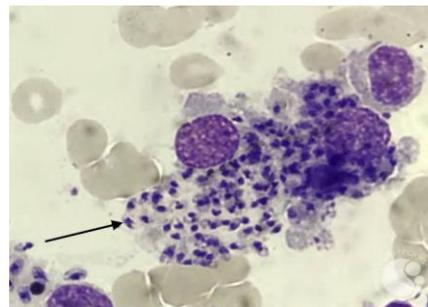


Figure 01 : la forme amastigote et promastigote de *Leishmania SP*

a) Forme promastigote observée sous microscope optique (6x40).

b) Forme amastigote observée sous microscope optique (6x40).

1.2.3 Génétique de leishmania

ADN nucléaire :

Le génome de leishmania est d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0,3 à 2,8 Mb.

Son ADN est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques. Le génome de Leishmania est très riche en G/C Il contient peu de séquences répétées et on estime 8000 gènes. (Hide M .,2004)

ADN kinétoplastique :

Un élément clé de la génétique de Leishmania est le kinétoplaste, un organe en forme de disque qui contient le génome mitochondrial condensé. Ce corps nucléoprotéique abrite **deux types d'ADN mitochondrial :**

- **Les maxi cercles**, qui codent pour les ARN ribosomiques, certaines protéines et des séquences cryptogènes,
- **Les mini cercles**, qui renferment les gènes des ARN guides.

Les génomes de maxi cercles et de mini cercles sont transcrits indépendamment, mais le flux d'informations génétiques converge au niveau de l'ARN, où les ARNg dirigent l'édition des transcrits cryptiques de maxi cercles qui deviennent finalement des ARN messagers (Jules J. Berman., 2012).

1.2.4 Le vecteur

Les phlébotomes (mouche de sable, petit moucheron), de point de vue morphologique :

- Petit insecte diptère de 1.5 à 5 mm de long.
- Une tête avec un angle de 45°.
- Velu avec des ailes lancéolées dressées en v.
- La femelle est hématophage responsable de la transmission de leishmaniose.
- Pique nocturne douloureuse (ne laisse pas une trace).

(Hide M .,2004)



Figure 02 : Phlébotome hématophage (ancien genre)

1.2.5 Cycle de vie et mode de transmission

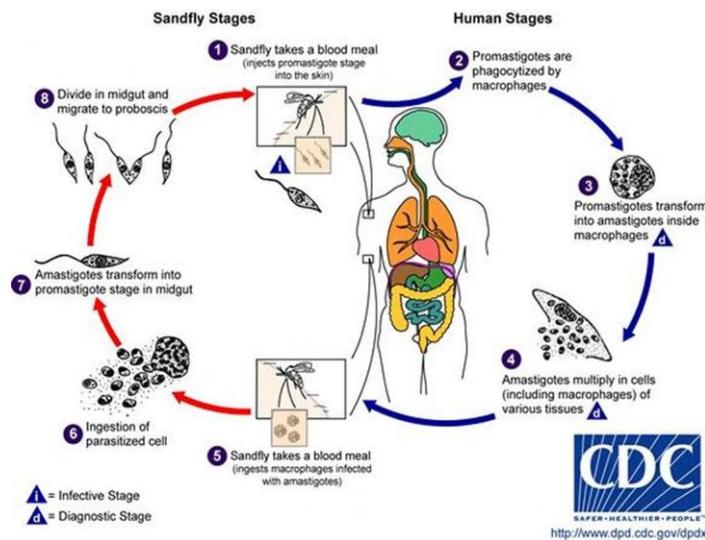


Figure03 : Le cycle de vie de parasite leishmania (CDC).

1. L'infection est transmise à l'homme par la piqûre d'un phlébotome femelle infecté, qui inocule une forme mobile du parasite, appelée promastigote méta cyclique
2. Une fois dans l'organisme, les promastigotes méta cyclique sont capturés par macrophages, par un processus appelé phagocytose, au cours duquel les phagocytes ingèrent des micro-organismes.
3. À l'intérieur des macrophages, les promastigotes méta cyclique se transforment en une autre forme, dite amastigote.
4. Les amastigotes se multiplient activement à l'intérieur des macrophages, dans divers tissus de l'hôte.
- 5–6. Lorsqu'un phlébotome pique une personne ou un animal déjà infecté, il absorbe du sang contenant des macrophages hébergeant des amastigotes, et devient à son tour infecté.
7. Dans l'intestin moyen du phlébotome, les amastigotes se transforment à nouveau en promastigotes.
8. Ces promastigotes se multiplient, se développent, puis migrent vers la région buccale de l'insecte, prêts à être injectés dans un nouvel hôte lors d'une piqûre, complétant ainsi le cycle de transmission.

qui se nourrissent de sang pour produire des œufs. Soixante-dix espèces animales, dont l'être humain, peuvent être des réservoirs naturels des parasites *Leishmania*.

Les réservoirs animaux de *Leishmania sp.* Varient selon l'espèce et la localisation géographique, incluant les chiens, d'autres canidés, les rongeurs et divers animaux. (Chelsea Marie *et al.*, 2022).

On distingue deux formes d'infection :

➤ **Une forme zoonotique**

- Réservoirs de la leishmaniose cutanée zoonotique (*Leishmania major*) : Rongeurs sauvages.

- Réservoirs de la leishmaniose viscérale zoonotique (*Leishmania infantum*) : les Chiens domestiques (le principal réservoir), les Chiens errants et Parfois des renards, chacals, loups

➤ **Une forme anthroponotique :** en Inde et au soudan, l'homme représente l'unique réservoir du parasite transmis par le vecteur, avec les complexes *Leishmania donovani* et *Leishmania tropica* comme principaux agents pathogènes (Aubry P., Gaüzère B., 2021)

Autres modes de transmission peuvent exister **tel que** :

- Chez les toxicomanes intraveineux, la transmission par échange de seringue.
- La transmission par transfusion sanguine (transmission transfusionnelle) et la Transmission congénitale (transplacentaire) de la mère à l'enfant.
- L'inoculation parentérale accidentelle (accidents de laboratoire). (OMS.,2022)

1.4 Répartition géographique

1.4.1 En Afrique du nord

Le **Maghreb** est une **zone d'endémie** pour la leishmaniose **viscérale** et **cutanée**.

- **La leishmaniose cutanée** est plus ancienne et a une prévalence plus élevée que la leishmaniose **viscérale**, causée par :
 - *L. major* est l'espèce la plus répandue et elle est de transmission zoonotique
 - *L. tropica* est le plus polymorphe et sa transmission est de type zoonotique et anthroponotique.
- **La leishmaniose viscérale** est la deuxième forme de leishmaniose au Maghreb. Seul *L. infantum* est connu pour être responsable de cette maladie. Le cycle de transmission de ce parasite est zoonotique. (Chaara *et al.*,2014)

1.4.2 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.

- **Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)** est causée par *L. major*, le vecteur est *Phlebotomus papatasi* et le réservoir est *Psammomys obesus* (rongeur).
- **La leishmaniose cutanée anthroponotique (LCA)** causée par *Leishmania tropica*, son vecteur est *Phlebotomus sergenti*, et l'homme est le principal réservoir.
- **La leishmaniose cutanée sporadique** causée par *L. infantum* dont **Izri et Belazzoug** ont mis en évidence son vecteur qui est *Phlebotomus perfiliewi* à Ténès.
- **La leishmaniose viscérale zoonotique (LVZ)** est causée par *Leishmania infantum*, les chiens étant le principal réservoir et *Phlebotomus longicuspis* et *P. perniciosus* les principaux vecteurs. (Izri et al., 2021)

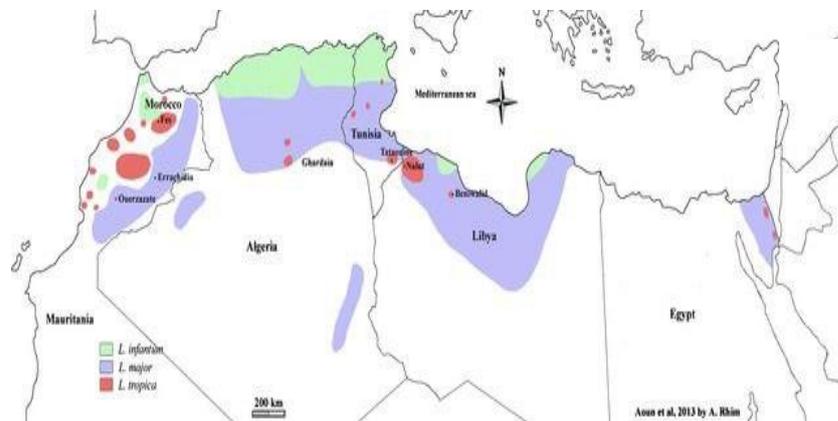


Figure 04 : Répartition géographique de la leishmaniose en Afrique du nord.

1.5 Aspect Clinique (Type de leishmaniose)

Il existe trois Aspects cliniques :

1.5.1 La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) est une maladie vectorielle provoquée par un protozoaire intracellulaire du genre *Leishmania*, pouvant s'avérer mortelle en l'absence de traitement. En Asie et en Afrique de l'Est, elle est principalement due à *Leishmania Donovanii*, l'être humain constituant alors le principal réservoir. En revanche, en Amérique latine et dans le bassin méditerranéen, elle est causée par *Leishmania infantum* et prend la forme d'une zoonose, le chien représentant le réservoir principal. C'est une maladie grave et invalidante, caractérisée

par la triade classique : une fièvre prolongée, splénomégalie, pancytopenie et une hypergammaglobulinémie). (Scarpini.s *et al.*,2022)

1.5.2 La leishmaniose cutanée

C'est la forme la plus fréquente, peut être causée par plusieurs espèces tel que *leishmania Major*, *Leishmania tropica* et *leishmania infantum*. Elle est rarement mortelle. La LC provoque (des ulcères sur les parties exposées du corps, des lésions cutanées qui persistes des mois) sa guérison est spontanée.

En Algérie, il existe deux entités de leishmaniose cutanée :

1.5.2.1 La Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)

La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) Autrefois dite « **Clou de Biskra** » est due à *L. major* (MON-25) et présente dans les zones arides et semi-arides s'est récemment propagée hors de ses foyers habituels (**Biskra à l'est et Abdala à l'Ouest**) et devient plus fréquente dans le nord de l'Algérie, coexistant avec la forme viscérale.

1.5.2.2 La leishmaniose cutanée sporadique (LCS)

La leishmaniose cutanée sporadique (LCS) due à *L. infantum* et survenant dans les zones humides et subhumides a été décrite dans de nombreux pays méditerranéens. Elle coexiste géographiquement avec la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale infantile méditerranéenne. En Algérie, cette forme est appelée « **Clou de Mila** ». (Mansouri *et al.*, 2012)

1.5.3 La leishmaniose cutanée muqueuse (LCM)

Caractérisée par la capacité du parasite à métastasé dans les tissus muqueux par dissémination lymphatique ou hématogènes.

Elle commence par une inflammation et une congestion nasale, suivie d'une ulcération de la muqueuse nasale et perforation de septum, dans certains cas les joues, lèvres, pharynx ou larynx sont également touchés.

La LCM ne guérit jamais spontanément et très difficile à traité avec des Infections bactériennes secondaires, elle est potentiellement mortelle. (Richard Reitheinger *et al.*,2007)



L.C.M

L.C

L.V

Figure 05 : Les différentes formes de leishmaniose.

1.6 Diagnostic

Ce titre sera développé dans la partie pratique.

1.7 Traitement

Les médicaments utilisés pour le traitement de la leishmaniose :

1.7.1 Pour la leishmaniose cutanée

- Traitement thermique local.
- Paromomycine (pommade).
- Amphotéricine B liposomal (IV), Miltefosine orale. (Cas de lésions graves)

1.7.2 Pour la leishmaniose cutanéomuqueuse

- Amphotéricine B liposomal (IV), Miltefosine orale.

1.7.3 Pour la leishmaniose viscérale

- Amphotéricine B liposomal (IV).

(Chelsea Marie *et al.*, 2022)

1.8 Prophylaxie

1.8.1 Prophylaxie individuelle

Visé à protéger chaque personne ou animal selon son mode de vie ou environnement.

- **Vêtements protecteurs** : longs, épais, de préférence imprégnés d'insecticide contre les phlébotomes.
- **Éviter les sorties nocturnes** : surtout en zones infestées.
- **Vaccination des chiens** : contre la leishmaniose (en zones endémiques) et d'autres maladies (rage, leptospirose...).
- **Traitement antiparasitaire régulier** : contre tiques, puces et moustiques.

(Edoardo Torres Guerrero *et al.*,2017)

1.8.2 Prophylaxie collective

Vise à protéger toute une population contre les maladies vectorielles.

- **Élimination des eaux stagnantes** : pour limiter la reproduction des moustiques.

- **Lutte anti-vectorielle** :

Pulvérisation d'insecticides dans les zones à risque.

Utilisation de moustiquaires imprégnées.

Amélioration de l'hygiène environnementale.

Renforcement des mesures individuelles dans les zones touchées.

(OMS.,2022)

Chapitre 2
Matériels et Méthodes

Chapitre 2

Deuxième chapitre : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

(Voir annexe 1)

2.1.1 Période et lieu d'étude

Notre période d'étude s'étend sur une période de 4 mois : de février 2025 à juin 2025, elle été menée au sein de service de la parasitologie et mycologie au niveau d'HCA Ain naadja (**Dr Mohamed Seghir Nekkache**).

2.1.2 Population d'étude

Notre étude a inclus tous les cas suspects de leishmaniose viscérale ou cutanée. Au total, 30 patients ont été recrutés lors de consultations ou d'hospitalisations dans différents services. Parmi eux, 7 patients suspects de développer une leishmaniose viscérale ont bénéficié d'un prélèvement de sérum, réalisé par diverses unités, en vue d'un sérodiagnostic par ELISA ou Western Blot. Et les 23 autres patients suspects de leishmaniose cutanée ont bénéficié d'un diagnostic parasitologique et moléculaire.

Échantillonnage :

La collecte des données s'est déroulée en trois parties à l'aide d'une fiche de renseignement.

- **Première partie** : Informations sur l'identité du patient, incluant le nom, le prénom, l'âge, le sexe, la profession et l'adresse, ainsi que la notion de séjour en zone d'endémie.
- **Deuxième partie** : Données cliniques et paracliniques, comprenant les signes généraux (fièvre, altération de l'état général...), les caractéristiques des lésions (nombre, taille, aspect clinique, siège) et les types de prélèvements effectués (frottis, biopsie).
- **Troisième partie** : Informations thérapeutiques et évolutives, incluant la molécule prescrite, la voie d'administration (infiltration péri-lésionnelle, injection intramusculaire), la dose et la durée du traitement, ainsi que l'évolution sous traitement.

Le diagnostic a été évoqué cliniquement et confirmé par un examen parasitologique direct, ainsi que par des techniques sérologiques et moléculaires.

Deux types de prélèvements ont été réalisés en fonction du type de leishmaniose

- **Pour leishmaniose cutanée**

Prélever les sérosités de la lésion avec un vaccinostyle stérile, après avoir retiré les croûtes, afin de recueillir un maximum de sérosité. Cette sérosité est ensuite étalée sur au moins trois lames pour réaliser les frottis cutanés.

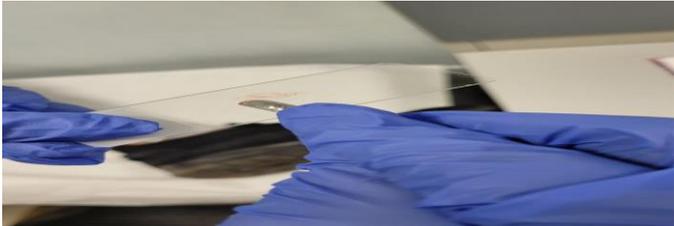
		
<p>Observation de la lésion (HCA)</p>	<p>Humidifier la lésion avec l'eau physiologique pour faciliter le prélèvement des sérosités (HCA)</p>	<p>Prélèvement de sérosités (HCA)</p>
 <p>Étalement des sérosités sur la lame</p>		

Figure 06 : Les étapes de réalisation des frottis cutanés.

Il est important d'enlever tout écoulement de sang pour ne pas altérer le prélèvement. Si la lésion est surinfectée, il faut attendre le début du traitement avant de faire le prélèvement. Enfin, la zone est désinfectée avec un antiseptique à la fin de la procédure

- **Pour leishmaniose viscérale :**

On récolte souvent une ponction de moelle osseuse. L'échantillon est étalé sur lame, coloré avec la technique MGG et conservé pour une éventuelle sérologie. Une analyse moléculaire peut aussi être faite à partir de la moelle osseuse ou du sang total prélevé dans un tube. Cet examen est effectué par un hématologue ou un pédiatre.

2.2 Méthodes

Le diagnostic de la leishmaniose repose sur une combinaison d'approches cliniques, parasitologiques, sérologiques et moléculaires.

L'identification du parasite peut être réalisée par un examen microscopique, amplification de l'ADN par QRT PCR, tandis que les tests sérologiques (Elisa, western blot) et le test diagnostic rapide (TDR) permettent de détecter des anticorps et antigènes spécifiques.

Le choix de méthode diagnostic dépend de la forme clinique de la maladie.

2.2.1 Examen direct

2.2.1.1 Examen microscopique

Intérêt : permet l'observation directe des amastigotes de *leishmania*

- ✓ **Après le prélèvement de sérosité : on va fixer et colorer les lames (coloration RAL)**

- La coloration RAL (Voir annexe 02)

- Coloration par MAY GRÜNWALD GIEMSA (MGG) (voir annexe 03)

2.2.1.2 Culture

Pour réaliser une culture de *leishmania* :

- Préparer le poste de travail en respectant strictement les règles d'asepsies, en utilisant des matériels stérile (gants, seringue).
- Prélèvement de l'échantillon : à l'aide d'une seringue stérile, injecter quelques gouttes de l'eau physiologique dans la zone de prélèvement et réaspirés lentement pour recueillir un mélange (cellule, liquide et sang capillaire).

- Introduire doucement le prélèvement dans un tube contenant du milieu NNN et un autre de blanc d'œuf coagulé et glisser l'aiguille le long de la paroi de du tube pour déposer l'échantillon à la surface du milieu.
- Ajouter quelque goutte de RPMI pour enrichir le milieu.
- Incuber les tubes à 25°C en position inclinée (de 7 à 21 jours).
- Tous les 3 jours, prélever une goutte du surnageant, étaler sur la lame.
- Observer au microscope a immersion (x100) a la recherche de promastigote mobile.

		
<p>Des milieux préparés</p>	<p>Introduire le prélèvement dans un tube du milieu blanc d'œuf</p>	<p>Introduire le prélèvement dans un tube du milieu NNN</p>

	
<p>Ajouter quelques gouttes de RPMI</p>	<p>Incuber à 25°</p>

Figure 07 : Les étapes de la culture des sérosités.

2.2.1.3 Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

Intérêt : l'obtention d'un segment d'ADN spécifique

2.2.1.3.1 PCR classique

Dans le cadre de notre étude, deux méthodes **d'extraction d'ADN** ont été utilisées afin de préparer les échantillons pour la PCR. La première méthode est une extraction manuelle, réalisée à l'aide du **kit Qiagen**, reconnu pour sa précision et sa fiabilité. La seconde méthode est une extraction automatique, effectuée à l'aide de l'appareil **Saccace**, permettant un gain de temps et une standardisation accrue du processus. Ces deux approches ont permis d'optimiser la qualité de l'ADN extrait, essentiel pour le bon déroulement de PCR.

A) **Extraction de l'ADN : (voir annexe 05)**

Par Kit Qiagen et kit Saccace (automate).

B) Amplification :

Tableau I : L'amorce utilisée pour le diagnostic de leishmaniose.

Le Nom d'amorce	Séquence	Taille (pb)	Cible
RV1 (sens)	5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3'	145pb	ADN Kinétoplastique (la région LT1 du minicercle du KDNA)
RV2 (antisens)	5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'		

Préparation du mix de la PCR :

- La manipulation du mélange est effectuée manuellement avec des gants, sous une hotte à flux laminaire afin de prévenir toute contamination.
- Avant la préparation du mélange, les réactifs doivent être préparés en respectant un ordre décroissant de concentration.
- Le microlitrage est ajusté en fonction : du nombre total d'échantillons et de leur volume à prélever pour chacun d'eux.

Tableau II : La composition de Mix excluant l'ADN avec volumes et concentrations.

Produits	Volume pour 1 échantillon
Master Mix	25ul
RV1	3ul
RV2	3ul
H2O	14ul

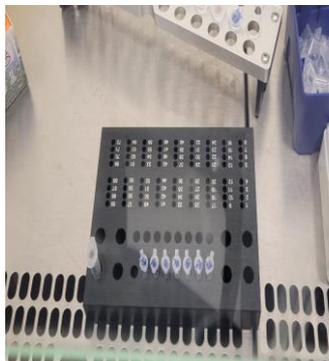
Pour le témoin positif, 5 μ L d'extrait de Leishmania positif sont ajoutés à 45 μ L du mix PCR. En revanche, pour le témoin négatif, ces 5 μ L sont remplacés par 5 μ L d'eau distillée stérile.

Tous les tubes sont ensuite brièvement vortexés pour homogénéiser le contenu, puis placés dans un thermocycleur.

Programmation du thermocycleur : La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (**My Cycler™ Thermal Cycler**), un appareil constitué d'un bloc thermique où sont insérés les tubes contenant le mélange réactionnel. Il permet de soumettre les échantillons à des cycles de températures précises pendant des durées programmées. Le protocole comprend 30 cycles, chacun étant divisé en trois phases distinctes

Tableau III : Le programme de la PCR standard sur le thermocycleur.

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	94°	5min	1
Dénaturation	94°	1min	30
Hybridation	59°	1min	30
Elongation	72°	1 :30 min	30
Elongation finale	72°	7min	1
Conservation	4°	∞	/



Ajouter 5ul d'extrait dans chaque tube Eppendorf contenant préalablement 45 ul de mix PCR



Mélanger au vortex



Mise en place des micro tubes dans le bloc de thermocycleur



Lancer le programme de thermocycleur (2h20min)

Figure 08 : Les étapes d'amplification d'ADN

C) Révélation :

- Après la réalisation de la PCR, la lecture des résultats de la PCR se fait avec électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration est relative à la taille des amplicons, dans notre cas 145 Pb nécessitent la préparation d'un gel à 2 % (**Voir annexe 04**).

Dans une plaque a puits :

- Ajouter 7ul d'eau dans chaque puits
- Ajouter 3ul de colorant dans chaque puits
- Ajouter 3 à 5 ul de marqueur de taille dans le premier puit de la plaque seulement
- Ajouter 10ul d'amplicon de chaque patient dans les puits restants
- Dépôt de mélange réactionnel d'échantillon dans le gel d'agarose

		
<p align="center">Préparation du mélange réactionnel</p>	<p align="center">Dépôt du mélange dans chaque puit du gel</p>	<p align="center">Fermer le couvercle et brancher au générateur réglé à une tension de 75V.</p>

Figure09 : Les étapes de révélation

➤ **Migration et la lecture :**

On ferme le couvercle de la cuve et on la branche au générateur réglé à une tension de **75V**.

En utilisant un voltage plus élevé, la séparation des bandes sera moins nette. Plus la tension est élevée plus la migration est rapide mais moins précise.

La durée de la migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel et à la quantité de tampon dans la cuve. La durée moyenne de migration est d'environ 30 min jusqu'au 45 min pour l'amorce **RV1 et RV2**

Les bandes d'ADN sont visualisées sur une table UV d'un Trans illuminateur dans une chambre noire. Après migration les bandes d'ADN de nos amplicons sont comparées à celle du témoin positif ainsi qu'au marqueur de taille. S'il n'y a pas de bandes on dira que notre échantillon ne contient pas l'ADN du parasite recherché. Le témoin négatif doit rester négatif afin d'écartier tout risque de contamination.

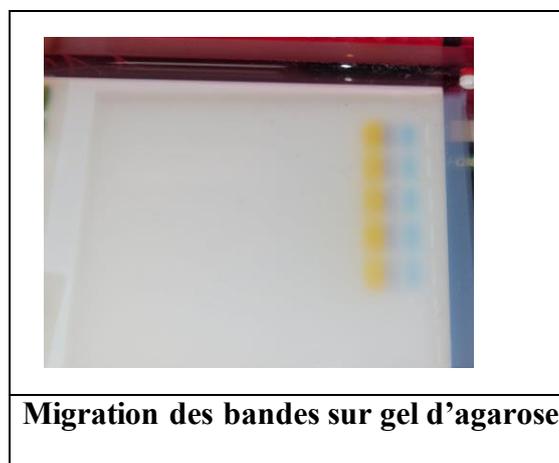


Figure 10 : Migration des bandes sur le gel d'agarose.

2.2.1.3.2 QRT PCR**Intérêt :**

Permet de quantifier l'ADN cible en temps réel grâce à l'émission de fluorescence pendant l'amplification.

Après avoir réalisé une extraction d'ADN à partir des échantillons cliniques à l'aide du kit d'extraction ADN Saccace, nous poursuivons l'analyse en utilisant une PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) pour détecter la présence de *Leishmania sp.*

Amplification :**➤ Préparation du mix PCR :**

- La manipulation du mélange est effectuée manuellement avec des gants, sous une hotte à flux laminaire afin de prévenir toute contamination.
- Avant la préparation du mélange, les réactifs doivent être préparés en respectant un ordre décroissant de concentration
- Le microlitrage est ajusté en fonction : du nombre total d'échantillons et de leurs volumes à prélever pour chacun d'eux.

Tableau IV : Préparation du master mix de la QRT PCR.

Produits	Volumes pour 1 échantillon
PCR mix 1	10ul
PCR Buffer	5ul
Taq Fat	0.5ul

- Ajouter 15ul de master mix dans chaque micro tube de PCR
- Ajouter 10ul d'ADN extrait dans chaque tube
- Volume final par tube 25ul
- Mise en place dans le thermocycleur (appareil de type qPCR compatible fluorescence
- **(Rotor-Gene Q).**

Tableau V : Programmation du thermocycleur.

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Activation initiale	95°	15min	1 cycle
Dénaturation	95°	10sec	45 cycles
Hybridation	60°	25sec fluorescent signal détection	45 cycles
Elongation+lecture	72°	10sec	45 cycles

La lecture de fluorescence se fait à 60°C à chaque cycle

Révélation et interprétation : consiste à analyser

- La courbe d'amplification (fluorescence en fonction du nombre de cycles)
- Le Ct (Cycle threshold) de chaque échantillon :
 - Ct < 30 : échantillon positif (Leishmania détecté).
 - Ct ≥ 31 : échantillon négatif (pas de détection).
- Toujours valider la série avec :

Contrôle positif : doit amplifier correctement.

Contrôle négatif (eau) : ne doit pas amplifier.

Tube PCR
et ces
caps
(bouchon)

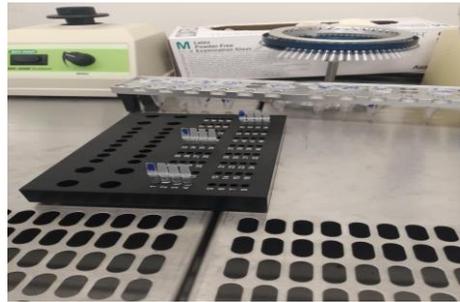
Support rotatif

Kit de
qPCR
saccage

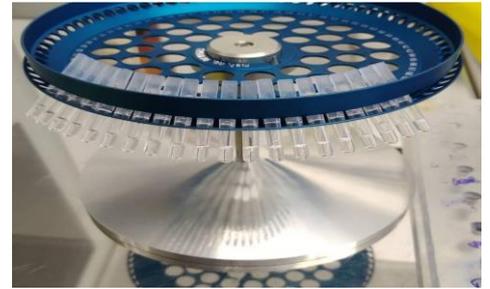




Préparation du master mix



Verser le contenu de master mix dans les micro tubes et fermer les

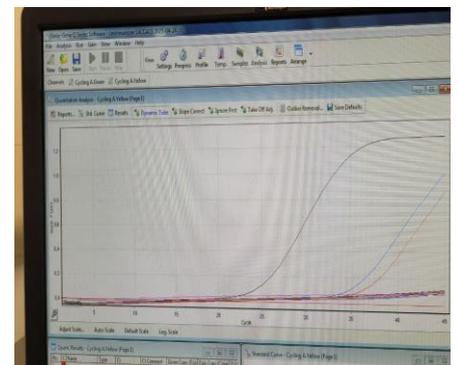
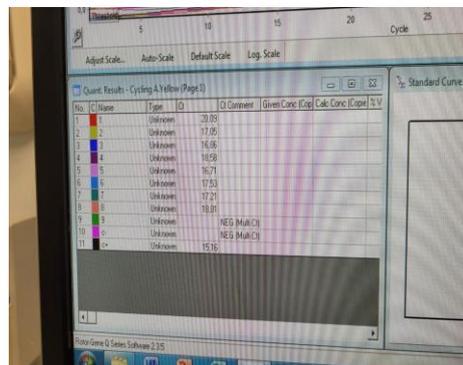
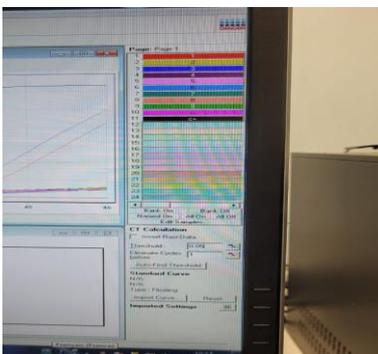


Placer les micro tubes dans le support rotatif



Insérer les soigneusement dans bloc thermique de thermocycleur et lancer la programmation

➤ Le seuil de lecture (threshold) du canal yellow est de 0.03



Lecture des résultats avec un threshold 0.03

- Le seuil de lecture (threshold) du canal green est de 0.05

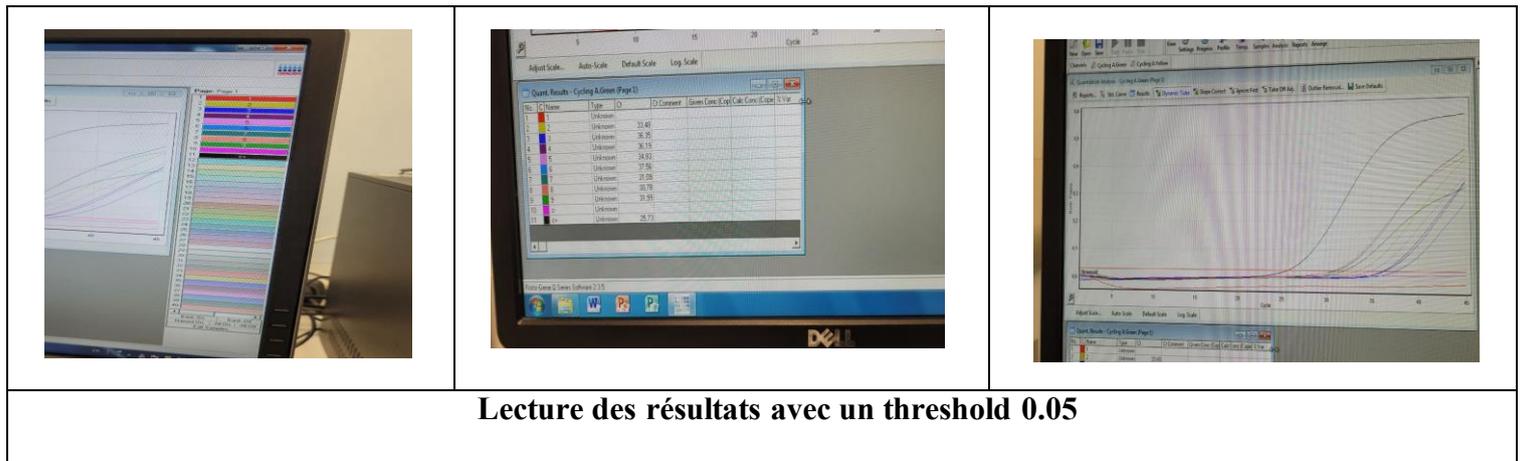


Figure11 : Les étapes de réalisation et lecture des résultats de la qRT PCR.

2.2.1.3.3 Sybr Green

Est un colorant fluorescent qui se lie spécifiquement à l'ADN double brin. Utilisé en qPCR (PCR en temps réel)

Intérêt : permet de suivre l'amplification de l'ADN au fur et à mesure des cycles. A chaque cycle, l'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à la quantité d'ADN amplifié, ce qui permet de quantifier la cible en temps réel.

- Dans le cadre de notre travail, nous avons entrepris l'optimisation d'un protocole de RT-PCR en utilisant le kit SYBR Green. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur un protocole de PCR classique, que nous avons adapté à un thermocycleur de qRT-PCR.

Bien que les étapes fondamentales – dénaturation, hybridation et élongation restent identiques, l'utilisation d'un kit basé sur la fluorescence SYBR Green permet une détection en temps réel. L'objectif était d'ajuster les paramètres de cycle afin d'obtenir une amplification spécifique et reproductible, puis de comparer les résultats à ceux obtenus par la RT PCR.

Tableau VI : Préparation du MM de Sybr Green.

Produits	Volumes pour 1 échantillon
MM	12.5ul
RV1	1.5ul
RV2	1.5ul
H2O	4.5ul

Sul pour L'ADN

Tableau VII : Programmation du thermocycleur pour Sybr Green.

Etape	Température	Durée	Nombre des cycles
Activation initiale	95°	15min	1
Dénaturation	94°	15s	35
Hybridation	59°	30s	35
Elongation	72°	30s	35



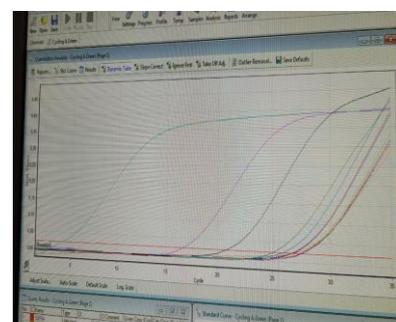
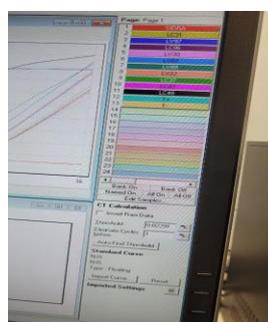
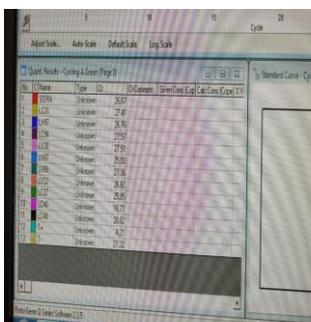
Kit de sybr green



Mettre les échantillons dans les micros tube



Mise en place des échantillons dans le thermocycleur



Lecture des résultats avec un threshold 0.02

Figure12 : Les étapes de réalisation et lecture des résultats de la RT-PCR par Sybr Green.

2.2.2 Examen indirect

2.2.2.1 TDR (test de diagnostic rapide)

Outil de diagnostic simple et rapide qui permet de détecter la présence d'anticorps anti-leishmania dans le sang du patient. (Voir annexe 05)

2.2.2.2 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Intérêt : Afin de détecter et doser la présence des anticorps et antigènes dans un échantillon.

Les étapes de réalisation:

- 1- Préparation des dilutions (1\100) : dans un tube à hémolyse mettre 990ul de diluant B et 10ul de sérum et mélanger au vortex.
- 2- Préparation de la solution de lavage (1\30) : mélanger 29ml d'eau distillé avec 1ml de solution de lavage.
- 3- Mettre 100ul de chaque dilution dans les puits de la plaque en respectant la répartition suivante : le 1^{er} puit laisser le vide, le 2 -ème mettre négatif, le 3et4eme mettre les deux standards (+), les autres puits mettre les dilutions et le dernier le témoins (+) et recouvrir avec du papier film.
- 4- Mettre la plaque dans l'incubateur à 37 degrés pendant 1h.
- 5- Laver la plaque 4 fois avec la solution de lavage, et ajouter 100ul du conjugué et recouvrir de nouveau avec du papier film, et incuber 30 min à 37 degrés.
- 6- Laver une autre fois avec la solution de lavage (4 fois), et ajouter 100ul de substrat dans tous les puits y compris le 1^{er} (dans le but de valider la technique) et recouvrir la plaque avec de l'aluminium (le substrat est photosensible).
- 7- Incubation 30 min à 37 degrés, après incubation ajouter 100ul de solution stop.
- 8- Lecture des résultats à 405nm au spectrophotomètre.



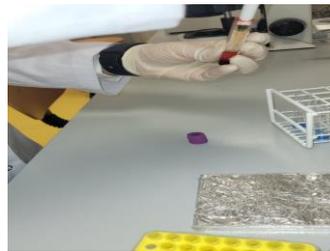
Préparation de matériels utilisés(HCA)

Réactifs :
Diluant B
Substrat
Conjugué

2 comburants (+) et 1
comburant (-)

Incubateur
37°

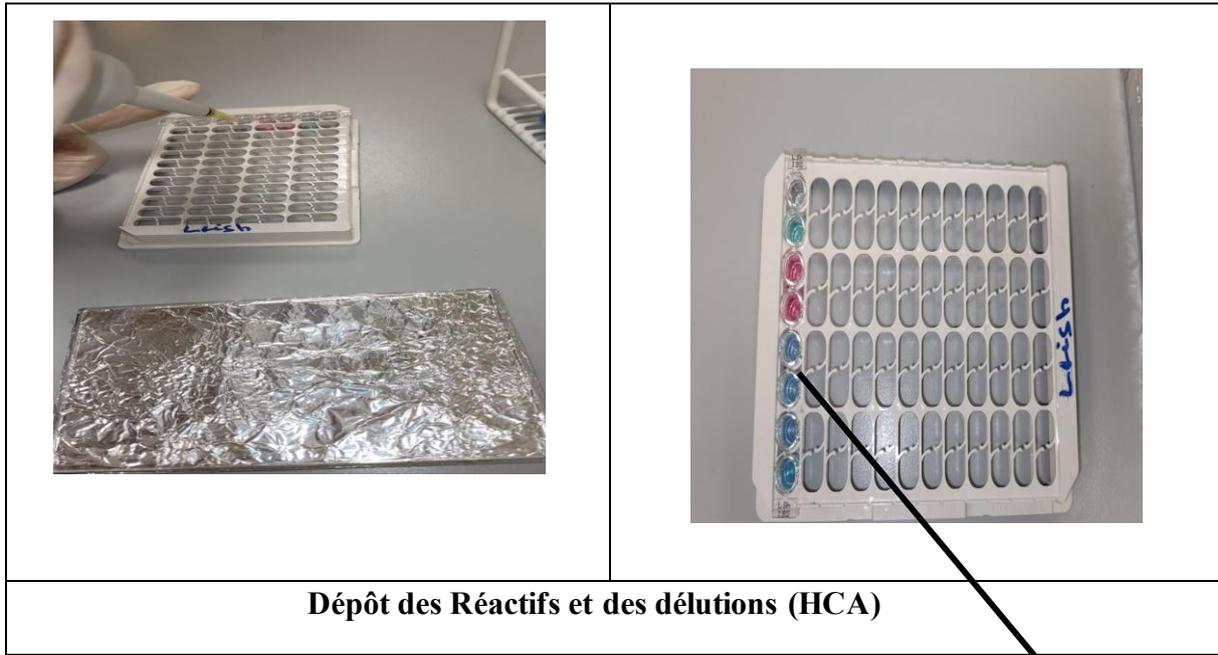
Spectrophotomètre



Préparation des dilutions (HCA)

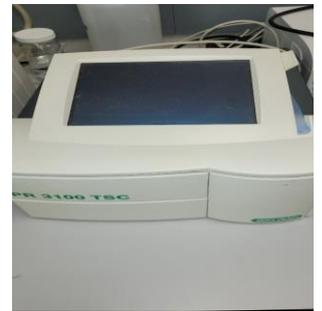
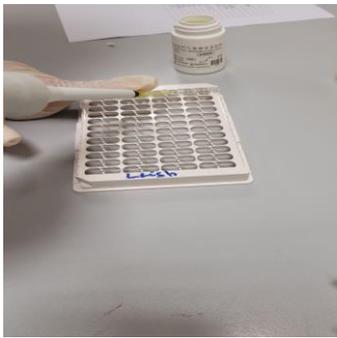


Préparation de la solution de lavage (HCA)



<p>Puit a : sub</p> <p>Puit b : CN</p> <p>Puit c : CP</p> <p>Puit d : CP</p> <p>Puit e : Patient 1</p> <p>Puit f : patient 2</p>	<p>puit g : patient 3</p> <p>puit h : Témoin+</p>
--	---

<p>L'ajout du Conjugué (HCA)</p>	<p>Recouvrir avec le papier film</p>	<p>Incubation à 37° pendant 1h</p>	<p>Faire 4 lavage</p>



L'ajout du substrat

Recouvrir avec une plaque d'aluminium et incuber à 37° 30min

L'ajout de la solution stop

Lecture des résultats

Figure 13 : Les étapes de réalisation d'Elisa.

Interprétation :

En premier lieu on calcule la moyenne des deux contrôles +
(cp1+cp2/2)

DO sub < DO CN

Avec la moyenne calculée, on obtient l'intervalle avec lequel on compare les résultats de la DO on déduit les positifs des négatifs.

Sample	OD	Interpretation
Standard A	0.583	
Standard B	1.976	
Standard C	4.891	
Standard D	2.432	
Control	15	
Sample 1	8.48	Positive
Sample 2	1.2	Negative

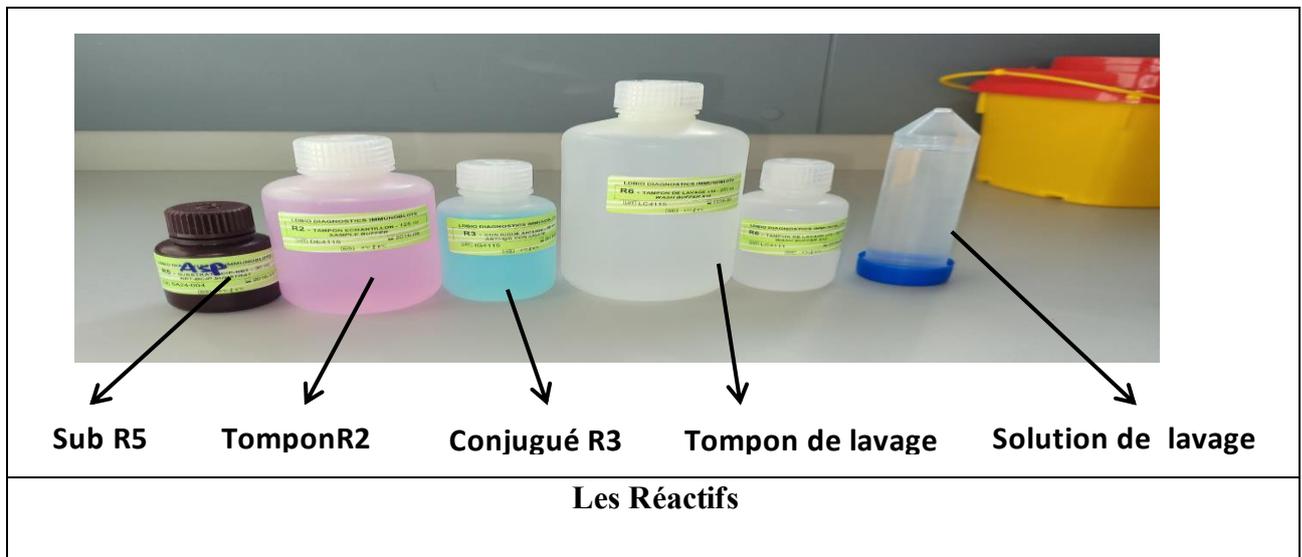
La feuille d'interprétation des résultats

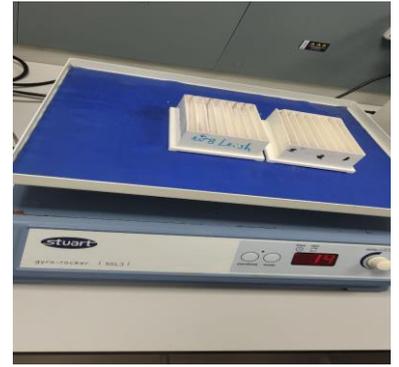
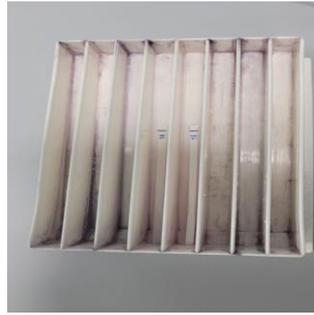
2.2.2.3. Western blot :

Intérêt : permet de détecter les antigènes spécifiques à leishmania présents dans l'échantillon.

✚ **Les étapes de réalisation:**

- 1- Découper une bandelette R1 à l'aide d'un scalpel, et la déposer sur une plaque à rigoles.
- 2- Ajouter 1200ul de Tampon R2 (dans le but de réhydrater la bandelette).
- 3- Ajouter 25ul de sérum (si le patient est un bébé ou un immunodéprimé VIH ajouter 50ul), et déposer la plaque sur l'agitateur pendant 90 min) à 37 rotations.
- 4- Préparer la solution de lavage (45ml d'eau distille + 5ml tampon de lavage R6).
- 5- Après incubation, aspirer tout le tampon à l'aide d'une micropipette, et faire 3 lavages chaque lavage remettre la plaque sur l'agitateur pendant 3min.
- 6- Ajouter 1200ul de conjugué R3, remettre la plaque sur l'agitateur pendant 1h.
- 7- Refaire 3 lavages comme l'étape 5.
- 8- Ajouter 1200ul de substrat R5 et recouvrir la plaque avec de l'aluminium, et la mettre sur l'agitateur pendant 15min tout en surveillant l'apparition des bandes.
- 9- Ajouter 1200ul de solution stop (qui est l'eau distillé) faire 2 lavages.
- 10- Laisser sécher la bandelette et lire les résultats.



**Les Bandelettes****Agitation****Figure 14 :** Les étapes de réalisation du Western Blot.

2.3 Analyse statistique

L'analyse des données et les illustrations graphiques ont été réalisés par le logiciel EXCEL 2019.

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel IBM-SPSS – statistics version 25. Nous avons effectué une comparaison entre les trois types de PCR (PCR classique, RT PCR et RT PCR par SYBR GREEN) en utilisant le test de Khi-carré avec un $p < 0.05$ considéré comme significatif.

Chapitre 3
Résultats et Discussion

Chapitre 3

Troisième chapitre : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Résultats

3.1.1 Résultats globaux

Parmi les 30 patients, le diagnostic de la leishmaniose est confirmé chez 07 patients soit 23,33 %.

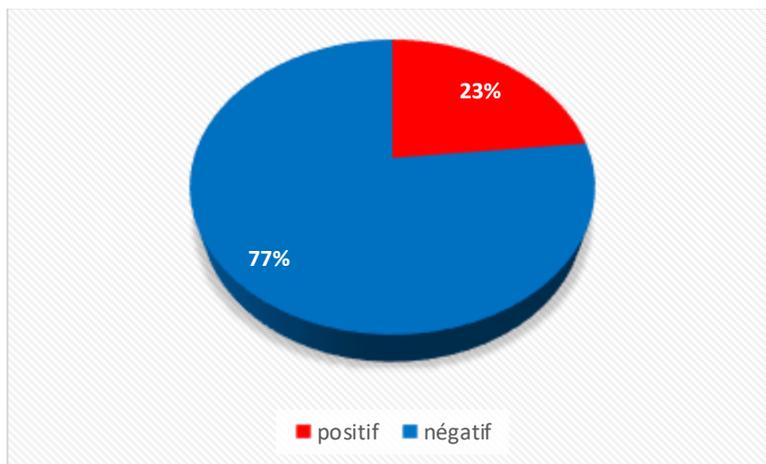


Figure 15 : Résultats globaux à la recherche de *Leishmania sp.*

3.1.2 Résultats parasitologiques

Résultats de l'examen direct :

- Sur un total de 16 frottis cutanés analysés, 04 se sont révélés positifs par la présence de forme amastigotes de *leishmania sp* voir (figure 16), soit un taux de positivité de 25 %.

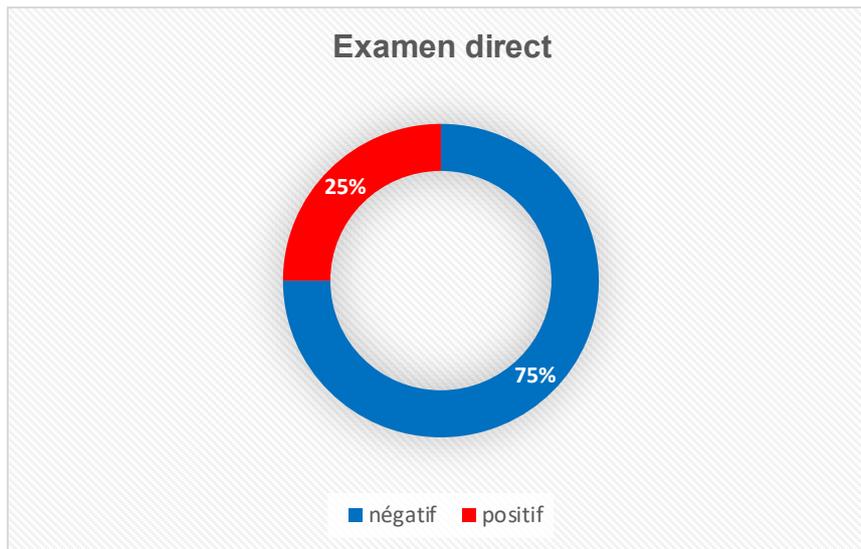


Figure 16 : Résultat de l'examen direct des frottis cutanés à la recherche de *Leishmania sp*

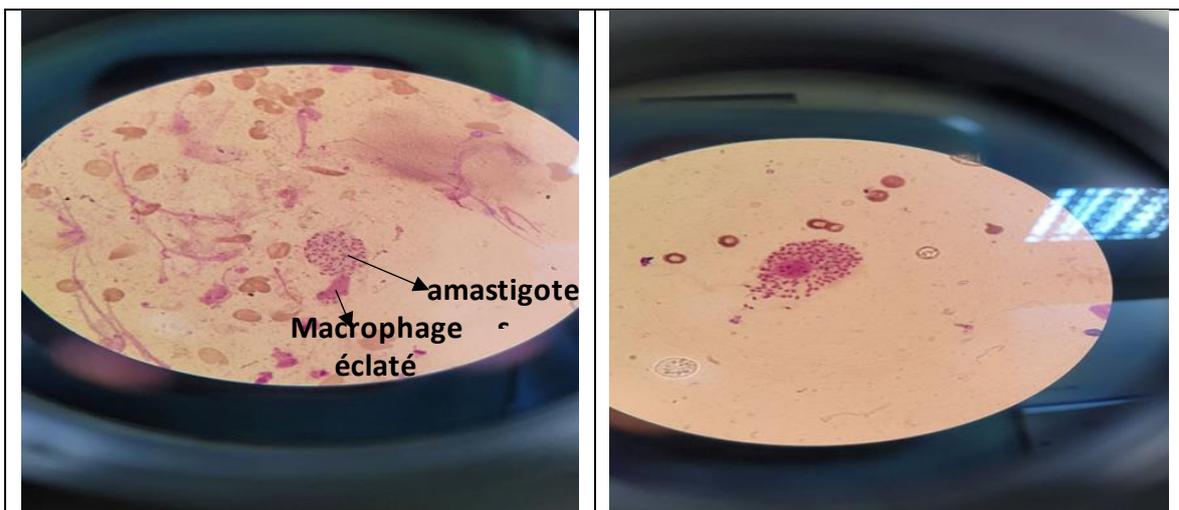


Figure 17 : Forme amastigote observée au MO après coloration MGG GR x100 – Photos prises au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales – Hôpital central de l'Armée.

3.1.3 Résultats sérologiques

3.1.3.1 Résultats d'ELISA

- L'ELISA à la recherche d'IgG anti leishmania est réalisée uniquement aux patients suspects de leishmaniose viscérale.

- Cette dernière est effectuée sur sept (07) sérums : 01 patient est revenu positif en faveur d'une LV soit (14 ,28%) et 6 négatifs (85 ,71%).

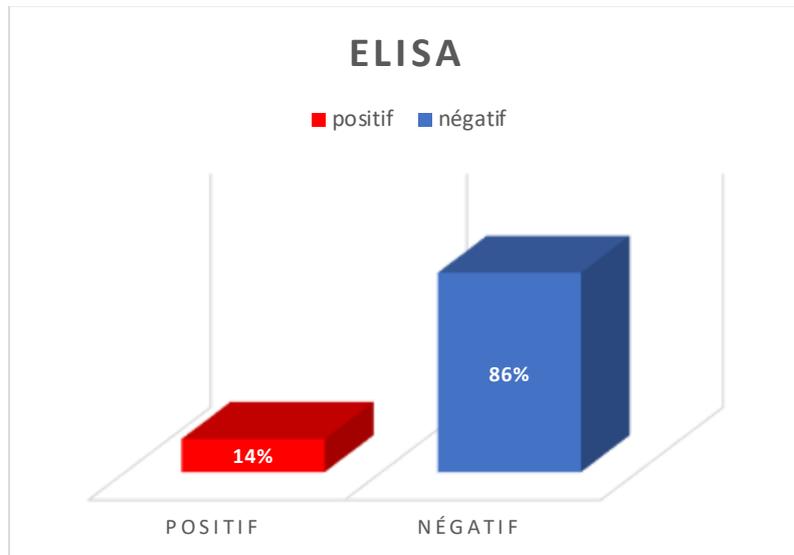


Figure 18 : Résultats de l'examen sérologique ELISA à partir des prélèvements de la Leishmaniose viscérale.

The image shows a microplate reader with a grid of wells. The columns are numbered 1 to 5, and the rows are lettered A to D. Each well contains a sample ID, a dilution (1/1), and an optical density (OD) value. A mouse cursor is pointing to the well containing SM1_2.

	1	2	3	4	5
A	SM1_1 1/1 0.151	SM1_9 1/1 0.86	SM1_17 1/1 0.867	SM1_25 1/1 0	SM1_33 1/1 0
B	SM1_2 1/1 0.154	SM1_10 1/1 0.85	SM1_18 1/1 0.609	SM1_26 1/1 0	SM1_34 1/1 0
C	SM1_3 1/1 0.805	SM1_11 1/1 0.503	SM1_19 1/1 0.708	SM1_27 1/1 0	SM1_35 1/1 0
D	SM1_4 1/1 0.775	SM1_12 1/1 0.785	SM1_20 1/1 1.147	SM1_28 1/1 0	SM1_36 1/1 0

Figure 19 : Résultats obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre lors l'examen sérologique ELISA, à partir de prélèvement de la LV.

–Photo prise au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales Hôpital central de l'Armée.

3.1.3.2 Résultats du Western-Blot

- Le WB est effectuée pour les sept 7 prélèvements suspects de développer une leishmaniose viscérale.

-les résultats : deux positifs soit (28,57%) et les cinq autres négatifs (71,42%).

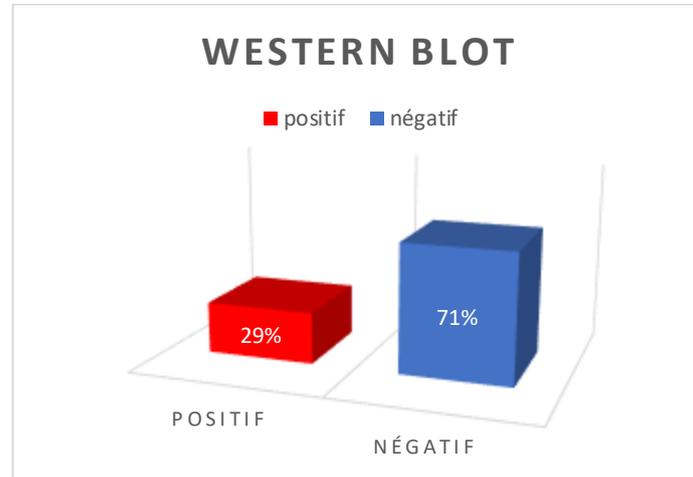
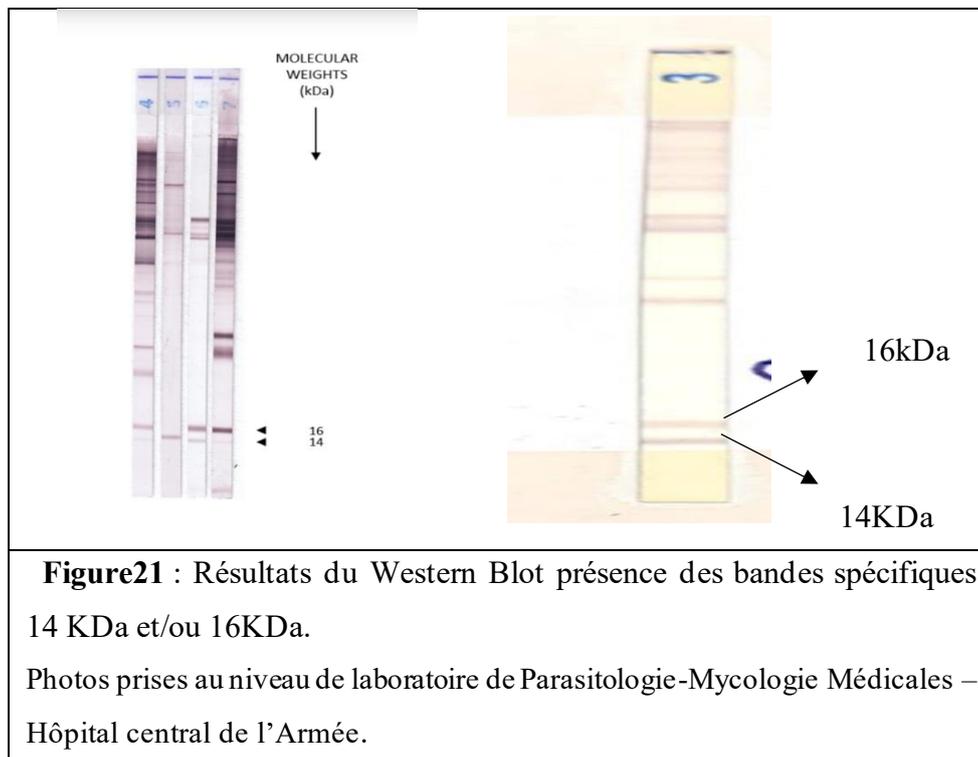


Figure 20 : Résultat de l'examen sérologique Western Blot à partir des sérums des patients suspects de leishmaniose viscérale.

- On considère un résultat Western-Blot positif dans le cas où il y a une présence des deux bandes spécifiques 14 KDa et/ou 16 KDa, 18KDa et /ou 33 KDa.



-D'après ces résultats le WB nous a permis de corriger un malade faussement négatif à l'ELISA.

3.1.4 Résultats moléculaires

3.1.4.1 Résultats de la PCR classique

- La PCR à la recherche d'ADN leishmanien est effectuée en utilisant l'amorce **RV1/RV2** qui cible l'ADN kinétoplastique pour tous les patients à partir des sérosités et biopsie cutanée et sang total pour la leishmaniose cutanée, sang total sur tube EDTA pour la leishmaniose viscérale.
- Les résultats sont affichés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VIII : Répartition des résultats de la PCR classique.

Résultat positif	Résultat négatif	Total
07	23	30

Tableau IX : Répartition des résultats positifs de la PCR classique selon la nature du prélèvement.

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvement	Résultats (positifs)	Total
Sérosités	16	4/16	7/30
Sang total (EDTA)	13	2/13	
Biopsie	01	1/1	

- Un résultat de PCR est considéré comme positif s'il y a apparition d'une bande spécifique fluorescente de 145 pb après électrophorèse et révélation sous UV.



Figure 22 : Résultats de la PCR classique RV1/ RV2.

Photo prise au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales – Hôpital central de l'Armée.

3.1.4.2 Résultats RT PCR

- La PCR en temps réel ou PCR quantitative permet de quantifier l'ADN cible en temps réel tout en émettant une fluorescence pendant l'amplification.
- la RT PCR est effectuée pour tous les patients.
- les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau X : Répartition des résultats de la RT PCR avec le kit saccace (*leishmania spp* REAL TM)

Résultat positif	Résultat négatif	Total
13	17	30

Tableau XI : Répartition des résultats positifs de la RT PCR selon la nature du prélèvement.

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvement	Résultats (positif)	Total
Sérosités	16	9/16	13/30
Sang total sur tube EDTA	13	3/13	
Biopsie	01	1/1	

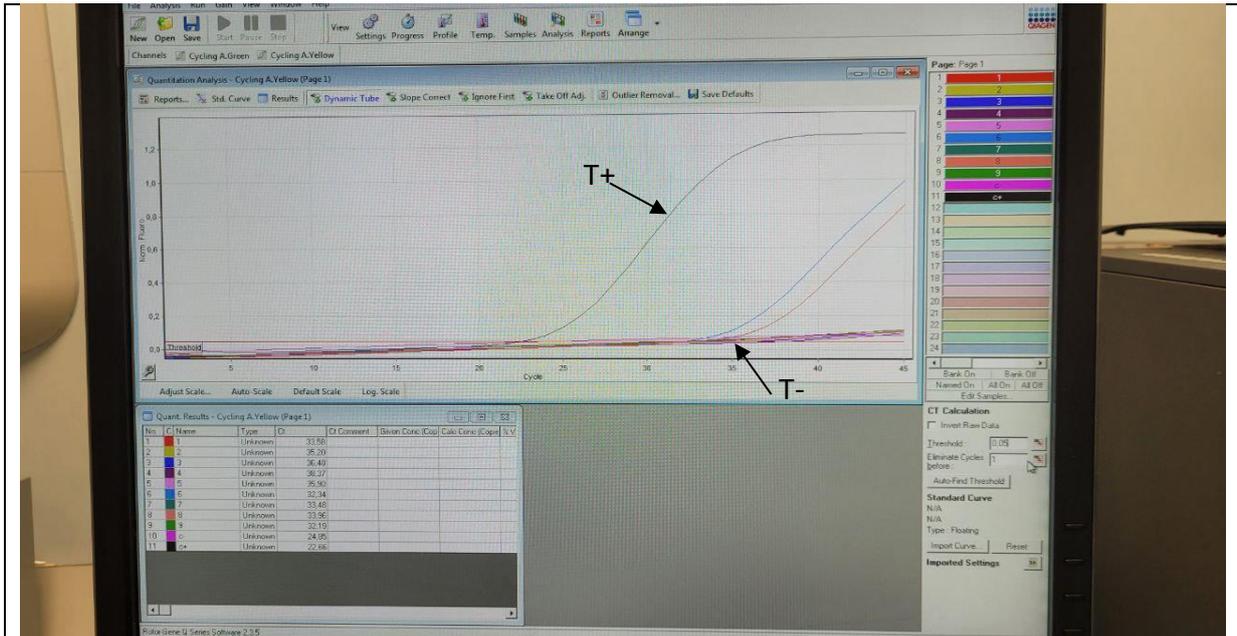


Figure 23 : Résultats de la PCR en temps réel avec le kit saccace (*Leishmania spp* REAL TM) à la recherche d’ADN *leishmania sp*.

- Photo prise au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales Hôpital Central de L’Armée.

3.1.4.3 Résultats PCR SYBR GREEN®

- Le SYBR GREEN® est un colorant fluorescent qui se lie à l’ADN double brin.
- la RT PCR par SYBR GREEN® est effectuée pour tous les patients.
- les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XII : Répartition des résultats de la RT PCR par SYBR GREEN®

Résultat positif	Résultat négatif	Total
13	17	30

Tableau XIII : Répartition des résultats positifs de la RT PCR par SYBR GREEN® selon la nature du prélèvement.

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvement	Résultats (positif)	Total
Sérosités	16	9/16	13/30
Sang total sur tube EDTA	13	3/13	
Biopsie	01	1/1	

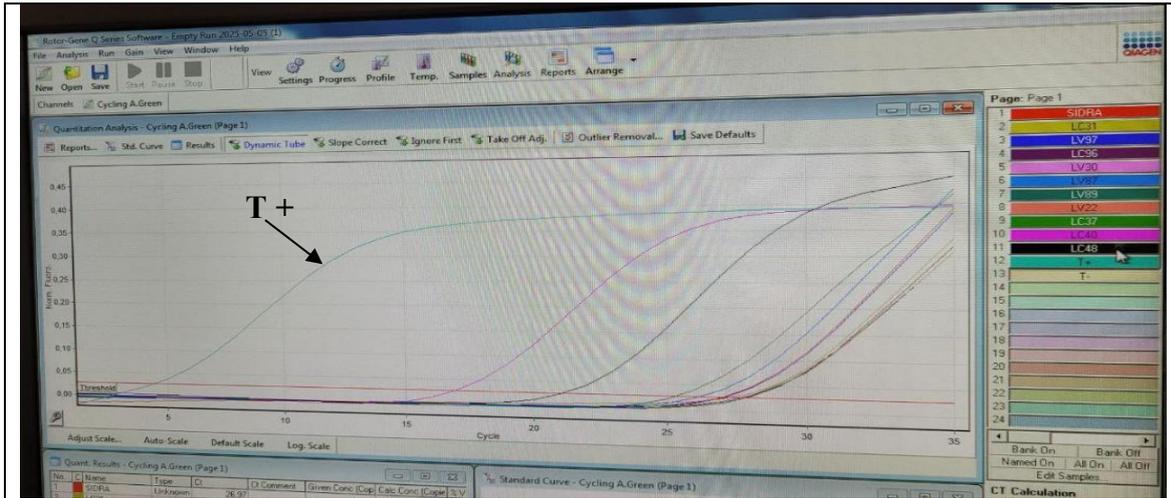


Figure 24 : Résultats de la PCR SYBR GREEN® avec l’amorce RV1 RV2.

Photo prise au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales – Hôpital Central de l’Armée.

Tableau XIV : Comparaison entre les deux techniques d’extraction d’ADN.

Type d'extraction	QIAGEN	SACCACE
Principe	Colonne de silice	Billes magnétiques
Temps	Plus long (environ 2h)	Plus rapide (environ 50 min)
Reproductibilité	Moins reproductible : dépend fortement de la rigueur du technicien.	Très reproductible : protocole standardisé et automatisé
Risque	Risque de contamination plus élevés. Erreurs humaines possibles.	Risques de contamination réduits (système fermé). Moins d'intervention humaine.
Qualité	Qualité variable selon l'opérateur et le respect du protocole. Peut donner un bon rendement si bien exécuté.	Qualité généralement élevée et constante, avec meilleur rendement pour certains types d'échantillons.

Tableau XV : Comparaison entre l'examen direct et la PCR.

ED \ PCR	Positif	Négatif	TOTAL
Positif	04	00	04
Négatif	01	25	26
Total	05	25	30

Tableau XVI : Comparaison entre l'ELISA et le WB.

ELISA \ WB	Positif	Négatif	Total
Positif	01	00	01
Négatif	01	05	06
Total	02	05	07

Tableau XVII : Comparaison entre la PCR classique et la RT PCR.

PCR \ RT PCR	Positif	Négatif	Total
Positif	07	00	07
Négatif	06	17	23
Total	13	17	30

Tableau XVIII : Analyse des résultats en fonction des technique (PCR classique et RT PCR).

		RT PCR		Total	Tests du khi-carré	Résultat
		Négatif	Positif			
PCR CLASSIQUE	Négatif	12	11	23	0.368	Les deux variables sont indépendantes
	Positif	5	2	7		
Total		17	13	30		

-Test du khi-carré : 0.368

Interprétation : Les résultats de la PCR classique et de la RT-PCR ne sont pas significativement liés. Cela signifie qu'un échantillon positif ou négatif avec une méthode ne permet pas de prédire avec certitude le résultat avec l'autre.

Tableau XIX : Analyse des résultats en fonction de la PCR classique et PCR SYBR GREEN ®.

		SYBR GREEN PCR		Total	Tests du khi- carré	Résultat
		Négatif	Positif			
PCR CLASSIQUE	Négatif	12	11	23	0.368	Les deux variables sont indépendantes
	Positif	5	2	7		
Total		17	13	30		

-Test du khi-carré : 0.368 → Variables indépendantes

Interprétation : la PCR classique ne montre pas de lien significatif avec les résultats de la SYBR Green PCR.

Tableau XX : Comparaison entre la RT PCR et la PCR SYBR GREEN ®.

RT PCR SYBR green	Positif	Négatif	Total
Positif	13	00	13
Négatif	00	17	17
Total	13	17	30

Tableau XXI : Analyse des résultats en fonction des technique RT PCR et PCR SYBR GREEN.

		SYBR GREEN PCR		Total	Tests du khi- carré	Résultat
		Négatif	Positif			
RT PCR	Négati f	17	0	17	0.000	Les deux variable s sont dépenda ntes
	Positif	0	13	13		
Total		17	13	30		

-Test du khi-carré : 0.000 → Variables dépendantes

Interprétation : il y'a correspondance parfaite entre RT-PCR et SYBR Green PCR.

Tous les échantillons positifs avec l'une sont aussi positifs avec l'autre, et pareil pour les négatifs. Cela indique une forte corrélation : ces deux méthodes détectent les mêmes choses.

Conclusion :

La **PCR classique** donne des résultats indépendants de ceux de **RT-PCR** et de **SYBR Green PCR**. En revanche, les résultats de **RT-PCR** et **SYBR Green PCR** sont parfaitement corrélés (dépendants), indiquant qu'ils détectent probablement les mêmes échantillons positifs/négatifs avec une forte concordance.

PCR classique : Résultats indépendants des deux autres techniques. Elle peut donc être moins sensible ou cibler différemment.

RT-PCR et SYBR Green PCR : Résultats dépendants, donc très cohérents entre eux, probablement plus fiables ou plus sensibles dans cette expérience.

Tableau XXII : Comparaison entre les résultats des différentes techniques utilisées.

Techniques utilisées	Leishmaniose viscérale	Leishmaniose cutanée
ED	00	4 /16
ELISA	01/07	00
WB	02/07	00
PCR classique	02/07	05/23
RT PCR	03/07	10/23
PCR SYBR GREEN	03/07	10/23

Tableau XXIII : Tableau récapitulatif des techniques et leurs taux de sensibilité et de spécificité.

Techniques	ED	ELISA	WB	PCR	RT PCR	PCRSYBR GREEN
Sensibilité	80%	50%	100%	100%	100%	100%
Spécificité	86%	85%	100%	100%	100%	100%

- Pour calculer la sensibilité :

$$VP / (VP+FN)$$

- Pour calculer ma spécificité :

$$VN / (VN+FP)$$

3.1.5 Exploitation épidémiologique

3.1.5.1 Répartition des résultats positifs selon le sexe

- Les résultats positifs obtenus indiquent que les leishmanioses touchent les deux sexes, bien qu'une prédominance masculine soit observée, avec une sex-ratio (H/F) (6/1).

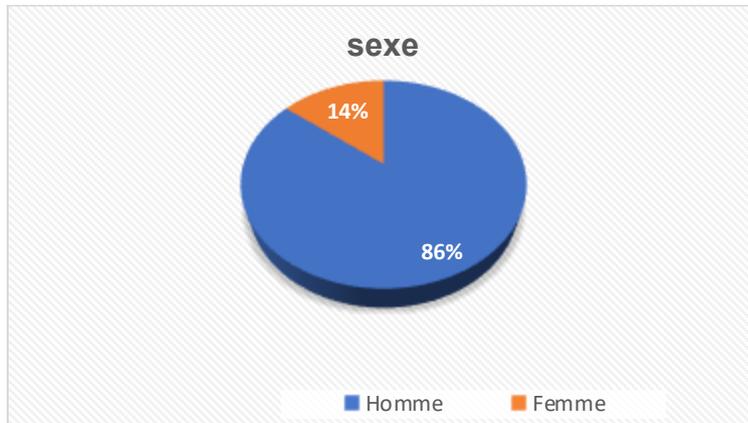


Figure 25 : La répartition des patients positifs selon le sexe.

3.1.5.2 Répartition des résultats positifs selon l'Age

Les patients revenus positifs au diagnostic de la leishmaniose sont répartis selon trois tranches d'âge. La plus touchée est située entre (25-40) et compte 5 patients soit 71,42%. L'âge moyen des cas positifs est de 30,28 ans ; et des extrêmes allant de 24 ans à 45ans.

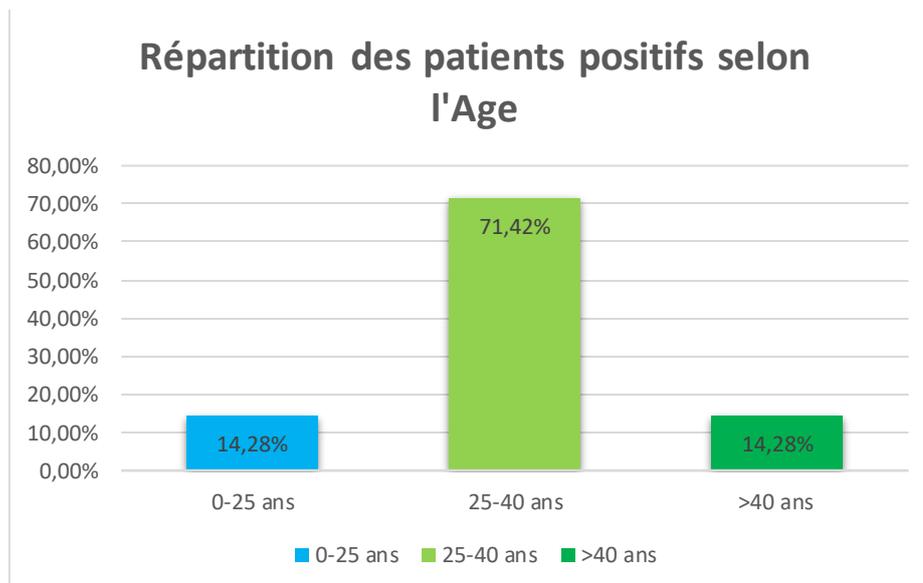


Figure 26 : Répartition des patients positifs selon l'âge.

3.1.5.3 Répartition des résultats positifs selon le type de leishmaniose

-Sur les sept 07 cas positifs :

Tableau XXIV : Prévalence des leishmanioses chez les patients positifs.

Type de leishmaniose	Cutanée	Viscérale
Nombre de cas	05	02

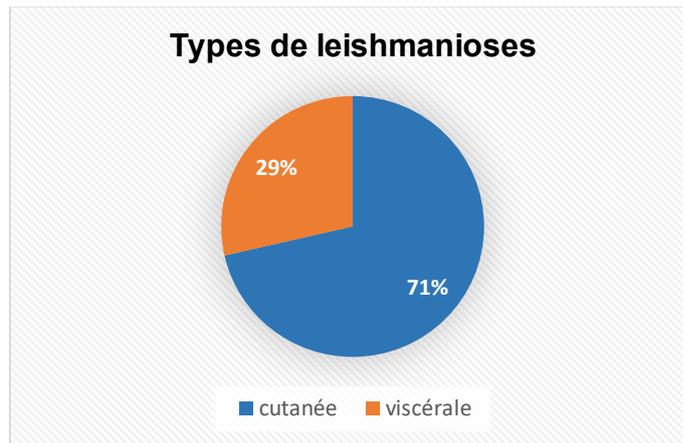


Figure 27 : Répartition des leishmanioses chez les cas positifs.

3.1.5.4 Répartition des cas positifs selon les régions

A l'aide des fiches de renseignements, une carte de répartition géographique des patients en Algérie est établie.

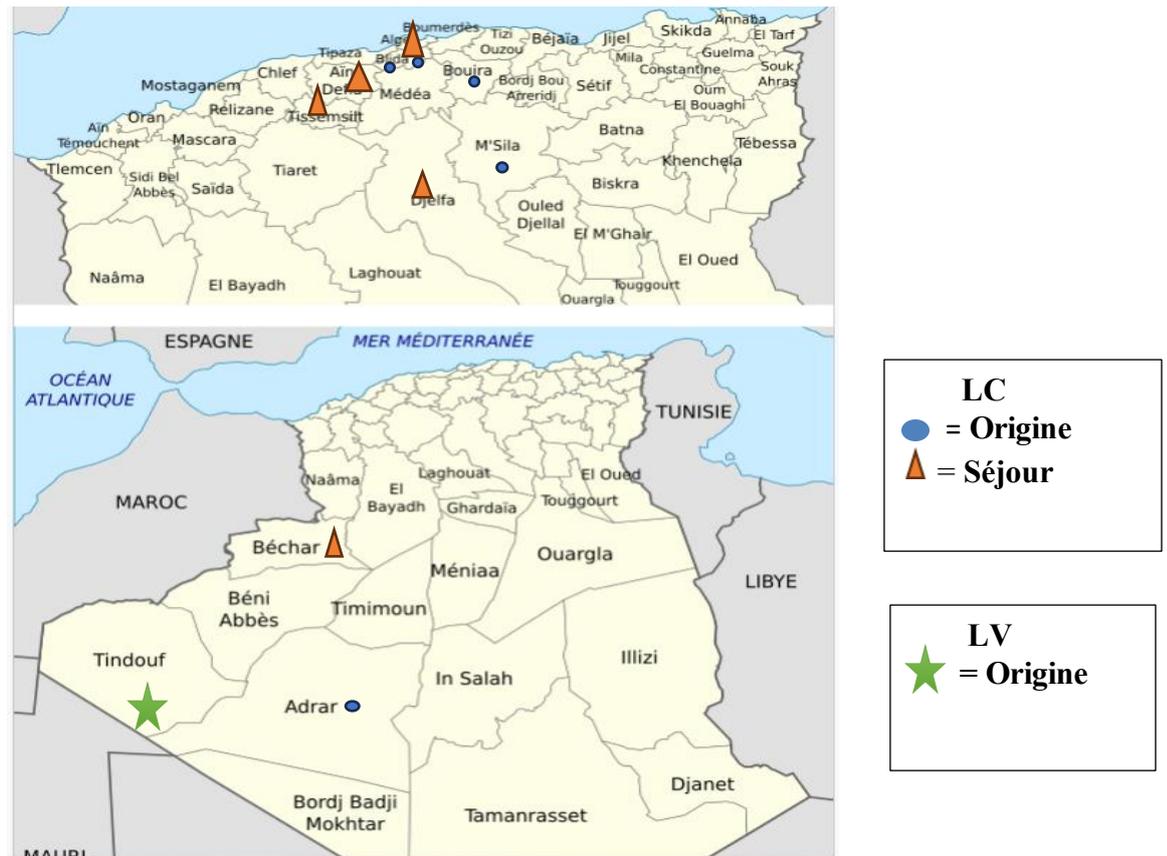


Figure 28 : La répartition géographique des patients ayant une leishmaniose cutanée (carte d’Algérie avec le lieu de l’infection et origine).

3.1.5.5 Répartition des cas positifs selon la localisation des lésions

- D’un point de vue clinique, les lésions cutanées observées étaient majoritairement situées sur les parties exposées du corps, telles que les avant-bras, les jambes, la cheville, ainsi que le visage (joues, front, nez et oreilles).

III.5.5.1. Leishmaniose cutanée

Tableau XXV : Répartition des cas positifs selon la localisation des lésions.

Patients leishmaniose cutanée	Localisation de la lésion
Patient 01	Oreille
Patient 02	Front
Patient 03	Cheville
Patient 04	Front
Patient 05	Pieds



Figure 29 : Les différentes localisations des lésions de la leishmaniose cutanée
Photos prises au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicales – Hôpital
Central de l'Armée.

3.2 Discussion :

La leishmaniose demeure un problème de santé publique majeur en Algérie, notamment sous sa forme cutanée, qui représente la majorité des cas recensés. Il s'agit d'une maladie parasitaire vectorielle transmise par la piqûre de phlébotomes femelles infectées. L'Algérie est classée parmi les pays les plus touchés au monde par la leishmaniose cutanée, aux côtés de pays comme l'Afghanistan, le Pakistan, la Syrie et l'Iran (OMS.,2023)

Nous avons mené une étude sur une période de cinq mois afin d'évaluer et mettre au point l'apport de la RT-PCR dans le diagnostic de la leishmaniose. Les résultats obtenus varient selon les techniques utilisées. L'examen direct est considéré comme la méthode de référence pour le diagnostic de la leishmaniose, suivi par la culture parasitaire. D'autres techniques ont également été mises en œuvre, notamment l'ELISA, le Western blot, la PCR classique, la qRT-PCR, ainsi que la PCR par SYBR Green.

L'examen direct (ED) est une technique simple et largement utilisée pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée. Elle permet la visualisation directe du parasite à partir d'un frottis coloré. Toutefois, sa sensibilité est variable et dépend de plusieurs facteurs, notamment la charge parasitaire, la qualité du prélèvement et l'expérience de l'observateur. Elle présente l'avantage d'être rapide, peu coûteux, nécessite un matériel rudimentaire et facile à mettre en œuvre. (reitheinger.R et dujardin, J.,2007)

Dans notre étude, l'examen direct a permis de détecter le parasite dans 4 cas sur 5, soit un taux de positivité de 80 %. Ce résultat suggère une bonne performance de la méthode dans notre contexte, probablement favorisée par la qualité des prélèvements. Ce taux est comparable à celui rapporté par (Keita *et al.*, 2003), qui ont observé 84 % de frottis positifs. En revanche, nos résultats apparaissent nettement supérieurs à ceux rapportés en Algérie par (Harrat *et al.*,1996), qui ont rapporté un taux de positivité de 48 %. Ces écarts peuvent s'expliquer par des différences méthodologiques, la précocité des prélèvements ou encore des variations de la charge parasitaire selon les régions endémiques.

Pour la culture, quatre patients présentant des signes cliniques évocateurs de leishmaniose, confirmés positifs à l'examen direct, ont été soumis à des cultures sur milieu NNN ainsi que sur un milieu à base de blanc d'œuf enrichi au RPMI 1640. Toutefois, aucune croissance parasitaire n'a été observée. La culture sur milieu NNN, bien que spécifique, présente une sensibilité variable, souvent comprise entre 30 % et 60 %, selon la qualité des échantillons et

la charge parasitaire (**Tasyaran et al.,2021**). Le milieu à base de blanc d'œuf, moins standardisé et peu documenté, est généralement considéré comme moins performant. Par ailleurs, (**Boelaert et al.,2008**) ont montré que les méthodes de culture, même enrichies, sont souvent insuffisantes pour détecter de faibles parasitémies, ce qui peut expliquer l'échec observé malgré l'utilisation du RPMI 1640. De plus, plusieurs facteurs techniques, tels que le délai entre le prélèvement et l'inoculation, les conditions de transport et de stockage, ainsi que la qualité de la préparation des milieux, peuvent compromettre la viabilité des parasites et, par conséquent, la réussite de la culture.

Les méthodes sérologiques constituent aujourd'hui un apport significatif au diagnostic des leishmanioses. Sur Les deux patients suspects de leishmaniose viscérale, le test ELISA a révélé une séropositivité anti-*Leishmania* IgG chez un seul patient, tandis que l'autre était négatif. Ce taux de positivité modéré est inférieur à celui rapporté dans les zones de forte endémie, où la sensibilité de l'ELISA peut dépasser 90 % chez les patients symptomatiques (**Chappuis et al.,2007**). La variabilité antigénique des souches régionales de *Leishmania*, ainsi que le type de kit utilisé (**Maia et Campino.,2008 ; Srivastava et al., 2011**). Ces éléments soulignent l'importance d'interpréter les résultats sérologiques avec prudence et de les intégrer dans une démarche diagnostique

Nous avons appliqué le Western blot LDBio® IgG sur deux malades. Les deux prélèvements analysés se sont révélés positifs, soit un taux de positivité de 100 %. Bien que notre échantillon soit très limité, ce résultat souligne l'utilité du Western blot pour confirmer l'infection dans notre contexte.

Le Western blot est reconnu pour sa spécificité élevée grâce à sa capacité à détecter des antigènes spécifiques de *Leishmania infantum*. (**Bossolasco et al.,2003**) rapportent une spécificité supérieure à 95 %, ce qui rend ce test particulièrement utile pour confirmer les cas suspects, surtout lorsque les méthodes classique, telles que la culture ou l'examen direct, sont faussement négative ou présentent une faible sensibilité.

Dans notre étude, la spécificité obtenue est de 100 %, en accord avec les résultats de (**Marty et al.,2007**) et de (**Ferroglio et al.,2007**), qui ont respectivement rapporté des spécificités de 99 % et 100 %.

Nos résultats s'accordent ainsi avec les données littérature, qui met en avant la fiabilité du Western blot comme outil de confirmation, en particulier dans les contextes de faible

parasitémie ou lorsque d'autres tests sont négatifs. Cependant, il convient de noter que la sensibilité du test peut varier selon plusieurs facteurs, tels que le stade de l'infection, le statut immunitaire du patient ou une réponse humorale insuffisante. (Cota *et al.*, 2012) ont ainsi rapporté une diminution de la sensibilité du Western blot chez les patients immunodéprimés ou en phase précoce de la maladie. Ces données confirment que, malgré ses performances intéressantes, le Western blot doit être interprété avec prudence et utilisé en complément d'autres outils diagnostiques

La PCR constitue aujourd'hui une technique de référence dans le diagnostic moléculaire, notamment pour les infections parasitaires telles que la leishmaniose. La fiabilité de cette méthode repose non seulement sur la qualité de l'ADN extrait, mais également sur le choix des amorces utilisées pour l'amplification.

L'extraction de l'ADN représente une étape primordiale : elle doit permettre d'obtenir un acide nucléique pur et suffisamment purifié afin d'éviter toute inhibition lors de la PCR. Plusieurs études ont comparé les méthodes d'extraction traditionnelles (phénol-chloroforme, digestion à la protéinase K) à des kits commerciaux comme ceux de Qiagen et Sacace. Ces derniers, bien que plus coûteux, offrent généralement de meilleurs rendements en termes de pureté et de reproductibilité (Lachaud *et al.*, 2001 ; Otterbein *et al.*, 2023).

Dans notre étude, nous avons comparé deux kits commerciaux, Qiagen (méthode manuelle) et Saccace (procédure automatisée), pour l'extraction de l'ADN de *Leishmania*. Les deux kits sont disponibles sur le marché, nécessitent l'ajout d'un contrôle interne pour la qRT-PCR, et ont fourni des résultats exploitables, confirmant leur fiabilité pour le diagnostic moléculaire de la leishmaniose.

En PCR classique, les deux kits ont permis une amplification efficace de l'ADN, sans différence notable en termes de qualité des résultats. Toutefois, le kit Qiagen, exige un temps de manipulation plus long en raison d'un protocole plus complexe, ce qui peut constituer une contrainte dans les laboratoires à haut débit. Le kit Sacace, automatisé, se distingue par une exécution plus rapide et standardisée, ce qui le rend particulièrement adapté au diagnostic de routine.

En qRT-PCR, l'ajout d'un contrôle interne est requis dans les deux cas afin de vérifier la qualité de l'extraction et d'écartier la présence d'inhibiteurs. Cela renforce la fiabilité des

résultats obtenus. Notre expérience montre que les deux kits sont performants et permettent une détection sensible et reproductible de l'ADN parasitaire.

Ces observations sont cohérentes avec celles rapportées par **(Srivastava *et al.*,2011)**, qui indiquent une sensibilité de 100 % pour le kit Saccace dans la détection de plusieurs espèces de *Leishmania*. Le kit Qiagen, quant à lui, a été associé à une sensibilité de 86,67 % dans une étude publiée par **(Dupont *et al.*, 2020)**, ce qui démontre sa robustesse malgré un protocole plus long.

Les deux kits se sont révélés fiables et efficaces pour le diagnostic moléculaire de la leishmaniose. Le choix entre les deux dépendra principalement du temps de manipulation disponible, des ressources du laboratoire et des besoins en termes de rapidité ou de volume de traitement. Le kit Sacacce, automatisé et plus rapide, convient bien au diagnostic de routine.

Par ailleurs, nous avons fait le choix d'utiliser les amorces RV1 et RV2, largement reconnues pour leur forte sensibilité dans la détection du genre *Leishmania sp*, notamment en raison de leur ciblage du kADN minicirculaire, très abondant dans le parasite. Ce choix est également appuyé par les données de la littérature, telles que celles rapportées par **(Araújo *et al.*, 2023)**, qui ont montré que ces amorces permettent une détection jusqu'à 1 fg d'ADN de *L. infantum*.

Dans notre étude, la PCR classique utilisant les amorces RV1/RV2 a permis de détecter *Leishmania* dans 100 % des échantillons analysés (7/7), ce qui témoigne d'une excellente sensibilité. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études menées chez l'homme, qui ont également rapporté des taux de détection très élevés à l'aide de cette méthode l'équipe de **(Silva *et al.*,2001)** ont rapporté une sensibilité de 97,8 % chez des patients humains, y compris asymptomatiques, en utilisant les amorces RV1/RV2 sur des échantillons de sang périphérique.

Dans notre étude, la PCR en temps réel (RT-PCR) a permis de détecter *Leishmania* chez 13 patients, parmi lesquels 7 avaient déjà été identifiés comme positifs par d'autres méthodes de diagnostics. Ainsi que la RT-PCR a confirmé 100 % des cas positifs précédemment détectés, tout en corrigeant des patients initialement négatifs par les autres techniques, ce qui souligne sa sensibilité supérieure. **(Lima Junior *et al.*,2013)** ont montré une sensibilité de 91,3 % pour la RT-PCR dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale à partir d'échantillons sanguins, soulignant son efficacité dans ce contexte. **(Bensoussan *et al.*,2006)** ont démontré une sensibilité élevée (jusqu'à 98,7 %) avec des PCR ciblant l'ADN kinétoplastique (kDNA)

dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée, confirmant que cette cible multicopie est particulièrement adaptée pour maximiser la sensibilité des tests moléculaires. Par ailleurs, **(Ghasemian et al.,2014)** ont mis en avant la rapidité (environ 1 h 30 après extraction), la non-invasivité et l'efficacité de la RT-PCR.

Selon **(Galluzzi et al.,2018)** la PCR en temps réel représente un outil diagnostique de référence dans la leishmaniose, capable de détecter l'ensemble des cas positifs identifiés par les méthodes classiques, tout en augmentant significativement le nombre total de cas détectés. Cette amélioration contribue à réduire les faux négatifs, garantissant une meilleure prise en charge clinique des patients.

Le développement du test de réaction en chaîne par polymérase en temps réel utilisant le SYBR Green a permis un diagnostic sensible, rapide, précis et reproductible de la leishmaniose viscérale (LV). Le SYBR Green est un colorant intercalant qui se lie de manière non spécifique au sillon mineur de l'ADN double brin. Lorsqu'il est lié à l'ADN, sa fluorescence augmente de plus de 100 fois, permettant ainsi une détection efficace par l'analyse de la courbe de fusion. La PCR en temps réel présente l'avantage d'éliminer l'étape post-amplification, laborieuse et sujette à la contamination, telle que l'électrophorèse sur gel, réduisant ainsi le temps d'analyse et le risque de manipulation des produits amplifiés **(Ghasemian et al., 2014)**.

. Nous avons entrepris une optimisation d'un protocole de PCR classique utilisant les amorces RV1/RV2 en l'adaptant à une PCR en temps réel basée sur SYBR Green, afin d'en évaluer la contribution de ce dernier dans le diagnostic de la leishmaniose.

Notre essai a permis la détection de l'ADN leishmanien chez 13 patients, les résultats ont mis en évidence une excellente sensibilité diagnostique. En effet, la PCR classique utilisant les amorces RV1/RV2 a permis de détecter *Leishmania* dans 100 % des cas, tout comme le protocole optimisé en PCR temps réel (SYBR Green), qui a également identifié l'ensemble des échantillons positifs. Bien que ces performances soient très élevées, elles doivent être interprétées avec prudence, notamment en comparaison avec des protocoles de PCR temps réel totalement validés dans la littérature, tels que celui de **(Blaizot et al.,2021)**, ciblant le gène Hsp70 et atteignant une sensibilité de 98 %. Cette différence apparente peut s'expliquer par la diversité des cibles moléculaires utilisées ainsi que par les variations techniques entre les protocoles, rendant les comparaisons indirectes.

Il convient également de souligner que le protocole SYBR Green évalué dans notre étude est encore en phase d'optimisation. Divers facteurs méthodologiques peuvent influencer ses performances finales, notamment les conditions d'amplification, ou encore le type d'échantillon biologique : biopsie, sérosité (aspiration), EDTA. Malgré cela, les résultats obtenus sont très encourageants et montrent clairement que l'adaptation d'une PCR classique vers un format en temps réel peut aboutir à un outil diagnostique à la fois rapide, sensible et mieux adapté aux exigences du terrain. Toutefois, des essais supplémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons sont nécessaires pour valider pleinement ce protocole et en garantir la reproductibilité.

Ces résultats préliminaires sont encourageants et suggèrent que l'adaptation de la PCR classique au format temps réel SYBR Green est à la fois faisable et prometteuse. Bien que le protocole nécessite encore des ajustements, cette approche pourrait aboutir à un outil diagnostique plus sensible, rapide et mieux adapté aux conditions de terrain. Des essais supplémentaires restent nécessaires pour valider définitivement sa performance et sa fiabilité.

Les kits commerciaux tels que le kit Saccace offrent une standardisation et une simplicité d'utilisation pour la détection de *Leishmania* par PCR en temps réel, leur coût élevé constitue un frein à leur déploiement dans les laboratoires à ressources limitées. En revanche, l'utilisation de la qRT-PCR avec le colorant intercalant SYBR Green représente une alternative plus économique, tout en conservant une bonne sensibilité et spécificité lorsqu'elle est bien optimisée (Galluzzi *et al.*, 2018).

Sur un total de 30 prélèvements analysés, qu'ils aient été réalisés sur place ou adressés au laboratoire, 23 % (soit 7 cas) se sont révélés positifs, tandis que 77 % (23 cas) sont négatifs.

La taille globale de notre échantillon est relativement faible ; ceci est dû fort probablement à la période dans laquelle notre travail a été réalisé, en dehors du pic de transmission saisonnier, ce qui a pu limiter le nombre de cas observés (Harrat *et al.*, 2014).

Les résultats négatifs peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment le contexte particulier des patients pris en charge par l'Hôpital Central de l'Armée (HCA), qui reçoit exclusivement des patients issus de la première région militaire. Cette restriction géographique implique une population provenant d'un nombre limité de wilayas, ce qui peut influencer la représentativité des cas. De plus, le profil majoritairement militaire des patients, les conditions d'exposition spécifiques à ce milieu, ainsi que les délais de consultation ou les

stades cliniques peu avancés peuvent également contribuer à la proportion importante de résultats négatifs observée.

Concernant la répartition des cas selon le sexe, la maladie affecte les deux sexes, mais une nette prédominance masculine est observée, les hommes représentant environ 80 % des cas contre seulement 20 % chez les femmes. Ce constat concorde avec les résultats de **(Zait et al.,2009)**, qui ont également rapporté une prédominance masculine dans la leishmaniose cutanée en Algérie.

Nos résultats montrent que la tranche d'âge la plus affectée par la leishmaniose est celle des 25 à 40 ans, avec un âge moyen de 30,28 ans. Cette prédominance chez les jeunes adultes rejoint les observations rapportées dans plusieurs études en Afrique du Nord. En Tunisie, **(Bousslimi et al.,2010)** ont souligné que cette population est particulièrement exposée au risque de transmission, notamment en raison de ses activités professionnelles en milieu rural ou périurbain. **(Aoun et al.,2014)** confirment cette tendance, en mettant en évidence l'extension des foyers leishmaniens vers des zones autrefois épargnées, favorisée par l'urbanisation anarchique, les changements climatiques et la mobilité humaine.

La majorité des cas diagnostiqués à l'Hôpital Central de l'Armée (HCA) correspondent à des formes cutanées de la leishmaniose, largement plus fréquentes que les formes viscérales. Nos résultats concordent avec ceux de **(Aoun et Bourathine.,2014)** et **(WHO.,2010)** confirment que la leishmaniose cutanée est fortement endémique en Algérie.

Notre étude révèle que les cas de leishmaniose sont répartis sur plusieurs wilayas, notamment Djelfa, Bouira et Alger. Cette répartition témoigne d'une large dissémination de la maladie à travers le territoire algérien, dépassant ainsi les zones historiquement endémiques telles que Biskra. Ce constat suggère une extension progressive de l'aire de transmission de la leishmaniose, probablement favorisée par divers facteurs environnementaux et humains, tels que les mouvements de population, les changements climatiques et l'urbanisation rapide.

Ces résultats s'inscrivent en parfaite cohérence avec les données rapportées par **(Zait et Hamrioui.,2009)**, mais également avec les observations plus anciennes de **(Bellazoug M.,1985)**. Ce dernier a souligné déjà l'importance des mouvements de population, incluant les migrations saisonnières et les déplacements professionnels, ce qui concerne probablement responsable de cette dispersion géographique de la leishmaniose en Algérie. **Bellazoug** mettait aussi en avant l'impact des modifications des habitats naturels et des conditions

climatiques sur la dynamique de transmission, ainsi que la nécessité d'un suivi épidémiologique rigoureux et d'une meilleure organisation des campagnes de lutte pour contrôler cette maladie.

Par ailleurs, **(Bachi *et al.*,2019)** a constaté la progression des cas de leishmaniose cutané (LC) du sud vers le nord, notamment dans les zones humides et subhumides

Sur le plan clinique, les lésions cutanées observées chez les patients de notre étude étaient majoritairement localisées au niveau des zones découvertes du corps, notamment les jambes, le visage, les avant-bras et les chevilles. Cette distribution anatomique s'explique par l'exposition préférentielle de ces régions aux piqûres de phlébotomes, en particulier durant les périodes d'activité nocturne de ces vecteurs. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **(Boubidi *et al.*,2011)**.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives :

La leishmaniose demeure un enjeu majeur de santé publique en Algérie, particulièrement dans ses formes cutanée et viscérale. Ce travail a permis d'évaluer et de comparer différentes méthodes de diagnostic, incluant l'examen direct, la culture, les tests sérologiques (ELISA, Western blot), la PCR classique, la RT-PCR, ainsi que la qRT-PCR utilisant SYBR Green.

Les résultats ont montré que la qRT-PCR (amorces RV1/RV2) constitue une méthode sensible, fiable et économique, capable de rivaliser avec des kits commerciaux plus coûteux comme Saccace. Elle a permis une détection de 100 % des cas positifs identifiés par d'autres méthodes, avec une parfaite concordance avec la RT-PCR.

En revanche, la PCR classique a présenté une sensibilité plus faible et des résultats indépendants, ce qui limite son efficacité en pratique clinique.

Notre étude souligne également la faisabilité d'adapter des protocoles classiques vers des versions en temps réel, plus adaptées aux besoins des laboratoires algériens en contexte de ressources limitées. Bien que le protocole SYBR Green nécessite encore des ajustements, les résultats obtenus sont prometteurs pour une application à grande échelle.

Enfin, cette étude ouvre la voie à une meilleure standardisation des méthodes moléculaires de diagnostic de la leishmaniose en Algérie, en renforçant la capacité de détection précoce, indispensable pour améliorer la prise en charge des patients.

Références bibliographique

Références bibliographiques :

1. **Alemayehu, B., & Alemayehu, M.** (2017). *Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host*. Health Science Journal, 11(4).
<https://doi.org/10.21767/1791-809x.1000519>
2. **Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & Boer, M. D.** (2012). *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence*. PLoS ONE, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
3. **Aoun, K., Bouratbine, A., & Ben Abda, I.** (2014). La leishmaniose en Tunisie : situation épidémiologique, dynamique de transmission et perspectives de lutte. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 107(1), 4–12. <https://doi.org/10.1007/s13149-013-0335-1>
4. **Araújo, F. S., et al.** (2023). *Evaluation of primers RV1 and RV2 for detection of Leishmania spp. in clinical samples*. Acta Tropica, 240, 106912.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106912>
5. **Arnau, E., Pérez, L., Gómez, F., Martínez, A., Sánchez, J.** (2023). *Evaluation of the Sacace Leishmania spp. Real-TM Kit for Molecular Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis*. Journal of Clinical Microbiology, 61(2), e01234-22. <https://doi.org/10.1128/JCM.01234-22>
6. **Aubry, P., & Gauzere, B.-A.** (2024). *Leishmanioses – Actualités 2024*. Centre René Labusquière, Université de Bordeaux.
7. **Bachi, F., Icheboudene, K., Benzitouni, A., Taharboucht, Z., & Zemmouri, M.** (2019). *Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Algérie à travers la caractérisation moléculaire*. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 112(2), 147–152. <https://doi.org/10.3166/bspe-2019-0087>
8. **Bellazoug, M.** (1985). *Les leishmanioses en Algérie : données épidémiologiques anciennes et récentes*. Revue de l'Institut Pasteur d'Algérie.
9. **Benikhlef, R., Aoun, K., Boudrissa, A., Abid, M. B., Cherif, K., Aissi, W., Benrekta, S., Boubidi, S. C., Späth, G. F., Bouratbine, A., Sereno, D., & Harrat, Z.** (2021). Cutaneous Leishmaniasis in Algeria ; Highlight on the Focus of M'Sila. *Microorganisms*, 9(5), 962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050962>
10. **Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L.** (2006). *Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis*. Journal of Clinical Microbiology, 44(4), 1435–1439. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>
11. **Blaizot, R., et al.** (2021). *Performance of a real-time PCR targeting the Hsp70 gene for diagnosing cutaneous leishmaniasis in field conditions*. PLOS ONE, 16(3), e0248205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248205>
12. **Boelaert, M., et al.** (2008). *Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102(1), 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.003>

Références bibliographiques

13. **Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., et al.** (2003). *Real-time PCR assay for clinical management of HIV-infected patients with visceral leishmaniasis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5080–5084. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5080-5084.2003>
14. **Boubidi, S. C., Boumechache, A., Aoun, K., Harrat, Z., & Pratlong, F.** (2011). *Leishmania major in Algeria: new foci of cutaneous leishmaniasis and review of the distribution of zymodemes*. *Parasite*, 18(2), 115–120. <https://doi.org/10.1051/parasite/2011182115>
15. **Bousslimi, N., Aoun, K., Ben-Ayed, S., Harrat, Z., Mokni, M., & Belhadj-Hamida, N.** (2010). *Epidemiological and clinical features of cutaneous leishmaniasis in Central Tunisia: A retrospective study of 170 cases*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24(7), 806–811. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03540.x>
16. **Bryceson, A.** (1969). *Leishmaniose cutanée diffuse en Éthiopie I. Caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63(6), 708–737. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(69\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(69)90116-3)
17. **Carvalho, S. F. G., et al.** (2022). *Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(1), 10–15.
18. **Chaar, D., Haouas, N., Dedet, J. P., Babba, H., & Pratlong, F.** (2014). *Leishmaniasis in Maghreb : An endemic neglected disease*. *Acta Tropica*, 132, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.018>
19. **Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Boelaert, M., & Alvar, J.** (2007). *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?* *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
20. **Chelsea Marie, PhD, University of Virginia; William A. Petri, Jr, MD, PhD, University of Virginia School of Medicine.** (2023). *Vérifié/Révisé mars 2023*.
21. **Cota, G. F., De Sousa, M. R., Demarqui, F. N., & Rabello, A.** (2012). *The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1665. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001665>
22. **De Araújo, H. K., et al.** (2023). *Limitation of primers used in PCR for the characterization of Leishmania infantum*. *Journal of Parasitology*, 109(5), 445–449. <https://doi.org/10.1645/21-130>
23. **Dupont, D., et al.** (2020). *Comparative study of DNA extraction methods for detection of Leishmania spp. by qPCR*. *PLOS ONE*, 15(12), e0243884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243884>
24. **Ferroglio, E., Rossi, L., & Lavazza, A.** (2007). *Utilisation du Western blot pour la confirmation du diagnostic de la leishmaniose canine*. *Parasitologie vétérinaire*, 144(1–2), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.020>
25. **Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M.** (2018). *Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis*. *Parasites & Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>

Références bibliographiques

26. **Ghasemian, M., et al.** (2014). *Real-time PCR using SYBR Green for detection and quantification of Leishmania infantum DNA*. Journal of Parasitic Diseases, 38(3), 290–295. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0255-9>
27. **Guessous-Idrissi, N., Rhalem, A., Riyad, M., Sahibi, H., & Bichichi, M.** (1997). Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Morocco. Archives de l'Institut Pasteur du Maroc, 44, 63–68.
28. **Guide taxonomique des maladies infectieuses** (2012). *Chapitre 17 Euglénozoaires*. In: Berman, J. J. Pages 95–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415895-5.00017-9>
29. **Harrat, Z., Pralong, F., Belkaid, M., et al.** (1996). *Leishmania major MON-25: une souche atypique isolée en Algérie*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90(6), 625–626. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90429-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90429-9)
30. **Hide, M.** (2004). *Variabilité pathogénique du complexe Leishmania donovani. Agent de la Leishmaniose viscérale*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II.
31. **Izri, A., Bendjaballah, A., Andriantsoanirina, V., & Durand, R.** (2014). Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3). <https://doi.org/10.3201/eid2003.13-1152>
32. **Izri, A., Bendjaballah-Laliam, A., Sereno, D., & Akhoundi, M.** (2021). *Updates on Geographical Dispersion of Leishmania Parasites Causing Cutaneous Affections in Algeria*. Pathogens, 10(3), 267. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030267>
33. **Keita, S. M., Diallo, M., Traoré, A., et al.** (2003). *Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose cutanée au Mali*. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 96(5), 379–381.
34. **Keita, S., Diallo, S., Diallo, M., Camara, M., & Diallo, B.** (2003). *Diagnostic parasitologique de la leishmaniose cutanée à Conakry*. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 96(3), 214–217.
35. **Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P.** (2001). *Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of Leishmania infantum in asymptomatic dogs*. Journal of Clinical Microbiology, 39(3), 1395–1400. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1395-1400.2001>
36. **Lima Junior, M. S., et al.** (2013). *Performance of quantitative real-time PCR assay in the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood samples*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 55(6), 393–398. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600007>
37. **Maia, C., & Campino, L.** (2008). *Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection*. Veterinary Parasitology, 158(4), 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>
38. **Maritati, M., Trentini, A., Michel, G., Hanau, S., Guarino, M., De Giorgio, R., Pomares, C., Marty, P., & Contini, C.** (2023). *Performance of five serological tests in the diagnosis of visceral and cryptic leishmaniasis: a comparative study*. J Infect Dev Ctries, 17(5), 693–699.

Références bibliographiques

39. **Marty, P., Aït-Oudhia, K., Rivollet, D., Foucher, A., Sobesky, R., & Goyard, S.** (2007). *Évaluation du Western blot pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale chez les patients immunodéprimés*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1902–1906. <https://doi.org/10.1128/JCM.02451-06>
40. **Mihoubi, I., De Monbrison, F., Frahtia, K., Picot, S., & Gassem, N.** (2012). *Utility of real-time PCR for the diagnosis of infantile visceral leishmaniasis in Algeria*. *Médecine et Santé Tropicales*, 22(1), 61–64. <https://doi.org/10.1684/mst.2012.0011>
41. **Mokni, M.** (2019). *Leishmanioses cutanées*. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 146(3), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
42. **Nadau Q., Laure, Odette, & Nadau, C.** (2005). *Étude préliminaire de l'utilisation de la protéine lack dans le test D'intra-Dermo-Réaction de la leishmaniose canine*. Thèse pour obtenir le grand Docteur Vétérinaire, Toulouse, 116 p.
43. **Organisation mondiale de la Santé (OMS).** (2023). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
44. **Organisation mondiale de la santé (OMS).** *Principaux repères sur la leishmaniose*. Dernière mise à jour en janvier 2022 (who.int).
45. **Otterbein, L. R., et al.** (2023). *Evaluation of DNA extraction methods for molecular diagnosis of parasitic infections*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 37(4), e24899. <https://doi.org/10.1002/jcla.24899>
46. **Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.** (2007). *Cutaneous leishmaniasis*. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
47. **Sadjadi, M., et al.** (2023). *Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative Leishmania species in Morocco by using three PCR-based assays*. *Parasites & Vectors*, 7, 420.
48. **Scarpini, S., et al.** (2022). *Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics*. *Microorganisms*, 10(10), 1887. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101887>
49. **Siala, E., Bouratbine, A., & Aoun, K.** (2022, 1 janvier). *La leishmaniose viscérale méditerranéenne : Actualités du diagnostic biologique*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8996314/>
50. **Silva, E. S., Gontijo, C. M. F., & Pacheco, R. S.** (2001). *Detection of Leishmania DNA by PCR in asymptomatic human carriers*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(5), 471–475. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000500005>
51. **Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., & Sundar, S.** (2011). *Diagnosis of visceral leishmaniasis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>
52. **Tasyaran, M. A., Yilmaz, S., Kizilates, B., & Avkan-Oguz, V.** (2021). *Comparison of liver extract medium with Novy–MacNeal–Nicolle medium and the molecular method for the diagnosis of leishmaniasis*. *Klimik Journal*, 34(1), 18–22.

Références bibliographiques

53. **Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R.** (2017). *Leishmaniasis: a review*. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
54. **Touhami, N. A. K., Ouchene, N., Ouchetati, I., & Naghib, I.** (2022). Animal leishmaniasis in Algeria : A systematic review and meta-analysis. *Comparative Immunology Microbiology And Infectious Diseases*, 93, 101930. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101930>
55. **World Health Organization: WHO.**(2010). control of the leishmaniasis .WHO Technical Report Series ,No.949,Geneva
56. **World Health Organization: WHO.** (2019, 31 janvier. Leishmaniasis. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2
57. **Zait, H., & Hamrioui, B.** (2009). *Leishmanioses cutanées en Algérie : Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 412, 33–39. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(09\)73933-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(09)73933-4)

Annexes

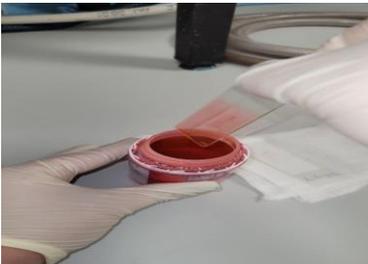
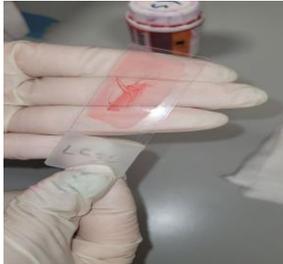
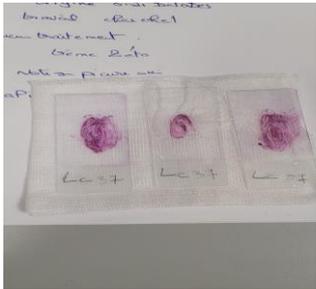
Matériels :

Matériel biologique	Matériel non biologique	
	Équipements	Réactifs et produits chimiques
<ul style="list-style-type: none"> • Patient (sang, sérum, moelle osseuse, biopsie) 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit de TDR (cassette et pipette), compresse lame • bistouri • microscope optique • bécher • papier filtre • Tube a hémolyse • micropipette • plaque de micro titration • incubateur • plaque d'aluminium • centrifugeuse • spectrophotomètre • tube flacon • agitateur • plaque à rigole • colonne Qiagen • bain marie • tube d'éluion • les gants • les surblouses • la hotte a flux lumineaire • tube epindorf • thermocycleur • les microtubes, • électrophorèse sur gel d'agarose 	<ul style="list-style-type: none"> • Diluant, • l'eau physiologie • colorant éosine-RAL 555 • colorant bleu-RAL 555 • méthanol • colorant giemsa • Tampon PBS • diluants A et B • conjugué • solution stop • substrat • solution de lavage • l'eau distillé • bandelette sensibilisé (R1) • tompon échantillon (R2) conjugué anti-IGg(R3), • Tompon de lavage (R6) • AL, • protéinase k, • éthanol, • tompon de lavage AW1 • tompon de lavage AW2 • tompon AE • ATL • les amorces (RV1 et RV2) • master mix. • FIX-RAL 555 • TAE • BET • Marqueur de taille • Colorant (revelation)

Annexe 2

Coloration RAL :

- Fixation par méthanol ou FIX-RAL 555 pendant 5min et laisser les séchés.
- Plonger la lame par le premier colorant Eosine-RAL 555 pendant 5 seconds.
- Plonger la lame par le deuxième colorant Bleu-RAL 555 pendant 5 seconds.
- Rincer doucement la lame avec l'eau du robinet.

		
<p>Les colorants (HCA)</p>	<p>Dépôt de liquide séreux sur la lame (HCA)</p>	<p>Fixation par méthanol (HCA)</p>
		
<p>Coloration par eosine-RAL555 (HCA)</p>	<p>Lame colorée par eosine-RAL555 (HCA)</p>	<p>Coloration par Bleu-RAL555(HCA)</p>
		
<p>Lame colorée par Bleu-RAL555(HCA)</p>	<p>Rinçage avec l'eau du robinet</p>	<p>Lame obtenue après coloration RAL (HCA)</p>

Annexe **3**

Coloration par MAY GRÜNWARD GIEMSA (MGG):

Intérêt : permet l'observation directe des amastigotes de leishmania

Préparation de PBS :

- Remplir l'éprouvette avec environ 1000mL d'eau distillée stérile.
- Ajouter le contenu du flacon de PBS (poudre lyophilisée) dans l'eau.
- Mélanger jusqu'à dissolution complète.
- Transférer dans un flacon propre et stérile, étiqueter avec : PBS et Date de préparation Initiales.
- Conserver à température ambiante.



Préparation du matériel et réactif



Verser le PBS en poudre dans l'eau distillée et mélanger

Préparation du colorant :

- Diluer le Giemsa au 1/10 avec de l'eau tamponnée (pH 7–7.2) à l'aide d'un papier filtre et entonnoir.
- Fixation : Recouvrir la lame avec du méthanol pur, Laisser agir 3 minutes.
- Coloration : Recouvrir la lame avec le colorant dilué, Laisser agir 20 minutes.
- Rinçage : Laver doucement avec de l'eau de robinet.

Annexes

- Séchage : Laisser sécher à l'air libre.

		
Fixation au méthanol	Dilution et filtration MGG	Verser le colorant en couvrant toute la surface de la lame après 20 min rincer avec l'eau

Observation au microscope :

- Examiner sous grossissement (*100) au microscope optique
- Rechercher les amastigotes dans les macrophages libres dans l'échantillon

✚ Présence des amastigotes : Test positive

✚ Absence des amastigotes : Test négative

	
Mise au point grossissement (*100) (HCA)	Ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lame (HCA)

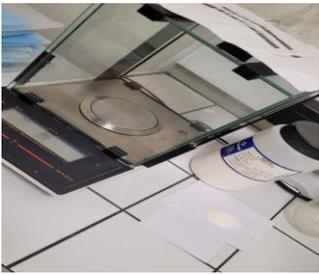
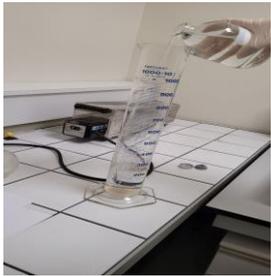
- La confirmation se fait par d'autres tests sérologiques et moléculaires.

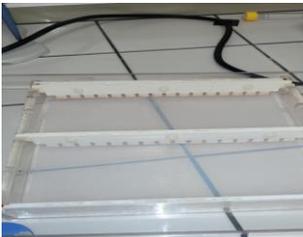
Annexe 4

Préparation de gel d'agarose à 2% :

Mode opératoire gel d'agarose

- Dans une bouteille en verre graduée mettre 6g de poudre d'agarose.
- Ajouter 270 ml d'eau distillée et 30 ml de TAE (x1).
- Bien mélanger puis mettre à chauffer dans un bain marie pendant 15 minutes jusqu'à Homogénéisation totale du mélange et l'obtention d'un liquide transparent.
- Retirer le mélange du bain marie et laisser le tiédir.
- Ajouter 3 gouttes de BET après avoir retiré le mélange (TAE + poudre d'agarose).
- Coulage du gel dans la cuve à électrophorèse horizontale.

			
Peser 6g d'agarose	Verser 270 d'eau distillée	Verser 30 ml de TAE x1	Verser la poudre d'agarose dans la fiole et mélanger

		
Mélanger bien puis mettre à chauffer dans bain marie	Retirer le mélange et laisser le tiédir puis ajouter 3 gouttes de BET	Coulage du Gel

ATTENTION : le BET est un produit classé CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique).

Annexe 5

TDR (test de diagnostic rapide) :

Intérêt : permet de détecter rapidement la présence des AC /AG spécifiques du parasite.

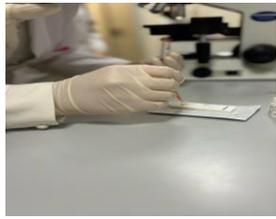
Les étapes de réalisation :

- 1- Préparation du matériel : le kit TDR qui contient (une cassette, un diluant et une pipette).
- 2- Dépôt de l'échantillon : déposer une quantité de sérum à l'aide d'une pipette (fournit dans le kit) sur la cassette.
- 3- L'ajout du diluant : ajouter quelques gouttes du diluant pour faciliter la migration des composants sur la bandelette. Laisser le test réagir pendant (10 à 30 min).
- 4- Lecture des résultats:

Une bande C-contrôle =test valide mais (négatif).

Deux bandes (C-T) = test positif.

Absence de bande = test invalide

		
Préparation des matériels	Prélèvement de sérum sanguin à l'aide d'une pipette à partir d EDTA	Dépôt de l'échantillon sur la cassette de TDR
		
L'ajout de diluant	Attendre le résultat 15min	Résultat négative)

Annexes

Annexe 6

A.1). Extraction de l'ADN :

A.1.1) Kit Qiagen :

Étape permettant d'obtenir d'ADN génomique pure

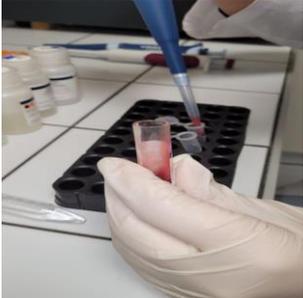
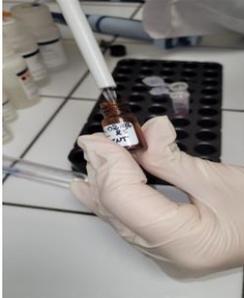
✚ Les étapes :

Étape de lyse cellulaire :

- Mettre 200ul de sang dans un Eppendorf et ajouter 200ul d'AL ,10ul de protéinase K puis vortexer.
- Mettre les Eppendorfs dans le bain marie 30 min à 56°.
- Ajouter 200ul d'éthanol puis transférer sur les colonnes Qiagen.
- Centrifuger 3min à 10000rpm

Protéinase k



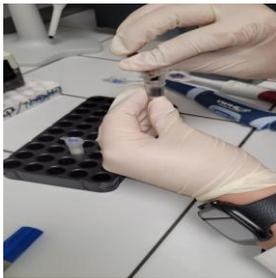
			
Ajouter 200ul de sang	Ajouter 200ul d'AL	Ajouter 10ul de protéinase K	Vortexer le mélange

Annexes

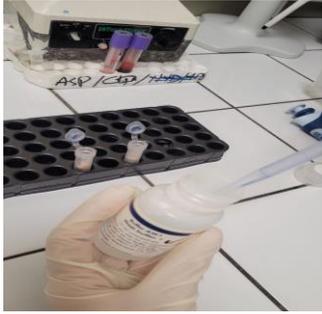


Purification :

- Après centrifugation, jeter le culot et remettre la colonne dans un tube collecteur et ajouter 500ul d'AW1 et Centrifuger 3min à 10000rpm.
- Répéter la même étape et ajouter 500ul d'AW2 et Centrifuger 3min à 10000rpm.
- Transférer la colonne dans un Eppendorf et ajouter 300ul d'AE et Centrifuger une dernière fois 3min à 10000rpm.

			
Ajouter 500ul d'éthanol	Vortexer le mélange	Verser le mélange dans une colonne Qiagen	Centrifuger et jeter le culot

Annexes



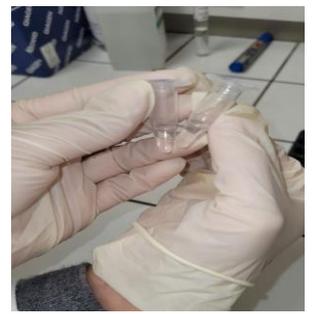
Ajouter 500 ul Aw1 et centrifuger



Ajouter 500 ul AW2 et Centrifuger



Ajouter 300 ul AE et centrifuger



Les extraits obtenus

Protéinase K : Enzyme qui digère les protéines, lyse les cellules, dégrade les nucléases et libère l'ADN.

Buffer AL (lysis buffer) : Contient du chaotrope (ex : guanidine) pour désorganiser les membranes cellulaires et nucléaires et dénaturer les protéines. Facilite la fixation de l'ADN sur la colonne de silice.

Éthanol : Favorise la liaison de l'ADN à la membrane de silice de la colonne.

Buffer AW1 : Premier tampon de lavage, élimine les protéines, débris cellulaires et inhibiteurs PCR (à base de sel et d'alcool).

Buffer AW2 : Deuxième lavage plus fort, élimine les traces de contaminants (ex. protéines, sels).

Buffer AE (éluant) : Tampon faiblement salin, libère l'ADN fixé sur la colonne (élution) en le rendant disponible pour PCR ou qPCR.

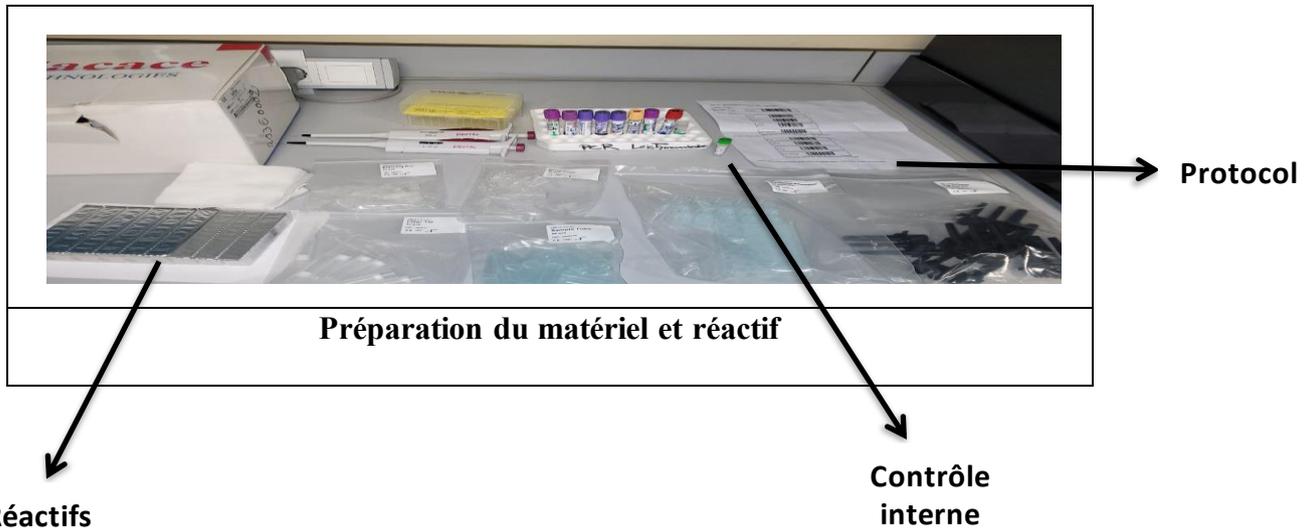
A.1.2). Extraction de l'ADN : Saccace (automate)

Les étapes :

- Préparation de matériel et réactif utilisé.
- Placer les tubes dans l'appareil saccace (piercing pin, elute tube, réaction chamber, tip holder, sample tube et le réactif).

Annexes

- Ajouter 200ul de l'échantillons dans tube échantillons et ajouter 10ulde contrôle interne si on va faire une RT PCR.
- Lancer le Protocol à l'aide de l'appareil saccace.
- Après 54 min on obtient l'extrait d'ADN pur (pour 200ul de sang, on obtient 100ul d'extrait).



Ajouter 200ul de sang dans tube à échantillons	Ajouter 10ul de contrôle interne	Placer les tubes à échantillons dans l'appareil



Annexe 7

• Matériel utilisé pour l'étude parasitologique

➤ Matériel consommable



Pipette pasteur



Micropipette



Lamelles



Embouts



Lame

➤ Les milieux de culture



Milieu NNN et blanc d'œuf

Annexes

➤ Les appareillages



Microscope optique.



Étuves (25C° et 37C°)



Hotte

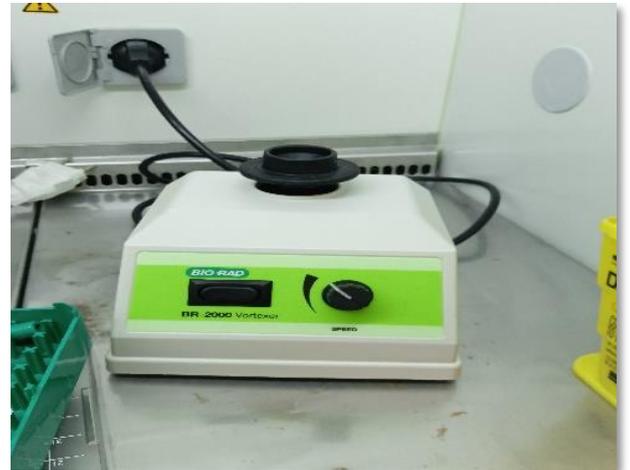


Table lumineuse à UV

Annexes



Balance



vortex



Agitateur



Centrifugeuse

Annexes



Rotor-geneQ



Incubateur

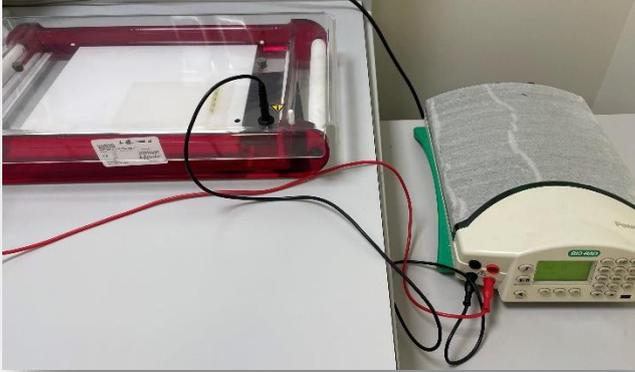


Spectrophotomètre



Le SaMag-12-CE-IVD Sacacce

Annexes



Cuve d'électrophorèse



Thermocycleur



Bain marie

Annexe 8

- **Matériel utilisé pour l'étude moléculaire**

- **Matériel consommable**



Embout



Microtubes de 5 ml (Eppendorf)

- **Amorce utilisée**



RV1/RV2

Annexes

➤ Les réactifs



Colorant Bleu/Orange



Marqueur de taille



Master Mix



Eau pour préparation injectable



H2O



Kit sybr green

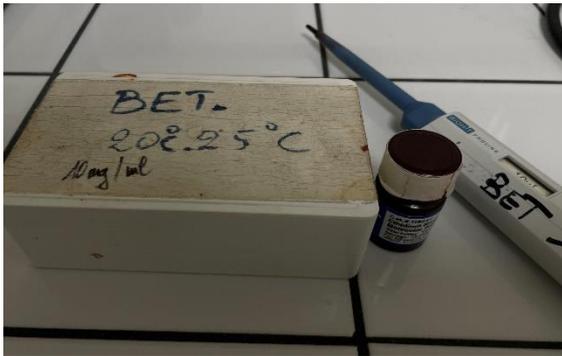


Controle interne

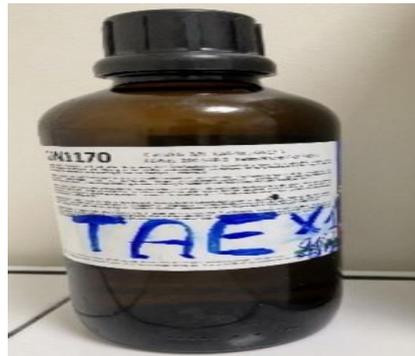


Kit sacacce

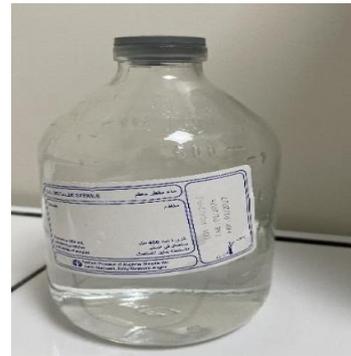
Annexes



BET



Tampon TAE

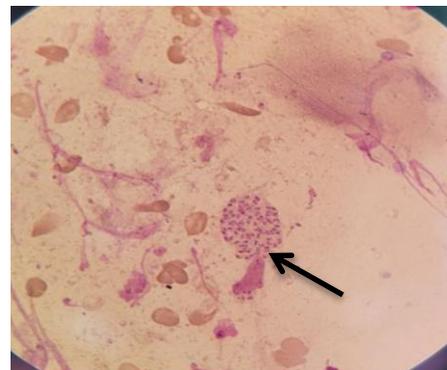
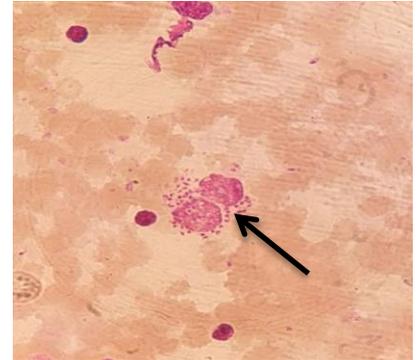
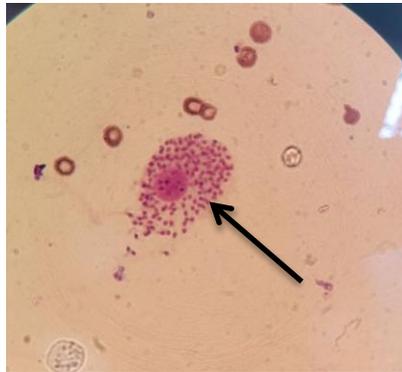
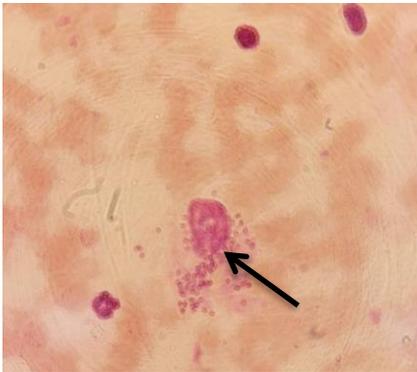


Eau distillée

• Les Différentes lésions observées chez les patients :



Les formes amastigotes :



Paramètre d'évaluation de performance diagnostique :

Pour connaître réellement la fiabilité de ces techniques, nous avons calculé la sensibilité et la spécificité pour chacune d'elles. Le calcul de ces paramètres passe par la connaissance des définitions suivantes :

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

FP : faux positifs, représente le nombre de patients positifs selon la technique en question, mais négatifs avec les autres techniques, les patients étant négatifs.

FN : faux négatifs, représente le nombre de patients négatifs avec la technique en question, mais positifs avec au moins une autre technique.

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

La sensibilité : la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente. Elle est donnée par : $\frac{VP}{VP+FN}$

Annexes

La **spécificité** : la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades, est donnée par :

VN/VN+FP

Les fiches de Renseignements :

Hôpital Central de l'Armée - Dr. Mohamed Sghir Nekkache -
 المستشفى المركزي للجيش " الدكتور نقاش محمد صغير"
 Bp 244 Kouba - Algérie

Laboratoire : Parasitologie - Mycologie médicales. Unité : Leishmanioses.

4. Diagnostic parasitologique			
Biopsie de la/des lésions : [] Oui [] Non	Si - Oui - : [] Positive [] Négative	Culture : [] Oui [] Non Si - Oui - : [] Positive [] Négative	
Examen microscopique direct (frottis) : [] Oui [] Non		Si - Oui - : [] Positif [] Négatif	
5. Prise en charge			
Date de début du traitement : (jj/mm/aaaa)			
Type de traitement dispensé : nettoyage/pansement [], intralésionnel [], cryothérapie [], intramusculaire/systémique [], thermothérapie [], autre (préciser) :			
Nom du médicament utilisé : stibogluconate de sodium [], glucantime [], autre (préciser) :			Dosage administré : :
Date du dernier suivi après la fin du traitement : (jj/mm/aaaa)			
Traitement achevé : [] Oui [] Non		Résultat : [] Guérison [] Échec [] Rechute [] Patient n'est pas venu pour le dernier suivi après la fin du traitement	

- Pour la leishmaniose cutanée :

République Algérienne Démocratique et Populaire
 Ministère de la défense nationale
 Première région militaire
 Hôpital Central de l'armée Dr MOHAMED ESSGHIR NEKKACHE
 Service de parasitologie mycologie médicale : Pr H. Adjmi .

Fiche de renseignement pour le diagnostic de la
Leishmaniose Cutanée

Fiche N° :
 Nom : Prénom : Sexe : Profession :
 Tel : Unité : Hôpital : Service :
 Origine géographique précise : Groupage sanguin :
 Notion de séjour en zone d'endémie de leishmaniose ou autre zone :
 Médecin traitant : Date de prélèvement :
 Date de début de la maladie : Evolution :
 Antécédents : - Personnels :
 - Familiaux :

Renseignements cliniques :
 Notion de piqûre de moustique :
 Nombre de lésion : Localisation : (préciser l'endroit exacte)
 Visage Membre inférieur Membre supérieur Cou et nuque

Autre localisation :
 Nature de lésion :

Crouteuse	<input type="checkbox"/>	Ulcéérée	<input type="checkbox"/>
Sèche	<input type="checkbox"/>	Inflammatoire	<input type="checkbox"/>
Nodulaire	<input type="checkbox"/>	Squameuse	<input type="checkbox"/>
Lipoïde	<input type="checkbox"/>	Furonculoïde	<input type="checkbox"/>

Autre pathologie :
 Autre symptômes même inhabituels :
 Autre signes :

Traitement : Posologie : Date :
 La recherche des leishmanioses a-t-elle déjà été faite : Oui : Non :
 Où : Résultat :
 Résultat de l'examen au laboratoire :

Annexes

- Pour la leishmaniose viscérale :

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de la défense nationale
Première région militaire
Hôpital Central de l'armée Dr MOHAMED ESSGHIR NEKKACHE
Service de parasitologie mycologie médicale : Pr H. Adjmi .

Fiche de renseignements pour le Diagnostic biologique de la
Leishmaniose viscérale

Fiche N° :

Nom :Hôpital :Service :
Prénom :Age :Sexe :
Origine géographique précise :
Notion de séjours en zone d'endémie de leishmaniose ou autre zone :
Médecin traitant :Date de prélèvement :
Date de début de la maladie :
Antécédents : - Personnels :
- Familiaux :

Symptomatologie clinique :

Fièvre	Hépatomégalie	Splénomégalie	pâleur	amaigrissement	adénopathies	hémorragies

Autres symptômes :

- Cutanées :
- Pulmonaires :
- Digestifs :
- Autres symptômes même inhabituels :

Syndrome biologique :

Anémie	Thrombopénie	Leucopénie	Formule blanche	VS	Electrophorèse des protéines	Taux de CD4	Charge virale

Autres signes :

Notion de prise de traitements : molécule :Posologie :Date :

Autres drogues :

La sérologie leishmanienne a-t-elle déjà été faite : Oui : Oû :Résultat.....
Non :

La recherche de Leishmanies dans la moelle osseuse ou la rate a-t-elle été pratiquée :
.....Résultat :

Remarque :

- Toutes les photos sont prises au sein de laboratoire parasitologie mycologie médical de l'hôpital centrale d'armée (photos personnelles).
- Tous les protocoles utilisés sont des protocoles mères validés par l'équipe technique, et ont servi de référence pour la mise en œuvre des différentes techniques de diagnostic (examen direct, culture, ELISA, PCR, qRT-PCR...)

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البليدة 1
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de

Master en Biologie

Filière : sciences biologiques

Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème

Mise au point d'une QRT PCR (RV1, RV2) pour le diagnostic de
la Leishmaniose

Présenté par :

Bendaikha Cirine
Mohammedi Sara

Soutenu le :22/06/2025

Devant les membres du jury :

Mme Kadri. F
Mr Benyahia. N
Mr Abdelouahed. K
Mme Hamzi.W
Mme Saadi.L

MCA/USDB1
MAA/USDB1
Pr/HCA
MCA/USDB1
Pr/USDB1

Présidente
Examinateur
Promoteur
Co promotrice
Invité d'honneur

Année universitaire : 2024/2025