

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Universite Saad Dahleb Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Projet de fin d'études
en vue de l'obtention du diplôme de Master
en science de la nature et de la vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique

Thème

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE
DES SOUCHES DE *LEISHMANIA* ISOLEES DU CHEVAL**

Réalisé par : M^{lle} OUHAÏT ASMA

Soutenu le : 02 Juillet 2025

Membres de jury :

Mr. N. BENYAHIA

MAA, USDB 1

Président

Mme. R. AISSANI

MCB, USDB 1

Examinatrice

Mme. F. BACHI

Professeure, IPA

Promotrice

Promotion 2024 / 2025

REMERCIEMENTS

Je remercie Allah tout puissant, qui m'a donné la capacité et la patience pour continuer mes études et dépasser toutes les difficultés rencontrées.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma promotrice de mémoire Pr. Fatma BACHI, d'avoir accepté de m'encadrer, pour sa modestie et pour la confiance et la liberté qu'elle m'a accordé tout au long de la réalisation de ce mémoire. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Mes remerciements les plus sincères vont à Mme Nesrine BENFARES pour le partage de son expérience, son soutien constant, ses encouragements, et pour l'ambiance agréable tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Mr. Ramdane MOHAMED SAID et tous les professeurs qui m'ont enseignés, je leur remercie pour la qualité de leur enseignement.

Mes sincères remerciements vont à Mr. N. BENYAHIA de me faire l'honneur de juger ce travail, ainsi qu'à Mme. N. AISSANI pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents, ma sœur et mes frères, pour leurs encouragements et leur patience.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du laboratoire de biologie parasitaire, pour leur soutien moral et leurs encouragements, en particulier à Mme. Sakina BELKHADEM qui m'a toujours soutenue par sa présence au quotidien.

Merci également à mes amis (es) pour leur écoute, leurs encouragements et leurs sourires.

Je remercie du fond de mon cœur ma meilleure amie Melle Sara MAHIEDINE qui me soutien et m'encourage toujours.

Table des matières

1. LE PARASITE PATHOGENE : <i>LEISHMANIA</i>	4
1.1. DEFINITION :	4
1.2. HISTORIQUE :	4
1.3. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE :	4
1.3.1. <i>Taxonomie</i> :	4
1.3.2. <i>Génome du parasite</i> :	7
a) L'ADN nucléaire :	7
b) l'ADN kinétoplastique (ADNk) :	7
1.3.3. <i>La morphologie du parasite</i> :	7
a) La forme amastigote :	7
b) La forme promastigote :	7
1.3.4. <i>L'échappement cellulaire des leishmanies</i> :	8
1.3.5. <i>Les vecteurs</i> :	9
1.3.6. <i>Les réservoirs</i> :	10
1.3.7. <i>Cycle de vie</i> :	11
1.4. LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE :	12
a) Dans le monde :	12
b) En Algérie :	13
2. LA CLINIQUE DE LA LEISHMANIOSE	13
2.1. LA LEISHMANIOSE VISCERALE :	14
2.2. LA LEISHMANIOSE CUTANEE :	14
2.2.1. <i>La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) à L. major</i> :	14
2.2.2. <i>La leishmaniose cutanée sporadique ou du Nord (LCS ou LCN)</i> :	15
2.2.3. <i>Leishmaniose cutanée chronique (LCC)</i> :	15
2.3. LA LEISHMANIOSE CUTANEOMUQUEUSE (LCM) :	15
3. DIAGNOSTIC DE LA LESHMANIOSE :	15
3.1. DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE :	15
3.1.1. <i>Examen direct</i> :	15
3.1.2. <i>Culture</i> :	16
3.2. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE :	17
3.2.1. <i>L'immunofluorescence indirect (IFI)</i> :	18
3.2.2. <i>Test immunoenzymatique (ELISA)</i> :	18
3.2.3. <i>Le western- Blot</i> :	18

3.3.	DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE :	18
4.	TRAITEMENT :	19
4.1.	TRAITEMENT DE LV :	19
4.2.	TRAITEMENT DE LC :	19
5.	PROPHYLAXIE :	20
5.1.	PREVENTION DES PIQUES DE PHLEBOTOMES	20
5.2.	LUTTE CONTRE LES RESERVOIRS ANIMAUX	20
5.2.1.	<i>Chien</i> :	20
5.2.2.	<i>Rongeurs</i> :	20
5.3.	LUTTE CONTRE LE VECTEUR	20
5.4.	DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT	20
6.	MATERIEL :	22
6.1.	MATERIEL BIOLOGIQUE :	22
6.2.	MATERIEL NON BIOLOGIQUE :	22
6.2.1.	<i>Les équipements</i> :	22
6.2.2.	<i>Le petit matériel</i>	23
6.2.3.	<i>Réactifs et Tampons de la PCR</i> :	23
6.2.4.	<i>Réactifs et Tampons du séquençage</i> :	24
7.	METHODES :	24
7.1.	LES ETAPES DE LA TECHNIQUE PCR :	24
7.1.1.	<i>Extraction de l'ADN</i> :	24
7.1.1.1.	Principe :	24
7.1.1.2.	Mode opératoire :	25
7.1.2.	<i>Amplification de l'ADN Leishmania par PCR-ITS1</i> :	26
7.1.2.1.	Procédure	26
7.1.3.	<i>La révélation des produits d'amplification</i> :	28
7.1.3.1.	Procédure	28
7.2.	LES ETAPES DE SEQUENÇAGE :	28
7.2.1.	<i>Purification des produits d'amplification (Amplicons-ITS1)</i> :	29
7.2.1.1.	Protocole :	29
7.2.2.	<i>PCR de séquençage des amplicons ITS1 purifiés (PCR à terminaison de chaîne)</i> :	29
7.2.2.1.	Procédure :	30
7.2.3.	<i>Purification des amplicons ITS1 marqués au Sephadex</i> :	31
	Procédure :	31
7.2.4.	<i>Séquençage de Sanger</i> :	31
	Mode opératoire :	32

7.3.	TRAITEMENT DE DONNEES :.....	33
8.	RESULTATS ET DISCUTION :.....	36
8.1.	RESULTATS	37
8.1.1.	<i>Résultats de l'amplification de l'ADN :.....</i>	<i>37</i>
8.1.2.	<i>Résultats de séquençage :.....</i>	<i>38</i>
8.2.	DISCUSSION :.....	41

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNk : Acide désoxyribonucléique kinétoplastique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

C : Cytosine

ddNTPs : didésoxyribonucléotides

dNTPs : désoxyribonucléotides

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

G : Guanine

IFI : Immunofluorescence indirect

ITS1 : Internal Transcribed Spacer 1

Kpb : kilo paire de bases

LBA : Liquide de lavage broncho-alvéolaire

LC : Leishmaniose cutanée

LCC : Leishmaniose cutanée chronique

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LCN : Leishmaniose cutanée du Nord

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique

LE : Leishmaniose équine

LE : Leishmaniose équine

LPG : Lipophosphoglycane

LV : Leishmaniose viscérale

LVA : Leishmaniose viscérale de l'adulte

LVI : Leishmaniose viscérale infantile

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MGG : May-Grünwald-Giemsa

NCBI : National Center for Biotechnology Information

min : minute

MRP : MARCKS-related Protein

MT : Marqueur de Taille

NO : Oxyde nitrique

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

pdt : pendant

pH : Potentiel hydrogène

PMO : Ponction de Moelle Osseuse

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

RFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction

Sec : seconde

SRH : Système Réticulo-Histiocytaire

T : Thymine

TBE : Tris-Borate-EDTA

tr : tours

UV : Ultraviolet

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Classification mise à jour des espèces <i>de Leishmania</i> (M. Akhoundi et al., 2017)...	6
Figure 2 : Représentation schématique des principaux organites intracellulaires de la forme amastigote (a) et la forme promastigote (b). (Landfear, S. M. 2022).	8
Figure 3 : Phlébotome femelle (<i>Phlebotomus papatasi</i>) lors du repas sanguin. (ECDC/Photographer)	10
Figure 4 : Cycle de vie de parasite <i>Leishmania</i> (Montaner-Angoiti et Llobat 2023).	12
Figure 5 : Les amastigotes dans le cytoplasme des macrophages après coloration Giemsa (https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html).	16
Figure 6 : les promastigotes en culture (https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html).	17
Figure 7 : Représentation schématique des étapes de l'extraction de l'ADN.	25
Figure 8 : Représentation schématique de L'espace interne transcrit (ITS) dans l'opéron ribosomal et la position des amorces utilisées (LITSR et L5.8S) dans cette étude pour amplifier la séquence ITS1 (El tāi et al., 2000).	26
Figure 9 : Le séquençage Sanger (https://microbenotes.com/sanger-sequencing/).	32
Figure 10 : Révélation sur gel d'agarose à 1.5 % des produits d'amplifications de PCR-ITS1. Puits n°1 : Marqueur de taille. Puits n°2 : Contrôle négatif. Puits n°7 : Contrôle positif. Puits n°3, 4, 5, 6 et 8 : Echantillons.	37
Figure 11 : Révélation sur gel d'agarose à 1.5 % des produits d'amplifications de PCR-ITS1. Puits n°1 : Marqueur de taille. Puits n° 7 : Contrôle positif. Puits n° 9 : Contrôle négatif. Puits n° 2, 3, 4, 5, 6 et 8 : Echantillons.	38
Figure 12 : Exemple de résultat de chromatogramme dans Chromas, obtenu après une lecture de la séquence reverse analysée de L. CH 7.....	38
Figure 13 : Exemple d'alignement des séquences corrigées : L. CH 7 et L. CH 2, avec une séquence de référence (AJ634355) dans MEGA, et une représentation en surbrillance d'une partie du chromatogramme (Figure11).	39
Figure 14 : Les séquences consensus obtenues pour les 3 échantillons appartenant aux chevaux n° 2, 7 et 9 respectivement.	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences d’amorces sens et antisens utilisées dans la PCR-ITS1 (El Tai et al., 2000).....	27
Tableau 2 : Composition du mélange réactionnel (Mix) pour PCR-ITS1 (El tai et al., 2000). 27	
Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel de la PCR de séquençage (QSP le nombre amplicons ITS1 purifiées).	30
Tableau 4 : Liste des chevaux prélevés dans notre études.	36
Tableau 5 : Identification des espèces de <i>Leishmania</i> à partir d'échantillons de sang des trois chevaux positifs à la PCR, par séquençage de l'ADNr ITS1.	40

INTRODUCTION

La leishmaniose est une maladie parasitaire à transmission vectorielle répandue dans l'ancien et le nouveau monde, due à un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire du genre *Leishmania*, et transmise par la piqure de phlébotomes femelles infectés. Elle évolue cliniquement chez l'homme sous trois formes : cutanée, viscérale et cutanéomuqueuse, touchant respectivement la peau, les viscères et les muqueuses (Dedet 1999 ; Alemayehu 2017 ; Mokni 2019). La leishmaniose cutanée est la forme la plus fréquente de la maladie, mais la leishmaniose viscérale est la plus grave, presque toujours mortelle en l'absence de traitement.

La leishmaniose demeure un problème de santé publique dans 4 régions éco-épidémiologiques du monde : l'Afrique de l'Est, l'Afrique du Nord, les Amériques et l'Asie de l'Ouest et du Sud-Est. Elle est la troisième parasitose à transmission vectorielle la plus importante après le paludisme et la filariose lymphatique. Selon l'OMS, 0,7 à 1 million de nouveaux cas sont déclarés chaque année, toutes formes cliniques confondues. En 2023, 99 pays étaient considérés comme pays d'endémie pour la leishmaniose cutanée (LC) et/ou leishmaniose viscérale (LV), dont l'Algérie, qui constitue un gros foyer, car elle représentait 64% des cas de LC dans la région Africaine (Jain et al., 2023 ; OMS 2024).

Les leishmanioses sont des parasitoses zoonotiques principalement décrite chez les chiens, les rongeurs et l'homme, qui sont les mammifères le plus souvent infectés. Cependant, d'autres mammifères comme le cheval, peuvent être contaminés et exprimer des signes cliniques. En effet, l'infection de la population équine, par des parasites *Leishmania*, a été signalée pour la première fois chez le cheval par Mazza en 1927, et chez l'âne en 1959 par Alencar (Soares et al., 2013 ; da Silva Luiz et al., 2023). Depuis les années 80, les cas cliniques de leishmaniose équine (LE), généralement caractérisés par des formes cutanées, sont de plus en plus décrites dans le monde. Principalement au Brésil, où le parasite en cause dans la majorité des cas est *L. Brasiliensis*, et en Europe (Espagne, Portugal et l'Allemagne), les infections équines sont dues à *L. infantum*, décrites comme des infections autochtones (Müller et al., 2009 ; Benassi et al., 2018).

Il est donc probable que le cheval joue un rôle de réservoir accidentel. Toutefois, dans des zones endémiques où le contact avec les vecteurs (phlébotomes) est important, la possibilité d'une infection équine ne doit pas être exclue et mérite davantage d'investigation car il peut tout fois participer activement au cycle de transmission. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé cette étude avec comme objectifs :

- L'isolement d'éventuelle souche de *Leishmania* à partir de sang de chevaux par une technique de biologie moléculaire : PCR ;
- La caractérisation moléculaire des souches isolées par séquençage Sanger ;
- Discuter le potentiel rôle de réservoir des chevaux pour la leishmaniose.

Ce travail comprend deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique notamment sur la leishmaniose, l'agent causal de la maladie : les *Leishmania*, les vecteurs responsables de sa transmission et les réservoirs. La deuxième partie porte essentiellement sur les travaux d'isolement et de caractérisation moléculaire des espèces de *Leishmania* isolées.

CHAPIRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE PARASITE PATHOGENE : *LEISHMANIA*

1.1. Définition :

La leishmaniose est une infection parasitaire due à un parasite protozoaire flagellé de la famille des *Trypanosomatidae*, (ordre des *Kinetoplastida*) et du genre *Leishmania*. Il se présente sous deux formes au cours de son cycle biologique : l'amastigote et la promastigote. L'amastigote infecte les phagolysosomes des cellules phagocytaires d'un hôte vertébré ; tandis que la promastigote est une forme extracellulaire retrouvée dans l'intestin moyen des phlébotomes femelles infectés lors d'un repas sanguin en piquant un hôte vertébré. Ainsi, les leishmanies sont des parasites intracellulaires obligatoires qui alternent entre le vecteur invertébré (le phlébotome) et un hôte vertébré, principalement le chien (LV), les rongeurs (LC) et l'homme.

Il existe trois formes principales de la maladie : la leishmaniose cutanée (LC) qui est la forme la plus fréquente, la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM), qui n'existe pas en Algérie, et la leishmaniose viscérale (LV), mortelle en l'absence de traitement.

1.2. Historique :

En 1900, William Boog Leishman découvrit des corps ovoïdes dans la rate d'un soldat mort d'émaciation et splénomégalie à Dum Dum, en Inde. En 1903, il les prit pour des trypanosomes dégénérés et nomma la maladie « fièvre Dum-Dum ». Peu après, Charles Donovan observa les mêmes corps dans des échantillons spléniques chez des patients indiens atteints de fièvre et de splénomégalie, mais rejeta l'hypothèse des trypanosomes. Laveran les attribua à un nouveau parasite du genre *Piroplasma*, tandis que Ronald Ross, étudiant le kala-azar, conclut qu'il s'agissait d'un nouveau protozoaire et que le tableau clinique des cas ressemblait à celui du kala-azar. Il les classa dans un nouveau genre *Leishmania Donovan* (Steeverding 2017).

1.3. Etude épidémiologique :

1.3.1. Taxonomie :

Les leishmanies sont des parasites protozoaires appartenant au genre *Leishmania* (Ross 1903). La position taxonomique de ce genre selon la classification de Levine et al., (1980) est la suivante :

Règne : Protista (Haeckel, 1866).

Sous-Règne : Protozoa Goldfuss, 1817 Emend. Siebold, 1848.

Embranchement : Sarcomastigophora Honigberg et Balamuth, 1963.

Sous-Embranchement : Mastigophora Diesing, 1866.

Classe : Zoomastigophorea Calkins, 1909.

Ordre : Kinetoplastida Honigberg, 1963 Emend. Vickerman, 1976.

Sous-Ordre : Trypanosomatina Kent, 1880.

Famille : Trypanosomatidae Doflein, 1901 Emend. Grobben, 1905.

Genre : *Leishmania* Ross, 1903.

L'organisation systématique a débuté en 1916 et a été suivie de nombreux ajustements et systèmes taxonomiques. Une nouvelle classification a été élaborée par **Adl et al. en 2005**, en se basant sur l'étude de l'ultra structure de *Leishmania* établie par **Levine et al. (1980)**, ainsi que sur des études moléculaires phylogénétiques. Cette classification est la suivante :

Embranchement : Euglenozoa Cavalier-Smith 1993, 1981, Emend. Simpson, 1997 ;

Classe : Kinetoplastea Honigberg, 1963, Emend. Vickerman 1976;

Sous-Classe : Metakinetoplastina Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia, and Vickerman, 2004;

Ordre : Trypanosomatida Kent, 1880, emend. Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia, and Vickerman, 2004

Famille : Trypanosomatidae Doflein, 1901 Emend. Grobben, 1905

Genre : *Leishmania* Ross, 1903.

Le genre *Leishmania* est divisé en deux sous genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur ; *Leishmania*, caractérisé par un développement **suprapylorique**, à la jonction intestin moyen-intestin postérieur du vecteur et *Viannia* par un développement **péripylorique** à n'importe quelle portion de l'intestin.

La classification actuelle basée sur les données moléculaires est représentée par le dendrogramme ci-dessous :

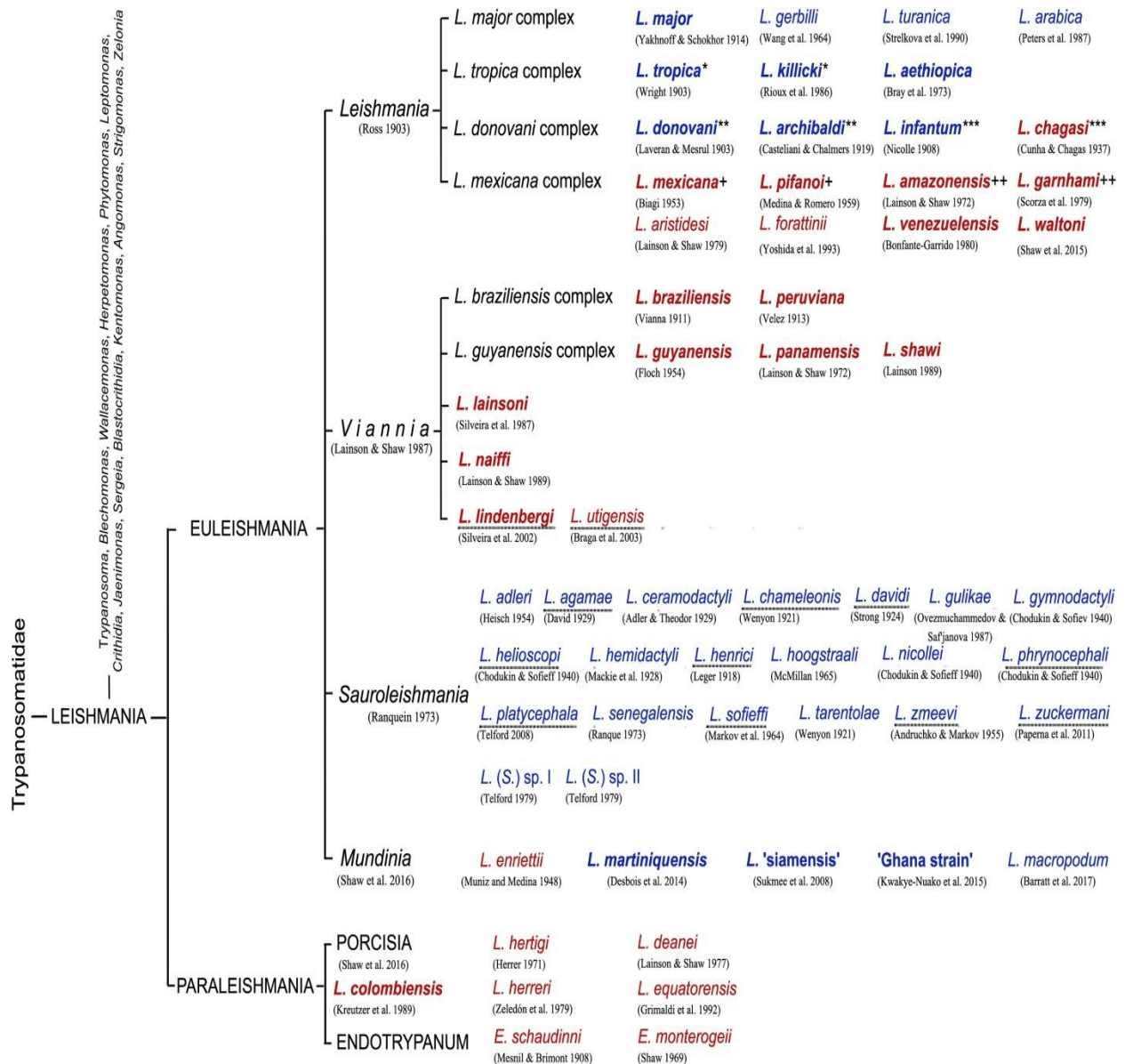


Figure 1 : Classification mise à jour des espèces de *Leishmania* (M. Akhoundi et al., 2017).

, + : Synonyme ; un nombre différent d'étoiles () et de signes plus (+) indique quel nom d'espèce est synonyme de quelle espèce d'origine. Souligné : Pas de classification définitive. *L. « siamensis »* et *L. martiniquensis* ont également été trouvées dans le Nouveau Monde. Les noms de *Leishmania* entre guillemets sont des noms non officiels, sans description formelle. Les espèces pathogènes pour l'homme sont écrites en gras. Les espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde sont surlignées respectivement en bleu et en rouge.

1.3.2. Génome du parasite :

a) L'ADN nucléaire :

Le génome *Leishmania* est d'environ 29 à 35 Mb, organisé en un nombre variable de chromosomes : 36 pour les *Leishmania spp.* de l'Ancien Monde, et 34 ou 35 pour celles du Nouveau Monde (Dedet et al., 1999 ; Kazemi 2011 ; Real 2013). Ce génome est caractérisé par une organisation polycistronique dépourvu d'introns, très peu de séquences répétées, et une plasticité génomique incluant des variations de ploïdie qui s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie (Ouelette et al., 2003 ; Kazemi 2011). Des comparaisons interspécifiques ont montré une remarquable conservation de la structure du génome des différentes espèces de *Leishmania*, malgré la variabilité pathogénique et la différence dans leur tropisme tissulaire (Dedet et al., 1999).

b) L'ADN kinétoplastique (ADNk) :

Il est localisé dans la mitochondrie à la base du flagelle (Borst and Hoeijmakers, 1979) et représente environ 30% de l'ADN parasitaire. Il est constitué par un réseau unique d'ADN circulaires imbriqués composé de : 25 à 50 maxicercles correspondent à l'ADN mitochondrial, et de milliers (5 000 à 10 000) de minicercles impliquées dans l'édition de l'ARN (Yilmaz, I. C. et al., 2022).

1.3.3. La morphologie du parasite :

Les leishmanies sont des parasites dimorphiques, présentant deux formes morphologiques principales au cours de leur cycle biologique (Figure 1) :

a) La forme amastigote :

C'est une forme intracellulaire dans le système réticulo-histiocytaire (SRH) de l'hôte mammifère. Elle est ronde immobile, d'environ 2 à 6 µm de diamètre, contenant un noyau, un kinétoplaste et un flagelle interne visibles uniquement en microscopie électronique (Dedet 1999).

b) La forme promastigote :

C'est une forme extracellulaire flagellée, présente dans le tractus intestinal de l'insecte vecteur (phlébotomes femelles infectés) et dans le milieu de culture. La forme promastigote possède un corps long et mince (environ 15 à 30 µm sur 2 à 3 µm), avec un noyau central, un kinétoplaste et un long flagelle antérieur libre qui lui confère une grande mobilité (Dedet 1999).

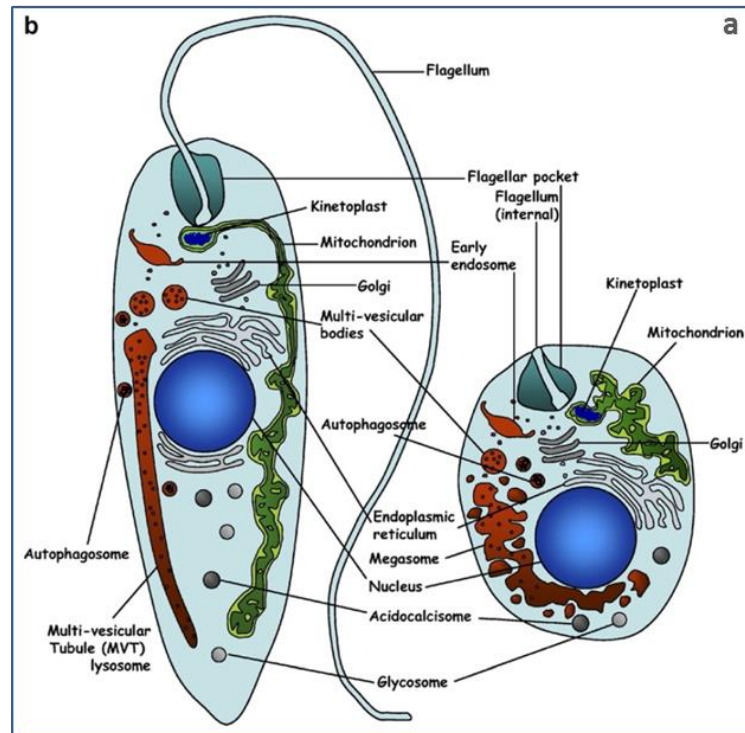


Figure 2 : Représentation schématique des principaux organites intracellulaires de la forme amastigote (a) et la forme promastigote (b). (Landfear, S. M. 2022).

1.3.4. L'échappement cellulaire des leishmanies :

Lors de leur entrée dans l'organisme, les promastigotes métacycliques de *Leishmania* sont immédiatement exposés à l'action du système du complément, qui vise à les détruire. Normalement, ce système fixe la molécule C3b sur leur surface, entraînant la formation d'un complexe lytique (C5b-9) capable de perforer leur membrane. Cependant, les promastigotes métacycliques ont développé plusieurs stratégies pour contourner cette attaque. Deux molécules membranaires principales jouent un rôle crucial : le lipophosphoglycane (LPG) et la protéase de surface gp63 (Filippi et al., 2001).

La protéine gp63 joue un rôle clé en dégradant C3b en une forme inactive, C3bi. En parallèle, des kinases présentes sur la surface des promastigotes métacycliques peuvent aussi inactiver C3 et C3b par phosphorylation. Le lipophosphoglycane (LPG), abondant à leur surface, agit comme une barrière physique, empêchant la fixation du complexe C5b-9 à la membrane plasmique. Ces mécanismes permettent aux leishmanies d'éviter la lyse et de survivre à cette première ligne de défense immunitaire (Filippi et al., 2001).

Une fois entré dans les macrophages, les promastigotes se transforment en amastigotes à l'intérieur des vacuoles parasitophores, qui sont des compartiments acides contenant des protéines lysosomales. Encore une fois, les leishmanies réussissent à inhiber les défenses oxydatives des cellules hôtes, grâce aux LPG et Gp63 et les glyco-inositol-phospholipides. Ces trois molécules parasitaires, vont empêcher la production de dérivés actifs de l'oxygène et d'oxyde nitrique (NO), essentiels à la destruction parasitaire, en ciblant la protéine kinase C ou l'un de ses substrats : la protéine MRP. Simultanément, l'infection des macrophages réduit fortement la production d'IL-12, une cytokine clé pour déclencher une réponse immunitaire protectrice via les lymphocytes T CD4+, dont la fonction est indispensable pour contrôler l'infection. Cela permet aux leishmanies de persister et de se multiplier. Ce paradigme d'échappement immunitaire, que l'on retrouve aussi chez des virus comme le VIH ou celui de la rougeole, rend l'agent parasitaire particulièrement résilient au sein de l'hôte (Filippi et al., 2001).

1.3.5. Les vecteurs :

La leishmaniose est transmise par la piqure du phlébotome femelle infecté connu aussi sous le nom de mouche de sable (Figure 2). Le phlébotome est un diptère nématocère appartenant à la famille des *Psychodidae*, et la sous-famille des *Phlebotominae*. Il existe plus de 600 espèces de phlébotomes réparties en cinq genres, mais les seuls impliqués dans la transmission de la leishmaniose humaine sont les genres : *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde, dont seulement 30 espèces ont été identifiées comme vecteurs des espèces *Leishmania* pathogènes pour l'homme. Chaque espèce de phlébotome ne transmet généralement qu'une seule espèce de parasite (Hide 2007 ; Alemayehu et Alemayehu 2017).

Les phlébotomes sont de petits insectes hématophages (environ 2 à 3 mm de long), capable de passer les mailles d'une moustiquaire. Ils sont velus et au vol silencieux. La femelle phlébotomes pond ses œufs dans des environnements où les larves peuvent trouver la matière organique, la chaleur et l'humidité nécessaires à leur développement comme les terriers et les chenils. Ils sont présents dans toutes les régions intertropicales et tempérées du monde. Leur activité est généralement plus intense à la nuit et au crépuscule (Sharma, U, & Singh, S., 2008).

En Algérie, Il y a une prédominance des espèces : *Phlebotomus perniciosus* et de *Phlebotomus longicuspis*, principaux vecteurs de la leishmaniose viscérale. *Phlebotomus*

papatasi vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique et *Phlebotomus perfiliewi* pour la leishmaniose cutanée sporadique du Nord (Belazzoug 1985 ; Izri et Bellazzoug, 2007)



Figure 3 : Phlébotome femelle (*Phlebotomus papatasi*) lors du repas sanguin.
(ECDC/Photographer)

1.3.6. Les réservoirs :

La leishmaniose est principalement zoonotique, dans laquelle les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages ou domestiques, selon la forme clinique de la maladie et l'espèce de *Leishmania* en cause. Lorsque l'homme est le seul hôte réservoir, c'est une leishmaniose anthroponotique (Alemayehu 2017 ; Mokni 2019). Les principaux réservoirs sont des mammifères, en particulier les chiens, les rongeurs, et occasionnellement d'autres animaux, comme les chats, et les chevaux (Hinde 2007 ; Alemayehu 2017 ; Benassi et al., 2018).

Dans la leishmaniose viscérale, le chien domestique est reconnu comme le réservoir principal de *Leishmania infantum* dans le bassin méditerranéen, dont l'Algérie (Belazzoug 1987 ; Hinde 2007 ; Adel et al., 2014). Des cas ont été signalés chez d'autres canidés comme les chats et les chacals, bien que leur rôle épidémiologique reste secondaire. (Bessad et al., 2012). Quant à la leishmaniose cutanée, elle est souvent associée à des réservoirs rongeurs, comme *Psammomys obesus* et *Meriones shawi*, qui hébergent respectivement *L. major* et *L. killicki* NON 301 et 306 dans différentes zones d'Algérie (Belazzoug 1983, 1986 ; Harrat et al., 2009 ; Mansouri 2012)

Concernant les équidés, et plus spécifiquement le cheval, leur rôle comme réservoir reste encore mal élucidé. Plusieurs études, notamment en Amérique du Sud et en Europe, ont rapporté des cas de leishmaniose chez le cheval, généralement sous forme cutanée, causée par *L. infantum* ou *L. braziliensis*. En Algérie, la présence de lésions compatibles avec la leishmaniose chez le cheval a été observée, mais aucune étude n'a confirmé l'espèce en cause.

1.3.7. Cycle de vie :

Le cycle biologique des *Leishmania* est un cycle hétéroxène (Figure 3), se déroulant entre deux hôtes ; le phlébotome invertébré (Vecteur) et un mammifère vertébré (Hôte).

➤ Chez l'homme :

Le cycle commence lors d'un repas sanguin d'un phlébotome femelle infecté, qui injecte à l'hôte vertébré au site de piqure les parasites au stade promastigote métacyclique. Ces derniers, seront ensuite internalisés par les macrophages de l'hôte où ils se transforment en amastigotes et se multiplient par scission binaire dans les phagolysosomes jusqu'à l'éclatement de la cellule. L'infection se répond par relargage/internalisation de macrophage à macrophage. Dans les cas de leishmaniose viscérale, tous les organes contenant des macrophages et des phagocytes du SRH peuvent être infectés, en particulier les ganglions lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse (Hide et al., 2007).

➤ Chez le vecteur :

Les phlébotomes en se nourrissant, généralement la nuit, du sang d'un hôte réservoir vertébré (homme, rongeurs ou chiens...), pour pondre ses œufs, ils ingèrent les macrophages de l'hôte, contenant des amastigotes. Ces formes parasitaires sont alors libérées dans l'intestin moyen abdominal postérieur de l'insecte, où elles se transforment en promastigotes pour commencer leur cycle biologique extracellulaire chez le vecteur (Hide et al., 2007). Les promastigotes procycliques migrent ensuite vers la partie antérieure du tube digestif du phlébotome où ils se multiplient par fission binaire, subissent une métacyclogenèse et deviennent infectieuses (promastigotes métacycliques). Par la suite, ils migrent vers les glandes salivaires et la trompe en attendant le prochain repas sanguin (Dedet 1999 ; Hide et al., 2007).

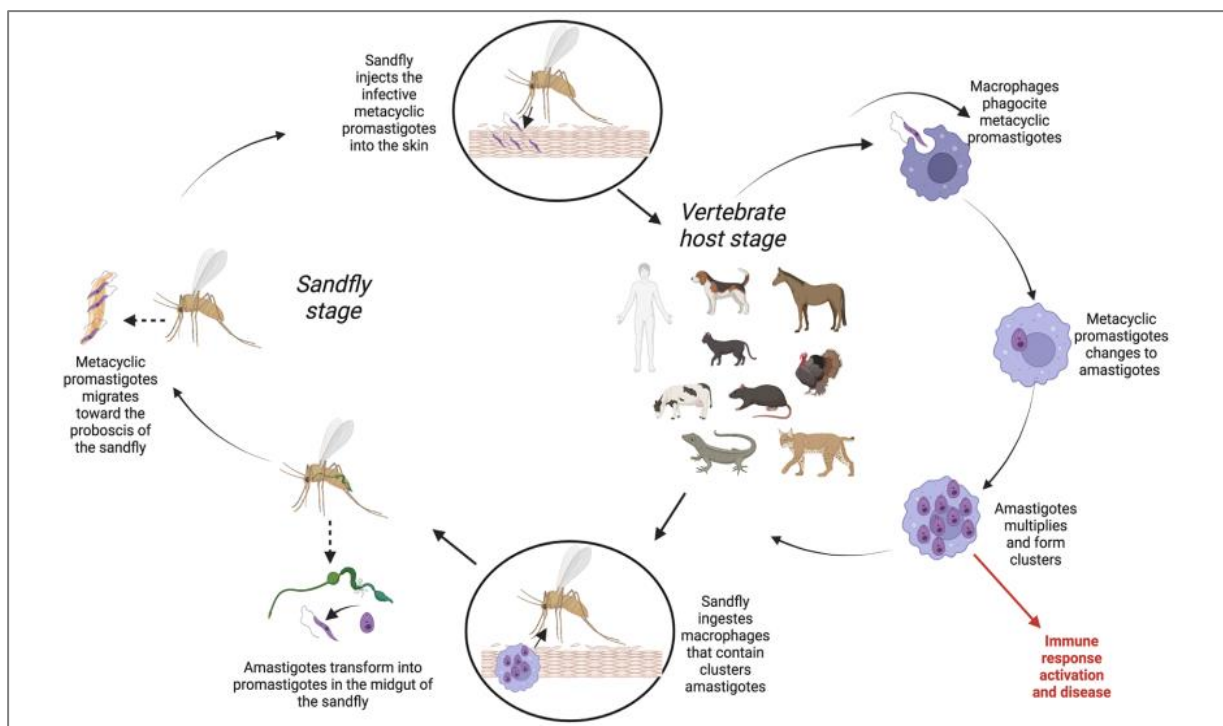


Figure 4 : Cycle de vie de parasite *Leishmania* (Montaner-Angoiti et Llobat 2023).

1.4. La répartition géographique :

a) Dans le monde :

La LC est endémique dans 90 pays. Selon le rapport de l’OMS 2024, l’OMS rapporte le bilan de 2023 qui précise que, plus de 94% (271 705) de nouveaux cas autoctones de LC ont été signalés, dont 81% concernaient la région de la Méditerranée orientale et 13% dans la Région des Amériques. Les pays les plus touchés, plus de 4000 cas chacun, sont : Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Iraq, Pakistan, Pérou, République arabe syrienne, République islamique d’Iran, Sri Lanka et Yémen. Ces 11 pays représentent 91% des cas signalés à l’échelle mondiale (OMS, 2024).

La Région de la Méditerranée orientale et l’Algérie constituent le «point chaud», car elles représentent à elles seules 84% (227 874) des cas de LC (OMS 20024).

Sur les 80 pays où la LV est endémique, 42% de nouveaux cas ont été notifiés par la Région de la Méditerranée orientale, 37% par la Région africaine, 14% par la Région des Amériques et 6% la Région d’Asie du Sud-Est.

Il existe 3 «points chauds» éco-épidémiologiques de la LV : l’Afrique de l’Est (Djibouti, Tchad, Érythrée, Éthiopie, Kenya, Somalie, Soudan du Sud, Soudan et Ouganda), qui

représente 73% (8579) des cas observés dans le monde ; le Brésil, avec 12% des cas (1461) ; et le sous-continent indien (Bangladesh, Inde et Népal), avec 6% des cas (740). Ces quatre pays : Brésil, Éthiopie, Kenya et Soudan, ont notifié plus 1000 cas de LV chacun, d'où 60% des cas signalés à l'échelle mondiale. (OMS 20024).

b) En Algérie :

Selon l'OMS, l'Algérie est fortement endémique pour la leishmaniose cutanée. En effet, l'incidence de la leishmaniose cutanée était de 10,30/100 000 habitants et de 0,08/100 000 habitants pour la leishmaniose viscérale selon l'INSP 2022.

Le foyer historique de Biskra reste encore le plus actif, mais la maladie s'étend rapidement et crée d'importants foyers tels ceux de M'sila, Bou-Saada, Tiaret et Béchar.

LCZ sous sa forme humide ou rurale s'observe dans les régions steppiques, arides et semi-arides, principalement au niveau de la frange nord du Sahara. Dans ces régions, cohabitent le vecteur *Phlebotomus papatasi* et les rongeurs sauvages réservoirs naturels de la maladie *Psammomys obesus* et *Meriones shawi*.

La LV sévit à l'état endémique dans les régions humides et subhumides du Nord du pays (Izri et Belazoug, 2017). Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% de cas (Harrat et al, 1992).

Les régions affectées par la LV s'étendent vers Oran et Tlemcen à l'Ouest, jusqu'à Annaba, Sétif et Collo à l'Est (Mihoubi et al, 2006). Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (Harrat et al, 1995 ; Bachi et al., 2006)

La leishmaniose cutanée du Nord (LCN) se propage le long du littoral et de la région du Tell en Algérie. Sa répartition géographique est superposable à celle de la leishmaniose viscérale (Harrat et al., 1995).

2. LA CLINIQUE DE LA LEISHMANIOSE

Les signes cliniques de la leishmaniose dépendent à la fois de l'espèce parasitaire (Dermotrope ou viscérotrope), de la réponse et du statut immunitaire de l'hôte (Dedet et al., 1999). Un grand nombre de personnes infectées par *Leishmania* restent asymptomatiques. Cependant, chez d'autres, l'infection peut entraîner des manifestations cliniques très variées. En effet, plusieurs formes de leishmaniose sont décrites : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée (LC) et la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) (Hinde et al., 2007).

2.1. La leishmaniose viscérale :

La LV est la forme la plus grave car elle est mortelle en l'absence du traitement dans plus de 95 % des cas. Elle se caractérise par : une fièvre irrégulière, une splénomégalie et une anémie (Hinde et al., 2007 ; OMS 2022). En plus de la triade classique (fièvre, splénomégalie, anémie), on observe souvent : hépatomégalie, amaigrissement progressif avec des troubles biologiques à type de : pancytopénie et hypergammaglobulinémie. À partir du point de pique du phlébotome sur la peau, les parasites diffusent par voie sanguine vers les ganglions lymphatiques régionaux, la rate, le foie et la moelle osseuse et provoquent les symptômes systémiques. Les symptômes apparaissent généralement plusieurs semaines ou mois après l'infection, mais peuvent se manifester après plusieurs années. Les espèces du complexe *Leishmania donovani* sont principalement responsables de cette forme. L'espèce *L.infantum* est la plus impliquée chez les enfants de bas âge, de moins de 5 ans, et est responsable de la leishmaniose viscérale infantile (Hinde et al., 2007 ; Izri et Belazzoug, 2007) .

Chez les personnes immunodéprimées (VIH+, greffes, corticothérapie), la LV peut évoluer vers une forme disséminée avec atteinte de plusieurs organes (cutanée, digestive, pulmonaire) et un pronostic péjoratif malgré traitement.

2.2. La leishmaniose cutanée :

En Algérie, il existe trois formes cliniques de leishmaniose cutanée : Ces trois types se distinguent principalement par leur épidémiologie, leurs réservoirs animaux, leurs vecteurs et leur évolution clinique.

2.2.1. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) à *L. major* :

Elle est due au zymodème MON-25 de *L. major*. C'est la forme la plus rencontrée en Algérie, correspond au clou de Biskra ou bouton d'Orient (Mansouri et al., 2012). Elle se caractérise par une lésion cutanée nodulaire souvent unique, avec des limites mal définies, une surface irrégulière et grenue, ou des lésions multiples qui peuvent évoluer vers des lésions ulcéro-croûteuses. La LCZ est bénigne évoluant vers la guérison spontanée (Izri et Belazzoug 2007 ; Mokni 2019).

2.2.2. La leishmaniose cutanée sporadique ou du Nord (LCS ou LCN) :

La LCN, nommée « Clou de Mila », est due principalement au zymodème MON-24 de *L. infantum*. Elle se présente sous forme d'une lésion unique de petite taille, de 10 à 20 mm, souvent papuleuse avec un nodule rouge, régulier, lisse, bien limité, de taille variable, recouvert ou non de squames (Belazzoug et al., 1985 in Mansouri et al., 2012). Le délai d'apparition des lésions par rapport à la piqûre par le phlébotome est variable de 1 mois à 5 ans, avec une moyenne de 3 à 6 mois. L'évolution est lente, une à deux années (Izri et Belazzoug 2007 ; Mokni 2019).

2.2.3. Leishmaniose cutanée chronique (LCC) :

L'expression clinique de la LCC est dominée par des lésions de nodules ulcérocroûteux plutôt secs. Des formes ulcéreuses et extensives sont parfois observées.

2.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) :

Elle est présente surtout en Amérique du sud (Brésil, Bolivie, et au Pérou), et due au complexe *braziliensis* et plus rarement au complexe *guyanensis*. Des cas rares ont été retrouvés dans l'ancien monde en Éthiopie, dues à *L. aethiopica* (Hinde et al., 2007 ; Mokni, 2019).

Elle entraîne une destruction étendue et défigurante des muqueuses du nez, de la bouche et du corps, y compris du visage, des bras et des jambes causant de graves handicaps (Hinde et al., 2007 ; OMS 2022). Elle se développe des mois ou des années après l'apparition des lésions cutanées.

3. DIAGNOSTIC DE LA LESHMANIOSE :

3.1. Diagnostic parasitologique :

3.1.1. Examen direct :

C'est un examen de certitude qui permet la mise en évidence des leishmanies sous leurs formes amastigotes et cela après l'étalement de l'échantillon, sur une lame porte objet, recueilli par grattage des lésions cutanées (pour la leishmaniose cutanée) ou de ponction de moelle osseuse (PMO) ou du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA pour la leishmaniose

viscérale). Le frottis ainsi obtenu est séché et coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou au Giemsa après fixation par le méthanol.

La lecture de frottis au microscope optique avec un objectif G X100, permettra d'observer les amastigotes (cytoplasme bleu pâle, noyau et kinétoplaste punctiforme en rouge pourpre), isolés et/ou en amas à l'intérieur des macrophages (Figure N°5).

Il est avantageux grâce à son coût faible et son résultat rapide. Cependant, la lecture des frottis nécessite un biologiste expérimenté. Les faux négatifs ne sont pas exceptionnels et s'observent en cas de faible charge parasitaire ou de ponction hémodiluée (Izri et Belazzoug 2007 ; Siala et al., 2022).

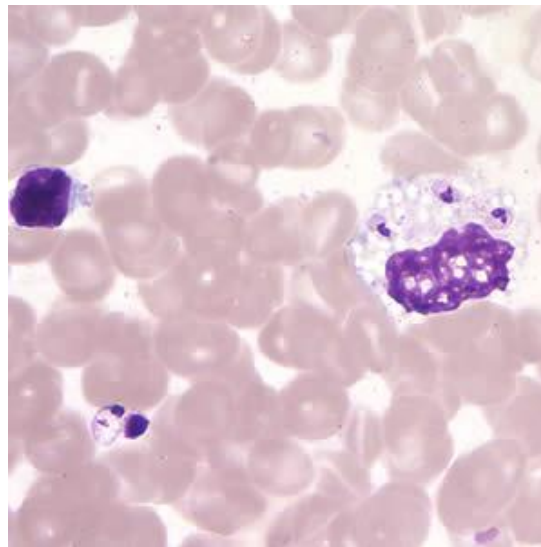


Figure 5 : Les amastigotes dans le cytoplasme des macrophages après coloration Giemsa (<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>).

3.1.2. Culture :

La culture rend plus sensible le diagnostic car elle présente l'avantage de corriger certains examens directs faussement négatifs. Elle permet d'obtenir la souche en vue de son identification par typage isoenzymatique et génomique, et l'évaluation de leur sensibilité aux anti-leishmaniens (Siala 2022).

Le milieu le plus utilisé reste le milieu de Novy, Mc Neal et Nicolle (NNN), préparé selon les recommandations de Nicolle et Berrebi. Il s'agit d'une gélose salée enrichie de 10 % de sang frais de lapin, additionné d'antibiotiques, et coulée en position inclinée dans des tubes à vis stériles. C'est un milieu diphasique (une phase solide et une phase liquide), facile à préparer et peu coûteux.

Des gouttes de MO, LBA ou aspirations cutanée serontensemencés dans le milieu NNN et incubés entre 24 et 26 °C. Une vérification hebdomadaire de la culture par la recherche des leishmanies dans une goutte de la phase liquide, suivi d'un repiquage dans un milieu neuf jusqu'à 4 semaines. Après ce temps, s'il n'y a pas de leishmanies, la culture est rendue négative. La lecture est effectuée entre lame et lamelle faite au microscope à fond clair avec un objectif G X10 ou X40. Les leishmanies se présentent sous leurs formes promastigotes, repérées grâce à leur mobilité (Izri et Belazzoug 2007). L'inconvénient de la culture est son délai d'incubation, les faux négatifs en cas de faible charge parasitaire et les problèmes de contaminations, ainsi que la nécessité de disposer d'une animalerie (Siala 2022).

D'autres milieux de culture peuvent être utilisés tels que le milieu de sérum de lapin coagulé, le milieu RPMI et le milieu de Sloppy-Evans (Siala 2022).

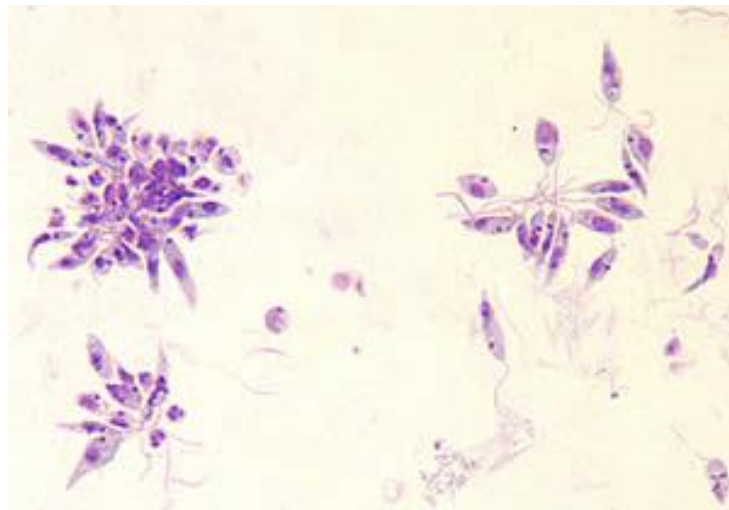


Figure 6 : les promastigotes en culture (<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>).

3.2. Diagnostic immunologique :

Les tests sérologiques sont indiqués uniquement pour le diagnostic de la LV. Ils sont confrontés à des difficultés d'interprétation en cas d'immunodépression (sensibilité plus faible chez les patients co-infectés par le VIH), d'infection ancienne ou de réactions croisées avec d'autre pathogènes (Siala et al., 2022 ; CDC 2024).

3.2.1. L'immunofluorescence indirect (IFI) :

C'est une technique de référence. Sa sensibilité et sa spécificité rapportées varient respectivement de 87 à 100% et de 77 à 100%. Cependant, malgré ces bonnes performances, nécessite un microscopiste expérimenté et exige un microscope à fluorescence de coût élevé pas toujours disponible (Siala et al., 2022).

3.2.2. Test immunoenzymatique (ELISA) :

C'est une technique employée couramment en diagnostic de routine. Elle peut être automatisable, permettant d'analyser un nombre important d'échantillons en même temps (Siala et al., 2022). Cependant, sa sensibilité et spécificité dépendent étroitement de l'antigène employé. Les kits utilisant l'antigène recombinant K39 (rK39) ont d'excellentes spécificités estimées de 93% à 100% (Siala et al., 2022).

Les ELISA ne doivent pas être utilisées pour exclure un diagnostic de LV chez les patients infectés par le VIH. Cependant, un test positif, même à des titres faibles, a une valeur diagnostique lorsqu'il est associé à la définition clinique du cas.

3.2.3. Le western- Blot :

C'est une technique de confirmation du diagnostic de la LV, en mettant en évidence deux bandes spécifiques à l'antigène *Leishmania infantum*, 14 et/ou 16 kDa. Une technique de choix en termes de sensibilité et de spécificité, supérieure à celle des techniques sérologiques conventionnelles (Izri et Belazoug, 2007). Elle est utilisée pour le dépistage des patients immunodéprimés (co-infectés par le VIH), dont les titres d'anticorps sont parfois très faibles.

De plus, ce test permet de différencier les sujets malades de ceux porteurs asymptomatiques. En effet, selon certains auteurs, la présence simultanée des bandes 14 kDa et/ou 16 kDa avec des bandes comprises entre 18 et 31 kDa serait plutôt spécifique de la LV maladie (Marty et al., 1995 in Siala et al., 2022). Les Kits commercialisés sont coûteux réservés aux laboratoires spécialisés.

3.3. Diagnostic moléculaire :

Les approches moléculaires basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou d'autres techniques d'amplification offre un double avantage : sensibilité et précocité de diagnostic. Ces techniques restent coûteuses et réservées à des laboratoires spécialisés. De plus, leur extrême sensibilité rend parfois délicate la distinction entre un portage

asymptomatique, courant en zone d'endémie, et une réelle pathogénie au cours de formes symptomatiques (Chouihi et al., 2009).

4. TRAITEMENT :

Chaque région géographique a une combinaison unique de souche parasitaire, de phlébotome et de réservoir. Le schéma thérapeutique qui est efficace dans une région n'est pas forcément efficace dans une autre. Il n'est donc pas possible de recommander une conduite thérapeutique unique efficace et non toxique pour toutes les formes de la maladie dans toutes les régions géographiques (Mokni 2019).

4.1. Traitement de LV :

- **En 1^{re} intention : Amphotéricine B liposomale (Ambisome)** en perfusion intraveineuse à raison d'une injection de 3 mg/kg/j pendant 4 jours J0, J1, J2, J3 et une dernière prise à J10.

Les recommandations de l'OMS chez les sujets VIH+ : perfusion intraveineuse de 3 à 5 mg/kg/j, 10 injections les jours j1 à j5 puis à j10, j17, j24, j31 et j38 (dose totale jusqu'à 40 mg/kg).

- **En 2^{ème} intention : antimoniate de méglumine (Glucantime®)** : 20 mg d'antimonié pentavalent (SbV)/kg/j en intramusculaire pendant 28 jours.

- **Prophylaxie secondaire chez VIH+** : il faut retenir qu'il n'y a pas de consensus pour la chimioprophylaxie pour les sujets VIH positifs. Certains préconisent une injection mensuelle d'antimoniate de méglumine, alors que d'autres prescrivent une injection par quinzaine ou par mois de 3 mg/kg d'amphotéricine B liposomale ou 2 mg/kg de pentamidine.

4.2. Traitement de LC :

a) Lésion inférieure à 4 cm : unique siégeant en dehors du visage

- **Abstention thérapeutique ou juste un traitement antiseptique** : dans les formes bénignes à *L. major* ;

- **Traitement local** : il repose sur des infiltrations péri-lésionnelles de Glucantime associées à une cryothérapie superficielle ou thermothérapie si possible.

b) Lésion de plus de 4 cm : inflammatoire siégeant au niveau du visage

- **La voie parentérale** : par Glucantime pendant 20 jours.

5. PROPHYLAXIE :

La prévention de la leishmaniose est un problème multifactoriel qui fait intervenir des facteurs épidémiologiques, socioéconomiques et environnementaux, afin de rompre la chaîne de transmission de la maladie.

5.1. Prévention des piqûres de phlébotomes

- Pulvérisation d'insecticides (pyréthrinoïdes) à l'intérieur et autour des habitations.
- Utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide.
- Application de répulsifs cutanés.

5.2. Lutte contre les réservoirs animaux

5.2.1. Chien :

- Abattage des chiens errants.
- Dépistage des chiens séropositifs.
- Utilisation de colliers insecticides (ex. Scalibor).
- Vaccination possible des chiens séronégatifs (efficace mais coûteuse).

5.2.2. Rongeurs :

- Destruction des terriers.
- Élimination des plantes-hôtes (chénopodiacées).
- Traitement des terriers avec des appâts empoisonnés (phosphure de zinc).

5.3. Lutte contre le vecteur

- Réduction de la population de phlébotomes par pulvérisation d'insecticides.
- Gestion environnementale (réduction des gîtes larvaires).
- Protection individuelle (vêtements couvrants, moustiquaires, répulsifs).

5.4. Diagnostic et traitement

- Diagnostic précoce et traitement rapide pour limiter la transmission et prévenir les complications.

CHAPIRE II :

MATERIEL ET METHODES

6. MATERIEL :

6.1. Matériel biologique :

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie parasitaire, au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie sis à Dely Ibrahim, Alger, sur la période s'étalant entre Décembre 2023 et Juin 2024. Il a été effectué à partir d'échantillons sanguins obtenus par ponction de la veine jugulaire (environ 5 ml) chez 23 chevaux, d'âges variés (compris entre 9 et 21 ans), appartenant à différentes races (Arabe, Arabe-barbe, selle français et Anglo-Arabe-barbe). Tous les prélèvements ont été réalisés par un vétérinaire d'un centre équestre à Blida, avec le consentement préalable des propriétaires. Les échantillons ont été recueillis dans des tubes contenant de l'EDTA, puis conservés à une température de -20°C jusqu'à leur analyse.

L'objectif de ce travail était de :

- ✓ Vérifier la présence des Leishmanies dans le sang de chevaux et discuter leur rôle de réservoir ;
- ✓ Identifier par génotypage les souches isolées.

6.2. Matériel non biologique :

Ce travail a nécessité l'utilisation d'un ensemble d'équipement, petit matériel, réactifs et tampons :

6.2.1. Les équipements :

- Bain marie ;
- Centrifugeuse réfrigérée ;
- Agitateur (Vortex) ;
- Congélateur -20°C
- réfrigérateur
- Balance digital ;
- Agitateur magnétique ;
- Micro-onde ;
- PSM II ;
- Thermocycleurs PCR Mastercycleur ;
- Cuves d'électrophorèse mini horizontale ;

- moule de gel d'agarose et peignes ;
- Générateur de courant électrique ;
- Transilluminateur UV ;
- Centrifugeuse avec support pour plaques à 96 puits
- Séquenceur Sanger SeqStudio Genetic Analyzer.

6.2.2. Le petit matériel

- Micropipettes (10, 20, 200, 1000 µl) ;
- Pointes stériles avec filtre (10, 200 et 1000 µl) ;
- Microtubes Eppendorf (0.6 et 1.5 ml) ;
- Portoir réfrigérant pour microtubes ;
- Verreries (Erlenmeyer, bécher, Eprouvette graduée) ;
- Barreau magnétique ;
- Plaque de réaction optique 96 puits ;
- Feuille adhésive optique ;
- Gants nitrile.

6.2.3. Réactifs et Tampons de la PCR :

- Kit d'extraction (QIAamp DNA Mini kit).
- Amorce sens : LITSR (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3')
- Amorce antisens : L5.8S (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3')
- Taq polymérase
- dNTPs
- MgCl₂
- Marqueur de poids moléculaire IX (0.072-1.35 kbp).
- Agarose pour électrophorèse.
- Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA).
- Bromure d'éthidium (BET).
- Tampon de charge : bleu de bromophénol.
- Ethanol absolu à 99.9°
- Eau distillée et eau PPI

6.2.4. Réactifs et Tampons du séquençage :

- Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (applied biosystems)
- Tampon de séquençage 5X
- Amorce sens : LITSR (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3')
- Amorce antisens : L5.8S (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3')
- Kit Pure Link Quick PCR Purification (invitrogen)
- Isopropanol
- Sephadex G-50

7. METHODES :

L'ensemble des 23 prélèvements ont été soumis en premier lieu à la technique PCR pour vérifier le portage ou pas des leishmanies. Par la suite, les prélèvements revenus positifs en PCR ont été soumis à un séquençage pour génotypage des souches isolées pour l'identification des espèces de genre *Leishmania*.

7.1. Les étapes de la technique PCR :

7.1.1. Extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang a été réalisée à l'aide du kit **QIAamp DNA Mini Kit** (QIAGEN), conformément aux recommandations du fabricant.

7.1.1.1. Principe :

L'extraction de l'ADN repose sur la libération de l'ADN cellulaire suivie de sa purification. Cette procédure comprend trois étapes principales : la lyse cellulaire, la purification de l'ADN, et son élution.

- A. **Lyse cellulaire** : Elle permet de libérer l'ADN intracellulaire par l'action combinée d'un agent chaotrope puissant, le **chlorhydrate de guanidine**, qui dénature les protéines et les rend solubles, et de la **protéinase K**, qui dégrade toutes les protéines, notamment les histones associées à l'ADN.
- B. **Purification de l'ADN par centrifugation** : L'ADN libéré est fixé sur une membrane de silice présente dans la colonne de purification, en présence d'éthanol absolu (99,9°). Les impuretés (protéines, lipides et autres contaminants) sont éliminées par des étapes de lavage successives à l'aide des tampons AW1 et AW2.

c. **Élution de l'ADN** : L'ADN est ensuite récupéré (élué) de la membrane de silice à l'aide du tampon d'élution ou d'eau distillée.

7.1.1.2. Mode opératoire :

L'extraction de l'ADN génomique total a été réalisée à partir de chaque échantillon de sang, ainsi que des cultures positives de *Leishmania infantum* utilisées comme témoin positif lors des réactions PCR.

Le protocole est le suivant :

200 µl de sang total ont été incubés avec 200 µl de tampon de lyse AL et 20 µl de protéinase K. L'incubation a été effectuée au bain-marie à 56 °C pendant 10 minutes (On peut incuber jusqu'à 30 minutes en fonction de la consistance du prélèvement). Après la lyse, 200 µl d'éthanol absolu froid (99,9°) ont été ajoutés au lysat. Le mélange a été transvasé sur une colonne QIAamp Mini spin (contenant une membrane de silice) où l'ADN s'adhère. Une première centrifugation a été effectuée à 8000 tr/ min pdt 1 minute. Après cela, deux lavages successifs ont été réalisés avec 500 µl de chacun des tampons AW1 et AW2. Ces derniers ont été suivis d'une centrifugation à deux vitesses différentes, 8000 tr/min pdt 1 min et 14 000 tr/min pdt 3 et une min respectivement, afin de garantir l'élimination complète des contaminants. Enfin, l'ADN a été élu avec 50 µl de tampon d'élution AE. Après une incubation d'une minute, une dernière centrifugation à 8000 tr/min pdt 1 min, a permis de récupérer l'ADN, lequel a été lancé directement dans l'étape de PCR ou conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation (figure7).

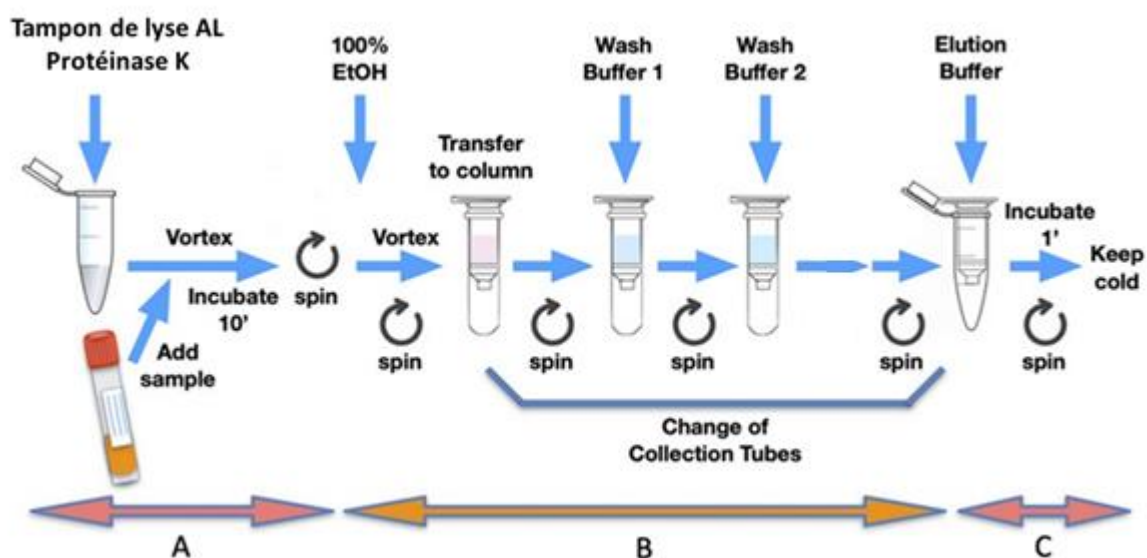


Figure 7 : Représentation schématique des étapes de l'extraction de l'ADN.

7.1.2. Amplification de l'ADN *Leishmania* par PCR-ITS1 :

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est devenue une technique couramment utilisée pour la détection des acides nucléiques. Elle permet d'amplifier in vitro, en un grand nombre de copies, une séquence d'ADN cible à partir d'une quantité initiale minimale, et ce, en quelques heures seulement

Le principe repose sur une succession de cycles thermiques comprenant trois étapes principales :

- **Dénaturation** : séparation des deux brins d'ADN par chauffage (rupture des liaisons hydrogène) ;
- **Hybridation** : fixation des amorces spécifiques sens (forward) et antisens (reverse) sur les extrémités 3' de leurs séquences complémentaires sur les brins d'ADN dénaturés (Tableau1) ;
- **Élongation** : synthèse d'un nouveau brin d'ADN par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase), qui incorpore les désoxyribonucléotides (dNTPs) en direction 5' → 3' à partir des amorces.

7.1.2.1. Procédure

La détection de l'ADN du parasite *Leishmania* a été effectuée par PCR conventionnelle, en ciblant la région ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) (Figure 8), située entre les gènes codant les petites et grandes sous-unités de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr), en utilisant les amorces LITSR et L5.8S (Tableau 1). Cette région, d'une taille comprise entre 300 et 350 paires de bases (pb), est fréquemment utilisée pour la différenciation moléculaire des espèces de *Leishmania*.

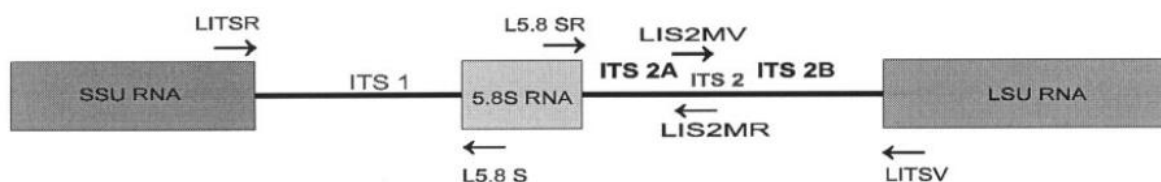


Figure 8 : Représentation schématique de L'espace interne transcrit (ITS) dans l'opéron ribosomal et la position des amorces utilisées (LITSR et L5.8S) dans cette étude pour amplifier la séquence ITS1 (El taï et al., 2000).

Tableau 1 : Séquences d'amorces sens et antisens utilisées dans la PCR-ITS1 (El Tai et al., 2000).

Séquences d'amorces		
LITSR	(Sens)	5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3'
L5.8S	(Antisens)	5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3'

L'amplification commence par la préparation du mélange réactionnel, le Mix PCR-ITS1, dans un microtube, en tenant compte du nombre d'extrait d'ADN à lancer, plus un témoin négatif (eau PPI) et un témoin positif extrait d'ADN de la souche *L. infantum* (Tableau 2). La manipulation se fait sous hotte dans un portoir réfrigérant pour microtubes.

Tableau 2 : Composition du mélange réactionnel (Mix) pour PCR-ITS1 (El tai et al., 2000).

Composants du Mix	Concentration finale pour un échantillon	
H ₂ O	QSP 50 µl	Mix
Tampon 10X	1X	
MgCl ₂	1.5mM	
dNTPs	200 µM	
Amorce F (LITSR)	0.5 µM	
Amorce R (L5.8S)	0.5 µM	
Taq polymérase	2U/µl	
Extrait d'ADN	10 µl	
Volume final	50 µl	

Les microtubes sont placés dans un thermocycleur préalablement programmé selon les amorces du gène cible. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures variables pendant des durées déterminées.

La programmation des cycles est la suivante : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 02 min, suivie d'un enchaînement de 34 cycles comprenant : une dénaturation à 95°C pendant 20 sec, d'hybridation à 53°C pendant 30 sec, et d'élongation à 72°C pendant 1 min, et enfin une élongation final à 72°C pendant 06 min. Puis maintenir à + 4 °C.

7.1.3. La révélation des produits d'amplification :

Les produits d'amplification (Amplicons) obtenus par PCR-ITS1 ont été révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1,5 %, préparé dans un tampon TBE (Tris-Borate-EDTA).

L'électrophorèse est une méthode de séparation des fragments d'ADN en fonction de leur charge et de leur taille exprimée en nombre de paires de bases. La séparation se fait grâce à leur migration vers l'électrode de charge opposée, dans une solution tampon de pH et de concentration convenables, sous l'influence d'un champ électrique obtenu par un générateur de courant continu.

7.1.3.1. Procédure

Le gel d'agarose à 1,5 % a été préparé en dissolvant 1.5 g d'agarose dans 100 ml de tampon de migration TBE 1X (Annexe 1), dans un four à micro-ondes. Après refroidissement à environ 50 °C, un agent intercalant, le bromure d'éthidium (0.5 µg/ml), est incorporé dans le gel et versé dans un moule muni de peignes. Le BET permet la visualisation des fragments d'ADN sous lumière ultraviolette (UV).

Après solidification, les peignes sont retirés et le gel immergé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X. Six (6) µL de chaque produit d'amplification ainsi qu'un marqueur de taille de poids moléculaire (MT), tous mélangés individuellement à un tampon de charge (3 µl), sont déposés dans les puits du gel et exposé à un courant électrique de 75 Volts pendant environ 20 minutes.

À la fin de l'électrophorèse, le gel a été placé dans un transilluminateur UV, et les bandes correspondant aux produits d'amplification ont été visualisées et photographiées. La présence d'une bande unique d'environ 300–350 pb est considérée comme un résultat positif indiquant la présence de l'ADN de *Leishmania*.

7.2. Les étapes de séquençage :

Les prélèvements revenus positifs en PCR ont été soumis au séquençage pour la caractérisation moléculaire.

7.2.1. Purification des produits d'amplification (Amplicons-ITS1) :

La purification a été faite sur les produits d'amplification révélés positifs à la leishmaniose et vise à éliminer les impuretés (amorces non utilisées, nucléotides libres, enzymes, tampons, et les sels), afin d'obtenir des amplicons pur prêts pour le séquençage.

La purification a été réalisée à l'aide du kit PureLink Quick PCR Purification (invitrogen), conformément aux recommandations du fabricant.

Le Tampon de liaison (Binding Buffer B2) utilisé pour la purification favorise la liaison des amplicons à la membrane de silice. Le tampon est activé par l'ajout d'isopropanol. Une fois liées, les impuretés sont éliminées par lavage, et les amplicons purifiés sont élués avec un tampon d'éluion.

7.2.1.1. Protocole :

Le *Binding Buffer B2* a été reconstitué avec 10 ml d'isopropanol. Ensuite, 4 volumes de *Binding Buffer B2* reconstitué ont été mélangés avec 1 volume de produit d'amplification (50 à 100 µl) et bien mixés. Le mélange a été transvasé dans une colonne de purification et centrifugé à 8000 tours/min pendant 1 minute. Deux centrifugations successives faites, la première avec 560 µl de tampon de lavage contenant de l'éthanol pendant une minute et la deuxième à vide (3 min) pour éliminer l'excès du tampon de lavage. Enfin, l'ajout de 50 µl de tampon d'éluion avec incubation 2 minutes à température ambiante puis une dernière centrifugation pendant 2 minutes afin de récupérer les amplicons purs. Ces derniers peuvent être stockés à -20 °C ou procéder immédiatement au séquençage.

7.2.2. PCR de séquençage des amplicons ITS1 purifiés (PCR à terminaison de chaîne) :

La PCR de séquençage repose sur le même principe que la PCR conventionnelle décrite ci-dessus, à l'exception de :

- Lancer les amorces sens et antisens dans deux microtubes séparément ;
- Et l'ajout des ddNTP* (didésoxyribonucléotides) marqués à chaque réaction.

Lorsqu'un ddNTP*, nucléotide modifiée par l'absence de groupement hydroxyle (–OH) en position 3', est incorporé, l'élongation s'arrête, générant ainsi une série de fragments de longueurs différentes marqués en 3' par un fluorophore spécifique à chaque base. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire pour déterminer la séquence.

7.2.2.1. Procédure :

Une seconde réaction de PCR a été réalisée sur les amplicons ITS1 purifiés, en utilisant le kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing (Applied biosystems). Dans ce kit on trouve :

- Le **Mix de la réaction BigDye® Terminator v3.1** prêt à l'emploi et qui contient : les ddNTPs marqués par la technologie Big dye, dNTPs, MgCl₂, Taq polymérase et un tampon ;
- Un **tampon de séquençage 5X**.

Le Mix a été préparé suivant le protocole du fabricant (Tableau 3). Il est nécessaire de préparer, pour chaque amplicons ITS1 purifiés, le Mix dans deux tubes différents, chacun contenant l'une des deux amorces (LITSR ou L5.8S), les même utilisées dans la première PCR-ITS1.

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel de la PCR de séquençage (QSP le nombre amplicons ITS1 purifiées).

Composants du Mix	Volume (µl) pour une réaction
Big dye Terminator v3.1	02
Tampon 5X	02
Eau PPI	03

Le mélange suivant a été préparé sous hotte dans un portoir réfrigérant pour microtubes:

- 7 µl du Mix ;
- 1 µl de l'une des amorces (F ou R) dilué auparavant au 1/3 (1 volume d'amorce à 10 µM et 2 volumes d'eau PPI) ;
- 1µl du produit d'amplifications ITS1 purifié.

Les tubes préparés ont été mis dans le thermocycleur avec la programmation suivante : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 10 min, suivie d'un enchaînement de 31 cycles comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 20 sec, d'hybridation à 58°C pendant 20 sec, et d'élongation à 60°C pendant 3 min, puis à 10°C pdt une minutes. Conservation à -20°C ou procéder immédiatement à la suite des étapes.

7.2.3. Purification des amplicons ITS1 marqués au Sephadex :

Les amplicons marqués générés en fin de la PCR de séquençage ont été purifiés par Sephadex avant d'être soumis à une électrophorèse capillaire dans le séquenceur automatisé SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

La purification par Sephadex G-50 repose sur la chromatographie d'exclusion. Les amplicons marqués (produits de séquençage) sont de grande taille et passent rapidement à travers la résine, tandis que les petits composés (ddNTP* et dNTP non incorporés, amorces, enzymes...) sont retenus plus longtemps. Cela permet d'éliminer les impuretés interférant avec la détection lors de l'électrophorèse capillaire.

Procédure :

Préparation de Sephadex à 5% en dissolvant 5g de Sephadex dans 100 ml d'eau distillée et laisser reposer une (1) heure pour une hydratation complète des billes du gel.

Une plaque de filtration à 96 puits (MAHVN45) et une plaque collectrice ont été superposées. Quatre cent (400) µl de Sephadex sont déposés dans les puits de la plaque MAHVN45 en comptant deux puits (amorces sens et antisens) par le nombre d'échantillons. Ensuite, procéder à une centrifugation à 2000 tr/min pdt 1 min. La plaque collectrice jetée est remplacée par une nouvelle. Refaire l'étape précédente mais cette fois-ci avec 200 µl de Sephadex et une centrifugation à 3000 tr/min pdt 2 min. Dix (10) µl d'eau PPI ont été rajoutés à chacun des tubes des amplicons ITS1-PCR marqués et transférés un par un dans la plaque Sephadex. Une centrifugation à 3000 tr/min pdt 2 min est réalisée. Les amplicons ITS1-PCR marqués sont purifiés et récupérés dans la plaque collectrice. Cette dernière est prête à être mise dans le séquenceur (analyseur génétique) SeqStudio pour le séquençage de séquences purifiées.

7.2.4. Séquençage de Sanger :

Le séquençage Sanger, connu aussi sous le nom de « méthode de terminaison de chaîne », a été développé par le biochimiste Frederick Sanger et ses collègues en 1977. Cette méthode d'analyse permet de déterminer l'ordre des bases nucléotidiques d'un fragment d'ADN en utilisant des nucléotides modifiés appelés didésoxynucléotides triphosphates (ddNTP). Ces derniers dépourvus du groupe hydroxyle à l'extrémité 3', indispensable à la formation de la liaison phosphodiester nécessaire à l'élongation du brin d'ADN.

Les ddNTP sont présents en quantités plus petites par rapport aux dNTP. Leur incorporation aléatoire bloque la synthèse d'ADN, générant ainsi une série de fragments simple brin de longueurs variables, chacun se termine par un ddNTP marqué par un fluorophore spécifique. Chaque fluorophore correspond à l'une des quatre bases de l'ADN (A, C, T, ou G).

Les fragments générés sont séparés par électrophorèse capillaire sur gel (ECG). Ils sont attirés dans le capillaire rempli de polymère par un phénomène électrocinétique, puis séparés en fonction de leur taille. Lors de leurs traversés, ils passent devant un laser qui excite les marqueurs fluorescents présents sur les ddNTP et un détecteur de fluorescence mesure les spectres d'émission des fluorophores. Par la suite, un logiciel interprète les longueurs d'onde d'émission et génère un chromatogramme où chaque pic de couleur correspond à l'un des nucléotides. Cela permet d'identifier avec précision la séquence du fragment analysé.

Sanger Sequencing

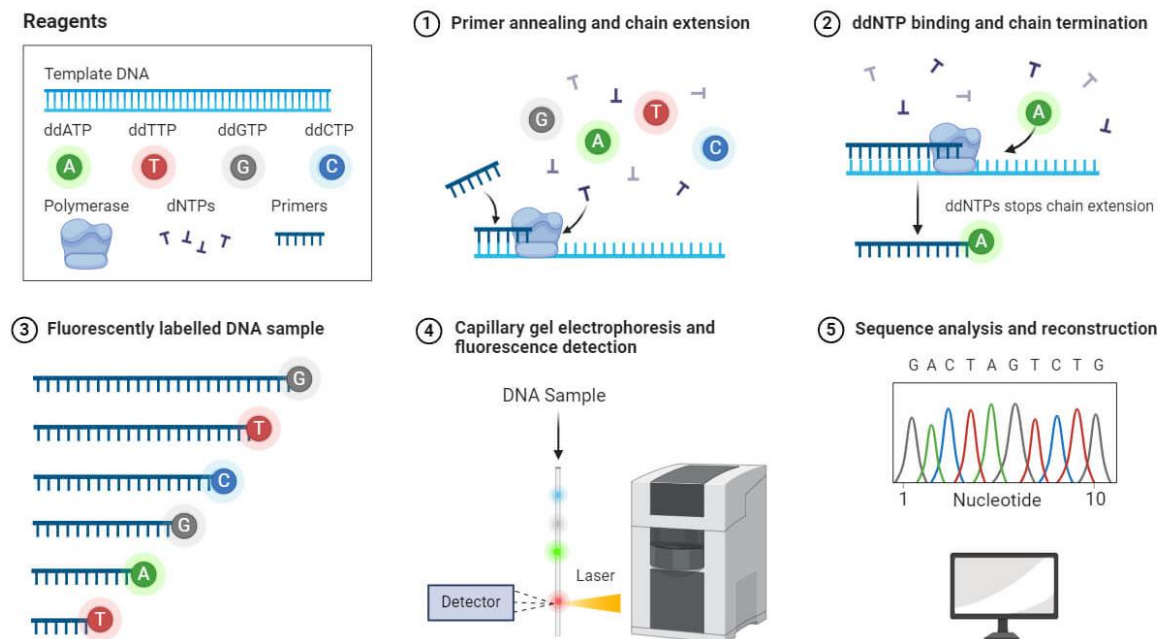


Figure 9 : Le séquençage Sanger (<https://microbenotes.com/sanger-sequencing/>).

Mode opératoire :

Une fois le séquenceur allumé et la méthode d'analyse configurée, la plaque optique à 96 puits contenant les échantillons est introduite, l'analyse commence. Les échantillons marqués par fluorescence sont aspirés électrocinétiquement dans les capillaires du séquenceur. Les

fragments d'ADN chargés négativement traversent le polymère des capillaires et se séparent par électrophorèse capillaire sur gel en fonction de leur taille.

Les fragments d'ADN séparés sont excités par un laser et la fluorescence est détectée. Les données de fluorescence sont analysées à l'aide du logiciel intégré, selon l'étalonnage de l'ensemble de fluorophores spécifiques utilisé et l'identité de la base dans la séquence est déterminée. A la fin, un dossier contenant les chromatogrammes et les fichiers FASTA incluant les séquences obtenues pour chacun des échantillons lancés est récupéré, afin de les traiter et analysés.

7.3. Traitement de données :

À l'issue du séquençage, les données brutes obtenues sous forme de chromatogrammes ont été traduites en séquences nucléotidiques à l'aide du logiciel interne de l'automate. Ces fichiers ont ensuite été visualisés et corrigés à l'aide du logiciel Chromas v2.6.6. L'examen visuel des chromatogrammes a permis d'évaluer la qualité de lecture, notamment aux extrémités où les pics deviennent flous, et d'identifier les éventuelles ambiguïtés (sites hétérozygotes ou erreurs de lecture), souvent révélées par des pics superposés.

Les séquences obtenues avec les amorces sens (forward) et antisens (reverse) ont été traitées séparément dans un premier temps. Les séquences antisens ont été inversées et complémentées (fonction *reverse complement*) à l'aide du logiciel MEGA v12.0.11, afin d'obtenir une orientation 5'–3' correcte pour l'assemblage. Les séquences ont ensuite été alignées à l'aide du programme ClustalW, disponible dans le logiciel MEGA v12.0.11. Les deux brins ont ensuite été comparés et superposés manuellement. Les extrémités correspondant aux amorces ont été éliminées pour ne conserver que la région amplifiée. En cas de discordance entre les bases dans la zone de chevauchement, le choix du nucléotide final a été guidé par la qualité du pic observée dans le chromatogramme, permettant ainsi l'obtention d'une séquence consensus fiable.

Pour l'identification des espèces de *Leishmania*, les séquences consensus ont été soumises à l'outil BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponible sur la plateforme du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cet outil permet de rechercher des similitudes entre la séquence requête et les séquences déposées dans la base de données GenBank. L'alignement est évalué sur la base de trois critères principaux : le pourcentage d'identité (Supérieur à 98%), le taux de recouvrement (query cover) et la valeur d'e-value

(probabilité que la similarité soit due au hasard). Plus l'e-value est faible (inférieure à 1e-50), plus l'alignement est considéré comme significatif.

L'identification d'une séquence à une espèce donnée de *Leishmania* est considérée comme fiable lorsque le pourcentage d'identité est supérieur à 98 % pour au moins 99 % de la longueur analysée.

CHAPIRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

8. RESULTATS ET DISCUSSION :

Ce travail a été réalisé à partir de sang total de 23 chevaux (Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des chevaux prélevés dans notre étude.

Numéro d'identification	Nom du cheval	Age	Sexe	Robe	Race
L.CH 1	QUASSAM	15 ans	Mâle	Alezan	barbe
L.CH 2	AL HIBA	11 ans	Femelle	Alezan	Arabe-barbe
L.CH 3	PASSION	21 ans	Femelle	Alezan	selle français
L.CH 4	ATTIQUE	14 ans	Femelle	Grise	selle français
L.CH 5	QUAYS	15 ans	Mâle	Alezan	barbe
L.CH 6	AMADEUS	14 ans	Mâle	Alezan	selle français
L.CH 7	HAITHEM	09 ans	Mâle	Grise	Anglo-Arabe barbe
L.CH 8	OUARDI	16 ans	Mâle	Alezan	Arabe-barbe
L.CH 9	QUISTE	15 ans	Mâle	Gris	barbe
L.CH 10	ASTUCE	14 ans	Femelle	bal	selle français
L.CH 11	UNE	16 ans	Femelle	bal	selle français
L.CH 12	QUENDIL	15 ans	Mâle	Gris	barbe
L.CH 13	AFRIPOL	09 ans	Femelle	Alezan	Anglo-Arabe barbe
L.CH 14	RIADH	14 ans	Mâle	Gris	barbe
L.CH 15	THEMIS	17 ans	Femelle	Alezan	selle français
L.CH 16	ASTERIX	14 ans	Mâle	bal	selle français
L.CH 17	ROUANDA	14 ans	Femelle	Alezan	anglo-Arabe
L.CH 18	QUANOUN	15 ans	Mâle	bal	barbe
L.CH 19	ROMANI	14 ans	Mâle	Alezan	barbe
L.CH 20	NATALINA	17 ans	Femelle	Alezan	Anglo-Araba
L.CH 21	QUARTS	20 ans	Mâle	Alezan	selle français
L.CH 22	REGUEY	19 ans	Mâle	Alezan	selle français
L.CH 23	RIF	19 ans	Mâle	bal	selle français

8.1. Résultats

8.1.1. Résultats de l'amplification de l'ADN :

La présence de *Leishmania* chez les 23 chevaux a été vérifiée par l'amplification de l'ADN extrait de leur sang total, grâce à la PCR ciblant la région ITS1.

Les produits d'amplification (amplicons) ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %, permettant l'observation d'éventuelles bandes spécifiques de la région ITS1 ciblée.

Une bande unique de taille attendue, comprise entre 300 et 350 pb, a été obtenue pour trois échantillons : L.CH 2, L.CH 7 et L.CH 9, indiquant la présence de l'ADN *Leishmania*. Le contrôle positif utilisé a aussi été révélé par la présence d'une bande de même taille. La détermination de la taille des bandes obtenues a été faite en se comparant la taille de la bande trouvée à celle du marqueur de taille (MT) de poids moléculaire IX (0.072-1.35 kpb). Les autres échantillons n'ont pas été mentionnés car ils étaient tous négatifs (Figure 9 et 10).



Figure 10 : Révélation sur gel d'agarose à 1.5 % des produits d'amplifications de PCR-ITS1. Puits n°1 : Marqueur de taille. Puits n°2 : Contrôle négatif. Puits n°7 : Contrôle positif. Puits n°3, 4, 5, 6 et 8 : Echantillons.

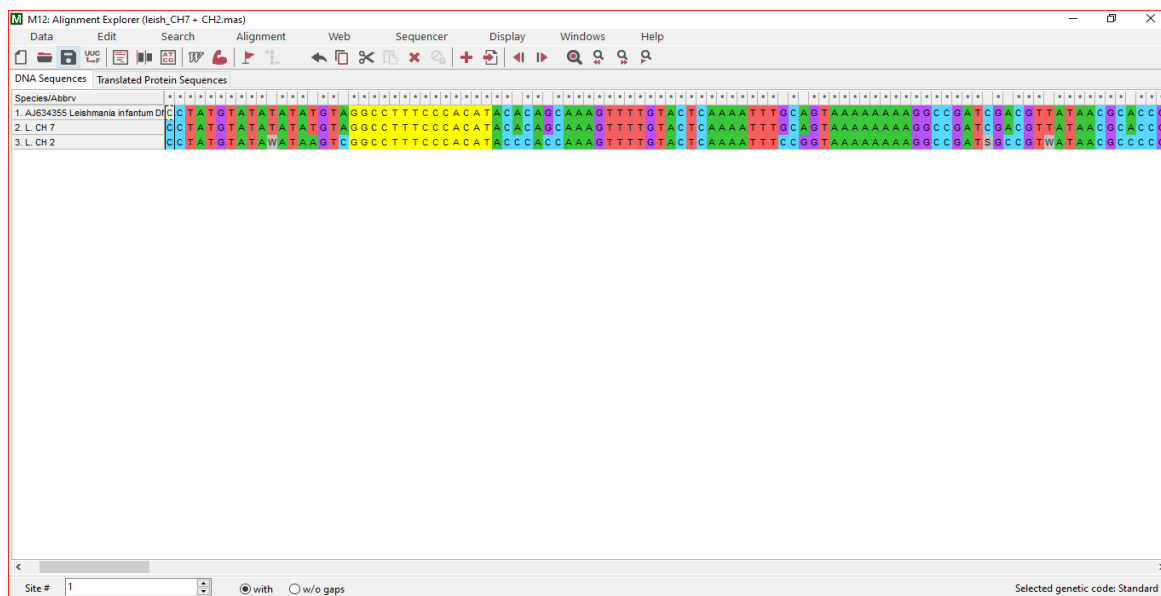


Figure 13 : Exemple d'alignement des séquences corrigées : L. CH 7 et L. CH 2, avec une séquence de référence (AJ634355) dans MEGA, et une représentation en surbrillance d'une partie du chromatogramme (Figure11).

Les séquences consensus obtenues après nettoyage et assemblage des deux brins sens et antisens pour les trois chevaux (Figure 14).

> L. CH 2

CCTATGTATAWATAAGTCGGCCTTTCCACATACCCACCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTCCGGTA
AAAAAAGGCCGATSGCCGTWATAACGCCCCGCCTATACCAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAA
AAAATATGCGGCGTTTTCGGTTTTTTGGCGGGGAGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCCCCTATCGCT
TCGCGATGGATGACTTGGCTGCCTAWTCCGTTCAAGAAC

> L. CH 7

CCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAA
AAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAA
AAATATACGGCGTTTTCGGTTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACCTACCGCTT
CGCGATGGATGACTTGGCT

> L. CH 9

TTTAATACTCAAAATTTACAGTTAAAAAGGCCGATCGACGTTGTAAAACGCACCGCCTATACACAA
AAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATAGACGGCGTTTTCGGTTTTTTGGCGGGAGGGAGAGAG
AGGGGGGTGCGTGCGCGTGGATAACGGCTCCCATTTTTTGTGCGGATGGATGACTTGTCTTTT

Figure 14 : Les séquences consensus obtenues pour les 3 échantillons appartenant aux chevaux n° 2, 7 et 9 respectivement.

Les séquences consensus obtenues ont été soumises à l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) pour l'alignement avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank. L'identification des espèces de *Leishmania* sont considérée comme correcte lorsque les séquences présentent plus de 98 % d'identité pour au moins 99 % de la séquence analysée (Tableau 5).

Tableau 5 : Identification des espèces de *Leishmania* à partir d'échantillons de sang des trois chevaux positifs à la PCR, par séquençage de l'ADNr ITS1.

Code cheval	Taille de la séquence	Query cover	Pourcentage D'identité	E-value	Recherche BLAST (Similitude de séquence GenBank)
L. CH 2	236	100%	90,25%	7e-82	<i>L. infantum</i> (AJ634355) <i>L. chagasi</i> <i>L. Donovan</i>
L. CH 7	217	100 %	98,16%	8e-101	<i>L. infantum</i> (MK165182.2) (KX096612.1) <i>L. donovani</i>
L. CH 9	194	99 %	94,79 %	6e-77	<i>L. major</i> (AJ000310)

La recherche BLAST dans la base de données GenBank a montré que deux chevaux (cheval 2 et 7) présentent une similitude de 90,25% et 98,16% d'identité, respectivement, avec les séquences ITS1 du complexe *Leishmania donovani* (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. chagasi*). Le cheval 2 a présenté 90,25 % d'identité car nous n'avions eu que la séquence antisens après séquençage ce qui a limité sa correction. Le cheval 9, quand à lui, a présenté 94,79% d'identité avec *L. major*. Les E-value obtenus pour les trois séquences sont faibles, donc l'alignement est considéré comme significatif.

8.2. Discussion :

L'analyse moléculaire a révélé que 3 chevaux sur un total de 23 (3/23), soit 13,04 %, étaient positifs par PCR ciblant la région ITS1 de *Leishmania*. Après séquençage, les chevaux : L.CH 2 et L.CH 7, présentent une forte similarité avec des séquences appartenant au le complexe *Leishmania donovani* dans la base de données GenBank, tandis que le cheval L.CH 9 montre une similarité avec les séquences de *Leishmania major*.

La séquence obtenue chez le cheval 2 présente une couverture de 100 % avec un pourcentage d'identité de 90,25 %, tandis que celle du cheval 7 montre un alignement parfait (100 % de couverture) avec 98 % d'identité. Le pourcentage d'identité plus faible observé pour la séquence du cheval 2 pourrait être dû à l'absence de la séquence reverse et à la présence de zones d'ambiguïtés (lecture floues et de faible intensité aux extrémités dans le chromatogramme). Toutefois, la couverture complète et l'E-value très faible renforcent la fiabilité de l'alignement et confirment fortement l'appartenance de ces deux séquences au complexe *donovani*, qui inclut *L. infantum*, *L. donovani* et *L. chagasi*, en particulier pour la séquence L. CH 7.

Étant donné la répartition géographique de ces espèces : *L. donovani* prédominant en Asie du Sud (notamment en Inde) et *L. chagasi* limitée à l'Amérique du Sud, ces deux espèces peuvent être écartées. En revanche, *L. infantum*, agent responsable de la leishmaniose viscérale humaine et canine en Algérie, apparaît comme l'espèce la plus probable pour ces deux séquences. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en Europe (Koehler et al., 2002 ; Solano-Gallego et al., 2003), ainsi qu'au Brésil (Soares et al., 2013), confirmant la possibilité d'une infection équine par *L. infantum* et suggérant un rôle possible du cheval dans la chaîne de transmission de la leishmaniose.

La séquence du cheval 9 montre une similitude de 94,79 % avec *Leishmania major*, pour une couverture de 99 %. Bien que l'identité soit légèrement inférieure au seuil de confirmation définitive (> 98 %), la couverture élevée et la faible E-value suggèrent une forte proximité génétique avec cette espèce. Ce faible pourcentage d'identité est dû probablement aux zones d'ambiguïtés aux extrémités de la séquence.

En Algérie, la *L. major* est l'agent causal de la leishmaniose cutanée zoonotique avec comme réservoir principal le rongeurs *Psammomys obesus*. La détection de *L. major* chez un cheval est exceptionnelle. En ce sens, la présente étude serait l'une des premières à rapporter

l'isolement de *L. major* chez le cheval en Algérie, mettant en évidence une diversité des espèces de *Leishmania* chez les chevaux, incluant à la fois des agents de leishmaniose viscérale (*L. infantum*) et cutanée (*L. major*).

Enfin, ces données appuient l'idée que le cheval pourra avoir un rôle important en tant que réservoir notamment en zones d'endémies. Elles encouragent aussi à réaliser des études sur un échantillonnage représentatif de la population équine, avec des études complémentaires (sérologiques, entomologiques, géographiques) pour mieux comprendre la dynamique de transmission.

CONCLUSION

L'étude menée a permis de mettre en évidence, la présence d'ADN de *Leishmania* chez des chevaux à l'aide de techniques de biologie moléculaire ciblant l'espaceur ITS1. Les résultats obtenus confirment la présence chez deux chevaux des souches appartenant au complexe *Leishmania donovani*, très probablement *L. infantum*, espèce endémique responsable de la leishmaniose viscérale humaine et canine en Algérie. Le troisième cheval a présenté une forte similarité génétique avec *Leishmania major*, espèce associée à la leishmaniose cutanée zoonotique.

Ces résultats, bien que limités à un faible nombre d'échantillons, révèlent une diversité d'espèces de *Leishmania* pouvant infecter les chevaux et soulignent la possible implication de cet hôte dans l'épidémiologie de la leishmaniose. La détection de *L. major*, rarement signalée chez les équidés, constitue une donnée originale qui mérite une attention particulière.

L'ensemble de ces observations renforce la nécessité d'élargir les études sur un échantillonnage plus grand des chevaux, afin de mieux comprendre le rôle du cheval en tant qu'éventuel hôte réservoir dans les cycles de transmission de la leishmaniose en Algérie.

REFERENCE

1. Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukehal, A., ... & Boelaert, M. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One*, 9(6), e99207.
2. Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.
3. Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... & Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1-29.
4. Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. *Health Science Journal*, 11(4), 1.
5. Belazzoug, S. (1983). Le Nouveau Foyer De Leishmaniose Cutanee De M'sila (Algerie). Infestation Naturelle De" Psammonys Obesus"(Rongeur, Gerbillide). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, Vol. 76, No. 2, 146-149.
6. Belazzoug, S. (1986). Découverte d'un Meriones shawi (Rongeur, Gerbillidé) naturellement infesté par Leishmania dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, 79(5), 630-633.
7. Belazzoug, S. (1987). La leishmaniose canine en Algérie. *Maghreb Veterinaire*, 3, 11-13.
8. Benassi, J. C., Benvenga, G. U., Ferreira, H. L., Soares, R. M., Silva, D. T., Pereira, V. F., ... & Oliveira, T. M. F. D. S. (2018). Molecular and serological detection of Leishmania spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(06), 1058-1063.
9. Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., & Harrat, Z. (2012). Leishmania infantum MON-1 isolated from a golden jackal (Canis aureus) in Grande Kabylie (Algeria). *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 105, 5-7.

10. Chouihi, E., Amri, F., Bouslimi, N., Siala, E., Selmi, K., Zallagua, N., ... & Aoun, K. (2009). Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses Cultures on NNN medium for the diagnosis of *Leishmaniasis*. *Pathol. Biol*, 57, 219-224.
11. da Silva Luiz, C., de Oliveira, G. A., da Silva, B. A., de Miranda Maranhão, A. C. P., Santos, M. M., da Silva Pontes, K. G., ... & Bastos, I. V. M. (2023). Leishmaniose tegumentar equina: Revisão de Literatura. Atualizações em clínica, reprodução e diagnóstico laboratorial de grandes animais, 114.
12. Dedet, J. P., Pratlong, F., Lanotte, G., & Ravel, C. (1999). The parasite. *Clinics in dermatology*, 17(3), 261-268.
13. El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579.
14. Filippi, C., Malherbe, L., Julia, V., & Glaichenhaus, N. (2001). L'immunité contre les leishmanies. *médecine/sciences*, 17(11), 1120-1128.
15. Harrat, Z., Boubidi, S. C., Pratlong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J. P., ... & Belkaid, M. (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 716-720.
16. Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J. A., ... & Dedet, J. P. (1996). *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 625-629.
17. Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, S., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J. L., & Banuls, A. L. (2007). Understanding human leishmaniasis : the need for an integrated approach. *EncyInfect Diseases*, 55, 87-123.
18. Izri, A., & Belazzoug, S. (2007). Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. *Revue francophone des laboratoires*, 2007(396), 3-10.
19. Kazemi B. Genomic organization of *Leishmania* species. *Iran J Parasitol*. 2011 Aug ; 6(3) :1-18. PMID : 22347292 ; PMCID : PMC3279888.
20. Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schönian, G., Zahner, H., & Burkhardt, E. (2002). Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, 109(1-2), 9-17.

21. Landfear, S. M. (2022). New Vistas in the Biology of the Flagellum—*Leishmania* Parasites. *Pathogens*, 11(4), 447. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040447>.
22. Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., ... & Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa* The committee on systematics evolution of the society of protozoologists. *The Journal of protozoology*, 27(1), 37-58.
23. Mansouri, R., Pratlong, F., Bachi, F., Hamrioui, B., & Dedet, J. P. (2012). The first isoenzymatic characterizations of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the Area of Annaba (Eastern Algeria). In *The Open Conference Proceedings Journal* (Vol. 3, No. suppl 2-M2, pp. 6-11).
24. Mokni, M. (2019, March). Leishmanioses cutanées. In *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* (Vol. 146, No. 3, pp. 232-246). Elsevier Masson.
25. Montaner-Angoiti, E., & Llobat, L. (2023). Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world?. *Veterinary Research Communications*, 47(4), 1777-1799.
26. Müller, N., Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M. H., Bogenbor, K. K., Hilbe, M., ... & von Bomhard, W. (2009). Occurrence of *Leishmania sp.* in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary parasitology*, 166 (3-4), 346-351.
27. Real, F. E. R. N. A. N. D. O., Vidal, R. O., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M. C., Costa, G. G. L., Herai, R. H., ... & Bahia, D. (2013). The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA research*, 20(6), 567-581.
28. Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Mikhailov, A., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., ... & Gasimov, E. (2021). Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une période de référence pour la feuille de route à l'horizon 2030. *Weekly epidemiological record*, 96 (35), 401-420.
29. Schönian, G., Lukeš, J., Stark, O., & Cotton, J. A. (2018). Molecular evolution and phylogeny of *Leishmania* (pp. 19-57). Springer International Publishing.
30. Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45(4), 255-72.
31. Siala E, Bouratbine A, Aoun K. Mediterranean visceral leishmaniasis : update on biological diagnosis. *Tunis Med*. 2022 Janvier ; 100(1):13-26. English. PMID: 35822327; PMCID: PMC8996314.


32. Soares, IR, Silva, SO, Moreira, FM, Prado, LG, Fantini, P., Maranhão, RDPA, ... & Palhares, MS (2013). Premières preuves de cas autochtones de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chez le cheval (*Equus caballus*) dans les Amériques et infection mixte à *Leishmania infantum* et *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Parasitologie vétérinaire*, 197 (3-4), 665-669.
33. Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., & Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain.
34. Steverding, D. Histoire de la leishmaniose. *Parasites Vectors* 10 , 82 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
35. Yilmaz, I. C., Dunuroglu, E., Ayanoglu, I. C., Ipekoglu, E. M., Yildirim, M., Girginkardesler, N., ... & Gursel, M. (2022). *Leishmania* kinetoplast DNA contributes to parasite burden in infected macrophages: Critical role of the cGAS-STING-TBK1 signaling pathway in macrophage parasitemia. *Frontiers in Immunology*, 13, 1007070.

Webographies :

1. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
2. <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>.
3. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation du Tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 10X à pH 8.3 :

- 107.8 g de Tris (89 mM),
 - 55 g d'acide borique (89 mM),
 - 5.8 g d'EDTA (2 mM),
- 
- Quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée.

Pesez les trois constituants et mettez-les dans un erlenmeyer mené d'un barreau magnétique. Ajoutez une quantité d'eau distillée et mettez sur un agitateur magnétique afin de faire dissoudre tous les constituants, en ajustant le pH à 8 avec une solution de NaOH à 4N.

NB : Pour préparer 100 ml de tampon TBE 1X (une fois concentré), mettez 10 ml de tampon TBE 10X et ajouter 90 ml d'eau distillée et mélanger bien.

Résumé

La leishmaniose est une maladie parasitaire vectorielle, due à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* et transmise par la piqûre de phlébotomes femelles infectés. Elle est représentée chez l'homme sous différentes formes cliniques, cutanée, viscérale et cutanéomuqueuse. Cette affection demeure un problème majeur de santé publique dans de nombreuses régions du monde, notamment en Algérie, où elle est endémique. Les canidés et certains rongeurs sont reconnus comme les principaux réservoirs de la maladie, mais l'implication d'autres mammifères comme les équidés, entre autres le cheval, demeure peu exploitée. Dans ce contexte, ce travail a pour objectif de détecter la présence de *Leishmania* à partir d'échantillons sanguins de 23 chevaux par PCR-ITS1 et la caractérisation moléculaire des souches isolées par séquençage Sanger. Les résultats de la PCR-ITS1 ont permis de mettre en évidence la présence d'ADN de *Leishmania* chez trois chevaux, dont le séquençage a révélé l'appartenance des souches au complexe *L. donovani*, *L. infantum* précisément et le complexe *L. major*. Ces résultats, bien que limités, mettent en évidence une diversité d'espèces de *Leishmania* chez les chevaux et soulignent leur possible rôle dans l'épidémiologie de la leishmaniose. Ce qui nécessite de poursuivre les investigations sur un échantillon élargi pour évaluer le potentiel réservoir équin dans les cycles de transmission en zones endémiques.

Abstract

Leishmaniasis is a vector-borne parasitic disease caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of infected female sandflies. In humans, it presents in various clinical forms, including cutaneous, visceral, and mucocutaneous manifestations. This disease remains a major public health problem in many regions of the world, particularly in Algeria, where it is endemic. Canids and certain rodents are recognized as the main reservoirs of the disease, but the involvement of other mammals, such as equids, including horses, remains largely unexplored. In this context, this study aims to detect the presence of *Leishmania* in blood samples from 23 horses using ITS1-PCR and to perform molecular characterization of the isolated strains by Sanger sequencing. The results of the ITS1 PCR revealed the presence of *Leishmania* DNA in three horses, and sequencing showed that the strains belonged to the *L. donovani* complex, specifically *L. infantum*, and the *L. major* complex. These results, although limited, highlight the diversity of *Leishmania* species in horses and underscore their potential role in the epidemiology of leishmaniasis. This necessitates further investigations on a larger sample to assess the potential equine reservoir in transmission cycles in endemic areas.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Universite Saad Dahleb Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Projet de fin d'études
en vue de l'obtention du diplôme de Master
en science de la nature et de la vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique

Thème

ISOLEMENT ET CARACTERISATION MOLECULAIRE
DES SOUCHES DE *LEISHMANIA* ISOLEES DU CHEVAL

Réalisé par : M^{lle} OUCHAIT ASMA

Soutenu le : 02 Juillet 2025

Membres de jury :

Mr. N. BENYAHIA

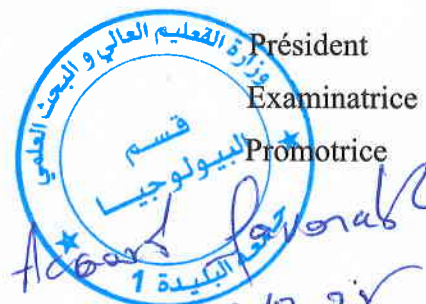
Mme. R. AISSANI

Mme. F. BACHI

MAA, USDB 1

MCB, USDB 1

Professeure, IPA



Promotion 2024 / 2025

N. BENYAHIA

02/12/2024
Bachi