

## DEDICACES



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH  
Faculté des Sciences et Techniques-Fès  
Laboratoire de biotechnologie microbienne



DIRECTION REGIONALE DE LA SANTE DE FES  
Laboratoire Régional de Diagnostic  
Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu

### *PROJET DE FIN D'ETUDES*

*Filière : Master des Sciences et Techniques*

*Option : BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE*

# ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DE LA LEISHMANIOSE CUTANÉE À FÈS ET MY YACOUB

**Réalisé par :** - M<sup>me</sup> BENNOUNA Asmae

**Soutenu le :** 21/06/2010

**Encadré par :** - Dr. EL OUALI LALAMI Abdelhakim  
- Dr. BEKHTI Khadija  
- Dr. IBNSOUDA Saâd

**Devant le jury composé de :**

Président : - Dr. IBNSOUDA Saâd

Encadrants : - Dr. BEKHTI Khadija

- Dr. EL OUALI LALAMI Abdelhakim

Examineurs :- Dr. SEBTI Faiza

- Dr. MANIAR Saâd

Professeur à la FST de Fès

Professeur à la FST de Fès

Directeur du LRDEHM

Docteur biologiste à l'INH

Responsable de l'ORS

*Année universitaire : 2009/2010*

قالوا سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا  
إنك أنت العليم الحكيم

(صدق الله العظيم)

سورة البقرة الآية 31

# DEDICACES

---

Dédicaces

## DEDICACES

---

*Je dédis ce modeste travail*

*À Madame Benmassaoud Fatima Zouhra*

*À celle qui jaillit d'amour et de tendresse...*

*À celle qui nous a comblé de joie et de bonheur...*

*À celle qui était pour nous, et le restera, le symbole de sacrifice, de courage et  
d'amour  
attentif*

*À celle qui pense à nous, jour et nuit ...*

*À celle qui m'as appris toutes les bonnes valeurs...*

*À celle qui a fait de ma vie une rose...*

*À la compagne de ma vie...*

*À toi maman*

*Que dirais-je d'autre pour te décrire ?*

*Que ferai-je pour te remercier ?*

*Je ne sais pas, les mots sont incapables de traduire toute ma gratitude et tout  
mon amour.*

*Je te promets de ne pas faillir à mon devoir.*

*Que dieu te préserve pour nous en bonne santé et te prête une longue vie pour que*

*Je puisse te combler à mon tour.*

## DEDICACES

---

### À Monsieur Mohamed Najib Bennouna

*À l'homme qui m'a toujours aidé...*

*À l'homme qui m'a toujours guidé...*

*À l'homme qui m'a tout le temps encouragé matériellement et moralement...*

*À l'homme qui m'a permis de franchir tous les obstacles qui se sont dessinés sur  
mon chemin...*

*À l'homme dont je suis très fière...*

*À qui je dois tout...*

*À toi papa*

*En témoignage de l'effort que tu as déployé pour ma formation et mon éducation.*

*Pour ta foi inébranlable dans ma réussite.*

*Pour ton appui lors de la réalisation de ce travail.*

*Qu'aurai-je fait sans toi ?*

*Rien*

*Je te promets de ne pas faillir à mon devoir.*

*Que dieu tout puissant te protège et te prête longue vie*

## DEDICACES

---

À mon mari :  
Lebbar Mohamed

*Je tiens à vous dire qu'aucun de mes mots ne saurait exprimer mon amour, ma vive gratitude et mon intime attachement en témoignage de votre inéluctable patience, votre sacrifice et votre soutien tout au long de ce travail.*

À mon frère :  
Bennouna Youness

*Merci pour votre présence, votre amour, votre soutien et votre aide, qui m'ont été, tout au long de mon parcours étudiant, précieux pour me surpasser jour après jour. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de réussite et de prospérité... MERCI A VOUS.*

À ma sœur :  
Bennouna Kaoutar

*À la benjamine de notre petite famille  
Avec son cœur d'or  
Et son amour infini,  
à qui je souhaite toute la réussite et le bonheur.*

À mes grands-parents maternels:

*Par vos regards et vos paroles pleines de fierté de ma personne, ma joie ne peut qu'être immense.  
Que dieu vous préserve en bonne santé.*

À mes beaux-parents :

*Merci pour votre amour, votre gentillesse votre soutien et vos encouragements. C'est avec un immense plaisir que je vous dédis ce modeste travail.*

À Monsieur Lahmamsi Fahd et à tous les membres de sa famille :

*Je vous remercie pour votre amour et votre encouragement et je vous dédis, par la même occasion, ce modeste travail... Encore merci.*

## DEDICACES

---

À Monsieur Filali Abdelmajid et à tous les membres de sa famille :

*Merci pour votre encouragement et votre soutien.  
Puisse ce travail être pour moi, l'occasion de vous exprimer ma gratitude et  
mes sincères remerciements.*

À Monsieur Senhaji Zakariae et tous les membres de sa famille :

*Je vous remercie pour votre encouragement et votre soutien. C'est avec  
plaisir que je vous dédis ce modeste travail.*

À toute ma famille :

*Je tiens à vous dire tous, qu'aucun de mes mots ne saurait exprimer  
l'ampleur de ma reconnaissance. Je vous aime beaucoup.  
Que dieu vous bénisse tous.*

*À Boutaina Abbadi, Lamiae Ouali Alami, Ahlam Abbad  
Khadija, Hasnae, Zineb, et Meryem.*

*En vous connaissant, j'ai connu l'amitié qui réjouit les cœurs,  
Et parce que rien n'est plus rare que l'amitié,  
Je vous promets qu'elle restera rose.*

À tous mes amis :

*Dont je ne citerai pas les noms vu que la liste est longue.  
Je dédis mon travail à tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin tout  
au long de mon parcours étudiantin.*

*Je vous remercie tous pour les merveilleux moments qu'on a passé ensemble  
et pour tout le bonheur qu'on a pu partager. Je vous souhaite bonne chance*



*Enfin, je vous remercie tous d'être là pour moi.*

*MILLE MERCI...*

## DEDICACES

---

# Remerciements

## DEDICACES

---

### À mes encadrants:

#### **Madame BEKHTI Khadija**

*Professeur universitaire à la FST de Fès*

*Je suis très reconnaissante du grand honneur que vous me faites en acceptant de m'encadrer au cours de ce projet de fin d'études.*

*Aussi, je suis très sensible pour votre accueil aimable, votre générosité, votre bienveillance, votre simplicité ainsi que votre savoir faire dont j'ai pu profiter et qui m'a été d'une grande aide tout au long du parcours de ce projet.*

*Je vous remercie également pour votre disponibilité, pour la confiance que vous avez su m'accorder, vos explications et pour tous les conseils que vous m'avez prodigué pour la réalisation de ce travail.*

*De plus, votre présence parmi les membres de ce jury m'envoie ravie et reconnaissante de votre soutien, votre estime et votre intérêt pour ce travail.*

*Je vous exprime mes vifs remerciements, ma profonde admiration et mon grand respect.*

#### **Monsieur EL OUALI LALAMI Abdelhakim**

*Docteur biochimiste, directeur du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu*

*Veillez Mr, accepter l'expression de mes remerciements les plus profonds, pour m'avoir accepté dans votre laboratoire et pour l'intérêt que vous avez porté pour cette étude tout au long de la période de mon stage.*

*Je suis fière de l'honneur que vous m'avez donné en acceptant de faire partie de ce jury.*

*Votre maîtrise professionnelle et vos grandes qualités humaines, ont suscité en moi une grande admiration.*

*Votre sérieux, votre sympathie, votre générosité et votre humanisme font de vous un exemple à suivre.*

*Veillez Mr, trouver ici l'expression de ma haute considération et de mon plus grand respect.*

#### **Monsieur IBNSOUDA Saâd**

*Professeur chercheur à la FST de Fès*

*Je suis très reconnaissante de votre orientation judicieuse et de vos précieux conseils qui m'ont guidé dans la partie moléculaire de cette étude.*

*Je vous adresse mes vifs remerciements pour votre bienveillance, vos qualités humaines et d'avoir bénéficié de votre savoir et de votre grande expérience qui resteront pour moi un modèle.*

## DEDICACES

---

*Veillez accepter, ici le témoignage de mes respects et mes remerciements les plus sincères.*

*Je vous remercie également de m'avoir accepté dans votre laboratoire et pour vos remarques pertinentes dans la réalisation de la PCR,*

### *À mes examinateurs du projet de fin d'études*

***Madame SEBTI Faiza***

*Docteur biologiste à l'Institut National d'Hygiène*

*Votre compétence professionnelle, ainsi que vos qualités humaines ont suscité ma grande admiration.*

*Je tiens également à vous remercier sincèrement pour votre aide et vos conseils lors de la réalisation du présent travail.*

*Veillez accepter ma gratitude et mes remerciements les plus respectueux.*

***Monsieur MANIAR Saad***

*Docteur biologiste, responsable de l'Observatoire Régional de la Santé de la région Fès-Boulemane*

*Je suis infiniment reconnaissante du grand honneur que vous me faites en acceptant aimablement de siéger au sein de mon jury.*

*J'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez apporté à ce projet.*

*Votre compétence alliée à votre gentillesse et votre compréhension font honneur à la profession.*

*Veillez trouver ici, l'expression de ma grande estime et ma sincère reconnaissance.*

# DEDICACES

---

## Aux personnels du laboratoire régional de diagnostic épidémiologique et d'hygiène du milieu

*Monsieur SABREI Hamid*

*Qui m'a adopté dès mon premier jour de stage. Merci à vous pour votre gentillesse, votre confiance et votre générosité. Et surtout, merci de m'avoir transmis les ficelles du métier.*

*Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

### Je remercie également

*Tous les membres du personnel de LRDEHM,*

*En particulier :*

*M<sup>lle</sup> ALAMI ouafae, M<sup>r</sup> AABOUCH Mohamed et M<sup>r</sup> CHRIGUI Hamid*

*Merci de m'avoir accepté parmi vous telle une collègue et de m'avoir transmis votre savoir faire.*

*Sachez qu'aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance.*

## DEDICACES

---

### Je remercie également :

*Monsieur IRAQUI Mohamed*

*Professeur chercheur à la FST de Fès*

*Votre aimabilité et vos qualités humaines et professionnelles  
seront pour nous un exemple encourageant.*

*Veillez trouver ici l'assurance de mon grand respect.*

*Monsieur RHAJAOUI Mohamed chef de département de parasitologie de  
l'INH et Madame FELLAH Hajiba docteur biologiste à l'INH*

*Je vous remercie de l'intérêt que vous avez accordé à notre travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Monsieur MOSTAQUIM Mohamed*

*Etudiant chercheur au laboratoire de biotechnologie  
microbienne de la FST de Fès*

*Je vous remercie de votre gentillesse et de votre aide.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance*



*Veillez trouver ici, Messieurs, Dames, le témoignage de ma respectueuse et profonde  
gratitude, et de recevoir l'expression de mes plus grands remerciements et ma profonde  
considération.*

*À*

*L'ensemble des professeurs  
de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès  
Qui ont participé à ma formation*

# DEDICACES

---

Avant propos

# DEDICACES

---

Le projet de fin d'études, constitue un module, d'une importance majeure pour le cursus universitaire, puisqu'il tend à concrétiser l'application pratique de toutes les notions théoriques acquises au cours des enseignements universitaires. Ce projet, tend à déterminer les capacités de l'étudiant à s'intégrer dans un monde d'activité nouvelle, qui est celui du travail.

Mon sujet qui s'inscrit dans ce cadre, est réalisé au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès qui est un service d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique et au Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.



Sommaire

The word "Sommaire" is rendered in a large, stylized, black-outlined font. It is enclosed within a double-line rectangular border. The letter 'S' is significantly larger than the other letters, which are in a uniform, slightly condensed serif typeface. The dot on the 'i' is a simple oval shape.

# DEDICACES

## INTRODUCTION GENERALE .....

1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. HISTORIQUE DE LA

LEISHMANIOSE.....3

### II. ACTEURS DE LA

LEISHMANIOSE.....3

1. Parasites : Leishmanies

.....3

2. Insectes vecteurs : Phlébotome.....

5

3. Réservoirs.....

6

4. Cycle biologique .....

7

### III. BIOLOGIE DES LEISHMANIES.....

9

1. Formes de leishmanies.....

9

1.1. Forme amastigote.....

9

1.2. Forme promastigote.....

9

1.3. Passage d'une forme à l'autre.....

10

2. Génome des leishmanies.....

10

2.1. L'ADN nucléaire.....

11

2.2. L'ADN kinétoplastique.....

12

3. Reproduction des leishmanies.....

13

4. Constituants antigéniques majeurs des leishmanies.....14

5. Interactions hôtes- leishmanies.....

15

# DEDICACES

---

## IV. POUVOIR PATHOGENE

### DESLEISHMANIES.....16

1. Leishmaniose viscérale.....  
**16**
2. Leishmaniose cutanée .....  
**18**
  - 2.1 Forme sèche ou urbaine.....  
**18**
  - 2.2 Forme humide ou rurale.....  
**19**
  - 2.3. Forme sporadique.....  
**20**
  - 2.4. Forme cutanée diffuse LCD.....  
**20**
  - 2.5. Forme cutanéomuqueuse.....  
**21**

## V. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA LEISHMANIOSE.....22

1. Répartition mondiale.....  
**22**
2. Répartition nationale de la leishmaniose.....  
**24**
  - 2.1. Leishmaniose viscérale.....  
**25**
  - 2.2. Leishmanioses cutanées.....  
**26**
    - 2.2.1. LC à *Leishmania major*.....  
**26**
    - 2.2.2. LC à *Leishmania tropica*.....  
**27**
    - 2.2.3. LC à *Leishmania infantum*.....  
**27**
3. Répartition régionale desleishmanioses.....  
**28**

## VI. DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES

### .....28

1. Cas de leishmaniose viscérale.....  
**29**
  - 1.1. Etape séro-hématologique .....  
**29**

# DEDICACES

---

1.2. Etape immunologique.....	
<b>29</b>	
1.2.1. Agglutination directe (DAT) .....	
<b>29</b>	
1.2.2. Immuno-Fluorescence Indirecte (IFI) .....	
<b>29</b>	
1.2.3. ELISA : l'Enzyme-Linked Immunosorbent assay.....	
<b>29</b>	
1.3. Etape parasitologique.....	
.....	
<b>30</b>	
2. Cas de leishmaniose cutanée.....	
<b>31</b>	
2.1. Diagnostic histologique.....	
.....	
<b>31</b>	
2.2. Culture des leishmanies.....	
.....	
<b>31</b>	
2.3. Diagnostic moléculaire de la leishmaniose.....	
.....	
<b>31</b>	
2.3.1. Extraction d'ADN des leishmanies .....	
<b>32</b>	
2.3.2. Amorces utilisées.....	
.....	
<b>33</b>	
2.3.3. Séquençage des leishmanies.....	
<b>33</b>	
<b>VII. TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE.....</b>	
<b>34</b>	
1. Médicaments.....	
<b>35</b>	
1.1. Médicaments utilisés à l'échelle mondiale.....	
<b>35</b>	
1.1.1. Sels d'antimoine pentavalents (SbV) .....	
<b>35</b>	
1.1.2. Sels de pentamidine : Isethionate de pentamidine :	
PENTACARINA®.....	
<b>35</b>	
1.1.3. Amphotéricine B et ses formulations lipidiques .....	
<b>36</b>	
1.1.4. Aminoside sulfate .....	
<b>37</b>	
1.1.5. Allopurinol .....	
<b>37</b>	

# DEDICACES

---

1.1.6. Imidazolés.....	37
1.1.7. Interféron gamma.....	38
1.2. Médicament utilisé à l'échelle nationale.....	38
2. Vaccination.....	38

## MATERIELS ET METHODES

### LIEU D'ETUDE

.....	4
<b>0</b>	

### TYPE D'ETUDE

.....	4
<b>0</b>	

### I. ETUDE RETROSPECTIVE

.....	4
<b>0</b>	

### II. ETUDE PROSPECTIVE

.....	4
<b>2</b>	

#### 1. Description clinique

.....	4
<b>3</b>	

#### 2. Diagnostic histologique ..... 43

2.1. Technique de coloration..... 43

2.2. Conservation des lames colorées.....  
**44**

#### 3. Culture des leishmanies ..... **44**

1.2. Contrôle .....  
**44**

1.3. Repiquage.....  
**44**

#### 2. Diagnostic moléculaire..... **45**

2.2. Extraction d'ADN génomique.....  
**45**

# DEDICACES

---

4.1.1. Extraction d'ADN par phénol- chloroforme- alcool .....	45
4.1.2. Extraction d'ADN par choc thermique.....	46
2.3. Amplification par PCR .....	47
2.3.1. Amorces spécifiques .....	47
2.3.2. Réactifs de la PCR .....	47
2.3.3. Amplification.....	48
2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	48
2.4.1. Préparation du gel.....	49
2.4.2. Dépôt des produits d'amplification.....	49
2.4.3. Migration.....	49
2.4.4. Visualisation.....	49
2.5. Séquençage d'ADN .....	50
2.6. Analyse bioinformatique des séquences .....	50

## RESULTATS ET DISCUSSION

### CHAPITRE .I. ETUDE RETROSPECTIVE ET PROSPECTIVE

#### I. ETUDE RETROSPECTIVE.....

.....	51
1. Répartition des cas de la LC selon le type de dépistage.....	53
2. Répartition des cas de la LC par mois .....	53
3. Répartition des cas de la LC selon la provenance .....	54
4.1. Répartition des cas de la LC selon les provinces .....	54
4.2. Répartition des cas de la LC selon le milieu .....	55

# DEDICACES

---

5. Répartition des cas de la LC selon le genre .....	<b>56</b>
5.1. Répartition des cas de la LC selon le sexe .....	<b>56</b>
5.2. Répartition des cas de la LC selon les tranches d'âge.....	<b>56</b>
6. Contrôle de la non-conformité des lames examinées par le LRDEHM .....	<b>57</b>
<b>II. ETUDE PROSPECTIVE.....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE.II. DESCRIPTION CLINIQUE ET DIAGNOSTIC DE LA LC</b>	
<b>I. DESCRIPTION CLINIQUE DES LESIONS.....</b>	<b>59</b>
1. Délai de consultation.....	<b>59</b>
2. Sièges des lésions.....	<b>60</b>
3. Aspect des lésions.....	<b>60</b>
4. Origine de l'infestation .....	<b>61</b>
<b>II. DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE.....</b>	<b>61</b>
<b>III. CULTURE DES LEISHMANIES.....</b>	<b>62</b>
<b>VI. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA LC PAR PCR.....</b>	<b>63</b>
1. Mise au point de la technique PCR dans le diagnostic de la LC .....	<b>63</b>
1.1. Extraction d'ADN par phénol-chloroforme-alcool.....	<b>63</b>
1.2. Extraction d'ADN par choc thermique et amplification par PCR .....	<b>65</b>
1.2.1.Extraction d'ADN par 3 chocs thermiques et amplification par PCR ...	<b>65</b>
1.2.2. Comparaison de l'extraction d'ADN par 3ou 2 chocs thermique et amplification par PCR.....	<b>66</b>

# DEDICACES

---

1.2.3. Comparaison de l'extraction d'ADN par 1 et 2 chocs thermiques et amplification par PCR .....	
<b>67</b>	
2. Evaluation de la technique PCR dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée .....	
<b>68</b>	
2.1. Résultats de la PCR sur les prélèvements directs.....	<b>70</b>
2.2. Résultats de la PCR sur les Prélèvements indirects sur lames.....	
<b>70</b>	
<b>V. SEQUENÇAGE D'ADN DES LEISHMANIES.....</b>	
<b>....71</b>	
<b>VI. ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SEQUENCES .....</b>	
<b>71</b>	
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS .....</b>	
<b>73</b>	
<b>ANNEXES .....</b>	
<b>76</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	
<b>...80</b>	
<b>WEBOGRAPHIES.....</b>	
<b>94</b>	
<b>RESUME</b>	

# Introduction générale

## DEDICACES

---

La leishmaniose est une parasitose vectorielle dont l'agent pathogène est un protozoaire trypanozomatidae du genre *Leishmania* (Ross, 1903) et dont le vecteur de transmission est la femelle hématophage d'un insecte diptère du genre *Phlebotomus* (Peters et al., 1987 ; Dedet, 1999).

Les leishmanies se développent dans les cellules histio-monocytaires des mammifères dont l'homme. Selon l'espèce parasitaire incriminée, l'infection chez ce dernier peut revêtir trois formes ([www.medicopedia.net](http://www.medicopedia.net)):

- ❖ Viscérale (Kala Azar) avec des poussées de fièvre irrégulières, une hépatosplénomégalie et une anémie. Des cas de dermite post Kala Azar peuvent apparaître. En absence de traitement cette forme est mortelle (Grünfeld, 1998).
- ❖ Cutanée se manifestant sous forme de papule prurigineuse rouge sombre, qui se vésiculise, s'ulcère, s'infiltré en profondeur évoluant très lentement vers la guérison au prix d'une cicatrice (Belazzoug, 1985 ; Khiati, 1992).
- ❖ Cutanéomuqueuse se distingue de la précédente par une ulcération plus extensive, plus profonde atteignant les muqueuses et qui aboutit à une mutilation de l'organe touché (Grünfeld, 1998).

La leishmaniose touche plus de 100 pays par le monde, c'est la deuxième cause de mortalité parasitaire après le paludisme. Selon l'OMS (2007) 350 millions de personnes sont exposées au risque de la leishmaniose chaque année; l'incidence annuelle mondiale se situe entre 1,5 et 2 millions de cas se répartissant entre 1 à 1,5 millions de LC et 500 000 de LV.

Le Maroc n'est pas indemne, la leishmaniose a été signalé depuis 1974 (Foley et al., 1914); la maladie a été largement confinée aux régions arides du Sahara (Rioux et al., 1982 ) mais l'émergence d'autre foyer (Rhajaoui, 2009) ne cesse d'apparaître. Cette augmentation est probablement due au changement climatique et à l'extension de l'aire géographique du vecteur (Andrew et al., 2000).

La leishmaniose devient une menace pour la santé publique. En absence de vaccin et de médicament prophylactique, le ministère de la santé a mis en place un programme de lutte contre cette infestation. Ce programme est géré par la direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies; il se base

## DEDICACES

---

sur un diagnostic précoce suivi d'un traitement et d'une lutte spécifique anti-vecteurs et anti-réservoirs. La leishmaniose devient donc à déclaration obligatoire (arrêté ministériel marocain 683-95 du 31 mars 1995). Le traitement de cette infection est pris en charge par l'état. Celui-ci se base sur les dérivés de l'antimoine ou des diamidines (sels de pentamidine). Cependant ces produits peuvent générer des effets secondaires (Sand, 1985 ; Dedet, 1999) et mêmes des résistances (Falcofe et al., 1993) donc le traitement de la leishmaniose ne se pratique qu'après un diagnostic de confirmation.

Le diagnostic est histologique, il met en évidence des leishmanies de très petite taille (2  $\mu\text{m}$ ) dans le cytoplasme des macrophages. Cette identification est difficile et peut donner des faux négatifs surtout au début de l'infestation où la charge parasitaire est faible. De ce fait un diagnostic de « certitude » est appliqué, il se base sur la culture *in vitro* mais celle-ci nécessite un délai d'au moins 6 semaines. Ces méthodes de diagnostic restent limitées car en plus, elles ne peuvent pas déterminer l'espèce en cause vu que les leishmanies sont tous morphologiquement identiques. Une autre méthode de diagnostic s'impose c'est le diagnostic moléculaire, rapide et précis vis-à-vis de l'espèce.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail dont l'objectif principal est le diagnostic moléculaire de l'agent pathogène de la leishmaniose cutanée par la technique PCR.

Dans ce projet, nous allons en premier lieu réaliser une étude rétrospective de la LC e »registrée au LRDEHM de Fès afin d'approcher la situation épidémiologique de la maladie. En deuxième lieu, nous allons traiter à travers une étude prospective :

- ❖ La description clinique des lésions ;
- ❖ L'optimisation du diagnostic moléculaire de la LC et le comparer par rapport au diagnostic histologique.

## DEDICACES

---

Etude bibliographique

# DEDICACES

---

## I. HISTORIQUE DE LA LEISHMANIOSE

Parmi les historiques de toutes les parasitoses, celui des leishmanioses est un de ceux les plus fertiles en événements.

Al boukhari, médecin arabe qui vivait au X<sup>ème</sup> siècle, décrit incontestablement cette infestation cutanée, Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique. Guilhou en 1833 décrit l'infection cutanée sous le nom du «bouton d'orient» (Jarry, 1999).

Firth découvrit en 1891 un agent pathogène (*Sporozoa furunculosa*) sans le décrire suffisamment (Raymond, 2003).

En 1898, à Tachkent en Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans des prélèvements d'ulcère, sans toutefois déterminer son statut taxonomique (Raymond, 2003).

Ce même parasite fut étudié en 1903 par Wright, chez un enfant arménien vivant à Boston, aux États-Unis. Il fut considéré comme une micro-sporidie et reçut le nom de *Helcosoma tropicum* (Raymond, 2003).

En 1906, Luhe décrivit la taxonomie dans un livre allemand (Dedet, 1999 ; Raymond, 2003).

En 1914, Yakimoff et Schokhor constatèrent l'individualisation de deux variétés *Leishmania tropica* (*L. tropica*) var. *major* et *Leishmania tropica* var. *minor*.

En 1921, le rôle du phlébotome dans la transmission des leishmanioses fut décrit par Baupere et Arago.

En 1973, Bray et al. décrivent un nouveau taxon *L.aethiopica* et adoptèrent la nomenclature binominale, *L. tropica* et *L. major*.

## II. ACTEURS DE LA LEISHMANIOSE

### 1. Parasites : Leishmanies

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés de l'ordre des kinetoplastidés, de la famille des trypanosomatidae et du genre *Leishmania*.

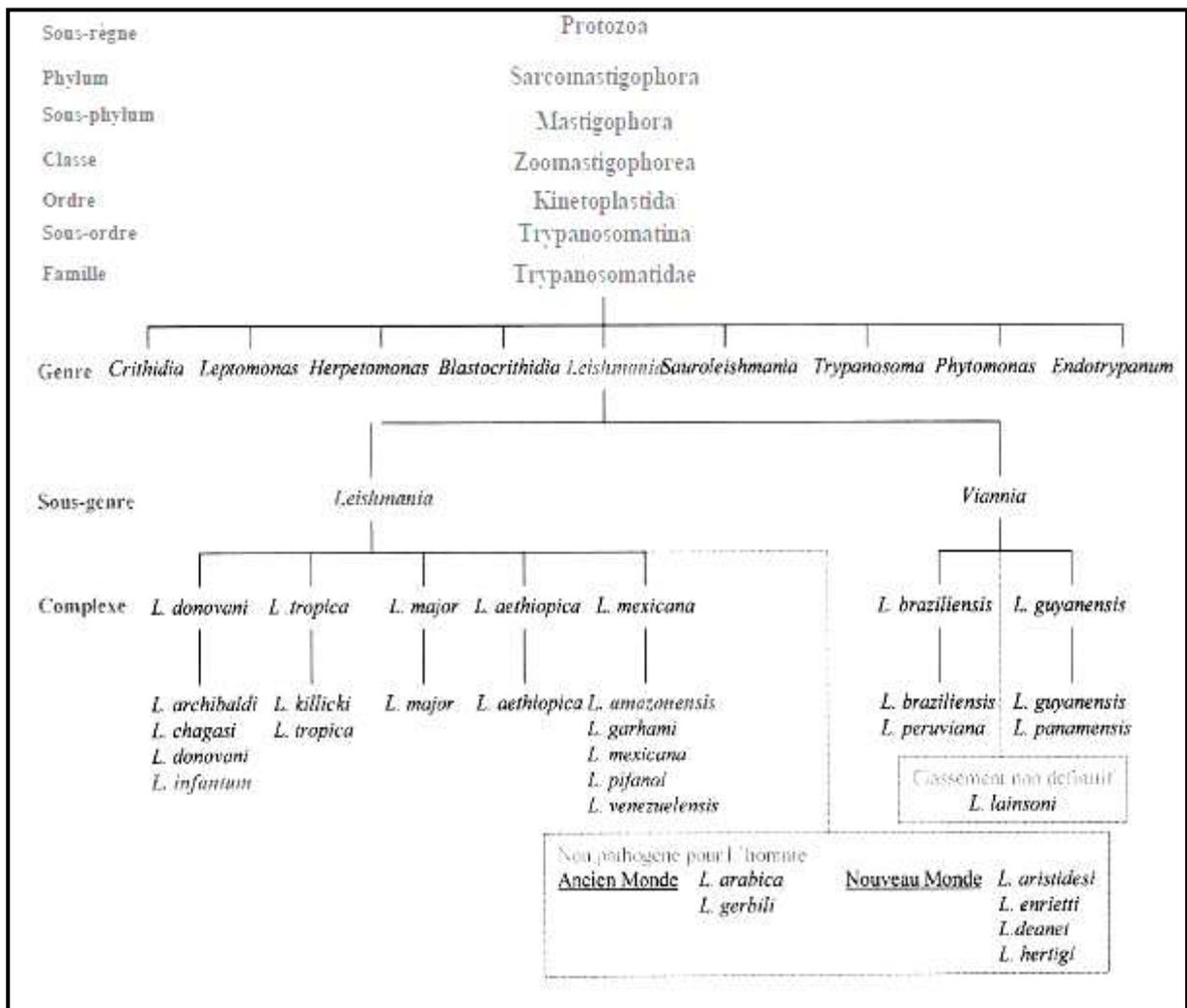
Ces parasites sont dimorphes : amastigote intracellulaire et promastigote libre dans l'intestin de l'insecte vecteur.

# DEDICACES

Morphologiquement identiques, la différentiation des espèces de *Leishmania* a fait l'objet de nombreuses études de classification:

- \*Clinique se basant sur la forme de la pathologie;
- \*Epidémiologique basée sur la répartition géographique, les hôtes réservoirs et les vecteurs;
- \*Iso-enzymatique basée sur la mobilité électro-phorétique des iso-enzymes (Gardener et al., 1974);
- \*Moléculaire basée sur la densité de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial (Chance et al., 1974) des parasites, l'analyse de restriction par endonucléases (Gardener et al., 1977).

Plusieurs classifications sont donc établies celle qu'on retient c'est la classification donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1990).



**Figure 1 :** Taxonomie des leishmanies.

(OMS, 1990)

# DEDICACES

---

## 2. Insectes vecteurs : Phlébotomes

Les phlébotomes (figure 2) sont des petits insectes velus de 2 à 3 mm qui vivent dans les régions chaudes. Ce sont les femelles hématophages qui sont les vecteurs de la leishmaniose.

Les phlébotomes sont des diptères nématocères de la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae; ils comptent actuellement 700 espèces décrites. Il existe une relation étroite entre l'espèce de vecteur et l'espèce de leishmanie (Sacks, 2001)

Selon Lewis et ses collaborateurs en 1977, la sous-famille des Phlebotominae comprend cinq genres, les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* dans l'Ancien Monde, et les genres *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* dans le Nouveau Monde.



**Figure 2 :**

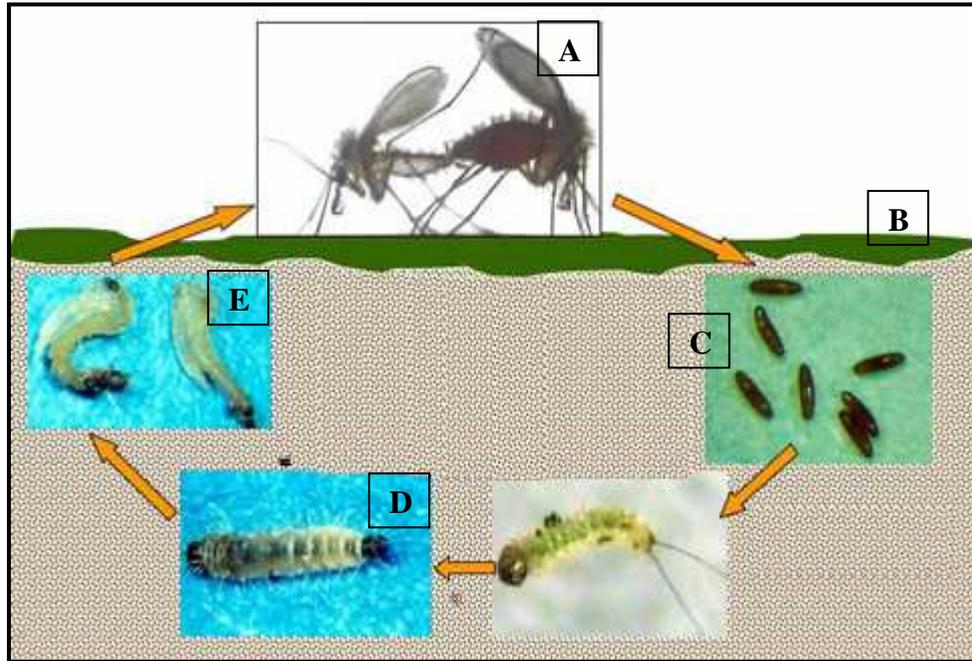
Phlébotome.

([www.parasito.montpellier-wired.com/proto/phlebotome2.jpg](http://www.parasito.montpellier-wired.com/proto/phlebotome2.jpg))

Dans les zones modérément chaudes les phlébotomes sont actifs pendant les mois chauds puis disparaissent à l'automne. Alors que dans les pays tropicaux, ils sont plus ou moins actifs toute l'année, (Léger, 1999).

La figure 3 représente schématiquement le cycle biologique d'un phlébotome. Les œufs, les larves et la nymphe se développent dans les micro-biotopes terrestres humides. Il est difficile de localiser ces formes à l'état naturel.

# DEDICACES



**Figure 3** : Cycle biologique du phlébotome.

([www.gruppoleishmania.org/fr/downloads](http://www.gruppoleishmania.org/fr/downloads))

A : Phlébotome adulte

C et D : Larves

B : Œuf

E : Nympe

La durée du cycle dépend de l'espèce, de la température et d'autres facteurs mais elle est en général inférieure à 45 jours.

### 3. Réservoirs

Les Hôtes réservoirs contiennent le parasite sans manifestation pathologique. Les vertébrés jouant le rôle de réservoir de *Leishmania*, diffèrent d'une espèce parasitaire à une autre.

#### ❖ *L. donovani*

C'est une anthroponose, l'homme est le seul vertébré reconnu comme étant le réservoir de la LV endémique à *L. donovani* (OMS, 1984).

#### ❖ *L. infantum*

C'est l'agent d'une zoonose dont le chien est le principal réservoir. Certains canidés sauvages sont suspectés d'être des réservoirs primaires de *L. infantum*.

## DEDICACES

---

Par ailleurs, le rat noir (*Rattus rattus*) pourrait être impliqué comme réservoir naturel de *L. infantum* dans certains foyers méditerranéens (Gradoni et al., 1978).

### ❖ *L. major*

Ce parasite est maintenu par des rongeurs appartenant aux genres *Rhombomys*, *Meriones* (Elbihari et al., 1987).

### ❖ *L. tropica*

D'après l'OMS (1984), c'est l'homme qui joue le rôle de réservoir et de source de l'infestation.

Cependant, dans certains foyers, le chien a été trouvé naturellement infecté par *L. tropica* (Guessous-idrissi et al., 1997) voire même considéré comme un réservoir de ce parasite (Nadim et al., 1978).

Quand aux leishmanioses du nouveau monde, les parasites ont été isolés chez un très grand nombre de mammifères (Le paresseux, l'opossum, le fourmilier et le rat noir...).

## 4. Cycle biologique

La leishmaniose constitue un ensemble complexe au sein duquel sont impliqués les phlébotomes, les réservoirs et les parasites.

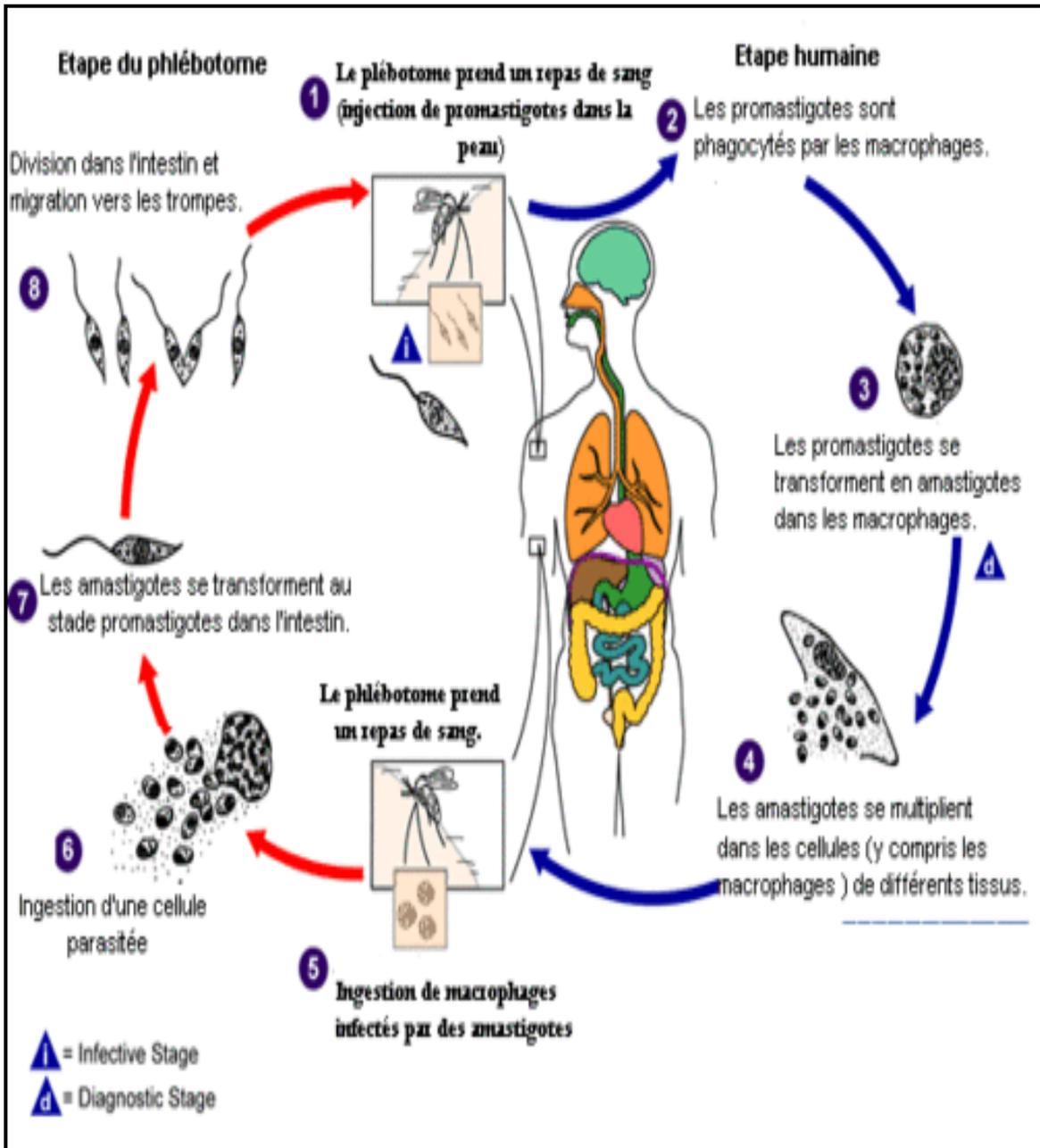
Les leishmanies sont transmises par la piqûre infectante des phlébotomes femelles lors de leur repas de sang chez un mammifère (Abonnec et al., 1970). Les promastigotes métacycliques déposées au niveau du point de la piqûre sont phagocytées par les macrophages (Molyneux et al., 1983 ; Baldet, 2004); elles se transforment en amastigotes (Bray et al., 1973 ; Dedet, 2001). Les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées par scissiparité.

Selon l'espèce incriminée, le tissu atteint est différent ce qui est la cause des manifestations cliniques.

Les phlébotomes s'infectent lors d'un nouveau repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (Develoux et al, 1987; Diarra, 2008). Chez le vecteur, les promastigotes vivent dans l'intestin moyen. Après une période de multiplication intrapariétale, les promastigotes reviennent dans la lumière gastrique puis se dirigent vers

# DEDICACES

l'intestin antérieur et s'accumulent derrière la valve oesophagienne. La fixation des promastigotes sur la paroi du tube digestif de l'insecte se fait soit par l'interdigitation du flagelle entre les microvillosités de la bordure en brosse des cellules épithéliales, soit à l'aide d'hémidesmosomes disposés au niveau de la partie antérieure du flagelle (Gentilini et al, 1999 ; Nozais et



al, 1996). Ces promastigotes métacycliques migrent dans la trompe du phlébotome (Guarini et al, 1914) et le cycle reprend de nouveau (figure 4).

**Figure 4 :** Cycle parasitaire de leishmaniose.

(CDC, 2009)

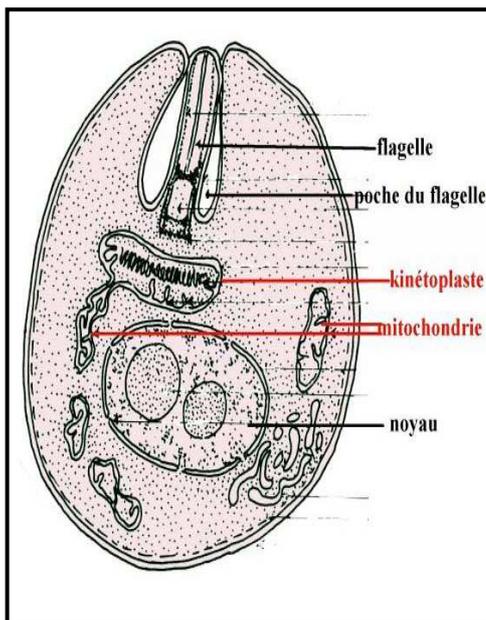
## III. BIOLOGIE DES LEISHMANIES

### 1. Formes des leishmanies

Les espèces du genre *Leishmania* sont morphologiquement identiques et se présentent sous deux formes :

#### 1.1. Forme amastigote

La forme amastigote appelée aussi « *Leishmania* » est une cellule eucaryote ovoïde, mesure de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , immobile, intracytoplasmique (figures 5 et 6). A l'intérieur du cytoplasme parasite apparaissent deux masses chromatinienne l'une sphérique correspond au noyau, l'autre en forme de bâtonnet correspond au kinétoplaste (Dantas-Torres, 2006).



**Figure**

**5:**

Représentation schématique

**Figure 6:** Amastigote des leishmanies

de la forme amastigote de leishmanie.

représenté dans des macrophages.

([www.sante.univnantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure1.jpg](http://www.sante.univnantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure1.jpg)

; Hide, 2004)

#### 1.2. Forme promastigote

# DEDICACES

---

La forme promastigote appelé aussi « *Leptomonas* » (figure 7) se trouve dans le tube digestif de l'hôte invertébré, le phlébotome, et dans la phase liquide des cultures *in vitro*. Il s'agit du stade mobile du parasite; de corps allongé, fusiforme mesurant de 20 à 30  $\mu\text{m}$  de longueur ; il est pourvu d'un kinétoplaste situé à l'extrémité antérieure du parasite, d'un flagelle permettant la mobilité et d'un noyau centrale (Daeninckk et al., 1998 ; Dantas-Torres, 2006).



**Figure 7:**  
leishmanies en  
([www.sante.univ-](http://www.sante.univ-)

Promastigotes de  
culture.

[nantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure2.jpg](http://nantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure2.jpg))

### 1.3. Passage d'une forme à l'autre

La morphologie de ces parasites, notamment leur métabolisme sont très sensibles aux paramètres environnementaux et à leurs variations. La température, le pH, l'osmolarité du milieu, la pression en  $\text{O}_2$  et en  $\text{CO}_2$  ont été décrits comme influençant la forme parasitaire et les métabolismes du glucose et de certains acides aminés.

Deux paramètres subissant de grandes variations au cours du cycle, à savoir le pH et la température et pourraient commander la mise en route de programme de différenciation (Antoine et al., 1999). Lorsque les parasites passent des insectes vecteurs à leurs hôtes mammaliens, elles subissent tout d'abord une augmentation de température d'environ  $10^\circ\text{C}$  puis, après internalisation par les macrophages, une chute du pH externe d'environ 2 unités (Antoine et al., 1999).

## 2. Génome des leishmanies

# DEDICACES

---

Les leishmanies renferment deux génomes l'un nucléaire et l'autre kinétoplastique.

## 2.1. L'ADN nucléaire

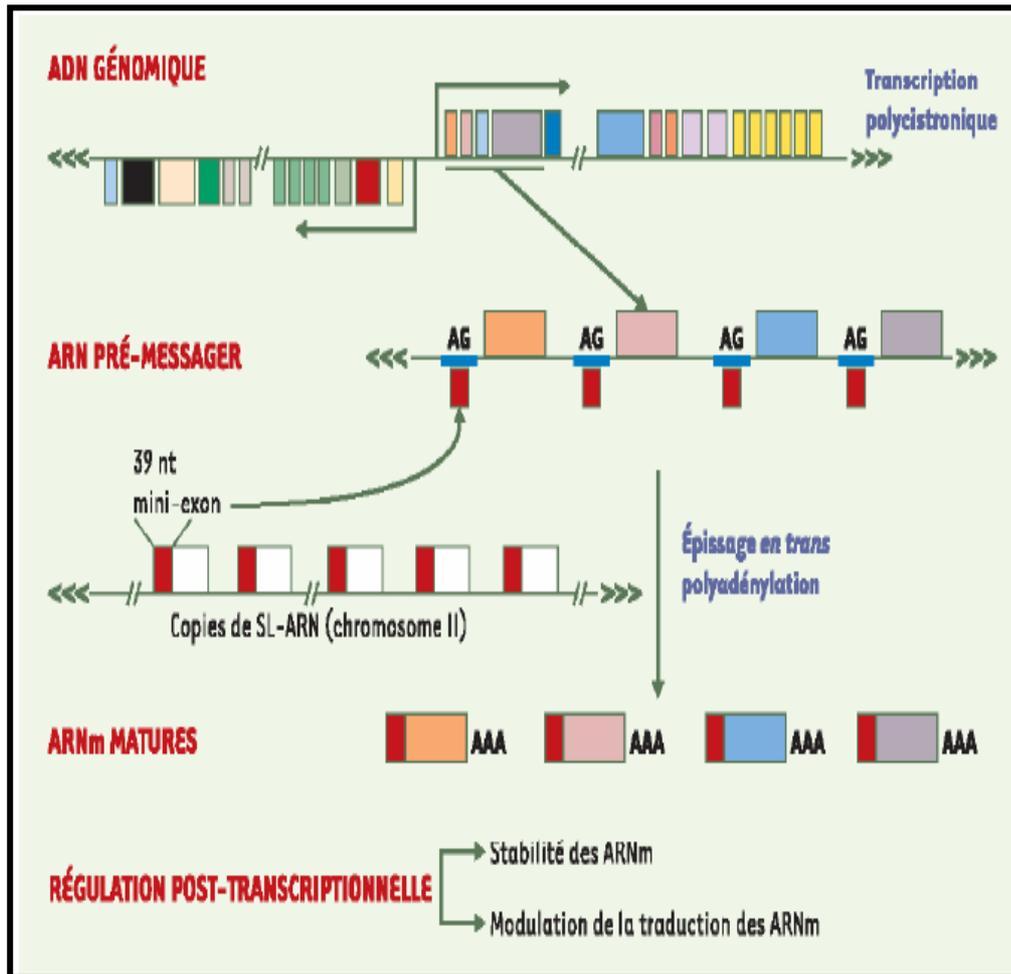
La non condensation de la chromatine du génome de *Leishmania* a rendu son étude difficile mais grâce au projet de séquençage de *Leishmania major* (MHOM/IL/81/Friedlin), nous connaissons actuellement le génome dans sa quasi-totalité (94 %). La taille du génome est d'environ 35 Mégabases (Mb) et il a été découpé en 34 à 36 chromosomes (Britto et al., 1988 ; Wincker et al., 1996) de taille variant entre 0,3 et 2,8 Mb.

L'ADN des leishmanies est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques (Myler et al., 2000). Le génome de *Leishmania* est très riche en G/C puisqu'il est de 60% en moyenne (Alvarez et al., 1994). Il contient assez peu de séquences répétées (Ouellette et al., 2003).

L'état de ploïdie des *Leishmania* s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie. En effet, des doubles knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique (Souza et al., 1994). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fusion, translocation) (Dujardin, 2000), ou des amplifications achromosomiques (Stiles et al., 1999) ont été mis en évidence.

La régulation de l'expression des gènes se fait principalement au niveau post-transcriptionnel via deux mécanismes : l'épissage (ajout d'une coiffe mini exon de 39 nucléotides en 5') et la polyadénylation en 3' (Ullu et al., 1991 ; Clayton et al., 2002) (Figure 8). Par ce processus, les unités polycistroniques deviennent monocistroniques et chaque ARNm se retrouve entouré de splice-leader en 5' et d'une queue poly A en 3'. D'autres facteurs tels que la stabilité des messagers et la régulation de la traduction viennent moduler l'expression génique.

# DEDICACES



**Figure 8:**  
Organisation gén

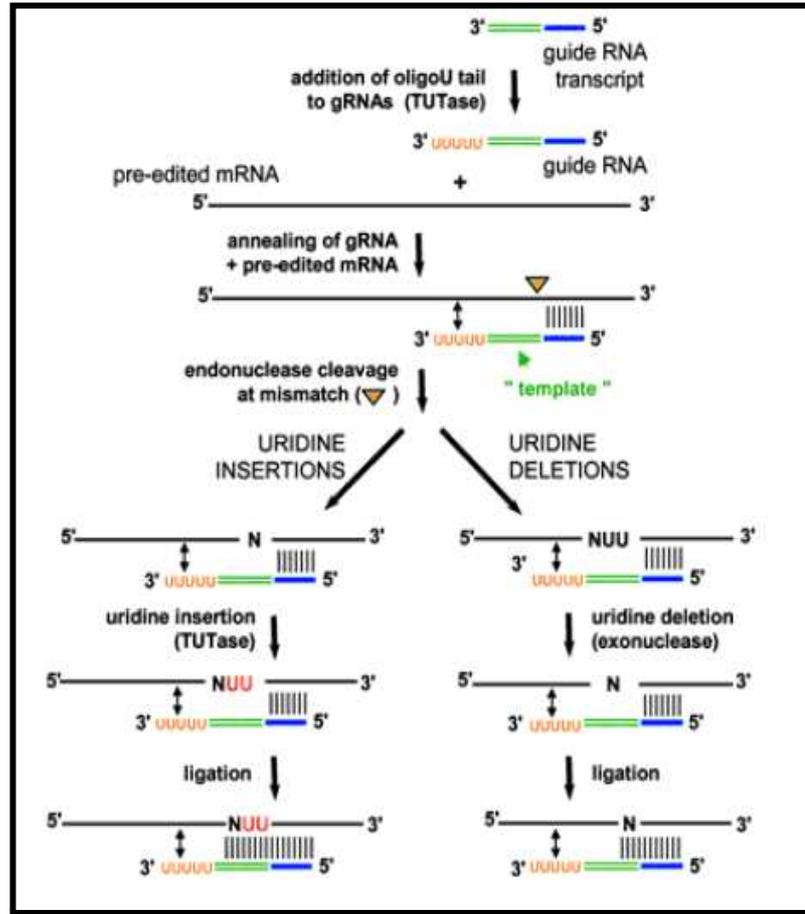
ique et maturation des ARNm.

(Ouellette et al., 2003)

## 2.2. L'ADN kinétoplastique

Outre l'ADN nucléaire, les kinétoplastidés se caractérisent par leur ADN kinétoplastique. Ce dernier renferme deux types d'ADN : les minicercles impliqués dans les phénomènes «d'editing» (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN (Kabb et al., 2001 ; Gott, 2003) et les maxicercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomique. Ce mécanisme «d'editing», permet d'exprimer les transcrits des maxicercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités (figure 9). La formule «insertion» d'uridine semble être majoritaire, à tel point, que la taille du transcrit final peut quasiment avoir doublée (Lodish et al., 2000).

# DEDICACES



**Figure 9** : Schématisation du mécanisme d'editing chez les kinétoplastidés (Gott, 2003).

Les ARN guides (en bleu et vert) viennent s'ajouter aux ARNm pré-édités puis le couple subit une insertion (voie de gauche) ou une délétion (voie de droite) d'uridines.

### 3. Reproduction des leishmanies

Même si le mode de reproduction des *Leishmania* est encore débattu, il semble que ce parasite se reproduit de façon majoritairement clonale comme les autres trypanosomatidés (Sambrook et al., 1989 ; Tibayrenc, 1990 ; Banuls et al., 1998 ; Schonian et al., 2003, Banuls et al., 2002). En dépit de ce mode de reproduction, ces organismes présentent la capacité de faire la recombinaison sexuée puisque des hybrides ont été mis en évidence dans les populations naturelles (Evans et al., 1987 ; Dujardin et al., 1995 ; Banuls et al., 1998). Les mécanismes moléculaires mis en jeu restent indéterminés car même si des fusions cellulaires ont été observées aux microscopes

## DEDICACES

---

(Walters et al., 1993 ; Kreutzer et al., 1991), ces événements n'ont pas pu être reproduits *in vitro* (Gibson et al., 1995). La fréquence des événements de recombinaison sexuée étant estimée inférieure à  $4 \times 10^{-4}$  (Panton, 1991 ; Victoir et al., 2003), ils ont donc un impact faible sur la structure génétique globale. Théoriquement, ce modèle clonal implique une structure en lignées clonales individualisées avec de forts déséquilibres de liaison au sein de chacun des lignées ainsi qu'une corrélation entre les caractères indépendants, notamment entre les caractères phénotypiques (virulence, pathogénicité, comportement biologique, etc...) et les caractères génétiques.

### **4. Constituants antigéniques majeurs des leishmanies**

La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes (Spath et al., 2003.; Euzéby, 2008):

-Du lipophosphoglycane (LPG) ;

-Des glycolipides et glyco-inositolphospholipides;

-Des enzymes:

\* Glycoprotéines : gp63, gp42, gp43 (laminine de surface), gp46 ;

Cystéines protéinases ;

\* Une protéine de la famille tryptophane-acide aspartique, le LACK.

Il semble que ces composants soient des molécules-clés intervenant dans le métabolisme des parasites et qu'ils puissent jouer un rôle important dans leur pathogénicité, leur virulence est dans les interactions hôte-parasite. Ils représentent donc des cibles moléculaires intéressantes en immunothérapie et en chimiothérapie.

Le cytoplasme contient une kinase jouant un rôle dans la survie des leishmanies dans les cellules parasitées.

# DEDICACES

---

## 5. Interactions hôtes- leishmanies

L'interaction hôte leishmanie est fonction d'un tropisme spécifique probablement lié aux molécules de surface du parasite comme le lipophosphoglycane (LPG), un glycolipide largement représenté à la surface du parasite et dont les récepteurs sont des lectines de la cellule hôte

Le LPG est spécifique de chaque espèce; en effet la séquence des sucres substitués sur l'ossature du LPG est très différente selon les espèces de *Leishmania*; par exemple, *L. major* contient du poly- $\beta$ -galactose tandis qu'il n'y a pas de sucres substitués chez *L. donovani* (Turco et al., 1992). Ces molécules pourraient être à l'origine des variations observées dans la réponse de l'hôte vis à vis des différentes espèces. En effet la galectine-3, une lectine sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques activées par des molécules pro-inflammatoires, se lie spécifiquement aux épitopes polygalactose du LPG de *L. major* (Matte et al., 2002). Cette interaction spécifique pourrait s'avérer déterminante dans la réponse inflammatoire massive locale provoquée par *L. major* car la galectine-3, qui forme une couche à la surface du macrophage pourrait être détruite par la protéase GP63 exprimée à la surface du parasite. Le clivage de la galectine-3 par *L. major* provoquerait une augmentation de la sensibilité des macrophages à des stimuli immunologiques, ce qui pourrait expliquer la réponse locale inflammatoire induite par *L. major*.

Les amastigotes de *L. donovani* semblent également interagir avec des lectines mais leur surface étant dépourvue de GP63, l'interaction avec *L. donovani* fait intervenir plusieurs types de récepteurs dont la lectine MR (mannose receptor), l'intégrine CR3 et le récepteur des immunoglobulines FC $\gamma$ R. L'interaction du parasite avec la lectine MR (mannose receptor), l'intégrine CR3 et le récepteur des immunoglobulines FC $\gamma$ R à la surface de la cellule hôte active la phosphotyrosine phosphatase SHP-1 ce qui a pour effet d'inhiber l'activité des kinases JAK2 et Erk1/2. Plusieurs fonctions du macrophage (par exemple la voie de production de monoxyde d'azote [NO]) normalement induites par l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sont alors inhibées. De plus,

## DEDICACES

---

l'activation de la voie SHP-1 altère directement l'activité de plusieurs facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, IRF-1, AP-1). Enfin, un mécanisme SHP-1-indépendant, passant par la voie PKC, pourrait provoquer la dégradation du facteur de transcription STAT1. iNOS: inducible nitric oxide synthase; IL-12: interleukine-12.

En conclusion *L. major* induit un recrutement cellulaire massif de leucocytes et la sécrétion marquée de cytokines pro-inflammatoires, tandis que *L. donovani* ne provoque qu'une très légère réponse inflammatoire au site primaire d'infection. Cette réponse inflammatoire très forte pourrait expliquer le maintien du parasite et le développement de lésions cutanées aux sites d'inoculation spécifiques de *L. major*.

Il a été démontré que l'un des gènes phare amastigote spécifique chez *L. donovani* responsable de la LV est le gène A2 (Charest et al., 1996). Ce gène est tronqué chez *L. major* agent de LC cependant des souches de *L. major* recombinants exprimant le gène A2 de *L. donovani* développe un pouvoir de viscéralisation augmenté (Ouellette et al., 2003).

## IV. POUVOIR PATHOGENE DES LEISHMANIES

La leishmaniose comme infection chez l'homme est caractérisée par son extrême diversité clinique; en effet, On peut schématiquement distinguer trois grandes variétés (Khiati, 1992).

### 1. Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) est caractérisée par une hyperplasie histio-monocytaire atteignant la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le foie et parfois la muqueuse du grêle. Sa période d'incubation est silencieuse et dure de 1 à 2 mois, parfois d'avantage.

La LV appelé Kala-Azar qui veut dire «fièvre noir» débute d'abord par une fièvre résistante aux antibiotiques d'allure typhoïdique (fièvre en plateau) et dont la défervescence se fait mal puis devient de plus en plus irrégulière anarchique, une anémie avec pâleur extrême. La splénomégalie, l'hépatomégalie, et l'hypertrophie des ganglions sont plus nettes chez

## DEDICACES

---

l'enfant. L'amaigrissement des membres et du thorax contraste avec l'augmentation de volume de l'abdomen. Parfois une perte d'appétit, une asthénie et des troubles digestifs sont rapportés. L'évolution de la maladie, en absence de traitement, est fatale dans un tableau de cachexie et de complications infectieuses ou digestives.

La leishmaniose viscérale atteint de préférence les enfants (figure 10). Chez l'adulte, elle survient sur un terrain immunodéprimé (transplantés, SIDA, lymphome...). Des co-infections leishmaniose viscérale/SIDA sont signalées dans plusieurs pays avec une prévalence de 1 à 3%. Les espèces de leishmanies responsables sont *Leishmania infantum* et *Leishmania chagasi* dont le réservoir est constitué par le chien et les canidés sauvages, et *Leishmania donovani* dont le réservoir est l'homme (Dedet, 2009).



-a-



-b-

**Figure 10** : -a- et -b-: Aspect clinique des patients atteints de la leishmaniose viscérale.

([www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp](http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp))

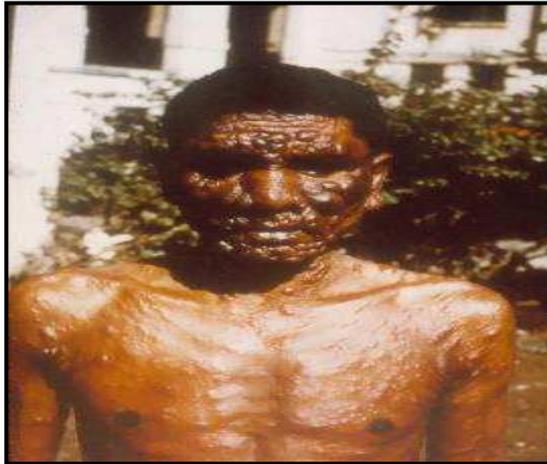
La leishmaniose viscérale peut être endémique dans certains pays comme l'Inde, épidémique ou sporadique comme au Maroc.

La LV en Inde et au centre africain s'accompagne de leishmaniose dermatique post-kala-azar (LDPKA) (figure 11) qui débute une à plusieurs

## DEDICACES

---

années après la guérison apparente d'une leishmaniose viscérale. Les lésions sont des macules hypo-pigmentées ou érythémateuses siégeant en n'importe quel point du corps peuvent ultérieurement se transformer en nodules, spécialement à la face. Le type Hindou est du à *L donovani*.



**Figure 11:**  
cutanée post Kala

Leishmaniose  
azar.

### 2. Leishmaniose cutanée

La LC se caractérise par la non-uniformité de l'infection prenant un aspect différent d'une région à l'autre ou même d'une zone à l'autre à l'intérieur d'une même région (Belazzoug, 1985 ; Khiati, 1992).

Les expressions cliniques vont d'un simple bouton guérissant spontanément aux formes graves cutanéomuqueuse récidivantes ou diffuses.

On individualise quatre formes cutanées :

#### 2.1. Forme sèche ou urbaine

Appelé aussi « leishmaniose cutanée anthroponotique » (LCA), elle est due à *L.tropica* sa période d'incubation dure habituellement de 2 à 8 mois.

Siège sur les zones découvertes, donne le classique « bouton d'orient ». Cette lésion est généralement unique (mais parfois existent de très nombreux boutons simultanés) et siège au point d'inoculation. Les parties atteintes sont les zones découvertes du corps, accessibles aux phlébotomes : la face, les mains, les avant-bras et les pieds (figures 12 et 13). L'infection débute par une papule inflammatoire évoluant en nodule avec infiltration en

## DEDICACES

profondeur. Le nodule s'entoure d'une auréole rouge mais demeure parfaitement indolore, tout au plus un peu prurigineuse.

La peau s'ulcère au centre de la papule, un liquide jaunâtre s'écoule et devient une croûte. Cette croûte s'épaissit, adhère à l'ulcération sous-jacente qu'elle recouvre entièrement tandis que la lésion s'agrandit. Elle peut alors atteindre plusieurs centimètres de diamètre.

Sous la croûte, il y'a un cratère peu profond, à bords taillés à pic, à fond suintant, papillomateux, rouge reposant sur l'induration qui en forme la



base.

**Figure 12 :** Lésions dues à *L. tropica*  
*L. tropica*

au niveau du visage.

**Figure 13 :** Lésion due à

au niveau de la main.

(Microbiologie. CHU Caen. C. Duhamel et A Dompmartin, 2009 ;  
[www.leish.ifrance.com/Utilitaires/clinique.htm](http://www.leish.ifrance.com/Utilitaires/clinique.htm))

L'évolution de la LCA est chronique et se fait vers la guérison déterminant une ulcération de la peau, laissant souvent des cicatrices indélébiles et disgracieuses.

Sur le plan épidémiologique l'homme constitue le réservoir de parasite, c'est cette forme qui est fréquemment rencontré dans le foyer méditerranée (OMS, 1997 ; Marie et al., 2006).

### 2.2. Forme humide ou rurale

Appelé aussi leishmaniose zoonotique, elle sévit dans les régions rurales semi désertiques en méditerranée orientale dans le sud de l'URSS, en Asie, et en Afrique noire. Le parasite en cause est *L. major* et dont les réservoirs habituels sont les rongeurs.

## DEDICACES

---

L'espèce responsable est *L. major*. L'infection se distingue de la forme sèche par son évolution plus rapide, sa plus grande taille, le caractère plus creusant et plus inflammatoire de l'ulcère, sa cicatrice plus importante et le plus grand nombre de lésions, sa période d'incubation est nettement plus courte (10 à 45 jours). L'ulcération de la lésion primaire s'agrandit rapidement pour atteindre de 2 à 8 cm. Parfois se forme un cratère à bords taillé à pic, à fond bourgeonnant, parfois, au contraire, la lésion prend un aspect fungiforme et se surélève (figure 14) (OMS, 1997 ; Marie et al., 2006).



**Figure 14:** Lésions dues à *L. major*.

(Parasitologie-Mycologie. CHU Montpellier. J.P. Dedet, 2009)

L'inflammation est marquée; s'accompagnant parfois de lymphangite et d'adénopathies. L'évolution se fait vers la guérison spontanée en 3 à 5 mois mais laisse persister une cicatrice importante.

### **2.3. Formes sporadiques**

Des formes cutanées de leishmaniose, dues à *L. infantum*. Il s'agit en général de lésion unique, ulcéro-croûteuse ou lupôïde, siégeant au niveau de la face et pouvant évoluer pendant au moins deux années.

### **2.4. Forme cutanée diffuse LCD**

En Afrique de l'Est, en Tanzanie, au Kenya et en Ethiopie surtout sévit la LCD due à *L. aethiopica* qui forme des nodules apparaissant sur le corps entier fourmillant évoquant une lèpre lépromateuse il s'agit d'une forme rebelle insensible au traitement évoluant vers la mort (figure 15).

## DEDICACES

---

*Leishmania mexicana pifanoi* n'est connue que dans des cas de leishmaniose cutanée diffuse observés au Venezuela.



**Figure 15 :**

cutanée diffuse.

Dans le foyer de leishmaniose cutanée de la République Dominicaine, tous les patients présentent une LCD, mais le parasite responsable n'a pas encore été identifié.

Leishmaniose

leishmaniose

### 2.5. Forme cutanéomuqueuse

Constitue un vaste ensemble d'affections qui se rencontrent dans toute l'Amérique du sud des USA (Texas) jusqu'en Argentine dans ces régions en plus des formes cutanées qui par extension vont gagner de proche en proche les muqueuses au niveau de la face et entraîner des mutilations effroyables (figure 16).



**Figure 16 :**

mucocutanée.

Leishmaniose

([www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp](http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp))

Au niveau du pavillon de l'oreille l'ulcère peut entraîner des destructions importantes par contiguïté.

Des ulcérations cutanées atteignant au niveau de la face la plaie peut envahir tout le tractus respiratoire supérieur s'accompagnant de surinfection entravant la respiration et l'alimentation.

## DEDICACES

---

Les espèces en cause sont :

❖ *L. braziliensis braziliensis* : quand les lésions primaires ne sont pas traitées, la maladie évolue dans 80% des cas vers une leishmaniose cutanée ou muqueuse.

❖ *L. braziliensis guyanensis* : est à l'origine du « Pian-bois », qui se matérialise fréquemment par une lésion sèche humide et indolore, souvent de nature tumorale et ayant tendance à persister. Des métastases au niveau des voies lymphatiques et des ulcères sur toute la surface du corps ne sont pas rares.

❖ *L. braziliensis panamensis* : détermine des lésions généralement ulcératives qui ne guérissent pas spontanément ; la teinte lymphatique est fréquente, l'adénopathie caractérise habituellement la maladie.

❖ *L. mexicana mexicana* : la localisation fréquente est l'oreille évoluant parfois vers la chronicité et il n'est pas rare qu'une partie de l'oreille soit détruite.

❖ *L. mexicana amazonensis* : détermine des lésions cutanées uniques ou multiples dont la guérison spontanée est rare. Si l'infection est commune chez les rongeurs sylvestres, il n'est pas fréquent que l'homme soit atteint. Chez 30% environ des patients présentant des lésions attribuées à ce parasite, on observe une leishmaniose cutanée diffuse.

❖ *L. peruviana* : Un petit nombre de cas de leishmaniose cutanéomuqueuse ont été rapportés dans l'Ancien Monde, la plupart concernant des hommes adultes du Soudan.

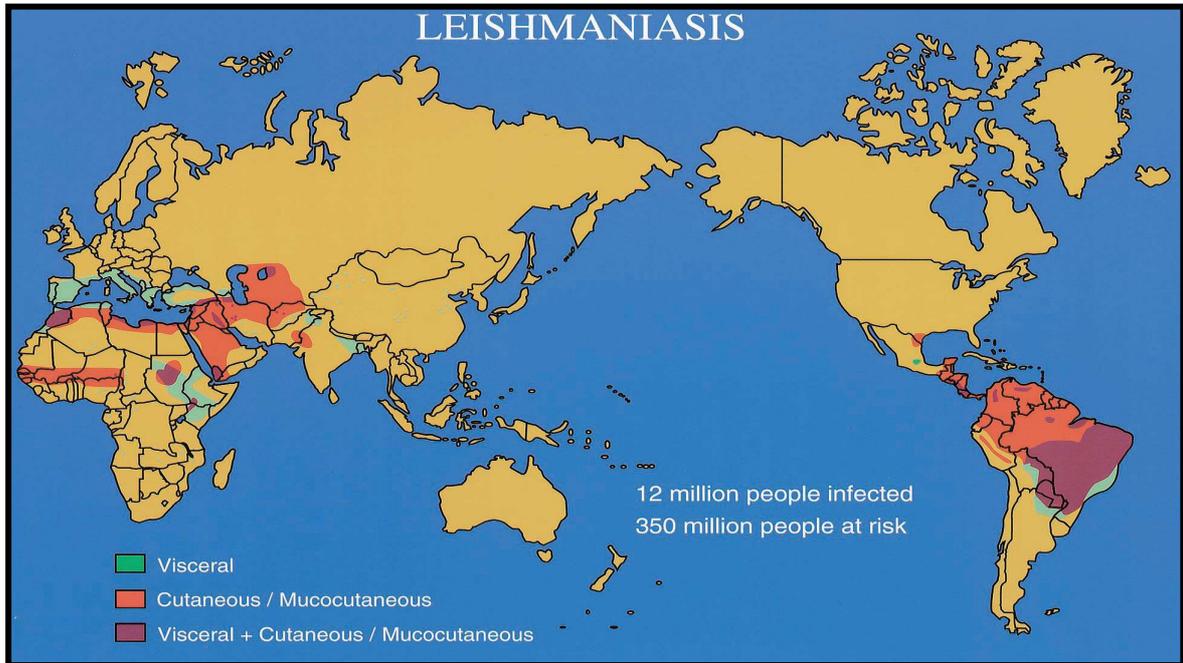
## V. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA LEISHMANIOSE

### 4. Répartition mondiale

Les leishmanioses, toutes formes cliniques confondues, affectent quatre continents (Asie, Amérique, Europe, et Afrique), dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays, dont 72 pays en voie de développement. Les zones d'endémie sont l'Europe du sud, ainsi que de nombreux pays d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique de sud (figure 17).

## DEDICACES

On distingue deux grandes situations géographiques : l'Ancien Monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amériques du Nord du Sud et Centrale).



**Figure 17 :** Régions endémiques des cas de leishmaniose cutanée, mucocutanée et viscérale. (Handman. E., 2001).

Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* d'une part, et elles sont propagées par différents genres et espèces de phlébotomes selon la région d'autre part. Les pays les plus durement touchés par la leishmaniose viscérale sont le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan : on y retrouve 90% des nouveaux cas annuels quant à la leishmaniose cutanée, 90% des nouveaux cas se situent en Afghanistan, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie (OMS, 2000).

Concernant la Leishmaniose viscérale, l'aire de distribution de *Leishmania donovani* agent des leishmanioses viscérales s'étend de l'Afrique de l'Est au Sud-Est Asiatique. En Inde, les premières épidémies de leishmanioses viscérales (kala-azar) et la persistance de foyers endémiques ont été et sont couplées à la présence des populations péri-domestiques et anthropophiles de l'insecte hôte et vecteur, *Phlebotomus argentipes*, l'un des rares vecteurs

## DEDICACES

---

dont la bio-écologie est relativement bien appréhendée (Christophers et al., 1925; Christophers et al., 1926 ; Shortt et al., 1932 et Keilin et al., 1937).

Les aires de distribution de *Leishmania infantum* s'étendent respectivement de la Chine nord orientale à la Méditerranée occidentale et du Mexique au nord de l'Argentine. Au sud de la France, la présence de *L. infantum* et de ses vecteurs (*Phlebotomus ariasi* et *P. perniciosus*) est révélée principalement par des cas de leishmaniose canine, de leishmaniose cutanée et de plus rares cas de leishmanioses viscérales humaines (Rioux et al., 1980 ; Killick-Kendrick et al., 1984).

En ce qui concerne les leishmanies responsables des leishmanioses cutanées, il est encore commun de les distinguer en se référant au Nouveau Monde et à l'Ancien Monde. Deux sous-genres, le sous-genre *Viannia* et le sous-genre *Leishmania* circulent sur le continent américain (Amérique Centrale et du Sud). A l'exception de *L. tropica*, les parasites du sous-genre *Leishmania* circulent essentiellement au sein de systèmes zoonotiques forestiers dominés donc par des mammifères sauvages (ordres des Didelphimorphes, Xenarthres, Rodentiens et Primates simiens). Les parasites du sous-genre *Viannia* circulent aussi essentiellement au sein de systèmes zoonotiques dominés par des mammifères sauvages, voire domestiques.

De nombreux projets agricoles ou de prospections minières, d'exploitations forestières, d'activités militaires et la pression démographique contribuent à rendre compte du caractère épidémique des leishmanioses pour des populations humaines. Ces différents facteurs de risque liés au comportement, à l'environnement ou au développement, permettent d'expliquer en partie, la répartition des foyers leishmaniens (Desjeux, 1999).

### **5. Répartition nationale de la leishmaniose**

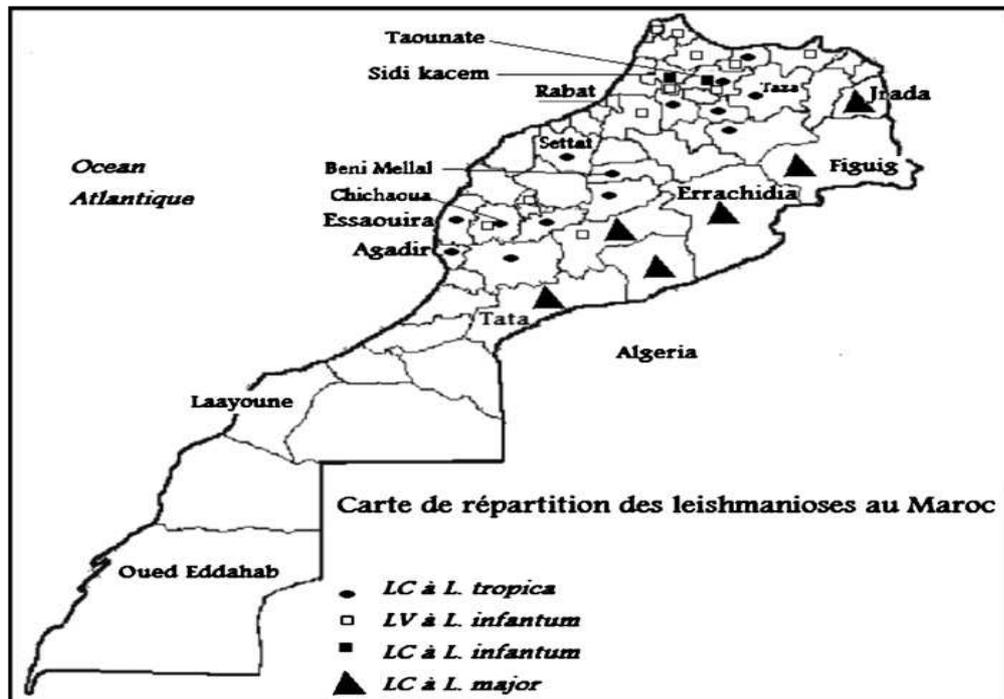
Au Maroc, comme dans la plupart des pays circumméditerranéens, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. Qu'elles soient zoonotiques ou anthroponotiques, cutanées ou viscérales, ces affections y sont largement représentées, depuis les montagnes du Rif jusqu'aux palmeraies perarides des piémonts de l'Anti-Atlas. Les études

# DEDICACES

écobiologiques ont révélé la présence simultanée de deux formes nosologiques et cliniques de leishmaniose dans le royaume, à savoir :

❖ la leishmaniose viscérale (LV) répartie principalement au Nord du Maroc (figure 18) ;

❖ la leishmaniose cutanée (LC) observée dans le centre du pays, le Sud et le Sud-Est de la chaîne de l'Atlas (figure 18) (Rhajaoui, 2009).



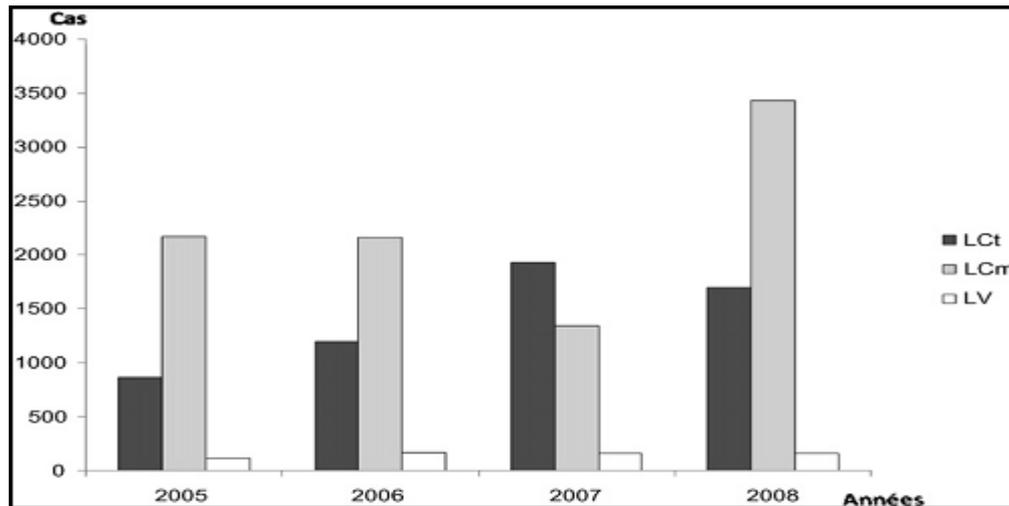
**Figure 18** : Carte de répartition de la leishmaniose au Maroc.

(Rhajaoui, 2009)

## 2.1. Leishmaniose viscérale

La LV au Maroc est connue depuis plusieurs décennies. Le premier cas du kala-azar infantile a été décrit à Tanger en 1921 (Remlinger, 1921). Alors qu'une LV chez l'adulte a été rapportée chez une infirmière à Meknès en 1922 (Klippel et al., 1922). Cette maladie est surtout localisée dans le Nord du pays, mais des cas sporadiques ont été observés dans d'autres régions, notamment au Sud (Dereure et al., 1986). La morbidité de la LV fluctue en moyenne autour de 152 cas par an (figure 19).

# DEDICACES



**Figure 19** : Evolution des cas de leishmaniose viscérale (LV), leishmaniose cutanée à *L. tropica* (LCT) et celle à *L. major* (LCM). (Rhajaoui, 2009)

Le parasite responsable est *Leishmania infantum*, dont le zymodème MON 1 est le plus commun sur le pourtour méditerranéen (Rioux et al., 1982).

Deux espèces du phlébotome sont incriminées dans la transmission de cette forme au Maroc, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perniciosus* et *P. longicuspis* (Dereure et al., 1986 ; Rioux et al., 1986 ; El Miri, 2009).

## 2.2. Leishmanioses cutanées

Les LC humaines ont été subdivisées en deux entités éco-épidémiologiques différentes:

- ❖ LC due à *L. major* dite aussi la forme humide ou rurale ;
- ❖ LC due à *L. tropica* dite aussi la forme sèche ou urbaine.

### 2.2.1. LC à *Leishmania major*

La LC humaine à *L. major* était connue au Maroc au début du XX<sup>ème</sup> siècle par quelques cas sporadiques (Guessouss et al., 1996; Foley, 1914). Après, cette maladie évoluait sous forme d'épidémies alternées dans le temps par des périodes d'accalmie, dans lesquelles les zones soumises à une puissante pression parasitaire sont vraisemblablement à l'abri des nouvelles vagues épidémiques. Le nombre de cas peut atteindre plus de 2000 cas par an (figure 19).

## DEDICACES

---

La maladie s'observe en zone aride dans les palmeraies des piémonts méridionaux de l'Anti- et le Haut-Atlas.

Le cycle épidémiologique de cette forme, s'appuie sur la présence dans ses sites de répartition, d'un rongeur commensal, *Meriones shawi grandis*. Cette gerbille, inféodée au complexe douar palmeraie, joue le rôle de réservoir du parasite (Rioux et al., 1986).

La transmission du parasite depuis le réservoir à l'homme se fait par le biais du *Phlebotomus papatasi* abondant dans les douars contaminés (Adler et al., 1941 ; Rioux et al., 1986).

Toutes les souches isolées du réservoir, de l'homme et du vecteur sont identiques et se sont identifiées biochimiquement, comme étant *L. major* MON 25 (Rioux et al., 1986).

Les mêmes résultats ont été retrouvés sur des frottis cutanés, en 2007, dans les provinces d'Ouarzazate et d'Er-Rachidia (figure 18) (Rhajaoui et al., 2007).

### 2.2.2. LC à *Leishmania tropica*

Le premier cas de LC due à *L. tropica* a été identifié en France en 1987 chez un enfant marocain ayant séjourné à Tanant dans la province d'Azilal (Marty et al., 1989). Depuis lors, les atteintes leishmaniennes dues à *L. tropica* ne cessent pas d'apparaître. Un grand foyer, s'étendant sur une superficie d'environ 400 km<sup>2</sup> allant d'Azilal au centre jusqu'à Essaouira à l'Ouest et Agadir-Guelmim au Sud, a été identifié comme lieu où sévit la LC à *L. tropica* dans notre pays.

### 2.2.3. LC à *Leishmania infantum*

Cette forme a été signalée pour la première fois en France (Rioux et al., 1980). Depuis, elle a été trouvée dans la plupart des foyers à LV canine et humaine du pourtour méditerranéen. Le premier cas marocain a été dépisté, dans le Rif central à Taounate.

Des investigations moléculaires, réalisées en 2007, montrent l'existence de formes cutanées causées par *L. infantum*. La majorité de ces cas ont été enregistrés au niveau de la province de Sidi Kacem (Rhajaoui et al., 2007). Il s'agit de formes sporadiques montrant des lésions uniques, ulcéro-

## DEDICACES

---

crouteuses ou lipoïdes, évoluant pendant au moins deux ans (Rioux et al., 1996).

### 6. Répartition régionale des leishmanioses

La situation épidémiologique de la leishmaniose en 2008 peut être résumée dans le tableau suivant :

**Tableau 1** : Situation épidémiologique de la LC et LV dans la Région de Fès (Année 2008).

Régions/prov.pref.	Leishmaniose cutanée	Leishmaniose viscérale
Fès	9	9
Moulay yacoub	11	10
Séfrou	69	9
Boulemane	49	0
Total	138	28

**Source** : (Direction d'épidémiologie et lutte contre les maladies-RABAT).

Le nombre des cas de la leishmaniose cutanée le plus élevée en 2008 a été enregistré à la province de Séfrou (69 cas) suivi de la province de Boulemane (49 cas).

Concernant la leishmaniose viscérale le nombre des cas le plus élevé est enregistré à la province de Moulay yakoub (10 cas) suivi successivement de la préfecture de Fès et la province de Séfrou avec 9 cas dans chacune (El Miri, 2009).

## VI. DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES

Le diagnostic de la leishmaniose est orienté par le tableau clinique selon la forme de leishmaniose ; des techniques sérologique, immunologique viennent compléter le diagnostic de certitude qui lui est parasitologique et repose essentiellement sur l'examen parasitologique effectué directement sur frottis et après culture. Récemment les techniques de biologie moléculaire se développent et le diagnostic moléculaire est possible (Lefichoux et al., 1999).

# DEDICACES

---

## 1. Cas de leishmaniose viscérale

Le diagnostic se déroule en trois étapes :

### 1.1. Etape séro-hématologique

Des signes humoraux et hématologiques peuvent indiquer une éventuelle leishmaniose ils associent une vitesse de sédimentation (VS) accélérée, une augmentation de gammaglobuline, un rapport inversé d'albumine/globuline, une anémie modérée à  $150\ 000\ \text{GR}/\text{mm}^3$ , une leucopénie marquée avec moins de 4 000 neutrophiles et une thrombocytopénie de 100 000 à 150 000 plaquettes par  $\text{mm}^3$ .

### 1.2. Etape immunologique

Plusieurs techniques immunologiques sont utilisées pour détecter les anticorps anti-leishmanies (Ashford et al., 1993.; Harith et al., 1989.; Schneider et al., 1993).

#### 1.2.1. Agglutination directe (DAT)

Cette technique est validée comme un test sensible et spécifique pour les investigations de terrain (Boelaert et al., 1999 ; Ozbel et al., 2000).

Le principe consiste à former un précipité visible à l'œil nu dans des puits de plaques de micro-titrage contenant différentes dilutions du sérum du malade et l'antigène qui provient des cultures des promastigotes *in vitro*.

#### 1.2.2. Immuno-Fluorescence Indirecte (IFI)

Ce test permet de visualiser les antigènes promastigotes de culture à l'aide d'un anti anticorps fluorescent, il permet de confirmer la suspicion clinique et hématologique à plus de 95% des cas des cas de LV. L'épreuve est spécifique de genre, bien que des réactions croisées significatives aient été signalées chez des individus infectés avec *Trypanosoma cruzi* (maladie de chagas).

#### 1.2.3. ELISA : l'Enzyme-Linked Immunosorbent assay

## DEDICACES

---

La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps anti-immunoglobuline.

L'ELISA des leishmanies utilise un antigène promastigote soluble dans un détergent (Triton X-100) et protégé par des inhibiteurs de la protéase (Mancianti et al., 1995).

Plus récemment, un antigène recombinant à partir d'une protéine clonée de *L. chagasi*, appelé rK39, a été signalé comme étant hautement réactif avec des sérums de cas de leishmaniose viscérale humaine et canine. L'antigène rK39 est maintenant produit commercialement sous forme d'un test sur bandelette (figure 20). Ce test montre en cas de positivité, une bande visible à l'œil nu en 10 minutes (Dmbele, 1992 ; Bourée et al., 2008).



**Figure 20** : Test de leishmaniose viscérale. (Bourée et al., 2008)

### 1.3. Etape parasitologique

L'examen apporte la certitude aux diagnostics. C'est un examen microscopique qui se pratique immédiatement après le prélèvement ou tardivement après culture (Molyneux et al., 1983).

L'examen direct consiste à chercher les amastigotes dans les macrophages sur frottis du prélèvement obtenu par ponction médullaire au niveau sternale chez l'adulte et au niveau des apophyses épineuses de la Crête iliaque ou des plateaux tibiaux chez l'enfant et coloré au May-Grunwald-Giemsa.

L'examen après culture in vitro permet de rechercher les promastigotes dans des milieux de cultures spéciales après un délai d'incubation de une à 4 semaines

# DEDICACES

---

Pour l'examen après culture *in vivo*, le Hamster (*Mesocricetus auratus*) est l'animal le plus communément utilisé (Rioux et al., 1986). L'animal développe des signes de leishmaniose.

## **2. Cas de la leishmaniose cutanée**

### **2.1. Diagnostic histologique**

Il permet la mise en évidence du parasite dans un frottis confectionné à partir d'un prélèvement et coloré par le May-Grunwald-Giemsa.

Le prélèvement est réalisé à la périphérie de la lésion cutanée dans ses parties infiltrées, en évitant les zones ulcérées ou surinfectées par les bactéries (Gentilini et al., 1986 ; Degos, 1976).

### **2.2. Culture des leishmanies**

Une partie du prélèvement cutané peut être ensemencé en culture sur milieu gélosé (milieu NNN-sang) ou divers milieux liquides supplémentés.

Le milieu NNN est un milieu biphasique constitué par la gélose au sang frais de lapin décomplémenté ou non. Elle n'est réalisée que dans les laboratoires spécialisés disposant d'un élevage de lapins (Evans et al., 1987).

La culture est lente et nécessite des repiquages hebdomadaires. Une culture est dite négative après un mois et demi de repiquage négatif.

La culture des leishmanies est nécessaire pour le typage enzymatique des souches. Elle joue aussi un rôle important pour la confirmation du diagnostic parasitologique (Berrebi, 1936 ; Chouihi et al., 2009).

### **2.3. Diagnostic moléculaire de la leishmaniose**

Le diagnostic moléculaire de la leishmaniose par la PCR (Polymérase chain réaction) à fait l'objet de plusieurs études et apparaît plus sensible que les autres méthodes de diagnostic classique (Meredith et al., 1993; Osman et al., 1997; Belli et al., 1998., Aviles et al ., 1999.; de Oliveira et al 2003., Marfurt et al 2003.; Schonian et al., 2003.; Bensoussan et al., 2006)

## DEDICACES

---

La réaction PCR permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donnée afin d'en obtenir une quantité suffisante pour l'étude.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (Boer et al., 2006).

La phase d'amplification par PCR la plus commune est celle de la région ITS1 partie transcrite ribosomale interne de *Leishmania*. Cette région est polymorphe chez les différentes espèces de *Leishmania*, la digestion de son amplicon ITS1 avec les enzymes comme HaeIII, HhaI, ou RsaI permettent de distinguer entre la majorité des espèces (Schonian et al., 2003 ; Aljawabreh et al., 2004 ; Musso et al., 1996).

Il existe aussi l'amplification par PCR de l'ADN du kinétoplaste. L'ADN-K contient presque 10 000 mini cercles par cellules avec presque 800 paires de base dont 200 identiques et 600 différents. Ce nombre élevé de copies donne une sensibilité très élevée pour le diagnostic de ce genre mais l'hétérogénéité des régions diminue de la spécificité de la PCR (Cortes et al., 2004 ; Noyes et al., 1998).

D'autres types d'amplification sont aussi utilisées, on a l'allèle spécifique pour l'identification des leishmanies de l'ancien monde et la technique Real-time Taq Man PCR qui est utilisée pour déterminer la quantité des *Leishmanias* dans les échantillons biologiques (Bell et al., 2002, Bretagne et al., 2001).

### **2.3.1. Extraction d'ADN des leishmanies**

#### ❖ Extraction d'ADN par phénol-chloroforme

L'extraction d'ADN se fait par phénol- chloroforme qui est une méthode de purification minutieuse qui inclut beaucoup d'étape de lyse, de digestion, d'extraction et de lavage. (Bensoussan et al., 2006 ; Schonian et al., 2003 ; Meredith et al., 1993 ; Osman et al., 1997).

#### ❖ Extraction d'ADN à partir de culture cellulaire par le kit Roche

## DEDICACES

---

Le principe de cette technique consiste à une homogénéisation de l'échantillon avec un tampon de lyse cellulaire en présence d'un fort détergent anionique et de la protéinase K. L'élimination de l'ARN se fait à l'aide de l'ARNase. La suppression des protéines est réalisée par précipitation sélective et centrifugation. L'ADN purifiée est finalement récupérée de la solution par précipitation de l'isopropanole.

Cette technique d'extraction d'ADN est caractérisée par sa simplicité, sa rapidité et elle permet aussi d'avoir une ADN hautement purifiée qui peut être utilisée dans les standards PCR, séquençage... (Miller et al., 1988 ; Lahiri et al., 1993 ; Steinhoff et al., 1994 ; Barnes et al., 1994).

### 2.3.2. Amorces utilisées

Il y'a plusieurs amorces utilisées pour la PCR des leishmanies telles que : La première paire d'amorces (R221/R332) a été décrite par G.J.J.M. Van Eys et al. en 1992 et L. Lachaud et al. en 2000. Ce couple d'amorces amplifie un fragment d'ADN de 603 pb, leurs séquences sont les suivantes :

\_ R221 : 5'- GGCCGGTAAAGGCCGAATAG -3' ;

\_ R332 : 5'- GGTTTCCTTTCCTGATTTACG -3'.

La seconde paire d'amorces (Lei 70L/Lei 70R) a été décrite par Spanakos et al en 2002. Ce couple d'amorces amplifie un fragment d'ADN de 345 pb. Leurs séquences sont les suivantes :

\_ Lei 70L : 5'- CGCAACCTCGGTTCGGTGTG -3' ;

\_ Lei 70R : 5'- CGCGGTGCTGGACACAGGGTA -3'.

La troisième paire d'amorce ITS-219F/ ITS 219S a été décrite par Schoenian et al., 2003 ; Tai et., 2000 et Tai et al., 2001. Ce couple d'amorce amplifie un fragment de (256 – 288) pb.

Leurs séquences sont les suivantes :

ITS-219F (5'-AGCTGGATCATTTTCCGATG-3')

ITS-219R (5'-ATCGCGACACGTTATGTGAG-3')

Il existe d'autres paires d'amorces dans la littérature, le choix entre ces différents séquences dépend du degré de sensibilité souhaité et niveau de spécificité recherché : genre, espèce ou groupe d'espèces (Le Fichoux et al., 1999).

# DEDICACES

---

### 2.3.3. Séquençage des leishmanies

Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. De cette réunion est né le *Leishmania Genome Network*, un consortium de laboratoires impliqués dans la cartographie, le séquençage et l'annotation des génomes et dans les tests fonctionnels qui en découlent. Un projet de séquençage a débuté avec la souche *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin (Ouellette et al., 2002).

Le séquençage de *Leishmania* à l'aide d'un séquenceur (figure 21) équipé d'un laser permettant la détection de fluorochrome (et donc le fragment) par la longueur d'onde émise. Cette technique consiste à utiliser 5 couleurs de fluorochrome émettant 5 longueurs d'onde différentes : bleu, rouge, orange, vert et jaune. L'orange étant réservé au marqueur de taille. Le produit de PCR ainsi marqué est dilué dans du formamide et additionné d'un marqueur de taille.

Après passage du fragment amplifié dans le polymère de capillaire, le séquenceur transfère les données à l'ordinateur ou ils sont analysés par un logiciel (Hide, 2004).



**Figure 21** : Séquenceur.

([www.biomedicale.univ.paris5.fr/ifr95/images/appareil\\_sequenceur2.gif](http://www.biomedicale.univ.paris5.fr/ifr95/images/appareil_sequenceur2.gif))

# DEDICACES

---

## VII. TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE

La thérapeutique des leishmanioses est dominée, depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, par les dérivés stibiés qui demeurent, encore de nos jours les médicaments de première intention.

Toutefois, au cours de la co-infection LV/VIH, ou dans des cas de résistance fréquente aux antimoniés (LCM, kala-azar est-africain ou indien), l'amphotéricine B « très chère » tend à s'imposer en première intention, surtout sous sa forme encapsulée dans les liposomes (Dedet, 1999).

### 3. Médicaments

#### 1.1. Médicaments utilisés à l'échelle mondiale

##### 1.1.1. Sels d'antimoine pentavalents (SbV)

Les deux produits disponibles de nos jours sont l'antimoniote de N-méthyl glucamine, commercialisé sous le nom de Glucantime® et le stibogluconate de sodium ou Pentostam® (Escomel, 1917 ; Berman, 1988 ; Badaro et al., 1990).

Chimiquement voisins, l'un résulte d'une liaison à un sucre, le méglumine (Glucantime®) et l'autre d'une réaction entre antimoine et l'acide gluconique (Pentostam®). Ils ont une teneur en antimoine distincte, de 8,5% pour le Glucantime® (8,5 mg/ml) et de 10% pour le Pentostam® (10 mg/ml).

Leur mécanisme d'action n'a jamais été exploré et demeure mal connu. L'antimoine a une action inhibitrice sur la synthèse de l'ATP, sur l'oxydation glycolitique et sur celle des acides gras (Berman, 1988).

L'efficacité des antimoniés dans le traitement des leishmanioses est confirmée par plus d'un demi-siècle d'utilisation. Pourtant ces produits ont fait l'objet de recommandation d'emploi très diverses, pour tenter d'améliorer leur efficacité et de diminuer leurs effets toxiques.

Le défaut de réponse aux antimoniés de certaines formes de leishmaniose a été signalé à maintes reprises dans certains foyers endémiques de LV et de LCM. Il ne saurait toutefois être automatiquement rapporté à une résistance

## DEDICACES

---

de la souche de parasite, en raison de la multiplicité des protocoles thérapeutiques employés et de la variation des doses d'antimoine administrées. Pourtant, des souches authentiquement résistantes aux antimoniés ont été isolées des patients non répondeurs au traitement (Falcofe et al., 1993).

### **1.1.2. Sels de pentamidine : Isethionate de pentamidine : PENTACARINA®**

La pentamidine est une diamine aromatique synthétisée dès la fin des années 1930. Il en existait deux sels : le mésylate de pentamidine, dont la spécialité, la lomidine®, a été retirés du marché en 1990 et n'existe plus que pour l'usage vétérinaire, et l'iséthionate de pentamidine®, commercialisé sous le nom de pentamidine® et plus récemment de pentacarinat® (Pradinaud et al., 1991).

La pentamidine inhibe la synthèse d'ADN parasite par blocage de la thymidine synthétase et par fixation d'ARN de transfert.

Le mésylate de pentamidine a été largement utilisé dans le traitement et la prévention de la trypanosomose humaine africaine. Dans le domaine des leishmanioses, il a été principalement employé comme médicament alternatif de la LV infantile, en cures alternées avec le Glucatime®, ou encore comme drogue de première intension dans le traitement de la LC à *L. guyanensis* en Guyane française (Pradinaud et al., 1991).

Le pentacarinat® correspond à une nouvelle présentation de l'iséthionate de pentamidine couramment utilisé antérieurement sous le nom de penatmidine® dans le traitement de diverses formes viscérales et cutanées de leishmaniose en Inde et en Afrique de l'Est.

L'efficacité du mésylate paraissait légèrement supérieure à celle de l'iséthionate, avec cependant un effet diabétogène plus marqué (Sotomancipe et al., 1993).

### **1.1.3. Amphotéricine B**

## DEDICACES

---

Antibiotique polyénique isolé en 1955 d'un *Streptomyces* du sol, l'amphotéricine B est un antifongique puissant utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Son statut évolue actuellement de produit alternatif pour les leishmanioses résistantes aux antimoniés, à celui d'anti-leishmanies de première intention au cours de la leishmaniose viscérale de l'immunodéprimé ou de la leishmaniose muqueuse. C'est un heptaène dont la formule brute est C<sub>46</sub> H<sub>73</sub> NO<sub>20</sub> (Thakur et al., 1993).

L'amphotéricine B inhibe la déméthylation du lanostérol qui s'accumule de façon anormale et provoque des modifications de la perméabilité de la membrane parasitaire entraînant une perte de substances vitales. Elle agirait en outre également sur les macrophages en stimulant leur production et en augmentant leurs capacités phagocytaires.

L'amphotéricine B est un antileishmanien très puissant, dont l'efficacité chez le Hamster expérimentalement infecté est supérieure à celle des antimoniés.

Une formulation récente de l'amphotéricine B encapsulée dans un liposome unilamellaire est disponible depuis peu d'années (AmBisome®). Elle consiste dans l'incorporation l'amphotéricine B dans la bicouche membranaire d'un liposome, par une association non covalente avec les phospholipides et le cholestérol composant cette membrane.

L'amphotéricine B encapsulée ne se dissocie pas des liposomes en milieu aqueux. Elle demeure dans la circulation générale, d'où elle est captée par les cellules du système réticulo-histiocytaire. Le produit s'accumule dans les tissus infectés et les cellules, en particulier les macrophages. L'amphotéricine B encapsulée interagit de façon minime avec les cellules de mammifères. Ses modalités d'action sur les *Leishmania* sont supposées être les mêmes que celles de l'amphotéricine B conventionnelle (Dedet et al., 1999).

### 1.1.4. Aminocide sulfate

L'aminosidine est un antibiotique aminocide naturel à noyau deoxystreptamine, produit par un *Streptomyces*.

# DEDICACES

---

Le mode d'action de l'aminosidine est analogue à celui de la streptomycine, il agit en inhibant la synthèse de protéines parasitaires par liaison au ribosome (Thakur et al., 1992).

## **1.1.5. Allopurinol**

L'allopurinol est un analogue structural de l'hypoxanthine couramment utilisé dans le traitement de l'hyperuricémie.

L'allopurinol intervient dans le métabolisme des purines en s'incorporant à l'ARN parasite pour lequel il a un effet létal (Dedet et al., 1999).

## **1.1.6. Imidazolés**

Les dérivés imidazolés constituent une famille particulièrement fournie d'antifongiques de synthèse. Certains d'entre eux, dont le kétoconazole ou Nizoral® et l'intraconazole ou sporanox®, sont crédités d'une activité antileishmanienne pas toujours définitivement établie.

Les imidazolés inhibent le cytochrome P450, bloquant la synthèse des stérols membranaires. Leur activité aboutit à une désorganisation interne des organelles aboutissant à la mort cellulaire (Dedet et al., 1999).

## **1.1.7. Interféron gamma**

L'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) est une lymphokine produite naturellement par les lymphocytes T helper et les cellules tueuses NK après stimulation par certains antigènes ou mitogènes. Il possède de nombreuses propriétés immunodultrices, dont l'activation des macrophages. L'interféron gamma 1-b recombinant humain est actuellement produit industriellement par génie génétique chez E-coli et utilisé en association pour réduire les infections graves chez les patients présentant une agranulocytose chronique (Murray et al., 1988 ; Falcofe et al., 1993).

## **1.2. Médicament utilisé à l'échelle nationale**

# DEDICACES

---

Le médicament utilisé au Maroc pour le traitement de la LC est sous forme d'une injection intra-lésionnelle ou une injection intramusculaire profonde de glucantime. Ce médicament est pris en charge par l'état (OMS, 1997).

## **4. Vaccination**

Face au fléau que représentent les leishmanioses, une seule mesure apparaît opportune : la prévention par une vaccination efficace et sans complication secondaires (Cruz- cubas et al., 1999).

La voie de la « leishmanisation », inoculation de parasites vivants, est actuellement très étudiée. En effet, les personnes atteintes d'une leishmaniose dans le passé, se trouvent immunisées contre les nouvelles infections.

De cette constatation est née l'idée que l'injection des parasites vivants pouvait conduire au même résultat. Différentes formes d'inoculation (Gradoni, 2001) ont donc été étudiées :

- ❖ Des parasites atténués ou tués (Kenney et al., 1999) ;
- ❖ Des fractions purifiées de lysats parasitaires (Dunan et al., 1989) ;
- ❖ Des protéines recombinantes (Mitchell et al, 1986 ; Rafati et al., 2000) ;
- ❖ Des peptides synthétiques (Spitzer et al., 1999)
- ❖ Des vaccins d'ADN (Melby et al., 2000).

Mais à ce jour, aucun vaccin n'est commercialisé.

# Matériel et méthodes

# DEDICACES

---

Notre travail comporte deux types d'études :

Une étude rétrospective qui a pour objectif d'étudier l'évolution des cas positifs de la leishmaniose cutanée au niveau de LRDEHM de la préfecture de Fès et la province de Moulay yacoub) durant l'an 2009 et une étude prospective comportant quatre volets :

- ❖ Une description clinique des lésions ;
- ❖ Un diagnostic histologique ;
- ❖ Une culture des leishmanies ;
- ❖ Un diagnostic moléculaire.

## LIEU D'ETUDE

Le laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du milieu de la délégation médicale de la préfecture de Fès est désigné par le ministère de la santé pour faire le diagnostic microscopique de la leishmaniose cutanée concernant la préfecture de Fès et la province de Moulay yacoub. Il reçoit des hôpitaux et des dispensaires de toute la région les lames des malades ayant une lésion cutanée suspecte d'une "leishmaniose". Certaines fois le laboratoire reçoit les malades référés par leurs médecins traitant pour réalisation d'un frottis de la lésion.

## TYPE D'ETUDE

### I. ETUDE RETROSPECTIVE

L'étude rétrospective concerne l'analyse des données et des résultats des prélèvements cutanés examinés au LRDEHM durant l'année 2009.

Ces données proviennent des registres de leishmaniose cutanée dûment conservés au sein du laboratoire;

# DEDICACES

Le traitement statistique est réalisé par le Logiciel Epi info conçu par l'organisation mondiale de la santé (figures 22 et 23). La réalisation des graphes est faite par le logiciel Excel.



**Figure 22 :** Interface du logiciel Epi info.

Les variables utilisées dans le saisi des données sont : Date de prélèvement, préfecture ou la province, centre de santé, date de réception, adresse, code de laboratoire, numéro de la lame, Nom et Prénom, âge, sexe, milieu, dépistage, année, mois et opérateur.

**Figure 23 :** Grille de saisie de données.

## II. ETUDE PROSPECTIVE

# DEDICACES

---

Le matériel biologique sur lequel le diagnostic histologique et moléculaire se fait provient du suc dermique prélevé à partir des lésions.

Pour notre étude moléculaire nous avons confectionné pour le prélèvement biologique trois échantillons :

- \*Un frottis mince sur lame ;
- \*Un prélèvement sur tube éppendorf ;
- \*Et un prélèvement sur le milieu de culture NNN.

## **Technique de prélèvement**

Le prélèvement est effectué à la périphérie de la lésion cutanée, en évitant les zones ulcéreuses ou surinfectées par des bactéries selon la technique suivante:

❖ L'ulcération cutanée est soigneusement désinfectée avec de l'eau physiologique stérile après avoir enlevé la croûte qui la recouvre.

❖ La lésion est séchée à l'aide d'un coton.

❖ Le revêtement cutané est raclé à l'aide d'un vaccinostyle en allant de plus en plus profondément jusqu'à la sérosité plus au moins teinté du sang,

❖ Le produit de raclage est déposé dans des tubes éppendorf qui seront congelés à -20°C.

❖ Une légère pression est effectuée à l'aide de vaccinostyle, pour récolter la sérosité dans :

\*Une boîte de pétri stérile contenant 1 ml de l'eau physiologique stérile et 0,5 à 1 ml des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Ce mélange estensemencé dans le milieu de culture NNN;

\*Sur des lames, le produit du raclage est étalé très finement à l'aide d'une autre lame est un frottis mince est confectionné. Les lames sont numérotées à l'aide d'un graveur

Le frottis fera l'objet de l'examen histologique effectué au laboratoire puis contrôlées par le laboratoire de référence de la leishmaniose à l'INH de Rabat. Ces lames sont mensuellement envoyées avec leurs fiches de renseignement (annexe 1).

La plaie est de nouveau nettoyée en mettant une pommade, et couverte avec une compresse stérile fixée par du sparadrap.

## **1. Description clinique**

# DEDICACES

---

La description clinique fait partie du diagnostic de la leishmaniose. Elle est réalisée grâce à un interrogatoire précis (fiche signalétique annexe 2) et donne en plus de la description de la lésion cutanée des informations supplémentaires sur :

- ❖ Le Nombre de lésion, unique ou multiple ;
- ❖ L'aspect de lésion, sèche ou humide ;
- ❖ La localisation de lésion, partie couverte ou découverte ;
- ❖ Les informations cliniques concernant la période d'infestation, la période d'incubation, lieu d'infestation et la période d'état de la maladie ;

## 2. Diagnostic histologique

L'examen histologique est réalisé pour les frottis cutanés étalés sur les lames en utilisant un microscope optique.

Ces frottis sont tout d'abord fixés sur les lames et colorés par le colorant May-Grunwald-Giemsa.

### 2.1. Technique de coloration

Les frottis cutanés ainsi réalisés sont colorés aux colorants MGG par la procédure suivante :

✂ L'étalement est fixé par l'alcool méthylique (méthanol absolu) pendant 2 à 5min ;

✂ Le frottis fixé est coloré pendant 30 à 60 minutes par la solution de Giemsa diluée à 3 ou 10 % dans de l'eau distillée ou dans une solution physiologique tamponnée à pH = 6,8. A noter que Le flacon de la solution mère de Giemsa doit être fermé hermétiquement et garder à l'abri de la lumière et le Giemsa dilué est utilisable pendant environ 8 heures, par conséquent, nous préparerons la dilution le jour même où elle sera utilisée ;

✂ le frottis coloré est Lavée délicatement à l'eau du robinet (débit faible) pour enlever l'excès du colorant ;

✂ Les frottis sont séchés à l'air libre en les posant verticalement sur un portoir ;

# DEDICACES

---

✂ L'examen des frottis se fait au microscope optique avec un objectif de 100.

## **2.2. Conservation des lames colorées**

La conservation des lames est effectuée en utilisant l'EU KIT dilué par le toluène ou le xylène selon la procédure suivante :

- ✂ Deux gouttes du conservateur dilué sont déposées sur le frottis,
- ✂ La lame est couverte avec une lamelle en évitant la formation des bulles d'air puis séchée.

## **3. Culture des leishmanies**

Les cultures des leishmanies dans le milieu NNN sont contrôlées et repiquées chaque semaine pendant une période de 6 semaines. L'incubation de la culture se fait dans une étuve réfrigérée à une température avoisinante les 23°C. Une culture est considérée négative si elle reste négative jusqu'à la 6<sup>ème</sup> semaine.

### **3.1. Contrôle**

Le contrôle des cultures a pour but de vérifier s'il y'a une contamination par des bactéries ou des champignons.

Ce contrôle est réalisé chaque semaine en mettant une goutte de la culture entre lame et lamelle et son observation à l'aide d'un microscope (objectif 40).

### **3.2. Repiquage**

Le repiquage est réalisé hebdomadairement en prélevant une goutte de la culture à l'aide d'une pipette pasteur stérile que nous avons déposé dans un nouveau milieu de culture NNN.

# DEDICACES

---

## 4. Diagnostic moléculaire

L'identification moléculaire est basée sur l'extraction de l'ADN suivie de l'amplification du gène de l'ARN par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces suivantes : AlmIts 1F, AlmIts 1R (tableau 2).

**Tableau 2** : Séquences nucléotidiques des amorces ;

Amorces	Séquence nucléotidique
AlmIts 1F	5' -TGATACCACTTATCGCACTT-3'
AlmIts 1R	5' -CTGGATCATTTTCCGATG-3'

Les produits de la PCR sont ensuite séquencés. En vue de l'identification taxonomique, les séquences ainsi obtenues sont comparées avec une base de données existante dans le programme BLASTN.

### 4.1 . Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est recherchée dans les prélèvements indirects sur les frottis cutanés fixés et colorés et sur les prélèvements cutanés directs déposés dans les tubes éppendorf conservés à -20°C et sur la culture.

L'optimisation du protocole d'extraction d'ADN génomique des leishmanies est réalisée par deux méthodes différentes :

#### 4.1.1. Extraction d'ADN par phénol-chloroforme-alcool

L'extraction d'ADN par phénol chloroforme est une méthode de purification minutieuse qui inclut des étapes de lyse, de digestion et de séparation d'ADN; elle se réalise selon la technique suivante :

☞ sur le matériel tissulaire adhérent sur la lame, 100 µl du tampon de lyse (annexe 3) sont ajoutés. Avec un cône stérile le frottis est gratté et la suspension est aspirée puis transférée dans un tube éppendorf marqué. Ce processus est répété une deuxième fois.

☞ A ce mélange, 3µl de protéinase K (20mg/ml) sont ajouté puis il est incubé toute la nuit à 60°C.

☞ Après incubation, 200µl de phénol sont ajoutés puis le mélange vortexé pendant 2-3 minutes est centrifugé à 14 000rpm ou plus pendant 3 minutes.

## DEDICACES

---

☞ Trois parties se forment la phase organique, l'interface et la phase aqueuse.

☞ La phase aqueuse contenant l'ADN est transférée soigneusement par pipetage en mettant le cône contre le bord du tube incliné et sans toucher l'interface dans un tube stérile contenant 200µl de chloroforme.

☞ Vortex et centrifugation comme auparavant.

☞ La phase aqueuse est transférée à nouveau dans un tube stérile contenant le 1/10<sup>ème</sup> du volume d'acétate de sodium 3M ou NaCl 5M et on ajoute 2,5 du volume d'éthanol 96% (500µl).

☞ Incubation pendant 30 minutes (le mieux toute la nuit) à -20°C pour permettre au précipité d'ADN de se former.

☞ Après Centrifugation à 4500 rpm pendant 10 à 30 minutes, le surnageant est aspiré en faisant attention à ne pas toucher le culot d'ADN, qui peut être invisible.

☞ L'éthanol à 70% (300µl) est rajouté au culot puis centrifugé pendant 5 minutes et le culot obtenu est laissé ouvert pendant une heure dans l'étuve à 37°C jusqu'à ce que les dernières traces d'éthanol soient évaporées.

☞ Dissolution du culot d'ADN dans 50µl dans d'eau bi-distillée ou dans du tampon TE (annexe 3).

☞ Les échantillons d'ADN dilués sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

### **4.1.2 Extraction d'ADN par choc thermique**

Technique alternative à la lyse chimique, utilisée pour l'extraction d'ADN des bactéries et des champignons; elle se base sur une série de passage des échantillons du froid au chaud.

La procédure utilisée est la suivante :

☞ Les prélèvements directs dans les tubes éppendorf et les frottis colorés sont mis en suspension en ajoutant 100 µl de l'eau distillée stérile à chaque un.

☞ Les mélanges sont incubés une heure à -20°C puis transférés dans un bain marie à 80°C pendant 5 minutes. Après ils sont incubés une autre fois à -20°C pendant 30 minutes ensuite transférés à 80°C. Ce processus est répété deux fois puis une centrifugation pendant 10 minutes à 7000 rpm

# DEDICACES

---

donne un surnageant contenant normalement de l'ADN, 2 µl du surnageant est utilisé pour la réaction d'amplification (PCR).

## 4.2. Amplification par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par K.Mullis et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN.

Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel).

### 4.2.1. Amorces spécifiques

Les amorces utilisées sont des amorces universelles amplifiant la région ITS de l'unité ribosomique.

Cette région est une zone assez bien conservée à l'intérieur d'une même espèce, mais elle est variable d'une espèce à une autre et constitue un bon indicateur taxonomique à l'échelle de l'espèce.

Pour cette raison, cette zone a été amplifiée pour confirmer le diagnostic précédent.

**Tableau 1 : Séquences nucléotidiques des amorces**

Amorces	Séquence nucléotidique
<b>AlmIts 1F</b>	5' -TGATACCACTTATCGCACTT-3'
<b>AlmIts 1R</b>	5' -CTGGATCATTTTCCGATG-3'

### 4.2.2. Réactifs de la PCR

La réaction de PCR a été réalisée dans des tubes éppendorf dans un thermocycleur.

Le mélange réactionnel est effectué tel que présenté dans le tableau ci-dessous :

# DEDICACES

**Tableau 3:** Mélange réactionnel de la réaction du PCR pour un échantillon ;

Composants	Volume	Concentration finale
Tampon Taq (10X)	5	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5	1,25 mM
dNTPs (1mM)	1	0,02 mM
AlmIts 1F (20pmol/μl)	1	0,4 pmol/μl
AlmIts 1R (20pmol/μl)	1	0,4 pmol/μl
Taq polymérase (5U/μl)	0,5	0,05 U/μl
Eau	34	-
ADN	5	-
Volume final	50	-

### 4.2.3 Amplification

L'amplification de l'extrait d'ADN a été réalisée dans un thermocycleur Applied Biosystems 2720.

Le programme est donné par le tableau suivant :

**Tableau 4 :** Programme d'amplification des leishmanies.

Nombre de cycle	Dénaturation	Hybridation	Elongation
Cycle initial	2 min. 95° C	0	0
32 cycles	20 sec. 95°C	30 sec. 53°C	1 min. 72°C
Cycle final	0	0	6 min. 72°C

Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %.

### 4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Le but de l'électrophorèse sur gel horizontal est la séparation des fragments d'ADN, leur détection par intercalation avec le bromure d'éthidium et leur visualisation sous de faibles UV.

# DEDICACES

---

\* L'électrophorèse sur gel d'agarose précède la PCR pour les échantillons d'ADN extraits par phénol- chloroforme- alcool dans le but est de s'assurer que l'ADN a été bien extrait.

## **4.3.1. Préparation du gel**

Une solution d'agarose à 1,2% est préparée dans du TAE 1 X à partir d'une solution TAE 50 X (annexe 3).

Ce tampon est le même utiliser pour la migration. La solution a été chauffée avec agitation jusqu'à dissolution complète de l'agarose, puis refroidie pour ajouter 2µl de BET (Bromure d'éthidium) (annexe 3), Le gel a été ensuite coulé dans une moule avec peigne à 16 cupules. Après solidification, le gel a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1fois.

## **4.3.2. Dépôt des produits d'amplification**

10 µl du produit d'amplification a été mélangé avec une solution de charge (annexe 3), puis déposé dans les puits du gel. La solution de charge contient :

- ☞ Un marqueur de mobilité qui est le bleu de bromophénol et qui permet de suivre la migration,
- ☞ Un alourdisseur « glycérol » qui permet d'entraîner l'ADN au fond des puits.

## **4.3.3. Migration**

La migration a été réalisée au moyen d'un générateur de courant pour l'électrophorèse. Le courant a été réglé premièrement à 70 volets pour permettre la sortie de l'ADN des puits, ensuite à 50 volts pour la migration. Celle-ci a été arrêtée lorsque le produit atteint une distance considérable.

## **4.3.4. Visualisation**

La visualisation de l'ADN a été permise grâce à un colorant fluorescent BET déjà ajouter à la solution d'agarose. Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques.

# DEDICACES

---

On peut aussi plonger le gel d'agarose après migration dans une solution de BET 0.5µg/ml pendant 15mn puis le laver avec de l'eau distillée.

## 4.4. Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'[ADN](#), consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné il est réalisé par les responsables au centre de recherche CURI de Fès selon le protocole suivant.

Les produits de PCR sont purifiés à l'aide de billes magnétiques est utilisé pour la réaction de séquençage. Celle-ci est réalisée selon la technique automatisée de Sanger. Cette méthode consiste à réaliser une amplification spécifique (PCR) dans laquelle on utilise des didésoxynucléosides monophosphate (ddNMP) généralement marqués par des fluorochromes. Ces dérivés ne possèdent pas une fonction OH en position 3' du désoxyribose.

L'incorporation de l'un des didésoxynucleotides par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie. On aura donc toute une famille de fragment d'ADN synthétisés avec des longueurs différents selon qu'un désoxynucléotide ou un didésoxynucléotides a été au hasard incorporé. Dans tout les cas, toutes les molécules se terminent obligatoirement par un ddNMP.

Ces fragments sont séparés par électrophorèse selon leur longueur, les petits migrent en premier. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier des brins d'ADN ne différent en longueur que par un seul nucléotide. Le gel est alors lu par une base A, T, C, G.

L'utilisation d'un logiciel informatique permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

## 4.5. Analyse bioinformatique des séquences

Les séquences d'ADN ribosomiaux ITS1 obtenues sont alignées avec les séquences nucléotidiques du même ADN de la base de données du Centre

## DEDICACES

---

National de l'Information pour la Biotechnologie (NCBI) disponible en ligne via le programme BLASTn.

# Résultats et discussion

# DEDICACES

---

## CHAPITRE .I. ETUDE RETROSPECTIVE ET PROSPECTIVE

### III. ETUDE RETROSPECTIVE

L'étude rétrospective concerne les cas de la leishmaniose cutanée enregistrés dans le Laboratoire Régional de Diagnostique Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de la préfecture de Fès durant l'an 2009.

Elle comporte des précisions sur le type de dépistage, la date de recrutement, la provenance le sexe et l'âge.

Au total, le LRDEHM a enregistré 194 prélèvements pendant l'an 2009; parmi eux 77 cas, représentés par 44 femmes et 33 hommes, sont positifs en diagnostic histologique (soit 39,70% des prélèvements) (tableau 5).

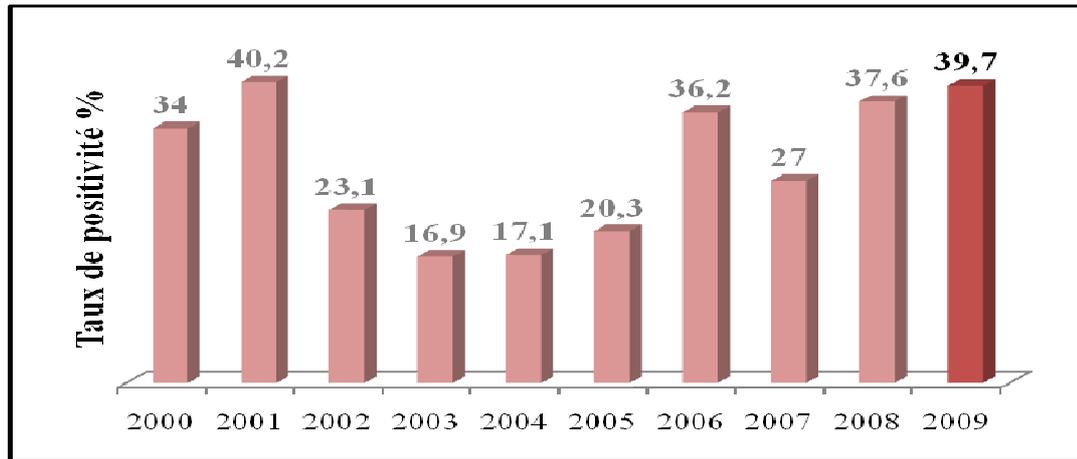
**Tableau 5 :** Recensement des lames de frottis cutanés examinées par le LRDEHM durant l'an 2009 en fonction du sexe.

Sexe		Résultats		Total
		Positif	Négatif	
Féminin	Effectif	44	68	112
Homme	Effectif	33	49	82
Total	Effectif	77	117	194
	Pourcentage	<b>39,70%</b>	60,30%	100%

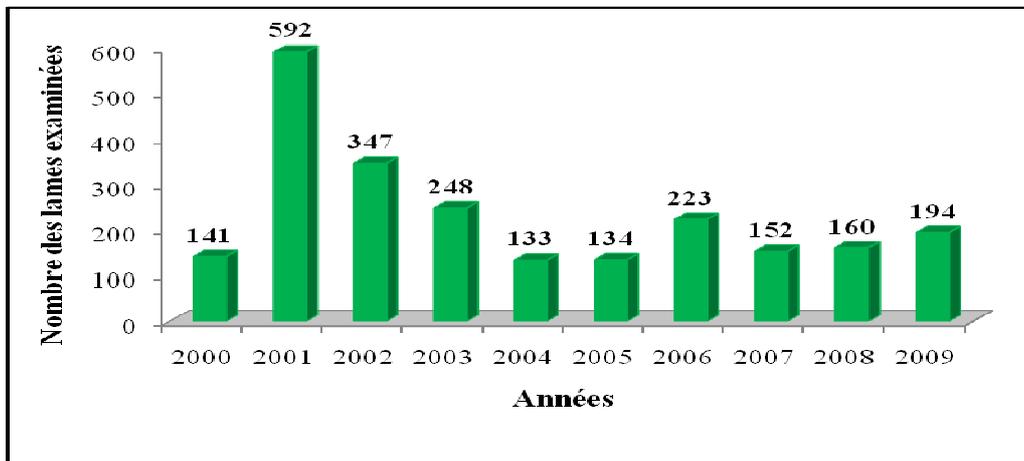
En se comparant à une étude rétrospective antérieure de 2000 à 2008 réalisée au LRDEHM de Fès (Bendriss et al., 2009) (figure24).

Nous avons constaté que ce taux de positivité en diagnostic histologique ne dépasse guerre celui de 40,2% enregistré en 2001.

## DEDICACES



**Figure 24 :** Taux de positivité des lames de la LC examinées par le LRDEHM entre 2000 et 2009



**Figure 25 :** Répartition des lames de la LC examinées par le LRDEHM entre 2000 et 2009.

Cette faible proportion des cas positifs par rapport au nombre des prélèvements à tester (figures 24 et 25) peut avoir plusieurs explications dont :

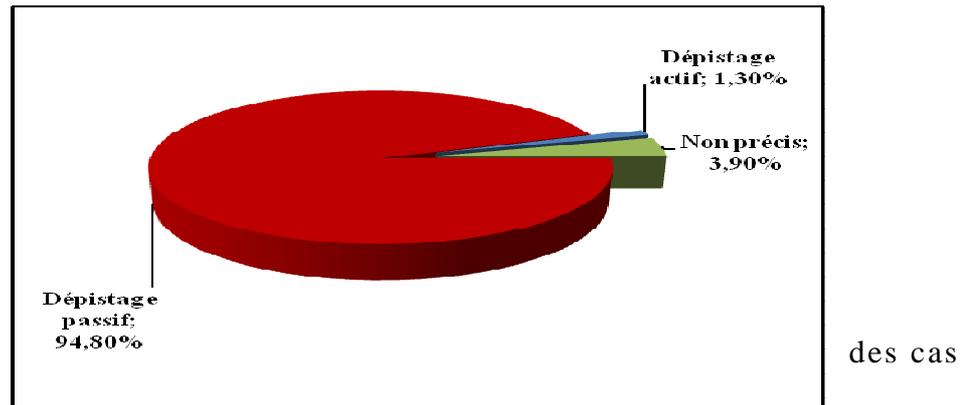
- ☞ **La difficulté de l'examen clinique** posé par les médecins; en effet les lésions données par les leishmanies peuvent se confondre avec d'autres dermatoses de type mycose ou tuberculose d'où l'intérêt d'effectuer un examen différentiel;
- ☞ **La qualité du prélèvement** qui demande un soin et une pratique rigoureuse ;

# DEDICACES

☞ **La qualité de la coloration** ; qui est liée à la qualité du colorant et au pH de l'eau distillée utilisée pour la préparation de la solution de coloration ;

☞ **La lecture microscopique** qui nécessite une grande expérience. Mais cette dernière hypothèse peut être éliminée par la double lecture des lames.

## 1. Répartition des cas de la LC selon le type de dépistage

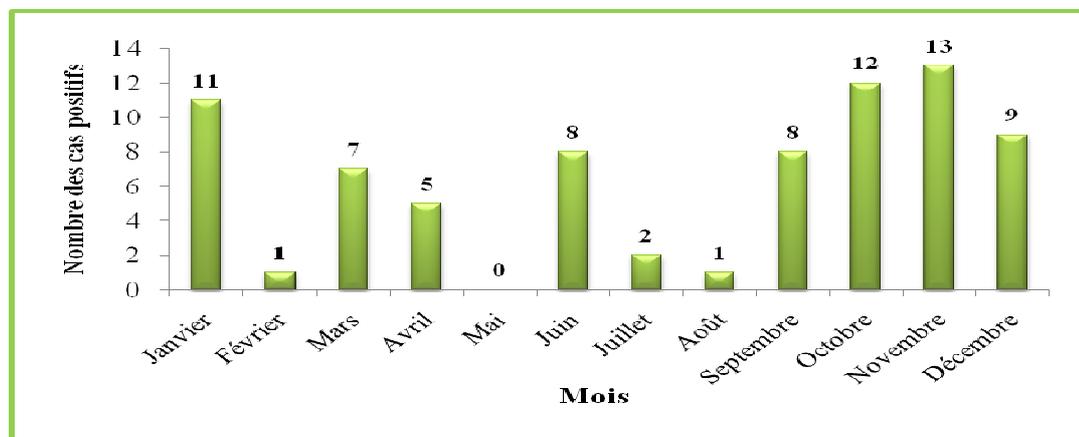


**Figure 26 :**  
Répartition  
de la LC en

fonction de type de dépistage durant l'année 2009.

D'après la figure 26, nous constatons qu'il y'a une dominance de dépistage passif avec 73 cas, soit 94,80% par rapport au dépistage actif qui est enregistré uniquement pour un cas. Ceci peut être expliqué par le fait que la préfecture de Fès et la province de Moulay yacoub ne représentaient pas des zones d'épidémie pour réaliser un dépistage actif.

## 2. Répartition des cas de la LC par mois



**Figure 27 :** Répartition mensuelle des cas de la LC durant l'année 2009.

# DEDICACES

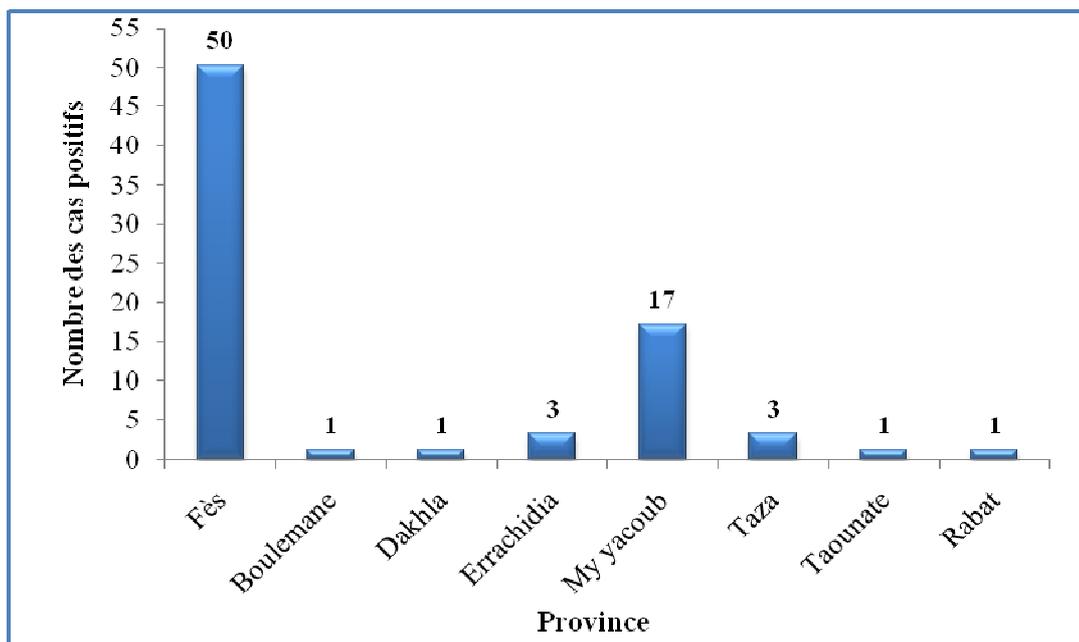
En générale, les cas de la leishmaniose sont enregistrés toute l'année (figure 27). Cependant, durant la saison pluvieuse (septembre-février) 54 cas ont été enregistré soit 70,13% du total de l'année, alors que pendant la saison chaude (mars-aout) le nombre des cas enregistré est 23 soit 29,87%.

Plus précisément ce sont les mois d'octobre et de novembre qui enregistrent le plus grand nombre de cas positifs avec respectivement 12 et 13 cas; par contre durant les mois de mai, février et d'août, nous avons observé les chiffres les plus faibles, avec respectivement 0, 1 et 1 cas (figure 27).

Ces résultats peuvent être en rapport avec l'activité du vecteur et le délai d'incubation de l'hôte. En effet le vecteur ne s'active qu'en période chaude de mars à avril (OMS, 1997) d'autant plus il a été démontré qu'à Fès le phlébotome n'apparaît qu'à partir du mois de mai (El-Miri, 2009), donc c'est après une incubation de 1 à 4 mois selon les individus et leur immunité (OMS, 1997) que la LC se manifeste d'où le nombre élevé des cas positifs durant les mois de septembre à janvier.

### 3. Répartition des cas de la LC selon la provenance

#### 3.1. Répartition des cas de la LC selon les provinces



**Fi**  
**gu**  
**re**  
**28**  
:  
Ré  
pa  
rtit

## DEDICACES

---

ion des cas de la LC par province durant l'année 2009.

La figure 28 montre que, la majorité des cas positifs examinés proviennent de la préfecture de Fès avec 50 cas. Cependant, sur ces 50 cas, 45 sont des cas importés, cela veut dire que les personnes ont séjourné en dehors de Fès et que l'infestation s'est produite ailleurs et cinq cas sont autochtones autrement dit les malades n'ont pas quitté Fès.

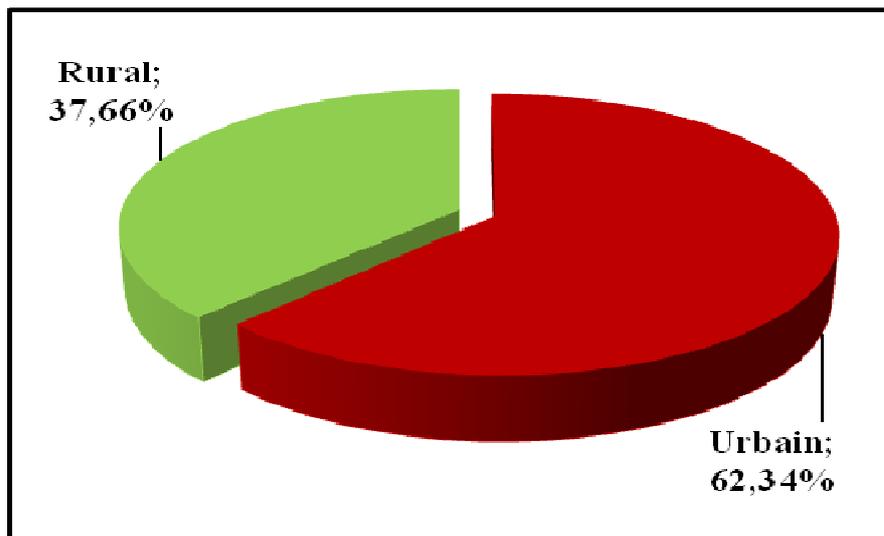
Ce dernier résultat montre que Fès est aussi une région endémique et il se peut que des cas asymptomatique réservoir existent.

Les cas provenant de la ville Boulemane et les autres provinces sont uniquement des cas référés par leurs médecins traitant vers le LRDEDM et par conséquent ils ne reflètent pas la réalité de la situation épidémiologique de ces provinces.

Nous avons enregistré également d'autres cas qui proviennent d'autres villes en hors de la région Fès-Boulemane, à savoir :

- Dakhla (1 cas),
- Errachidia (3 cas),
- Taounate (1 cas),
- Taza (3 cas),
- Rabat (1 cas).

### 3.2. Répartition des cas de la LC selon le milieu



# DEDICACES

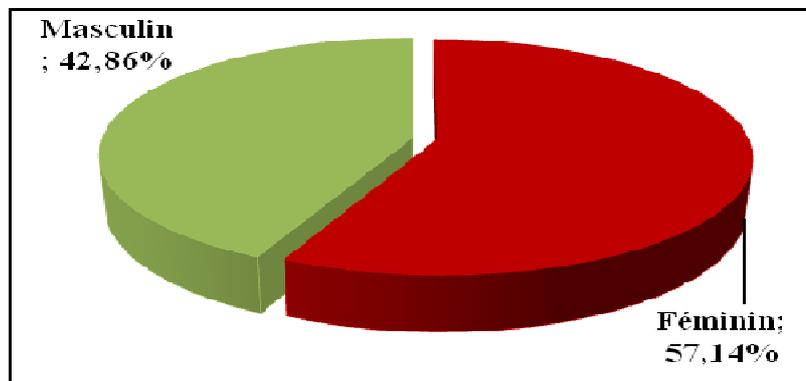
**Figure 29 :** Répartition des cas de la LC selon le milieu durant la l'année 2009.

Sur les 77 cas de la LC nous avons dénombré 48 cas provenant du milieu urbain (soit 62,34%) et 29 cas provenant du milieu rural (soit 37,66%).

Nous constatons donc que les cas de la LC ont été d'origine urbain plus que d'origine rural, avec une différence de 24,68% (figure 29).

## 4. Répartition des cas de la LC selon le genre

### 4.1. Répartition des cas de la LC selon le sexe



**Figure 30 :**  
Répartition  
cas de la LC

des  
selon

le sexe durant l'année 2009.

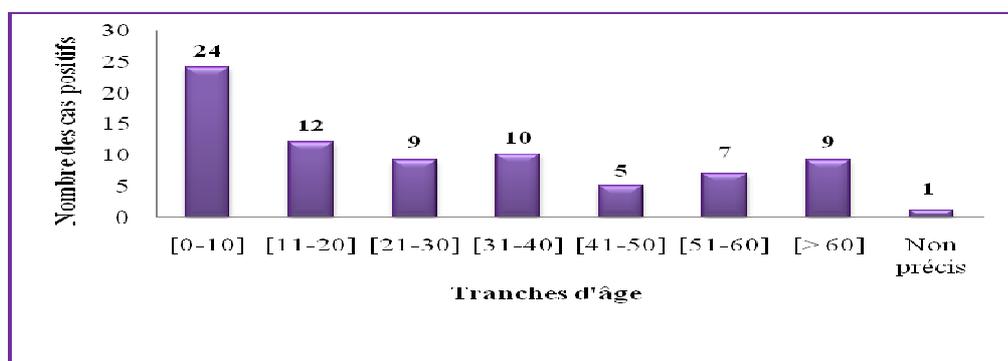
Sur les 77 cas positifs de leishmaniose cutanée, 44 sont représentés par des femmes (soit 57,14 %), ce qui montre une prédominance de leishmaniose féminine (figure 30).

Ce résultat est semblable à celui rapporté par :

✧ Chiheb et al. Au nord du Maroc en 1999, qui ont détecté que 56 % des patients ont été de sexe féminin.

✧ Traore et al. en 2001 à Ouagadougou, qui ont trouvé 50,3% de sujets de sexe féminin.

### 4.2. Répartition des cas de la LC selon les tranches d'âge



# DEDICACES

---

**Figure 31 :** Répartition des cas de la LC selon les tranches d'âge durant l'année 2009.

Toutes les tranches d'âges peuvent être touchés (figure 31); néanmoins ce sont les jeunes enfants de [0-10] ans qui sont les plus représentés avec 24 cas soit 31,17% de l'ensemble des cas, viennent ensuite les autres tranches d'âges de [11 à 20], [21 à 30], [31 à 40] et [>60] alors qu'une baisse s'observe chez les personnes de [41-50] ans.

Ce résultat peut être expliqué par le fait que dans les tranches d'âge [0-10] et [>60] les enfants et les personnes âgées possèdent une faible immunité; alors que dans les autres tranches d'âge de [11 à 20], [21 à 30], [31 à 40] se trouvent les personnes actifs qui peuvent faciliter l'exposition à la piqure par les phlébotomes.

## **5. Contrôle de la non-conformité des lames examinées par le LRDEHM**

Sur 194 lames examinées par le LRDEHM et contrôlées par le laboratoire de référence de l'INH de Rabat durant l'an 2009, il y'a 24 lames non conformes soit un pourcentage de non-conformité de 12,37%. Concernant les années 2007 et 2008, ce pourcentage était de 0,65% et 10,2% respectivement (Bendriss, 2009).

Ainsi, l'examen microscopique en plus du fait qu'il se limite à l'identification du genre, il se heurte au problème de fiabilité ce qui montre l'intérêt de développer d'autres techniques de diagnostic.

## **IV. ETUDE PROSPECTIVE**

Cette étude couvre la période de stage allant du premier Janvier jusqu'à fin Mai 2010. Les données rentrent aussi dans le cadre d'un dépistage passif de la LC dans la préfecture de Fès.

Nous avons recensé durant 5 mois :

## DEDICACES

---

107 personnes ayant des lésions leishmaniennes suspectes; parmi eux, 74, sont reçus au laboratoire d'épidémiologie et 33 sont examinés dans des centres de santé; le laboratoire ne reçoit que les frottis cutanés de ces derniers pour diagnostic.

Sur les 107 personnes signalées, 39 cas se sont révélés positifs par l'examen histologique (soit un taux de positivité de 36,45%) et prouve que la lésion est bien une leishmaniose cutanée.

21 cas de LC sont de sexe féminin (soit 53,85%) et 18 cas sont de sexe masculin (soit 46,15%).

Les âges des malades à LC varient de 1 à 74 ans (tableau 6) mais ce sont les enfants de moins de onze ans qui sont les plus atteints.

**Tableau 6** : Répartition des cas de la LC selon les tranches d'âge.

Tranches d'âge	Fréquence
[0,10]	12
[11,20]	7
[21,30]	4
[31,40]	3
[41,50]	3
[51,60]	3
[>60]	7

La plupart des cas positifs examinés relèvent de la préfecture de Fès (35 cas) cependant se sont tous des cas importés qui ont été infestés dans d'autres régions (Taounate, Errachidia) (tableau 7).

**Tableau 7** : Répartition des cas de la LC selon la provenance (province et milieu).

Provenance		Fréquence
Province	Milieu	
Fès	Urbain	35
Errachidia	Rural	2
Taounate		2

Les résultats de l'étude prospective rejoignent et confirment ceux donnés par l'étude rétrospective en montrant que :

## **DEDICACES**

---

- ❖ Le diagnostic histologique donne environ 35% de positivité des prélèvements à testés;
- ❖ Les enfants sont les plus touchés;
- ❖ La majorité des cas sont des cas importés.

## **CHAPITRE.II. DESCRIPTION CLINIQUE ET DIAGNOSTIC DE LA LC.**

Durant la période du stage, nous nous sommes intéressés à un troisième volet, c'est celui de rapprocher et de comparer la description clinique au diagnostic moléculaire de la LC.

### **I. DESCRIPTION CLINIQUE DES LESIONS**

L'examen clinique basé sur la forme de la lésion signale 107 personnes suspectes d'infestation; cependant l'examen histologique ne retient que 39 cas réellement porteurs de leishmanies ce qui donne une incertitude de 63,55% de l'examen clinique par rapport au diagnostic histologique.

Sur les 39 personnes atteintes de leishmaniose, 31 personnes sont réellement reçues au laboratoire. Un questionnaire révèle des informations sur la date d'apparition de la maladie et l'examen décrit la forme des lésions, leurs aspects, leurs nombres et leurs localisations.

#### **5. Délai de consultation**

Les délais de consultation (tableau8) vont de trois mois à 1 an, la majorité des personnes ne consultent qu'après 8 mois.

**Tableau 8 :** Répartition des cas de la LC selon le délai d'apparition de lésion/consultation.

<b>Délai d'apparition de lésion/consultation</b>	<b>Fréquence</b>
3 mois	2
4 mois	1

## DEDICACES

---

5 mois	3
6 mois	3
8 mois	10
1 an	12

Ce résultat peut s'expliquer soit par le délai d'incubation qui peut être long mais aussi par l'ignorance de la maladie chez le malade.

### 6. Siège des lésions

Le siège des lésions se localise sur les parties découvertes du corps à savoir les mains, le visage et les pieds (tableau 9).

**Tableau 9** : Répartition des cas positifs de la LC selon la localisation de la lésion.

Localisation de la lésion	Fréquence
Pied	8
Main	15
visage	13

### 7. Aspect des lésions

La forme sèche est rencontrée chez 9 cas dont six avaient une lésion unique (tableau10).

La forme humide est rencontrée chez 22 cas dont 15 cas avaient des lésions multiples (tableau10).

Ce résultat rejoint celui de la littérature (Rioux et al., 1986 ; Chiheb et al., 1999 ; Rhajaoui et al., 2007 ; Rhajaoui, 2009).

**Tableau 10** : Répartition des cas de la LC selon le nombre et l'aspect de lésion.

Nombre de lésion	Aspect de lésion	
	Humide	Sèche
1	7	6
2	9	1

## DEDICACES

3	3	2
4	1	0
5	1	0
9	1	0

### 8. Origine de l'infestation

Le tableau 11 montre que la forme humide est rencontrée chez 22 cas originaires tous d'Errachidia (tableau11).

La forme sèche est rencontrée chez neuf cas dont cinq cas d'origine Taounate et quatre d'origine d'Errachidia (tableau11).

Ce résultat est en concordance avec celui de la littérature (Rhajaoui, 2009) qui montre que la région d'Errachidia représente un foyer de la leishmaniose cutané à *L major* donnant des lésions multiples et humides; alors que le nord du Maroc comme le pourtour méditerranéen représente un foyer à *L infantum* dont la lésion est sèche.

**Tableau 11** : Répartition des cas de la LC selon la provenance et l'aspect.

Provenance		Aspect	
Province	Origine	Humide	Sèche
Fès	Errachidia	20	4
	Taounate	0	3
Errachidia	Errachidia	2	0
Taounante	Taounate	0	2

## II. DIAGNOSTIC HISTOLOGIQUE

Le diagnostic histologique sur frottis cutanés est réalisé pour 74 cas sur 107 cas à tester; pour les 33 cas restants, leurs frottis cutanés ont été effectués dans les centres de santé de la préfecture de Fès et ceux de My yacoub.

Sur les 74 frottis cutanés effectués dans le LRDEHM, nous avons enregistré 31 lames positives et 43 lames négatives. Autrement dit, un taux de positivité de 41,89%.

# DEDICACES

---

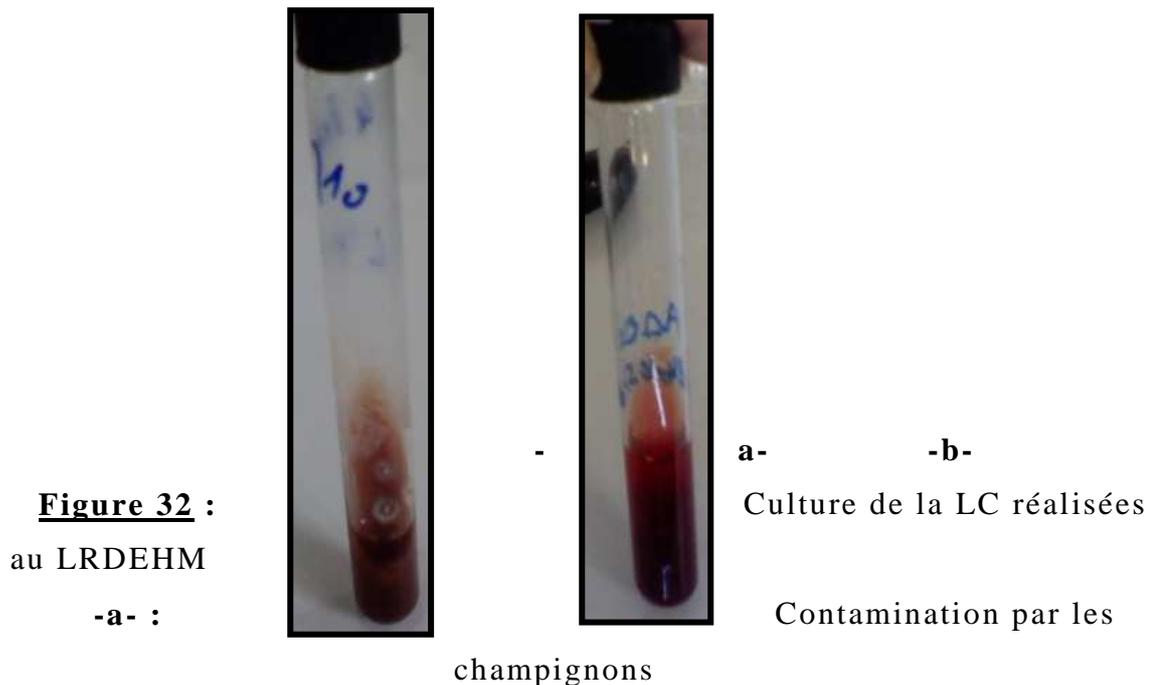
La lecture microscopique des 33 lames effectuées dans les C/S a montré 25 lames négatives et 8 lames positives cela induit un taux de positivité de 24,24%.

Ceci peut être expliqué par la qualité du prélèvement et la réalisation des frottis dans les centres de santé.

## III. CULTURE DES LEISHMANIES

Nous avons réalisé une culture des leishmanies pour 12 cas mais malheureusement nous avons eu des contaminations par des champignons (figure 32) pour les 5 premiers cas dès la première quinzaine et pour les 7 cas restants nous avons obtenus des contaminations par des bactéries à partir de la troisième semaine.

Ceci peut être expliqué par le fait que nous n'avons pas travaillé dans des conditions aseptiques lors de la réalisation de la culture pour les 5 cas premiers ou bien lors de repiquage pour les 7 cas derniers. Cela induit que le travail sous une hôte dans des conditions aseptiques est nécessaire pour la réalisation de la culture.



# DEDICACES

---

-b- : Contamination par les bactéries

## VII. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA LC PAR PCR

Le diagnostic moléculaire est effectué sur deux type de prélèvement; direct recueilli sur des tubes éppendorf et congelés à -20°C et indirect recueilli sur lames confectionnées pour le diagnostic histologique.

### 1. Mise au point de la technique PCR dans le diagnostic de la LC

L'optimisation de ce diagnostic commence par l'extraction d'ADN génomique des leishmanies.

#### 1.1. Extraction d'ADN par phénol-chloroforme-alcool

Cette extraction chimique est réalisée selon le protocole précédemment décrit et testé sur six échantillons positifs, dont cinq sont des frottis cutanés réalisés au LRDEHM et une culture positive des leishmanies provenant de l'INH de Rabat que nous avons utilisé comme un témoin positif.

Dans le but de s'assurer de la qualité de cette extraction, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose. Après migration aucune bande n'a été visualisée.

Ceci peut être expliqué soit:

Par le faible nombre des amastigotes dans les frottis cutanés, en effet Schonian et al (2003) ont montré qu'en passant de 2000 parasites par échantillon à 2 parasites par échantillon, la positivité de la PCR passe respectivement de 100% à 20%.

Par la faible concentration des enzymes de restriction

Nous nous sommes orienté vers l'essai d'une autre technique qui est l'extraction d'ADN par choc thermique.

# DEDICACES

---

## 1.2. Extraction d'ADN par choc thermique et amplification par PCR

Nous avons appliqué cette technique qui est couramment utilisé dans le laboratoire de biotechnologie pour les bactéries en modifiant certains paramètres.

### 1.2.1. Extraction d'ADN par 3 chocs thermiques et amplification par PCR

Quatre échantillons positifs sont testés, dont deux sont des frottis cutanés

et

Echantillons	Choc thermique (3fois)	PCR
Lame 157	-	Bande faiblement intense
Lame 37	-	Bande faiblement intense
Tube éppendorf 28	-	Pas de bande
Tube éppendorf 45	-	Pas de bande

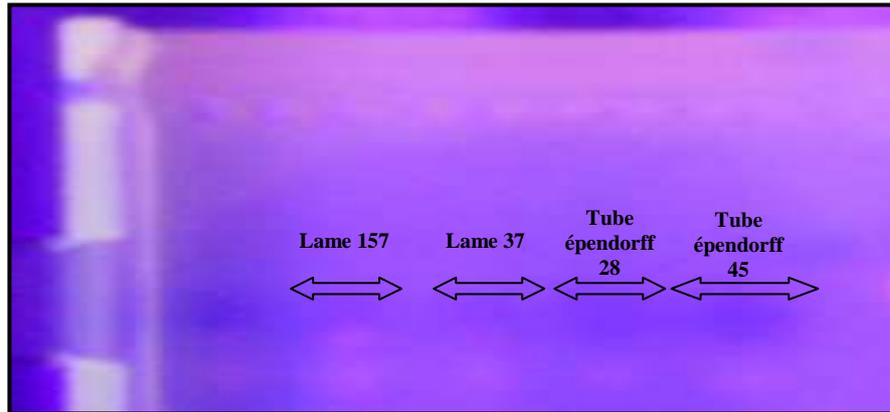
deux sont des prélèvements directs (tableau 12).

**Tableau 12** : Résultat de la PCR de l'extraction de l'ADN en utilisant 3 chocs thermiques.

L'électrophorèse sur gel d'agarose de ces produits amplifiés a montré la présence de deux bandes (lame 157 et lame 37) faiblement intenses pour les échantillons des frottis cutanés (figure 33).

# DEDICACES

---



**Figure 33** : Résultat de la PCR de l'extraction de l'ADN en utilisant 3 chocs thermiques.

Ceci peut être expliqué par :

- une dégradation de l'ADN de nos échantillons vu que le temps de choc thermique est long,
- une dilution de l'ADN dans le mélange réactionnel de la PCR.

\*\*Ceci nous a conduit à changer le nombre du choc thermique et de la concentration de l'ADN et faire une comparaison entre l'extraction d'ADN d'une part en utilisant deux et trois chocs thermiques et d'autre part en utilisant 2 $\mu$ l et 5 $\mu$ l de l'ADN pour l'amplification par PCR.

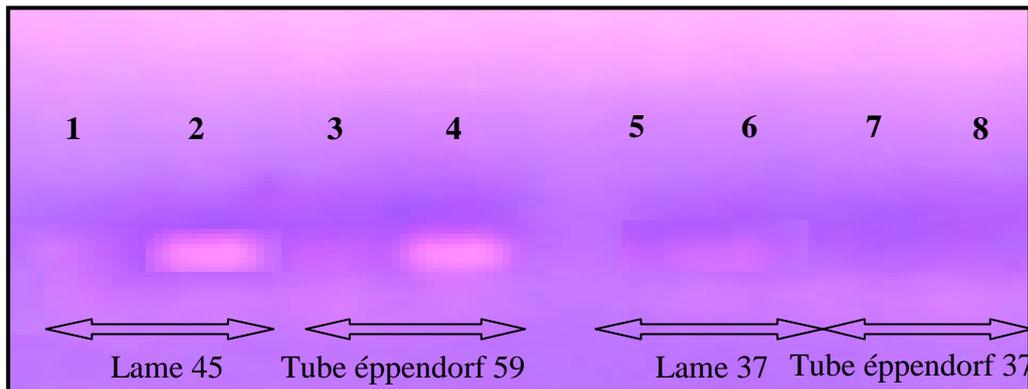
## **1.2.2. Comparaison de l'extraction d'ADN par 3 et 2 chocs thermique et amplification par PCR**

En utilisant 2 chocs thermiques et 5 $\mu$ l du produit de l'extraction de l'ADN (tableau 13) nous avons visualisé 3 bandes dont deux sont intenses et une faiblement intense (figure 34) alors qu'en utilisant 3 chocs thermiques et 2 $\mu$ l d'ADN pour les mêmes échantillons nous n'avons visualisé que deux bandes faiblement intenses (figure 34). Concernant le dernier échantillon (tube éppendorf 37), nous n'avons pas obtenu de bande ceci peut être expliqué par le manque d'expérience et le manque du matériel adéquat (burette).

**Tableau 13** : Résultats de la comparaison de l'extraction d'ADN en fonction du nombre du choc thermique et du volume de l'ADN dans le mélange réactionnel de la PCR.

## DEDICACES

Echantillons	Nombre du choc thermique	Volume de l'ADN dans le mélange réactionnel de la PCR	PCR
Lame 45 (1)	3	2µl	Bande faiblement intense
Lame 45 (2)	2	5µl	<b>Bande intense</b>
Tube éppendorf 59 (3)	3	2µl	Bande faiblement intense
Tube éppendorf 59 (4)	2	5µl	<b>Bande intense</b>
Lame 37 (5)	3	2µl	Pas de bande
Lame 37 (6)	2	5µl	Bande faiblement intense
Tube éppendorf 37 (7)	3	2µl	Pas de bande
Tube éppendorf 37 (8)	2	5µl	Pas de bande



**Figure 34 :** Résultat de la comparaison de la PCR pour les échantillons d'ADN extraits par 2 et 3 chocs thermiques.

### 1.2.3. Comparaison de l'extraction d'ADN par 1 et 2 chocs thermiques et amplification par PCR

Les résultats de cette comparaison sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 14 :** Résultats de la comparaison de l'extraction d'ADN en fonction du nombre du choc thermique.

Echantillons	Nombre du choc thermique	PCR
Lame 59	2	Bande faiblement intense
	1	Pas de bande

## DEDICACES

Lame 61	<u>2</u>	<b>Bande intense</b>
	1	Pas de bande
Tube épendorff 59	<u>2</u>	<b>Bande intense</b>
	1	Pas de bande
Tube épendorff 61	<u>2</u>	<b>Bande très intense</b>
	1	Bande faiblement intense

En utilisant un choc thermique nous avons visualisé uniquement une seule bande par contre en utilisant deux chocs thermiques nous avons obtenus 4 bandes. Ce résultat est confirmé dans les tests figurés dans le tableau ci-dessous.

Compte tenus de ces résultats et en vu des prochains tests effectués pour évaluer le diagnostic de la leishmaniose par PCR, nous avons retenu le protocole d'extraction d'ADN par choc thermique en utilisant deux chocs thermiques et 5µl du produit de l'extraction pour l'amplification.

**Tableau 15** : Résultats de la PCR de l'extraction d'ADN par deux chocs thermiques.

Echantillons	Extraction d'ADN (2 chocs thermiques)	PCR
Lame 59	-	Bande intense
Lame 37	-	Bande intense
Tube épendorff 37	-	Bande faiblement intense
Lame 27	-	Bande faiblement intense
Tube épendorff 27	-	Bande faiblement intense

## 2. Evaluation de la technique PCR dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée

L'évaluation est réalisée pour 53 échantillons dont 33 sont des prélèvements directs et 20 sont des frottis cutanés.

**Tableau 16** : Résultats de l'extraction d'ADN des échantillons en fonction des résultats de diagnostic histologique et de PCR.

Type d'échantillon	Référence d'échantillon	Résultat diagnostic	Extraction ADN par 2	PCR
--------------------	-------------------------	---------------------	----------------------	-----

# DEDICACES

		histologique	chocs thermiques	
Frottis cutanés sur lames	A 38	Négatif	-	Pas de bande
	A 41	Négatif	-	Pas de bande
	A 46	Négatif	-	Pas de bande
	A 28	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 34	Positif	-	Pas de bande
	A 35	Positif	-	Pas de bande
	A 43	Positif	-	Pas de bande
	A 45	Positif	-	Pas de bande
	A 61	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 62	Positif	-	Pas de bande
	A 72	Positif	-	Pas de bande
	A 73	Positif	-	Pas de bande
	A 74	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 77	Positif	-	Pas de bande
	A 79	Positif	-	Pas de bande
	A 79	Positif	-	Pas de bande
	A 80	Positif	-	Pas de bande
	A 83	Positif	-	Pas de bande
	A 86	Positif	-	Pas de bande
	A 91	Positif	-	Bande intense
Prélèvements directs sur tube éppendorf	F 168	Négatif	-	Pas de bande
	F 173	Négatif	-	Pas de bande
	A 16	Négatif	-	Pas de bande
	A 23	Négatif	-	Pas de bande
	A 31	Négatif	-	Pas de bande
	A 32	Négatif	-	Pas de bande
	A 39	Négatif	-	Pas de bande
	A 40	Négatif	Pas de bande	Pas de bande
	A 41	Négatif	-	Pas de bande
	A 54	Négatif	-	Pas de bande
	A 55	Négatif	-	Pas de bande
	A 67	Négatif	-	Pas de bande
	A 68	Négatif	-	Pas de bande
	A 71	Négatif	-	Pas de bande
	A 89	Négatif	-	Pas de bande
	<b>A 90</b>	<b>Négatif</b>	-	<b>Bande intense</b>
	A 102	Négatif	-	Pas de bande
	A 105	Négatif	-	Pas de bande
	<b>A 20</b>	<b>Positif</b>	-	<b>Bande intense</b>
	A 61	Positif	-	Bande intense
	A 62	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 64	Positif	-	Bande intense
	A 66	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 69	Positif	-	Bande faiblement intense

# DEDICACES

	A 69	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 72	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 79	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 79	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 80	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 80	Positif	-	Bande faiblement intense
	A 86	Positif	-	Pas de bande
	A 91	Positif	-	Bande intense
	F 157	Positif	-	Bande très intense

## 2.1. Résultats de la PCR sur les prélèvements directs

Les 33 prélèvements directs sur tubes éppendorf et congelés à -20°C sont subdivisés comme suit : 15 échantillons testés positifs par l'histologie et 18 échantillons testés négatifs par l'histologie.

Sur les 15 échantillons positifs, 14 ont montré des bandes par la PCR ce qui représente un pourcentage de 93,33% de réussite du diagnostic de la LC par PCR. Au sein de cet examen moléculaire cinq échantillons montrent des bandes intenses à fortement intenses alors que les autres bien que positifs en PCR mais les bandes sont faiblement intenses. Ce résultat ainsi que la négativité de l'échantillon A86 peut être expliqué par la qualité du prélèvement et les moyens mis pour le faire. En effet, de part qu'il faut prélever dans la sérosité du derme le matériel du prélèvement est spéciale (burette) alors que nous n'avons utilisé qu'un simple vaccinostyle.

Sur les 18 échantillons négatifs, un a été révélé positif avec une bande intense ce qui montre que la PCR peut être plus fiable que le diagnostic histologique.

## 2.2. Résultats de la PCR sur les Prélèvements indirects sur lames :

Les 20 frottis cutanés sont répartis comme suit : 17 lames positives par l'histologie et 3 lames négatives.

Sur les 17 lames positives, nous avons détecté par la PCR uniquement 4 bandes. Ceci peut être expliqué par la dégradation d'ADN par choc mécanique lors de déplacement des lames du LRDEHM au laboratoire de biotechnologie microbienne de la FST ou bien le non prélèvement des leishmanies lors de grattage des frottis surtout quand le nombre des parasites est très faible dans la lame (Schonian et al., 2003).

# DEDICACES

---

## VII. SEQUENÇAGE D'ADN DES LEISHMANIES

Le séquençage a été réalisé uniquement pour les produits amplifiés dont nous avons obtenu une bande intense soit 13 échantillons.

Nous n'avons obtenus que les résultats de deux échantillons:

### ✧ Lame 59 (AlmIts 1R)

```
GCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATA  
CAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAAC  
GGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGGAA  
CGCAGTAAAGTGCGATAAGTGGTATGA
```

### ✧ Lame 37 : Amorce AlmIts 1R

```
AAATCCGCAGTAAAAAAGGCCGATCGACGTCGTAGAACGCACCGCCTATACAC  
AAAAGCAAAAATGTCCGCCCAWACAAAAAATAGACGGCGTCTCGGCCTCTGG  
CGGGAGGGAGAGAGAGGGGGGTGCGCGCGCGTGGATAACGGCTCACATAACGT  
GTCGCGATGGATGACTTGGCCCCCTACTTCTTTGAAAAACGCAGTAAAGTGCGA  
TAAGTG
```

## VIII. ANALYSE BIOINFORMATIQUE DES SEQUENCES

Pour classer un microorganisme dans un genre ou en tant qu'une espèce donnée il y'a des critères d'identification à respecter. Ainsi, la définition moléculaire du genre stipule que les identités des séquences d'ARNr 5,8S doivent être supérieures ou égales à 97%. Une similarité supérieure ou égale à 99% traduit l'appartenance à une même espèce. Alors qu'un pourcentage d'identité inférieur à 97% ne permet pas l'identification (Drancourt et al., 2000).

Ainsi, les séquences obtenues sont comparées aux séquences de la banque des données grâce au logiciel Blast les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant.

## DEDICACES

---

**Tableau 17 :** Espèces leishmaniennes dont le gène ARNr 5,8S montre une identité avec celles de nos échantillons.

Echantillon	% d'identité avec la séquence AlmIts 1R	Espèce leishmanienne identifiée
Lame 37	100%	<i>Leishmania major</i>
Lame 59	99%	<i>Leishmania infantum</i> ou <i>Leishmania chagasi</i> ou bien <i>Leishmania donovani</i>

D'après les résultats mentionnés dans ce tableau, nous trouvons que le gène de l'ARN 5,8S de l'espèce *Leishmania major* présente un pourcentage de 100% avec celui de l'échantillon (lame 37). Selon les critères d'identification moléculaire, nous pouvons attribuer cet échantillon à cette espèce. Ainsi, l'origine de ce patient (lame 37) est Errachidia ce qui concorde avec la littérature (Rhajaoui, 2009 ; Rhajaoui et al. 2007)

D'autre part, le pourcentage d'identité du gène de l'ARN 5,8S de l'échantillon (lame 59) avec celui des parasites du genre *Leishmania* est de l'ordre de 99% après séquençage avec l'amorce AlmIts 1R. Son identification au niveau de l'espèce nécessite une confirmation avec d'autre amorce. Mais, puisque cette personne est d'origine de Taounate et l'infestation est cutanée nous pouvons s'orienter plus vers la *Leishmania infantum* (Rioux, et al, 1996 ; Rhajaoui, 2009).

Conclusion et perspectives  
et recommandations

## DEDICACES

---

Le Maroc fait partie des pays du pourtour méditerranéen touchés par la leishmaniose; surtout la forme cutanée qui ne cesse de s'élargir avec de nouveaux foyers d'infestation, de nouveaux malades à guérir et des hôtes réservoirs à combattre.

La préfecture de Fès n'est pas indemne; nous avons pu actualiser durant notre travail la base des données sur les cas de la leishmaniose cutanée enregistrés dans cette région par le LRDEHM.

En effet, le LRDEHM de Fès a reçu en l'an 2009, 194 cas suspects dont 77 (soit 39,7%) se sont révélés des cas de LC par le diagnostic histologique.

L'analyse des données de l'étude rétrospective et prospective a montré les informations suivantes :

- ❖ Les mois de forte incidence sont ceux d'octobre et novembre ils enregistrent le plus de cas de LC.

- ❖ Ce sont les enfants de moins de onze ans et les personnes âgées qui sont les plus touchés.

- ❖ La majorité des cas examinés relèvent de la préfecture de Fès avec 50 cas sur 77. Cependant, sur les 50 cas, 45 sont des cas importés, surtout de la région d'Errachidia où sévit la leishmaniose à *L major*.

- ❖ Nous avons montré qu'effectivement, ce sont les lésions d'aspect humide caractéristiques de cette espèce qui sont les plus fréquentes.

- ❖ Les cas autochtones existent mais ils ne représentent que cinq cas sur 50; la possibilité de l'existence d'un réservoir dans la région de Fès est probable.

- ❖ Nous avons montré que les lésions ne sont pas disséminées mais qu'elles sont confinées au lieu de la piqûre du phlébotome qui pique au niveau des zones accessibles, non couvertes à savoir les mains, le visage et les pieds.

Nous avons constaté qu'en plus du diagnostic histologique le seul pratiqué par LRDEHM et qui signale uniquement la présence ou l'absence des leishmanies dans les frottis cutanés sans spécifier l'espèce, nous pourrions aussi diagnostiquer la LC par PCR tout en précisant l'espèce en cause par séquençage.

## DEDICACES

---

Cette identification moléculaire mise au point au laboratoire de biotechnologie microbienne s'est basée sur le prélèvement, l'extraction, l'amplification et le séquençage.

L'extraction par action thermique est effectuée sur des prélèvements directs congelés et sur des frottis colorés.

Les résultats obtenus montrent que la PCR faite à partir des prélèvements directs et congelés soumis à une extraction par choc thermique à deux cycles est meilleure que l'extraction faite sur les frottis colorés. En effet la réussite du diagnostic moléculaire de la LC par PCR sur les prélèvements directs congelés à -20°C est de 93,33%.

De plus nous avons pu montrer que le diagnostic moléculaire par PCR peut être plus fiable que le diagnostic histologique vu qu'un examen histologique négatif s'est avéré positif par cette technique.

Le diagnostic moléculaire par PCR nous a conduit au séquençage de deux souches, une appartenant à *L major* originaire d'Errachidia et l'autre appartenant à *L infantum* originaire de Taounate.

### **En perspective**

Le sujet de la leishmaniose est un large chantier à explorer dans tous les domaines épidémiologique, immunologique et génétique.

A cours terme, il serait intéressant de continuer dans ce domaine de diagnostic moléculaire afin:

- \*De réduire à zéro le taux de non-conformité par diagnostic moléculaire ;
- \*De pouvoir réussir la culture des leishmanies *in vitro* ;
- \*De calculer la sensibilité de la PCR en dosant la plus faible concentration de la culture des leishmanies capable de donner un résultat positif ;
- \*De séquencer les souches autochtones et déterminer leur appartenance ;
- \*De réaliser le diagnostic moléculaire dans la région de Fès avec des amorces spécifiques de l'espèce.

**Diagnostiquer c'est bien, mais lutter contre le parasite c'est mieux**

## DEDICACES

---

- ❖ Sensibilisation des responsables sur l'importance de la surveillance épidémiologique et les avantages du dépistage actif ;
- ❖ Formation continue des techniciens pour améliorer le ciblage des lésions ;
- ❖ Réalisation du diagnostic moléculaire ;
- ❖ Sensibilisation des personnels de santé ;
- ❖ Mener d'autres recherches.

## DEDICACES

---

# Références bibliographiques

## DEDICACES

---

1. **Abonnec, E., Paster, J.P., (1970).** Phlébotomes de la Haute- Volta (Wiptem, Pkycbodidm) Notes biologiques. Cah. orstom., Sér. Enf. Med. Parasitol.; VIII : 32-37.
2. **Adler S, Ber M.** Transmission of *L. tropica* by the bite of *P. papatasi*. *Ind J Med Res* 1941;29:803–9.
3. **Al-Jawabreh, A., Schnur, L.F., Nasereddin, A., Schwenkenbecher, J.M., Abdeen, Z., Barghuthy, F., Khanfar, H., Presber W., Schoenian, G. (2004).** The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *Leishmania major*, *Trop. Med. Int. Health* 9 (7), pp. 812–816.
4. **Alvarez, F., Robello, C., Vignali, M. (1994).** Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol biol evol* 11 (5): 790-802.
5. **Andrew, K., Githeko., Steve, W. (2000).** Lindsay,2 Ulisses E. Confalonieri 3 et Jonathan A. Patz Changement climatique et maladies à transmission vectorielle : une analyse régionale *Bulletin of the World Health Organization*, 78 (9) : 1136-1147.
6. **Antoine, J.C., Lang, T., Prina, E. (1999).** Biologie cellulaire de *Leishmania* ed ellipses.
7. **Ashford, D.A., Badaro, R., Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalis, M.G., David, J.R. (1993).** Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48, 1.8.
8. **Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F.P., Harris, E. (1999).** PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasitol.* 85: 181-187.
9. **Badaro, R., Falcofe, E., Badaro, F.S., Carvalho, E.M., Pedral-Sampaio, D., Barral, A., Carvalho, J.S., Barral-Netto, M., Brandely, M., Silva, L, Bina, J.C. Teixeira, R., Falcofe, R., Rocha, H., Ho, J.L.,**

## DEDICACES

---

**Johnson, W.D. (1990).** Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and Interferon gamma. *New engl. J. med* 322: 16: 21.

**10. Baldet, T. (2004).** Biologie et contrôle des maladies vectorielles émergentes, - Montpellier : CIRAD/EMVT.-30p.

**11. Bañuls, A.L., (1998).** Apport de la génétique évolutive à la taxonomie et à l'épidémiologie du genre *Leishmania*. PhD dissertation, University of Montpellier, France.

**12. Bañuls, A.L., Hide, M., Tibayrenc, M. (2002).** Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1: p. S9-13.

**13. Barnes, W.M. (1994).** PCR amplification of up to 35- kb DNA with high fidelity and high yield from lamda bacteriophage templates. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 91,2216- 2220.

**14. Belazzoug, S., Lanotte, G.,Maazoun, R.,Pratlong, E., Rioux, J.A. (1985).** Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent de la leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie, *Ann. Parasitol. Hum. Comp* 60, pp. 1-3.

**15. Bell, A.S., Ranford-Cartwright, L.C. (2002).** Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.*, 18 (8), 337.342.

**16. Belli, A., Rodríguez, B., Aviles, H., Harris, E. (1998).** Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 102-109.

**17. Bendriss, H. (2009).** Examen morphologique et identification moléculaire du parasite de la leishmaniose cutanée dans la wilaya de Fès. Mémoire du projet de fin d'étude master II gestion et conservation de la biodiversité.

**18. Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Lionel, F., Schnur., Charles, L., Jaffe. (2006).** Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1435-1439, Vol. 44, No. 4.

**19. Berman, J.D. (1988).** Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical

**20. mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*, 10, 560-586.**

## DEDICACES

---

21. Berrebi, J. (1936). La culture des leishmanies. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 25, 89-141.
22. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., K. Siminovitch, K.A., Olivier, M. (1999). Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol.* 29:3737-3744.
23. Boelaert, M., El safi, S., Jacquet, D., De Muynck, A., Van Der Stuyfet P., Le ray, D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 129–134.
24. Boer, A., Blodorn-Schlicht, N., Wiebels, D., Steinkraus, V., Falk, T.M. (2006). Unusual histopathological feature if cutaneous leishmaniasis identified by polymerase chain reaction specific for *Leishmania* on paraffin-embedded skin biopsies, *Br. J. Dermatol.* 155(4) 815-819.
25. Bourrée, P., Alireza, E. (2008). hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre (94).
26. Bray, R.S., Ashford, R.W., Bray, M.A. (1973). Parasite causing cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 345–348.
27. Bretagne, S *et al.* (2001). Real- Time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver of infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4), 828-831.
28. Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, m., Dedet, J.P., Winker, P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between old world and new world *Leishmania* genomes . *Gene* 222 (1): 107-17.
29. Chance, M.L., Peters, W., Shchory, L., (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania*. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 68 :307-316
30. Clayton, C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* 21 (8): 1881-8.
31. Charest, H., Zhang, W.W., Matlashewski, G. (1996). The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'- untranslated region. *J Biol Chem*; 271: 17081-90.

## DEDICACES

---

32. [Chouihi, E.](#), [Anui, F.](#), [Bouslimi, N.](#), ; [Siala, E.](#), [Selmi, K.](#), [Zallagua, N.](#), [Ben Abdallah, R.](#), [Bouratbine, A.](#), ; [Aoun, K.](#) (2009). Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses = Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis [Pathologie et biologie](#) vol. 57, n°3, pp. 219-224.
33. **Christophers, S.R., Short, H.E., Barraud, P.J. (1925).** The development of the parasite of Indian Kalaazar in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale & Bnmetti. *Ind. J. med. Res.* 12, 605-608.
34. **Christophers, S.R., Short, H.E., Barraud, P.J. (1926).** The anatomy of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Ann. & Brun. (Diptera). 1. The head and mouth parts of the imago. *Ind. med. Res. Mem.* 4, 177-204.
35. **Cortes, S., Rolao, N., Ramada, J., Campino L. (2004).** PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98(1):12-7.
36. **Cruz-Cubas, A.B., Rolland, L., Monjour, L. (1999).** Vaccination anti-leishmanienne *édition ellipses*.
37. **Dantas-Torres, F. (2006).** Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol.48 no.4 São Paulo.
38. **Daeninckk, F. (1998).** Etude comparative, en immunofluorescence directe, des formes promastigote et amastigote de *Leishmania infantum*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine Claude Bernard, Lyon, 89p.
39. **Dedet, J. P. (1999).** Les leishmanioses. Edition Ellipses, 253 p.
40. **Dedet, J.P., Pratlong, F. (2001).** Leishmanioses. In : Epidémiologie des maladies parasitaires (Ripert C. Ed.) Editions Médicales Internationales., 3 : 221-241.
41. **Dedet, J.P. (2009).** Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. EMC, Maladies infectieuses, 8-506-A-10.
42. **Degos, R. (1976).** Dermatologie 9ème édition du petit précis entièrement revue et complétée. Paris : Maloine., Vol. 19 (1333) 277P.
43. **Dereure, J., Pratlong, F., Lanotte, G., Rioux, J.A. (1986).** La leishmaniose viscérale autochtone au Maroc méridional. In: *Leishmania*.

## DEDICACES

---

Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. *Coll. Int CNRS/Inserm:37; 225.*

**44. Desjeux, P., Dedet, J.P. (1993).** Laboratoire de Parasitologie - Mycologie CHU Montpellier.

**45. Desjeux, P. (1999).** Les leishmanioses. Aspect de santé publique et lutte. *Edition Ellipses, 253p.*

**46. Develoux, M., Blanc, L., Garba, S., Mamoudou, H., Ravisse, P., Cenac, A. (1987).** Etude clinique et épidémiologique de la Leishmaniose au Niger. *Cahiers Santé ; 1 : 130-134.*

**47. Diarra, S.S., (2008).** Etude de l'incidence de la Leishmaniose cutanée et les facteurs de risque d'exposition parasitaire en zone d'endémie de Barouéli (Kémena et Sougoula) Région de Ségou (Mali). *Thèse : Médecine : Université de Bamako.*

**48. Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies (D.E.L.M) : Maroc en chiffre, 2006.**

**49. Dmbele, S. (1992).** la leishmaniose cutanée : Intérêt d'un traitement par le 4-4Diamino- Diphenyl Sulfone (à propos de 20 cas à l'Institut Marchoux) *Thèse médecine, Bamako., N°19, 44-46.*

**50. Duhamel, C., Dompmartin, A. (2009).** Microbiologie. CHU Caen.

**51. Dujardin, J.C., Bañuls, A.L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., de Doncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arevalo, J., Tibayrenc, M. (1995).** Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica. 59: 293-307.*

**52. Dujardin, J.C., Henriksson, J., Victoir, K., Brisse, S., Gamboa, D., Arevalo, J., Leray, D. (2002).** Molecular epidemiology and diagnosis of leishmania : what have we learnt from genome structure, dynamics and function, *trans R soc trop med hyg 96 suppl: S 81-6.*

**53. Dunan S et al., (1989).** Vaccination trials against canine visceral leishmaniasis. *Parasite immunology, 1989, 11:397-402.*

**54. [Elbihari,S.](#), [Cheema, S.H.](#), [El-hassan, A.M.](#) (1987).** Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 4. Canine cutaneous leishmaniasis in the Eastern Province. *Tropicale medicine et hygiene. [Volume 81, Issue 6](#), Pages 925-927.*

## DEDICACES

---

- 55. El Miri, H. (2009).** L'identification morphologique et moléculaire des vecteurs des leishmanies à la ville de Fès. Mémoire du projet de fin d'étude master II gestion et conservation de la biodiversité.
- 56. Escomel, E. (1917).** Le traitement de la leishmaniose américaine par l'oxyde d'antimoine. *Bull. soc. Path. Exot.*, 10 : 381- 384.
- 57. Evans, D.A. (1987).** Leishmania. In: *In-Vitro Methods for Parasite Cultivation*, Taylor A.E. & Baker J.R., eds. *Academic Press*, London, UK, 52-75.
- 58. Falcofe, E., Taranto, N.J., Remondegui, C.E., Dedet, J.P., Canini, L.M., et al (1993).** Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon- $\gamma$  and pentavalent antimonial compounds. *Trans. R. soc . trop. Med. Hyg.*, 88: 95-97.
- 59. Foley, H., Vialatte, C. (1914).** Existence dans le Sud marocain du bouton d'orient à l'état endémique. *Bull Soc Path Exo* 191;7:114-5.
- 60. Gardener, P.J., Chance, M.L., Peters, W., (1974).** Biochemical taxonomy of Leishmania. II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 68 :317-325.
- 61. Gardener, P.J., Shchory, L., Chance, M.L. (1977).** Species differentiation in the genus Leishmania by morphometric studies with the electron microscopic. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 71 : 147-155.
- 62. Gentilini, I.M., Duflo, B. et al. (1986).** Les Leishmanioses. In : Médecine Tropicale. Paris : *Editions Flammarion* : 125-133.
- 63. Gentilini, M., Dedet, J.P. (1999).** les leishmanioses. *Collection médecine tropicale*.
- 64. Gibson, W., Kanmogne, G., Bailey, M. (1995).** A successful backcross in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 69, 101-110.
- 65. Gott, J. M. (2003).** Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10583-10584.
- 66. Gradoni, L., Pozio, E., Bettini, S., Gramiccia, M. (1978).** Ricerca di leishmanie in cani selvatici delle provincia di grosseto. *Ig. Sanita publ.*, 34 : 257-268.

## DEDICACES

---

- 67. Gradoni, L. (2001).** An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology* 100, 87-103.
- 68. Grünfeld, J.P. (1998).** Dictionnaire de Médecine Flammarion / sous la direction de Serge Kernbaum. Paris : Flammarion, 1030p.- (collection Médecine-Sciences).- ISBN 2-257-16399-0.
- 69. Guarini, P., Peyromond, D., Piens, M.A., Rioux, J.P., Goderey, D.G., Lanote, G., Poratleng, F. (1914).** Présence de *Leishmania major* au Mali, Identification enzymatique d'une souche d'origine humaine, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* : 60-91.
- 70. Guessouss Idrissi, N., Riyad, M., Chiheb, S. (1996).** Les leishmanioses au Maroc, actualités épidémiologiques et diagnostiques. *Bulletin SMS M*, tome VII, numéro 2, pages 31-35.
- 71. Guessouss-Idrissi, N., Berrag, B., Riyad, M., Sahibi, H., Bichich, M., Rhalem, A. (1997).** *Leishmania tropica*: Etiologic agent of a case of visceralizing canine leishmaniasis in north Morocco. *Am J Trop Med & Hyg* 199;57:172-3.
- 72. Handman, E. (2001).** Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 229-243.
- 73. Harith, A.E., Slappendel, R.J., Reiter I., Van Knapen, F., Korte, P.D., Huigen, E., Kolk, A.H.J. (1989).** Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2252-2257.
- 74. Hide, M. (2004).** Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania (Leishmania) donovani* agent la leishmaniose viscérale. université de Montpellier II sciences et techniques de Languedoc.
- 75. Jarry, D.M. (1999).** Historique des leishmanioses et leurs complexes pathogènes p : 13-20.
- 76. Kabb, A.L., Opegard, L.M., McKenzie, B.A., Connell G.J. (2001).** A mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplast editing. *Nucleic Acids Res.* 29 , pp. 2575-2580.
- 77. Keilin, D., Tate, P. (1937).** A comparative account of the larvae of *Trichomyia urbica* Curtiz, *Psychodes albipennis* Zett., and *Phlebotomus argentipes* Ann. et Brun. (Diptera, Psychodidae). *Parasitol.* 29, 347-358.

## DEDICACES

---

- 78. Kenney, R.T., Sacks, D.L, Sypek, J.P., Vilela, L., Gam, A.A., Evans-Davis, K (1999).** Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 163: 4481-4488.
- 79. Khiati, M. (1992).** la leishmaniose viscérale Service de pédiatrie, hôpital Salim-Zemirli, Alger. *Journal de pédiatrie et de puériculture* n ° 8-1992.
- 80. Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T. J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., Perieres, J., Dubois, H. (1984).** Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 555–572.
- 81. Klippel, Monier-Vignard. (1922).** Premier cas de Kala-azar d'origine marocaine. *Soc Med Hop Paris*;20:72–85.
- 82. Kreutzer, R.D., Corredor, A., Grimaldi, Jr. G., Grogl, M., Rowton, E.D., Young, D.G., Morales, A., McMahon-Pratt, D., Guzman, H., Tesh, R.B. (1991).** Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg* 44: 662-675.
- 83. Laamrani el idrissi, A., Lyagoubi, M., Ayoujil, M., Mouki, B., Barkia, A., Lhayati, M. (1997)** lutte contre les leishmanioses. Publication du ministère de santé, *MAROC.OMS*.
- 84. Lahiri, D.K. et al. (1993).** DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical genetics* 31, 321-329.
- 85. Le Fichoux, Y., Quaantajf., Afeuvre, J.P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, .I, Rousseau, D., Kubar, J. (1999).** Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J. Clinical Micorbiology*, 37,1953-1957.
- 86. Léger, N., Depaquit, J. (1999).** Les Phlébotomes. In Dedet J-P., Les Leishmanioses, *Ellipses Ed.*, Paris,89-108.

## DEDICACES

---

- 87. Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S., Zipursky., Matsudaira. P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000).** Molecular Cell Biology, 4th edition. [\*Molecular Cell Biology\*](#).
- 88. Mancianti, F., Falcone, M.L., Giannelli, C., Poli, A. (1995).** Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **59**, 13–21.
- 89. Marfurt, M., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P., Felger, I. (2003).** Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*.
- 90. Marie, C., Fevre, L., Favennec, P., Courville, J., Bernet., H. (2006).** Leishmaniose cutanée au cours d'une polymyosite Cutaneous leishmaniasis in polymyositis [\*La Revue de Médecine Interne Volume 27, Issue 7\*](#), , Pages 566-568.
- 91. Marty, P., Le Fichoux, Y., Pratlong, F., Lanotte, G., Rioux, J.A., Lacour, J.P. (1989).** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in young Moroccan child observed in Nice France. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 198;83:510.
- 92. Matte, C., Olivier, M. (2002).** Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis* ; 185: 673-81.
- 93. Melby, P. C., Ogden, G. B., Flores, H. A., Zhao, W., Geldmacher, C., Biediger, N. M., Ahuja, S. K., Uranga, J., Melendez, M. (2000).** Identification of Vaccine Candidates for Experimental Visceral Leishmaniasis by Immunization with Sequential Fractions of a cDNA Expression Library. *Infect. Immun.* 68: 5595-5602
- 94. Meredith, S. E. O., Zijlstra, E. E., Schoone, G. J., Kroon, C. C. M., Van Eys, G. J. J. M., Schaeffer, K. U., El Hassan, A. M., & Lawyer, P. G. (1993).** Development and application of the polymerase chain reaction for

## DEDICACES

---

the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Arch Inst Pasteur Tunis* 70, 419–431.

**95. Miller, S.A. et al. (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16, 1215.

**96. Mitchell, G. F., and E. Handman. (1986).** The glycoconjugate derived from a *Leishmania major* receptor for macrophages is a suppressogenic, diseasepromoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 8:255–263.

**97. Molyneux, D.H., Ashford, R.W. (1983).** The Biology of Trypanosoma and Leishmania. Parasites of Man and Domestic Animals, Taylor & Francis, London, UK, 185–250.

**98. Murray, H.W., Berman, J.D., Wright, S.D. (1988).** Immunochemotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection: gamma interferon plus pentavalent antimony. *J. inf. Dis.*, 157: 973-978.

**99. Musso, O., Sommer, P., Drouet, E., Cotte, L., Neyra, M., Grimaud, J., Chevallier, M. (1996).** *In situ* detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods, *J. Vir. Meth.* 56 pp. 125–137.

**100. Myler, P.J., Sisk, E., Mcdonagh, P.D., Martinez-calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S.M., Yan, S., Madhulbala, R., Ivens, A., Stuart, K., (2000).** Genomic organization and gene function in leishmania. *Biochem soc trans* 28 (5): 527- 531.

**101. Nadim, A., Navid-hamidid, A., Javadian. E., Tahvildari bidruni, G.H., Amini, H. (1978).** Present status of kala-azar in Iran. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 27 :25-28.

**102. Noyes, H. (1998).** Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 657-661.

**103. Nozais, J.P. (1996).** Fascioloses (distomatoses à *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*). In «NOZAIS JP, DATRY A, DANIS M - Traité de parasitologie » .Pradel ed, pp 651-670.

**104. Oliveira, F.S., Pirmez, C., Pires, M.Q., Brazil, R.P., Pacheco, R.S. (2005).** PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *V et Parasitol* 129: 219-227

## DEDICACES

---

105. OMS., (1990). Maladies tropicales, Progrès de la recherche 1989-1990 : deuxième rapport du programme TDR. -Genève : OMS : 79-87.
106. OMS., (1997). lutte contre les leishmanioses.
107. OMS., (2000). Leishmania and HIV co-infection. *Lepr. Rev.* 71, 104-5.
108. Osman, O.F., Oskam, L. Zijlstra, E.E. (1997). Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2454-2457.
109. Ouellette, M., Drummelsmith, J., El-fadili, A., Kundig, C., Richard, D., Goy, G. (2002). Pterin transport and metabolism in leishmania and related trypanosomatid parasites. *Int J parasitol* 32 (4): 385-98.
110. Ozbel, Y., Oskam, L., Ozensoys, S., Turgay, N., Alkan, M.Z., Jafee, C.L., Ozel, M.A. (2000). A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.*, 74, 1-6.
111. Panton, L.J., Tesh, R.B., Nadeau, K.C, Beverley, S.M. (1991). A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *J Protozool* 38: 224-228.
112. Peters, W., Killisk-Kendrick, R. (1987). The leishmaniasis in biology and medicine, Vol. 1 : Biology and Epidemiology. *Academic Press*, London, UK.
113. Pradinaud, R., Servan, G., Saint-marie, D., Girardeau, I., Cotz, W., Will, F. (1991). Bilan de 10 années de traitement de la leishmaniose tégumentaire par la pentamidine en Guyane française : à propos de 1025 cas/nouv. *Dermatol.*, 10 : 456.
114. Rafati, S., Gholami, E., Hassani, N., Ghaemimanesh, F., Taslimi, Y., Taheri, T., Soong, L. (2000). *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine.* 22;25 (21) :4159-69.
115. Raymond, L.J. (2003). *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) – a perplexing parasite. *Folia parasitologica* 50: 241-250
116. Remlinger, P. (1921). Un cas de Kala-azar infantile observé au Maroc. *Arch Inst Pasteur Afr Noi* ;1:240-1.
117. Rhajaoui, M., Abdelmajeed, N., Fellah, H., Azmi, K., Amrir, F., Al-jawabreh, A., et al. (2007). Molecular typing reveals emergence of a

## DEDICACES

---

new clinic-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Em Infec Dis*;3(9):1358–60.

**118. Rhajaoui, M. (2009).** Les leishmanioses humaines au Maroc : une diversité nosogéographique G Model Patbio-2825; No of Pages 4 *Revue générale*.

**119. Rioux, J.A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R., Pratlong, F. (1980).** Parasitologie animale-*Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C. R. Acad. Sc. Paris*. 291, 701-703.

**120. Rioux, J.A., Petter, F., Akalay, O., Lanotte, G., Ouazzani, A., Seguignes, M., Meriones shawi. (1982).** Réservoir de *Leishmania major* dans le Sud marocain. *C R Acad Sci* ;294:515–7.

**121. Rioux, J.A, Lanotte, G., Petter, F., Derreure, J., Akalay, O., Pratlong, F. (1986).** Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. Coll. Int. CNRS/Inserm* 1986b:365–95.

**122. Ross, R. (1903).** Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J* ; 2:1261-1262.

**123. Sacks, D.L. (2001).** Leishmania–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microb.* 3, 1–9.

**124. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

**125. Sands, M., Kron, M.A., Brown, R.B. (1985).** Pentamidine : a review, *Rev Inf Dis* 7 pp. 625–634.

**126. Schneider, P., Rosat, J.P., Ransijn, A., Ferguson, M.A., McConville, M.J. (1993).** Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Biochem J* 15;295 (Pt 2):555–564.

**127. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD., (2003).** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358.

## DEDICACES

---

128. Short, H.E., Smith, R.A., Swaminath, C.S. (1932). Miscellaneous experiments with *Phlebotomus argentipes* Ann. & Brun. in relation to transmission of Kala azar. *Ind. Med. Iles. Mem.* 90-102.
129. Soto, J., Buffet, P., Grogl, M., Berman, J. (1993). Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. *Am J Trop Med Hyg* 50, 107-111.
130. Souza, A.E., Bates, P.A., Coombs, G.H., Mottram, J.C (1994). Null mutants for the imcpa cysteine proteinase gene in *Leishmania Mexicana*. *Mol biochem parasitol* 63 (2) : 213-20.
131. Spitzer, N., Jardim, A., Lippert, D., Olafson, RW. (1999). Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine*. 17;17(11-12):1298-300.
132. Steinhoff, U.M., et al. (1994). Lysozyme-encoding bovine c DNAs from neutrophilic granulocytes and mammary gland are derived from a different gene than stomach lysozymes. *Gene* 143 (2), 271- 276.
133. Stiles, J.K., Hicock, P.I, Shah, P.H., Mead, J.C. (1999). Genomic organization transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann trop med parasitol* 93 (8): 781-807.
134. Thakur, C.P., Olliaro, P., Gothoskar., S., Bhowmick, S., Choudhury, B.K., Prasad, S., Kumar, M., Verma, B.B. (1992). Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (= paromomycin) – antimonial combination, a pilot study in Bihar, India. *Trans. R. soc. Trop. Med. Hyg.*, 86: 615-616.
135. Thakur, C.P., Sinha, G.P., Sharma, V., Pandey, A.K., Kumar, M., Verma, B.B., (1993). Evaluation of amphotericin B as a first line drug in comparison to sodium stibogluconate in the treatment of fresh cases of kala-azar. *Indian. J. med. Res.*, 97: 170-175.
136. Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 87:2414–2418. [CrossRef](#), [PubMed](#), [CSA](#).
137. Turco, S.J., Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* , 46:65-94.

## DEDICACES

---

- 138. Ullu, E., Tschudi, C. (1991).** Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc natl acad sci USA* 88 (22): 10074-8.
- 139. Victoir, K., De Doncker, S., Cabrera, L., Alvarez, E., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Le Ray D., Dujardin, J.C. (2003).** Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 80–87.
- 140. Walters, L.L., Irons, K.P., Guzman, H., Tesh, R.B. (1993).** Formation and composition of the peritrophic membrane in the sand fly, *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* ;30:179–198.
- 141. Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P., Bastien, P. (1996).** The leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic acids res* 24 (9): 1688-94.

# DEDICACES

---

Annexes

# DEDICACES

## Annexe 1 : Fiche des renseignements

MINISTERE DE LA SANTE  
INSTITUT NATIONAL D'HYGIENE  
DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE  
UNITE DE LEISHMANIOSE

Code:

### FICHE DE RENSEIGNEMENTS Origine: LRDEHM-Fès

Nom:  Prénom:   
Age:  Sexe:   
Province:  Secteur:   
Localité:

#### TYPE DE LEISHMANIOSE:

1-LEISHMANIOSE CUTANEE:

Nombre de lésions:   
Localisation:   
Aspect:

2-LEISHMANIOSE VISCERALE:

SIGNES CLINIQUES:

EXAMENS BIOLOGIQUES:  Parasitologie:   
Sérologie:

Nombre de lames envoyées:   
Date d'envoi:

Numéro de lame	Date d'examen	Résultat	Observations

Nom de technicien(ne):

Cachet du chef de service

# DEDICACES

## Annexe 2 : Fiche signalétique

وزارة الصحة  
Ministère de la Santé  
مكافحة الأمراض الطفيلية  
Lutte contre les Maladies Parasitaires

MP.1

**Bon d'Examen Individuel**

N° 062494 /D

الإسم Nom	<input type="text"/>	الصف Sexe	<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
السن Age	<input type="text"/>	إسم رب الأسرة Nom du chef de foyer	<input type="text"/>
رقم المنزل Maison N°	<input type="text"/>	N° Code	رقم <input type="text"/>
السكنى Localité	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
المستوصف Secteur	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
الدائرة الصحية Circons.Sanitaire	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
الإقليم Province/Préfecture	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dépistage	Actif <input type="checkbox"/>	Passif <input type="checkbox"/>	Autre <input type="checkbox"/>

Programmes	Nature de l'examen ou du prélèvement	Date du prélèvement	Date d'examen	Résultat
Paludisme	Goutte épaisse			
Bilharziose	Prélèvement d'urine			
Leishmaniose	Sérologie			
	Frottis de moelle			
	Frottis cutané			
	Biopsie			

N° du laboratoire :

Observations : .....

## Annexe 3 : Préparation des solutions

# DEDICACES

---

## **Tampon de lyse**

- 1,48 g NaCL
- 10 ml EDTA (0.5M, pH = 8.0)
- 25 ml Tris. Cl (1M , pH = 7,4)
  - ☞ Complétez le volume à 500 ml avec l'eau distillée et aliquote dans des tubes de 50 ml ;
  - ☞ Rajouter dans le tube à utiliser 10 SDS (45ml tampon de lyse + 5ml SDS à 10) ;
  - ☞ Stérilisez par autoclavage pendant 15 min dans l'autoclavage à vapeur. Solution stérile à 4°C température ambiante.

## **TE (pH= 8.0)**

- 2 ml 1M Tris-HCL, pH = 8.0
- 400 µl 0.5 M EDTA, pH = 8.0
  - ☞ Ajouter 170 ml d'eau ;
  - ☞ Vérifier le pH et ajuster le à 8.0 avec 1n HCl ;
  - ☞ Complétez alors le volume à 200 ml.

Stérilisez par autoclavage pendant 20 minutes dans la phase liquide. Stocker le tampon à température ambiante.

## **Tampon TAE (Tris-acetate-EDTA)**

Solution de stockage, 50x :

- 57,1 ml acide acétique Glacial
- 100 ml 0,5 M EDTA (pH= 8.0)
- 242 g Tris base
- Ajuster à 1 litre avec H<sub>2</sub>O

TAE est d'habitude préparé et stocké à une concentration 10x ou 50x (solutions de stockage). Le pH du tampon de stockage concentré devrait être approximativement 8,3.

Diluer le tampon de stockage (concentré) juste avant son utilisation. Sa concentration dans le gel et dans la cuve doit être la même.

## **Bromure d'éthidium BET (10mg /ml)**

# DEDICACES

---

Il est généralement commercialisé prêt à l'emploi, si non on peut le préparer. Solution de stockage est la solution de travail 0,5µg /ml

- ☞ Ajouter 100 mg de bromure d'éthidium à 10 ml de H<sub>2</sub>O.
- ☞ Agiter avec un barreau magnétique jusqu'à plusieurs heures pour s'assurer de sa dissolution complète
- ☞ Envelopper le mélange obtenu par du papier aluminium ou transférer la solution de 10 mg /ml dans un flacon noir. Et gardé à température ambiante.

## **Solution de charge**

Il est généralement commercialisé prêt à l'emploi. Si non on peut le préparer :

- 0,1g bleu de Bromophénole
- 15 ml Glycérol
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 50 ml. Stocker à 4°C.

## ***Remarques :***

- L'EDTA est un agent chélateur des cations (Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup>) qui sont des cofacteurs d'ADNase donc il inhibe l'action de cette enzyme sur l'ADN ;
- Le NaCl crée une pression osmotique et favorise la précipitation ;
- Le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) est un détergent, il permet la désorganisation de la double couche des phospholipides membranaires des cellules pour libérer les acides nucléiques ;
- La protéinase K est une protéase permettant la dissociation des protéines.
- Le phénol est un déprotéinisant très puissant ;
- Le chloroforme élimine les traces de phénol,
- L'éthanol permet la précipitation de l'ADN.

# Webographies

# DEDICACES

---

1. [www.parasito.montpellier-wired.com/proto/phlebotome2.jpg](http://www.parasito.montpellier-wired.com/proto/phlebotome2.jpg)
2. [www.gruppoleishmania.org/fr/downloads](http://www.gruppoleishmania.org/fr/downloads)
3. [www.sante.univnantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure1.jpg](http://www.sante.univnantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure1.jpg)
4. [www.sante.univ-nantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure2.jpg](http://www.sante.univ-nantes.fr/med/ticem/umvf/leishmanioses/site/html/images/figure2.jpg)
5. [www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp](http://www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp)
6. [www.leish.ifrance.com/Utilitaires/clinique.htm](http://www.leish.ifrance.com/Utilitaires/clinique.htm)
7. [www.biomedicale.univ-paris5.fr/ifr95/images/appareil\\_sequenceur2.gif](http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/ifr95/images/appareil_sequenceur2.gif)
8. [www.medicopedia.net](http://www.medicopedia.net)