

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE ET VEGETALE



# Mémoire

Présenté par

**M<sup>elles</sup> CHERRAT Sabrina & SAHNOUN Assia**

En vue de l'obtention du titre de

## Master II

**Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: Parasitologie appliquée aux organismes animaux et végétaux**

## Thème

**Préparation des milieux de culture  
pour le diagnostic de la  
leishmaniose cutanée**

Soutenue publiquement le: 16/06/2015

Devant le jury composé de :

**M<sup>me</sup> ZERROUKI-DAOUDI Nacera,**

**Mr BOUKHEMZA Mohamed,**

**M<sup>lle</sup> SEKLAOUI Nacera,**

**M<sup>me</sup> BOUKHEMZA-ZEMMOURI Nabila**

**M<sup>r</sup> HADJ KACI Ammar,**

**Professeure,**

**Professeur,**

**Maître assistante,**

**Professeure,**

**Maître assistant A,**

**U M M T O,**

**Présidente;**

**Rapporteur;**

**Co-Rapporteur;**

**Examinatrice;**

**Examineur.**

**Année Universitaire : 2014/2015**

*Louanges à Dieu le tout puissant pour ce qu'il nous a donné, la santé, la bravoure et la patience pour achever ce travail (Hmdouallah).*

*Au moment de mettre un point final à ce travail, nous tenons à adresser nos remerciements à :*

*-Notre maitre et rapporteur de mémoire Mr. BOUKHEMZA Mohamed, professeur à la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'UMMTO, pour avoir accepté de diriger ce travail avec une grande patience, ses encouragements, ses interventions, ses orientations ainsi ses conseils.*

*Profonds respects et reconnaissance assurée de notre part à vous.*

*-Nous apportons notre gratitude à notre Co-Rapporteur ; Dr SEKLAOUI Nacera maitre assistante en parasitologie et chargé de cours à la faculté de médecine de l'UMMTO de nous avoir aidé, pour sa simplicité, ainsi que pour le temps qu'elle nous a consacré tout au long de ce modeste travail malgré ses multiples préoccupations.*

*-Nous tenons aussi à remercier Dr MOULOVA ABDELKAMEL pour son aide et son appui tout au long de la réalisation de ce travail.*

*- Un spécial et grand merci pour Dr AFROUNE ROKIA pour son soutien et aide tout au long de notre stage pratique au niveau du laboratoire de Parasitologie de la Faculté de médecine de l'UMMTO, malgré ses multiples responsabilités.*

*-Nous adressons également nos remerciements à M<sup>me</sup> ZERROUKI-DAOUDI Nacera, Professeure à U.M.M.T.O, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Qu'elle trouve en ce mémoire toute notre considération et estimation.*

*-A notre examinatrice M<sup>me</sup> BOUKHEMZA-ZEMMOURI Nabila, Professeure a U M M T O, vous nous avez honoré avec grande sympathie de siéger parmi ce jury.*

*-Nous avons aussi l'immense plaisir de confier au Mr HADJ KACI Ammar, Maître assistant A à U.M.M.T.O, l'examen de ce manuscrit, qu'il trouve ici l'expression de toute notre reconnaissance.*

*-Nous tenons à remercier tour ceux qui ont contribué de prés ou de loin, à la réalisation de ce travail.*



# Dédicace

Comment peut-on oublier les inoubliables ?

A cette occasion, un moindre geste m'est obligé envers-eux ;

**A mes chers et respectueux parents "Mouloud" et "Sadia"**

Vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour éternel et mon affection, je vous offre ce modeste travail en témoignage de vos prières et de tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être avec l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me combler ainsi que votre générosité et votre bonté ont été un exemple pour nous tous, sachez que nous vous sommes très reconnaissant.

Je t'aime « Baba » et je t'aime « Yemma » puisse DIEU tout puissant vous garder et vous procurer santé et bonheur.

**A mes deux chers frères "Mohand", "Hamid" et mes deux chères sœurs "Meriem" (Karima) et "Tomtom" (Fatma-Zohra)**

En témoignage de votre soutien et encouragements, un merci et un amour fraternel de ma part. N'oubliez vous pas que l'union fait la force pour lever tous les défauts et les obstacles de la vie. Que DIEU nous protège.

**A la mémoire** de mes deux oncles « ZIZI Hamid » et « XALI Khaled » at-n Yerhem REBI et que DIEU les accueille dans son vaste paradis.

**A Linda ma meilleure amie et copine**

Merci pour la compagnie durant ces années d'étude, merci pour ta compréhension, ton soutien moral et je sais que se merci n'est pas assez. Mais merci pour tous ce que vous avez faits pour moi.

**A toute ma famille maternelle et paternelle.** Je ne saurai les citer tous de façon individuelle, cependant qu'ils soient rassurés du fait que toute ma reconnaissance leur est due.

**A Assia** mon binôme et toute sa famille, c'est un vrai plaisir de travailler avec toi.

**A mes très chères amies** Mina, Aqila, Souhayla, Célia, Nadia, Sabrina, Hakima, Sadia, Nabila, Samia, Ghania, Ryma, Khloudja, Malika et Nassima avec lesquelles j'ai partagé des moments inoubliables.

**A Tous ce qui me connaissent** de loin ou de près et toute la promotion de parasitologie.

**SABRINA**

# Dédicace

## *Je dédis ce modeste travail*

À celle qui pense à nous, jour et nuit, à celle qui m'a appris toutes les bonnes valeurs, à celle qui a fait de ma vie une rose, à la compagne de ma vie... **À toi maman.**

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

À l'homme qui m'a toujours aidé, à l'homme qui m'a toujours guidé, à l'homme qui m'a tout le temps encouragé matériellement et moralement, à l'homme qui m'a permis de franchir tous les obstacles qui se sont dessinés sur mon chemin, à l'homme dont je suis très fière, à qui je dois tout... **À toi papa.**

## **À mon frère Omar**

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

## **À mes sœurs Lydia et Amel**

Vous m'avez soutenue et vous m'avez supportée tout le long de mon parcours que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mes sentiments les plus affectueux.

## **À mes grands parents maternels**

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

## **À toute ma famille**

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

## **À ma meilleure copine Fazia**

Chère sœur merci pour ton soutien tu étais toujours présente pour m'en couragée aucun mot ne serait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance. Puisse DIEU tout puissant te procurer toi ainsi que ta famille santé, bonheur et prospérité.

## **À mon binôme ainsi que toute sa famille**

Avec toute mon affection je vous présente tout mon respect. Puisse DIEU tout puissant vous procure santé, prospérité et tout le bonheur du monde.

## **À l'a mémoire de mes grands parents paternelle ; et mon chère oncle**

## **À tous mes amis et camarades.**

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

**ADN** : Acide Désoxyribose Nucléique.

**C°** : degré Celsius.

**CHU TO** : Centre Hospitalo-universitaire de Tizi-Ouzou.

**EPH** : Etablissement Public Hospitalier.

**L** : Leishmania.

**LC** : Leishmaniose Cutanée.

**LCD** : Leishmaniose Cutanée Diffuse.

**LCL** : Lésion Cutanée Localisée.

**LCM** : Leishmaniose Cutanée-Muqueuse.

**LCN** : Leishmaniose Cutanée du Nord.

**LCZ** : Leishmaniose Cutanée Zoonotique.

**LPG** : Lipophosphoglycan.

**LV**: Leishmaniose Viscérale.

**MGG**: May Grund wald Giemsa.

**MØ**: Phagocytes.

**NNN**: Novy-Mac Neal-Nicolle.

**OMS** : Organisation Mondial de la Santé.

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase.

**UI** : Unité Internationale.

**VIH** : Virus d'Immunodéficience Humaine.

<i>N° des figures</i>	<i>Intitulé</i>	<i>Page</i>
<b>Figure 1</b>	Forme promastigote de <i>Leishmania</i>	7
<b>Figure 2</b>	Formes amastigote	8
<b>Figure 3</b>	Phlébotome femelle	9
<b>Figure 4</b>	Phlébotome mâle	9
<b>Figure 5</b>	Cycle de vie de Phlébotome	10
<b>Figure 6</b>	Le chien réservoir <i>L.infantum</i>	13
<b>Figure 7</b>	<i>Meriones shawi</i>	14
<b>Figure 8</b>	<i>Psammomys obesus</i>	14
<b>Figure 9</b>	Cycle biologique de <i>Leishmania</i>	15
<b>Figure 10</b>	Cycle de transmission de la leishmaniose cutanée	16
<b>Figure 11</b>	La leishmaniose cutanée dans le monde	17
<b>Figure 12</b>	La leishmaniose cutanée zoonotique	18
<b>Figure 13</b>	La leishmaniose cutanée du nord	18
<b>Figure 14</b>	Phlébotome femelle gorgé de sang dans la région Kabyle	19
<b>Figure 15</b>	Forme diffuse de la leishmaniose cutanée	22
<b>Figure 16</b>	Différents types de lésions de la leishmaniose cutanée zoonotique	23
<b>Figure 17</b>	Forme de la leishmaniose cutanée de Nord	24
<b>Figure 18</b>	Co-infection Leishmaniose/VIH dans le monde	25
<b>Figure 19</b>	Les appareillages de laboratoire	32
<b>Figure 20</b>	Le Bain marie	32
<b>Figure 21</b>	L'Etuve Pasteur à 121°C	32

<b>Figure 22</b>	L'Etuve d'incubation	32
<b>Figure 23</b>	La Hotte à flux laminaire.	32
<b>Figure 24</b>	Microscope optique	32
<b>Figure 25</b>	La verrerie utilisée	32
<b>Figure 26</b>	Préparation de la gélose	34
<b>Figure 27</b>	La gélose préparée	34
<b>Figure 28</b>	Les milieux gélosés solidifiés	34
<b>Figure 29</b>	Le lapin	35
<b>Figure 30</b>	Rasage et désinfection de la partie thoracique du lapin	35
<b>Figure 31</b>	Paillasse préparée pour la ponction du lapin	35
<b>Figure 32</b>	Ponction du Lapin	36
<b>Figure 33</b>	Recueil du sang de Lapin dans l'Erlen Meyer	36
<b>Figure 34</b>	Mise en solution des milieux solidifiés	37
<b>Figure 35</b>	Mélange de sang à la gélose	37
<b>Figure 36</b>	Inclination des tubes préparés	37
<b>Figure 37</b>	Milieux NNN dans l'étuve d'incubation à 37°C	38
<b>Figure 38</b>	Contrôle de la stérilité des milieux NNN	38
<b>Figure 39</b>	Conservation des milieux à +4°C	38
<b>Figure 40</b>	Matériels utilisés pour la préparation de milieu blanc d'œuf	39
<b>Figure 41</b>	Agitation des blancs d'œufs	39
<b>Figure 42</b>	Répartition du blanc d'œufs sur les tubes stériles	40

<b>Figure 43</b>	Coagulation des milieux blancs d'œufs au bain Marie à 100°C	40
<b>Figure 44</b>	Conservation des milieux à + 4°C	41
<b>Figure 45</b>	Lésion cutanée	41
<b>Figure 46</b>	Les étapes d'un prélèvement cutané	42
<b>Figure 47</b>	Les étapes de la coloration	42
<b>Figure 48</b>	L'ensemencement de la souche	43
<b>Figure 49</b>	Contenu de la seringue vidé dans les milieux de culture	43
<b>Figure 50</b>	Les formes promastigotes observées au (G×40)	44
<b>Figure 51</b>	Le repiquage de la souche	44
<b>Figure 52</b>	Les formes promastigotes (G×100)	44

## Liste des tableaux

<i>N° des tableaux</i>	<i>Intitulé</i>	<i>Page</i>
<b>Tableau I :</b>	Principaux complexes du Leishmaniose cutanée repartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique (DEDET, 2001)	4
<b>Tableau II :</b>	Les différentes souches ensemencés dans le milieu NNN et leurs repiquage	45
<b>Tableau III:</b>	Ensemencement de deux souches dans le milieu Blanc d'œuf et leurs repiquages	46

## **Index des abréviations**

## **Listes des figures**

## **Liste des tableaux**

## ***Sommaire***

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur la leishmaniose cutanée</b>	
I-1-Définition.....	3
I-2-Historique .....	4
I-3-Etude du parasite .....	6
I-3-1-Taxonomie.....	6
I-3-2- Caractères morphologiques .....	7
I-3-3-Biologie .....	8
I-3-4-Structure biochimique .....	8
I-4-Etude du vecteur .....	9
I-4-1- Taxonomie .....	9
I-4-2- Caractères morphologiques .....	9
I-4-3-Cycle de développement .....	10
I-5-Interaction Leishmanie-Vecteur .....	12
I-6-Effets de la salive du vecteur chez l'hôte .....	12
I-7-Etude du réservoir.....	13
I-8-Cycle de vie et transmission de <i>Leishmania</i> .....	14
I-8-1-Cycle de vie .....	14
I-8-2-Transmission vectorielle .....	15
I-9- Distribution géographique de La leishmaniose cutanée .....	17
I-9-1-Dans le monde.....	17
I-9-2-En Algérie.....	17
I-10-L'effet des changements climatique et environnementaux sur la leishmaniose cutanée ....	18
I-10-1-Les changements climatiques.....	18
I-10-2-Les changements environnementaux.....	19
I-11-Particularités de leishmaniose à Tizi-Ouzou .....	19

## **Chapitre II : Clinique, diagnostic, traitement et prophylaxie**

II-1-Formes cliniques de la leishmaniose cutanée.....	20
II-1-1-Leishmaniose cutanée localisée .....	20
II-1-2 –Leishmaniose cutanée diffuse .....	21
II-2- Les leishmanioses cutanées en Algérie .....	22
II-2-1- La leishmaniose cutanée zoonotique.....	22
II-2-2- La leishmaniose cutanée du Nord .....	23
II-3- Co-infection VIH – leishmaniose cutanée .....	24
II-3-1-Dans le monde.....	24
II-3-2- En Algérie .....	25
II-4-Diagnostic des Leishmanioses cutanées.....	25
II-4-1-Diagnostic indirect .....	26
II-4-2-Diagnostic parasitologique.....	26
II-4-3-Diagnostic moléculaire .....	28
II-5-Prophylaxie .....	29
II-5-1-collective .....	29
II-5-2-Individuelle .....	29
II-6- Traitement .....	30
II-6-1-Locaux.....	30
II-6-2-Généraux .....	30

## **Chapitre III : Matériel et méthodes**

III-1-Matériel .....	31
III-1-1-Matériel biologique.....	31
III-1-2- Matériel de laboratoire.....	31
III-2- Méthodes.....	34
III-2-1- Préparations du milieu NNN .....	34
III-2-2- Préparation du milieu Blanc d'œufs .....	39
III-2-3- Mise en évidence de parasite .....	41
III-3- Ensemencement .....	43

## **Chapitre IV : Résultats et Discussion**

IV-1- Résultats.....	45
IV-1-1- Résultats des ensemencements .....	45
IV-2- Interprétation .....	46
IV-3-Discussion.....	48
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>50</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumés**

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies parasitaires d'expression clinique variée, dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ces affections sont transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions (DESJEUX, 1996).

Les leishmanioses, sont des maladies endémo-épidémiques dont la prévalence mondiale selon l'Organisation Mondiale de la Santé est de 14 millions de personnes atteintes, ce qui fait d'elles parmi les préoccupations majeurs pour l'OMS, dont elles bénéficient d'un programme de prophylaxie très strict.

Les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays du monde. Elles sont répandues à la surface de la terre sous forme de foyers de plus ou moins grande importance sur tous les continents à l'exception de l'Océanie. L'un des principaux facteurs de risques est l'urbanisation (MARTY et *al.*, 2009).

L'Algérie, qui compte parmi les pays les plus touchés, est concernée par cette zoonose qui sévit à l'état endémique sous trois formes cliniques : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN) et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (HARRAT et BELKAÏD, 2002).

Le diagnostic de certitude des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite par examen direct du frottis, ce qui n'est pas toujours fructueux. Aussi, il est préférable de déceler en parallèle le pathogène par la mise en culture. Cette dernière qui est indispensable est cependant conditionnée par la disponibilité de milieux performants et faciles à préparer.

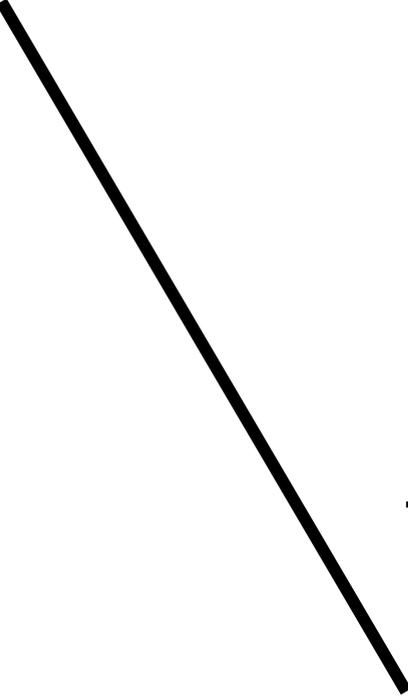
Cependant, il existe une autre alternative concernant l'approche parasitologique directe et qui consiste en l'identification du parasite par l'utilisation de techniques sérologiques et moléculaires.

- L'objectif de la présente étude est :

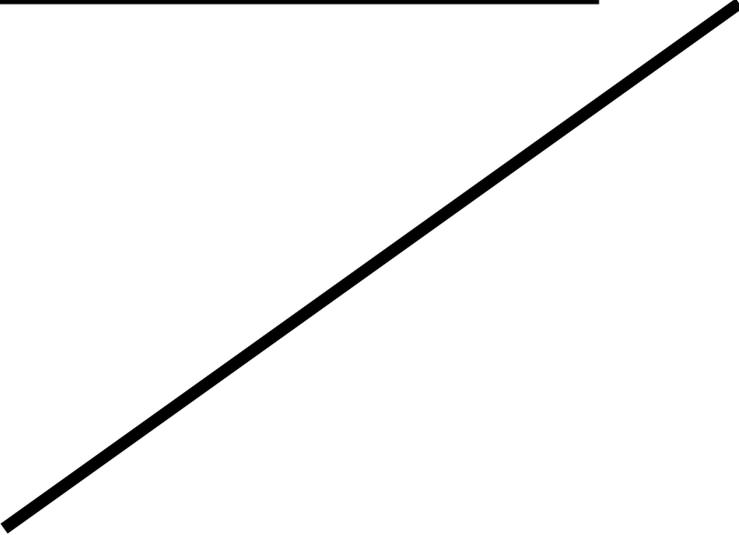
-Réussir la préparation de deux milieux de culture.

- La mise en évidence de parasites dans ces deux milieux.
- Interpréter le rendement de ces deux milieux de culture.

Aussi notre travail s'articule autour de quatre chapitres. Après une introduction générale, les deux premiers sont consacrés à une revue bibliographique sur la leishmaniose cutanée, où sont passés en revue les aspects, systématique, épidémiologie, clinique, diagnostic, traitement et prophylaxie de cette parasitose. Le troisième chapitre est dédié à la méthodologie de travail. Les résultats de cette étude sont rapportés et discutés dans le quatrième chapitre. Une conclusion générale termine ce travail.



*Etude bibliographique*



---

---

***Chapitre I***  
***Généralités sur la leishmaniose***  
***cutanée***

---

---

- La leishmaniose cutanée est une réticulo-endothéliose parasitaire dont l'agent pathogène infecte les macrophages des mammifères.

**I-1-Définition**

Les leishmanioses sont des parasitoses communes à l'homme et aux animaux (anthropozoonoses) dues à des protozoaires du genre *Leishmania*, famille des trypanosomatidae (LIGHTBURN et al., 2000). Ce sont des maladies infectieuses dues au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaires flagellés (DEL GIUDICE et al., 2001). Ces parasites obligatoires dihéteroxyènes (MARIGNAC et al., 2003) affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme (DEDET, 2001). Ce parasite est transmis par la pique d'un arthropode vecteur, le phlébotome femelle (MARTY et al., 2009) appartenant au genre *Phlebotomus* dans l'Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (OSMAN et al., 2000).

Les Leishmanies causent une panoplie de manifestations cliniques, allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes dites « Bouton d'Orient » (isolé siégeant sur une partie du corps), à des affections viscérales fatales avec dissémination du protozoaire dans tout l'organisme, pouvant en l'absence de traitement entraîner la mort (DESJEUX, 2004), et d'autres affections, cutanéomuqueuses (exacerbations inflammatoires causent des graves défigurations). Elles incluent d'autres affections rebelles à toutes thérapeutiques : leishmaniose cutanée diffuse (LCD). Cette forme de LC particulière et rare correspond au parasitisme de sujet anergique par les espèces *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde et *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde. Mais depuis que les cas d'immunodépression acquise se multiplient, quelques cas de LCD ont également été signalée avec les espèces habituellement responsables de lésions localisées telles *L. major* ou *L. braziliensis*.

La multiplicité des tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces leishmaniennes (Tableau I) et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté (DEDET, 2001).

- **Tableau I :** Principaux complexes du Leishmaniose cutanée repartis selon le sous-genre, le grand domaine géographique et l'expression clinique (DEDET, 2001).

Sous-genre <i>Leishmania</i>		Sous-genre <i>Viannia</i>
<b>Ancien Monde</b>	L.tropica L.major L.kilicki L.aethiopica L.arabica	
<b>Nouveau monde</b>	L.infantum L.mexicana L.amazonensis L.venezuelensis	L.guyanensis L.panamensis L.shawi L.naiffi L.lainsoni L.peruviana
<b>Clinique</b>	Leishmaniose cutanée	

## I-2- Historique

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leur forme cutanée, comme en témoigne le nom sanscrit de Kala-azar (fièvre noire) qui désigne la leishmaniose viscérale indienne.

En effet, la constatation des lésions cutanées bien évidente remonte à la plus haute antiquité aussi bien dans l'ancien que dans le nouveau monde, alors que l'individualisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pu se faire qu'au XIXème siècle. Ainsi, les leishmanioses tégumentaires de l'ancien monde, sont des affections dermatologiques connues depuis très longtemps. La première description clinique moderne est celle de Mc NAUGHT en 1882 et c'est CUNNINGHAM en 1885 qui découvrit les parasites dans un prélèvement de « bouton d'Orient ».

En 1898, BOROWSKY décrit les parasites d'une leishmaniose cutanée en reconnaissant leur nature de protozoaires.

Le parasite *Leishmania* fut découverte par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leurs honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (ROBERTS et JANOVY, 2000; cité par FORGET, 2004).

La première culture fut obtenue par NICOLLE & SCIRE en 1908, ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903 et conclurent « la presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan et de celui de Wright n'est pas contestable.

En 1910, PEDROSA et DA SILVA réussissent à cultiver pour la première fois *L.braziliensis* sur le milieu NNN.

En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur les scarifications cutanées. Mais la transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par ADLER & BER (MAZELET, 2004).

De 1925 à 1928, ADLER et THEODOR ainsi que CHRISTOPHERS étudient le cycle du parasite et sa répartition géographique.

En 1981, MAAZOUN et *al.* Mettent en place la chimiotaxonomie pour les études taxonomiques du genre *Leishmania* (MAAZOUN et *al.*, 1981).

BELAZZOUG, en 1985, isole et identifie le variant enzymatique de *L.infantum* responsable de la leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. Il s'agit du zymodème MON-24 (BELAZZOUG, 1985).

A partir de 1985, les premiers cas de co-infection VIH-leishmanies sont décrits.

Depuis 1990 a lieu le séquençage et l'annotation des génomes de *Leishmania* ainsi que l'identification des *Leishmania* par les techniques moléculaires (RAVEL et *al.*, 1998 ; RAVEL et *al.*, 2006).

En Algérie, le premier cas de leishmaniose cutanée appelé « clou de Biskra » a été décrit par HAMEL en 1860 à Biskra (HAMEL, 1860).

Ainsi que différents collaborateurs, à savoir, IZRI, HARRAT, BELKAID, HAMRIOUI, BACHI et ACHOUR ont contribué à l'étude des leishmanioses cutanées en Algérie par leurs travaux et publications.

**I-3- Etude du parasite**

Les leishmanies sont des parasites endocellulaires du système cellulaire phagocytaire mononucléée des vertébrés.

**I-3-1- Taxonomie :**

L'approche taxonomique des leishmanies se heurte essentiellement à des difficultés inhérentes au parasite lui-même : ressemblance morphologique et absence de reproduction sexuée.

Par conséquent, les taxonomistes ont fait appel à un ensemble de caractères extrinsèques pour tenter de construire une classification cohérente. Ils se sont basés sur le comportement du parasite dans le vecteur, le pouvoir pathogène expérimental, les caractères culturels, les critères immunologiques, les données épidémiologiques et exceptionnellement, la morphologie comparée. Dans le genre *Leishmania*, la taxonomie actuelle est basée sur trois sections (MAAZOUN, 1982)

- a) **Section Hypopylaria** : ce sont les Leishmanies de l'Ancien Monde se multipliant dans la partie postérieure de l'intestin du vecteur; parasite exclusif des Lézards, leur forme est promastigote et/ou amastigote dans le sang ou les viscères de l'hôte. Ce dernier se contamine par prédation
- b) **Section Peripylaria** : ce sont les Leishmanies qui se développant dans l'intestin postérieur, moyen et antérieur du phlébotome. La section comprend deux groupes, l'un inféodé aux lézards qui s'infectent par prédation ou piquûre, l'autre inféodé aux mammifères, dont l'homme. Dans ce cas, la transmission est assurée par piquûre, le parasite est exclusivement amastigote dans les macrophages. La parasitose humaine est cutanée ou mucocutanée.
- c) **Section Suprapylaria** : les Leishmanies évoluent dans l'intestin moyen et antérieur du vecteur. L'hôte est un vertébré sauvage ou domestique, dont le parasite infeste les macrophages au niveau viscéral, sanguin ou cutané. La transmission est assurée par piquûre de différentes espèces de phlébotomes.

Cette classification était établie sur des données cliniques, épidémiologiques et sur les caractéristiques biologiques des parasites chez les animaux de laboratoire et chez les vecteurs (DUMON et PIARROUX, 1995); tandis que la classification actuelle privilégie des critères biochimiques et immunologiques d'investigation.

**➤ Position taxonomique:**

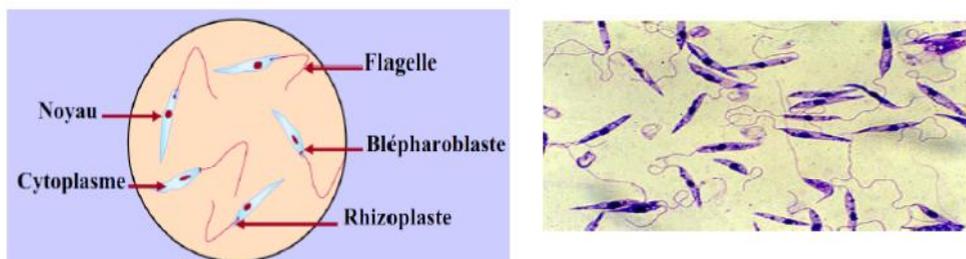
<b>Règne :</b>	Protoctista
<b>Sous-règne :</b>	Protozoa
<b>Phylum :</b>	Sarcomastigophora
<b>Sous-phylum :</b>	Mastigophora
<b>Classe :</b>	Zoomastigophorea
<b>Ordre :</b>	Kinetoplastida
<b>Sous-ordre :</b>	Trypanosomatina
<b>Famille :</b>	Trypanosomatidae
<b>Genre:</b>	<i>Leishmania</i>

**I-3-2- Caractères morphologiques :**

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle, deux stades évolutifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome femelle et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire simple (DEDET, 2001).

**I-3-2-1- Le stade promastigote :**

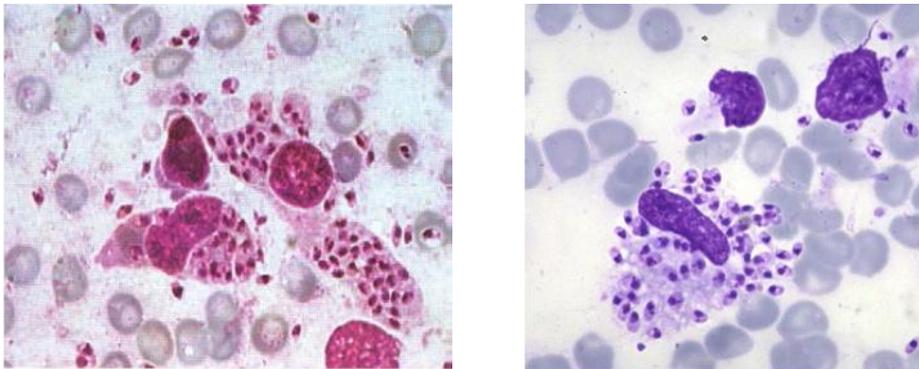
Munie d'un flagelle antérieur, cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Il s'agit d'un organisme allongé, d'environ 10 à 25µm de longueur (Figure 1). Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure. Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au pharynx. La durée de cette phase varie de 14 à 18 jours. Le parasite est régurgité par l'insecte au moment de son repas sanguin. C'est la forme que l'on retrouve chez le vecteur et c'est sous cet aspect que se présente la forme infestante pour l'homme. On la rencontre également dans la phase liquide des milieux de culture.



**Figure 1:** Forme promastigote de *Leishmania*. ([www.alae.iquebec.com](http://www.alae.iquebec.com))

**I-3-2-2-Le stade amastigote :**

C'est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve dans les cellules du système réticulo-histocytaire des hôtes vertébrés et dans les cellules mises en culture. Ce sont de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 2), immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentant un noyau, un kinétoplaste et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur.



**Figure 2:** Forme amastigote. ([www.parasitologie.univ-montp1.fr](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr))

**I-3-3-Biologie**

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont exceptionnellement rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et se multiplient par division binaire longitudinale. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage : les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages, ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (DEDET, 1999).

**I-3-4-Structure biochimique**

Les *Leishmania* sont impossibles à distinguer morphologiquement, elles peuvent être différenciées par analyse des iso-enzymes. Celle-ci fait appel à une technique :

- L'électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques
- L'isoélectrofocalisation

L'électrophorèse des iso-enzymes a connu depuis une vingtaine d'années une utilisation de plus large et a servi à caractériser de nombreux isolats obtenus dans le monde entier (HARRAT *et al.*, 1995).

## I-4-Etude du vecteur

### I-4-1-Taxonomie :

Il s'agit de Diptères, Nématocères qui constituent à l'intérieur de la famille des Psychodidae, la sous-famille des Phlebotominae. Les Phlebotominae se distinguent des Trichominae et des autres Psychodidae par les nervures alaires et par le nombre des segments des palpes maxillaires.

- Les phlébotomes comptent environ 600 espèces réparties en 6 genres (RODHAIN et PEREZ., 1985) :
  - *Phlebotomus* et *Sergentomyia* caractéristiques de l'ancien monde.
  - *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya* et *Hertigia* du nouveau monde.
- En Algérie 22 espèces ont été recensées et identifiées par BELAZZOUG en 1991. dont 12 du genre *Phlebotomus* et 10 du genre *sergentomyia*.

### I-4-2- Caractères morphologiques:

Les phlébotomes présentent un corps grêle et allongé de 1 à 3 mm de taille, de couleur jaune terne qui vire au noir. Le corps ainsi que les ailes ont un aspect velu. La tête forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue.



**Figure 3:**Phlébotome femelle.



**Figure 4:**Phlébotome mâle.

**I-4-2-1- La tête :** est formée par une capsule chitineuse (épicrane), limitée de chaque côté par un grand œil composé. Sur la région frontale s'insèrent deux antennes formées chacune de 16 segments: deux segments basaux et 14 segments beaucoup plus longs et minces. L'ensemble des pièces buccales forme une trompe courte. Seules les femelles portent des mandibules dentelées.

**I-4-2-2-Le thorax :** porte une paire d'ailes et des balanciers qui assurent l'équilibre de l'insecte pendant le vol. Les ailes sont lancéolées et comprennent sept nervures longitudinales et des nervures transverses. Sur chacun des trois segments thoraciques fusionnés est insérée une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies.

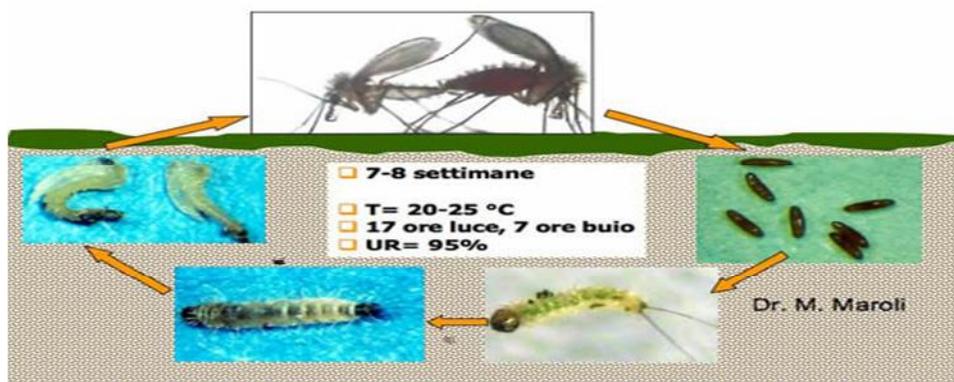
**I-4-2-3- L'abdomen :** est composé de dix segments. Les trois derniers sont modifiés pour constituer les génitalia (FOURATI, 2011).

**I-4-3-Cycle de développement :**

Les phlébotomes adultes ont une activité crépusculaire à nocturne (RIOUX et GOLVAN, 1969).

Ils se nourrissent de sucs végétaux. Seules les femelles sont, en outre, hématophages. Elles piquent divers hôtes mammifères, oiseaux, reptiles ou batraciens pour se procurer des éléments nutritifs nécessaires pour leur ovogenèse. Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs est en fonction de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante. Pour des colonies de laboratoire, la période varie de 4 à 8 jours (KILLICK-KENDRICK, 1990). L'oviposition est déclenchée par la maturité ovarienne et par la disponibilité des gîtes propices au développement des stades pré-imaginaux (TESH et GUZMAN, 1996).

Les phlébotomes présentent un cycle de vie holométabole qui comprend l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (Figure 5). Les femelles gravides déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades pré-imaginaux. L'éclosion donne naissance à une larve qui passe par 4 stades larvaires séparés par 3 mues, la quatrième donne naissance à une nymphe. Ces larves sont terricoles, sédentaires et saprophytes. Elles colonisent des gîtes très variés (fissures du sol, terriers de micromammifères, nids d'oiseaux, creux d'arbres, termitières, fentes des murs, sols des étables et des chenils) constituant des micro-habitats stables où règnent des conditions constantes. Il s'agit des lieux sombres, tempérés, protégés des pluies et des rayons solaires. La larve du 4<sup>ème</sup> stade subit la nymphose et se transforme en nymphe.



**Figure 5:**Cycle de vie de Phlébotome. (<http://www.gruppoleishmania.org>)

**I-4-3-1-L'œuf :**

L'œuf est de forme ellipsoïde, mesurant de 0,3 mm à 0,4 mm de longueur et 0,09 à 0,15 mm de largeur, de couleur blanc jaunâtre au moment de son émission, se pigmente rapidement en brun au contact de l'air, l'embryon est enveloppé dans une mince membrane. L'endochorion est strié d'un fin réticulum limitant des cellules de formes variables, l'exochorion recouvre l'œuf d'une gaine translucide (JAMARIN, 1991).

**I-4-3-2-La larve :**

Elle est vermiforme eucéphale, mesurant au 4<sup>ème</sup> stade 8 mm environ. Elle est formée de trois segments thoraciques et de neuf autres abdominaux dont les sept premiers sont munis de fausses pattes locomotrices. Cette larve ressemble, en définitif à une petite chenille.

**I-4-3-3-la nymphe :**

La nymphe éclot par une déchirure dorsale des téguments larvaires. Elle ne s'en dégage pas entièrement, et porte à l'extrémité caudale l'exuvie larvaire avec les deux paires de soies, retournées comme une ancre de bateau. Mesure 3 mm de longueur, de coloration blanc jaunâtre, elle a un aspect claviforme avec la tête repliée sous les segments thoraciques masquant sa partie postérieure. Le tégument nymphal est mince et transparente et on peut apercevoir dans la nymphe l'imago en voie de développement. Les gaines antennaires sont enroulées, les ébauches de trompe, des palpes, des ailes et des pattes sont très développées dans la partie antéro-ventrale. Le thorax est formé de trois segments (JAMARIN, 1991).

**I-4-3-4- l'adulte :**

Insecte de 1 à 4 mm de taille, de couleur jaune pâle, velu, d'aspect bossu, très fragile; les antennes comportent 16 articles velus, les pattes sont longues et grêles, les yeux sont généralement gros et sombre. Quant aux ailles, elles sont également, velues, de forme lancéolée et habituellement relevées chez l'insecte au repos. L'abdomen comporte dix segments dont les trois derniers constituent les organes génitaux. Ceux-ci, appelés coxites et styles, sont développés chez le mâle.

Le vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique admis depuis les frères SERGENT et PARROT 1926 est *Phlebotomus papatasi* confirmé par DEDET *et al.* (1973) et par IZRI *et al.* (1992), il s'agit de *Leishmania major* MON-25. Quant à la leishmaniose cutanée du Nord, IZRI *et al.* (1993), isolent l'agent responsable, pour la première fois, de chez *Phlebotomus (laroussius) perfiliewi* naturellement infesté à Ténès. Il s'agit de *leishmania infantum* zymodème MON-24.

**I-5-Interaction Leishmanie-Vecteur**

Bien qu'il puisse y avoir plusieurs espèces de *Leishmania* dans la niche écologique d'une espèce de vecteur en particulier, il n'est pas dit que ce vecteur transmettra toutes les espèces de parasites de façon aléatoire. En effet, il semble que l'association vecteurs-parasites soit spécifique (KILLICK KENDRICK, 1985). La susceptibilité ou la résistance d'une espèce de mouche donnée au développement d'un parasite en particulier semble dépendre de la capacité de celui-ci à surmonter certains obstacles tels les enzymes digestives de l'intestin médian, la membrane péritrophique entourant le repas sanguin et finalement l'excrétion du contenu de l'intestin médian suite à la digestion (SACKS, 2001). Pour ce qui est des enzymes digestives, on a démontré l'importance des protéines contenant des phosphoglycanes sécrétées par le parasite. Ces protéines formeraient une matrice qui diminuerait la quantité des enzymes digestives de l'intestin et leur charge négative protégerait le parasite de l'effet hydrolysant des enzymes à proximité. Le LPG à la surface du parasite jouerait également ce rôle (SACKS, 2001). Pour survivre, *Leishmania* doit également pouvoir s'évader de la membrane péritrophique rapidement. Celle-ci est entre autres composée de chitine et il semble que le parasite pourrait la lyser grâce à la production d'une chitinase (SCHLEIN et al., 1991).

Finalement, *Leishmania* doit être capable de s'attacher aux cellules épithéliales de l'intestin pour éviter d'être éliminé avec les restes du repas sanguin. Il semble que cet attachement soit médié par une interaction entre le LPG et les cellules épithéliales intestinales (PIMENTA et al., 1992 ; KAMHAWI et al., 2000b ; SACKS et al., 2000).

Les différences de structure entre les LPG des différentes espèces de *Leishmania* seraient responsables de leur survie dans leurs vecteurs respectifs. Par exemple, les ramifications de résidus galactose du LPG de *L. major* permettraient son attachement dans son vecteur naturel *P. papatasi* alors que *L. donovani* peut s'y attacher à son LPG non-ramifié (PIMENTA et al., 1994). À l'inverse, *L. major* et *L. donovani* ne peuvent coloniser l'intestin médian de *P. sergenti*, le vecteur naturel de *L. tropica*, dont le LPG contient beaucoup de glucose et d'arabinose (KAMHAWI et al., 2000b).

**I-6-Effets de la salive du vecteur chez l'hôte**

Lors d'un repas sanguin, la mouche des sables injecte de la salive au site de piqûre, qu'elle soit infectée ou non par *Leishmania*. Plusieurs études ont démontré que des homogénats de glandes salivaires avaient un pouvoir immunomodulateur lorsque injectés de façon concomitante avec *Leishmania* et permettaient l'augmentation de la taille de la lésion et/ou de la charge parasitaire. Cette exacerbation de la pathologie était associée à une augmentation de l'IL-4 (BELKAID et al., 1998b; LIMA et TITUS, 1996; MBOW et al., 1998) et une inhibition

de plusieurs fonctions du MØ telles la présentation d'antigène, la production de monoxyde d'azote (NO) et la prolifération de lymphocytes T spécifiques aux parasites (HALL et TITUS, 1995; KATZ et *al.*, 2000; THEODOS et TITUS, 1993). Par contre, la réponse de l'hôte était très différente lorsqu'on procédait à l'infection directement par une piqûre de mouche infectée plutôt qu'à la co-inoculation de parasites et d'homogénats de glandes salivaires. En effet, on observait une faible expression de l'IL-4 et aucun changement dans l'évolution de la pathogenèse (KAMHAWI et *al.*, 2000a). Malgré tout, une autre étude a démontré une exacerbation de l'infection par *L. major* lorsque injecté au site où *Lu. Longipalpis* avait piqué une heure plus tôt (THEODOS et *al.*, 1991). Il semble donc y avoir certaines divergences à ce sujet qui mérite d'être investigué davantage. La salive de vecteur est aussi reconnue pour conférer une immunité contre la leishmaniose (BELKAID et *al.*, 1998b; KAMHAWI et *al.*, 2000a). En effet, les souris pré-exposées aux homogénats de glandes salivaires étaient protégées contre l'exacerbation de la pathogenèse suite à une co-injection d'homogénats et de parasites. Également, les souris préalablement piquées par des mouches non-infectées avaient de plus petites lésions et moins de parasites suite à une infection par des mouches porteuses de *L. major*.

### **I-7-Etude de réservoir**

Les réservoirs de leishmanies sont variables selon l'espèce en cause et selon le foyer. Selon DEDET (2000), On distingue :

- **les réservoirs I:** Constitués par des animaux sauvages comme les rongeurs, les canidés sauvages.
  - **les réservoirs II:** constitués par des animaux domestiques comme le chien.
  - **les réservoirs III:** constitués par l'homme.
- En Algérie on a
- Les chiens réservoirs de *L. infantum* responsable de LCN.



**Figure 6 :** Le chien réservoir de *L. infantum*.

Et le réservoir de *L. infantum* est *Meriones shawi*. *Psammomys obesus* et le réservoir de *L. major* qui est responsable de LCZ.



Figure 7 : *Meriones shawi*



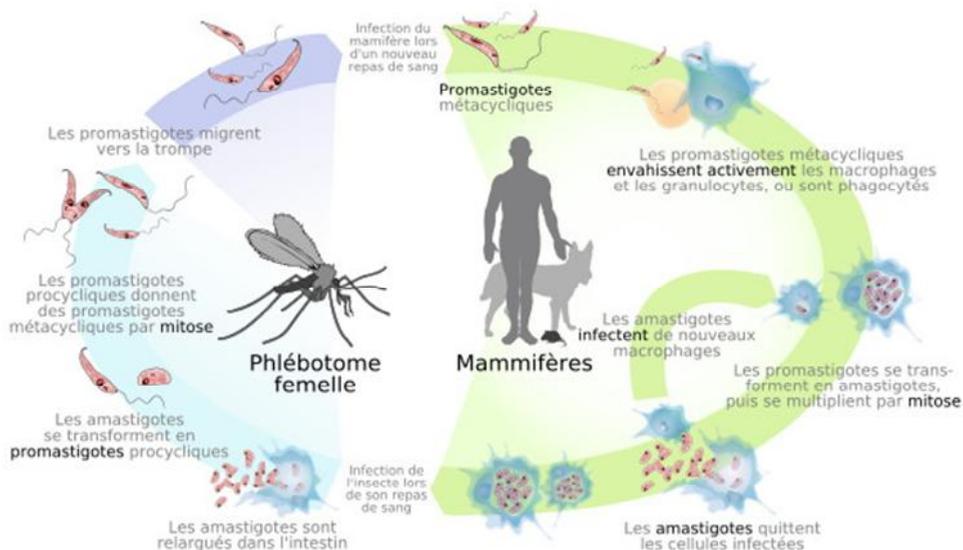
Figure 8 : *Psammomys obesus*

### I-8-Cycle de vie et de transmission de *leishmania*

#### I-8-1-Cycle de vie :

*Leishmania* a un cycle de vie hétéroxène qui nécessite deux hôtes, l'insecte phlébotome et un mammifère qui peut être l'homme ou un autre animal (rongeur, chien,...).

A l'occasion d'un repas sanguin sur un mammifère infecté par la *Leishmania*, le phlébotome femelle se contamine par les amastigotes se trouvant au lieu de piqûre. Ces parasites sont absorbés avec le sang et arrivent dans l'intestin moyen de l'insecte. Ils se transforment en promastigotes et commencent à se diviser activement. Au bout de 4 à 5 jours, ils migrent vers la région thoracique de l'insecte. Certains s'attachent, par leurs flagelles, à la cuticule des cellules de la muqueuse digestive et de la valve stomodéale. D'autres promastigotes deviennent très allongés se dotent d'une grande mobilité et d'une capacité de multiplication réduite (KILLICK KENDRIK et MOLYNEUX, 1981). Ces promastigotes pouvaient constituer un bouchon et faciliter ainsi le reflux de promastigotes lors de pompage du sang (ANTOINE et *al.*, 1999; VOLF et *al.*, 2004 ). Lors d'un autre repas sanguin, les promastigotes régurgités sur l'hôte mammifère, infectent les cellules macrophagiques et se transforment, après pénétration cellulaire, en amastigotes qui se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte lysé à la fin. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par des cellules avoisinantes où le processus se poursuit.



**Figure 9:** Cycle biologique de *Leishmania*. ([www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

### I-8-2-Transmission vectorielle :

C'est la plus importante, la présence du phlébotome conditionnant la répartition de la maladie.

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées. Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates, etc. Dans ce cas, la leishmaniose est dite zoonotique. Lorsque l'homme est l'unique réservoir du parasite, elle est dite anthroponotique.

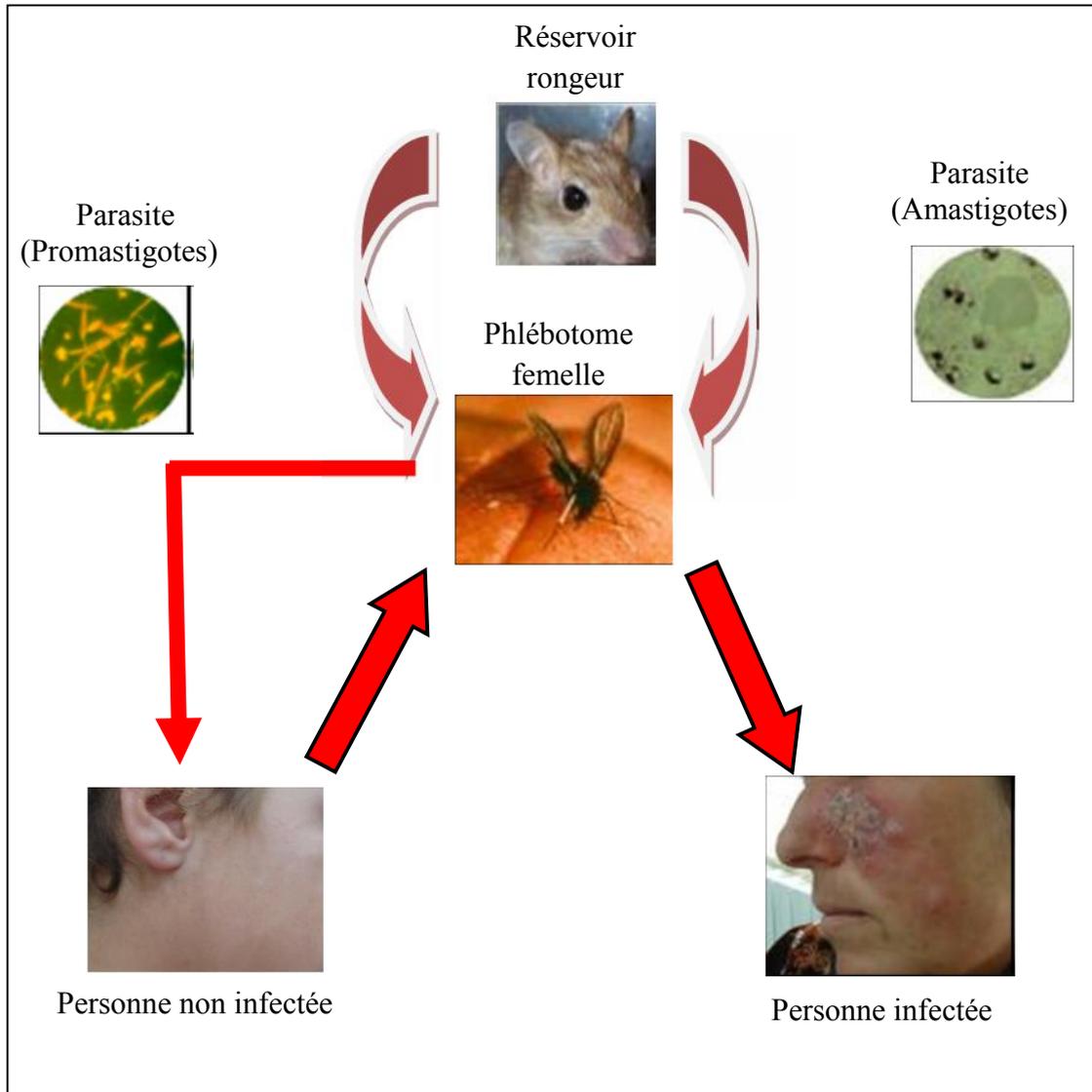
Chez le vecteur, les formes amastigotes sont ingérées au cours du repas sanguin. Elles se transforment en formes promastigotes dans les heures qui suivent. Elles subissent ensuite un cycle complexe comportant de nombreuses divisions mitotiques, deux étapes de fixation à l'épithélium de la muqueuse intestinale et une phase de migration vers la partie antérieure du tube digestif, où a lieu la transformation en formes virulentes dénommées promastigotes métacycliques infectantes. Ces dernières sont régurgitées lors du repas sanguin suivant dans le derme d'un hôte favorable.

L'inoculation intradermique de promastigotes métacycliques induit, au site même de la piqûre, une lésion qui passe généralement inaperçue chez l'homme et dont le devenir dépend du tropisme cutané, muqueux ou viscéral des différentes espèces de *Leishmania*. Dès la pénétration intracellulaire, les formes promastigotes se transforment en formes amastigotes.

La transmission vectorielle est le mode de contamination principal, la présence du phlébotome conditionnant la répartition de la maladie. Il existe également une transmission

par échange de seringues chez les toxicomanes. Les transmissions transfusionnelles et congénitales restent exceptionnelles.

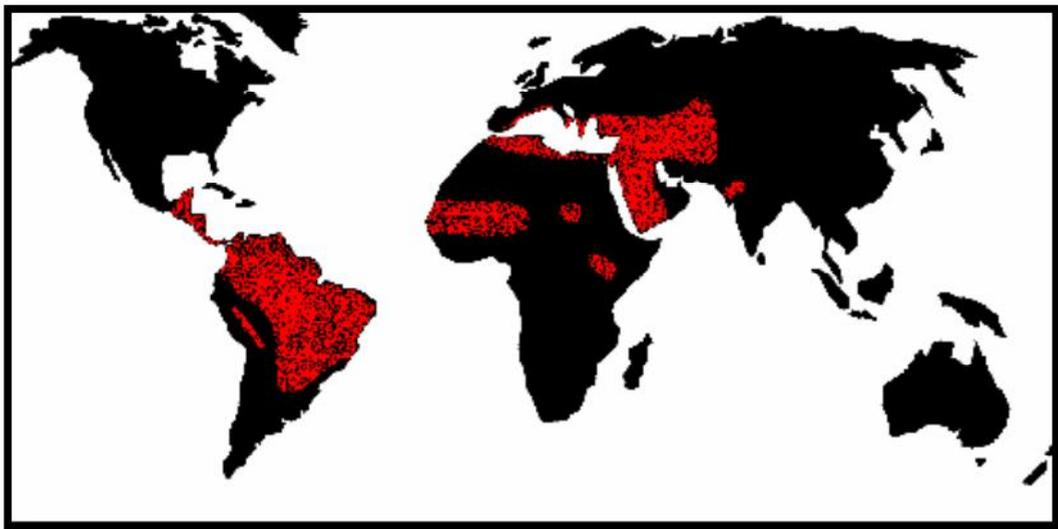
Chez les toxicomanes, la transmission par échange de seringue a été démontrée. Les voies transfusionnelles et congénitales jouent un rôle minime (ANOFEL, 2014).



**Figure 10 :** Cycle de transmission de la leishmaniose cutanée. (OMS, 2014)

**I-9-Distribution géographique de la leishmaniose cutanée****I-9-1-Dans le monde :**

Il s'agit d'une parasitose des zones intertropicales (hormis l'Océanie) et tempérées chaudes, signalée dans 88 pays répartis en cinq foyers (Figure 11): méditerranéen, chinois, indien, africain et américain. La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence annuelle à 2 millions (1,5 million de leishmanioses cutanées dont 90 % en Algérie, Afghanistan, Arabie saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie, et 500 000 leishmanioses viscérales dont 90% au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan) (ANOFEL, 2014).



**Figure 11:** La leishmaniose cutanée dans le monde. ([www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr))

**I-9-2-En Algérie :**

Il existe deux entités nosoépidémiologiques distinctes.

La Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) due à *L. major* et la leishmaniose cutanée du Nord (LCN) due à *L. infantum* variant enzymatique (BACHI, 2001).

La LCZ ou (clou de Biskra) sévit à l'état endémo-épidémique à l'étage bioclimatique aride et semi aride. Les foyers anciennement connus étant Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest (Figure 12). Cette forme cutanée connaît une véritable extension vers les hauts plateaux avec une survenue d'épidémie, en 1982 à M'sila (BELAZZOUG, 1982) suivie d'une autre en 1985 à Ksar chellal (Tiaret) (BELAZZOUG, 1986). Cependant, d'autres foyers sont apparus, notamment, ceux d'El Oued, Ghardaia, Bechar et Laghouat (Sud) et Batna, Médéa, Tiaret Borj Bou Ariridj (Nord) (DJEZZAR-MIHOUBI, 2006).

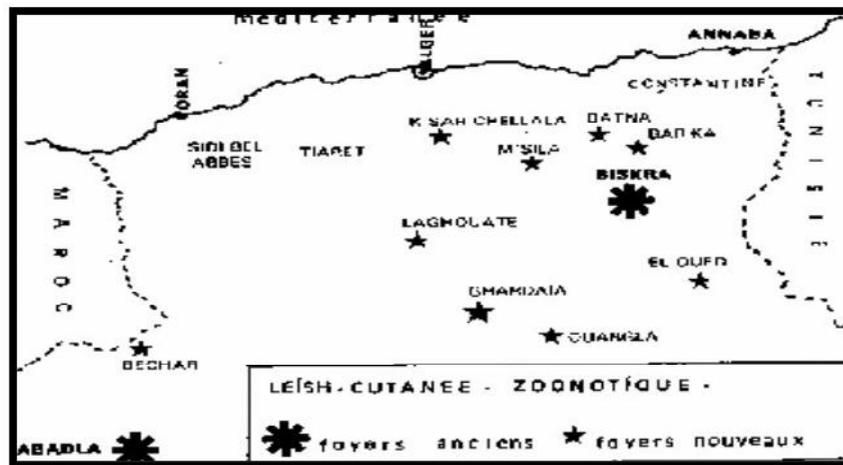


Figure 12: La leishmaniose cutanée zoonotique. (Harrat et al., 1995)

La LCN, décrite sous le nom de (clou de Mila) par SERGENT et GUEIDON (1923), sévit à l'état endémique le long du littoral et du Tell algérien (Figure 13) et sa répartition géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale. Elle est signalée dans des régions qui, jusque là étaient indemnes (HARRAT et al., 1995): Oran, Tlemcen (Ouest), Annaba, Sétif, Collo (Est). Les foyers de Tizi Ouzou, Bouira, Béjaïa, Constantine, Jijel, Mila et Ténès étant responsables du plus grand nombre de cas signalés (HARRAT, 2005).

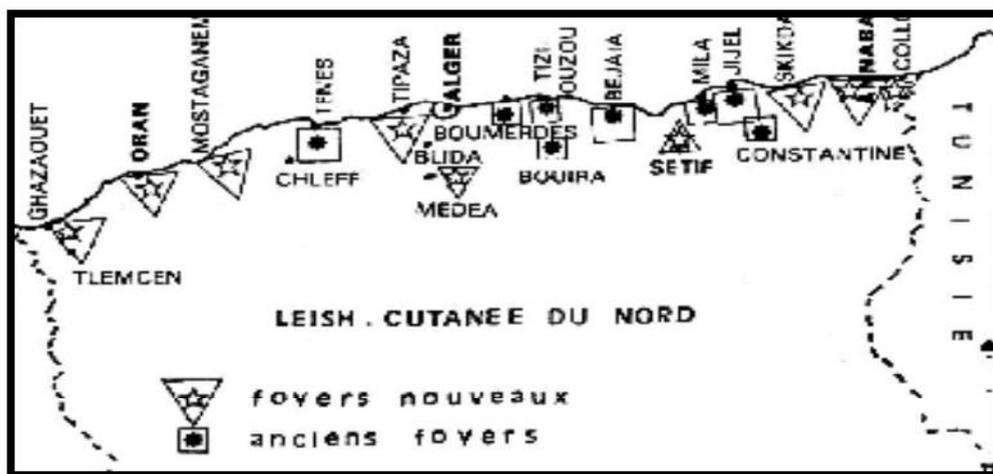


Figure 13: La leishmaniose cutanée du nord. (Harrat et al., 1995)

## I-10-L'effet des changements climatiques et environnementaux sur la leishmaniose cutanée

### I-10-1-Les changements climatiques :

Les conditions climatiques, notamment les précipitations, les températures et l'humidité ont des répercussions importantes sur la leishmaniose. Le réchauffement planétaire et la dégradation des terres modifient de plusieurs manières l'épidémiologie de la leishmaniose:

L'évolution des températures, de la pluviométrie et de l'humidité peut avoir des effets importants sur les vecteurs et les réservoirs en modifiant la distribution et en influant sur les taux de survie et la taille des populations.

Même les plus faibles variations de températures peuvent avoir une profonde incidence sur le cycle de développement des promastigotes de *Leishmania* dans les phlébotomes, et permettre ainsi au parasite de se transmettre là où la maladie n'était pas endémique auparavant.

Il est possible que les sécheresses, les famines et les inondations imputables au changement climatique entraînent des déplacements et migrations massives vers les zones de transmission de la leishmaniose et que la malnutrition affaiblisse l'immunité des populations concernées. (ANONYM, 1)

#### **I-10-2-Les changements environnementaux :**

Plusieurs changements environnementaux peuvent influencer l'incidence de la leishmaniose dont l'urbanisation, l'intégration du cycle de transmission dans l'habitat humain et l'empiètement des exploitations agricoles et des zones de peuplement sur les forêts. (ANONYM, 1).

#### **I-11-Particularités de leishmaniose à Tizi-Ouzou**

La Kabylie de part sa situation géo- climatique est très propice au développement et au maintien des zoonoses émergentes et réémergences comme les leishmanioses. Elles sont connues pour sévir en Kabylie depuis très longtemps. 30 malades de leishmaniose cutanée ont été marqués d'octobre 2007 à décembre 2010, dont 9 cas à Tizi-Ghennif, le même nombre à Boghni et 12 cas à Draa-El-Mizan.

Il existe six espèces différentes de phlébotomes à Tizi-Ouzou. *Phlebotomus perniciosus* et *P. perfiliewi* avec respectivement des taux de capture de 61%et 39% constituent les espèces les plus représentatives.

Le foyer de la Grande Kabylie est toujours actif est pourvoyeur de 50% des cas de leishmanioses. (ACHOUR-BARCHICHE et *al.*, 2010).



**Figure 14:** Phlébotome femelle gorgé de sang dans la région Kabyle. (Anonyme 2)

***Chapitre II***  
***Clinique, diagnostic, traitement***  
***et prophylaxie de la***  
***leishmaniose cutanée***

---

---

- L'inoculation intradermique de formes virulentes de leishmanies (promastigotes métacycliques) au moment de la piqûre du phlébotome, induit au site de la piqûre, une lésion qui passe généralement inaperçue. Lorsque la multiplication intracellulaire des amastigotes reste localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, les réactions cellulaires générées et les diverses cytokines produites entraînent le développement d'une lésion cutanée localisée (LCL). Les parasites peuvent également diffuser à d'autres sites cutanés, comme dans la leishmaniose cutanée diffuse (LCD), ou aux muqueuses de la face comme dans la leishmaniose cutanée muqueuse (LCM). Dans d'autres cas, les parasites s'étendent à tous les organes du système des phagocytes mononucléés provoquant la leishmaniose viscérale (LV).
- L'expression clinique des leishmanioses dépend donc de la localisation du parasite aux téguments ou aux organes profonds du sujet. Celle-ci est directement liée au tropisme de l'espèce leishmanienne en cause (DEDET, 2001).

### **II-1-Formes cliniques de la leishmaniose cutanée**

Les leishmanioses cutanées correspondent à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses. On distingue les formes suivantes :

- ✓ La leishmaniose cutanée localisée (LCL) ;
- ✓ La leishmaniose cutanée diffuse (LCD).

Les lésions cutanées sont, en général, localisées et siègent le plus au site d'inoculation du parasite par le phlébotome femelle. Une forme cutanée diffuse se développe plus rarement et résulte de la conjonction du parasitisme par certaines espèces avec un état d'anergie de sujet hôte (DEDET, 2001).

En général, les caractéristiques cliniques de la leishmaniose cutanée ne sont pas uniformes dans toutes les régions ni même à l'intérieur d'une région donnée, par suite de différences touchant à l'espèce parasitaire ou aux types zoonotiques en cause. La lésion classique débute sous forme d'un nodule au point d'inoculation. Une croûte se forme au centre et, si elle est arrachée, elle révèle une ulcération qui évolue vers la guérison au prix d'une cicatrice profonde présentant une altération de la pigmentation.

#### **II-1-1-Leishmaniose cutanée localisée :**

C'est la forme bénigne de l'affection, elle peut s'acquérir dans l'Ancien Monde et dans le Nouveau Monde. Après une incubation de 1 à 4 mois, les lésions sont uniques ou peu

nombreuses siégeant sur des zones découvertes, initialement papuleuses. Leur polymorphisme (papule, ulcération, nodule) est à l'origine d'une prise en charge souvent tardive. On distingue trois formes, lesquelles sont citées ci-dessous :

**II-1-1-1-La forme humide :**

C'est la forme la plus fréquente à type d'ulcération indolore, bordée par un bourrelet en relief congestif riche en parasite. Cette lésion est recouverte d'une croûte facile à arracher (bouton d'Orient, clou de Biskra). Elle est due à *L. major*, elle est dite aussi rurale. L'évolution est torpide, une surinfection secondaire est possible compliquant le rurale. La guérison est spontanée, laissant une cicatrice indélébile. Dans 10% des cas, une récurrence survient au niveau de la cicatrice antérieure (RAPP & ROUE, 2001).

**II-1-1-2-La forme sèche :**

Elle correspond à des lésions recouvertes de squames dont le grattage contient des parasites. Ces lésions, d'évolution lente (2 à 3 ans), peuvent confluer et former des plaques pseudotuberculoïdes ou lupoides au niveau de visage. Elle est due à *L. tropica* dite aussi forme urbaine anthroponotique (RAPP & ROUE, 2001).

**II-1-1-3-La forme sporadique :**

Des formes cutanées de leishmaniose dues à des variant enzymatiques de *L. infantum* sont décrites sporadiquement dans le pourtour du bassin méditerranéen. Elles déterminent essentiellement des lésions uniques, nodulaires, inflammatoires ou lupoides siégeant au visage et pouvant évoluer pendant deux années (BASSENNE et *al.*, 1997).

**II-1-2–Leishmaniose cutanée diffuse :**

C'est une forme grave, responsable de lésions nodulaires disséminées riches en parasites, qui confluent en large plaques infiltrées mimant une lèpre lépromateuse. L'affection évolue vers l'aggravation par poussées successives. Elle est rebelle aux antileishmaniens (RAPP & ROUE, 2001).



**Figure 15 :** Forme diffuse de la leishmaniose cutanée.

## II-2-Les leishmanioses cutanées en Algérie

Les leishmanioses cutanées correspondent à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses. On distingue les formes suivantes :

- ✓ La leishmaniose cutanée zoonotique ;
- ✓ La leishmaniose cutanée du Nord.

### II-2-1-La leishmaniose cutanée zoonotique :

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales. Après une incubation courte, apparaît la lésion caractéristique : ulcération cutanée, à bords surélevés, avec une croûte centrale adhérente, indolore, de taille variable (habituellement de 1 à 4 cm de diamètre) qu'est facile à arracher d'évolution chronique (MARTY, 2002). A côté de cette forme, la plus fréquente, s'observent les formes ulcéro-végétantes, verruqueuses et plus rarement lupoïdes (BACHI, 2001). Les lésions peuvent se rencontrer sur une quelconque partie de la surface du corps, mais siègent en général sur les parties découvertes exposées au site de piqûre du phlébotome femelle.

Les formes cliniques multiples diffèrent d'un sujet à l'autre, d'une lésion à l'autre chez un même individu, selon la localisation sur le corps, d'une espèce à l'autre, d'un biotope à l'autre.

Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'importantes cicatrices disgracieuses ou invalidantes.

Différentes appellations classiques ont été utilisées telles que bouton d'Orient (bassin méditerranéen), clou de Biskra (Algérie), bouton d'Alep (Syrie). Ces appellations ne correspondent à aucune réalité anatomo-clinique ou épidémiologique.

La durée d'évolution de la leishmaniose cutanée zoonotique est habituellement courte. Cependant, BELAZZOUG et *al.* (1985) ont signalé une forme chronique de la leishmaniose cutanée chez une petite fille de 15 mois. La particularité de cette observation était l'aspect lupoïde circiné d'évolution très longue (plus d'un an), évoquant la forme dite récidivante, due à *L.tropica*, mais l'isolement et l'identification isoenzymatique du parasite ont révélé *L.major* MON-25 (BACHI, 2006).



**Figure 16:** Différents types de lésions de la leishmaniose cutanée zoonotique.

([www.bioltrop.org](http://www.bioltrop.org); photos du bas: ANOFEL 3)

### **II-2-2- La leishmaniose cutanée du Nord :**

Elle s'oppose à la leishmaniose cutanée zoonotique en tout point de vue. Sur le plan clinique, la leishmaniose cutanée du Nord se présente sous forme d'une petite lésion unique, siégeant au niveau de la face, très inflammatoire, sans ulcération et sans croûte épaisse. Sa durée d'incubation est longue tout comme sa durée d'évolution (BACHI, 2001).

La leishmaniose cutanée du Nord nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an.

Ces deux formes de leishmanioses existent en Tunisie et au Maroc mais ces derniers se distinguent de l'Algérie par une troisième forme dont l'espèce responsable est *L.killicki*, isolée dans un foyer dans la région de Ghardaïa. C'est leishmaniose cutanée anthroponotique (RIOUX et *al.*, 1986).



**Figure 17 :** Forme de la leishmaniose cutanée de Nord.

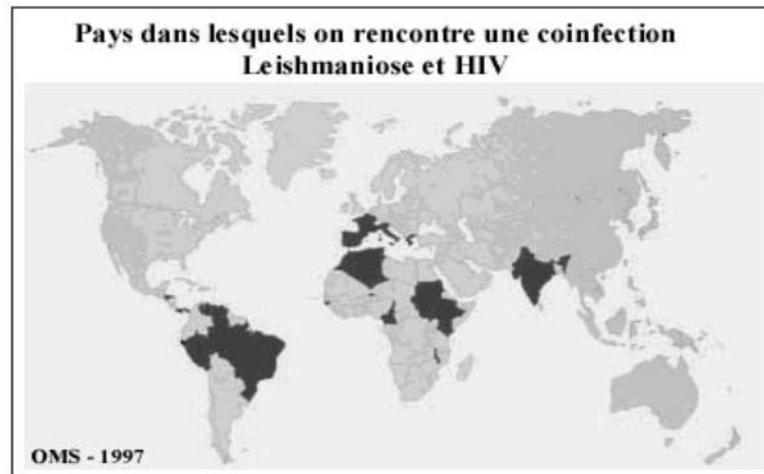
### **II-3- Co-infection VIH – leishmaniose cutanée :**

#### **II-3-1-Dans le monde :**

La co-infection *Leishmania*/VIH est une nouvelle maladie extrêmement grave et de plus en plus fréquente, avec toutes les conséquences que cela impliquent tant sur le plan clinique, au niveau diagnostic, en chimiothérapie et sur le plan épidémiologique et économique. On signale de plus en plus souvent des cas de co-infection *Leishmania*/VIH dans différentes parties du monde. Le nombre de cas devrait continuer d'augmenter dans les années à venir car il semblerait que les cas ne soient plus confinés aux zones d'endémie.

Les co-infections *Leishmania*/VIH sont considérées comme une réelle menace, en particulier dans le sud-ouest de l'Europe. Sur les 1700 premiers cas notifiés par l'OMS dans 33 pays du monde jusqu'en 1998. Sur 965 cas analysés rétrospectivement, 83,2% étaient des hommes, 85,7% des jeunes adultes (des toxicomanes par voie intraveineuse pour la plupart).

La majorité des co-infections dans les Amériques sont signalées au Brésil, où l'incidence est passée de 0,8 cas pour 100 000 habitants en 1986 à 10,5 pour 100 000 en 1996. D'une manière générale, le nombre de cas déclarés en Afrique donne une estimation modeste et serait bien supérieur si l'on exerçait une surveillance active sur l'ensemble du territoire. L'Ethiopie a un système bien organisé de dépistage, de prise en charge et de notification des infections. Le Kenya et le Soudan ont mis en place une surveillance en 1998 et le Maroc a un centre à cet effet, ainsi que des cas ont été signalés en Algérie. (W.H.O., 2000).



**Figure 18:** Co-infection Leishmaniose/VIH dans le monde. ([www.who.org](http://www.who.org))

### II-3-2- En Algérie :

Bien qu'une première mention de co-infection *Leishmania*/VIH ait été rapportée en Algérie en 1987, le nombre de cas de cette association, contrairement aux pays du sud de l'Europe, reste au dessous de la réalité. Un dépistage plus large permettrait sûrement le diagnostic de plusieurs autres cas. Il est à noter que près de 1500 personnes sont concernées par le SIDA dans notre pays (HARRAT *et al.*, 1995). Dans la co-infection *Leishmania*/VIH, les patients ont tendance à développer d'emblée une leishmaniose viscérale sans épisode cutané préalable même avec les souches dermatropes (PRATLONG *et al.*, 1995).

### II-4-Diagnostic des Leishmanioses cutanées

Les leishmanioses se manifestent par des signes cliniques qui diffèrent d'une forme à une autre et qui peuvent être communes à d'autres affections d'où l'importance est l'apport de l'enquête entomologique et épidémiologique autour des cas de leishmaniose dans l'orientation du diagnostic et dans la prophylaxie. La confirmation du diagnostic ou du rôle vecteur d'une espèce de phlébotome se fait principalement par la mise en évidence de leishmanies par les méthodes directes ou moléculaires.

Dans la présente étude, la mise en évidence du parasite est réalisée par examen microscopique et culture.

**II-4-1-Diagnostic indirect :**

Pour la LC, il n'y a pas de perturbations biologiques importantes. La vitesse de sédimentation reste normale, la protéine C réactive n'est pas augmentée et il n'y a pas d'hypergammaglobulinémie. La formule sanguine n'est perturbée qu'en cas de surinfection bactérienne, on observe alors une élévation modérée des leucocytes polynucléaires neutrophiles.

La présence de leishmanies dans les tissus cutanée n'entraîne pas la formation d'anticorps spécifiques décelables par les examens sérologiques habituels. L'hémagglutination indirecte, l'immunofluorescence indirecte ou l'Elisa ne sont d'aucun secours. Seul le Western blot inutile dans la plupart des cas pour le diagnostic de LCZ (MARTY *et al.*, 1994).

L'intradermoréaction à la leishmanie n'est pas non plus utilisée pour l'établissement d'une leishmaniose cutanée des enquêtes épidémiologiques, mais elle n'apporterait que peu d'information dans les foyers d'endémie de la LCZ.

**II-4-2-Diagnostic parasitologique :**

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence des parasites ou de leur ADN dans les prélèvements cutanés. Les leishmanies sont plus facilement retrouvées lorsqu'elles sont recherchées en début d'évolution de la maladie, dès les premières semaines qui suivent l'apparition des lésions. En fin d'évolution, les parasites deviennent rares dans les tissus. Les prélèvements doivent être réalisés en périphérie de la lésion, à cheval entre la peau saine et le bourrelet inflammatoire. Les meilleurs résultats sont obtenus par la biopsie cutanée. Un punch n°2 ou de préférence n° 4 permet un prélèvement suffisant pour un examen direct, une mise en culture sur le milieu spécifique et éventuellement une recherche d'ADN par PCR. La biopsie est réalisée après désinfection locale par un produit non iodé. Contrairement au prélèvement destiné à l'examen anatomopathologique, celui destiné à la parasitologie ne doit pas être fixé, mais doit respecter strictement toutes les normes d'asepsie pour éviter toute contamination. Lorsque la biopsie n'est pas possible, un grattage de la lésion permet de recueillir un peu de matériel aléatoires. Enfin, le prélèvement cutané peut être effectué par une ponction-aspiration : à l'aide d'une seringue de 10 ml, on injecte 0,1 à 0,5 ml de sérum physiologique stérile tout en dilacérant les tissus avec le point de l'aiguille, puis on aspire le produit de la dilacération. Cette technique est plus douloureuse et moins efficace que la biopsie cutanée.

**II-4-2-1-Examen direct :**

Cette méthode repose sur la visualisation du parasite par des prélèvements sanguins ou cutanés intéressant les organes où se trouvent les leishmanies (lésion, moelle osseuse, rate...) (DEDET, 2000).

Chez l'homme, cette méthode consiste à rechercher, après coloration, les leishmanies dans l'apposition de la biopsie sur une lame porte-objet ou dans l'étalement du produit de grattage ou de la ponction-aspiration. La coloration habituellement utilisée est le MGG ou le Giemsa seul après fixation par le méthanol. La recherche est effectuée au microscope à fort grossissement, X40 ou X100, avec un objectif à immersion. Les parasites apparaissent sous leur forme amastigote, isolés ou en amas dans le cytoplasme des macrophages.

**II-4-2-2-La culture :**

Elle rend plus sensible le diagnostic en permettant de retrouver des parasites qui ne l'auraient pas été à l'examen direct. Elle permet également d'obtenir la souche de leishmanies en vue de son identification. Le milieu le plus utilisé reste le milieu Novy, Mc Neal et Nicolle (NNN). Il s'agit d'une gélose salée enrichie de 10% de sang frais de lapin et coulée dans un tube à essai avec capuchon à visser.

L'ensemencement est réalisé de préférence sous hotte à flux laminaire ou près d'un bec bunsen car le milieu est très sensible à la contamination bactérienne ou fongique.

Le produit de la ponction biopsie ou le fragment de biopsie entier ou broyé dans l'eau physiologique stérile est déposé dans la phase liquide du milieu NNN. *Leishmania major* se développe assez rapidement en milieu de culture. Les promastigotes peuvent être observés dès le 5<sup>e</sup> jour d'incubation. Plus rarement, la culture ne se développe qu'au bout de 3 à 4 semaines. Au contraire, les variantes enzymatiques de *Leishmania infantum* sont plus difficiles à obtenir en culture, 4 à 5 semaines sont souvent nécessaires avant de voir apparaître quelques promastigotes.

Les résultats sont meilleurs lorsque le milieu est supplémenté en sérum de veau fœtal et solution de Schneider. L'addition des antibiotiques est quasi indispensable parmi eux : la pénicilline G (100U/ml) est le produit le plus souvent utilisé. Parfois on utilise la streptomycine (100µg/ml) et/ou la gentamycine (100µg/ml).

D'autres milieux de culture peuvent être utilisés tels que le milieu Blanc d'œuf où les cultures sur le blanc d'œuf recueilli aseptiquement et maintenu à 25°C, donneront des résultats au moins aussi satisfaisants.

#### **II-4-2-3-L'inoculation à un animal :**

En plus du Hamster doré syrien, d'autres rongeurs peuvent être utilisés tels que souris BalbC, *Meriones libycus* ou *Merions shawi* qui peuvent aussi être élevés en laboratoire. L'inoculation consiste à injecter 0,5 à 1 ml du broyat de la biopsie ou de produit de la ponction –biopsie dans un coussinet plantaire ou le museau de l'animal, voire en intrapéritonéale. L'animal développe une forme localisée ou généralisée de la maladie en quelques semaines à quelques mois.

#### **II-4-2-4-L'examen anatomopathologique :**

L'examen anatomopathologique est rarement demandé pour confirmer une LCZ.

Les corps de leishmanie sont souvent de découverte fortuite dans les coupes histologiques d'une biopsie réalisée devant une lésion atypique. Dans ces conditions, la souche parasitaire n'est évidemment pas isolée et l'identification spécifique n'est possible que par des techniques complémentaires de biologie moléculaire.

#### **II-4-3-Diagnostic moléculaire :**

Il est réalisé sur les biopsies ou ponctions-aspirations, et le résultat peut être obtenu rapidement, parfois dans les heures qui suivent le prélèvement, alors que la recherche de leishmanies par culture ou inoculation à l'animal nécessite plusieurs jours, voire plusieurs semaines ou mois. Le diagnostic moléculaire est obtenu même avec des souches de leishmanies qui ne se développent pas ou mal en milieu de culture. Grâce au choix des amorces et au génotypage, la PCR permet l'identification des espèces, voir des sous-espèces. Cette identification peut être obtenue en même temps que le diagnostic (BASTIEN, 1990 ; MARFURT, 2003; SERIN, 2007).

**II-5-Prophylaxie :****II-5-1-collective :**

**II-5-1-1-La lutte contre le vecteur :** Les insecticides, les moustiquaires.

**II-5-1-2-Lutte contre le réservoir :**

- Le déboisement des zones périurbaines et la destruction des terriers des rongeurs sauvages.
- Abattage des chiens errants et des chiens malades.
- Colliers imprégnés d'insecticides pour les chiens.

**II-5-2-Individuelle:**

- Se protéger contre la piqûre du phlébotome par l'utilisation des moustiquaires et des topiques anti moustiques.
- Porter des vêtements longs imprégnés de répulsifs.
- Éviter les promenades nocturnes pendant les périodes d'activités du phlébotome.

**❖ Vaccination :**

Le principe repose soit sur le blocage de la pénétration des promastigotes dans les cellules monocytaires ou bien sur l'inhibition de la survie des promastigotes infectieuses dans le phagolysosome. il repose également sur le blocage de multiplication des amastigotes dans le compartiment lysosomal et sur la neutralisation de la multiplication des amastigotes libérées après des cellules hôtes (WHO, 2001, TDR / OMS, 2005 ; STOBER *et al.*, 2006 ; RAFATI *et al.*, 2006 ; CORTEZ *et al.*, 2007).

Les essais de vaccination ont utilisé des vaccins composés de promastigotes atténuées ou bien tuées et des vaccins composés d'extraits d'antigéniques, moléculaires ou des vaccins à sous-unités qui sont caractérisés par leur propriétés biochimiques et fonctionnelles (OMS/TDR , 2005 ; CALVOPINA *et al.*, 2006; PALATNIK DE SOUSA, 2008).

Les vaccins obtenus par purification biochimiques se bases essentiellement sur la glycoprotéine de 63KDa (gp63) (JAAFARI *et al.*, 2006).

D'autres essais de vaccination utilisent des micro-organismes transfectés avec des gènes de *leishmania* recombinantes à virulence atténuée que les promastigotes de *L.major* transfectées avec le gène de l'IFN $\gamma$  (NICO *et al.*, 2007).

Un vaccin contre la leishmaniose canine a été récemment autorisé au Brésil. Il s'agit du vaccin leishmune dans plusieurs études ont démontré qu'il pourrait être un outil de prévention et de contrôle de la leishmaniose canine. En outre la capacité du vaccin leishmune à bloquer la transmission de la maladie été démontré (NOUGUEIRA *et al.*, 2005 ; DANTAS-TORRES, 2006 ; SARAIVA *et al.*, 2006).

**II-6-Traitement :**

Il existe deux types du traitement:

**II-6-1-Locaux :****➤ Physiques :**

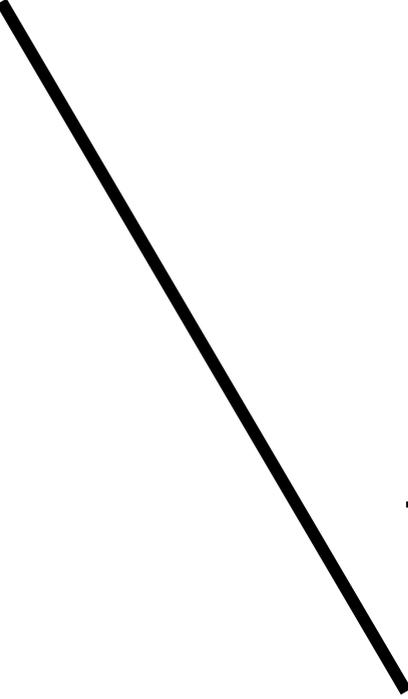
- Cryothérapie,
- Chirurgie,
- Chaleur (thermothérapie).

**➤ Chimiques :**

- dérivés de l'Antimoine: glucantime®.
- Autres en cours d'étude: imiquimod crème (Aldara ®), Aminosidine sulfate (Paromomycine pommade).

**II-6-2-Généraux :**

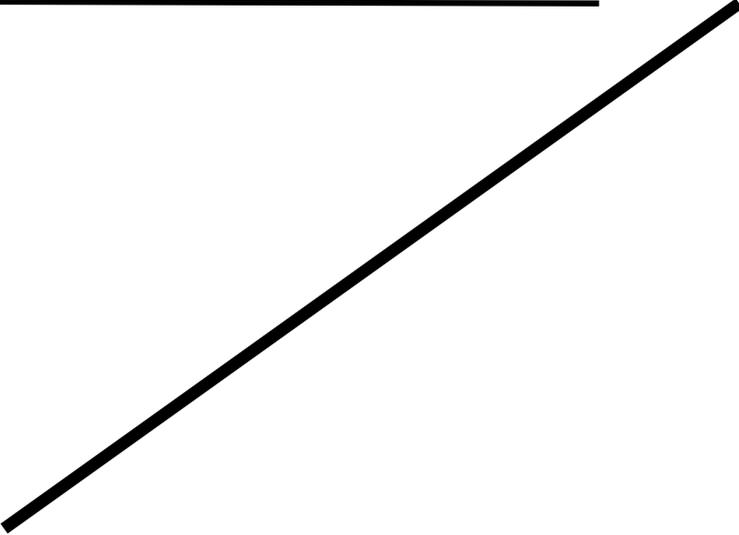
- Dérivés de l'Antimoine: **Glucantime®**: en première intention en une injection IM par jour pendant 15 à 21 jours; risque de stibio-intolérance (début): pseudo-allergique risque de stibio-intoxication enfin de traitement (rare): toxicité cumulative= atteinte cardiaque, rénale, hépatique (ECG tous les deux jours).  
-Evaluation du résultat: au moins un mois après la fin du traitement = guérison retardée.
- Pentamidine = **pentacarinat** ®\*: en une injection IM ou IV (sur au moins une heure) un jour sur deux en 2 à 4 injections au total: risque de malaise à l'injection: surveillance rénale, glucidique, hépatique, NFP, ECG.  
Evaluation: un mois après la fin du traitement.
- Amphotéricine-B \*.
- Kétoconazole, Itraconazole, Fluconazole: Intérêt = per os : à l'étude.
- Miltéfosine per os = utilisé dans la leishmaniose viscérale : à l'étude dans la leishmaniose cutanée.
- Autre en cours d'étude: Pentoxifylline (Torental ®) en association dans les formes résistantes ou les atteintes muqueuses.



*Etude expérimentale*

---

---



***Chapitre III***  
***Matériel et méthodes***

---

---

Le diagnostic des leishmanioses repose essentiellement sur le principe de la mise en évidence des leishmanies dans les prélèvements de patients, à l'examen direct ou en culture. Pour la mise en culture, elle se fait sur des milieux spécifiques tels que le milieu NNN, le milieu Blanc d'œufs; auxquels on rajoute des antibiotiques, les milieux ainsi préparés doivent être de qualité, et donner des résultats concluants.

Le but de ce travail est la préparation de deux milieux de cultures spécifiques différents. L'un est à base de sang de lapin, le milieu NNN, et l'autre est à base d'œufs, le milieu Blanc d'œufs. Et d'en évaluer la qualité (le rendement).

Nous avons réalisé cette étude au niveau du laboratoire de parasitologie de la faculté du Médecine de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

## **Matériels et méthodes**

### **III-1- Matériel**

#### **III-1-1- Matériel biologique :**

La souche de *leishmania sp.*

#### **III-1-2- Matériel de laboratoire :**

##### **III-1-2-1- Appareillages :**

-Pour mener à bien notre travail nous avons utilisé l'appareillage suivant :

- Agitateur magnétique.
- Bec Bunsen.
- Balance de précision.
- Centrifugeuse.
- Bain marie.
- Etuve Pasteur à 121°C.
- Etuve d'incubation à 24°C.
- Etuve d'incubation à 37°C.
- La Hotte à flux laminaire.
- Microscope optique.



Figure 19 : Les appareillages de Laboratoire.

Figure 20 : le Bain marie.

Figure 21 : L'Etuve Pasteur à 121°C.



Figure 22 : L'Etuve d'incubation.

Figure 23 : La Hotte à flux laminaire.

Figure 24 : Microscope optique.

III-1-2-2- Verreries :



Figure 25 : la verrerie utilisée.

### **III-1-2-3- Produits chimiques :**

- Chlorure de sodium.
- Citrate de sodium.
- May Grünwald.
- Giemsa.

### **III-1-2-4-Autres produits utilisé:**

- Bacto agar.
- Sang du lapin.
- Les Antibiotiques (Pénicilline G ; Gentamycine).
- L'urine stérile récupérée de laboratoire de microbiologie de CHU TO dont la source est humain.

## III-2- Méthodes

### III-2-1- Préparations du milieu NNN :

Après lavage et stérilisation du matériel, on procède aux étapes suivantes :

En premier lieu, on procède à la préparation de la gélose, dans un récipient, on fait dissoudre les 3g de Na CL dans 0,5L d'eau distillée stérile sur une flamme puis on ajoute les 5g d'Agar, et à l'aide d'un agitateur on remue jusqu'à dissolution complète, on laisse bouillir pendant 5 mn.

On transvase le mélange dans un Erlen Meyer.



**Figure 26:** Préparation de la gélose.



**Figure 27:** La gélose préparée.

On procède au remplissage des tubes à vis stérile à raison de 5 ml par chaque tube, on les laisse à température ambiante pour que la gélose se solidifie.



**Figure 28:** Les milieux gélosés solidifiés.

Après la solidification des milieux gélosés, on met ces derniers à l'étuve Pasteur à 121C° pendant une durée de 30 mn, pour la stérilisation des milieux avant de rajouter le sang de lapin.

En deuxième lieu, on réalise la ponction du lapin au laboratoire, à l'aide d'une seringue 50cc.

On achète 2 lapins et ça est due a l'absence de animalerie au niveau de notre université.



**Figure 29:** Le lapin.

On rase la partie thoracique et juste après on la désinfecte avec de l'alcool iodé.



**Figure 30:** Rasage et désinfection de la partie thoracique du lapin

A côté de la flamme du bec Bunsen, on procède à la ponction intracardiaque, après avoir repère la partie de forts battements cardiaques, et cela à l'aide d'une seringue 50cc, on prélève environ 25cc de sang, ce qui était très difficile à faire.



**Figure 31:** Paillasse préparée pour la ponction du lapin.



**Figure 32 :** Ponction du Lapin.

On refoule le sang prélevé dans un Erlen Meyer, contenant 3 ml de Citrate de sodium à 10%, on agite pour éviter la coagulation du sang. On le met au réfrigérateur à +4°C.



**Figure 33 :** Recueil du sang de Lapin dans l'Erlen Meyer.

En troisième lieu, on procède au mélange du sang au milieu gélosé à raison de 1ml par tube. D'abord, on met les milieux solidifiés dans un bain marie bouillant, pour leurs solubilisation, après on fait descendre la température à 45 -50°C (à T°50°C la gélose reste liquide).



**Figure 34 :** Mise en solution des milieux solidifiés.

Devant une flamme du bec Bunsen, on mélange le sang au milieu gélosé, à raison de 1ml par tube et on remue le mélange sans faire de bulles.



**Figure 35 :** Mélange de sang à la gélose.

On met les tubes dans une position incliné.



**Figure 36 :** Inclination des tubes préparés.

En dernier lieu, on met les milieux à l'étuve Pasteur à 37 °C pendant 24 heures pour contrôle de stérilité et exsudation de l'eau, et cela après la solidification des milieux.



**Figure 37 :** Milieux NNN dans l'étuve d'incubation à 37°C. (Originale, 2015)

Après 24 heures à T° de 37°C, on a constaté que les milieux ne présentent aucune contamination, et il y a formation d'une phase liquide.



**Figure 38 :** Contrôle de la stérilité des milieux NNN.

Les tubes sont placés au réfrigérateur à +4°C, les milieux se conservent pendant une durée d'un mois.



**Figure 39 :** Conservation des milieux à +4°C.

### III-2-2- Préparation du milieu Blanc d'œufs :

On le prépare en utilisant 4 œufs et de l'urine microbiologiquement stérile. On sépare les jaunes des blancs des 4 œufs, on met les blancs dans un bécher avec l'urine, en présence d'une flamme d'un bec Bunsen et on ajoute 250 000 UI de pénicilline G.



**Figure 40** : Matériels utilisés pour la préparation des blancs d'œufs.

On agite énergiquement à l'aide d'un agitateur magnétique.



**Figure 41** : Agitation des blancs d'œufs.

On répartit les blancs d'œufs à raison de 3 ml par tube à vis stérile.



Figure 42 : Répartition du blanc d'œufs sur les tubes stériles.

On met les tubes dans un portoir incliné dans un bain marie bouillant à 100°C jusqu'à coagulation des milieux.

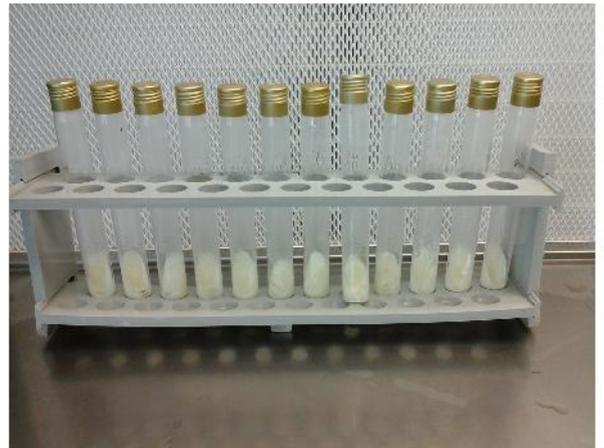


Figure 43 : Coagulation des milieux blancs d'œufs au bain Marie à 100°C.

Une fois la coagulation obtenue, on met les milieux à l'étuve Pasteur à 37°C pendant 24 heures, pour le control de stérilité et l'exsudation.

Après 24 heures, on a constaté l'absence de contamination et la formation d'une phase liquide en très petite quantité. On les conserve à +4°C.



**Figure 44 :** Conservation des milieux à + 4°C.

### **III-2-3- Mise en évidence du parasite :**

#### **III-2-3-1- Le prélèvement :**

Nous prélèvements on parvenant des patients de CHU TO atteints de la LC.

Notre patient est un homme de 49ans, dont la souche probablement est l'agent de la leishmaniose cutanée du Sud au niveau de pied.

Le prélèvement est obtenu en raclant les bordures de la lésion cutanée avec la lame de bistouri et étalé sur la lame porte objet en vue de réaliser un frottis.



**Figure 45 :** Lésion cutanée.



Figure 46 : Les étapes d'un prélèvement cutané.

III-2-3-2- L'examen direct après coloration :

Le frottis est coloré par les réactifs suivants :

- Le réactif de May Grünwald (R1) de 2 à 3 minutes.
- Et ensuite la coloration au Giemsa (R2) pendant 15 minutes.

➤ Après la coloration, le frottis est séché avant de passer à la lecture.

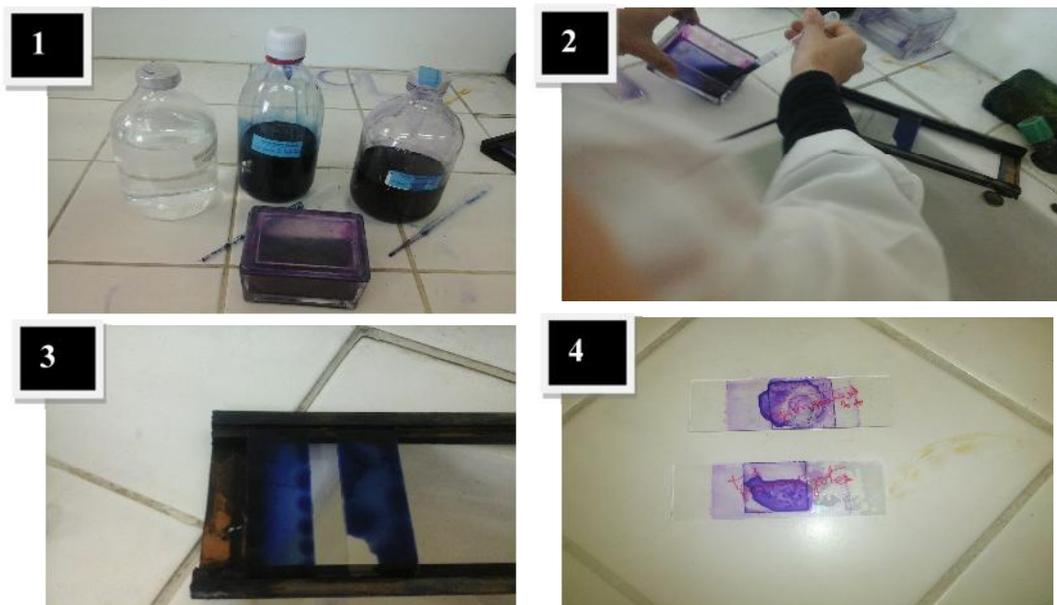


Figure 47 : Les étapes de la coloration.

**III-2-3-3- Lecture et identification :**

Elle consiste à faire une observation au microscope à l'objectif 100 après avoir mis 2 gouttes d'huile à immersion sur le frottis.

Les corps de leishmanies se trouvent groupés à l'intérieur des macrophages ou en apparence libre. Son cytoplasme apparaît coloré en bleu et contient un noyau teinté en rouge-violacé pourvu d'un gros caryosome central, à côté du noyau on distingue un appareil flagellaire.

**III-3- Ensemencement :**

Un contrôle de la culture originelle est effectué à l'état frais en examinant au microscope optique une goutte de la phase liquide entre lame et lamelle, prélevée stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur devant la flamme du bec Bunsen. A l'observation au G×40.

On ensemence la souche de *leishmania*.

Avant l'ensemencement on réalise un deuxième prélèvement et ça par des mouvements de va et vient et injecter un faible volume de l'eau physiologique puis aspirer dans la seringue les fragments tissulaires ;



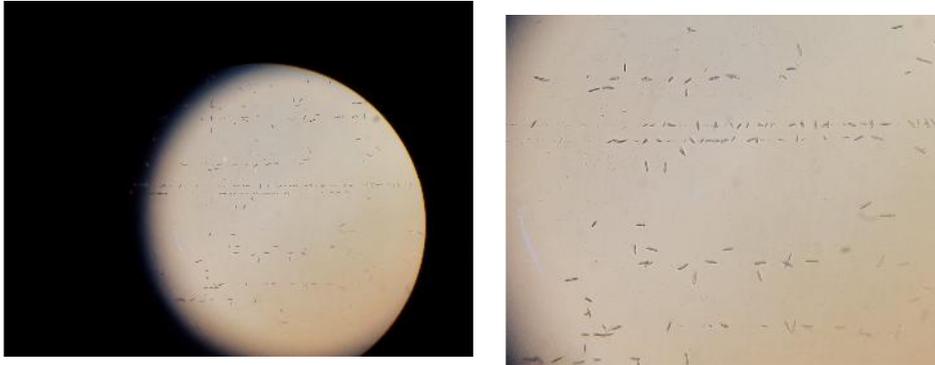
**Figure 48:** L'ensemencement de la souche.

Vider le contenu de la seringue dans le tube milieu NNN et l'autre tube milieu Blanc d'œuf ;



**Figure 49 :** Contenu de la seringue vidé dans les milieux de culture.

La lecture a lieu le 7<sup>ème</sup> jour. La phase liquide est prélevée stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur pour la recherche des formes promastigotes mobiles au microscope, entre lame et lamelle au (G  $\times$ 10 ;  $\times$ 40), et cela pour chaque milieu ensemencé.



**Figure 50 :** Les formes promastigotes observées au (G $\times$ 40).

Le repiquage se fait à l'aide d'une pipette Pasteur, prélever quelques gouttes de l'ancien tube et les couler dans un milieu neuf.

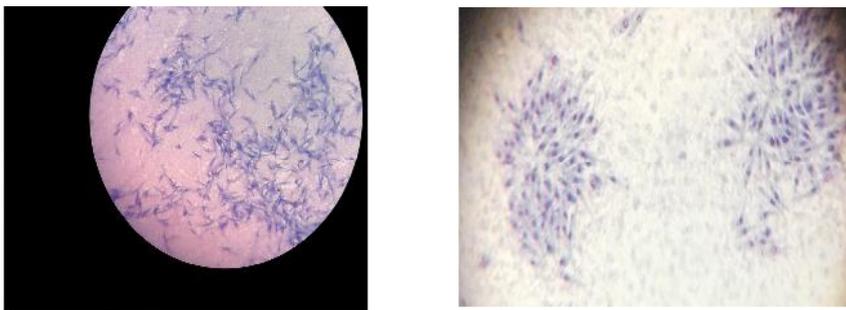


**Figure 51 :** Le repiquage de la souche.

Après contrôle de la vitalité des milieux de cultures ensemencés.

On procède à la coloration des lames observées dont la coloration est similaire à celle de l'examen direct.

L'observation par microscope se fait au (G $\times$ 10;  $\times$ 40;  $\times$ 100).



**Figure 52 :** Les formes promastigotes (G $\times$ 100). (Originale, 2015)

*Chapitre IV*  
*Résultats et Discussion*

---

---

IV-1- Résultats

Dans notre étude on a travaillé sur trois souches différentes de *Leishmania sp.* dont l'une était responsable d'une leishmaniose cutanée du Sud algérien au niveau du pied (CHU TO) et les deux autres sont parvenus de l'Institut Pasteur d'Alger.

IV-1-1- Résultats des ensemencements

Les résultats sont obtenus 7 jours après l'ensemencement de la souche en prélevant la phase liquide du milieu de culture dans des conditions stériles, et rechercher les formes promastigotes entre lame et lamelle au microscope pour chaque milieuensemencé.

On a mis en culture 3souches de *Leishmania* :

-2 souches du sous-genre *L.infantum* (*L.infantum* [IPA/480] et *L.infantum* [LIPA/1227]).

-une souche de*Leishmania sp.*(CHU TO) l'agent de la leishmaniose cutanée du Sud.

Le repiquage se fait tous les 7 jours.

IV-1-1-1-L'ensemencement des souches sur les milieux NNN et les résultats de la lecture :

Les résultats de l'ensemencement des souches de *Leishmania* sur les milieux NNN sont consignés dans le tableau II. Le nombreprésenté dans chaque colonne du tableau II signifie le nombre de tubes positifs sur le nombre total des tubes réensemencés.

Tableau II : Les différentes souches ensemencés sur le milieu NNN et leurs repiquages.

repiquage souche	Tube ensemencé	1 <sup>ere</sup> semaine	2 <sup>ème</sup> semaine	3 <sup>ème</sup> semaine	4 <sup>ème</sup> semaine	Total
<i>L.infantum</i> [IPA/480]	1/31	2/31	4/31	8/31	0/31	15/31
<i>L.infantum</i> [LIPA/1227]	1/32	2/32	4/32	5/32	10/32	22/32
<i>Leishmaniasp.</i> (CHU TO)	1/15	2/15	0/15	0/15	0/15	3/15

➤ L'examen du tableau II permet de faire le constat suivant :

-**Série 1** *L.infantum*[IPA/480]: 15/31 des milieux repiqués sont positifs pendant 3 semaines puis la quatrième semaine 16/31 des milieux sont négatifs.

-**Série2***L.infantum*[LIPA/1227] : 22/32 des milieux de culture sont positifs, et 10/32 sont négatifs.

-**Série 3***Leishmania.sp*(CHU TO) : le premier milieuensemencé est positif après repiquage la culture est positive à la première semaine et négative durant les trois semaines qui suivent.

**IV-1-1--2- L'ensemencement de la souche sur le milieu Blanc d'œuf :**

Les résultats de l'ensemencement des souches de *L.infantum*[IPA/480] et *Leishmania sp*(CHU TO) sur le milieu Blanc d'œuf sont rapportés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Ensemencement dessouches sur le milieu Blanc d'œuf et leurs repiquages.

repiquage souche	Tube ensemencé	1 <sup>ere</sup> semaine	2 <sup>eme</sup> semaine	3 <sup>eme</sup> semaine	4 <sup>eme</sup> semaine	Total
<i>L.infantum</i> [IPA/480]	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
<i>Leishmania</i> <i>sp</i> (CHU)	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

-La culture était négative durant un mois d'incubation pour les deux souches.

**IV-2- Interprétation :**

D'après les résultats d'ensemencements, le milieu NNN est plus fiable pour la culture des leishmanies que le milieu blanc d'œuf.

**IV-2-1- Pour le milieu NNN :**

1- Dans la première série ensemencée, *L.infantum*[IPA/480]incubée à 24C°, la culture était positive et riche en promastigotes pendant trois semaines, puis négative à la quatrième semaine sachant qu'il n'y avait pas de contamination cela est dû probablement au sang de lapine conservé 24h avant de le mélanger avec la gélose ce qui a influencé sur la qualité des milieux NNN préparés car le sang utilisé dans les milieux de cultures des trois semaines

d'incubation est mélangé avec la gélose juste après la ponction du lapin ce qui a donné des cultures positives.

2-La majorité des milieux était positifs et quelques uns sont négatifs justifiés par la contamination lors de la manipulation dans la deuxième série de culture de *L.infantum*[LIPA/1227] incubée un mois à 24 C°.

3-Le résultat était positif dans la troisième série de culture de *Leishmaniasp.* (CHU TO) après une semaine d'incubation à 24C°, ensuite négatif à cause de la contamination.

- Les résultats obtenus dans les deux séries de culturesensemencées signifient que la température 24C° est plus favorable pour la multiplication du parasite, pour confirmer ceci on a laissé un milieu de culture à température ambiante, il était négatif.
- La contamination des milieux de cultures est due à la prolifération des bactéries et des moisissures.

#### **IV-2-2-Pour le milieu Blanc d'œuf :**

La culture était négative dans les deux séries de cultureensemencées, une de *L.infantum*[IPA/480]et l'autre de *Lieshmaniasp.* (CHU TO) incubée à 24C° pendant un mois.

- Ce résultat signifie, soit qu'il y a eu une erreur lors d'une étape de préparation du milieu, le temps de coagulation très long; soit les urines utilisées sont peu stérile.

**IV-3- Discussion**

Dans le présent travail, d'après les résultats d'ensemencements, le milieu NNN est plus fiable pour la culture des leishmanies que le milieu blanc d'œuf.

Comme cela a été relaté dans la littérature, la probabilité d'observer des leishmanies est plus importante en début d'évolution de la maladie, la charge parasitaire étant en effet plus élevée car la multiplication est plus intense, elle est ensuite limitée du fait de la réponse immunitaire de l'organisme (HUBERT, 2006).

Le milieu NNN après sa mise en point par NICOLLE en 1908, reste le plus utilisé en pratique courante (BERREBI, 1936 ; LIMONCU, 1997 ; PRATLONG, 1994). C'est un milieu facile à préparer, peu coûteux et n'exigeant que du matériel simple disponible dans la plupart des laboratoires (BERREBI, 1936). Les résultats obtenus dans notre étude corroborent avec ceux avancés dans la littérature. En effet, un nombre important de nos cultures sur milieu NNN de *L.infantum* était positif et très riche en promastigotes. En outre, on a pu maintenir en vie les promastigotes plus d'un mois. Il est à noter que le développement de *Leishmania infantum*, responsable de la leishmaniose cutanée sur milieu NNN est très difficile. D'après BENIKHLEF et al. (2002), le milieu au sérum de lapin coagulé reste le milieu le plus adapté à la culture des souches à croissance difficile.

Toutefois, les cultures négatives obtenues sont expliquées par le problème des contaminations, car le milieu NNN est très riche en nutriments et propice à la prolifération des bactéries et des moisissures (BERREBI, 1936). D'ailleurs, l'utilisation d'antibiotique (pénicilline G) n'a pas suffi pour éviter ces contaminations pour cela on a rajouté la gentamicine à la pénicilline G qui a vraiment minimiser les contaminations des milieux NNN ce qui nous a permis de garder nos cultures plus d'un mois.

La négativité de la recherche des leishmanies par culture sur milieu blanc d'œuf est due probablement aux contaminations ou une erreur lors d'une étape de préparation. Toutefois, cela ne veut pas dire qu'il n'est pas fiable pour la culture des leishmanies, car l'urine utilisée dans sa préparation grâce à sa propriété de stimulant de la division cellulaire, suffirait selon plusieurs auteurs à améliorer à la fois la sensibilité de l'isolement et la richesse (HOWARLD, 1991 ; THIMOTHY, 1994).

Pour améliorer la sensibilité des cultures, il existe plusieurs milieux qui peuvent être utilisés, comme le milieu sérum de lapin coagulé, le milieu de Sloppy-Evans ou de compléter la phase liquide du milieu NNN de RPMI et de sérum de veau foetal (PRATLONG, 1994 ; EVANS, 1989 ; GRAMMICIA, 1989). Il faut cependant préciser que ces derniers milieux sont plus coûteux et difficile à préparer ou à manier (PRATLONG, 1994 ; BELKAID, 1996 ; GRAMMICIA, 1989).

Au terme de ce travail nous pouvons dire que les leishmanioses sont un problème important tant en santé humaine qu'animale dans tout le Bassin méditerranéen. Ainsi, elle reste l'une des maladies les plus négligées dans le monde mais au cours de ces dix dernières années, des avancées scientifiques majeures ont été réalisées dans le traitement, le diagnostic et la prévention de la leishmaniose.

Les différentes espèces de leishmanies provoquent diverses maladies et pour une espèce donnée, la pathogénicité varie selon la population humaine en cause. Comme on l'a indiqué précédemment, l'espèce de leishmanie a une influence déterminante sur l'évolution de la maladie (OMS, 2010).

À l'heure actuelle, le diagnostic direct ne suffit pas pour l'identification des espèces de leishmanies, pour cela on procède à la mise en culture du parasite qui permet d'identifier l'espèce parasitaire par analyse des iso-enzymes.

Selon nos résultats la culture sur milieu NNN qui présente un taux de positivité de 40/78 des milieux ensemencés et une vitalité qui peut dépasser un mois est utile pour confirmer le diagnostic direct et l'identification iso-enzymatique.

D'après les cultures ensemencées de leishmanies sur milieux NNN on peut déduire les paramètres de réussite de la culture sur ce milieu ; donc ensemencement de la souche de leishmanie et repiquage doivent se réaliser dans des conditions strictement stériles pour éviter ou minimiser la contamination puis incubation des cultures ensemencées à 24°C pour favoriser la multiplication du parasite et éviter la conservation du sang de lapin et le mélanger avec la gélose juste après la ponction.

Bien que la culture des leishmanies sur milieu blanc d'œuf est aussi utile dans le diagnostic de certitude, ce n'est pas le cas dans la présente étude, puisque les cultures que nous avons ensemencées présentent un taux de négativité de 30/30.

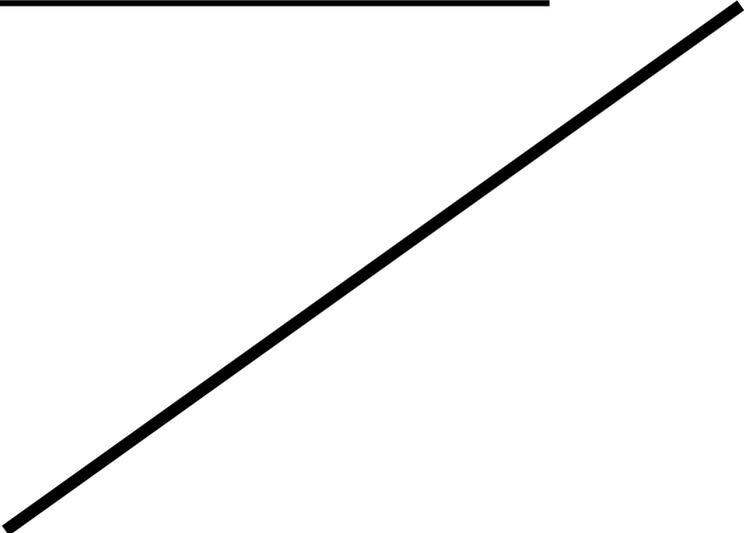
En fin la prophylaxie, ainsi que le dépistage et le traitement de ces zoonoses à un stade précoce contribueraient certainement à la réduction de l'indice de ces complications.



# *Références bibliographiques*

---

---



- **ACHOUR-BARCHICHE N., MOULOUA K., BOUBIDI S.Ch., BENBEDKA S., HARRAT Z. (2007).** *Contribution à l'identification des différents maillons du cycle épidémiologique des leishmanioses en Kabylie.* C17.
- **ANTOINE JC., LONG T. et PRINA E. (1999).** *Biologie cellulaire de Leishmania :* 41-58. In DEDET, J.P. Les leishmanioses. Collection Médecine tropicale : Ed. Ellipses, Paris, 249 p.
- **BACHI F. (2001).** *Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en Algérie.* Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.
- **BACHI F. (2006).** Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La lettre de l'infectiologie-Tome XXI-n°1-Janvier-Février 2006.
- **BASTIEN P. (1990).** Hamster joues rapport avec les membranes de la peau chiches pour l'alimentation de la membrane de sable de phlébotome mouches. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84** : 530.
- **BELAZZOUG S. (1982).** Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de Msila (Algérie). *Bull Soc. Pathol. Exot.* **75** : 497-504.
- **BELAZZOUG S. (1985).** *Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : Etude des réservoirs. Analyse chimio- taxonomique des parasites.* Thèse de Doctorat en Sciences médicales.
- **BELAZZOUG, S., ADDADI, K., MOKRANI, T., HAFIRASSOU, N., HAMRIOUI B., BELKAID.B. (1985).** La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984 *Ann. Soc. Belg. Mzd. Trop.* ; **65** :329-35.
- **BELKAID, Y., KAMHAWI, S., MODI, G., VALENZUELA, J., NOBENTRAUTH, N., ROWTON, E., RIBEIRO, J. and SACKS, D.L. (1998).** Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of Experimental Medicine*, **188**:1941-1953.
- **BELKAID M, HARRAT Z, HAMRIOUI B, THELLIER M, DARTY A, DANIS M. (1996).** A propos d'un milieu simple pour l'isolement et la culture des leishmanies. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **89** :276-7.
- **BENIKHLEF R., HARRAT Z., TOUDJINE M., DJERBOUH A., BENDALI-BRAHAM S. ET BELKAID M. (2004).** Présence de *leishmania infantum mon-24* chez le chien. *Médecine tropicale* ; **64** : 381-383 pp.

- **BERREBI J. (1936).** *La culture des leishmanies*. Arch .Inst. Past. Tunis, 89-141.
- **CALVOPINA, M., BAROSSO, P. A., MARCO, J. D., KORENAGA, M., COOPER, P.J. NONAKA, S., HASHIGUCHI, Y. (2006).** Efficacy of vaccination with a combination of leishmania amastigote antigens and the lipid A- analogue ONO-4007 immunoprphylaxis and immunotherapy againstleishmania amazonensis infection in a murine infection in a murine model of new world cutaneous leishmaniasis . *Vaccine*, **24** : 5645-5652.
- **DANTAS TORRES, F. (2006).**Leishmune vaccine : The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet.Prasitol*, **141** : 1-8.
- **DEDET J.P. (1999).** *Les leishmanioses*. Ed. Ellipeses, Paris : 213-226.
- **DEDET JP. (2000).** *Les leishmanioses* : actualités. Press Med., **29**:1019-26.
- **DEDET J.P. & Pratlong F. (2000).** Taxonomie des Leishmania et distribution géographique des leishmanioses. *Ann. Dermatol. Venerol*, **127** : 421-424.
- **DEDET J.P. (2001).** Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encyclopédie Médico-Chirurgical*, **8** :506-510.
- **DEL GIUDICE P., Marty P. & Lacour J.PH. (2001).** Leishmaniose cutanée autochtone en France métropolitaine. *Ann. Dermatol. Venerol*, **128**: 1057-1062.
- **DESJEUX P. (1996).** Leishmaniasis : public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, **14** : 417-423.
- **DESJEUX P. (2004).** *Leishmaniasis*, current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27** :305-18.
- **DJEZZAR-MIHOUBI I. (2006).** *Etude des leishmanioses diagnostiques au centre Hospitalo-universitaire Ben Baddis de Constantine*. Thèse de Doctorat d'état en Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.
- **DUMON H. & PIARROUX R. (1995).** Identification des leishmanies : outils actuels au service de la clinique et de l'épidémiologie. *Méd. Trop.* **55**: 123-126.
- **EVANS D.A, GODFREY D, LANHAM S, LANOTTE G, MODABBER F, SHNUR L.** *Handbook on isolation and characterization and cryopreservation of leishmania* In : Evans DA, editor, TDR, WHO. Genève **45** ; 1989.

- **FOURATI E. (2011).** *Enquêtes entomologiques dans un foyer de Leishmaniose cutanée zoonotique du centre tunisien* ». *Projet de fin d'études en vue de l'obtention de la Licence appliquée en Protection de l'environnement dans la spécialité «Environnement et Sécuritaire»*. Institut Supérieur des Sciences et Technologies de l'Environnement. Borj Cedria, Tunisie.
- **FORGET G. (2004).** *Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par Leishmania pour contrer la réponse immunitaire innée*. Thèse de Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine. Université. Laval. France.
- **GRAMMICIA M, GRADONI L. (1989).** Successful in vitro isolation and cultivation of Italian dermatopic strains of *L.infantum sensus lato*. *Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**:276-7.
- **HALL, L.R. and TITUS, R.G. (1995).** Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology*, **155**, 3501-3506.
- **HAMAL, H, (1860).** Etude compare des boutons d'alep et de Biskra. *Red. Mém. Med. Chir. Pharm. Mil.*4, 314-377.
- **HARRAT Z., HAMRIOUI B., BELKAÏD M. & TABET-DERRAZ O. (1995).** Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **88**:180-184.
- **HARRAT.Z, F. PRATLONG, S. BELAZZOUGE, J. M. DEREURE, DENIAU, J.A. RIOUX, M. BELKAID and J.P. DEDET. (1996).** *Leishmania infantum and leishmania major in Algeria. Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.* **90(6)** :625-629.
- **HARRAT Z. & BELKAID M. (2002).** Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **96** : 212-214.
- **HARRAT Z., BOUDRISSA A., BENHABYLES N. & HARRAT-HAMMADI D. (2005).** Panorama des Leishmanioses en Algérie. *IXème Journée Nationale de Parasitologie*, Alger le 18 Mai 2005.
- **HOWARLD MK, PHAROACH MM, ASHALL S, MILES MA. (1991).** Human urine stimulates growth of leishmania in vitro. *Trans R Soc. Top. Med. Hyg.* **85** : 477-499.
- **HUBERT B (2006).** Comment diagnostiquer la leishmaniose canine. *Le point Vét.* **207** :54-59.

- **IZRI M.A., BELAZZOUG S., PRATLONG F. & RIOUX J.A. (1992).** Isolement de *L. major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie). *Ann. Parasitol Hum. Comp.*, **67**: 31-32.
- **JAAFARI, M. R., GHAFARIAN, A., FARROKH-GISOOR, A., SAMIEL, A., TAVASSOTI, KM., MAHBOUDI, F., BARKHODARI, F., KHAMESIPOUR, A., MCMASTER, W.R., (2006).** Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of leishmania (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine*, **24**, 5708-5717.
- **KAMHAWI, S, BELKAID, Y, MODI, G, ROWTON, E. and SACKS, D. (2000a)** Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *science*, **290**, 1351 - 1354.
- **KAMHAWI, S., MODI, G.B., PIMENTA, P.F.P., ROWTON, E. and SACKS, D.L. (2000b).** The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan mediated midgut attachment. *Parasitology*, **121**, 25-33.
- **KATZ, O., WAITUMBI, J.N., ZER, R. and WARBURG, A. (2000).** Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**, 145-150.
- **KILLICK-KENDRICK R. and MOLYNEUX DH. (1981).** Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75 (1)**: 152-154.
- **KILLICK-KENDRICK, R. (1985).** Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. *Bulletin of the Society for Pathological and Exotic Filiales*, **78**, 747-755.
- **KILLICK-KENDRICK R. (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* **4**: 1-24.
- **LIGHTBURN E., MORAND J.J. & CHOUC C. (2000).** Leishmaniose tégumentaire du nouveau monde. *Nouv Dermatol*, **19**: 385.
- **LIMA, H.C. and TITUS, R.G. (1996.)** Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, **64**, 5442-5445.

- **LIMONCU ME, BALCIOGLU IC, YERELI k, OZBEL Y, OZBILGIN A. (1997).** A new experimental in vitro culture medium for cultivation of leishmania species .*J Clin Microbiol.* **35(9)** : 2430-2531.
- **MAAZOUN, R., LANOTTE, G., PASTEUR, NRIOUX, J.A., KENNOU, M.F., PRACTONG, F. (1981).** Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France .16 : contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches. Isolée en Cévennes, cote d'Azur, corse et Tunisie. *Ann. Parasit. Hum comp.* **56**, 131-146.
- **MAAZOUN R. (1982).** *Identification des leishmanies dans l'ancien monde. Signification de la variation isozymique.* Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle en Parasitologie, Pathologie et Relation éco-physiologiques. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- **MARFURT, J., I. NIEDERWIESER, D. MAKIA, H. P. BECK, and I. FELGER. (2003).** Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:115-124
- **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*, **157(2)** : 41-45.
- **MARTY P., Le FICHOUX Y., PRATLONG F. & GARI-TOUSSAINT M. (1994).** Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 33-34.
- **MARTY P. (2009).** Actualités sur les Leishmanioses en France. *Archive de pédiatrie.* **16** :S96-S100.
- **MAZELET L. (2004).** La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen Français. Thèse de Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- **MBOW, M.L., BLEYENBERG, J.A., HALL, L.R. and TITUS, R.G. (1998).** *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunologie*, **161**, 5571-5577.

- NICO, D., SANTOS, FN., BORJA CABRERA, G.P., PALATNIK DE SOUSA, C.B., (2007). Assessment of the monoterpene, glycidic and triterpene-moiety contributions to the adjuvant function of the CPO<sub>5</sub> Saponin of *Calliandra pulcherrima* benth during vaccination against experimental visceral leishmaniasis. **25(4)**: 649-58.
- NOGUEIRE, F., MOREIRA, M.A.B., BRJA- CABRERA, G.P., SANTOS, FN., MENZ, I, PARRA, L.E., XU ,Z., CHU, H.J., PALATNIK DE SOUSA, C.B., LUVIZOTTO, M.C.R., (2005). Absence of leishmania parasites in blood , skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, **23**, 4805-4810.
- Organisation Mondiale de la Santé/TDR. (2005). Dix-septième rapport du programme. Progrès de la recherche 2003-2004, 18-13.
- OMS, (2010). La lutte contre les leishmanioses Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 949 : 22 - 26 mars 2010.
- OSMAN O.F., KAGER P.A. & OSKAM L. (2000). Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop. Med. International Health*, **5** (8): 553-562.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B (2008). Vaccine for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. **26**, 1709-1724.
- PIARROUX, R., TROUVE, V., PRATLONG, F., MARTINI, A., LAMBERT, M. & RIOUX, J.A. (1994). The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of Old World *Leishmania* species. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88** :475-478.
- PIERRE B, (2007). *Traitements des leishmanioses. DIU Physiopathologie & Thérapeutique en Maladies Infectieuses*. Institute. Pasteur. Paris.
- PIMENTA, P.F., TURCO, S.J., MCCONVILLE, M.J., LAWYER, P.G., PERKINS, P.V. and SACKS, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**, 1812-1815.
- PIMENTA, P.F., SARAIVA, E.M., ROWTON, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J. and Sacks, D.L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **91** , 9155-9156.

- **Pratlong F, Martini A, Lambert M, Lefebvre M, Dedet JP, Rioux JA. (1994).** Intérêt de la culture et de l'identification isoenzymatique des leishmanies dans le diagnostic et l'épidémiologie des leishmanioses. *Med. Armees.* **22**: 61-5.
- **PRATLONG F., DEDET J.P., MARTY P., PORTUS M., DENIAU M., BRANCHES A., REYNES J., Martini (1995).** Leishmania-Human Immunodeficiency virus co-infection in the Mediterranean Basin: Isoenzymatic Characterisation of 100 isolates of the *Leishmania infantum* Complex. *J Infect. Dis.* **172**: 323-326.
- **RAVEL C., DEBYSSAY P., BLACKWELL J.M., IVENS A.C., BASTIEN P. (1998).** The complete chromosomal organization of the reference strain of the *Leishmania*. *Parasito. Today*, 14, 8.
- **RAVEL C., CORTES S., PRATLONG F., MORIO F., DEDET J.P., CAMPINO L. (2006).** First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species :*Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int.J.Parasitol.***36**, 1383-1388.
- **RIOUX JA. et GOLVAN, (1969).** Epidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. *Monog.Inst. N. Hyg.* : 223p.
- **RIOUX J.A, LANOTTE G., PETTER- G., DEREURE J., AKALAY O., PRATLONG F., VELEZ I.D., FIKRIN.B., MAAZOUN R., DENIAL M., JARRAY D., ZAHAF A., ASHFORD R.W., CADI-SOUSSI M., KILLICK-KENDRICK R., BEN MANSOUR N., MORENO G., PERIERES J., GUILVARD E., ZRIBI M., KENNOU M.F., RISPAIL P., KNECHTLI R. & SERRES E. (1986).** *Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco- épidémiologique, l'exemple de trois foyers : Tunisien, Marocain et Français.* Coll Inter CNRS/INSERM 1984, IMEEE. Montpellier: 365-395.
- **RIOUX, J.A, G.LANOTTE, E.SERRES, F.PRATLONG AND B.J.PERIERES. (1990).** Taxonomy of *Leishmania* use of isoenzymatic. Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.***65**: 111-125
- **RODHAIN F. ET PEREZ C., (1985).** *Les phlébotomes : systématique, biologie, importance médicale.* in : Précis d'Entomologie médical et vétérinaire, Ed. Maloine : 157- 175.
- **RODRIGUEZ-CORTES, A., OJEDA, A., LOPEZ-FUERTE, L., TIMON, M., ALTER, L., SOLANO-GALLEGO, L., SANCHEZ-ROBERT, E., FRANCINO ; O., ALBEROLA, J., (2007).** Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and Gp63 does not protect dogs against leishmania *infantum* experimental challenge. *Vaccine*, **25**, 7962,-7971.

- **SACKS, D.L., MODI, G., ROWTON, E., SPATH, G., EPSTEIN, L., TURCO, S.J. AND BEVERLEY, S. M. (2000).** The role of phosphoglycans in *Leishmania* - sand fly interactions .*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 406-411.
- **SACKS, D. (2001)** Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular microbiology*, **3**, 189-196.
- **SARAIVA, E. M., DE FIGUEIREDOBARBOSA, A., NUNES SANTOS, F., BORJA CABRERA, G. P., NICO, D., SOUZA PEREIRA, L. O., DE OLIVEIRA MENDES AGUIAR, DE OLIVEIRA, S. M., PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., (2006).** The FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. *Vaccine*, **24**, 2423-2431.
- **SCHLEIN, Y., JACOBSON, R. L. and SHLOMAI, J. (1991)** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proceedings of the Royal Society of London Ser. B.*, **245**, 121-126.
- **SERIN MS, WAKI K, CHANG K-P, ASLAN G, DIREKEL S, OTAG F, et al.** Consistence of minixon polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **57**:295–9.
- **SERGENT Et. & GUEIDON E. (1923).** Chronique du Bouton d’Orient en Algérie, Le clou de Mila . *Arch Inst Pasteur Alger*, **1**: 1-3.
- **STOBER, C. B., LANGE, U. G., ROBERTS, T. M. M. GILMARTIN, B., FRANCIS, R., ALME IDa, R., PEACOCK, S.C., Mc CANN, S., BLACKWELLE, M. J., (2006).** Form genome to vaccines for leishmanaisis: Screening 100 nouvel vaccine, **24**, 2602-2616.
- **TESH RB. et GUZMAN H., (1996).** *Sandflies and the agents they transmit.* In: Beaty B.J. Marquardt W.C., The biology of disease vectors. *Ed. Colorado*. 632 p.
- **THEODOS, C.M., RIBEIRO, J.M. and TITUS, R.G. (1991).** Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity*, **59**, 1592-1598.
- **THEODOS, C.M. and TITUS, R.G. (1993)** Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunology*, **15**, 481-487.

- **THIMOTHY C, JEANS LP. (1994).** Cultivation of *L. braziliensis* in an encommercial serum free medium containing human urine. *J. Parasitol.* **80(6)** : 1030-2.
- **VOLF P., HAJMOVA M., SADLOVA J. et VOTYPKA J. (2004).** Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosmid models. *Inst. J. Parasitol.* **34 (11)**: 1221-1227
- **World Health Organization (2000).** Leishmaniose et les co-infections Leishmania / HIV. Aide mémoire N°116.

- **Liens Webographiques**

**Anonym 1:** (<http://www.sante.public.lu>)

**Anonym 2:** (ANOFEL) 2014. Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie.

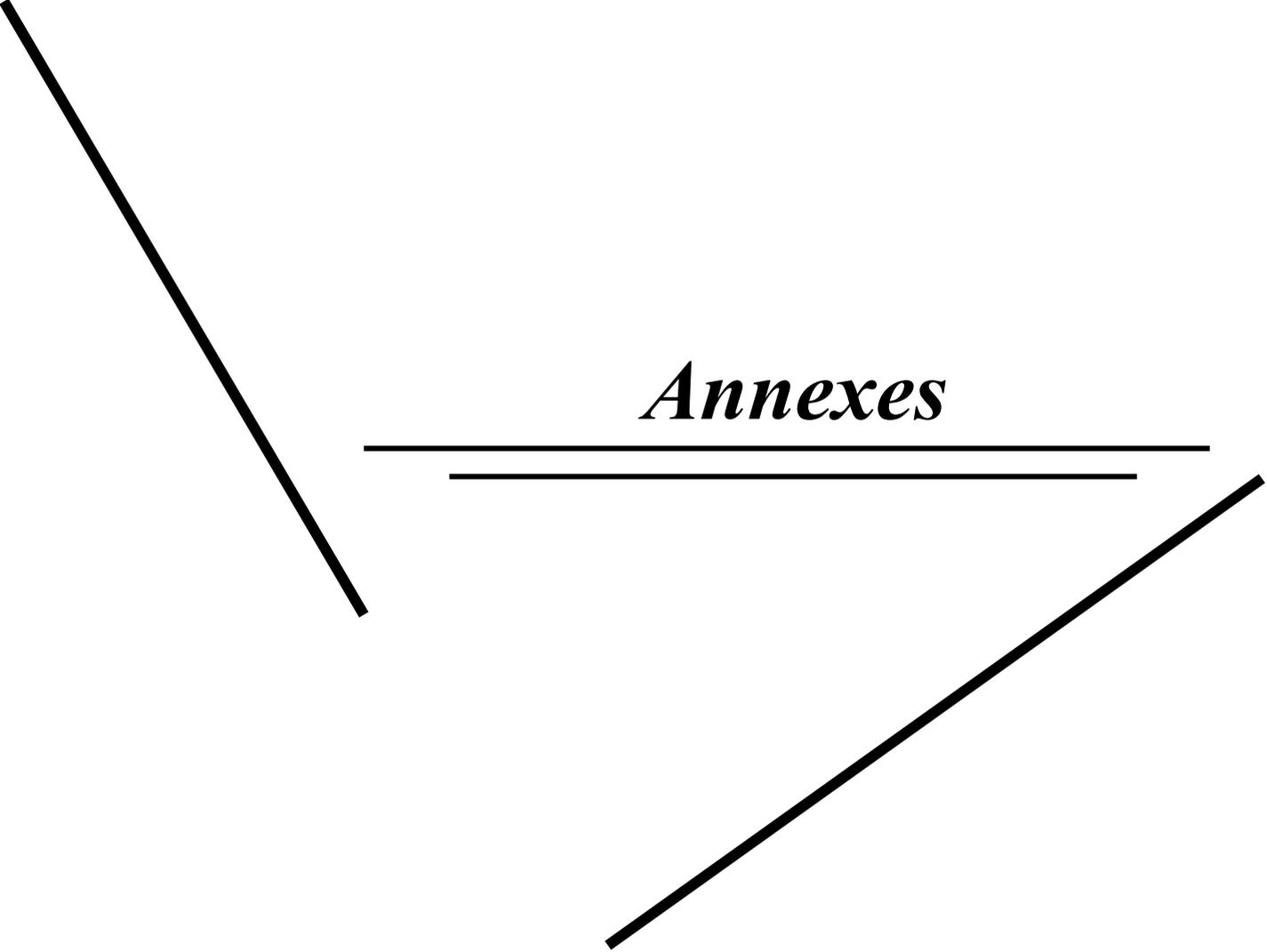
([www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr))

<http://www.esccap.fr>

<http://www.gruppoleishmania.org>

[http://bordeaux2medtrop.org/doc/COURS/UE2/Leishmanioses%20cutanees\\_Dr%20Schmoor.pd/related\\_univ.ency-education.com\\_uploads\\_1\\_3\\_1\\_0\\_13102001\\_parasito3an](http://bordeaux2medtrop.org/doc/COURS/UE2/Leishmanioses%20cutanees_Dr%20Schmoor.pd/related_univ.ency-education.com_uploads_1_3_1_0_13102001_parasito3an)

[http://leishmanioses.pdf\\_parasito3an-leishmaniose.pdf](http://leishmanioses.pdf_parasito3an-leishmaniose.pdf)



*Annexes*

**Annexe I : Le milieu NNN (Novy-Mac Neal-Nicolle)**

La culture est procédé sensible, permettant le diagnostic des leishmanioses même lorsque le diagnostic direct au microscope est négative.

Le matériel parasitaire provient de la sérosité ou de produit de raclage de lésion cutanée pour la leishmaniose cutanée.

**Préparation de milieu de culture NNN :**

**1-** La verrerie, soigneusement lavé, et stérilisée à l'étuve de pasteur à 180° C pendant 40mn à 1 heure.

**2-** Préparation de la gélose :

- Bacto-agar Difco                    5g
- Na cl pur                                3g
- Eau distillée                            0 ,5L

Mettre le Na cl dans l'eau froide et chauffer. Quand l'eau frémit ajouter le Bacto-Agar et remuer avec un agitateur jusqu' à dissolution complète .Laisser bouillir 5 mn.

Répartir en tubes à vis stériles à raison de 5ml de gélose par tube.

Stériliser les tubes à l'autoclave à 120° C pendant 20mn. Conserver à 4° C.

**3-** Prélèvement du sang de lapin par ponction cardiaque du lapin.

Prendre un lapin adulte et en bonne santé, le placer sur le dos et raser les poils thoracique. Stériliser la peau à l'alcool iodé. Repérer la zone de plus forts battements cardiaques et piquer l'aiguille, enfoncée en inclinant à 30° environ. Lorsque le sang arrive, aspire lentement sans bouger la seringue, retiré l'aiguille d'un seul coup après avoir ponctionné 40ml de sang.

Le sang est immédiatement refoulé, devant une flamme du bec Bunsen, dans un Erlenmeyer contenant 3ml de citrate de sodium à 10% et 250 000 UI de pénicilline. Bien agiter le flacon d'un mouvement circulaire pour mélanger l'anticoagulant au sang.

**4-** Mélange du sang et de la gélose

Placer les tubes de gélose dans l'eau froide et chauffer à ébullition pour fondre la gélose laisser refroidir jusqu'à 54°C et ajouter 1ml de sang par tube. Agiter sans faire de bulles. Incliner sur un portoir et laisser refroidir. Placer ensuite 24h à l'étuve à 37°C pour contrôle de stérilité et exsudation de l'eau.

Conserver le milieu au réfrigérateur à +4°C pendant 1 mois au maximum.

**5-** Ensemencement avec précaution d'asepsie rigoureuses et mettre à l'étuve à 24°C. Attendre 7 jours avant de faire la lecture. Celle-ci se fait par l'observation microscopique, en contraste de phase, d'une goutte de phase liquide du milieu, placer entre lame et lamelle. Repiquer ensuite sur 2 tube de NNN.

Les leishmanies de culture sont des promastigotes organisme allongé avec un flagelle antérieur et mobile.



**Annexe III:** Les milieux NNN préparés.

<b>Date de préparation</b>	<b>N° de tubes</b>
Mardi 10/03/2015	18
Mardi 24/03/2015	19
Mardi 31/03/2015	14
Jeudi 23/04/2015	19
Lundi 11/05/2015	19

**Annexe IV:** Les milieux Blanc d'œuf préparés.

<b>Date de préparation</b>	<b>N° de tubes</b>
Mardi 17/03/2015	32
Jeudi 16/04/2015	28

## Préparation des milieux de culture pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée

### Résumé :

La leishmaniose cutanée est une maladie parasitaire qui constitue un véritable problème de santé publique dans plusieurs pays dont l'Algérie. Parasitose due à la multiplication dans le système réticulo-histiocytaire d'un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Elle est transmise par la pique d'un phlébotome femelle hématophage.

Dans ce travail, nous avons préparé deux milieux de culture pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée.

La mise en évidence du parasite *Leishmania* passe par l'examen direct comme il représente un remarquable outil pour le diagnostic, mais il reste lié à certaines contraintes. Donc on ensemence la souche de *Leishmania* dans deux milieux de culture spécifiques l'un est à base de sang de lapin, le milieu NNN, et l'autre est à base d'œufs, le milieu Blanc d'œufs, auxquels on rajoute des antibiotiques, les milieux ainsi préparés doivent être de qualité, et donner des résultats concluants, en vue d'en évaluer la qualité (le rendement).

Les résultats obtenus dans notre travail montrent que la culture sur milieu NNN est plus fiable pour le diagnostic des leishmanies car elle offre les conditions favorables pour leurs multiplications. Ce milieu est par ailleurs, peu coûteux et n'exigeant que du matériel simple disponible dans la plupart des laboratoires.

**Mots clés :** Leishmaniose cutanée, Milieu NNN, Milieu Blanc d'œuf, ensemencement, repiquage.

## Preparation of culture medium for the cutaneous leishmaniasis diagnosis

### Abstract:

Cutaneous leishmaniasis is a parasitic disease that is a real public health problem in several countries including Algeria. Parasitosis due to the increase in the reticulohistiocytic system of a flagellate protozoan of the genus *Leishmania*. It is transmitted by the bite of a sandfly blood-sucking female.

In this work, we prepared two culture media for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The identification of *Leishmania* involves direct examination as it represents a remarkable tool for diagnosis, but it remains linked to certain constraints. So is seeded strain of *Leishmania* in two specific culture media is one with rabbit blood, NNN medium and the other is based on eggs, egg white environment, which we add antibiotics, and prepared media should be of quality, and give conclusive results, to assess the quality (performance). The results of our work show that culture on NNN medium is more reliable for the diagnosis of *Leishmania* because it offers favorable conditions for their multiplication. This medium is also inexpensive, requiring only simple equipment available in most laboratories.

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis, NNN medium, medium Egg white, seeding, transplanting.