

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES  
AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



En collaboration avec

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie.

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Parasitologie

## Thème

**Caractérisation épidémiologique et moléculaire de la  
leishmaniose cutanée humaine dans la wilaya de Tizi-Ouzou,  
et étude de la sensibilité à l'antimoine Sb III**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> : BELMILOUD Karima & M<sup>elle</sup> : OUAMEUR Asma

Soutenu publiquement le 23 octobre 2019 Devant le jury :

Mme BOUKHEMZA-ZEMMOURI Nabila	Professeure	UMMTO	Présidente.
Mme BENIKHLEF Razika	Chargée de Recherches	IPA	Promotrice.
Mr BOUKHEMZA Mohamed	Professeur	UMMTO	Co-promoteur.
Mr MOULOUA Abdelkamal	Maitre de conférences A	UMMTO	Examineur.

Promotion : 2018 – 2019

## *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 voulons exprimer par ces quelques lignes notre gratitude envers tous ceux en qui par leur présence, leur soutien et leurs conseils, nous avons eu courage d'accomplir ce travail.*

*Nous commençons par remercier **Mr HARAT Zoubir**, directeur de l'institut Pasteur d'Algérie et chef de service de laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations, de nous avoir acceptées au sein de son laboratoire.*

*Nous remercions vivement **M<sup>me</sup> BENIKHLEF Razika**, chargée de recherches au sein du laboratoire d'éco-épidémiologie de l'Institut Pasteur d'Algérie, qui nous a fait l'honneur d'être notre directrice, ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordée tout au long de la réalisation de ce mémoire et aussi pour son suivi et ses orientations durant l'élaboration de ce mémoire.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent de même à notre Co-encadreur **Mr BOUKHEMZA Mohammed**, professeur à l'UMMTO, pour ses conseils intéressants, ses encouragements continus, ainsi que pour le temps qu'il nous a réservé malgré ses grandes occupations.*

*Nous tenons à remercier les respectables membres du jury, **M<sup>me</sup> BOUKHEMZA-ZEMMOURI Nabila**, professeur à UMMTO et **Dr MOULOUA Abdel-Kamel**, Maitre de conférences A à l'UMMTO, pour bien vouloir nous accorder de leur temps précieux pour commenter, discuter et juger notre travail.*

*Nous tenons d'autre part, à remercier également **Dr SEKLAOUI N**, pour sa collaboration et de nous avoir autorisé à réaliser les prélèvements au niveau du laboratoire de parasitologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou.*

*Nous remercions **M<sup>me</sup> EDDAIKRA Naoual**, Maitre de recherches à l'Institut Pasteur d'Algérie pour son suivi et l'aide précieuse qu'elle nous a apporté durant notre période de stage.*

*Nos remerciements vont également à tout l'ensemble du personnel du service d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.*

# ***DEDICACE***

*Du profond de mon cœur, je dédie cet humble travail à tous ceux qui me sont chères*

***A ma chère mère***

***A mon cher père***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon*

*Bien-être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices.*

*Puisse dieu, le très haut, vous accorde santé, bonheur et long vie.*

***A mes très chères sœurs et beau frères***

*Amina, Amel, Manel, Wissem, Mahdi et Samir qui n'ont pas cessés de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études, que dieu les protèges et leur offre La chance et le bonheur.*

***A mes petites nièces***

*Imane, Aya, Israa qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur à moi et à toute la Famille.*

***A ma chère amie intime***

*Rosa, je te remercie pour l'amour que tu m'apporte au quotidien et tes encouragements durant mes années d'études.*

*Sans oublier mon binôme Karima pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

***A tout mes autres ami(e)s.***

*A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aimes*

*ASMA\**

# *Dédicace*

## ***A mes très chers parents***

*Affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement, vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez, pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Si j'en suis à ce stade c'est tout bonnement pour vous et grâce à vous.*

## ***A ma sœur «Nora» et mon petit frère «Rayane»***

*Je vous dédie ce travail, vous mes chers que j'aime plus que tous, vous avez dû me supporter toute au long de mon parcours, mais sans votre soutien moral et émotionnel je ne serai pas là aujourd'hui. Grand MERCI.*

## ***A mes grands parents***

*Que le bon dieu les gardes et les protèges.*

## ***A ma grande mère «Ouzna» qui nous a quittée trop tôt***

## ***A ma tante «Ghenima» et son mari***

*Les mots ne suffisent guère pour vous remercier pour tous ce que vous avez fait pour moi, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

## ***A mes très chers cousins «Salem, Karim et Mohamed»***

*Vous m'avez accompagné tout au long de mon travail, vous m'avez encouragé et soutenu, je vous dédie ce travail pour vous remercier et vous souhaitez le bonheur et la réussite.*

## ***A tonton Hakim***

## ***A Mouh ET son épouse Tassadit***

## ***A mon oncle Amar***

## ***A mon binôme «Asma»***

*Avec qui J'ai partagé les bons comme les pires moments, les hauts comme les bas ; merci pour votre soutien moral et ta compréhension.*

***A tous mes amies, ma promo et toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.***

***Karima\****

## Liste des abréviations

---

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ADNk: Acide Désoxyribonucléique kinétoplastique.

ACR2: Antimoine réductase.

Am B: Amphotéricine B.

ARN: Acide Ribonucléique.

CHU: Centre Hospitalo-universitaire.

CPB: Cystéine protéinase B.

DSP: la direction de la santé de la population.

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Hae III : restriction enzyme (enzyme de restriction).

HSP70: Heatschockprotein 70.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.

IPA: Institut Pasteur d'Algérie.

IFI: Immunofluorescence Indirect.

ITS1: Internal transcribed spacer 1.

LC: Leishmaniose Cutanée

LCC: Leishmaniose Cutanée chronique.

LCH: Leishmaniose Cutanée humaine.

LCM: Leishmaniose Cutanéomuqueuse.

LCZ: Leishmaniose Cutanée zoonotique.

LEEPGP: Laboratoire Eco-Epidémiologie Parasitaire et Génétique des Population.

LSU: Large Ribosomal Subunit rRNA gene

LV: Leishmaniose Viscérale.

MB: Mégabases.

MGG: May Grunwald Giemsa.

## Liste des abréviations

---

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis.

MON: Désignation du laboratoire de l'université 1 de Montpellier.

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle.

OMS: Organisation mondiale de la santé.

P: Phlébotome.

PCR: Polymérase Chain réaction.

PH: Potentiel Hydrogène.

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.(Polymorphisme de longueur de fragment de restriction).

RPMI: Le Roswell Park Memorial Institute medium.

Sb: Antimoine.

Sb III: Antimoine trivalent.

SbV: Antimoine pentavalent.

SDS: dodécylsulfate de sodium ou laurylsulfate de sodium.

SL: spliced leader.

SSU: Small ribosomal subunit rRNA gene.

SVF : sérum de veau fœtal.

TAE : Tris Acide EDTA (une solution tampon de migration utilisée en électrophorèse sur gel d'agarose des acides nucléiques).

TDR1 : Thiol dépendante réductase 1.

T-O : Tizi-Ouzou.

UV : Ultra-Violet.

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

µm : Micromètre.

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste de figures

Liste des tableaux

Introduction générale

## Généralité

I.Epidémiologie .....	1
I.1 Agent pathogène .....	1
I.1.1 Les formes du parasite et leurs localisations .....	1
I.1.2 Le génome de <i>Leishmania</i> .....	2
I.1.3 Classification .....	3
I.2 Le vecteur .....	4
I.3 Les réservoirs .....	5
I.4.Le cycle biologique .....	5
I.5 Répartition géographique .....	6
II Clinique.....	8
II.1 Leishmaniose cutanée .....	8
II.2 Leishmaniose cutanéomuqueuse .....	9
II.3 Leishmaniose viscérale .....	9
III Diagnostic des leishmanioses .....	9
III.1 Diagnostique direct.....	9
III.1.1 Diagnostic parasitologique .....	10
III.1.2 Diagnostic moléculaire .....	10
III.2 Diagnostique indirect.....	11

III.2.1 Méthodes sérologiques .....	11
IV Traitement des leishmanioses.....	12
IV.1 Antimoniés pentavalents .....	12
IV.2 Amphotéricine B .....	12
IV.3 Pentamidine .....	12
V Mode d'action de l'antimoine et mécanismes de résistance aux drogues .....	13
VI. Les leishmanioses en Algérie .....	14
VI.1 La leishmaniose viscérale .....	14
VI.2. La Leishmaniose cutanée zoonotique .....	15
VI.3 La Leishmaniose cutanée sporadique.....	15

## **Matériel et méthode**

II.1. Matériel.....	17
II.1.1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII.....	17
II.1.2. Etude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou .....	17
II.2. Méthodes.....	19
II.2.1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII.....	19
II.2.1. 1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou .....	19
II.2.1. 1. 1. Prélèvements des malades .....	19
1. Diagnostic parasitologique de la LCH .....	20
1.1. Examen direct : Recherche des corps de <i>Leishmania</i> dans le frottis .....	20
1.2. Isolement et culture des parasites .....	21

1.3. Culture en masse des parasites.....	22
3. Diagnostic moléculaire par PCR ITS1 .....	22
3.1. Extraction de l'ADN parasitaire par phénol chloroforme alcool iso-amylque.....	22
3.1.1 Sur lame.....	22
3.1.2. A partir des souches.....	23
3.2.PCR ITS1.....	24
3.2.1. Préparation du mix .....	24
3.2.2. Révélation des produits PCR : Diagnostic moléculaire de la LCH.....	24
I. Identification moléculaire des souches de <i>Leishmania</i> par PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction RFLP) de la région ITS1 .....	25
II. Étude de la chimiorésistance : Test de sensibilité des promastigotes à l'Antimoine (SbIII)...	26
III. Analyse statistique.....	27

## **Résultats et interprétation**

1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII .....	28
I. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou.....	28
1. Diagnostic parasitologique de la LCH .....	28
1.1.Examen direct : Recherche des corps de <i>Leishmania</i> dans le frottis.....	28
1.2.Isolement et culture des parasites .....	28
2. Diagnostic moléculaire par PCR ITS1 .....	29
II. Identification moléculaire des souches de <i>Leishmania</i> par PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction RFLP) de la région ITS1 .....	30
III. Étude de la chimiorésistance : Test de sensibilité des promastigotes à l'Antimoine (SbIII)	
B. Etude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou .....	32
I. Aspect épidémiologique de la LCH durant la période de décembre 2018 à Janvier 2019.....	34
II. Aspect épidémiologique de la LCH durant la période 2000-2019 .....	36
1- Répartition des cas de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou durant la Période 2000-2019. ....	36
2- Répartition mensuelle de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou durant la Période 2000-2019. ....	37

3- Répartition de la LCH selon l'âge et le sexe dans la wilaya de Tizi-Ouzou durant la période 2000-2019. ....	38
4- Répartition de la LCH selon la commune dans la wilaya de Tizi-Ouzou durant la période 2000-2019. ....	39

## **Discussion**

A- Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII .....	41
B- Etude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou .....	42

Conclusion générale

Références bibliographique

# Introduction générale

## Introduction

---

Les leishmanioses sont un complexe de maladies parasitaires réparties dans le monde, causées par des protozoaires obligatoires du genre *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) (Akhoundi, 2016; Ait khbaich, 2017). Elles sont transmises à l'hôte vertébré par l'intermédiaire de diptère Psychodidés du genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Dedet, 2009).

Chez l'Homme, Les leishmanioses sont endémiques dans de grandes zones des régions tropicales, subtropicales et du bassin méditerranéen, comprenant plus de 98 pays (Eugénie Gay, 2015). La prévalence globale des leishmanioses est estimée à 12 millions d'individus et 350 millions de personnes sont à risque (OMS, 2019). L'estimation de l'incidence annuelle mondiale des cas des leishmanioses se situe entre 1,5 et 2 millions, se distribuant entre 1 à 1,5 millions de cas de leishmanioses cutanées et de l'ordre de 500.000 cas de leishmanioses viscérale (Acebey *et al.*, 2008).

En Algérie, deux formes de leishmanioses existent: la leishmaniose viscérale (LV), due à *Leishmania infantum*, ayant comme réservoir principal le chien, et les leishmanioses cutanées qui sont dues à trois espèces de *Leishmania*. *Leishmania infantum* est responsable de la leishmaniose cutanée sporadique (LCS), le chien est incriminé comme réservoir (Benikhlef *et al.*, 2004 ; Benikhlef *et al.*, 2008), *Leishmania major* est responsable de la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) ; *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* sont des rongeurs sauvages, incriminés comme réservoirs des parasites (Belazzoug, 1983), et enfin, *Leishmania killicki* qui est l'agent de la leishmaniose cutanée chronique (LCC) (Harrat *et al.*, 2009), le réservoir est jusqu'à présent inconnu.

La grande Kabylie est connue depuis longtemps comme étant le foyer le plus actif de la leishmaniose viscérale humaine (LVH), la leishmaniose canine (LCan) et de la LCS (Dedet *et al.*, 1977). Ce foyer regroupe à lui seul près de 50% des cas de leishmaniose viscérales recensées en Algérie (Harrat *et al.*, 1995).

Selon une étude sur l'impact des facteurs écologique ou climatique sur la distribution des phlébotomes, la Kabylie, présente une grande variété de paysages, offrant des biotopes très diversifiés pour la faune phlébotomienne (Mouloua, 2017). Selon la même étude, 104 cas de LCH ont été enregistrés par les services de santé du département de Tizi-Ouzou durant la période 2005-2010, soit une incidence de 11,5 cas pour 100000 habitants et que c'est dans la dépression de DEM ou se concentre principalement les cas de LCH avec incidence de 39,02 cas pour 100 000 habitants.

## Introduction

---

L'objectif de ce travail est de caractériser et d'étudier la leishmaniose cutanée humaine (LCH) dans la wilaya de Tizi-Ouzou (TO) en s'appuyant sur l'étude de l'aspect épidémiologique de cette parasitose pour la période 2000-2019 ; sur l'étude moléculaire des cas diagnostiqués au niveau du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations (LEEPGP) durant la période de décembre 2018 à janvier 2019, ainsi que sur l'étude de la chimiorésistance des espèces de *Leishmania* qui circulent dans cette région. Sachant que le traitement de première ligne de la LCH est basé sur une drogue contenant de l'antimoine qui est le Glucantime<sup>R</sup>.

### Objectifs de l'étude

#### Objectif principal

Caractérisation épidémiologique et moléculaire de la LCH dans la wilaya de TO, et étude de la chimiorésistance des isolats au Sb III.

#### Objectifs secondaires

- Diagnostic parasitologique de la LCH chez 14 patients recrutés au niveau du service de parasitologie de l'hôpital de CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou.
- Diagnostic moléculaire par PCR ITS1 de l'ADN extrait à partir des frottis colorés et des prélèvements lésionnels récupérés dans du tampon EDTA (EDTA).
- Identification moléculaires par PCR RFLP des souches isolées des cas positifs.
- Evaluation de la susceptibilité des isolats vis-à-vis du SbIII.
- Etude de l'aspect épidémiologique de la LCH durant Décembre 2018 et Janvier 2019.
- Etude de l'aspect épidémiologique de la LCH durant la période 2000-2019.

Notre étude s'articule autour de quatre chapitres. Le premier est consacré à une revue bibliographique sur les leishmanioses. Le deuxième chapitre est dédié à la présentation du matériel et des méthodes utilisées tout au long de cette étude. Le troisième chapitre est consacré à l'interprétation des résultats obtenus, suivi du quatrième chapitre qui est réservé à la discussion. Ce travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives.

# Généralités

## I. Epidémiologie

Les leishmanioses sont des maladies à transmission vectorielle causées par des protozoaires obligatoires du genre *Leishmania* (*Trypanosomatida: Trypanosomatidae*) et transmises par la piqûre de phlébotomes infectés, dont les hôtes sont des animaux tels que les canidés, les rongeurs, les marsupiaux, les hyrax ou les êtres humains (Akhoundi, 2016).

Environ 53 espèces de *Leishmania* ont été décrites. Parmi celles-ci, 31 espèces sont connues pour être des parasites de mammifères et 20 espèces sont pathogènes pour l'homme (Akhoundi, 2016).

### I.1 Agent pathogène

Les leishmanioses sont dues à un parasite du système monocytes-macrophages, dont l'agent pathogène est un protozoaire, flagellé (Chabasse *et al.*, 2010).

Les espèces de *Leishmania* sont hétéroxènes, ce qui signifie qu'elles sont capables de coloniser deux hôtes (Akhoundi, 2016). Ils vivent dans les phagocytes du système réticulo-endothélial de mammifères comme forme amastigote et dans le système intestinal des phlébotomes comme forme promastigote (Figs.1 & 2).

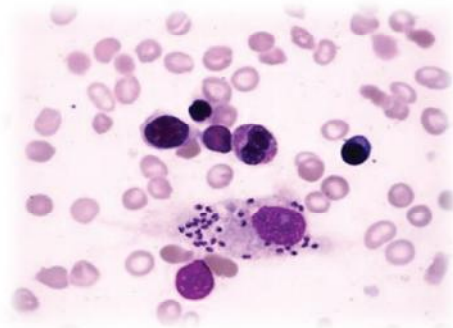
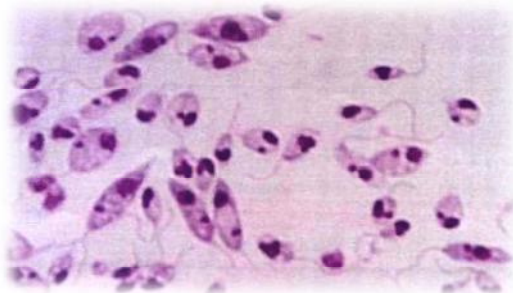


Fig. .1 : Forme promastigote du parasite      Fig. .2 : Forme amastigote du parasite

([http://www.parasitologie.unv\\_montp.1.fr](http://www.parasitologie.unv_montp.1.fr))

#### I .1.1 Les formes du parasite et leurs localisations

Les promastigotes sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif du phlébotome femelle.

Les promastigotes présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20µm de longueur et de 1 à 4µm de largeur, prolongée par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20µm de

## Chapitre I : Généralités

---

longueur (Fig.1), et qui émerge de leur pôle antérieur (Louis, 2009). Les promastigotes se multiplient à une température allant de 22°C à 26°C (Pearson & Sousa, 1996).

Elles possèdent plusieurs stades morphologiques dont la plus importante est la forme méta-cyclique qui est la forme infectieuse du parasite (Bates, 2007).

Dans ces formes parasitaires, le kinétoplaste est une partie spécialisée du compartiment mitochondrial qui contient l'ADN de cet organite, est situé entre le noyau et la base du flagelle (Louis, 2009).

Les amastigotes (étymologiquement = sans flagelle), nichent à l'intérieur des macrophages des mammifères (Fig.1), au sein de vacuoles dites parasitophores. A ce stade, les leishmanies deviennent ovoïdes ou sphériques et mesurent 2 à 3µm de diamètre.

Contrairement, à ce que leur nom pourrait conduire à penser, les amastigotes sont également munis d'un flagelle mais celui-ci est très court et ne dépasse pas le corps cellulaire. Le kinétoplaste de cette forme est plus souvent juxta nucléaire (Mazelet, 2004).

### I.1.2 Le génome de *Leishmania*

Comme tous les Kinétoplastidés, les *Leishmania* ont un génome nucléaire (ADNn) et un génome kinétoplastique (ADNk) (Peacock *et al.*, 2007).

Malgré la variabilité pathogénique des différentes espèces de *Leishmania* et la différence dans leur tropisme tissulaire, leur génome est remarquablement similaire, montrant un haut degré de conservation dans l'architecture et le contenu génique (Peacock *et al.*, 2007; Real, 2013). Il est formé de 36 chromosomes pour les espèces de l'ancien monde et de 34 à 35 pour les espèces du nouveau monde (Cantacessi *et al.*, 2015).

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

En outre, l'ADNk renferme deux types d'ADN circulaire : les mini-cercles impliqués dans les phénomènes « d'editing » de l'ARN (insertion/délétion d'uridine) et les maxi-cercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques (Kabb *et al.*, 2001 ; GOTT, 2003 ; Kazemi *et al.*, 2011).

### I.1.3 Classification

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

Règne : *Protista* Haeckel, 1866

Sous-Règne : *Protozoa* Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848.

Embranchement : *Sarcomastigophora* Honigberg et Balamuth, 1963

Sous-Embranchement : *Mastigophora* Diesing, 1866

Classe : *Zoomastigophorea* Calkins, 1909

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

Sous-Ordre : *Trypanosomatina* Kent, 1880

Famille : *Trypanosomatidae* Doflein, 1901 emend. Grobden, 1905

Genre: *Leishmania* Ross, 1903

Bien qu'il n'y ait qu'un genre appelé *Leishmania*, on différencie deux sous-genres selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur respectivement (Samake, 2006) : *Leishmania*, qui est mondialement répartie et *Viannia*, limité au Nouveau Monde (Rousset, 1995).

Avant le développement des outils biochimiques et moléculaires, la classification des leishmanies a été basée exclusivement sur la comparaison de facteurs extrinsèques tels que les données cliniques, épidémiologiques, la répartition géographique et la morphologie du parasite.

La biologie moléculaire et la biochimie ont ensuite remplacé ces facteurs phénotypiques.

La méthode de référence du typage de souches est l'électrophorèse isoenzymatique, même si des techniques plus résolutive tels que la PCR, les RFLP ou les microsatellites permettent d'affiner la classification (Hide, 2004).

## Chapitre I : Généralités

---

Ces techniques plus résolutive basées sur la Polymerase Chain Reaction (PCR), permettent aussi d'affiner la classification des *Leishmania* (**Hide, 2004**). La PCR permet une amplification spécifique massive de l'ADN de *Leishmania*, elle est aussi applicable directement sur des échantillons cliniques, sans nécessiter d'isolement parasitaire (**Awera et al., 2015**).

Diverses cibles ont été utilisées dans la technologie basée sur la PCR (**Awera et al., 2015**), tels que: SSU, small ribosomal subunit rRN Agene (18S rRNA); LSU, large ribosomal subunit rRNA gene; ITS, internal transcribed spacer ; kDNA; Cytochrome *b* (maxicircles) ; Cysteine proteinase B (CPB) ; Heat shock protein 70 (HSP70); miniexon ou spliced leader ; 7SL-RNA.

### I.2 Le vecteur

Les phlébotomes sont des insectes diptères (une paire d'ailes), nématocères (avec des antennes filiformes), de la famille des *Psychodida*. Ils mesurent 2 à 3 mm et ils sont parfois confondus avec des petits moustiques (Fig. 3). Ils sont de couleur claire, jaune pâle, à brune, à peine visible à l'œil nu. Leurs ailes, de forme lancéolée se dressent en V à 45° sur le dos lorsqu'ils sont au repos (**Izri et al., 2006**).

Les phlébotomes ont une activité nocturne et crépusculaire. Durant la journée ils se mettent à l'abri de la lumière et du vent dans diverses anfractuosités des murs ; caves et abris d'animaux sauvages et domestiques (**Izri et al., 2006**). L'insecte male se nourrit de suc de plantes et de miellat de pucerons. La femelle est hématophage et pique l'homme et les animaux, ce qui assure la transmission des *Leishmania* (**Izri et al., 2006**).

Les phlébotomes apparaissent toute l'année en zone intertropicale, et seulement en été dans les régions tempérées ou ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier (**Dedet, 2009**).



**Fig. 3:** *Phlebotomus* spp. (<https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>).

### I.3 Les réservoirs

Les leishmanioses sont principalement des zoonoses, ainsi les réservoirs potentiels ou naturels sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquelles le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées. Ces mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres selon les espèces de *Leishmania* : les chiens, les chats, les rongeurs, les marsupiaux et l'homme (**Derreure, 1999**).

### I.4. Le cycle biologique

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique (Fig.4) qui nécessite deux hôtes ; un hôte invertébré le phlébotome (insecte télmophage) et un hôte vertébré dans lequel les parasites sont essentiellement dans les leucocytes de la lignée phagocytaire du compartiment intracellulaire (macrophages, leucocytes dendritiques) (**Marignac et al., 2003**).

Le phlébotome femelle infecté prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, il salive au site de piqûre et régurgite le sang qui se contamine au contact des parasites, sous forme promastigote qui obstrue la vulve stomédiale (**Boussa, 2008**). Le phlébotome peut injecter entre 10 et 100 promastigotes dans le derme de l'hôte vertébré (**Mallorie, 2004**).

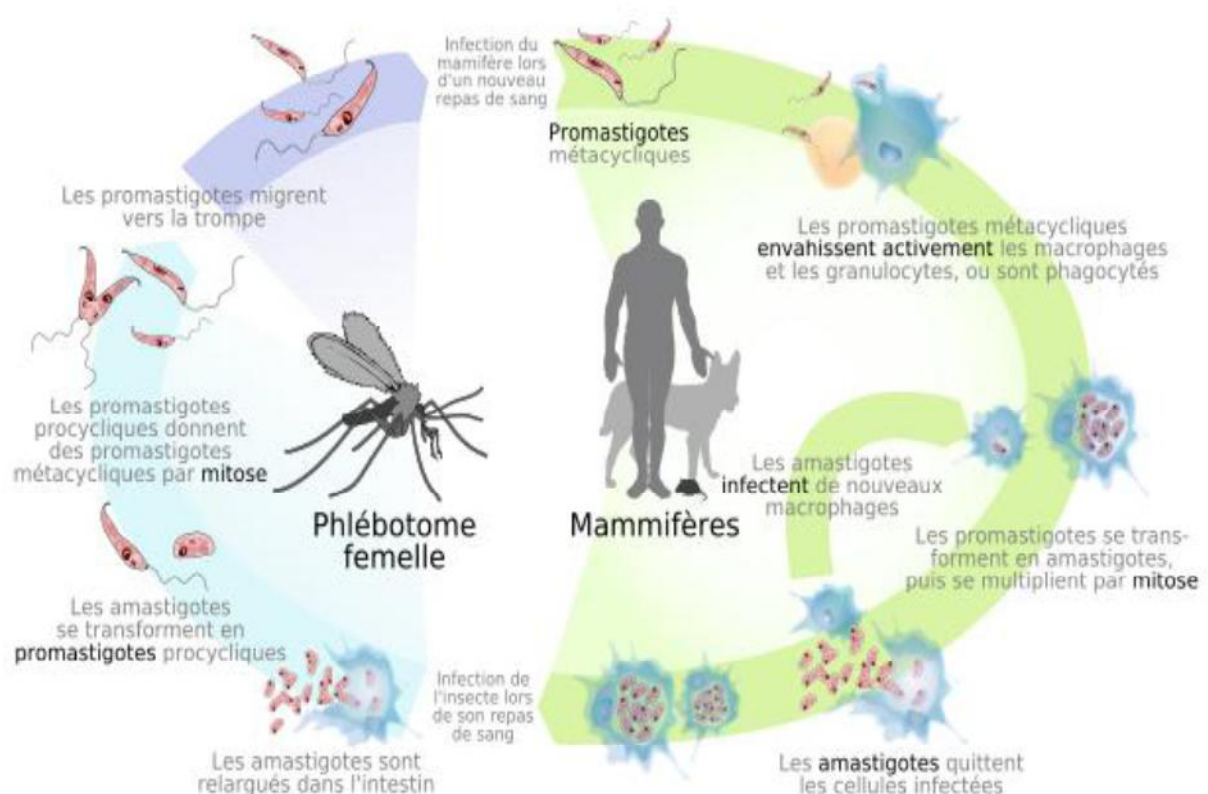
Chez l'hôte mammifère, les promastigotes métacycliques envahissent activement un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages), et se transforment ensuite en amastigotes (**Boussa, 2008**).

A l'intérieur des cellules macrophagiques des mammifères, les amastigotes sont localisés au sein des vacuoles dites parasitophores. Elles se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé (**Antoine et al., 1999**). Les

## Chapitre I : Généralités

amastigotes libérés infectent par la suite de nouvelles cellules avoisinantes où le processus se répète.

Le cycle est achevé lors de son prochain repas sanguin. Le phlébotome femelle ingère des macrophages contenant des amastigotes qui se différencieront en promastigotes au bout de 24 heures (**Frahtia-Benotmane, 2015**). Ces promastigotes se multiplient et se différencient en promastigotes métacycliques par mitose, puis elles migrent vers l'œsophage et la trompe en attendant un nouveau repas sanguin (**Mallorie, 2004**).



**Fig. 4:** Schéma représentant le cycle d'infection des leishmanioses (**Ruiz, 2011**).

### I.5 Répartition géographique

Les leishmanioses sont largement répandues à la surface de la terre (**Akhoundi, 2016**). Elles possèdent une aire de répartition qui s'étend sur les cinq continents (**Figs.5 et 6**).

350 millions de personnes sont à risque, 12 millions de cas d'infection (**Akhoundi, 2016**), et entre 700 000 et 1 million de nouveaux cas sont répertoriés chaque année, avec 20 000 à 30 000 cas de décès par an (**O.M.S. 2019**).

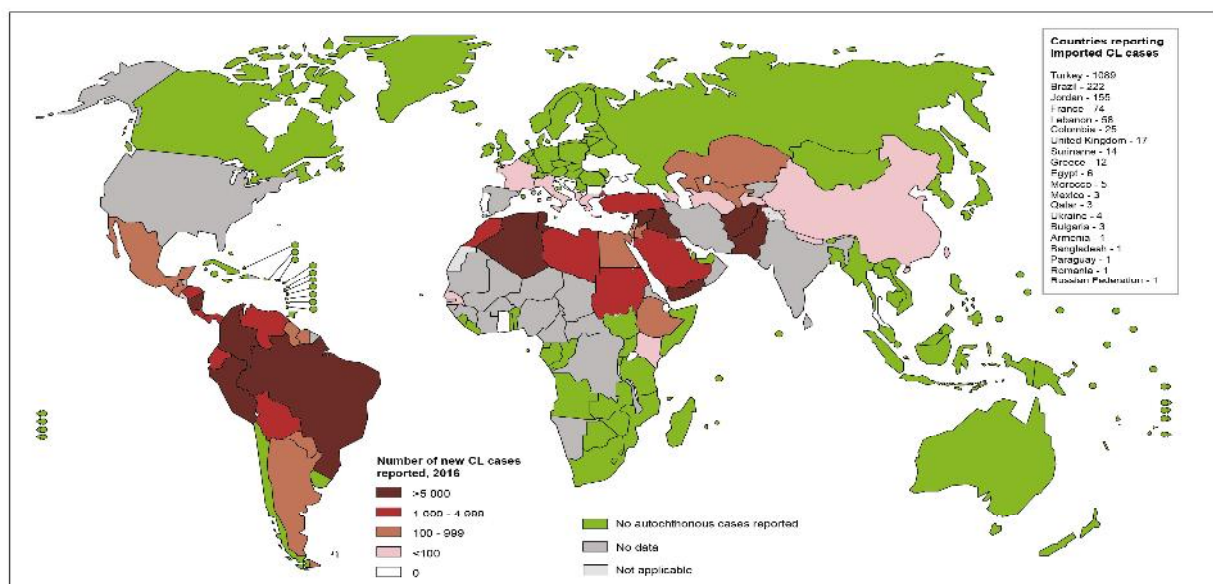
## Chapitre I : Généralités

L'incidence annuelle est estimée à environ 0,7 à 1,2million de cas de leishmaniose cutanée (LC) et de 0,2 à 0,4 million de cas de leishmaniose viscérale (LV) dans ces pays (Akhoundi., 2016).

La LC est la forme la plus courante (Dedet, 2001). Elle est endémique dans de grandes zones des régions tropicales, subtropicales et du bassin méditerranéen, comprenant plus de 98 pays (Fig.5). Les dix pays : Afghanistan, Algérie, Colombie, le Brésil, l'Iran, la Syrie, l'Éthiopie, le Nord-Soudan, le Costa Rica et le Pérou représentent 70% à 75% de l'incidence globale estimée des LC (Dedet, 2001).

En ce qui concerne la LV (Fig, 6), plus de 90% de tous les cas surviennent dans les pays suivants: l'Inde, le Bangladesh, le Soudan, le Brésil et l'Ethiopie (Akhoundi., 2016).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2016



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2018. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (N11)  
World Health Organization



Fig.5 : Situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le monde (OMS, 2016).

## Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016

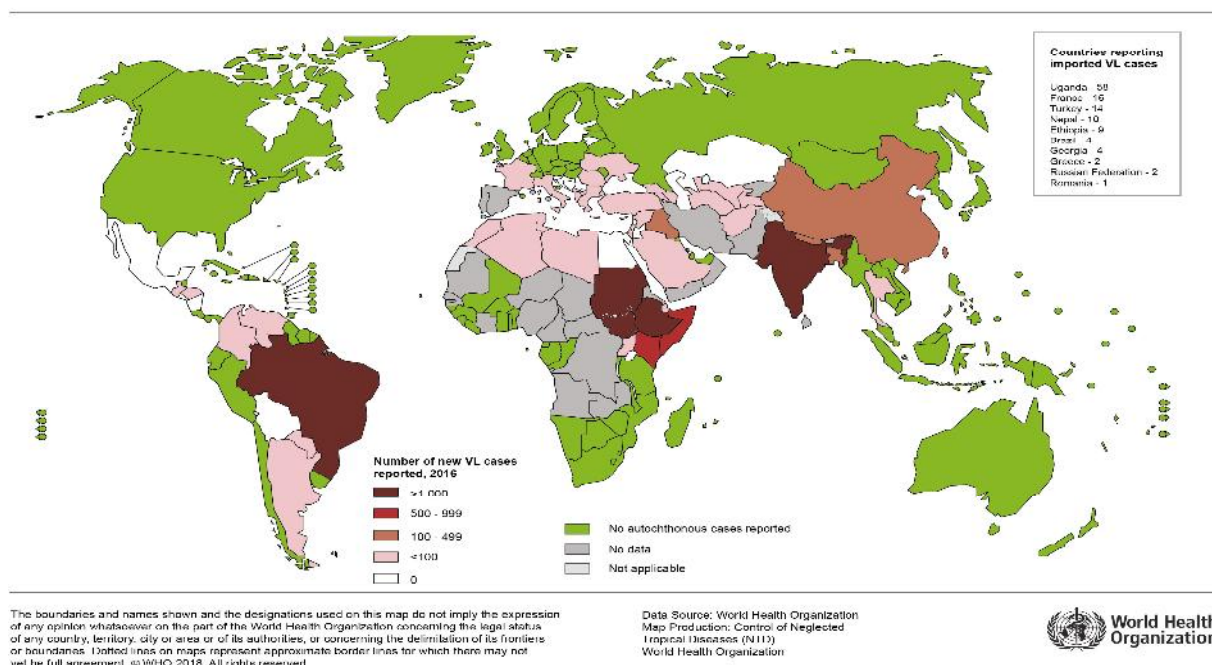


Fig. 6: Situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale dans le monde (OMS, 2016).

## II Clinique

Les manifestations cliniques de la leishmaniose dépendent de la complexité des interactions entre les caractéristiques de virulence des espèces de *Leishmania* et les réponses immunitaires de ses hôtes. La maladie est divisée en trois syndromes cliniques majeurs: viscéraux, cutanés et muqueux en fonction de la localisation du parasite dans les tissus de mammifères (Pearson *et al.*, 1996 ; Akhoundi, 2016).

### II.1 Leishmaniose cutanée

Les leishmanioses cutanées produisant un large spectre de manifestations allant de petits nodules au niveau de la peau à la destruction globale des tissus muqueux qui peut persister pendant des mois ou même des années dans certains cas avant que les lésions ne guérissent spontanément et laisser des cicatrices plates, hypopigmentées et atrophiques (Aoun *et al.*, 2014 ; Pearson *et al.*, 1996).

Bien que la LC guérisse habituellement et ne menace pas la vie, le patient infecté peut être psychologiquement et socialement endommagé. En fait, il n'est pas rare que plusieurs

lésions provoquent une grande défiguration et de la détresse (Aoun *et al.*, 2014 ; Pearson *etal.*.,1996).

### II.2 Leishmaniose cutanéomuqueuse

En général, l'affection évolue en deux temps : une apparition d'ulcères cutanés totalement identiques à ceux présentés lors d'une LC finissant par cicatriser entre 6 mois et 1 an, suivie ou concomitante d'une seconde infection de la muqueuse nasale. Celle-ci pourra conduire à une destruction partielle ou étendue des muqueuses du nez, de la bouche ou de la gorge (Dedet, 1999).

### II.3 Leishmaniose viscérale

La LV connue sous le nom de kala azar, est une maladie systémique causée par la diffusion de parasites *Leishmania* dans tout le système phagocyte-mononucléés et constitue la forme la plus sévère de la maladie (OMS, 2010). Elle est presque toujours fatale en l'absence de traitement. Les symptômes cliniques incluent entre autres la fièvre, les douleurs abdominales, la diarrhée, anémie, perte de poids, la splénomégalie, l'hépatomégalie et la cachexie (GUERIN *et al.*, 2002).

La LV est également apparue comme une infection opportuniste chez les patients infectés par le VIH ou autres affections immunodéprimantes (Pearson *et al.*, 1996).

## III Diagnostic des leishmanioses

### III.1 Diagnostique direct

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite (diagnostic parasitologique), ou de son ADN (diagnostic moléculaire), à partir du matériel récolté de façon variable suivant la forme de leishmaniose en cause (Tab.I). Il s'agit de méthodes directes largement utilisés dans le diagnostic des leishmanioses (Dedet, 2009).

## Chapitre I : Généralités

**Tableau I : Possibilités diagnostiques selon la forme de leishmaniose (Dedet, 2009).**

Possibilités diagnostiques selon la forme de leishmaniose.				
Méthodes diagnostiques	Formes cliniques			
		LV	LC	LCM
Prélèvement	Moelle osseuse Rate	Sang	Bordure lésion	Lésion
Diagnostic parasitologique	Frottis - Culture	- -	Frottis Histopathologie Culture	Frottis Histopathologie Culture
Diagnostic moléculaire	PCR	PCR	PCR	PCR
Diagnostic immunologique		Détection anticorps circulants	(Hypersensibilité retardée)	(Hypersensibilité retardée)

LV : leishmaniose viscérale ; LC : leishmaniose cutanée ; LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse ; PCR : *polymerase chain reaction*.

### III.1.1 Diagnostic parasitologique

Dans le cas d'une LC, le prélèvement se fait à l'aide d'un vaccinostyle stérile par grattage au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion. Les bordures sont raclées délicatement, la sérosité qui sort de la lésion est étalée sur une lame porte objet et séchée.

Pour la LCM, la lésion muqueuse est prélevée à l'aide d'une pince à biopsie. Les lames sont alors fixées au méthanol et colorées au May-Grunwald-Giemsa (MGG) (Dedet, 2009).

Dans le cas d'une LV, Les amastigotes se trouvent dans le sang, les aspirations et biopsie de la rate, ainsi que dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques .Les parasites apparaissent sous forme amastigote, en général intracellulaire à l'intérieur des monocytes mais de nombreux parasites extracellulaire sont vus sur les frottis (Akhoundi *et al.*, 2013).

La présence des parasites directement est aussi possible par la culture. Cette dernière a pour but de révéler la présence des parasites directement et augmenter leur nombre dans les milieux de cultures. Le prélèvement est ensemencé sur gélose au sang NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) (Pearson, 1996). D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, Schneider et le RPMI-1640 (Mihoubi, 2006).

### III.1.2 Diagnostic moléculaire

Devenue un outil quasi universel dans le domaine de la biologie. La Polymerase Chaîne Reaction (PCR) est une technique rapide permettant d'obtenir d'un échantillon complexe et peu abondant, de l'ADN en quantité suffisante (Fig. 7). Cette méthode utilise le principe de l'amplification in vitro de séquences d'ADN définies (Cortes *et al.*, 2004).

## Chapitre I : Généralités

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase.

Ce cycle répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (référence).

D'autres techniques de biologie moléculaires sont également utilisées dans le diagnostic direct des leishmanioses tel que la PCR en temps réel. Il s'agit d'une méthode quantitative qui permet de quantifier l'ADN présent dans le prélèvement (Dedet, 2009).

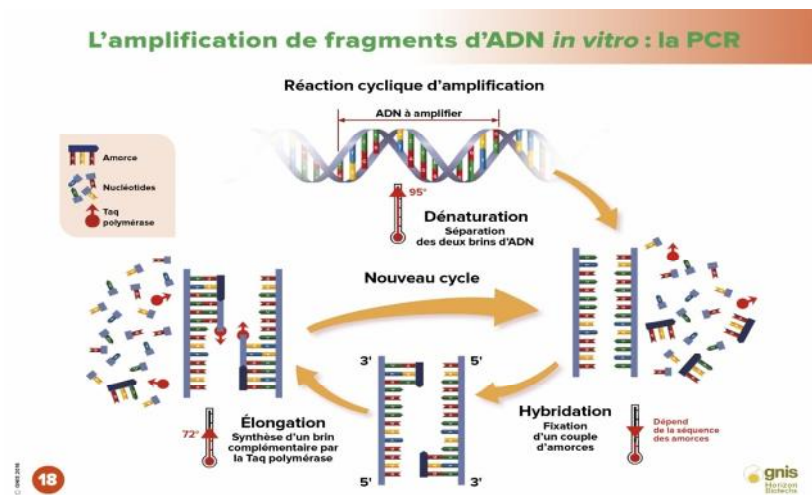


Fig.7 : Amplification génique *in vitro* par PCR (<http://www.horizonbiotechs.com>).

### III.2 Diagnostic indirect

#### III.2.1 Méthodes sérologiques

Les techniques sérologiques sont très utilisées dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale et canine. Elles sont basées sur l'identification des anticorps sériques (Izri et Bellazoug, 2007; Dedet, 2009). La LV et la leishmaniose canine s'accompagnent d'une réponse humorale, avec une apparition de titre élevé d'anticorps circulants (Alvar *et al.*, 2004).

## Chapitre I : Généralités

---

Deux tests sont principalement utilisés: Le test Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et le test d'Immunofluorescence indirecte (IFI). Il s'agit de techniques sensibles et spécifiques surtout en ce qui concerne la leishmaniose viscérale (**Izri et Bellazoug, 2007 ; Dedet, 2009**).

### IV Traitement des leishmanioses

Le traitement des leishmanioses reste difficile, en raison d'une part, de la multiplicité des espèces de *Leishmania* de sensibilité variable aux produits utilisés, et d'autre part, du nombre restreint de produits disponibles, et qui sont toxiques et coûteux (**Dedet, 2009**).

#### IV.1 Antimoniés pentavalents

Les antimoniés pentavalents sont les traitements de premières intention qui font appel à des sels d'antimoine : le N-méthyle glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostan®). Le traitement se prescrit par voie intramusculaire, intraveineuse, ou intra lésionnel. Dans le cas de la LC, la posologie est de 20 mg/kg par jour pendant 20 à 28 jours dans la LV et de la LCM.

#### IV.2 Amphotéricine B

L'amphotéricine B est un antifongique puissant utilisé dans le traitement des Mycoses systémiques. Il représente un anti-leishmanien puissant utilisé dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) ou résistantes aux antimoniés (**Jebbouri, 2013**).

#### IV.3 Pentamidine

La pentamidine est une polyamine très efficace en tant que médicament de seconde ligne, qui inhibe la synthèse de l'ADN parasitaire par blocage de la thymidine synthétase et par fixation de l'ARN de transfert. Cependant, il s'agit également d'un médicament coûteux et extrêmement toxique. Il s'administre en milieu hospitalier par voie parentérale à la dose de 4mg/kg (**Sundar, 2001**).

### V Mode d'action de l'antimoine et mécanismes de résistance aux drogues

Malgré l'utilisation d'antimoine depuis des décennies, le mécanisme d'action n'est encore pas entièrement compris, et certains aspects cruciaux du métabolisme de l'antimoine restent à caractériser. Il est généralement admis que l'antimoine pentavalent (SbV) est une pro-drogue qui requiert une réduction biologique sous forme d'antimoine trivalent (SbIII), pour exercer son activité anti-leishmanienne (Fig. 8). Cependant, son site d'action spécifique au niveau du macrophage et/ou de l'amastigote, et son mécanisme exact de réduction (enzymatique ou non enzymatique) reste controversée (**Roberts *et al.*, 1995 ; Roychoudhury & Ali., 2008**).

Afin d'être actif, l'antimoine doit entrer dans le macrophage, et à travers la membrane phagolysosomale et agir contre le parasite intracellulaire. Bien que la voie d'entrée du SbV ne soit pas connue, les chercheurs pensent qu'il entre via une protéine qui reconnaît la moitié d'un semblant de sucre (**ASHUTOSH *et al.*, 2007**). Il a été démontré qu'une fois que la réduction se produit dans le macrophage, le (Sb III) doit être transporté dans le parasite, grâce aux propriétés des aquaporines qui sont des protéines membranaires qui permettent le transport des petits solutés neutres, et plus particulièrement à l'aquaporine 1 chez *Leishmania* (**GOURBAL *et al.*, 2004**).

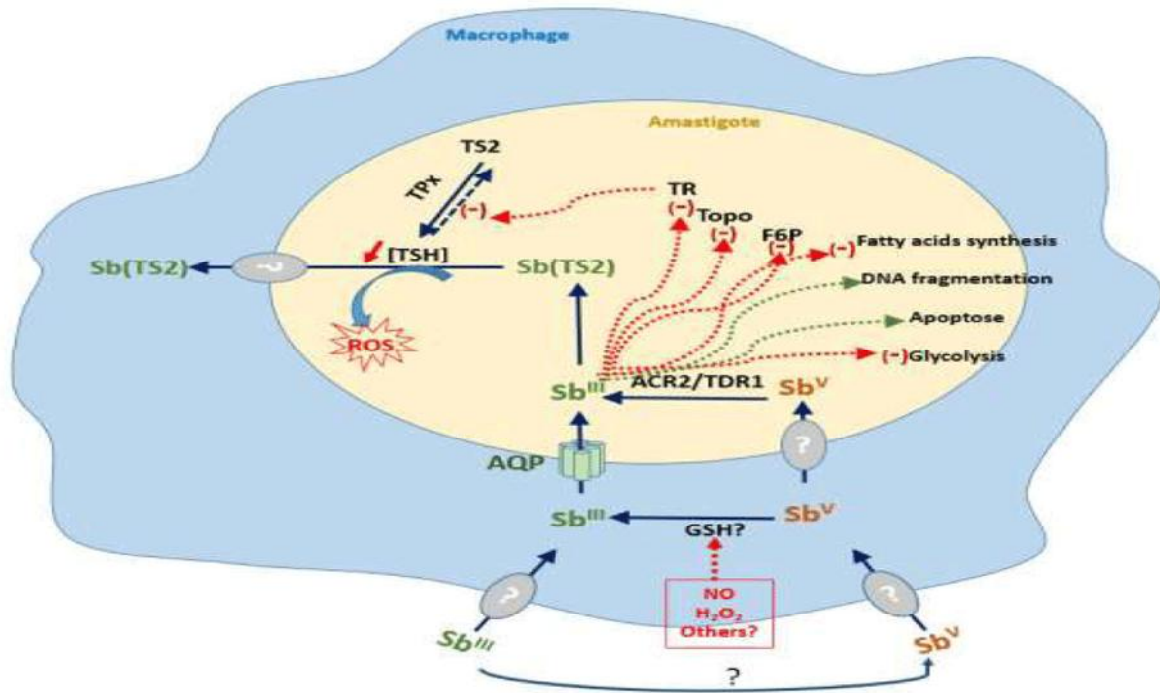


Fig. 8 : Représentation schématique du mode d'action de l'antimoine (Eddaikra,2016).

## VI. Les leishmanioses en Algérie

En Algérie, deux formes cliniques de leishmanioses sévissent à l'état endémique. La leishmaniose viscérale due à *L. infantum*, qui a pour réservoir principal, le chien et les leishmanioses cutanées qui sont dues à trois espèces de *Leishmania* : *L. infantum*, responsable de la leishmaniose cutanée du nord encore appelée leishmaniose cutanée sporadique qui a pour réservoir le chien (Benikhlef et al., 2004), *L. major* responsable de la leishmaniose cutanée zoonotique qui a pour réservoir des rongeurs sauvages *Psammomys obesus* et *Mériones shawi* (Rongeur, Gerbillidés) (Belazzoug, 1983 et 1986) et *L. Killicki* responsable de la leishmaniose cutanée anthroponotique (Harrat et al., 2009).

### VI.1 La leishmaniose viscérale

La LV est causée par *Leishmania infantum*, avec les canidés comme réservoirs (Harrat et al., 1995 ; Bessad et al., 2012) et *Phlebotomus perniciosus* comme vecteur de transmission (Izri et al., 1990). Les variantes enzymatiques décrites jusqu'à présent sont les zymodèmes MON-1, MON-24 et MON-80. Le zymodème MON-1 est retrouvé dans 90% des cas (Harrat et al., 1996).

## Chapitre I : Généralités

---

La leishmaniose viscérale, qui a la même distribution que la leishmaniose canine s'étend sur toute la partie Nord au niveau des étages bioclimatiques humides et subhumides (Harrat *et al.*, 1995). Le foyer le plus actif reste celui de la grande Kabylie qui comprend la région de Tizi-ouzou, Bouira, Bejaia et Boumerdes (Harrat *et al.*, 1995).

De nouveaux foyers sont aussi apparus qui s'étendent jusqu'à Collo à l'Est et déborde jusqu'à Sétif (Adel, 2014). Selon une étude épidémiologique rétrospective réalisée par Adel en 2014 sur la LVH, un nombre de 1274 cas de LV (81,56%) provenaient de provinces situées dans les régions centrale et orientale du nord de l'Algérie. Mila (239), Bejaïa (183), Sétif (147), Biskra (115) et Tizi-Ouzou (106) ont enregistré le plus grand nombre de cas. Outre dans le milieu rural, la présence de cas de LV pourrait être liée à la proximité de parcs (Tizi-Ouzou et Bouira avec le parc Djurdjura, Bejaia avec Parc Gouraya, Blida avec Chrea Park, Mila avec Taza National parc et Illizi avec le parc Tassili NAjjer).

### VI.2. La Leishmaniose cutanée zoonotique

Appelée également « clou de Biskra », on la retrouve à l'étage bioclimatique aride et semi-aride. Elle sévit à l'état endémo épidémique dans les régions steppiques des Hauts Plateaux (Boutrissa, 2014). Cette zoonose connaît actuellement une recrudescence et une extension géographique inquiétantes. Les foyers les plus classiques sont ceux de Biskra, M'sila et Batna. Ils constituent à eux seuls près de 70% des cas déclarés dans le pays (Boutrissa, 2014). En 2005, environ 31000 cas ont été recensés. L'affection s'est déclarée dans de nouvelles régions auparavant indemnes, telles que El Mehir à Bourdj Bouarredj, Saida, Ouargla et Médéa (Boutrissa, 2012).

A l'heure actuelle les souches isolées appartiennent au complexe *L. major* Mon- 25. *P. papatasi* est le principal vecteur de cette forme (Sergent *et al.*, 1921) Les réservoirs incriminés sont des rongeurs gerbillidés sauvages *Psammomys obesus* et *Mériones shawi* (Bellazoug, 1983).

### VI.3 La Leishmaniose cutanée sporadique

Elle est synonyme de la leishmaniose cutanée du Nord (Belazoug *et al.*, 1985). Elle est caractérisée par des lésions cutanées nodulaires localisées au site d'inoculation du parasite par le phlébotome.

## Chapitre I : Généralités

Les variantes enzymatiques de *L. infantum* responsables de la forme cutanée du nord sont les zymodèmes : MON-24, MON-80 et MON-1 (Harrat *et al.*, 1995). Les vecteurs prouvés sont *P. perfiliewi* e *P. perniciosus*, (Izri *et al.*, 1992).

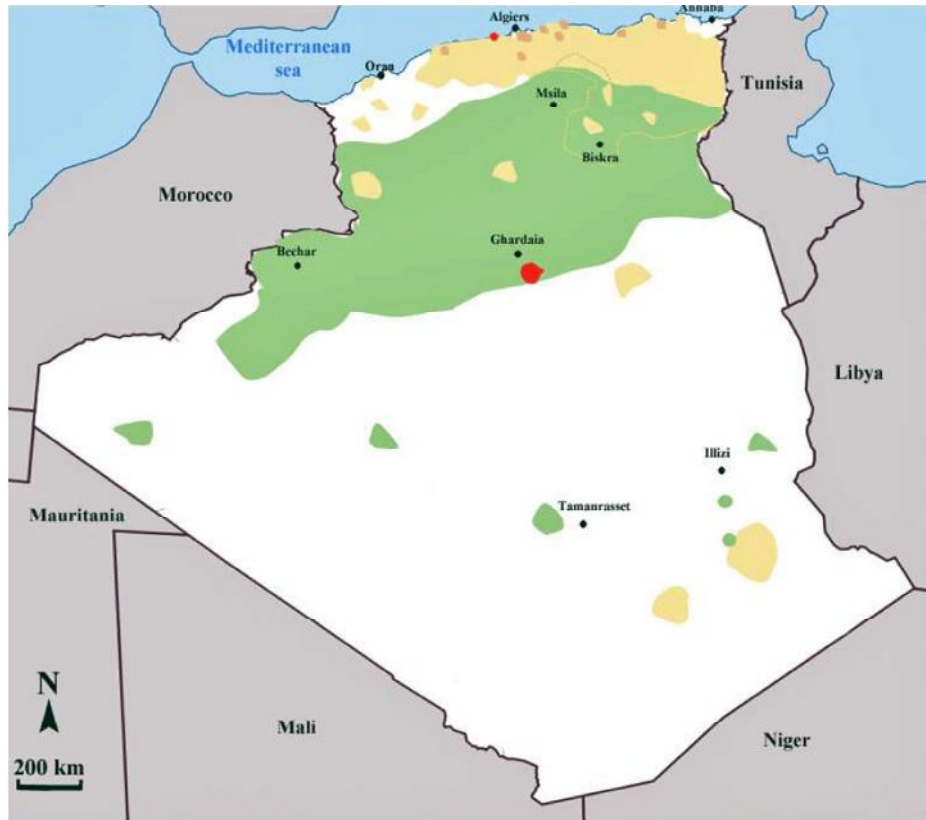


Fig. 9 : Distribution de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie.

(●) *L. major* LC, (●) *L. infantum*LV, (●) *L. infantum*LC, (●) *L. killicki*LC (Eddaikra, 2016).

# Matériel et méthodes

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII

Durant la période s'étalant du 01 décembre 2018 au 31 janvier 2019, 14 malades ayant des lésions cutanées ont été prélevés. Les prélèvements ont servi non seulement pour le diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH chez ces patients, mais aussi pour identifier le parasite en cause et de tester sa sensibilité vis-à-vis la molécule de traitement, le Glucantime.

Le recrutement des patients se déroule au niveau du laboratoire de parasitologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou. Les renseignements concernant l'origine géographique, l'âge et le sexe des 14 patients et leurs déplacements éventuels, la localisation des lésions, leur nombre, et leur aspect morphologique ont été relevés lors de l'anamnèse et de l'examen clinique précédant le prélèvement des lésions (**Tab. II**).

Les milieux de culture ayant servi à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont : le milieu gélosé au sang NNN (Novy, McNeal, Nicolle), le milieu RPMI1640 supplémenté de Sérum de Veau Fœtal (SVF), le Sérum de lapin. Tous les milieux utilisés sont préparés au niveau du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations (LEEPGP) de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA).

#### II.1.2. Etude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou

Il est à signaler que, la région de Tizi-Ouzou est située au Nord de l'Algérie, elle fait partie de la grande Kabylie. Elle est délimitée au nord, par la mer méditerranée, à l'est par la wilaya de Bejaia, à l'ouest par la wilaya de Boumerdès et au sud par la wilaya de Bouira (<http://www.Tizi-ouzou-dz.com>).

Administrativement, la région est divisée en 21 Daïras et 67 communes. Elle compte le plus grand nombre de communes en Algérie et comporte 1142991habitants repartis sur une superficie de 3568 Km<sup>2</sup>.

L'aspect épidémiologique de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou a été réalisé à travers une étude d'observation rétrospective réalisée durant la période 2000-2019. Ainsi, une base de données a été fournie par la direction de la santé de la population (DSP) de la wilaya de Tizi-Ouzou pour la période 2000-2017. Pour les deux années 2018-2019, nous avons intégré les cas diagnostiqués en 2018 au niveau du LEEPGP, ainsi que les cas détectés positifs durant la période de la présente étude (01décembre 2018- 31janvier 2019).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau II : Renseignements des isolats de LCH recrutés durant la période de Décembre 2018 à Janvier 2019 dans la wilaya de Tizi-Ouzou (ND : non déterminer)

N° isolats	Sexe	Age	Adresse	Lieu de séjour	Nombre de lésions	Localisation	Aspects des lésions
1. LC16/18	F	34mois	Tizi-Gheniff	ND	1	Visage	Surinfecté
2. LC75/18	F	18mois	Mizrana	ND	2	Visage (front)	Cicatrisé
3. LC85/18	M	31ans	Djelfa	Fréha	1	Visage	Nodulaire
4. LC86/18	F	05 ans	Alger	Tizi-Ouzou	3	ND	Ulcéro-croûteuse
5. LC87/18	M	42ans	Bouzeguène	Biskra/ Tindouf	6	Membre inferieur	ND
6. LC88/18	M	04ans	Makouda	Adrar	3	Membre inferieur	Ulcéro-croûteuse
7. LC89/18	M	08 ans	Makouda	Adrar	2	Membre inferieur	Ulcéro-croûteuse
8. LC03/19	F	19ans	Ait aissa-mimoune	ND	7	Membre inferieur	Ulcérée surinfecté
9. LC04/19	F	16 ans	Ait aissa-mimoune	ND	6	Membre inferieur	Ulcérée surinfecté
10. LC05/19	M	45ans	Ain-Zaouia	ND	2	Membre inferieur	Sèche
11. LC07/19	M	48 ans	Bordj-Menail	Biskra	2	Membre supérieur	Ulcéro-croûteuse
12. LC08/19	F	47ans	Tizi-Ouzou	ND	1	Cuir chevelu	Ulcéro-croûteuse
13. LC15/19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14. LC21/19	M	33ans	Ait-Khellili	M'sila	7	Membre supérieur	Ulcéro-croûteuse

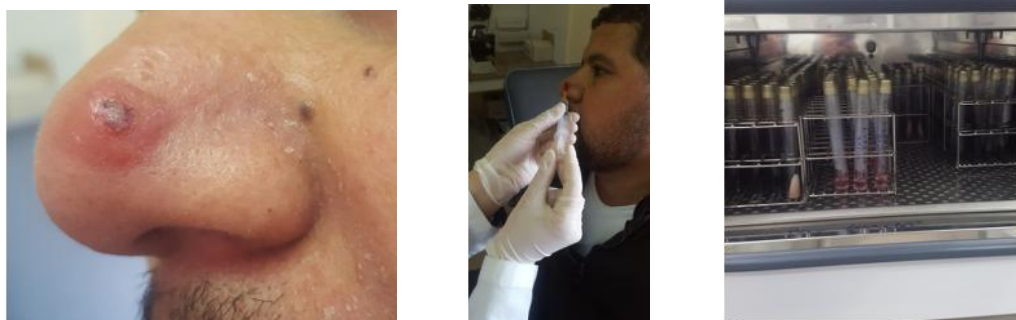
### II.2. Méthodes

#### II.2.1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII

##### II.2.1. 1. Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou

###### II.2.1. 1. 1. Prélèvements des malades

L'ulcération cutanée est soigneusement désinfectée avec de l'eau oxygénée. Le raclage est réalisé par un vaccinostyle ou une seringue stérile au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion (Fig.10). Le matériel raclé est déposé sur la surface d'une lame porte objet pour une éventuelle recherche des formes amastigotes du parasite (diagnostic parasitologique) ou de son ADN (diagnostic moléculaire). Une partie du suc dermique est ensemencée stérilement sur NNN et sérum de lapin pour un éventuel isolement de la forme promastigote du parasite. Une autre partie du prélèvement est conservée dans du tampon Tris EDTA (TE) et conservé à -20°C jusqu'au jour de l'extraction de l'ADN pour le diagnostic et/ou l'identification moléculaire.



**Fig.10** : prélèvements de la lésion cutanée (Belmiloud & Ouameur, 2019).

Il est à signaler que nous n'avons pas pu avoir les trois types de prélèvements (lame, culture et TE) pour tous les patients de la présente étude. Aussi, sur les 14 malades recrutés, 8 ont bénéficié d'un prélèvement du suc dermique de la lésion cutanée sur lame, 10 sur culture NNN et Sérum de lapin et seulement 2 sur TE (Tab.III).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

**Tableau III :** Types de prélèvements réalisés sur les 14 cas de LCH durant la période de décembre 2018 à janvier 2019 dans la wilaya de Tizi-Ouzou

N° isolats	Type De prélèvement		
1. LC16/18	Frottis	/	/
2. LC75/18	Frottis	/	/
3. LC85/18	/	Culture	TE
4. LC86/18	/	Culture	/
5. LC87/18	/	Culture	/
6. LC88/18	/	Culture	/
7. LC89/18	/	Culture	/
8. LC03/19	Frottis	Culture	/
9. LC04/19	Frottis	Culture	/
10. LC05/19	Frottis	/	/
11. LC07/19	Frottis	Culture	/
12. LC08/19	Frottis	/	TE
13. LC15/19	/	Culture	/
14. LC21/19	Frottis	Culture	/

### 1. Diagnostic parasitologique de la LCH

#### 1.1.Examen direct : Recherche des formes amastigotes dans le frottis

Le matériel raclé est déposé sur la surface d'une lame porte objet et laissé sécher. La fixation des cellules est réalisée par du méthanol. La coloration du frottis est effectuée par la suite avec du Giemsa dilué (1:10 vol/vol) pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite lavées avec de l'eau de robinet et laissées sécher. La recherche des formes amastigotes se fait par observation des lames au microscope optique, objectif Gr. X100(Fig.11).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

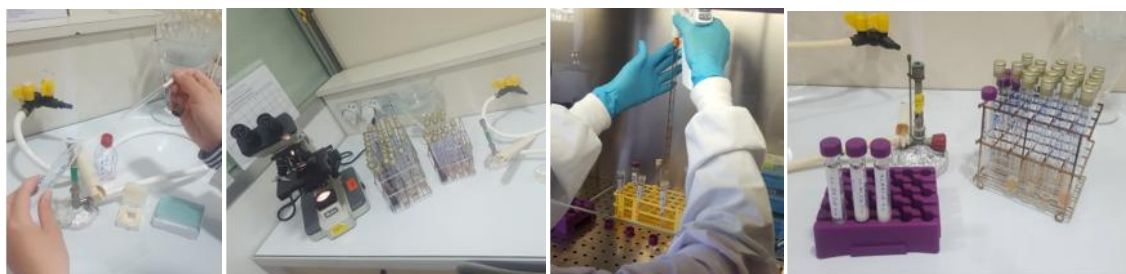


**Fig.11:** Coloration au Giemsa du frottis (original, 2019)

### 1.2. Isolement et culture des parasites

L'isolement du parasite est nécessaire non seulement pour confirmer le diagnostic de la LCH chez les cas, mais aussi pour la réalisation des différentes études ciblées dans notre travail à savoir : l'identification moléculaire par PCR-RFLP ITS1 et l'étude de la chimiorésistance des souches isolées aux antimonies Sb III.

L'isolement du parasite est effectué sur milieu NNN et/ou sérum de lapin après une incubation à 25°C pendant quelques jours. L'examen est réalisé entre lame et lamelle, au microscope au grossissement moyen (objectif x 40), en fond clair, les leishmanies peuvent être repérées par leur mobilité(Fig.12).



**Fig.12 :** isolement et culture des parasites (original, 2019)

Dans le cas d'une culture positive, les parasites sont repiqués dans de nouveaux milieux NNN ou milieu liquide RPMI1640+ 10%SVF dans le but de multiplier le nombre de parasites. La culture en masse des parasites est effectuée sous hôte à flux laminaire pour éviter toute contamination des cultures avec des germes ou des champignons.

### 1.3. Culture en masse des parasites

Les suspensions parasitaires des deux tubes NNN issus du deuxième repiquage sontensemencées sur 4 tubes contenant du RPMI 10 %. Après incubation d'une semaine à 25 °C, les suspensions parasitaires sont récupérées dans un tube conique stérile et centrifugées à 3000 tr/mn pendant 15 mn. Le culot parasitaire obtenu est soumis à une extraction par phénol chloroforme alcool iso-amylque pour l'étude moléculaire ou traité pour l'étude de la sensibilité des isolats via à vis du Sb III.

### 3. Diagnostic moléculaire par PCR ITS1

Dans la présente étude, la PCR a été appliquée selon le protocole de **Schonian (2008)** pour amplifier la région ITS1 (Internal transcribed spacer 1) de l'ADN extrait de *Leishmania* aussi bien pour le diagnostic de la LCH que pour l'identification de l'espèce en cause. Il s'agit d'une région polymorphe entre espèces de *Leishmania* et qui sépare les gènes codants pour la petite sous unité SSU rRNA et 5.8s rRNA, en utilisant les amorces : L5. 8s5' - TGATACCACTTATCGCACTT- 3' / LITSR 5'- CTGGATCATTTTCCGATG-3'.

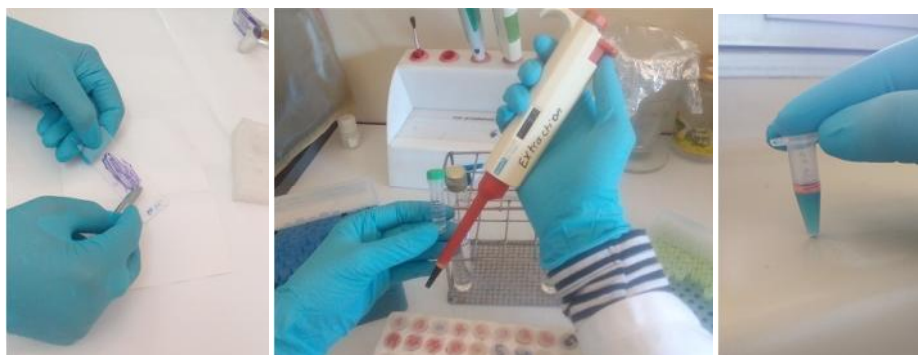
#### 3.1.Extraction de l'ADN parasitaire par phénol chloroforme alcool iso-amylque

L'extraction de l'ADN par phénol chloroforme iso-amylque pour les frottis et les culots parasitaires se fait selon les mêmes étapes.

##### 3.1.1 Sur lame

Les lames colorés au Giemsa et dont les résultats sont négatifs ont été sélectionnées pour une extraction de l'ADN.

A l'aide d'un bistouri stérile nous avons effectué un grattage du frottis coloré. La matière récupérée est déposée dans un tube eppendorf de 1,5ml. Une extraction de l'ADN au phénol- chloroforme iso-amylque été effectuée par la suite (Fig.13).





**Fig.13** : Les différentes étapes de l'extraction de l'ADN (photos originales)

### 3.1.2. A partir des souches

L'extraction de l'ADN par phénol chloroforme iso-amylique est réalisée sur le culot parasitaire obtenu après culture en masse.

#### Les étapes de l'extraction

##### Lyse cellulaire

Un tampon de lyse et du SDS à 10% sont ajoutés au culot parasitaire et/ou au produit du raclage du frottis pour casser les ponts disulfure et la bicouche lipidique de la cellule. Par la suite, la protéinase K (20mg/ml) est ajoutée pour digérer les protéines existantes dans la cellule et notamment celles qui sont liées à l'ADN. La lyse est réalisée au bain marie à 37°C toute la nuit.

##### Déproteinisation (sous hotte chimique)

La déproteinisation se fait par l'ajout d'un volume du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25v/24v/1v) à la préparation précédente. Après centrifugation à 13000g pendant 10 minutes, les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse. Cette dernière est récupérée délicatement dans un nouveau tube.

##### Précipitation

De l'acétate de sodium (1/10 du volume de notre échantillon) et un volume d'éthanol absolu sont par la suite ajoutés à la solution récupérée précédemment. L'ADN est précipité sous forme de filaments blanchâtre appelée «Méduse», après centrifugation à 12000g à 4°C

## Chapitre II : Matériel et méthodes

---

pendant 15 minutes. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 70% et centrifugé à 12000g à 4°C pendant 15 minutes. L'ADN est séché une nuit à température ambiante. Après une nuit de séchage, du tampon d'éluion (TE) est ajouté pour réhydrater l'ADN et conserver à -20°C pour une utilisation ultérieure.

### 3.2.PCR ITS1

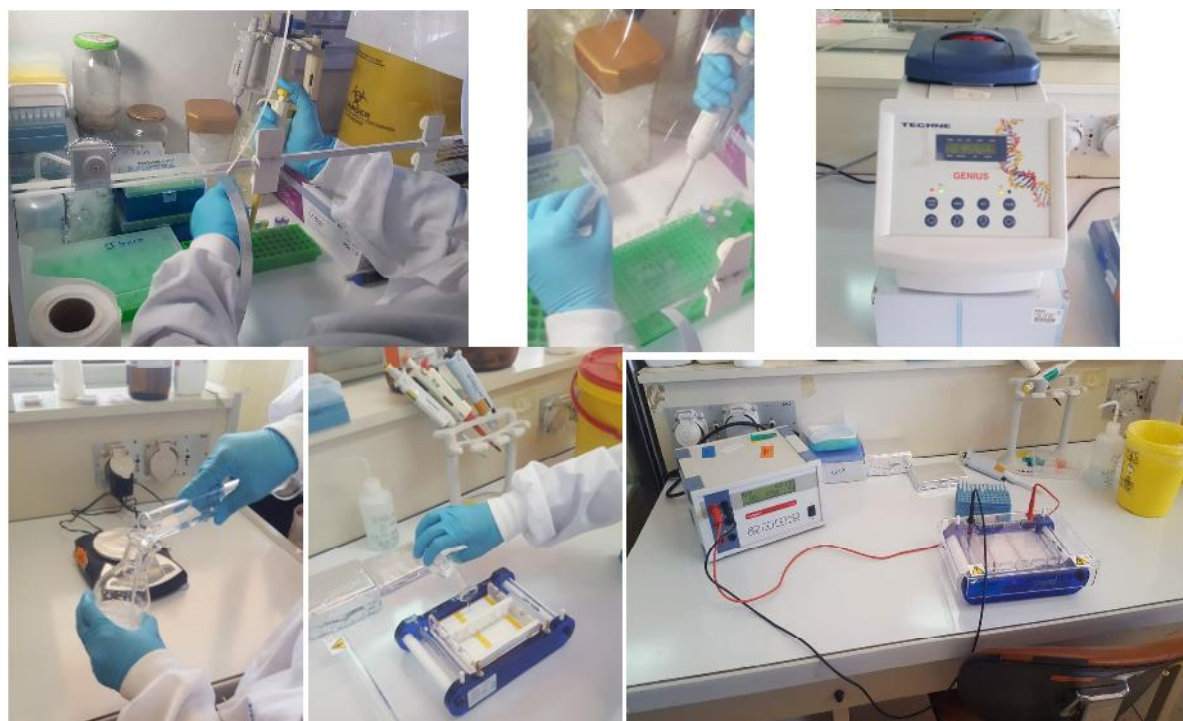
#### 3.2.1. Préparation du mix

La Préparation du mix se réalise sous hôte dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination du mix. Ainsi un mélange réactionnel est préparé selon le protocole de (Schonian, 2008) contenant : 10X PCR buffer, dNTP mix (2.5mM), primer LITRS et L5.8S (10µm), Taq (5U/µl) et de l'eau distillée.

L'ADN extrait auparavant est mis en contact avec le mélange réactionnel et placé dans le thermocycleur selon un programme spécifique à l'amorce ciblé (Schonian, 2008).

#### 3.2.2. Révélation des produits PCR : Diagnostic moléculaire de la LCH

Les produits PCR (*amplicons*) sont révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 2%. Ainsi un gel d'agarose est préparé dans du tampon Tris Acid acétique EDTA (TAE) dont le Bromure d'Ethidium est ajouté. Ce dernier s'intercale entre les acides nucléiques et permet la visualisation de la partie amplifiée sous UV. Après chauffage du gel au micro-onde, ce dernier est coulé dans une cuve d'électrophorèse munie d'un peigne. Après polymérisation, le peigne est ôté du gel et 5 µl de chaque amplicon est spoté dans les puits du gel. Un marqueur de taille est utilisé (100 paire base) pour vérifier la taille du produit PCR (Fig.14).



**Fig.14** : Les différentes étapes de la PCR

### I. Identification moléculaire des souches de *Leishmania* par PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction RFLP) de la région ITS1

L'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction « RFLP », (*Restriction Fragment Long Polymorphism*) est une technique qui permet de comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome qui est préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme (Schonian, 2009). Cette région est utilisée comme substrat pour les enzymes de restriction. Ces derniers, reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparés en fonction de leur taille. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches (Schonian *et al.*, 2003).

Les produits PCR ITS1 révélés positifs ultérieurement sont digérés par l'enzyme de restriction Hae III à 37°C pendant une nuit, selon le protocole de Schonian, 2008 (Fig.15). Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% et visualisés sous UV. Pour identifier les espèces de *Leishmania*, 02 espèces marqueurs (souches de références) ont été utilisées : *L. major* et *L. infantum*.



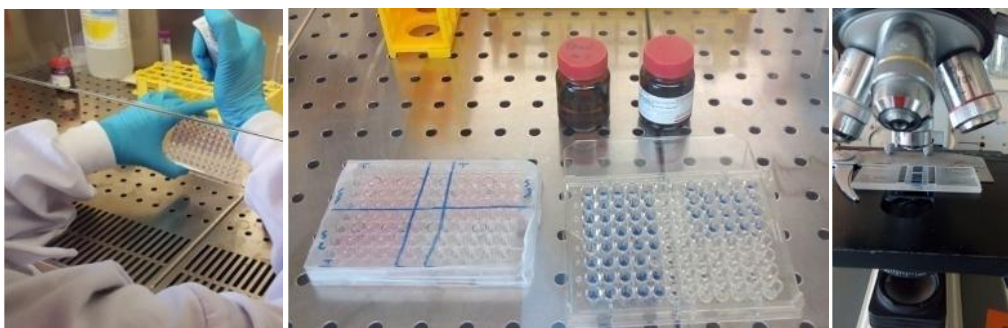
Fig.15 : Les différentes étapes de la PCR RFLP-ITS1

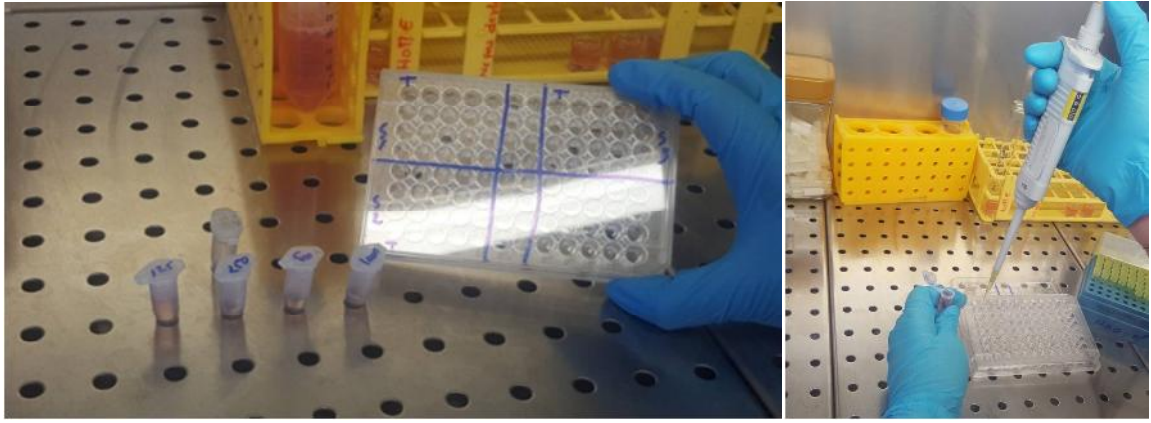
### II. Étude de la chimiorésistance : Test de sensibilité des promastigotes à l'Antimoine (SbIII)

Afin d'étudier la chimiorésistance des isolats de LCH de la wilaya de TO, nous avons évalué la sensibilité et/ou la résistance des souches *via à vis* du SbIII.

Après une culture en masse des leishmanies, une suspension parasitaire de  $2 \times 10^6$  parasites/ml a été cultivée sur milieu RPMI1640 supplémenté à 10% de SVF. Les parasites ont été ensuite incubés en quadruplâtes en présence de concentration croissante de Sb III, à savoir : 12.5, 25, 50 et 100  $\mu\text{g/ml}$ . Les parasites ont été déposés dans une plaque de 96 puits à fond plat à raison de 100  $\mu\text{l}$  par puits. La croissance parasitaire a été contrôlée après 72h d'incubation par numération cellulaire à l'aide de la cellule de Thoma (Fig.16). La concentration de l'antimoine trivalent (Sb III), causant 50% de mortalité ( $\text{IC}_{50}$ ) a été obtenue à partir de la courbe des pourcentages de viabilité, en fonction du log des concentrations (Sereno *et al.*, 2001).

Trois tests ont été réalisés pour chaque souche afin de déterminer la moyenne des  $\text{IC}_{50}$ .





**Fig.16.** : Les différentes étapes du test de sensibilité

### III. Analyse statistique

Pour l'étude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de TO, une analyse sur le logiciel Excel a été réalisée sur la base de donnée recueillies. Cependant l'analyse du test de la chimiorésistance à l'antimoine Sb III a été réalisée par le logiciel Graphprism5.03.

# Résultats et interprétation

# Discussion

### A- Diagnostic parasitologique et/ou moléculaire de la LCH et étude de la chimiorésistance à l'antimoine SbIII

Dans la première partie de la présente étude, nous avons effectué un diagnostic parasitologique sur 14 prélèvements cutanés récupérés auprès du service de parasitologie de l'hôpital de CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou. Sur les 14 malades recrutés dans cette étude; 8 ont bénéficié d'un prélèvement du suc dermique de la lésion cutanée sur lame, 10 sur culture NNN et Sérum de lapin et seulement 2 sur du TE.

L'examen direct des 9 lames colorées au Giemsa, nous a permis de mettre en évidence les corps de *Leishmania* chez seulement deux patients (Tab. IV), soit une fréquence de 25%. Malgré le nombre réduit des malades recrutés dans cette étude, ce pourcentage apparaît cohérent et concorde avec ce qui a été rapporté par **Moumni, en 2015** dans la région de Tlemcen où elles ont recensé 12 cas sur 35 prélèvements cutanés examinés (34%).

Entre autre, le diagnostic moléculaire par PCR ITS1 de l'ADN extrait à partir des lames négatives (6 prélèvements), ainsi que les 2 prélèvements sur TE étaient aussi négatifs chez 7 patients (LC16, LC75, LC03, LC05, LC08, LC15, LC21). Malgré la sensibilité et la spécificité de l'outil moléculaire (**Schonian et al., 2003**), un seul résultat PCR ITS1 a été trouvé positif chez un des deux prélèvements effectués sur du TE (LC85/18), soit une fréquence de 50%. Il est à noter que les frottis sur des lames préparées lors du diagnostic au microscope, sont des sources précieuses d'ADN pour le diagnostic par PCR (**Schonian et al., 2003**). Des études antérieures utilisant des lames colorées au Giemsa pour une amplification avec la PCR ITS1 ont montré que l'ADN de *Leishmania* avait été détecté dans 96,2% des lames des cas suspectés de LC au Maroc (**Arroubet et al., 2013**).

L'utilisation des cultures sur des milieux de cultures chez 10 prélèvements, nous a permis d'isoler le parasite *Leishmania* dans 70% des isolats. Ce résultat concorde avec les résultats rapportés par **Bousslimi et al. (2014)**. Les auteurs de cette étude ont trouvé un pourcentage de 62,3%.

L'utilisation des cultures s'avère utile non seulement pour confirmer le diagnostic mais aussi pour identifier l'agent causal. La caractérisation rapide et précise du parasite par l'outil moléculaire est importante non seulement pour connaître l'espèce de *Leishmania* qui circule dans la zone de notre étude mais aussi de décider du traitement approprié (**Aoun, 2012**).

## Chapitre IV : Discussion

---

Il ressort de notre identification par PCR RFLP, l'appartenance de nos isolats à *leishmania major* chez 6 patients. Un seul isolat LC85 n'a pas pu être identifié car il a été mal digéré lors de la digestion enzymatique par le HaeIII. *L. major* est une espèce causale de la leishmaniose cutanée zoonotique. Les foyers les plus touchés sont Biskra, M'sila, Batna et le Nord Sahara (**Belazzoug,1983; Pralong et al., 1990 Harrat et al., 1995**). D'après la fiche de renseignement rempli lors de l'examen des patients (Tab.II), nous remarquons que la notion de séjour dans des zones de LCZ a été notée chez 71,4% des malades, ce qui explique la présence de *L.major* chez nos cas, cependant un seul cas d'Alger a séjourné à TO (LC86/18). S'agit-il d'une contamination de la souche lors des repiquages? Ou d'une extension de la *L.major* vers le nord d'Alger. **Boutrissa en 2012**, a rapporté le phénomène de l'extension de cette espèce à Bordj- Bou- Arreridj qui se situe à 180 km au sud d'Alger. (**Boutrissa et al., 2012**). Dernièrement en 2016, **Beldi et al**, ont aussi rapportés l'extension de cette espèce vers le nord et le centre-est du pays.

En Algérie, une fois le cas est diagnostiqué, il sera systématiquement traité. Ce traitement est fourni gratuitement, selon les recommandations de l'OMS. Néanmoins, on estime que seuls les deux tiers des cas de LC sont traités. Actuellement, la première ligne de défense contre la LC repose sur l'utilisation de l'antimoine qui est le Glucantime (**Eddaikra, 2017**). Cependant des cas d'échec thérapeutique ont été décrits en Algérie faisant craindre une émergence de la résistance du parasite. Par conséquent, un besoin urgent d'informations sur l'état de la susceptibilité à l'antimoine des parasites et des souches de *Leishmania* est nécessaire. (**Eddaikra, 2017**).

Ainsi, au cours de cette étude nous avons effectué un test de sensibilité des promastigotes vis-à-vis l'antimoine Sb III dans le but de déterminer la sensibilité et/ou la résistance de nos isolats par rapport à ce traitement. Il ressort que nos isolats se comportent statistiquement de la même façon par rapport à leur sensibilité vis-à-vis du traitement du SbIII (p value > 0.05). Sachant que nos souches appartiennent à *L. major*, nos résultats concordent avec ceux d'**Eddaikra et al., 2018**.

### **B. Etude de l'épidémiologie de la LCH dans la wilaya de Tizi-Ouzou**

Afin de caractériser et d'évaluer l'aspect épidémiologique de la LCH à TO, nous avons étudié la distribution des cas durant la période 2000-2019 à travers les données fournis

## Chapitre IV : Discussion

---

par la DSP de la wilaya et à travers les 7 cas diagnostiqués durant les mois de décembre 2018- et de janvier 2019.

Durant la période 2000-2019, 232 cas de LCH ont été recensés dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Il ressort un pic en 2005 avec 33 cas recensés, soit une fréquence de 14%. Selon une étude réalisée par **Mouloua et al., 2017**, 104 cas de LCH ont été enregistrés par les services de santé du département de Tizi-Ouzou durant 2005-2010, soit une incidence de 11,5 cas pour 100000 habitants. et que c'est dans la dépression de DEM ou se concentre principalement les cas de LCH avec une incidence de 39,02 cas pour 100 000 habitants.

Cette augmentation a touché non seulement la wilaya de TO, mais également toutes les wilayas de l'Algérie. D'ailleurs, un pic d'alerte a été enregistré en 2005 par le ministère de la Santé algérienne, où 30 227 cas ont été recensés (REM, 2006). La maladie est passée de 29 cas pour 100 000 habitants en 1997 à 76,68 cas pour 100 000 habitants en 2005 (**Eddaikra, 2018**). Cependant les zones les plus touchées restent localisées dans les hauts plateaux dans les zones arides et semi arides : Biskra, M'sila et Batna (**Belazzoug, 1983**). Cependant une extension vers le nord a été signalée par **Boudrissa en 2012** et par **Beldi en 2016**. Il est à noter qu'après ce pic épidémique, le Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière Algérien a lancé une campagne de lutte anti-vectorielle et de prévention contre ces zoonoses pour l'ensemble du pays. Le taux de réduction de l'incidence est passé de 52% en 2006 à 82% en 2009 sur l'ensemble du pays (**Benikhlef, 2011**).

Ainsi, nous remarquons à travers notre étude qu'il y'a eu une baisse des nombres de cas dans la wilaya de TO durant les mêmes années (Fig..25.). Cependant une baisse considérable a été remarquée en 2012 (1,29%) pour atteindre 0% en 2014, 2015 et 2017.

Malgré la courte durée de notre étude (décembre 2018-janvier 2019), nous avons diagnostiqué 7 cas de LCH et que les premiers cas de cette parasitose apparaissent généralement à partir du mois de décembre jusqu'à juillet. **Aoun et al., en 2012** ont signalé que les manifestations cliniques de cette parasitose apparaissent à partir du mois d'août jusqu'à mois de janvier.

La distribution des cas de LCH par commune a montré que Draa el mizan (DEM) prend la tête du classement, suivie par Tizi-Gheniff, Boghni, M'kira et Ain-Zaouïa (Fig.31). Nos résultats concordent avec ce qui a été rapporté par **Mouloua et al., 2017**. Les auteurs ont

## Chapitre IV : Discussion

---

aussi signalé que c'est dans la dépression de DEM ou se concentre principalement les cas de LCH avec incidence de 39,02 cas pour 100 000 habitants.

DEM est une zone qui appartient à l'étage bioclimatique subhumide à hiver doux (**MEDDOUR, 2010**). Elle est caractérisée par une situation enclavée, donc protégée par rapport aux vents, avec toutefois une ouverture vers la mer au Nord-ouest, adoucissant le climat, réduisant ainsi les grands écarts de température. Une altitude relativement élevée (plus de 400 m) contribue, par ailleurs à tempérer les fortes chaleurs (**LESPE, 1909**), offrant ainsi des conditions favorables au développement des phlébotomes notamment les espèces liées au climat humide ou subhumide comme *Phlebotomus perniciosus* et *P. perfiliewi*. Lors de l'inventaire de **Bouizeri & Fali (2018)**, *P. perfiliewi* était majoritaire dans cette zone avec un taux de 48,15%. Il s'agit d'une espèce qui s'installe vers la fin du mois de juillet et qui est incriminée dans la LCS. Alors que *Phlebotomus perniciosus*, principal vecteur de la LVH en Afrique du Nord (**Harrat, 1995**) a été trouvée avec un taux de 15%. Cependant d'après l'inventaire de **Allouche & OuldLhadj (2018)**, *P. papatasi* été en tête des espèces identifiées avec un taux de 31% sur l'ensemble des phlébotomes capturés. Sachant que cette espèce est incriminée comme étant le vecteur de *L. major* MON-25, agent de la LCZ (**Izri et al., 1992**).

D'après la présente étude ; durant la période de décembre 2018-janvier 2019, il ressort que la commune la plus concernée par la LCH est Makouda (Fig.31). Cependant, la notion de séjour dans des zones de LCZ a été notée chez 71,4% des malades: 2 cas de Bouzeguène et Bordj-Menail ont séjournés à Biskra, 2 cas originaires de Makouda ont séjournés à Adrar et un cas originaire de Fréhaà séjourné à Djelfa. Ce résultat concorde avec celui retrouvé par **Zait & Hamrioui (2009)**, au C.H.U. Mustapha Bacha d'Alger, qui avaient constaté que 57,5% des cas avaient séjourné dans des zones endémie.

A travers cette étude, nous avons remarqué aussi que la tranche d'âge [5-10[ans est la plus vulnérable, ce qui concorde avec le résultat trouvé par **Bourdache & Toumi (2014)**. Le sexe ratio est en faveur des hommes, il est de l'ordre de 2,5 qui apparait proche de celui de **Djouzi (2018)** qui a retrouvé 2,2.

## Chapitre IV : Discussion

---

Malgré le nombre réduit des cas étudiés, nous avons remarqué que la partie des membres est la plus touchée par des lésions cutanées (71,4%), plus particulièrement les membres inférieurs (58%), et que l'aspect ulcéro-croûteux est le plus observé (58%). Ces résultats concordent avec ce qui a été rapporté par Aoun en 2012, et **Moumni, en 2015** dans la région de Tlemcen.

# Conclusion générale

## Conclusion

---

La leishmaniose cutanée humaine (LCH), est une maladie parasitaire qui constitue un problème de santé publique, aussi bien dans le monde qu'en Algérie. La wilaya de TO, est parmi les wilayas les plus touchées par la LCH à *L.infantum*.

Le diagnostic parasitologique et/ou moléculaire, l'isolement du parasite dans les milieux de cultures, ainsi que l'étude de la susceptibilité des isolats vis-à-vis de l'antimoine SbIII sont des outils indispensables dans l'analyse et la compréhension de l'épidémiologie de la LCH. vue le nombre réduits des prélèvements obtenus durant notre étude (Décembre 2018-Janvier 2019), la sensibilité et la spécificité des techniques n'a pas été évaluée. Néanmoins, les résultats obtenus à travers ces outils étaient satisfaisants. L'identification moléculaire par l'utilisation de la PCR RFLP a permis de révéler la présence de *L. major* chez 6 souches et que ces dernières sont sensibles à l'antimoine SbIII.

L'analyse de la répartition géographique des 232 cas de la LCH à travers 19 années d'études (2000-2019) a révélé que TO reste un foyer de LCH. Sur les 18 communes touchées, Draa-El-Mizan prend la tête du classement. L'affection touche le plus souvent les enfants en bas âges, et le sexe ratio est en faveur des garçons. Les premiers cas apparaissent à partir du mois de Décembre et les lésions se localisent le plus au niveau des membres.

### Perspectives

- Confirmer la présence de *Leishmania major* dans la wilaya de Tizi-Ouzou, par un nombre de prélèvement plus important.
- Compléter l'identification moléculaire par l'identification biochimique en utilisant la MLEE.
- La déclaration des cas de LCH dans le but d'estimer l'incidence réelle de la maladie à TO.

# Références bibliographique

## Références bibliographiques

---

### A

- Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukehal, A., ... Boelaert, M. (2014). *Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Algeria: An Update*. *PLoS ONE*, 9(6), e99207.
- Aït-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. (2011). *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol. Res.*, 109: 1225.1232.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, VotyÅpka J, Marty P, Delaunay P, et al. (2016). *A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies*. *PLoS Negl Trop. Dis.*, 10: e0004349.
- Akhoundi, M., Downing, T., VotyÅpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., ... Cano, J. (2012). *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence*. *PLoS ONE*, 7(5), e35671
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). *Canine Leishmaniasis*. *Advances in Parasitology*, 1–88
- Allouche I. et Ould Lhadj D. (2018): *Contribution à l'étude de la population phlébotomienne dans la région de Tizi-Ouzou, et recherche des leishmanies par dissection des femelles du genre Phlebotomus*. Mémoire de fin d'étude. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 54p.
- Amato V.S., Tuon F.F., Bacha H.A., Neto V.A., Nicodemo A.C. (2008). Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.*, 105, 1–9.
- Antoine JC, Lang T, Prina E. (1999). *Biologie cellulaire de leishmania*. In : Dedet JP, editor. Les leishmanioses. Paris: Ellipses: p 41-62.
- Aoun K., Bouratbine A. (2014) : Cutaneous leishmaniasis in North Africa. *Parasite*, 21-14.
- Aoun K, Ben Abda I, Bousslimi N et al. *Comparative characterization of skin lesions observed in the three endemic varieties of cutaneous leishmaniasis in Tunisia*. *Ann Dermatol Venereol*. 2012; 139(6-7): 452-8.

## Références bibliographiques

---

Ashutosh, Sundar S., Goyal N. (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J. Med. Microbiol.*, 56(2), 143-153.

Ait Kbaich, M., Mhaidi, I., Ezzahidi, A., Dersi, N., El Hamouchi, A., Riyad, M., ... Lemrani, M. (2017). New epidemiological pattern of cutaneous leishmaniasis in two pre-Saharan arid provinces, southern Morocco. *Acta Tropica*, 173, 11–16.

Akhoundi, M., Mirzaei, A., Baghaei, A., Alten, B., & Depaquit, J. (2013). Sand fly (Diptera: Psychodidae) distribution in the endemic and non-endemic foci of visceral leishmaniasis in northwestern Iran. *Journal of Vector Ecology*, 38(1), 97–104.

### B

Bates P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, 37(10):1097-106.

Balana-Fouce R., Reguera R.M., Cubria J.C., Ordonez D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.*, 30, 435–443

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.

Benikhlef R., Pratlong F., Harrat Z. (2011) : Leishmaniose viscérale infantile causée par *Leishmania infantum* zymodème MON-24 en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 94(1):14R6

Belazzoug S (1983). Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77(6): 876.

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.

Beldi N., Mansourir., Bettaieb J., Yaacoub A., Souguir Omrani H., Saadi Ben Aoun Y., Saadni F., Guizani I .ET Guerbouj S. (2017). *Molecular Characterization of Leishmania Parasites in Giemsa-Stained Slides from Cases of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, Eastern Algeria*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(6), [416-424].

## Références bibliographiques

---

Bessad A., Mouloua K., Kherrachi I., Benbetka S., Benikhlef R., Mezai G.&Harrat Z.(2012). *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull.Socié..Pathol. Exoti.*, 105(1), 5-7.

Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi, I et al. (2012). *Spread of Leishmania major to the north of Algeria*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 105(1): 30-5.

Boudrissa A, (2014). *ETUDE ECO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE CUTANEE DU SUD DE L'ALGERIE*. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas-Sétif.170p.

Bourdache K. Toumi N. (2015) : *Etude épidémiologique des leishmanioses humaines à Leishmania infantum en Kabylie entre 2007 et 2014*. Mémoire de fin d'étude. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.32p.

Boussa S (2008). *Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech .Maroc : effet de l'urbanisation sur la repartitions saptio- temporelle de phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations*. Thèse de doctorat en écologie –épidémiologie. Université louis pasteur Strasbourg I .217 : p 06-25.

Bousslimi N, Aoun K, Ben-Abda I et al.*Place de l'identification des leishmanies par la polymerase chain reaction – restriction fragment length polymerase dans l'étude de l'épidémiologie des leishmanioses cutanées en Tunisie*. *Pathologie Biologie*.(2014). 62(1) :p 30-33.

Bouizri Y., Fali D .(2018) : *Étude du microbiote intestinal des phlébotomes de la région de Tizi Ouzou* . Mémoire de fin d'étude. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Algérie.45p.

## C

Chabasse D., Danis M., Guiguen C., Richard-Lenoble D., Botterel F. et Miégevillle M., 2010 - *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*. 2. Paris : Ed. Elsevier Masson, 362p.

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.* : 98:12-17 .

## Références bibliographiques

---

### D

Dedet. J.P (2009). *Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique*. Elsevier Masson sas a-10 :p508-506.

Dedet J.P, (1999). *Les leishmanioses*. Paris : Ed. Ellipses Marketing, 253P.

Dereure J. (1999). *Réservoirs de leishmanies*. In : Dedet J. P. *Les leishmanioses*. Paris : Ed. Ellipses Marketing, 109-130.

Denton H., Mcgregor J.C., Coombs G.H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase, *TDR1*. *Biochem. J.*, **381**(2), 405-412.

Djezzar Mihoubi I., 2006 *-Etude des leishmanioses diagnostiquées au Centre Hospitalo-Universitaire Ben Baddis de Constantine*. Thèse de Doctorat d'Etat es-Microbiologie. Université Mentouri Constantine, 119p.

Djouzi R. (2018). *Prévalence de la leishmaniose cutanée au CHU de Tizi-Ouzou (Services de maladies infectieuses et de dermatologie)*. Mémoire de fin d'étude. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.43p.

Dujardin J.C., Henriksson J., Victoir K., BrisseS., Gamboa D., Arevalo J., LE Ray D. (2000). *Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the "one gene" evolutionary hypotheses? Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95(4), 527-34.

### E

Eddaikra N., Ait –oudhia K., Kherrachi I., Oury B., Moulti –Mati F., Benikhlef R., Harrat Z., Soreno D. (2018). *Antimony susceptibility of Leishmania isolates collected over a 30-year period in Algeria. Trop. Dis.* 12(3): e0006310.

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.

### F

Frahtia-Benotmane Kh, (2015). *DETECTION MOLECULAIRE DES LEISHMANIES A PARTIR DU GENRE PHLEBOTOMUS (DIPTERA : PSYCHODIDAE) : TENDANCE VERS*

## Références bibliographiques

---

LA REGRESSION DE LA LEISHMANIOSE A CONSTANTINE ? Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri – Constantine. Algérie, 120p.

Frezard F., Demicheli C. (2010). New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv*, 7, 1343–1358.

### G

Guerin P., Olliaro P., Sundar S., Boeleart M., Croft S., Desjeux P., Wasunna M., Bryceson A. (2002): Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2 (8): 494-501.

Gay E., Guegan H., Ameline M., J Gangneux J.-P. (2015). *Les leishmanioses humaines : parasitoses importées et autochtones* : p461-477.

Goto H., Lindoso J.A. (2010). *Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis*. *Exp Rev Anti-infect Ther*, 8, 419–433.

Gourbal B., Sonuc N., Bhattacharjee H., Legare D., Sundar S., Ouellette M., Rosen B.P., Mukhopadhyay R. (2004). *Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin*. *J.Biol. Chem.*, 279, 31010–31017.

### H

Harrat Z., Boubidi S., Pratlong F., Benikhlef R. & Selt B., (2009). Description of a dermatropic *leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 716–720.

Harrat Z., Hamrioui B., Belkaid M. & Tabet-Derraz O. (1995). Point actuel sur L'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Patho. Exoti.*, 88. 180 -184.

Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J. A., Belkaid M. et Dedet J. P., 1996 -*Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 90 (6) : 625-629.

Hide M. (2004) : *Variabilité pathogénique du complexe Leishmania (Leishmania donovani, agent de la leishmaniose viscérale. Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II. 268p.

## Références bibliographiques

---

### I

Izri A., Depaquet J. et Parola P. (2006). *Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. Med. Trop.* , 66 : 429-435.

Izri I A,Belazzoug S.(2007).Diagnostique de laboratoire des leishmaniose rencontrées en Algerie.*Dossier scientifique*,396 :5-9.

Izri, M. A., Belazzoug, S., Pratlong, F., & Rioux, J.-A. (1992). *Isolation of Leishmania major from Phlebotomus papatasi in Biskra. Completion of an epidemiological saga. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67(1), 31–32.

### J

Jebbouri Y.(2013). *Profil epidemio-clinique, thérapeutique et Evolutif de la leishmaniose cutanée (a propos de 52 cas)*.Thèse de doctorat. Université SIDI Mohammed Ben Abdellah.Maroc.156p.

### K

Kabb, A. L. Oppegard L.M. ,Mickenzie B.A., Connell G.J.(2001). A mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplast editing. *Nucleic Acids Research*, 29(12), 2575–2580.

### L

Louis C. (2009) : *La leishmaniose canine : ce que doit savoir le pharmacien d'officine*. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Nancy I.108p.

### M

Mazelet L. (2004) .*La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français*. Thèse de Maîtrise de Biologie des Populations et des Écosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 31p.

Marignac G., Lebastard M., Fall G., Nicolas L., Milon G. (2003) : Exploration de la dissémination de Leishmania, un parasite délivré et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte Vertébré. *Bull. Acad. Vét. France-2003/Tome 157-N°2* [www.academie-veterinaire-france.fr](http://www.academie-veterinaire-france.fr). 41- 45.

## Références bibliographiques

---

Marc F., Saihi M., Teyssandier M. (2007) : Maladies transmissibles et insectes piqueurs sur le territoire métropolitain. *Atelier Santé Environnement*. E.N.S.P. -IGS 2006-2007.

Moore E.M., Lockwood D.N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* , 2 (2), 151–158.

Moumni H.(2015) : *Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen*. Mémoire de fin d'étude. Université d'Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.68p.

Mouloua A. (2014) : *Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. 267p.

### O

Ouellette M., Olivier M., Sato S., Papadoupoulou B. (2003). Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era. *Med. Sci.*,19(10),900-9.

### P

Pearson RD, Sousa AQ. 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 22(1), 1–13.

Peacock C.S.,Seeger K.,Harris D., Murphy L.,Ruiz J.C., Quail M.A.,Peters N.,Adlem E ., Tivey A., Aslett M.,Kerhornou A., Ivens A., Fraser A., Rajandream M.A., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z., Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S., Squares R., Whitehead S., Rabinowtsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S.L., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D.P., Oyola S.O., Hilley J.D., Brito L.O., Tosi L.R., Barrell B., Cruz A.K., Mottram J.C., Smith D.F., Berriman M. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat.Genet.*, 39(7), 839- 47.

### R

Real F. (2013). The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res.*, 20, 567–581.

R.E.M. (2006) : Relevé Epidémiologique Annuel. Vol. XVII, N°5, 2006.16p. 15.

## Références bibliographiques

---

Roberts W.L., Berman J.D., Rainey P.M. (1995). In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39, 1234–1239.

Rousset J. ( 1995) . *Maladies parasitaires*. Paris : Ed. Masson, 192p.

Roychoudhury J., Ali N. (2008). Sodium stibogluconate: therapeutic use in the management of leishmaniasis. *Indian J.Biochem. Biophys.* 45, 16–22.

Rioux J.A., LanotteG., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65, 111–125.

### S

Samake S. (2006) : *Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (Cercle de Baroueli)*. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Mali. 120p .

Schonian G., Nasereddin A., Dinse N., SchwEynoch C., Schallig H., Presber W., Jaffe CL. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiol. Infec. Dis.*, 47, 349-358.

Singh S., Sivakumar R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother*, 10, 307–315

Sundar S., Pai K., Kumar R., Pathak-Tripathi K., Gam A.A., Ray M., Kenney R.T. (2001). Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(3), 193-196.

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.

### V

Van der Auwera, G., & Dujardin, J.-C. (2015). Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265–294.

## Références bibliographiques

---

### Z

Zait H. & Hamrioui B., 2009 - Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue Francophone des Laboratoires*. ; 412 : 33-39.

Zhou Y., Messier N., Ouellette M., Rosen B.P., Mukhopadhyay R. (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confer sensitivity to the drug pentostam. *Molecul. Biochem. Parasitol.* 279(36), 37445-37451.