

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou**  
Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques  
Département de biologie animale et végétale  
**Institut Pasteur d'Algérie**



**Mémoire de fin d'étude**

En vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option: parasitologie

**Thème**

**Etude de la diversité génétique des  
*Leishmanias* dans la wilaya de Tizi Ouzou**

Présenté par : M<sup>elle</sup> MAZOUNI Siham M<sup>me</sup> OULLADJ Sonia

Soutenu publiquement le 04 juillet 2018 devant la commission d'examen

Mme BOUKHEMZA-ZEMMOUIRI Nabila,	Maitre de conférences A	UMMTO	Présidente
Mme EDDAIKRA-LAAMA Naouel,	Maitre de recherche	IPA	Promoteur
Mme ZERROUKI-DAOUDI Nacira,	Professeur	UMMTO	Co-promoteur
Mr BOUKHEMZA Mohamed,	Professeur	UMMTO	examinateur
Melle ABDELLAOUI Karima	Maitre Assistante A	UMMTO	examinatrice

2017-2018

## Remerciements

Au terme de notre travail nous tenons à remercier « Allah » le miséricordieux de nous avoir donné la force, la volonté et le courage d'achever ce travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et profonde gratitude à Mme EDDAIKRA Naouel, Maître de recherche à l'institut Pasteur d'Algérie, pour nous avoir fait l'honneur d'encadrer et diriger notre travail ainsi que pour son suivi son engagement et ses orientations durant l'élaboration de ce mémoire.

Nous remercions notre Co-encadreur Mme ZERROUKI – DAOUDI Nacira, Professeur et Présidente du comité scientifique de l'UMMTO, pour son soutien, ses précieux conseils, ses orientations bienveillantes pour la réalisation de ce travail.

Nous remercions Mr BOUKHEMZA Mohamed, Professeur à l'UMMTO, d'avoir accepté de présider le jury ainsi que ses efforts, ses conseils et son aide afin de mener à bien ce master.

Nous remercions également Mme BOUKHEMZA –ZEMMOURI Nabila, MCA à l'UMMTO, et Melle ABDELLAOUI Karima, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions vivement le Dr MOULOUA Abdel-Kamel pour ces précieux conseils, son extrême amabilité et son aide durant ces deux dernières années.

Nous tenons à remercier le Laboratoire du Dr CHEREF et le Laboratoire du Dr BOUDJEBLA pour leur collaboration.

Nous remercions également le Dr DJRBOUA Dr SEKLAOUI N. et le Pr HAMRIOUI B. pour l'aide qu'ils nous ont apporté pour réaliser nos recherches.

Nous ne remercieront jamais assez Mme DJENNAD-KHERACHI Ihcène, chargée d'études au sein du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie, pour son aide précieuse, son soutien et ses encouragements.

Nous remercions Mr HARAT Zoubir de nous avoir acceptées au sein de son laboratoire.

Nous remercions Mme BENIKHLEF Razika chercheur biologiste au sein du laboratoire d'éco-épidémiologie de l'institut Pasteur d'Algérie pour l'aide qu'elle nous a apporté durant notre période de stage.

Nos remerciements vont également à toute l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie.

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

## Liste des abréviations

---

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique

BHI: Brain Heart Infusion.

CC : Concentration.

CHU: Centre Hospitalo Universitaire.

DAT: Test d'Agglutination Direct.

DO: Densité Optique.

EDTA : Ethylène diamine tétra acetique.

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

EMTM: Evan's Modified Tobie's Medium.

HRM: High ResolutionMeltinganalysis

IFI: Immuno Fluorescence Indirecte.

IPA: Institut Pasteur d'Algérie.

*L: Leishmania.*

LC : Leishmaniose Cutanée.

LCM: Leishmaniose Cutané-Muqueuse.

LCZ : Leishmaniose Cutanée Zoonotique.

LV : Leishmaniose Viscérale.

M: Masse Molaire.

MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de Magnésium.

MGG: May-Grunwald-Giemsa.

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NNN: Novy, McNeal, Nicolle.

OMS: Organisation Mondial de la Santé.

PCR: Polymerase Chaine Reaction.

PED: Pays En voie de Développement.

## Liste des abréviations

---

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

T.O: Tizi-Ouzou.

TRIS : tris hydroxyméthylaminométhane

## Liste des figures

---

<b>Fig. 02 :</b> Forme amastigote de <i>Leishmania</i> .....	3
<b>Fig. 02 :</b> Forme promastigote de <i>Leishmania</i> .....	3
<b>Fig. 03 :</b> Phlébotome femelle.....	4
<b>Figure.04 :</b> Cycle de transmission de <i>Leishmania</i> .....	5
<b>Figure. 05 :</b> Distribution de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie.....	7
<b>Figure.06 :</b> Résultats du nombre de parasite par macrophage par lames de frottis de diagnostic.....	16
<b>Figure.07:</b> résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN à partir des lames, des souches et des prélèvements sanguins.....	18
<b>Figure.08 :</b> Résultats des Rapports des DO de l'ADN extraits des échantillons de sang, de souches et de lames collectés dans la région de Tizi Ouzou.....	19
<b>Figure.09:</b> Distribution des concentrations des ADN obtenus à partir des lames, du sang et des souches de la région de Tizi Ouzou.....	20
<b>Figure.10 :</b> Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des 15 pools d'ADN ses prélèvement sanguins.....	21
<b>Figure.11 :</b> Résultats de la HRM des souches références sur l'appareil de PCR en temps réel Light cycliser.....	22
<b>Figure.12 :</b> Résultats de la HRM des souches sur l'appareil de PCR en temps réel Light cycliser.....	22
<b>Figure.13 :</b> Résultats de la HRM des frottis de lames.....	23
<b>Figure.14 :</b> Nombre de cas de LC dans la wilaya de Tizi Ouzou par commune de 2007 à 2017.....	24
<b>Figure.15 :</b> Nombre de cas de LV dans la wilaya de Tizi Ouzou par commune de 2007 à 2017.....	25
<b>Figure 16 :</b> Nombre de cas de LC et LV dans la wilaya de Tizi Ouzou de 2007 à 2017.....	25

## Liste des tableaux

---

<b>Tab. 01</b> : Tableau des prélèvements ayant été faits et analysés dans cette étude.....	<b>9</b>
<b>Tab.02</b> : Les produits du mix et leurs rôles.....	annexe page 2
<b>Tab.03</b> : Les conditions PCRJW11-12 (préparation du mix).....	annexe page 2
<b>Tab.04</b> : Programme du thermocycleur pour JW 11-12 .....	annexe page 3
Tab. 05 : Les échantillons PCR ITS 1 (Préparation du mix).....	annexe page 4
Tab. 06 : Programme du thermocycleur pour ITS 1.....	annexe page 4
<b>Tab.07</b> : Charge parasitaires des frottis.....	annexe page 5
<b>Tab.08</b> : Résultats des D.O sur Nanodrop à partir des prélèvements sanguins.....	annexe page 5
<b>Tab.09</b> : Résultats des D.O sur Nanodrop à partir des souches.....	annexe page 6
<b>Tab. 10</b> : Résultats des D.O sur Nanodrop à partir de lames.....	annexe page 6

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

INTRODUCTION.....1

## Chapitre 1 : Généralités

1	Les formes cliniques de la leishmaniose .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1	La leishmaniose viscérale (LV, également appelée kala-azar) ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.2	La leishmaniose cutanée (LC).....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.3	La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2	Agent pathogène : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1	Morphologie et biologie : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1.1	Les amastigotes :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1.2	Les promastigotes :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3	Le vecteur : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4	Réservoir :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
5	Cycle de transmission des leishmanies :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6	Répartition géographique.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.1	Dans le monde :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
6.2	En Algérie :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
7	Diagnostic : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
8	Traitement :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
8.1	Antimoniés pentavalents :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
8.2	Amphotéricine B liposomale : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

8.3	Pentamidine :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
8.4	Miltéfosine :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
8.5	Autres antileishmaniens :.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
9	Le portage asymptomatique de la leishmaniose : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
10	Prévention et lutte .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1	Matériel biologique .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1	Souches .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1.1	Lames defrottis.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.1.2	Prélèvements Sanguins .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2	Méthodes.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1	Prélèvement.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2	Isolement et culture .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.3	Extraction d'ADN .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.3.1	Lames .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.3.2	Souches.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.3.3	Sang .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4	Evaluation de la quantité d'ADN.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.1	Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.2	La PCR (Polymérase Chain Reaction) .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.4.3	HRM 7RNA-SL .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.5	Etude de l'épidémiologie de la LC et la LV .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.6	Analyse statistique.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Chapitre 3 : Résultats et discussion

1	Charges parasitaires des frottis .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2	Qualité et quantité de l'ADN total des frottis, souches et sang.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1	Sur gel d'agarose.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2	Sur Nanodrop.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.1	Qualité de l'ADN extrait .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2.2	Concentration des ADN.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3	Résultats des PCR .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

3.1	Résultats de la PCR JW 11, JW12 des prélèvements sanguins ...	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.2	Résultats des PCR ITS1 des souches .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.3	Résultats de la HRM des frottis de lames et des souches .	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
4	Données épidémiologiques rétrospectives.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
	Conclusion.....	30
	Références bibliographiques	
	Annexes	

# Introduction

## Introduction

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'homme et à certains animaux (anthropozoonose), elles sont causées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, et transmises à l'homme par la pique d'un insecte vecteur, le Phlébotome femelle hématophage (**Dedet, 2013**).

Dans le monde il existe trois formes de leishmaniose, en fonction de l'espèce parasitaire responsable; la leishmaniose cutanée, la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose viscérale. Malgré les avancées de la recherche, les leishmanioses restent encore un véritable problème de santé publique, d'après les données de l'organisation mondiale de la santé 350 millions de personnes de la population mondiale sont exposées dans 98 pays à ce risque infectieux (**Eugénie Gay, 2015**), avec une incidence de 1.3 million de nouveaux cas par an, et une mortalité annuelle de 20000 à 30000 personnes (**OMS, 2015**). Mais ces chiffres officiels semblent largement sous-évalués car il existe un portage asymptomatique important (**OMS, 2015**).

L'Algérie est parmi les pays les plus touchés par cette zoonose, qui est classée comme maladie à déclaration obligatoire, elle concernée par deux formes cliniques sévissant à l'état endémique : la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée.

La grande Kabylie est connue comme étant le foyer le plus actif de la leishmaniose viscérale (**Dedet et al., 1977**). Il faut noter que ce foyer regroupe à lui tout seul près de 50% des cas de leishmaniose viscérale recensés. (**Harrat et al., 1995**).

A travers ce travail, nous proposons en premier lieu une étude de la diversité génétique de *Leishmania* dans la région de Tizi Ouzou, en second lieu nous nous intéressons à l'existence de porteurs asymptomatique de la leishmaniose chez des donneurs de sang, enfin nous avons établi une enquête statistique rétrospective durant la période 2007-2018, dans le but de préciser certains paramètres épidémiologiques.

# Généralités

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'homme et à certains animaux (anthropozoonose). Elles sont causées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, et transmises à l'homme par la pique d'un insecte vecteur, le phlébotome femelle hématophage (**Dedet, 2013**).

Dans le monde il existe trois formes de leishmaniose, en fonction de l'espèce parasitaire responsable; la leishmaniose cutanée, la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose viscérale.

## **1. Les formes cliniques de la leishmaniose**

### **1.1 La leishmaniose viscérale (LV, également appelée kala-azar)**

Elle est mortelle en l'absence de traitement. Caractérisée par des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépato splénomégalie (augmentation simultanée du volume du foie et de la rate) et une anémie. Cette forme est fortement endémique dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est (**OMS, 2018**).

### **1.2 La leishmaniose cutanée (LC)**

C'est la forme la plus fréquente, elle provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices définitives et des handicaps sévères. Environ 95% des cas de la LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. Plus des deux tiers des cas surviennent dans les 6 pays suivants: l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, la Colombie, la République arabe Syrienne et la République islamique d'Iran (**OMS, 2018**).

### **1.3 La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)**

Elle détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Plus de 90% des cas de leishmaniose muco-cutanée surviennent au Brésil, dans l'État plurinational de Bolivie et au Pérou (**OMS, 2018**).

## **2. Agent pathogène**

### **1.4 Morphologie et biologie**

Le parasite est un protozoaire flagellé tissulaire qui présente au cours de son cycle deux stades évolutifs distincts. Le stade amastigote, sans flagelle extériorisé, est intramacrophagique et retrouvé chez les hôtes vertébrés dont l'homme; et le stade promastigote, libre et mobile grâce à son flagelle, est retrouvé dans l'intestin du phlébotome et dans les milieux de culture.

#### **1.4.1 Les amastigotes**

Les formes amastigotes sont de forme ovoïdes, mesurent 2  $\mu\text{m}$  à 6  $\mu\text{m}$ . Ils présentent en microscopie optique, après coloration au May-Grunwald-Giemsa, deux inclusions pourpres caractéristiques : le noyau, arrondi, et le kinétoplaste (origine du flagelle) en bâtonnet plus sombre. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire, dans la ou les vacuoles parasitophores du cytoplasme des macrophages pour les amastigotes ; libérées ensuite par lyse du macrophage, les *Leishmanias* sont phagocytées et évoluent dans d'autres macrophages (fig. 01).



**Fig. 01** : forme amastigote au microscope optique. GrX100 (IPA)

## 1.4.2 Les promastigotes

Les formes promastigotes sont allongées, mesurant 10  $\mu\text{m}$  à 25  $\mu\text{m}$  de longueur. Le noyau est central, le kinétoplaste est en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure (fig. 02).

En culture entre 24 et 28°C, les amastigotes se transforment en promastigotes comme dans l'intestin du vecteur. Pendant la phase de culture exponentielle les promastigotes dits procycliques, se multiplient par scissiparité longitudinale.

Quand la culture atteint son plateau, la majorité des parasites ont évolué en promastigotes métacycliques. Ces derniers représentent la forme infectieuse pour les macrophages mais qui ne se multiplient plus à moins qu'ils ne soient phagocytés et évoluent en amastigotes.



**Fig. 02** : Forme promastigote au microscope optique. GrX100 (IPA)

## 3. Le vecteur

Ce sont des Diptères nématocères de la famille des Psychodidae. Les phlébotomes sont des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps à l'état adulte : 1.5 à 4mm). De

## Généralités

---

couleur claire, en général jaune paille, leur corps est couvert de poils et ils présentent des ailes lancéolées dressées (fig.03).

Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement préimaginal (œuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide. Les biotopes de reproduction ne sont connus que pour peu d'espèces, ce qui constitue une limite très sérieuse à l'établissement de programmes de lutte (**Dedet, 2009**). Seule la femelle est hématophage, et assure la transmission des *Leishmanias*. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier. Il existe plus de 600 espèces de phlébotomes réparties dans presque toutes les régions biogéographiques du monde. Parmi elles, sur environ 70 suspectées vectrices, une trentaine seulement sont des vecteurs prouvés d'espèces anthropotropiques de *Leishmania*. Elles appartiennent aux genres *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (**Dedet, 2009**).



**Fig. 03** : Phlébotome femelle (**Poinsignon et al., 2005**).

#### 4. Le réservoir

Les réservoirs naturels de *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez les quels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclés. Les mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres, selon les espèces de *Leishmania*: carnivores, rongeurs, marsupiaux édentés, primates ou périssodactyles. Dans certains cas, tel que la LV à *L. donovani* et la LC à *L. tropica*, l'homme est l'unique réservoir (**Dedet, 2009**).

#### 5. Cycle de transmission des *Leishmanias*

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, l'insecte phlébotome et un mammifère. Ils se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes. D'après la figure 4 lorsque la femelle du phlébotome infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère (1), elle salive au site de piqûre et régurgite le sang qui se contamine au contact des parasites, sous forme promastigote, qui obstruent la valvule stomodéale.

Chez l'hôte mammifère, *Leishmania* infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages) du système phagocytaire mononuclé (2) et se transforme en

amastigote (3). Les amastigotes, nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores, où elles se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé (4). Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit.

Le cycle est achevé lorsqu'une autre femelle de phlébotome prend un repas sanguin du site d'infection et prélève des phagocytes contenant *Leishmania* (5). Dans le tube digestif de l'arthropode (6), les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures (7). Ces promastigotes se multiplient et migrent vers les glandes salivaires et la trompe en attendant un nouveau repas sanguin (8) (Boussaa, 2008).

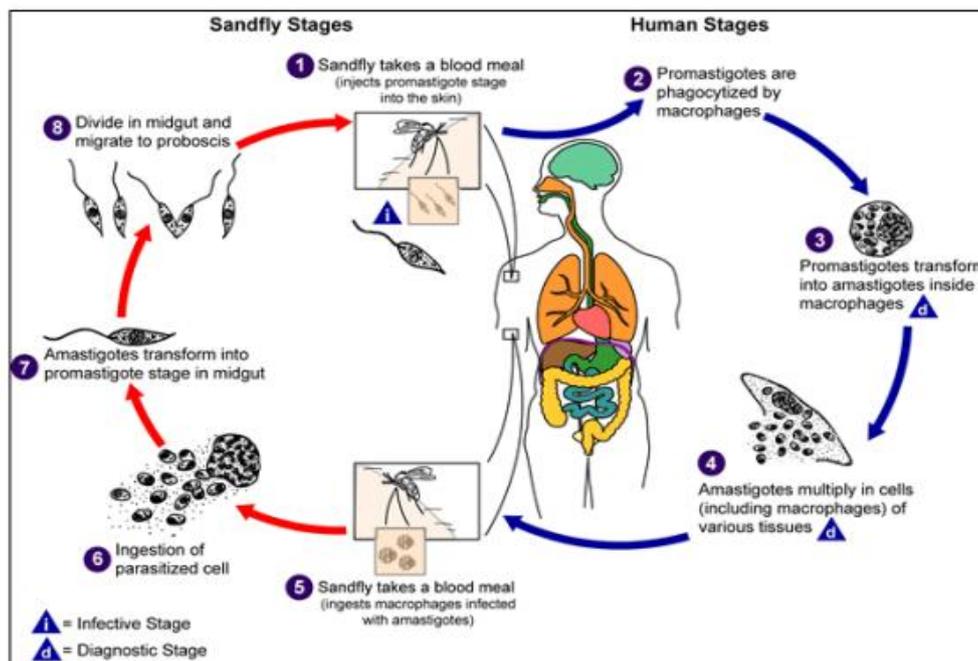


Fig. 04 : Cycle de transmission de *Leishmania* ( [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx) ).

## 6. Répartition géographique

### 6.1. Dans le monde

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 développement (Antoine et al, 1999). Les différentes manifestations cliniques sont observées dans l'ancien et le nouveau monde, 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 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 (Alvar et al, 2012).

### 6.2. En Algérie

L'agent responsable de la forme zoonotique de la LC(LCZ) est *L. major*. En Algérie, la leishmaniose cutanée à *Leishmania major* pose un problème de santé publique. C'est une maladie saisonnière qui s'exprime entre octobre et mars et qui sévit en mode endémique. Autrefois dénommée "clou de Biskra", décrite pour la première fois par **Hamel en 1860**, elle sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord saharienne correspondant à l'étage bioclimatique aride et semi-aride .Elle est retrouvée dans le Sahara et dans les régions steppiques (**Eddaikra.2016**).L'incidence de cette forme était de plus de 20000 cas en2010 (**REM,2010**).

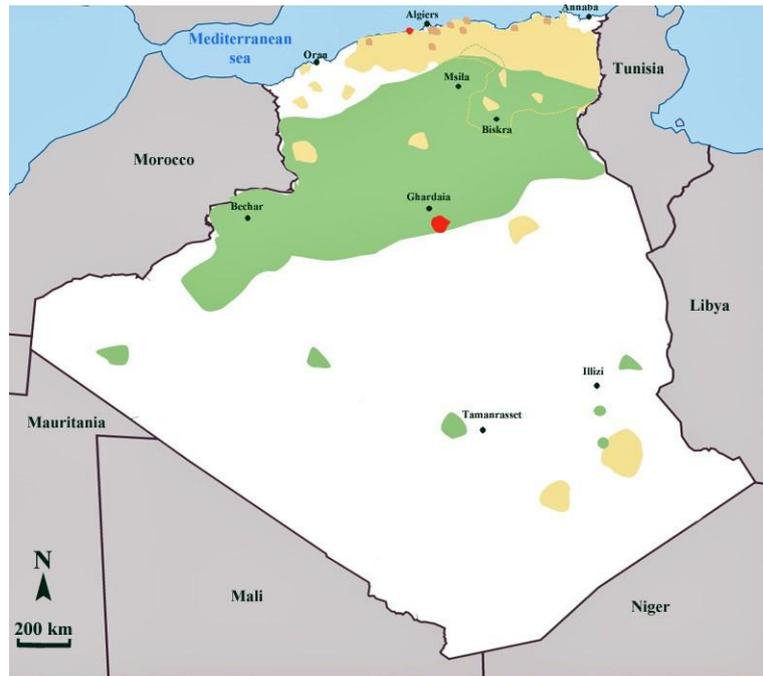
L'insecte vecteur pour la LC à *L. major* est *Phlebotomus papatasi* (**Izri et al., 1992**) et les réservoirs sont des rongeurs sauvages des régions désertiques et steppiques: *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* (**Belazzoug, 1983 ;Belazzoug,1986**).

Dans la partie nord du pays, on retrouve à l'état sporadique une LCZ provoquée par *L. infantum*. L'insecte vecteur est *Phlebotomus perfiliewi* (**Izri et Bellazzoug, 1993**), et le chien est le réservoir de *L. infantum* MON-24 (**Benikhlef et al., 2004**).

La forme viscérale de la leishmaniose est provoquée par *L.infantum*, et se retrouve principalement dans la partie nord du pays. Des foyers actifs sont localisés dans la région de Kabylie, ainsi que dans le Nord Est, dans les wilayas de Jijel et de Constantine (figure 05). D'autres cas ont aussi été rapportés récemment dans le Sud du pays, dans le Tassili N'ajjer (wilaya d'illizi) et dans le Hoggar (wilaya de Tamanrasset) (**Benallal et al.,2013**).

#### 6.2.1. Epidémiologie de la leishmaniose en Algérie

Une grande partie des publications relative à la distribution et de l'épidémiologie de la leishmaniose cutanée et viscérale en Algérie date des années 80 et 90 (**Belazzoug et al., 1985 ; Harat et al., 1992 ; Harat et al., 1996**). L'évolution de la situation épidémiologique au cours de ces dernières années a connu des flambés de la LC et une importante baisse de la LV.



**Fig.05** : Distribution de la LC et de la LV en Algérie.

(●) *L. major* LC, (●) *L. infantum* LV, (●) *L. infantum* LC, (●), *L. killicki* LC.  
(Eddaikra, 2015).

## 6.2.2. Analyse de 30 ans de données Epidémiologique sur la leishmaniose en Algérie

Les leishmanioses sont des maladies à déclaration obligatoire en Algérie, l'institut national de santé publique (INSP) recense les cas de LC et LV depuis 1980, les relevés épidémiologiques mensuels (REM) publiés par l'INSP depuis le début des années 80, ont permis d'évaluer l'évolution des 2 formes de leishmanioses sévissant en Algérie (LC et LV). Entre 1984 et 2013, il y a eu plusieurs pics de LV en 1985, en 1998, et en 2010. Le maximum de cas a été atteint en 1998 avec 310 cas, soit une incidence de 1,02 cas pour 100000 habitants. Par ailleurs, nous avons noté une recrudescence de la maladie en 2010 avec 121 cas, mais avec une incidence plus faible de 0,34 cas pour 100 000 habitants (Eddaikra, 2015).

## 7. Le portage asymptomatique de la leishmaniose

Le portage asymptomatique est défini par l'absence de symptômes cliniques apparents malgré la circulation de parasites dans le sang. Le contact antérieur de l'individu avec le parasite influence ce silence physiopathologique. (Rasmol et al.,1998). La transmission de *Leishmania* par transfusion a été signalés dans différentes zones d'endémie dans le monde (Cohen et al., 1991 ;Mauny et al., 1993; Singh et al.,1996).Les receveurs de sang sont des patients souffrant de Cancer, des receveurs d'hémodialyse, des receveurs d'organes et des nourrissons .Ces populations risquent de contracter la LV par transfusion sanguine en raison de leur statut d'immunosuppression (Cardo , 2006). Les donneurs de sang dans les zones d'endémie de LV sont des personnes qui peuvent avoir une infection à *Leishmania* sans avoir

un signe apparent ou des symptômes. Des études menées sur des donneurs de sang en bonne santé en zones endémiques ont révélées différents taux d'infection à *Leishmania* chez ces donneurs asymptomatiques. (**Huda et al, 2013**).

### 8. Prévention et lutte contre les leishmanioses

Une panoplie de stratégies d'intervention doit être mobilisée pour prévenir et combattre la leishmaniose. La transmission, en effet, s'inscrit dans un système biologique complexe associant l'hôte humain, le parasite, le phlébotome et, parfois, un réservoir animal pour cela **La lutte anti vectorielle** aide à interrompre ou affaiblir la transmission de la maladie en ciblant les populations de phlébotomes vecteur au niveau domestique par la pulvérisation d'insecticides, ou l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides à effet rémanents. Cette lutte s'accompagnera aussi par **la lutte contre les animaux réservoirs**.

D'autres stratégies aident à réduire la prévalence de la leishmaniose et préviennent handicaps et décès tels que **le diagnostic précoce et la prise en charge des cas, la surveillance efficace de la maladie et la mobilisation des communautés**.

### 9. Diagnostic

La LC peut être diagnostiquée par un examen direct des parasites fait à partir de grattages de lésions, ou de biopsies colorées par des colorants tel que le Giemsa. Les formes amastigotes sont faciles à observer sur des lésions actives ou récentes. La PCR est utilisée pour le diagnostic dans les pays où elle est disponible. Par ailleurs, les différentes espèces de *Leishmania* peuvent aussi être cultivées sur des milieux spécifiques, et certaines espèces sont difficiles à isoler. Les milieux les plus utilisés pour l'isolement et l'entretien des souches de *Leishmania* sont : NNN (Novy-MacNeil-Nicole), BHI (brain heart infusion), EMTM (Evan's modified Tobie's medium), Milieu de Grace et Milieu de Schneider (**Pan et al. , 1993**).

L'identification des espèces et sous espèces peut se faire par l'analyse des isoenzymes (MLEE), par PCR RFLP, ainsi que par des techniques immunologiques qui utilisent les anticorps monoclonaux (**Banuls et al., 2007**). Parmi les tests les plus connus, le test de Montenegro consiste en une injection intradermique au niveau de l'avant-bras d'un mélange d'antigènes de *Leishmania* provoquant une induration chez les personnes positives. Bien que ce test soit spécifique, il est difficilement utilisable en zones endémiques, car il ne peut faire la distinction entre une infection passée, active ou asymptomatique (**Viana et al., 2011**).

Certains tests d'agglutinations, comme le test d'agglutination direct (DAT), peuvent également être utilisés. Le test DAT, qui ne requiert que très peu de technologies, est facile d'utilisation, mais il est difficilement applicable dans les régions où plusieurs espèces de *Leishmania* sont présentes, car il est spécifique pour une seule espèce à la fois avec très peu de réactivité croisée (**Hailu, 2002**).

La LV peut elle aussi être diagnostiquée par les mêmes techniques que la LC. Les amastigotes peuvent se trouver dans le sang, dans les aspirations et biopsies de la rate, ainsi que dans la moelle osseuse, et les ganglions lymphatiques. La PCR et la culture sont particulièrement utiles lorsque les parasites sont en petit nombre. Des tests sérologiques, tel que l'IFI

(immuno-fluorescence indirecte) et l'ELISA peuvent être aussi utilisés dans le diagnostic. Le test de Montenegro est généralement négatif au cours de la LV, bien que des réactions positives peuvent être observées après guérison de la maladie.

### 10. Traitement

#### 10.1. Antimoniés pentavalents

Les produits disponibles sont l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®). Le traitement se prescrit par voie intramusculaire, intraveineuse ou en intralésionnel (formes cutanées). Dans les leishmanioses viscérales, la posologie est de 20 mg/kg par jour de dérivé pentavalent d'antimoine pendant 4 semaines.

#### 10.2. Amphotéricine B liposomale

Le protocole proposé chez le patient immunocompétent est une injection quotidienne de 3 mg/kg pendant 5 jours, plus une injection à même dose au 10<sup>e</sup> jour (dose totale : 18 mg/kg).

#### 10.3. Pentamidine

Seul l'iséthionate de pentamidine, commercialisé sous le nom de Pentacarinat®, est disponible. Il s'administre en milieu hospitalier, par voie parentérale à la dose de 4 mg base/kg.

#### 10.4. Miltéfosine

La miltéfosine (Impavido®) est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. La dose recommandée est de 2,5 mg/kg par jour. La dose journalière totale maximum est de 150 mg.

#### 10.5. Autres antileishmaniens

L'aminosidine sulfate, ou paromomycine, est d'efficacité démontrée dans la leishmaniose viscérale à *L. donovani* en Inde (voie intramusculaire) et dans la leishmaniose cutanée localisée à *L. major*. L'atovaquone et des triazolés, seuls ou associés à des antimoniés, font l'objet de quelques essais limités.

# Matériel et méthodes

## 1 Matériel biologique

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée au sein du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie et au laboratoire de Parasitologie du CHU NEDIR MOHAMMED de Tizi Ouzou.

### 1.1 Souches

Les prélèvements analysés dans ce travail ont plusieurs origines. Les renseignements relatifs à ces prélèvements sont résumés dans le tableau01:

- Prélèvements réalisés sur des patients atteints de leishmaniose cutanée habitant la région de Tizi-Ouzou au sein du CHU de Tizi Ouzou (N°: 11 /12 /13/14/15/16.)
- Prélèvements faits sur des patients atteints de LC de la région de Tizi-Ouzou au sein du CHU de Tizi Ouzou unité Belloua (N° : 03/04/05/06/07/08)
- Prélèvement fait sur un patient d'Alger atteint de LC au sein du CHU MUSTAPHA BACHA ayant séjourné à Bouira (N° 01)
- Prélèvement fait sur une patiente d'Alger hospitalisée à l'hôpital EL KETTAR ayant séjourné à Msila (N°02)
- Prélèvements faits dans un laboratoire privé de T.O sur un patient de Mekla et un autre patient de T.O ayant séjourné en Tunisie (N° 09/10).

**Tab.01** : Tableau des prélèvements ayant été faits et analysés dans cette étude.

Numéro	Sexe	Age	Origine géographique	Notion de séjour
1	Masculin	40 ans	Alger	Bouira
2	Féminin	26ans	Alger	Msila
3	Masculin	2ans	Mekla T.O	Msila
4	Féminin	6ans	Mekla T.O	Msila
5	Féminin	72ans	Bougni T.O	/
6	Masculin	12mois	T.O	Msila
7	Féminin	20ans	Mekla T.O	Bouira
8	Masculin	24ans	Bougni T.O	/
9	Masculin	41 ans		Tunisie
10	Masculin	57ans	T.O	/
11	Masculin	49 ans	Mekla T.O	/
12	Masculin	29 ans	Ain el hemmam T.O	/
13	Féminin	35 ans	LNI T.O	Bouira
14	Masculin	26 ans	Mekla T.O	/
15	Masculin	18 ans	Mekla T.O	/
16	Masculin	76 ans	Tizi Rached T.O	Sud

#### 1.1.1 Lames de frottis

Afin de déterminer les espèces de *Leishmania* circulantes dans la région de Tizi Ouzou, 16 frottis de malades atteints de la leishmaniose cutanée, ont été collectés. Les lames étaient originaires du CHU

# Matériel et méthodes

---

Tizi Ouzou (N°: 09/10/11/12/13/14/15/16), et de Laboratoires privés de Tizi Ouzou (N°: 02/03) et d'Azazga (N°: 05/08).

## 1.1.2 Prélèvements Sanguins

Afin de connaître le taux de portage asymptomatique de la leishmaniose dans la région de Tizi Ouzou, nous avons collecté des prélèvements sanguins de donateurs de sang. Ces échantillons ont été obtenus au niveau du centre de transfusion sanguine du CHU de Tizi-Ouzou sur tubes citratés et conservés au frais.

Les tubes de sang proviennent de donateurs habitant la région de T.O d'une tranche d'âge variant de 18 à 65 ans et dont 90% sont des hommes.

## 2 Méthodes

### 2.1 Prélèvement

Chez les malades atteints de LC, l'ulcération cutanée est soigneusement désinfectée après avoir enlevé les croûtes qui la recouvrent. Le raclage est réalisé par un vaccinostyle stérile dans la partie infiltrée loin des zones surinfectées. Le produit de raclage et le recueil des sérosités serviront à la confection des frottis ainsi que pour la réalisation des cultures sur milieu NNN et sur milieu sérum de Lapin (SLP).

Les prélèvements sanguins ont été faits au sein du centre de transfusion sanguine de T.O dans des tubes citratés et conservés au frais.

### 2.2 Isolement et culture

Les milieux de culture ayant servi à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont : le milieu semi solide NNN, le milieu RPMI supplémenté de 10% de SVF, le SLP et le milieu CCS préparés au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire IPA.

Les cultures ont été contrôlées tous les 5 jours pendant 45 jours jusqu'à ce qu'elles se positivent. Dans le cas de culture positive, les parasites sont repiqués dans du milieu neuf RPMI à 10 % de SVF pour obtenir une concentration de plus de 5 millions de parasites pour les extractions de l'ADN et pour la congélation des souches. Pour les cultures en masse importantes, les souches ont été repiquées sur CCS.

### 2.3 Extraction d'ADN

#### 2.3.1 Lames

Après lecture des lames au microscope optique grossissement x100, nous avons fait un grattage à l'aide d'un bistouri stérile à usage unique. La matière récupérée est disposée dans un tube de 1,5ml puis ajouter 250µl de tampon de lyse. L'extraction par Phénol Chloroforme est un procédé qui repose sur la différence de solubilité des acides protéiques dans une émulsion à deux phases : une aqueuse et une phase organique.

### 2.3.2 Souches

L'extraction de l'ADN des souches a été faite par la méthode Phénol chloroforme. C'est un procédé qui repose sur la différence de solubilité des acides protéiques dans une émulsion à deux phases : une aqueuse et une phase organique. L'extraction de l'ADN par phénol chloroforme pour les frottis et les culots parasitaire se fait selon les étapes suivantes.

- **Lyse cellulaire**

200µl de tampon de lyse ont été ajouté au culot pour casser les ponts disulfure, ensuite 20µl de SDS 10% ont été ajoutés pour casser la bicouche lipidique après 2,5µl de RNAase a été ajouté pour éliminer tous les ARN et incubé à température ambiante pendant 20 à 30 min. L'ADN libéré dans le milieu est alors traité par une protéinase K (20µl), qui a pour but de digérer les protéines qui lui sont associés. La lyse est réalisée au bain marie à 56°C toute la nuit. Le lendemain le lysat a été récupéré.

- **Déproteinisation**

La déproteinisation de la solution se fait par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isolamique (25V/24V/1/). Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation à 2500tr/m pendant 15 minutes.

- **Précipitation**

Pour précipiter l'ADN, 200µl de la phase aqueuse sont récupérés dans un nouveau tube. 1/10 volume d'acétate et 2 volumes d'alcool absolu sont ajoutés puis centrifugés à 12000tr/min à +4°C pendant 15min. Le culot est lavé avec 60µl d'alcool 70° les culots sont séchés à température ambiante toute la nuit, 60µl de tampon d'élution sont ajoutés aux culots de 2 à 3 heures a fin de réhydrater l'ADN.

### 2.3.3 Sang

Le sang a été extrait par la technique relargage salin. C'est une technique qui consiste à séparer en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. L'ADN subit une lyse, puis il est précipité dans l'alcool. Dans cette étude nous avons suivi le protocole de MILLER (1988) qui implique le relargage des protéines cellulaires par la déshydratation et la précipitation avec une solution de NaCl.

#### Extraction d'ADN par relargage salin

Cette méthode est une méthode chimique largement utilisée. Les traitements de l'ADN se manifestent par des ajouts de solutions à différents rôles. Pour notre cas, c'est-à-dire l'extraction de l'ADN à partir du sang, les étapes sont :

a) On ajoute une solution d'hémolyse qui soit hypertonique (généralement saline) qui provoque l'éclatement des globules rouges suite à un phénomène d'osmose. La lyse sélective se base sur la propriété des hématies qui contiennent des hémoglobines. Cette étape est réalisée grâce à une solution préparée dite d'hémolyse. Les composants de cette solution diffèrent selon le protocole. Le résultat est unique : la lyse des globules rouges. Les débris d'hématocytes sont ensuite éliminés par une centrifugation. Les globules blancs, attachés à la paroi par effet de la centrifugation (séparation par densité des éléments physiques : lymphocytes, de la solution contenant

les débris des hématies). Cette étape sera répétée jusqu'à ce qu'on obtient un culot blanc constitué exclusivement de globules blancs. On ajoute une solution saline contenant l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra acétique) qui provoque la cassure des membranes cellulaires externes et inhibe les enzymes qui peuvent dégrader l'ADN (ADNase, nucléase...). Cette solution contient aussi un détergent (SDS ; Sodium Dodécyl Sulfate) qui sert à s'associer aux lipides. (Jemmali B., 2007). Dans cette étape, les lipides structuraux de la membrane forment un complexe avec la solution savonneuse. Ainsi les lipides sont éliminés.

b) Une centrifugation élimine ces complexes lipidiques en solution à 2500 tr/ min pendant 15 min)

c) Les protéines libérées vont être soumises à l'action de la protéinase K, une enzyme (champs d'activité entre 37 et 56°C) qui sert à éliminer les différents types de protéines. Au cours de cette étape qui peut durer plusieurs heures, l'enzyme va « digérer » les protéines contenues dans la cellule, et notamment celles qui sont liées à l'ADN. Dans certains protocoles on ajoute aussi la RNase pour assurer la lyse des protéines et des ARN. (Jemmali B., 2007)

d) Les protéines sont précipitées par le NaCl (5M).

f) La précipitation de l'ADN se fait sous l'action d'un alcool fort et froid (éthanol) et on aura finalement l'ADN précipité sous la forme de filaments blanchâtres appelée aussi « Méduse ».

g) Enfin on met l'ADN dans une solution tampon TE (tampon d'élution Tris-EDTA « Acide Ethylène Diamine Tetra acétique »). L'ADN extrait est prêt à être conservé soit à -20 °C si on désire le conserver à long terme soit à 4°C pour un stockage à court terme. (Jemmali, 2007)

### 2.4 Evaluation de la quantité d'ADN

La concentration de l'ADN extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop. Les acides nucléiques absorbent à 260nm, alors que les protéines absorbent à 280nm (à cause des acides aminés aromatiques (Phe, Trp, Tyr)). Les molécules organiques (tampon, etc....) absorbent à 230nm. La pureté des échantillons a été déterminée par le rapport de la mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm, un rapport supérieur à 1,8 signifie que les échantillons ne contiennent que de faibles niveaux de contaminants protéiques. C'est pourquoi un mauvais ratio 260/280 (généralement <1,9) indique une contamination par protéines et un mauvais ratio 260/230 (généralement >2) indique une contamination par molécules organiques.

#### 2.4.1 Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose

Par électrophorèse sur gel d'agarose (annexe 03), on peut analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium, un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN.

Pour cela, on mélange 7µl du produit de PCR avec 3µl de tampon de charge puis on les dépose dans les puits de gel en réservant les trois derniers puits respectivement pour le témoin négatif, le témoin positif et le marqueur de PM. Ensuite, on branche les électrodes de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient de côté cathode en appliquant une tension de 120 V qui correspond à 1h de migration. Enfin, quand le colorant de charge arrive à proximité du front de migration, on coupe l'alimentation. La révélation des bandes d'ADN se fait par le trans-illuminateur : Il s'agit d'une simple

visualisation de la migration des bandes d'ADN sur table UV du transilluminateur dans une chambre noire.

### 2.4.2 La PCR (Polymérase Chain Reaction)

La réaction PCR (Mullis, 1985) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique, et répétition d'élongation, en présence d'amorces nucléiques et spécifiques et d'une ADN polymérase afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Dans le thermocycleur, il se produit dans un premier temps une dénaturation thermique, cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé, à une température élevée de l'ordre de 94°C. Cette température de dénaturation est supérieure à celle de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrices au cours des cycles d'amplification. En second lieu une Hybridation des amorces : Le milieu réactionnel contient deux amorces (Reverse et Forward), chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes des séquences à amplifier. La  $T_m$  est en fonction de la séquence, elle est en générale de l'ordre de 45 à 60°C. Et enfin l'Elongation des amorces : Une ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribo-nucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5' 3' à 72°C, température optimale. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

Dans notre travail nous avons réalisés trois types de PCR

-Une PCR ITS1 pour les souches (internal transcribed spacer1) qui cible le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale du genre *Leishmania*, nous avons réalisés 3 tests de PCR ITS1.

-Une PCR JW11/JW12 pour le sang qui cible l'ADN kinétoplastique de *Leishmania*. Nous avons réalisés 3 tests de PCR JW11/JW12.

-Une PCR HRM ciblant l'amorce 7 RNA SL pour les lames et les souches

### Protocole expérimentale

Préparation du Mix : Cette étape doit se réaliser sous des conditions aseptiques (DNA free) dans une pièce isolée et sous une hotte à U.V pour éviter toute contamination du mix. Les produits du mix des deux protocoles ITS et JW, et leurs volumes nécessaires pour un seul échantillon sont présentés en annexes.

### Programmation du Thermocycleur

Une fois la préparation et la distribution du mix terminé, les micros tubes seront placés dans le thermocycleur : ce dernier est programmé selon le gène. La réaction de polymérisation en chaîne est cyclique, elle se déroule en 3 étapes qui sont : la dénaturation initiale, l'hybridation et l'élongation finale. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. Les programmes du thermocycleur des deux protocoles ITS1 et JW, sont présentés en annexes.

## **La révélation des produits PCR**

Les produits PCR sont révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% durant 40min à 70 volts.

### **2.4.3 HRM 7RNA-SL**

L'analyse par fusion à haute résolution (HRM) est une technique relativement nouvelle qui permet la caractérisation directe des amplicons de PCR dans un système fermé. Il mesure les changements de l'intensité de fluorescence d'un colorant intercalant l'ADN pendant la dissociation de l'ADN double brin en ADN monocaténaire et peut faire la différence entre les polymorphismes mononucléiques (SNP).

Le SYBER Green I est un composé organique aromatique de formule chimique C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>S faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophore). Il a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Il est de ce fait utilisé en biologie moléculaire comme agent fluorescent, notamment lors de la réalisation d'une HRM.

Après avoir préparé le mélange réactionnel en additionnant des sondes fluorescentes et des primers, ainsi que l'ajout des ADN de nos échantillons et du témoin positif. Le mix est mis dans un appareil de PCR quantitative en temps réel. Il s'agit d'un appareil de type Light Cycler 480, couplé à un spectrofluoromètre. Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

La méthode de préparation du mix est similaire à celle de la PCR standard, à l'exception de l'ajout de la sonde marquée. Les volumes recommandés pour un seul échantillon sont présentés en annexes.

## **2.5 Etude de l'épidémiologie de la LC et la LV**

Cette partie consiste à analyser des données épidémiologiques des dix dernières années sur la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanée recueillis au près de la direction de la santé et de la population des communes de la région de T.O.

## **2.6 Analyse statistique**

Afin de comparer les résultats des extractions pour les trois types de prélèvements, une ANOVA à un facteur a été effectué. En cas de significativité, le post test de Tukey a été appliqué pour comparer nos résultats deux à deux. A cet effet, nous avons utilisé le logiciel Graph Prism 6.0.

# Résultats et discussion

## Discussion

---

Les outils de diagnostic de la leishmaniose actuellement disponibles en Algérie permettent d'identifier plus de 100 cas de LV par an (**Eddaikra et al. , 2018**). Les données de la dernière décennie montraient que l'incidence de la maladie était en augmentation, et son aire de distribution géographique en extension (**Achour et Madiou, 2009, Izri et Belazzoug, 2009**). La LV occupe, avec la leishmaniose cutanée la première place dans les maladies parasitaires, elle représente 35 % des cas de maladies à déclaration obligatoire (**Achour et Madiou, 2009**).

Au cours de cette étude, nous avons voulu mettre en évidence les différentes espèces de *Leishmania* existantes dans la wilaya de T.O et ce par différentes techniques d'extractions d'ADN (Phénol et relargage salin) et de diagnostic par des PCR (JW et HRM 7SL). Nous avons également voulu montré l'existence de porteurs asymptomatiques chez les donneurs de sang dans la wilaya étant donné que T.O est l'une des régions les plus touchées par la leishmaniose en Algérie. Finalement, nous nous sommes intéressées a une étude rétrospective dans la wilaya de T.O de 2007 à 2018 pour voir si l'incidence de la maladie augmente ou baisse au cours du temps afin d'élaborer une relation avec les espèces retrouvées par notre étude.

La nature des prélèvements utilisés au cours de notre étude a nécessité l'utilisation de plusieurs protocoles d'extractions de l'ADN. De nombreux protocoles d'isolement d'ADN génomique ont été optimisés (**Budowle et al. 2009 ; Pachot et al. ,2007 ; Elgort et al.,2004 ; Nasiriet al.,2005**) ; et vérifiés pour être reproductibles et donner de l'ADN de qualité suffisante pour l'analyse génétique (**Pachto et al., 2007**).

Dans un premier temps, nos résultats d'extraction de l'ADN, ont été analysés par un spectrophotomètre Nanodrop. L'objectif était de vérifier si la quantité de nos ADN était suffisante, et s'ils étaient indemnes de contamination.

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique du ratio 260/280 a donné une moyenne  $< 1,8$  pour les échantillons extraits à partir de prélèvements sanguins, ceci indique que l'ADN extrait est contaminé par des protéines. Le ratio 260/280 a donné une moyenne  $< 1,8$  pour les échantillons extraits des souches, ceci indique que l'ADN est contaminé par des protéines ; Tandis que le ratio 260/280 à donné une moyenne  $> 1,8$  pour les échantillons extraits des lames, ceci indique que l'ADN extrait est exempt de contamination par des protéines. Pour les échantillons de sang et frottis de lames le ratio 260/230 a donné une moyenne  $< 2.0$  cela peut indiquer une contamination par des composés organiques ; pour les culots parasitaires la valeur moyenne du ratio 260/230 est  $> 2$  indiquant une pureté de l'ADN des composants organiques. Ces valeurs étaient assez correctes pour pouvoir réaliser des tests PCR sur l'ensemble des échantillons que nous avons.

Dans un deuxième temps, 3 amorces ont été utilisées pour détecter l'ADN de *Leishmania*, par PCR du gène de l'ADN kinétoplastique JW11/12 chez les porteurs asymptomatiques, de l'ADN ribosomale ITS1 pour les souches étudiées, et l'ADN ribosomale 7RNA SL pour l'identification ultérieure par HRM des espèces pour les ADN extraits des lames et des souches.

## Discussion

---

Le diagnostic, le traitement et le pronostic de la leishmaniose dépendent d'une identification précise des espèces parasitaires pathogènes. Les méthodes de diagnostic microscopiques basées sur la culture ont été remplacées par des techniques moléculaires rapides, hautement sensibles et spécifiques basées sur la PCR qui cible les régions codantes et non codantes du génome de *Leishmania* (**Schonian et al. , 2003 ; Nasereddin et Jaffe, 2010**).

Le portage asymptomatique dans d'autres pays endémiques de la leishmaniose, a fait l'objet de plusieurs études (**Asfaram et al., 2017**). Il comporte un risque pour la population. Au cours de notre étude, qui a porté sur 150 donneurs de sang, nous avons réalisés des PCR afin de déterminer si le gène de *Leishmania* était présent dans l'ADN des donneurs de sang en utilisant l'amorce JW11 et JW12 qui ciblent l'ADN kinétoplastique de *Leishmania*. Nos résultats sur cet échantillon de la population de TO n'ont pas permis de retrouver l'ADN de *Leishmania*. Nos résultats peuvent s'expliquer par l'absence de porteurs asymptomatiques dans l'échantillon que nous avons étudié. Des études sur le portage asymptomatique ont été faites sur des populations beaucoup plus importantes en Europe avec un portage inférieur à 11% (**Scarлата et al., 2005**) en Italie et moins de 17% en Turquie (**Ates et al., 2011**).

Par la suite, l'identification des espèces des trois souches isolées et des 16 frottis, ont été analysé par une HRM ciblant l'amorce 7 RNA SL. La HRM (High Resolution Melting analysis), est une extension de l'analyse en courbe de fusion dont l'objectif principal est : le criblage et l'identification de nouveaux variants sur un amplicon entier en utilisant uniquement des amorces spécifiques.

Au cours de notre étude, cette technique a été utilisée pour la première fois en Algérie pour l'identification des espèces de *Leishmania*. Les résultats de la HRM nous ont révélé la présence de *L.infantum* et *L.major* dans la wilaya de T.O.. Nous savons que les foyers de Tizi-Ouzou, Bouira, Bejaia, Boumerdès, Constantine, Jijel, Mila et Ténès offrent le plus grand nombre de cas de leishmaniose a *L.infantum*, (**Harrat et al. ,1995 ; Pratlong et al. 1990 ; Belazzoug et al. , 1985 ; Lannot et al., 1908**) ce qui concorde parfaitement avec nos résultats

Tandis que pour la présence de l'espèce *L.major* dans la wilaya de T.O. doit faire l'objet d'une étude plus poussée afin de confirmer sa présence dans la wilaya. La Leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major* est endémique à Biskra et au nord Sahara selon (**Harrat et al., 1995 ; Pratlonget al., 1990 ; Benikhlef et al.,1985 ; Eddaikra et al, 2017**). Les travaux de Boudrissa en 2012, ont montré son extension vers le nord (**Boudrissa et al, 2012**).

L'étude des données statistiques des 10 dernières années dans la wilaya de Tizi Ouzou a révélé que depuis l'année 2007 où on a recensé 15 cas par an de leishmaniose il ya eu une baisse notable des nombres de cas par an. Les cas rapportés sont des patients habitant le sud de la Kabylie (Boughni, Ain Zaouia Frikat...) où l'activité des phlébotomes est au maximum car ce sont des zones a climat chaud et humide en plus de la proximité de la wilaya de Bouira qui est aussi une zone endémique.

Pour la distribution par commune, on note que le nombre de cas a diminué et que la LV a disparu de certaines communes. Par contre, il y a eu recrudescence dans les foyers de Draa El

## Discussion

---

Mizane Mekla et Azazga où la leishmaniose viscérale a atteint le nombre de 9 cas par an en 2009 et 2010. Nos résultats concordent avec ceux d'**Eddaikra et col (2018)**, qui a noté une baisse notable de la LV au cours de ces 30 dernières années (**Eddaikra et al, 2018**).

Pour la LC, l'évolution du nombre de cas par wilaya montre qu'entre 2007 et 2017, la maladie est en baisse progressive depuis l'année 2007. Les communes ayant le plus grand nombre de cas étant Azazga, Draa El Mizane et Boughni. Le taux le plus important a été atteint dans les communes de Boughni en 2007 avec 5 cas rapportés et Ouacifs et Tizi Ghenif en 2011 avec 8 cas rapportés.

Nos résultats s'expliquent par le fait que les programmes de lutte engagés par la wilaya de T.O qui se déroule en deux parties : La première est une campagne de lutte anti larvaire en détruisant tous les gîtes de reproduction des phlébotomes, et la deuxième partie est une campagne de lutte contre le phlébotome en utilisant des insecticides dans les zones rurales, le nombre de cas a fortement baissé depuis 2014 où on n'a rapporté aucun cas pendant 3 années consécutives d'après les relevés annuels de la direction de la santé et de la population de la wilaya de T.O.

Conclusion

Les leishmanioses sont des zoonoses parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, transmises par la piqûre d'un insecte vecteur phlébotome femelle. Deux formes de leishmaniose coexistent à l'état endémique en Algérie : la forme cutanée due à *Leishmania major* et *L. killcki*, et la forme viscérale due à *Leishmania infantum*, cette dernière pose un réel problème de santé publique.

L'objectif de notre étude est : d'étudier la diversité génétique des *Leishmanias* dans la région de Tizi Ouzou. A cet effet, nous avons collecté divers prélèvements utilisés dans le diagnostic de la leishmaniose (frottis et souches). De plus, nous nous sommes intéressés à l'exploration du portage asymptomatique de la leishmaniose chez des donneurs de sang. Enfin nous avons établi une enquête statistique rétrospective durant la période 2007-2017, dans le but de préciser certains paramètres épidémiologiques et de les relier à la diversité de *Leishmania*.

Au cours de notre étude nous avons testé deux méthodes d'extraction d'ADN, la première en utilisant un solvant organique : le phénol chloroforme, l'autre en utilisant un solvant non organique : le relargage Salin. L'extraction au phénol chloroforme a donné les meilleurs résultats en terme de qualité et de quantité d'ADN mais celle-ci possède un inconvénient majeur qui est sa forte toxicité. Le relargage salin représente une alternative pas chère et plus sûre qui fournit une bonne quantité d'ADN, mais qui n'arrive pas à éliminer les contaminants protéiques.

Au cours de notre étude, cette technique a été utilisée pour la première fois en Algérie pour l'identification des espèces de *Leishmania*. Les résultats de la HRM avec l'amorce 7RNA SL, nous ont révélé la présence de *L. infantum* et *L. major* dans la wilaya de T.O

Les résultats des PCR et de la HRM nous ont permis de dire que l'espèce *L. infantum* est toujours présente dans les foyers de leishmaniose dans la wilaya de T.O, alors que *L. major* peut être due à un séjour au Sud du patient atteint. Des études sur un échantillon plus grand et en utilisant d'autres techniques d'extraction d'ADN, seraient une des perspectives d'avenir afin de confirmer les résultats obtenus au cours de notre recherche.

Au cours de notre étude, qui a porté sur 150 donneurs de sang, nous avons réalisé des PCR afin de déterminer si le gène de *Leishmania* est présent dans l'ADN des donneurs de sang en utilisant l'amorce JW11 et JW12 qui ciblent l'ADN kinétoplastique de *Leishmania*. Nos résultats sur cet échantillon de la population de TO n'ont pas permis de retrouver l'ADN de *Leishmania*. Nos résultats peuvent s'expliquer par l'absence de porteurs asymptomatiques dans l'échantillon que nous avons étudié. Une étude sur un échantillon plus grand est plus que nécessaire pour une bonne estimation de ce portage. Des tests sérologiques de dépistage dans les zones endémiques doivent être effectués dans les banques de sang pour interdire les donneurs séropositifs à *Leishmania*.

Pour l'enquête épidémiologique réalisée le nombre de cas de leishmaniose est en baisse depuis les années 2000 ce grâce au programme de lutte que la wilaya a connue qui consiste en des campagnes de désinsectisation des villages et des villes de T.O ainsi qu'aux campagnes de sensibilisation et de formation sur le sujet.

L'élaboration de stratégies destinées à prévenir et à combattre les leishmanioses nécessite une bonne connaissance de l'interaction entre l'évolution de l'environnement urbain et les phlébotomes vecteurs.

Notre travail constitue une contribution à la connaissance des différentes espèces de *Leishmania* dans la région de T.O et la recherche d'éventuels porteurs asymptomatiques. Les données acquises dans ce travail ne doivent pas se limiter à un cadre de recherche universitaire et doivent être exploitées pour l'établissement d'une stratégie de prévention et de lutte efficace dans la wilaya de TO. Ceci n'est possible que par une coordination pluridisciplinaire entre les services de la santé et les autres secteurs concernés.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### -A-

- Abdelmajeed Nasereddin et Charles L. Jaffe. 2010. *Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene*. Journal Of Clinical Microbiology .48(6): 2240–2242.
- Achour Barchiche N, Madiou M. *Recrudescence des leishmanioses cutanées: à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou*. Pathol biol 2009 ; 57 : 65.
- Alvar J., Vélezi.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., Den Boer M.; WHO. (2012). *Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One; 7 (5), e35671.
- Antoine JC, Lang T, Prina E. (1999). *Biologie cellulaire de Leishmania*. In: Dedet JP, editor. Les Leishmanioses. Paris: Ellipses : p 41-62.
- Ates SC, Bagirova M, Allahverdiyev AM, Kocazeybek B, Kosan E. *Utility of the microculture method for Leishmania detection in non-invasive samples obtained from a blood bank*. Acta Trop 2013;128(1):54–60.

### -B-

- Banuls A.L., Dujardin J.C., Guerrini F., De Doncker S., Jaquet D., Arevalo J., Noel S., Le Ray D., Tibayrenc M. (2000). *Is Leishmania (Viannia) peruviana a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer*. J Eukaryot Microbiol, 47(3), 197-207.
- Belazzoug S., Addadi K., Mokrani T., Hafirassou N., Hamrioui B., Belkaid M. (1985). *La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984*. Ann Soc Belg Med Trop , 65, 329-35.

## Références bibliographiques

---

- Belazzoug S. (1983). *Isolation of Leishmania major Yakimoff & Schokhor, 1914 from Psammomys obesus Gretzschmar, 1928 (Rodentia, Gerbillidae) in Algeria*. *Transac Roy Soc Trop Med Hyg*; 77(6), 878.
- Belazzoug S., Neal R.A. (1986). *Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to L. major in Algeria*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80(4), 670-671.
- Benallal K., Gassen B., Bouiba L., Depaquit J., Harrat Z. (2013). *Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria*. *Acta Trop*, 128(3), 518-21.
- Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouha A., Bendali-Braham S., Belkaid M. (2004). *Présence de Leishmania infantum MON-24 chez le chien*. *Med trop*, 64(4), 381-383.
- Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R., Arrar L., Hamrioui B., Harrat Z. (2012). *Spread of Leishmania major to the north of Algeria*. *Bull Soc Pathol Exot*; 105(1), 30-35.
- Boussaa S ( 2008). *Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech. Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle de phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations* .Thèse de Doctorat en ecologie-épidémiologie. Université louis pasteurs strasbourg I .217 :p 06-25.

### -C-

- Cardo LJ. *Leishmania: risk to the blood supply*. *Transfusion*2006;46(9):1641–5.
- Cohen C, Corazza F, De Mol P, Brasseur D. *Leishmaniasis acquired in Belgium*.*Lancet* 1991;13(338 (8759)):128.

## Références bibliographiques

---

### -D-

- Dedet J-P, Beranrd C, Nicole D Gilles B ,et al. (2013). *Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer*. Presse Med :p01-12.
- Dedet. J.P (2009). *Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique*. Elsevier Masson Sas a-10 :p508-506.

### -E-

- Eddaikra N, (2016). Etude de la chimiorésistance aux antimoniés chez *Leishmania* en Algérie : Validation des tests in vitro et Développement de marqueurs moléculaires. Thèse de doctorat. UMMTO. Algérie, 111p.
- Eugénie Gay, Hélène Guegan, Marie Ameline, Jean-Pierre Gangneux (2015). *Les leishmanioses humaines : parasitoses importées et autochtones* :p461-477.

### -G-

- Garni R., Tran A., Guis H., Baldet T., Benallal K., Boubidi S., Harrat Z. (2014). *Remote sensing, land cover changes, and vector-borne diseases: use of high spatial resolution satellite imagery to map the risk of occurrence of cutaneous leishmaniasis in Ghardaïa, Algeria*. Infect Genet Evol, 28, 725-34.

### -H-

- Harrat Z., Addadi K., Belkaid M., Tabet-Derraz O. (1992). *Visceral leishmaniasis in Algeria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990)*. Bull Soc Pathol Exot, 85(4), 296-301.

## Références bibliographiques

---

- Huda MM, Rudra S, Ghosh D, Bhaskar KR, Chowdhury R, Dash AP, et al. *Low prevalence of Leishmania donovani infection among the blood donors in kala-azar endemic areas of Bangladesh*. BMC Infect Dis 2013;2(13 (1)):1.

### -I-

- Izri A, Belazzoug S. *Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie*. Revue Francophone des Laboratoires 2007 ; 396 : 3-10.
- Izri A., Belazoug S. (1993). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi naturally infected with dermatropic Leishmania infantum at Tenes, Algeria*. Trans R Soc Trop Med Hyg; 87(4), 399.

### -J-

- Jemmali B., 2007. *Caractérisation moléculaire des variantes de la caséine Kappa chez les caprins en Tunisie*. Mémoire de Mastère. INAT, Tunisie : 87p.

### -L-

- Lannot G, Maazoun R et al (1908) .*Un nouveau variation enzymatique Leishmania infantum* .Nicole; 60 :p01-03.

### -M-

- Mauny I, Blanchot I, Degeilh B, Dabadie A, Guiguen C, Roussey M. *Visceral leishmaniasis in an infant in Brittany: discussion on the modes of transmission out endemic zones*. Pédiatrie 1992;48(3):237–9.

### -P-

- Poinsignon A (2005). *Diversité et fonctions des protéines salivaires chez les arthropodes vecteurs : Etude de la relation immunitaire homme/vecteur au cours de*

## Références bibliographiques

---

*la Trypanosomiase Humaine Africaine*. Thèse doctorat. Faculté de Pharmacie. L'université de Paris XI :p 60.

- Pratlong F., Dereur J., Ravel C., Lami P., Balard Y., Serres G., Lanotte G., Rioux J.A., Dedet J.P. (2009). *Geographical distribution and epidemiological features of Old World leishmaniasis foci based on the isoenzymes analysis of 1048 strains*. Trop Med Int Health, 14(9), 1071-1078.

### -S-

- Saitsu, H., M. Kato, T. Mizuguchi, K. Hamada, H. Osaka, J. Tohyama, K. Uruno, S. Kumada, K. Nishiyama, A. Nishimura, I. Okada, Y. Yoshimura, S. Hirai, T. Kumada, K. Hayasaka, A. Fukuda, K. Ogata, and N. Matsumoto. 2008. *De novo mutations in the gene encoding STXBPI (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy*. Nat. Genet. 40:782-788.
- Scarlata F, Vitale F, Saporito L, Reale S, Li Vecchi V, Giordano S, et al. *Asymptomatic Leishmania infantum/chagasi infection in blood donors of western Sicily*. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102(4):394-6.
- Schonian, G., A. Nasereddin, N. Dinse, C. Schweynoch, H. D. Schallig, W. Presber, and C. L. Jaffe. 2003. *PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47:349-358.
- Singh S, Chaudhry VP, Wali JP. *Transfusion-transmitted kala-azar in India*. Transfusion 1996;36(9):848-9.

### -V-

- Vianna G.M., Nascimento M.D., Dinizneto J.A., Rabelo E.M., Binda Junior J.R., Santos O.M., Santos A.C., Galvao C.S., Guimares R.S. (2011). *Anti-Leishmania titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar*. Braz J Med Biol Res, 44(1), 62-5.

## Références bibliographiques

---

Sites Web :

<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/5.html#5>

<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

<http://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/leishmaniose/quel-traitement>

[https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&lr=lang\\_fr&as\\_sdt=0%2C5&as\\_ylo=2018&q=d%C3%A9finition+de+la+leishmaniose&btnG=](https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&lr=lang_fr&as_sdt=0%2C5&as_ylo=2018&q=d%C3%A9finition+de+la+leishmaniose&btnG=)

# Introduction

## Références bibliographiques

---

# Annexes

## **Annexe 1 : Coloration GIEMSA**

Le GIEMSA est un colorant spécifique des chromosomes, constitué d'un mélange de deux colorants (azur de méthylène et éosine) rose violacé. Le GIEMSA permet notamment de mettre en évidence les territoires chromosomiques.

## **Annexe 2 : Les réactifs d'extraction**

### **Phénol Chloroforme**

#### **❖ Lyse des parasites**

- 200 µl de tampon de lyse
- 12.5 µl SDS 10%
- 5 µl de la protéinase K
- Incuber toute la nuit à 55 C°

#### **❖ Extraction phénol chloroforme**

Les étapes suivantes se feront sous la hotte chimie (sauf les centrifugations)

- On ajoute un volume égal de mélange phénol chloroforme / alcool isoamylique (25v/24v/1v) « 500 µl ».
- Mélanger les deux phases jusqu'à obtention d'un mélange laiteux (2 à 3 mn).
- Laisser agir 5 mn sur paillasse.
- Centrifuger à 13000g pendant 10 minutes.
- Récupérer la phase supérieure sans aspirer l'interphase, la transférer dans un nouveau tube de 2ml.

#### **❖ Précipitation**

Mettre de l'acétate de sodium (1/10 du volume de notre échantillon ex : pour 200 µl de surnageant + 20 µl d'acétate de sodium).

- Ajouter deux fois le volume de l'éthanol absolu (500 µl).
- Centrifugation à 12000g à 4 C° pendant 15 minutes.
- Éliminer le surnageant délicatement.
- Ajoutez 500 µl de l'éthanol à 70 %.
- Centrifugation à 12000g à 4 C° pendant 15 minutes.
- Éliminer le surnageant délicatement.
- Laisser sécher une nuit à température ambiante.
- Après une nuit de séchage ajouter 100 µL de TE.

## Annexe 3 : L'électrophorèse

### Réactifs

- TAE 1X (Tris Acide EDTA) dilué une fois (40mM Tris, 20mM acetic acid, et 1mM EDTA).
- BET (Bromure d'éthidium).
- 

### Préparation du gel d'agarose à 0,8%

- Peser 0,8g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après chauffage, mélanger au micro-onde jusqu'à obtention d'un liquide limpide, pour le refroidir, mettre le mélange sous l'eau courante puis ajouter 7µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne. Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

## Annexe 4 : La PCR

### Réactifs

Nous avons utilisés dans notre PCR les réactifs du Kit QIAGEN.

**Tab.02** : Les produits du mix et leurs rôles

Produits	Rôle
Tampon	Stabiliser le PH du milieu réactionnel
dNTPs	Elongation des 2 brins d'ADN
MgCl <sub>2</sub>	Cofacteur positif de la Taq polymérase
Amorce 1	La reverse et Forward
Amorce 2	La reverse et Forward
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN
Eau distillée stérile	Dilution des réactifs à leurs concentrations

### Protocol JW11-12

**Tab.03** : Les conditions PCRJW11-12 (préparation du mix)

	Concentration finale	Volume (µL) pour un 1 échantillon
H <sub>2</sub> O	/	13,3
dNTP	0,2mM	1,5
Tampon	1X	4
Mgcl <sub>2</sub>	1,5mM	5
Amorce 1	0,5µM	1
Amorce 2	0,5µM	1
Solution Q	0,5 X	10
Taq polymérase	2U	0,2

Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillon étudié.

## Annexes

Tous les constituants sont mélangés dans un tube Eppendorf. 18µl de ce mélange sont distribués dans chaque tube de barrettes de 8 spécifiques à la PCR (thermocycleur).

En plus des échantillons on a :

- Témoin(-) : contient 2µl d'eau distillée stérile + 18 µl de mix.
- Témoin (+) : contient 2µl de l'ADN (+) plus 18 µl du mix.

L'échantillon : contient 2µl d'ADN extrait ajouté de 18 µl de mix. Le volume total de chaque microtube (échantillons et témoins) est de 20 µl.

**Tab.04** : Programme du thermocycleur pour JW 11-12

Programme		
Paramètre	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	4 min
Dénaturation	64°C	1 min
Hybridation	58°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	10 min

}

X30(cycles)

### Annexe 5: PCR HRM 7SL

Un volume final de 20µl dans des tubes de 1,5 ml à froid.

Mettre dans le tube

Mix	n=1
H <sub>2</sub> O PCR grade	3µl
Amorce 1	1µl (0, 5µM final)
Amorce 2	1µl.
Master Mix syber Green	10µl.
Echantillon	1 à 5 µl.

Vf= 20µl de mix + 5µl ADN. Pour un ADN a 20mg/µl

Sceller la plaque et centrifuger à 3000 rpm pendant 2 min

Placer la plaque dans l'appareil

Appliquer le programme selon le protocole de **Nassereddin et Jaffe, 2010**

	Température	Temps	Slope (°C/sec)	Mode d'acquisition
Dénaturation	95	15 min	20	
Amplification 40 cycles	95	5s	20	
	55	10s	20	
	72	2 min	20	
Melting	75	10s	0,1	
	95		0,1	
Refroidissement	40	30s		

Pour la fluorescence : Channel F1 et gain réglé à 5

Pour la normalisation des données de Fluorescence on applique le ratio F1/1

Courbes de melting analysées sur Channel 2 et 3

Modification des rampes

## Annexes

### Annexe 6 : PCR ITS 1

**Tableau 05** : Les échantillons PCR ITS 1 (Préparation du mix)

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL) pour 1 échantillon
H <sub>2</sub> O	/	/	23,1
Tampon	10X	1X	5
dNTP	4mM	0,2mM	2,5
A1	25µm	0,5mM	1
A2	25µM	0,5mM	1
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5mM	3
Taq pol	5U	2U	0,4
ADN	/	/	2

- Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillon étudié.
- Tous les constituants sont mélangés dans un tube Eppendorf. 23 µl de ce mélange sont distribués dans chaque tube de barrettes de 8 spécifiques à la PCR (thermocycleur).
- En plus des échantillons on a :
  - o Témoin (-) : contient 2µl d'eau distillée stérile plus 23µl de mix.
  - o Témoin (+) : contient 2µl de l'ADN (+) plus 23µl du mix.

-L'échantillon : contient 2 µl d'ADN extrait ajouté de 23 µl de mix. Le volume total de chaque microtube (échantillons et témoins) est de 25µl.

**Tableau 06** : Programme du thermocycleur pour ITS 1

Programme		
Paramètre	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	15min
Dénaturation	95°C	20sec
Hybridation	53°C	30sec
Elongation	72°C	1 min
Elongation finale	72°C	6min

} X35 (cycles)

## Annexes

### ANNEXE RESULTATS

**Tab. 07 :** Résultat des charges parasitaires des frottis.

Numéro de la lame	macrophages	Parasites	Parasites/macrophage
1	18	285	15.83
2	23	381	16.56
3	22	302	13.72
4	2	9	4.5
5	23	272	11.82
6	23	38	1.65
7	10	78	7.8
8	14	90	6.42
9	6	56	9.33
10	8	69	8.62
11	20	115	5.75
12	33	51	1.54
13	7	49	7
14	13	39	3
15	4	17	4.25
16	19	201	10.57

**Tab. 08 :** Résultats des D.O sur Nanodrop à partir des prélèvements sanguins.

Numéro	Concentration	260/280	260/230
1	49.64	1.081	1.7
2	10.96	1.39	2.01
4	73.33	1.03	1.96
10	65.87	1.34	1.96
11	16.16	1.34	1.15
22	10.02	1.097	1.97
31	19.24	1.925	1.36
35	3.53	1.155	2.28
40	6.85	1.453	1.906
51	49.59	1.77	1.95
53	47.76	1.55	1.46
54	5.9	1.25	2.27
55	49.58	1.09	1.48
61	14.87	1.17	2.35
62	14.2	1.48	1.8
66	5.98	1.35	2.003
70	25.38	1.36	2.38
75	14.79	1.61	1.96
86	15.22	1.19	2.48
88	278.05	1.81	1.77
89	95.43	1.006	1.57
90	39.16	1.35	1.19
91	10.19	1.37	7.33
101	19.92	1.24	1.81
109	51.3	1.28	1.46
111	4.36	1.24	-1.26
Moyenne	38.35692308	1.34334615	1.93457692

## Annexes

**Tab.09:** Résultats des D.O sur Nanodrop à partir des souches.

Numéro	Concentration	260/280	260/230
LC14 T.O 2018	118.88	1.804	1.633
LC15 T.O 2018	29.07	1.389	5.286
LC16 T.O 2018	19.1	1.8	3.9
	55.68333333	1.66433333	3.60633333

**Tab. 10 :** Résultats des D.O sur Nanodrop à partir de lames.

Numéro	Concentration	260/280	260/230
1	156.8	1.71	2.027
2	512.89	2.04	1.95
3	545.94	2.15	2.16
4	5.81	0.92	0.94
5	252.88	1.98	1.87
6	1.8	2.12	2.22
7	318.25	2.31	2.39
8	319.52	2.2	1.77
9	212.52	1.9	1.3
10	151.34	1.73	1.95
11	314.2	1.64	1.6
12	231.37	1.52	1.9
13	96.26	1.56	1.7
14	83.2	1.93	1.83
15	74.7	1.96	1.9
16	111.3	1.7	1.3
Moyenne	211.79875	1.835625	1.8004375

## Résumé

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires touchant l'homme et les animaux dont certains sont des réservoirs. Elles sont en passe de devenir un problème de santé majeur.

Notre étude a porté sur la diversité génétique des *Leishmania* dans la wilaya de Tizi Ouzou à travers diverses méthodes de recherches moléculaires telles que la PCR (amorces : JW,ITS1), et la mise au point pour la première fois en Algérie de la HRM 7RNA SL. L'ensemble de ces techniques nous ont permis d'identifier différentes espèces de *Leishmania* à T.O responsable de la LC ; à savoir *L. major* et *L. infantum*.

Ce travail a fait également l'objet d'une étude sur des donneurs de sang, pouvant être porteurs sains de la leishmaniose, qui s'est révélée négatives pour les 150 échantillons analysés par PCR ciblant l'ADN kinetoplastique JW11/JW12.

Enfin une étude rétrospective a été réalisée sur les 10 dernières années sur des données provenant du centre de prévention de la direction de santé et de la population de la wilaya de T.O et celle-ci nous démontre que la leishmaniose est en forte baisse depuis quelques années grâce au programme de lutte et de sensibilisation sur la maladie.

**Mots clés :** *Leishmania*, PCR JW, HRM 7 RNA SL, porteurs sains, étude rétrospective.

## Abstract

Leishmaniasis are parasitic diseases affecting both human and animals, some of which are reservoirs. They are becoming a major health problem through the world.

Our study focused on the genetic diversity of *Leishmania* species in the wilaya of Tizi Ouzou through several molecular methods such as PCR (with several primers: JW, ITS1, HRM 7SL), leading us to identify different species of *Leishmania* in TiziOuzou region

Furthermore, this study also interested on finding *Leishmania* on blood donors, who can be healthy carriers for this parasite, all the samples (150) were extracted using the salting out technique and found negatives for *Leishmania*

Finally, a retrospective study was carried out over 10 years of data from the direction of health and prevention of TiziOuzou's wilaya, showing that thanks to leishmaniasis control program, incidence becomes lower and lower.

**Key words:** leishmaniasis, *Leishmania*, healthy carriers, retrospective study