

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques
Département de Biologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master II.

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie des Populations et des Organismes.

Thème

Infection expérimentale des *Gerbillus nanus* capturés à Illizi par *Leishmania Major*.

Présenté par :

KLARI Nadia.

et

LARDJANE Cylia.

Soutenu le : 03/11/2021

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} CHAOUCHI Nora

MCA (UMMTO)

Examinatrice : M^{me} AMROUNE Thilleli

MCB (UMMTO)

Promotrice : M^{me} BRAHMI Karima

Professeur (UMMTO)

Co-Promoteur : M^r BENALLAL Kamel

Attaché de recherche (IPA)

Année Universitaire 2020/2021.

Remerciements

Nos remerciements les plus sincères vont à toute personne ayant eu la bonté et la patience de satisfaire notre curiosité et de nous aider dans notre travail par leurs précieux conseils, réponses et recommandations.

Nous tenons à remercier Mme. Karima Brahmi notre promotrice, professeur à l'UMMTO, c'est une personne qui nous inspire le plus grand respect.

Nous tenons à remercier Dr. Zoubir Harrat le chef du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations.

Notre attention se portera aussi plus particulièrement sur Mr. Kamel Eddine Benallal, notre co-promoteur, un homme qui nous a offert l'opportunité d'effectuer ce stage dans les meilleures conditions et qui nous a fortement impressionné par son expérience, savoir et sa concrète contribution au bon déroulement de ce travail.

A tout le personnel d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'IPA spécialement à Mme. Ghania Mezai et Mme. Ihen Kherachi qui n'ont épargné ni temps ni effort pour nous aider à travailler dans les meilleures conditions. Et nous remercions aussi Mr. Rafik Garni, Mlle. Ikram BENHASSINE et Mr. Mounir Zaabar de nous avoir aussi offerts leurs aides. Nous leurs adressons notre plus profonde reconnaissance pour leur bon encadrement et leurs conseils fructueux qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer.

Que Mme. Nora CHAOUCHI, présidente de notre jury et Mme. Tilleli AMROUN notre examinatrice trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail, qu'elles voient en ces mots l'expression de notre gratitude pour leur présence, pour leur dévouement et pour l'aide inestimable qu'elles nous ont apportées tout au long de ce parcours. Un petit bout de chemin certes, mais un grand enrichissement.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents pour qui je n'arriverais jamais à exprimer mon amour sincère, particulièrement à ma mère qui sans elle rien n'aurais pu être possible.

*A mes sœurs Katia et Mounia et mon frère Kamal
Je leurs souhaite que du bonheur, santés et avenir radieux.*

A Yanis

Qui n'a pas cessé d'être présent de par ses encouragements et ses conseils.

A ma binôme Nadia et tous ses proches qui m'ont ouvert les portes de chez eux et qui n'ont cessé d'être bienveillants et gentils à mon égard.

A mes copine Lydia et Ryma

Qui m'ont énormément aidé et avec qui j'ai partagé beaucoup de belles choses

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci

Dédicaces

Ce projet de fin d'étude est dédié à mes chers parents :

À mon très cher père

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Que se travail traduit ma gratitude et mon affection

À ma très chère mère

Ton affection me couve, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles

*À mon frère Mohamed et à ma petite sœur Wafaa
À qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite*

*À mon cher grand père Akli et ma tante Nadjia
Puisse dieu vous protège, vous procure santé et longue vie*

*À la mémoire de mon grand-père Mohamed et mes chères grand-mères
Que dieu les accueille dans son vaste paradis*

À Malik

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour l'aide que tu m'as apporté, ton soutien et encouragements

À ma binôme Cylia

À mes oncles Sidali, Lamara, Hakim, Toufik et leurs conjoints

À mes tantes Saliha, Tassadit, Malika, Rahima, Fayza et Baya et leurs conjoints

*À tous mes cousins et cousines sur tout Krimo, Chrifa, Amel et son marie
Bokreta Mohamed*

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible

Je vous dis Merci.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I - Données bibliographiques

Généralités sur la leishmaniose

I.1 – Historique.....	3
I.2 - Les vecteurs	3
I.2.1 - Taxonomie des phlébotomes	3
I.2.2 - Stades de développement.....	5
I.2.3 - Les phlébotomes en Algérie	6
I.3 - L'agent pathogène	6
I.3.1 – Taxonomie.....	6
I.3.2 – Morphologie	7
I.3.2.1 - La forme amastigote.....	7
I.3.2.2 - La forme promastigote	7
I.3.3 - Les différentes formes de la leishmaniose	8
I.3.3.1 - La leishmaniose viscérale (LV)	8
I.3.3.2 - La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)	8
I.3.3.3 - La leishmaniose cutanée (LC) ou Bouton d'Orient.....	9
I.3.4 - Les types de la leishmaniose cutanée en Algérie.....	9
I.3.5. 1 - La leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN)	9
I.3.5.2 - Leishmaniose Cutanée Zoonotique (LCZ) ou clou de Biskra.....	10
I.3.5.3 - Leishmaniose Cutanée à <i>Leishmania killicki</i>	10
I.3.5 - Co-infection <i>Leishmania</i> / VIH (SIDA)	10
I.3.6.1 - Leishmaniose cutanée et la co-infection leishmaniose cutanée / Sida	11
I.3.6 - Cycle parasitaire	11
I.3.6.1 - Phase extracellulaire (développement chez l'insecte)	11
I.3.6.2 - Phase intracellulaire (développement chez l'hôte mammifère).....	11
I.4 – Réservoirs	12
I.5 - Diagnostic de leishmaniose cutanée	13

I.5.1 - L'examen direct après coloration	13
I.5.2 – Culture.....	13
I.6 – Prophylaxie	14
I.7 - Répartition des leishmanioses	14
I.7.1 - Dans le monde	15
I.7.2 - En Algérie	15
Chapitre II - Matériels et méthodes.	
II.1 - Identification morphologique et moléculaire des rongeurs.....	18
II.1.1 - Zone de capture des rongeurs.....	18
II.1.2 - Identification morphologique	19
II.1.2.1 - Morphométrie corporelle.....	19
II.1.2.2- Morphométrie des ossements	20
II.1.2.2. - Mensurations crâniennes et dentaires	20
II.1.3 - Identification moléculaire.....	22
II.1.3.1 - Extraction d'ADN.....	22
II.1.3.2 - La réaction de polymérisation en chaine (PCR) séquençage.....	22
II.3.3.3 - Visualisation des produits PCR	24
II.1.3.4 - Séquençage et construction d'arbre phylogénique	24
II.1.3.4.1 – Principe	24
II.1.3.4.2 - Protocole expérimental.....	25
II.2 - Infection des rongeurs	26
II.2.1 - Revitalisation de la souche de parasite <i>Leishmania major</i>	26
II.2.2 - Monitoring et récolte des parasites revitalisés.....	27
II.2.3 - Infection expérimentale des rongeurs et Balb/c	27
II.2.4 - Comptage du nombre et différentes formes de parasites <i>Leishmania</i> dans l'inoculum.....	27
II.2.4.1. - Comptage des différentes formes de parasites dans les cultures .	27
II.2.4.2. - Comptage des parasites pour l'inoculum.....	28
II.2.5 - Inoculation des parasites dans le pavillon de l'oreille	28
II.2.6 - Suivi de l'évolution de l'infection (monitoring)	29
II.3 - Exploitation des résultats par les analyses statistique	29
Chapitre III - Résultats et discussions	
III.1 - Identification morphologique et moléculaire des rongeurs.....	30
III.1.1 - Morphométrie corporelle	30

III.1.2 - Mensurations crâniennes et dentaires	31
III.1.3 - Identification moléculaire	32
III.1.3.1 - Visualisation des produits PCR.....	33
III.1.3.2 - Séquençage et construction d'arbre phylogénique.....	33
III.2. – Comptage du nombre et différentes formes de parasites <i>Leishmania</i> dans l'inoculum	36
III.2.1. – Comptage des différentes formes de parasite <i>Leishmania</i>	36
III.2.2. – Comptage des parasites pour l'inoculum	36
III.3 - Suivi de l'évolution de l'infection (monitoring).....	37
III.4 – Résultats des analyses statistiques.....	40
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	
Annexes	

Figures	Pages
Figure 01 - Phlébotome femelle gorgée de sang	5
Figure 02 - Cycle de développement de <i>Lutzomyia</i>	5
Figure 03 - Examen au microscope optique d'un échantillon de moelle osseuse coloré d'un patient atteint de LV, montrant un macrophage contenant de multiples amastigotes de <i>Leishmania</i>	7
Figure 04 - Forme promastigote après coloration MGG, observé au microscope photonique au Gx100	8
Figure 05 - Signes cliniques de la leishmaniose cutanée	9
Figure 06 - Cycle parasitaire de <i>Leishmania</i>	13
Figure 07 - Répartition géographique des leishmanioses	16
Figure08 - Répartition de la Leishmaniose cutanée zoonotique en Algérie	16
Figure 09 - Répartition de la Leishmaniose cutanée du nord en Algérie	17
Figure 10 - Vue générale du village Imihrou	18
Figure 11 - Station d'étude et piège Sherman au niveau du lit de l'Oued	19
Figure 12 - Mensurations morphométriques prises sur les rongeurs	19
Figure 13 - Préparation des crânes et prise de différentes mensurations crâniennes et Dentaires	20
Figure 14 - Mensurations crâniennes prises sur les <i>Gerbillus</i> sp.	21
Figure 15 - champs de comptage de la cellule THOMA	28
Figure 16 - Empreinte dentaire de <i>Gerbillus</i> sp (Figure A). Empreinte dentaire de <i>Gerbillus nanus</i> (Figure B).	32
Figure 17 - Résultat de la PCR	33
Figure 18 - Profile de séquençage	34
Figure 19 - Arbre phylogénique par la méthode de Neighbor-Joining (1000 bootstraps) du rongeur n°3 et n°4	35
Figure 20 – Les différentes formes de parasite <i>Leishmania</i> colorés au MGG observés au microscope photonique (Gx100)	36
Figure 21 - Cinétique d'évolutive de l'induration chez <i>Gerbillus nanus</i> et Balb/c.	39

Liste de tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 01 - Sous genre et principales espèces de phlébotomes impliqués dans la transmission de diverses leishmanioses	4
Tableau 02 - Protocole expérimental CytB	23
Tableau 03 - Protocole expérimentale ITS1	24
Tableau 04 - Protocole expérimentale PCR, séquençage (amorce sens)	25
Tableau 05 - Protocole expérimentale PCR, séquençage (amorce antisens)	25
Tableau 06 – Mensurations corporelles des Gerbilles échantillonnés dans la région d’Illizi (Algérie) durant l’année 2020 – 2021	30
Tableau07 - Mensurations crâniennes et mandibulaires de gerbilles	31
Tableau 08 – Nombre de parasites comptés sur cellule Thoma	36
Tableau 09 – Évolution des indurations au niveau Des oreilles des <i>Gerbillus</i> sp et des Balb/c	39

Liste des abréviations

L - Leishmania.

Ph – Phlebotomus.

G – Gerbillus.

LC - Leishmaniose Cutanée.

LV - Leishmaniose Viscérale.

LCM - Leishmaniose Cutanéomuqueuse.

LCZ - Leishmaniose Cutanée Zoonotique.

LCS - Leishmaniose cutanée sporadique du nord.

CHU - Centre hospitalier universitaire.

LCL - Leishmaniose cutanée localisée.

LCD - Leishmaniose cutanée diffuse.

VIH - Virus de l'immunodéficience humaine.

NNN - Novy Nicolle Mc Neal.

MGG - May-Grunwald-Giemsa.

OMS - Organisation Mondiale de la Santé.

IPA - Institut Pasteur d'Algérie.

EPSP - Etablissement Public pour la santé de Proximité.

TE - Tris-EDTA.

EDTA - Acide éthylène diamine tétra-acétique

ATL - Tissue Lysis Buffer (Tampon de lyse cellulaire).

PK - Protéinase K.

AL - Lysis Buffer (tampon de lyse).

AW1 - Wash Buffer 1 (tampon de lavage 1).

AW2 - Wash Buffer 2 (tampon de lavage 2).

PCR - Polymerase Chain Reaction.

ADN - Acide Désoxyribonucléique.

CytB - Cytochrome B.

Dntp - Désoxyribonucléoside triphosphate.

Ddnto - Didésoxyribonucléotide triphosphate.

RPMI - Roswell Park Memorial Institut.

SVF - Sérum de veau fœtal.

IDO - Inoculation en intradermique oreille.

The background features three decorative orange circles of varying sizes, each composed of multiple overlapping outlines. Two thin orange lines originate from the top left and extend towards the circles. A larger orange shape, resembling a stylized 'C' or a partial circle, is located in the bottom right corner.

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies à transmission vectorielle, causées par des parasites obligatoires du genre *Leishmania* (Trypanosomatida : Trypanosomatidae) (Eddaikra, 2018). Elles sont classées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) parmi les plus importantes maladies tropicales négligées (OMS, 2009), elles touchent plus de 88 pays. Chaque année, environ 2 millions de cas de leishmaniose sont recensés, 1.5 millions de cas leishmaniose cutanée (LC) et 500.000 cas de leishmaniose viscérale (LV) (Annequin, 2020). Environ 350 millions de personnes vivent sous le risque d'être infectés, avec une prévalence globale de 12 millions (Rosenthal et Marty, 2002), en raison de la distribution discontinue des zones endémiques, du nombre de cas non rapportés, ou mal diagnostiqués mais aussi par la difficulté d'obtenir des informations de la part des autorités de santé de certains pays (Singh et al., 2012).

La leishmaniose sous ses deux formes cutanée et viscérale constitue un problème de santé publique pour l'Algérie qui est classée deuxième pays dans le monde après l'Afghanistan concernant les cas de LC (Eddaikra et al., 2018). Et comme d'autres pays méditerranéens, l'Algérie est fortement concernée par ces zoonoses qui sont classées dans notre pays comme maladies à déclaration obligatoire. La situation épidémiologique des leishmanioses est inquiétante puisque le nombre des cas est en nette recrudescence dans le pays où plusieurs nouveaux foyers pour les deux formes sont apparus (Harrat et al., 1995), d'après le dernier relevé épidémiologique mensuel publié en 2017 par l'Institut National de Santé Public 11,700 LC et 29 LV cas ont été enregistrés (INSP, 2017). Les parasites sont transmis par la piqûre de phlébotomes femelles infectées du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et le genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (Desjeux, 1996). En Algérie, 22 espèces de phlébotomes ont été reportées (Kabbout et al., 2016) parmi elles 4 espèces sont prouvées à transmettre le parasite *Leishmania* à savoir *Phlebotomus papatasi* transmet *L. major* MON-25 (Izri et al., 1992), *Ph. Perniciosus* transmet *L. infantum* MON-1 (Izri et al., 1990), *Ph. Perfiliewi* transmet *Leishmania infantum* MON-24 (Izri et Belazzoug, 1993) et *Ph. Sergenti* transmet *L. killicki* (Boubidi et al., 2011). Jusqu'à maintenant, seulement quatre animaux sont prouvés de servir comme réservoir aux parasites *Leishmania*, parmi eux le chien et le chacal sont des réservoirs de *L. infantum* agent causatif de la LV et la LC (Bessad et al., 2012), *Meriones shawii* et *Psammomys obesus* des réservoirs de *L. major* (Belazzoug, 1983, 1986) et *Massouteira mzabi* est considéré comme un réservoir potentiel de *L. killicki* dans la région de Ghardaïa où circule ce type de parasite (Boubidi et al., 2011). Récemment, le hérisson a fait sa place parmi les espèces à considérer puisqu'il a été retrouvé naturellement porteur d'anticorps anti-*Leishmania*

et l'ADN du parasite a été détecté par PCR dans les organes internes (Chemkhi *et al.*, 2015), mais son rôle nécessite plus d'études pour l'incriminer dans le cycle de transmission de la leishmaniose en Algérie.

Notre étude a pour objectif de tester la sensibilité d'une espèce de gerbille, capturée dans la wilaya d'Illizi où récemment des cas de LC ont été reportés, à développer la maladie et des signes d'infections, ainsi fournir des données sur le rôle possible que pourrait jouer cette espèce dans le maintien et la dissémination du parasite *Leishmania* dans la nature.

Cette étude comprend trois parties. La première partie concerne des généralités sur les leishmanioses. La seconde est consacrée à la partie matériels et méthodes où est rapportée les différentes techniques utilisées au sein du laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). Les résultats obtenus ont été cités dans la troisième partie avec discussion pour chaque résultat, et enfin, nous terminons par une conclusion et quelques perspectives.

The page features a decorative design with three sets of concentric orange circles. One large set is in the top right, a medium set is in the middle right, and another large set is in the bottom right. Two thin orange lines cross the page diagonally, one from the top left to the middle right, and another from the top right to the bottom left, intersecting near the middle set of circles.

Chapitre I

Données bibliographiques

I. – Données bibliographiques

Ce chapitre englobe des généralités sur la leishmaniose à commencer par son historique puis les vecteurs qui servent d'intermédiaires, les agents pathogènes et quelques réservoirs puis il aborde le côté diagnostic, la prophylaxie et en dernier la répartition géographique

I.1. – Historique

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses constituent des affections dermatologiques, connues depuis longtemps (Jarry, 1999). 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 XIX^{ème} siècle (Idir et Taleb, 2018).

Au Pérou, avant l'arrivée des espagnoles sur les côtes du nouveau monde, il y avait déjà des infections cutané-muqueuses très proches des leishmanioses connues aujourd'hui puisqu'une sculpture Inca de la civilisation « Mochica » (100 - 700 ap. J.C) représente une femme et sa maladie mutilante du nez et des lèvres, et les premières espagnoles observaient des éruptions et des ulcérations chez les indiens d'Amérique (Ripert et Pajot, 1996).

En 1900 et 1903, Leishman et Donovan ont découvert, avec coloration Giemsa, un parasite ovale dans les macrophages de patients atteints de leishmaniose viscérale. Wright en 1903, a décrit le premier cas d'infection par *Leishmania tropica* (Sánchez-Saldaña, 2015).

Selon les données de l'OMS datées de 1998, la leishmaniose touche environ 12 millions d'individus, 2 millions de cas apparaissent chaque année et 350 millions d'individus sont à risque. L'Afrique est la plus touchée, en particulier le Maroc, l'Algérie, le Soudan, la Tunisie, l'Ouganda, le Kenya et l'Éthiopie (Ripert et Pajot, 1996).

En Algérie, La leishmaniose est décrite pour la première fois en 1860 (Beniklef, 2021).

I 2 - Les vecteurs

Cette partie est dédiée de la taxonomie des phlébotomes, les différents stades de leurs développements et différents vecteurs signalés en Algérie.

I.2.1. - Taxonomie des phlébotomes

Les phlébotomes appartiennent à l'ordre des Diptères, du sous-ordre des Nématocères, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotomina (Chavy, 2019), jusqu'à maintenant environ 700 espèces ont été décrites (Tableau 1) (Boudrissa, 2018).

Ce sont des moucheron hémato-phages (Zougaghi, 2011) de 1,5 mm à 3mm (Figure 01). Seule la femelle est hémato-phage et assure la transmission des pathogènes (Larivière, 1987).

La distribution des phlébotomes englobe toutes les régions intertropicales, et bien au-delà dans beaucoup de régions. Ils ont su s'adapter à des climats très différents : méditerranéens, désertiques, tropicaux ou équatoriaux (Depaquit et Léger, 2017).

Tableau 1 - Sous genre et principales espèces de phlébotomes impliqués dans la transmission de diverses leishmanioses (Léger et Depaquit, 2001).

Genre	Sous genre	Espèce	Leishmanies
<i>Phlebotomus</i> (Ancien monde)	<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi</i> , <i>duboscqi</i>	<i>L. major</i>
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>sergenti</i> <i>alexandri</i> <i>alexandri</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i>
	<i>Synphlebotomus</i>	<i>martini</i> <i>guggisbergi</i> <i>ansarii</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i>
	<i>Larrousius</i>	<i>ariasi</i> <i>langeroni</i> <i>neglectus</i> <i>perfiliewi</i> <i>perniciosus</i> <i>longipes</i> <i>pedifer</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. aethiops</i>
	<i>Adlerius</i>	<i>chinensis</i>	<i>L. infantum</i>
	<i>Euphlebotomus</i>	<i>argentipes</i>	<i>L. donovani</i>
	<i>Lutzomyia</i>	<i>longipalpis</i> <i>diabolica</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. infantum</i>
<i>Lutzomyia</i> (Nouveau monde)	<i>Nyssomyia</i>	<i>olmea</i> <i>olmea</i> <i>flaviscutellata</i> <i>olmea bicolor</i> <i>intermedia</i> <i>umbratilis</i> <i>anduzei</i> <i>whitmani</i> <i>trapidoi</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
	<i>Psychodopygus</i>	<i>wellcomei</i> <i>panamensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>Helcocyrtomyia</i>	<i>peruensis</i>	<i>L. peruiana</i>
	<i>Pintomyia</i>	<i>pessoai</i>	<i>L. braziliensis</i>



Figure 01 - Phlébotome femelle gorgée de sang (Prudhomme, 2015).

I.2.2. - Stades de développements

Les phlébotomes sont des insectes dit holométabole (le cycle évolutif comporte une métamorphose complète), qui comprend obligatoirement : l'œuf, quatre stades larvaires, stade nymphal et l'imago (Figure 02) (Bounamous, 2010).

Le stimulus qui provoque l'oviposition est le contact avec une surface humide, leurs œufs se développeront ensuite en larves, puis pupes et enfin en un imago (Depaquit et Léger, 2017).

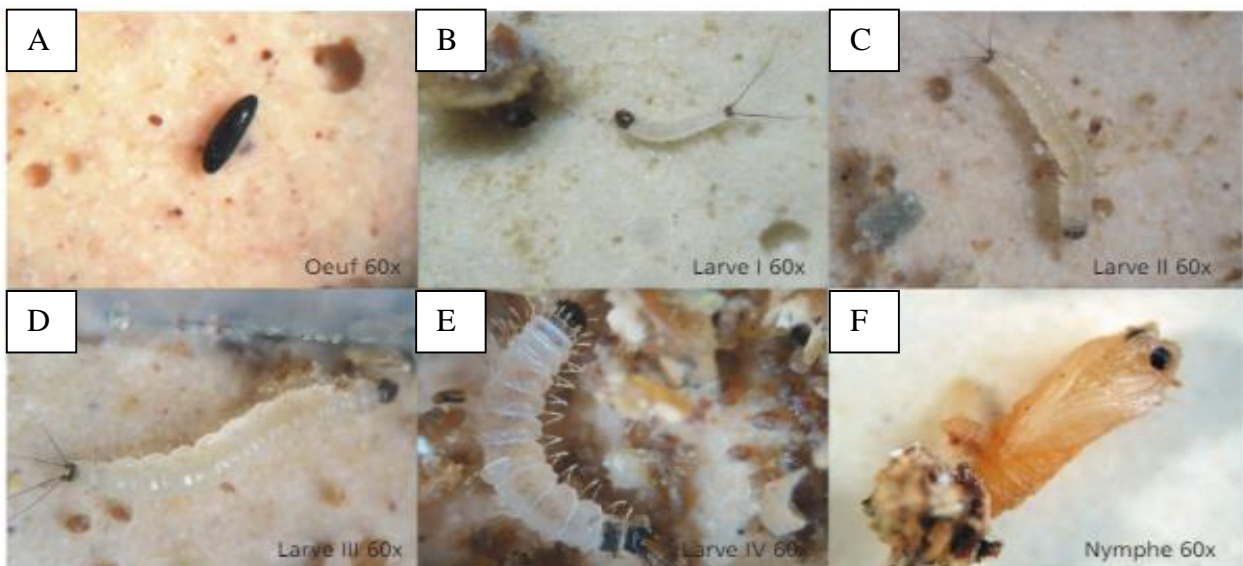


Figure 02 - Cycle de développement de *Lutzomyia*. **A** : œuf, **B** : larve de stade 1, **C** : Larve de stade 2, **D** : larve de stade 3, **E** : larve de stade 4, **F** : nymphe (Depaquit et Léger, 2017).

La majorité des espèces de phlébotomes ont une activité crépusculaire et nocturne (Fourati, 2012). En dehors de l'hôte vertébré, le cycle de vie de *Leishmania* est confiné au tube digestif (Dostálová et Volf, 2012).

I.2.3. - Les phlébotomes en Algérie

La présence des phlébotomes a été signalée pour la première fois en Algérie par Foley et Leduc en 1912 et plus tard par Parrot et Sergent 1917 à 1960 (Dedet et *al.*, 1984). Aujourd'hui, il existe 22 espèces de phlébotomes connues en Algérie, qui appartiennent aux deux genres : *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Ramdane et *al.*, 2018).

I.3. - L'agent pathogène

Du point de vue épidémiologique, ce sont des zoonoses, transmissent de vertébrés à vertébrés par un moucheron hématophage, le phlébotome. Elles surviennent chez l'homme, selon les régions, sur le mode sporadique ou endémo-épidémique, avec des recrudescences saisonnières (Ripert et Pajot, 1996).

En Algérie, *L.infantum* est l'agent de la leishmaniose viscérale, et *L. major* celui de la leishmaniose cutanée (Harrat et *al.*, 1996).

I.3.1. –Taxonomie

La classification de genre *leishmania* est faite comme suit selon Ripert et Pajot, (1996)

Sous-règne	Protozoa (Goldfuss, 1817).
Phylum	Sarcomastigophora (Honigberg et Balamuth, 1963).
Sous-Phylum	Mastigophora (Diesing, 1886).
Classe	Zoomastigophores (Calkins, 1909).
Ordre	Kinetoplastida (Honigberg, 1963).
Sous-ordre	Trypanosomatina (Kent, 1880).
Famille	Trypanosomatidae. (Döflein, 1901).
Genre	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903) (Rioux et <i>al.</i> , 1990).

Le genre *Leishmania*, comprend deux sous-genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur ; le sous genre *Leishmania* (Ross, 1903) et le sous genre *Viannia* Lainson et Shaw, (1987) (Ripert et Pajot, 1996).

Dans le sous genre *Leishmania* le développement est supra-pylorique, (la multiplication des promastigotes est limitées, chez l'insecte, à l'intestin moyen). Dans le sous genre *Viannia* le développement est péri-pylorique (Aarab, 2018), la multiplication concerne l'intestin moyen et l'intestin postérieure (Ripert et Pajot, 1996).

I.3.2. – Morphologie

Le parasite est dimorphique. Il se présente chez ces hôtes successifs sous deux stades distincts ; la forme amastigote et la forme promastigote (Ripert et Pajot, 1996).

I.3.2.1. - La forme amastigote

L'amastigote est une cellule qui mesure 2 à 6 μ de taille (Larivière, 1987), possédant un noyau arrondi et un kinétoplaste (origine du flagelle) en bâtonnet plus sombre (Figure 03) (Anofel et Chabasse, 2016). Elles sont immobiles, intracellulaires dans les macrophages ou elles se multiplient ou extracellulaires après éclatement de ces dernières. C'est la forme rencontrée chez l'hôte vertébré (Mokni, 2019).

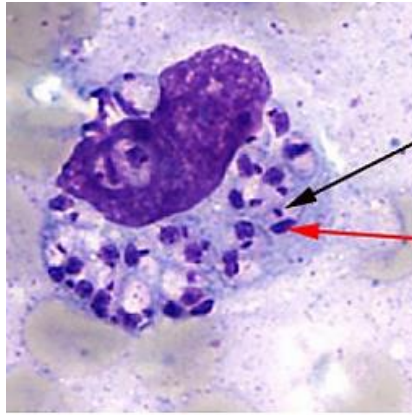


Figure 03 - Examen au microscope optique d'un échantillon de moelle osseuse d'un patient atteint de LV, montrant un macrophage contenant de multiples amastigotes de *Leishmania*. La flèche rouge indique le noyau de l'amastigote et la flèche noire indique un kinétoplaste (Mans et *al.*, 2017).

I.3.2.2. - La forme promastigote

Le promastigote représente la forme infectieuse du parasite, libre et mobile grâce à son flagelle (Figure 04), retrouvée dans le tube digestif du phlébotome femelle et dans les milieux de cultures (Anofel et Chabasse, 2016), possédant une forme allongée de 20 μ de longueur sur 8 μ de largeur (Larivière, 1987).

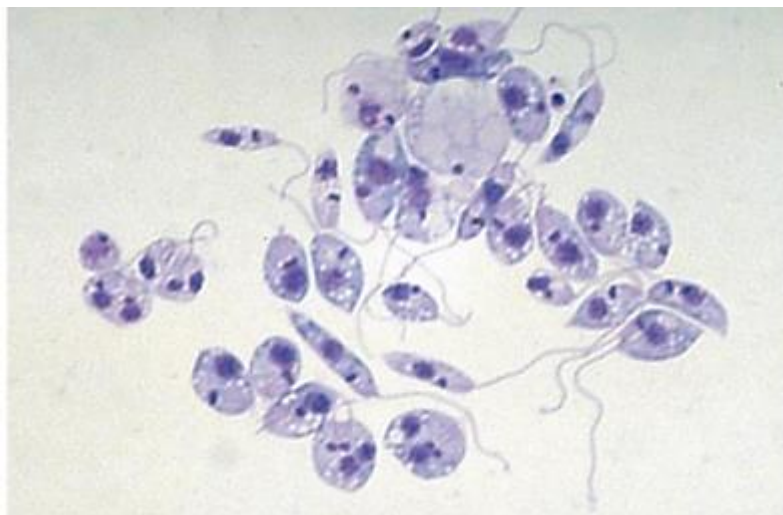


Figure 04 - Forme promastigote après coloration MGG, observé au microscope photonique au Gx100 (Anofel et Chabasse, 2016).

I.3.3. - Les différentes formes de la leishmaniose

Les Leishmanioses incluent des formes viscérales, cutanées et cutané-omuqueuse (Anofel et Chabasse, 2016). En Algérie, la leishmaniose se manifeste sous deux formes cliniques : la leishmaniose cutanée (LC) et la leishmaniose viscérale (LV) (Eddaikra, 2016).

I.3.3.1. - La leishmaniose viscérale (LV)

Appelée également Kala-azar, c'est la forme la plus grave de la Leishmaniose, causée par différents complexes dont *L. donovani* et *L. infantum* (Rhamirich, 2012). Elles sont dues à l'envahissement de tout le système réticulo-histiocytaire (foie, rate, ganglions, et moelle osseuse) (Larivière, 1987). L'incubation est environ 3 à 6 mois, mais peut atteindre plusieurs années. Quant à l'infection, elle peut rester asymptomatique dans de nombreux cas (Anofel et Chabasse, 2016).

La LV provoque plusieurs symptômes qui sont la fièvre, les frissons, la nausée, l'œdème facial, le saignement des muqueuses, la diarrhée et les difficultés respiratoires (Rhamirich, 2012).

I.3.3.2. - La leishmaniose cutané-muqueuse (LCM)

Elle est causée par *L. braziliensis* (qui peut aussi donner des formes localisées) et, dans une moindre mesure, par *L. panamensis* (Benoist *et al.*, 2020). Elle est caractérisée par des ulcérations qui s'étendent aux muqueuses (bouche, nez, conjonctives) et qui peuvent être très mutilantes. Il s'agit initialement d'une forme cutanée qui, dans 1 à 3 % des cas, se complique

après une ou plusieurs années plus tard de métastases muqueuses de la sphère oto-rhino-laryngologie (ORL) évoluant vers une perforation de la cloison nasale (Bouchaud et *al.*, 2019).

I.3.3.3. - La leishmaniose cutanée (LC) ou Bouton d'Orient

La LC est la forme la plus commune de la Leishmaniose (Figure 05). Elle se traduit par des ulcérations cutanées uniques ou multiples sur les parties découvertes du corps, comme le visage, les membres supérieurs et les membres inférieurs (Masmoudi et *al.*, 2007). S'en suit une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme qui conduit à une ulcération. Ces lésions, sont causées par *L.tropica*, *L. mexicana* et *L. major* (Marc et *al.*, 2006), qui sont généralement indolores mais laissent après cicatrisation, de profondes cicatrices non pigmentées (Estevez, 2009).



Figure 05 - Signes cliniques de la leishmaniose cutanée (A: Lésion causée par *L. tropica* à Kaboul, B: Leishmaniose muqueuse causée par *L. braziliensis* à Cochabamba, C: Leishmaniose récidivante causée par *L. tropica* à Kaboul, Afghanistan, D : Lésion traitée à l'acide de batterie, Pérou) (Reithinger et *al.*, 2007).

I.3.4. - Les types de la leishmaniose cutanée en Algérie

I.3.4.1. - La leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN)

La LCN est connue en Algérie sous le nom de clou de Mila. Un nouveau variant enzymatique du complexe *L. infantum* MON-24 a été identifié comme le principal agent responsable de la leishmaniose cutanée du Nord. Cette forme présente la particularité de siéger au niveau du visage sous forme d'une lésion nodulaire souvent unique, très riche en parasites. Son évolution chronique s'étale entre 6 et 12 mois (Belazzoug, 1986). La transmission du

parasite est assurée par *Ph. perfiliewi*, trouvé naturellement infesté par la *L. infantum* MON 24, dans la localité de Ténès, foyer actif de la LCN (Izri et al., 1993), le chien son principal réservoir (Benikhlef et al., 2004).

I.3.4.2. - Leishmaniose Cutanée Zoonotique (LCZ) ou clou de Biskra

Cette forme, connue depuis 1924 sévit à l'état endémo-épidémique au niveau des zones arides et semi-arides de l'Afrique du nord, dans la région de Chott El Hodna, (Parrot et Foley, 1925). Elle est causée par *L. major* et répandue dans les régions steppiques du nord du Sahara (Benikhlef et al., 2004). Les débuts de l'épidémie déclarée remontent à 1982 avec l'apparition des premiers cas à l'est du Chott El Hodna. Rapidement toute la région fut concernée ; l'incidence de la maladie atteignit 9 pour mille en 1982 (Belazzoug, 1983). L'épidémie ne se limita pas à la région de M'Sila puisque les wilayas voisines déclarèrent elles aussi des cas, avec cependant une incidence nettement plus faible. L'extension de la maladie a touché les wilayas suivantes : Biskra, Tiaret, Bordj Bou Arreridj, Batna, Djelfa, Saida et Sétif. Elle fut signalée la première fois dans la wilaya de Ghardaïa, elle constitue l'un des gros foyers émergents de leishmaniose cutanée, 2040 cas y ont été recensés au cours de l'année 2000.

I.3.4.3. - Leishmaniose Cutanée à *Leishmania killicki*

Une nouvelle forme de leishmaniose cutanée découverte en 2005 à Ghardaïa par Harrat et al. Les différents prélèvements effectués sur les malades ont révélé la présence de *L. Killiki* MON-301. La leishmaniose cutanée provoquée par *L. killickia* a été décrite pour la première fois au Maghreb en 1986 dans le sud tunisien (Bouratbine, et al., 2005), c'est une nouvelle forme clinique. *L. killicki* est transmis par *Ph. Sergenti* et *Massouteira mzabi* rongeurs des roches et potentiel réservoirs (Boubidi et al., 2011).

I.3.5. - Co-infection *Leishmania* / VIH (SIDA)

La leishmaniose viscérale après la piqûre infectante par le phlébotome, ou transmission transplacentaire ou transmission par le sang est liée à une dépression de l'immunité cellulaire. La leishmaniose viscérale nécessite une parfaite coopération cellulaire entre le système monocytes-macrophages et les lymphocytes, particulièrement les lymphocytes T- helper CD4+. Les Co-infections leishmanioses viscérales/VIH sont apparues du fait de la superposition croissante des deux maladies, la pandémie de VIH/SIDA atteignant les zones rurales et la leishmaniose viscérale devenant de plus en plus suburbaine. Les Co-infections sont signalées dans 33 pays, mais la plupart des cas proviennent du Sud de l'Europe (Espagne, France, Italie

et Portugal), les toxicomanes par voie intraveineuse (IV) représentant la principale population à risque. Les cas de co-infections augmentent en Afrique de l'ouest et dans les sous continents Indien où l'homme est la seule source d'infection pour les phlébotomes vecteurs. La prévalence de la co-infection serait de 1-3 % (OMS), ce qui est préoccupant pour les années à venir en zone d'endémie. Elle est observée chez les sujets jeunes entre 30-45 ans avec une prédominance masculine (Keita, 2005).

I.3.5.1. - Leishmaniose cutanée et la co-infection leishmaniose cutanée / Sida

Elle est beaucoup moins fréquente que la co-infection leishmaniose viscérale / Sida. Le premier cas déclaré de co-infection leishmaniose / Sida en Algérie a été rapporté par Ammar-Khodja en 1985 (Harrat et Belkaid, 2002). Il s'agit d'une leishmaniose cutanée étendue associée au Sida diagnostiquée chez un patient originaire de Bou Saada. Quelques années plus tard, trois cas de LC chez 3 immunodéprimés, dont un associé au Sida, ont été rapportés. Pour les deux autres, l'un était un greffé rénal sous immunosuppresseurs et le deuxième étant un enfant immunodéprimé. Les manifestations cliniques sont des lésions graves extensives pouvant toucher les muqueuses et dont l'évolution est lente avec possibilités de récurrences (Khalida, 2017).

I.3.6. - Cycle parasitaire

Ce titre met en évidence le cycle de vie du parasite de par ses différentes phases de développements chez l'insecte ou chez l'hôte mammifère.

I.3.6.1. - Phase extracellulaire (développement chez l'insecte)

Lors d'un repas sanguin, une femelle phlébotome peut ingérer des parasites présents dans le derme de l'hôte vertébré en aspirant des macrophages infectés (Mokni, 2019). Dans la lumière intestinale (Moulinier, 2003), les parasites passent de la forme amastigote à la forme promastigote, en se multipliant activement (PetitDidier, 2015).

I.3.6.2. - Phase intracellulaire (développement chez l'hôte mammifère)

Dans un premier temps, le phlébotome contamine un autre vertébré (hôte définitif) par piqûre, les promastigotes sont régurgités dans la peau, qui est donc la principale porte d'entrée (Mokni, 2019).

Dès la pénétration intracellulaire, ces parasites, sous la forme de promastigotes, vont infecter les macrophages, qui représentent les cellules hôtes définitives du parasite. Après phagocytose

des parasites par le macrophage, les promastigotes se différencient en amastigotes et se divisent activement. La multiplication des formes amastigotes (Figure 06) aboutit à l'éclatement de la cellule hôte (PetitDidier, 2015).

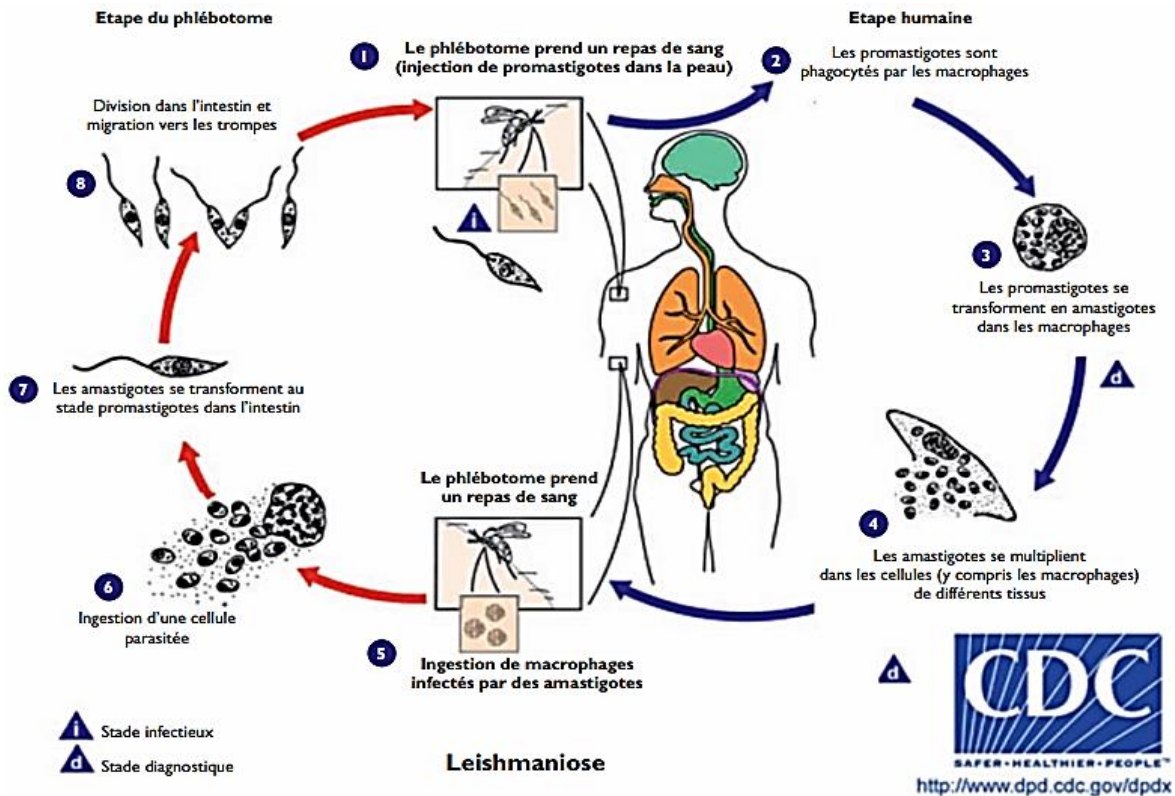


Figure 06 - Cycle parasitaire de *Leishmania* (Galluzzo, 2013).

I.4. – Réservoirs

Les leishmanies ont un spectre d'hôtes très large incluant des espèces sauvages, domestiques (Papierok et *al.*, 2008). Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates, ...etc (Djezzar, 2007), dans ce cas, la leishmaniose est dite zoonotique. Lorsque l'homme est l'unique réservoir du parasite, elle est dite anthroponotique (Buffet, 2011).

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet comme réservoir le chien. En effet, Dedet et *al.*, 1977 ont déduit que 11,4% des chiens de la grande Kabylie étaient atteints de la LV. Récemment, le chacal a fait son apparition comme étant un réservoir de *L. infantum* (Bessa et *al.*, 2012).

Leishmania infantum MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en grande Kabylie (Algérie).

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages. Le premier découvert est naturellement infesté par *L. major* au niveau du foyer de M'Sila, le *Psammomys obesus*, et le second, *Meriones shawii*, au niveau du foyer de Ksar chellala (Belazzoug, 1986).

I.5. - Diagnostic de leishmaniose cutanée

Il est évoqué à partir des caractéristiques cliniques de la lésion, de la notion de séjour en pays d'endémie et de la résistance aux traitements antiseptiques ou antibiotiques (Saurat et *al.*, 2004).

I.5.1. - L'examen direct après coloration

Il se fait sur les frottis par raclage de la lésion en bordure, de la face interne de l'ulcération sur sa périphérie jusqu'à ce qu'il soit légèrement teinté de sang, les prélèvements par ponction du nodule à la seringue, sur des coupes histologiques. Les frottis seront colorés par Giemsa après fixation par May Grünwald puis observés sous microscope photonique au Gx100. Les corps de leishmanies se trouvent groupés à l'intérieur des macrophages ou en apparence libre (Keita, 2005). L'identification formelle nécessite la visualisation d'un noyau, d'un kinétoplaste et d'une membrane de plasma sur deux formes 19 Le diagnostic parasitologique distinctes (W.H.O., 2014). Le diagnostic de la leishmaniose viscérale nécessite des prélèvements profonds (frottis médullaire). Alors que dans la LC, le prélèvement est superficiel au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion (Lelievre et *al.*, 1999).

I.5.2. - Culture

La culture est surtout pratiquée le milieu Novy Neal-Nicolle (NNN). Cette culture doit être conservée entre 22-26°C pendant 10 jours. Pour éviter la pullulation des microbes banaux, on maintient la température à 16°C. Actuellement l'ajout de 1250 UI de pénicilline par millilitre (ml) permet d'obtenir des cultures presque pures sans repiquage, tout en maintenant celles-ci à la température optimale de 22°C (Keita, 2005). Les promastigotes ont une forme allongée, unicellulaire, de 10-20 µm de long, 2-3 µm de large et sont mobiles. La longueur du flagelle est de 10-20 µm (W.H.O., 2014).

I.6 - Prophylaxie

Les leishmanioses posent depuis longtemps un grave problème de santé publique dans certains pays (Depaquit et Léger, 2017), sa transmission est perpétuée par un système biologique complexe impliquant l'hôte humain, le parasite, le phlébotome vecteur et dans certains cas, un réservoir animal (OMS, 2011). En luttant plus efficacement contre la maladie, on réduit à la fois la morbidité et la mortalité. On réduit également le rôle de l'être humain en tant que réservoir dans les cycles anthroponotiques et l'on peut éviter que la maladie n'évolue vers les formes cutanées compliquées (OMS, 2006).

L'enlèvement des plantes chénopodiacées, nourriture exclusive de *P. obesus* autour des habitations sur un rayon de 300 à 500 mètres, assure une protection contre le risque de transmission (Cherif et *al.*, 2012).

La lutte contre les vecteurs constitue l'un des volets de la prophylaxie. Pour déterminer quelle est la meilleure stratégie, il est essentiel d'étudier le cycle du parasite dans les conditions locales (Marinkelle, 1981). L'utilisation des pulvérisations d'insecticides et surtout les moustiquaires et les rideaux imprégnés de pyréthriinoïdes qui ont donné de bons résultats, notamment dans la lutte contre la leishmaniose cutanée à *L. tropica* (Depaquit et Léger, 2017). Dans le cas des foyers de leishmaniose à *L. infantum*, dans lesquels les chiens constituent le principal réservoir, la protection des chiens vis-à-vis des piqûres de phlébotomes à l'aide de colliers ou de solutions rémanentes d'insecticides s'est révélée particulièrement efficace (Depaquit et Léger, 2017)

Un diagnostic précoce et un traitement rapide et efficace permettant de réduire la prévalence de la maladie, de faire reculer la transmission et la propagation de la maladie. Il existe actuellement des médicaments très efficaces et sûrs contre la leishmaniose, en particulier contre sa forme viscérale. Ainsi une surveillance efficace de la maladie est importante pour assurer un suivi et une intervention rapides en cas d'épidémies ou en présence de taux élevés de létalité sous traitement.

Les activités de mobilisation et la sensibilisation de la communauté à la maladie, la disponibilité des services, le renforcement des capacités des cliniciens et des agents de santé, et des données de surveillance précises dans les pays à forte charge de morbidité, permet d'améliorer la détection précoce, la prise en charge et l'issue du traitement (OMS, 2020).

I.7. - Répartition des leishmanioses

La répartition géographique des leishmanioses s'est faite en deux parties, une dans le monde et l'autre dans l'Algérie.

I.7.1. - Dans le monde

Il s'agit d'une maladie des zones intertropicales et tempérées chaudes (Aarab, 2018), répartis en cinq foyers : Méditerranéen, Chinois, Indien, Africain et Latino-Américain.

D'après l'OMS, 350 millions de personnes sont exposées aux risques de contracter une leishmaniose (Reithinger et *al.*, 2007) et 12 millions de sujets sont actuellement atteints dans le monde (Sharma et Singh, 2008). 2 millions de nouveaux cas sont répertoriés chaque année, avec une incidence d'environ 1,5 millions de cas par an pour la LC et de 0,5 millions de cas par an pour la LV (Frahtia, 2015).

Plus de 90 % des cas de LV signalés dans le monde proviennent de l'Inde, du Soudan, du Bangladesh et du Brésil. De même, plus de 90 % des formes cutanées proviennent de 6 pays : l'Afghanistan, l'Iran, l'Arabie Saoudite, la Syrie, le Brésil et le Pérou (Coosemans et Van Gompel, 1998).

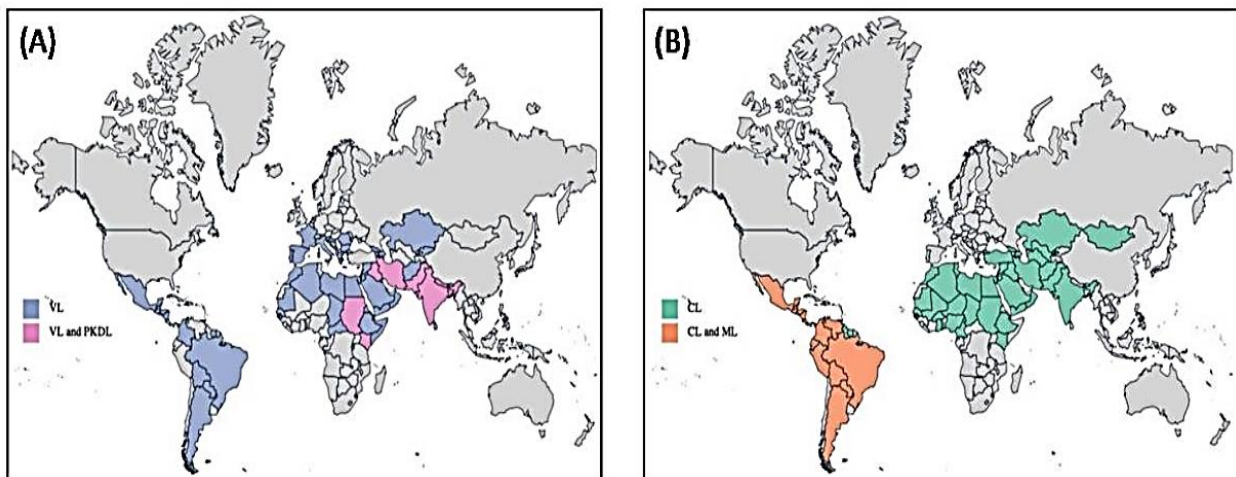


Figure 07 - Répartition géographique des leishmanioses : (A) leishmaniose viscérale et dermique post kala-azar (PKDL), (B) leishmaniose cutanée (LC) et cutanéomuqueuse (LCM) (PetitDidier, 2015).

I.11.2. - En Algérie

L'Algérie, par sa situation géographique, est caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques et par sa forte population rurale, présente un terrain favorable à l'émergence de plusieurs formes cliniques de la maladie (Bachi et *al.*, 2019).

Deux types de leishmanioses sévissent à l'état endémique en Algérie : la LC et la LV. Elles rentrent dans des complexes épidémiologiques différents, faisant intervenir des vecteurs et des réservoirs de parasites bien distincts (Djezzar, 2007).

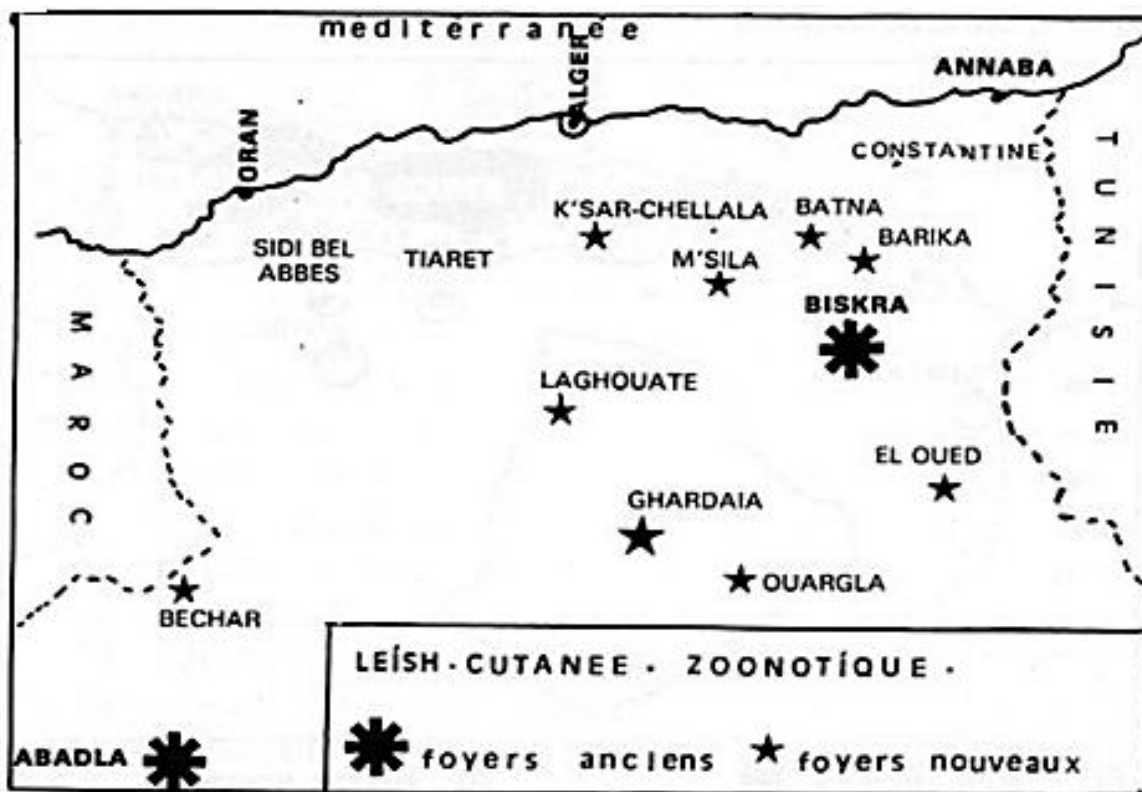


Figure 08 - Répartition de la Leishmaniose cutanée zoonotique en Algérie (Harrat et al., 1995).

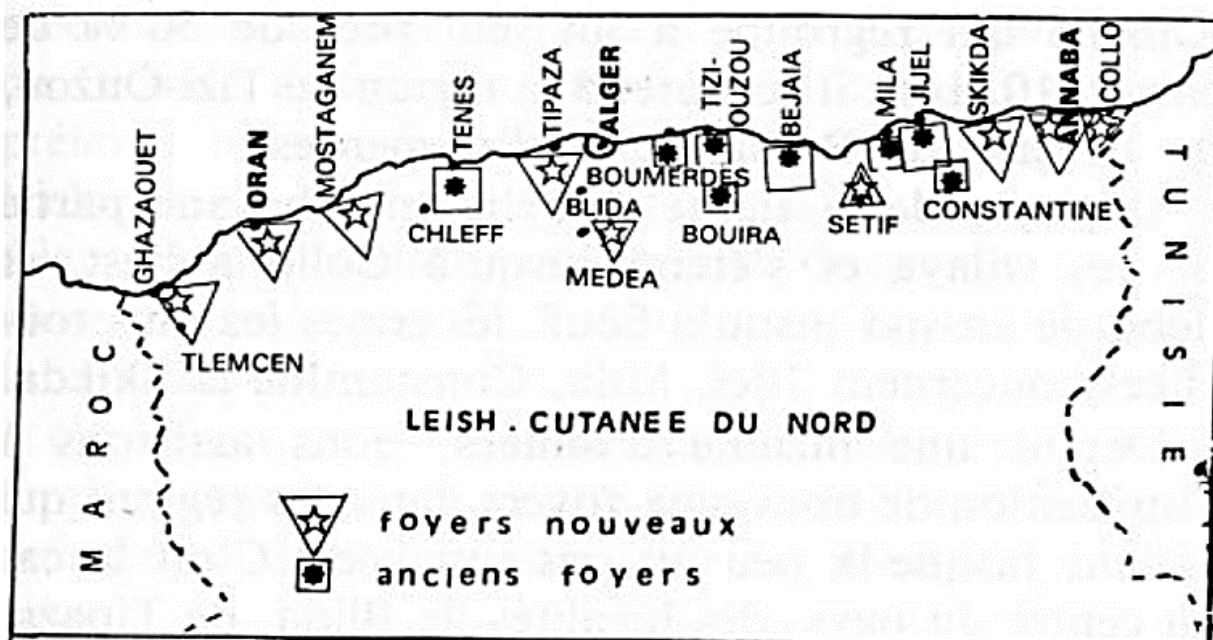


Figure09 - Répartition de la Leishmaniose cutanée du nord en Algérie (Harrat et al., 1995)

La leishmaniose viscérale s'étend sur toute la partie nord au niveau des étages bioclimatiques humide et subhumide. D'un autre côté, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi

arides et arides connues pour être des foyers de LCZ (Frahtia, 2015). En effet, 71 cas de LV ont été signalés aux niveaux de CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009, La majorité des malades provenaient du nord du pays, et d'autres cas sont également apparus à Tizi-Ouzou, Sétif, Boumerdès, Chlef, Tissemsilt, Médéa, Ain Defla, Bordj-BouArreridj, Bouira, Bejaïa, Tipaza, Sétif, Blida, et Relizane. Certains d'autres habitaient les wilayas du sud du pays : Tiaret, Ouargla, Adrar, Laghouat, Biskra et M'Sila (Zait, 2012).

The background features three decorative orange circles of varying sizes, each composed of multiple overlapping outlines. Two thin orange lines cross the page diagonally, one from the top-left to the bottom-right, and another from the top-right to the bottom-left, intersecting near the center. The text is centered between these lines.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II - Matériels et méthodes

Ce chapitre développe plusieurs points à commencer par la mise en évidence de la zone de capture des rongeurs du genre gerbilles puis la réalisation d'une identification morphologique et moléculaire sur eux et finir avec une infection expérimentale sur ces même rongeurs qui a été réalisée avec la souche *Leishmania major* au sein du laboratoire, d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), afin de tester leur sensibilité à développer la maladie.

II.1 - Identification morphologique et moléculaire des rongeurs

Identifications morphologique et crânienne sont faites à l'aide de pied à coulisse et une identification moléculaire réalisée à partir de crottes des gerbilles.

II.1.1 - Zone de capture des rongeurs

Le village Imihrou est situé à 170 km au sud du chef-lieu de la wilaya d'Illizi. Cette région est caractérisée par un climat saharien très aride. La température atteint 45°C à l'ombre et chute à 25°C la nuit, avec une humidité relative de 15%. Les habitants qui sont des nomades vivent dans des huttes construites avec des pierres et des feuilles de palmiers (Figure 10).



Figure 10 -Vue générale du village Imihrou.

En 2020, des rongeurs ont été capturés dans la région d'Imihrou wilaya d'Illizi près des habitations humaines au bord d'Oued (Figure 11 A) en utilisant des pièges Sherman (Figure 11 B) (Jutras, 2005) par les agents de l'établissement public pour la santé de proximité (EPSP) durant trois nuits consécutives à la suite de l'apparition d'un cas de leishmaniose cutanée chez

une femme qui n'a pas quitté son village durant toute l'année, ce qui suscite une infection autochtone. Les rongeurs ont été envoyés par un convoyeur, les animaux ont été mis en quarantaine avant de les intégrer dans l'animalerie avec les autres animaux.

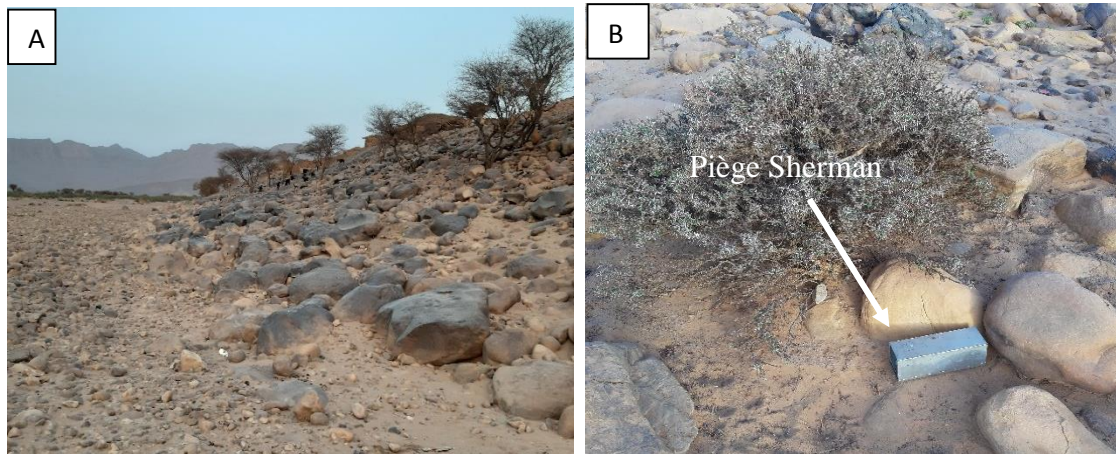


Figure 11–Station d'étude et piège Sherman au niveau du lit de l'Oued.

II.1.2 - Identification morphologique

Cette identification s'est faite en deux parties, la morphométrie corporelle et la morphométrie des ossements

II.1.2.1 - Morphométrie corporelle

Les rongeurs un par un ont été anesthésiés pendant 1 minute dans un récipient contenant un morceau de coton imbibé d'éther. Une fois l'animal endormi et après le sexage, le rongeur est allongé sur une plaque de polyester pour mesurer la queue, le corps (tête et abdomen) et la patte arrière sont prises (Figure 12) suivant les critères d'identification de Granjon (2009), à l'aide d'un pied à coulisse.

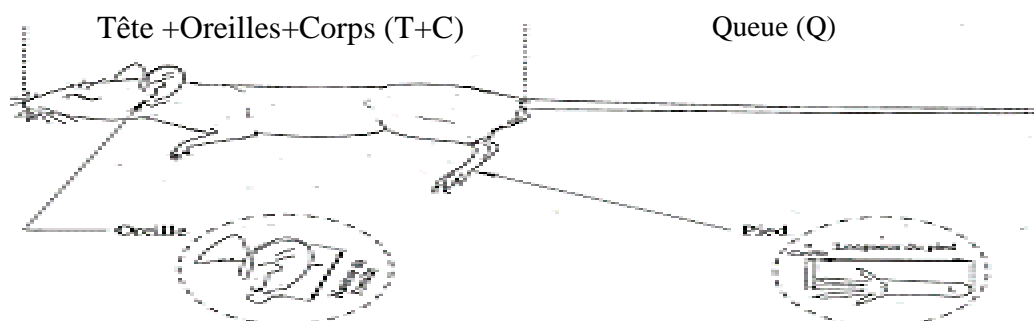


Figure 12 - Mensurations morphométriques prises sur les rongeurs (Beregere, 2003).

II.1.2.1.1. - Morphométrie des ossements

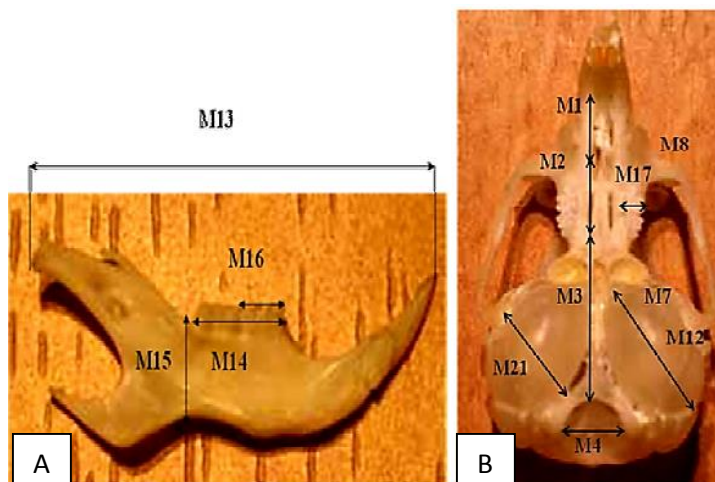
Les crânes ont été récupérés, bouillis et débarrassés de toute la chair qui les couvre pour effectuer les mensurations craniométriques. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un pied à coulisse électronique (Figure 13).



Figure 13 - Préparation des crânes et prise de différentes mensurations.

II.1.2.3. - Mensurations crâniennes et dentaires

Les mesures crâniennes ont été faites sur plusieurs compartiments du crâne suivant Berengere (2003) (Figure 14).



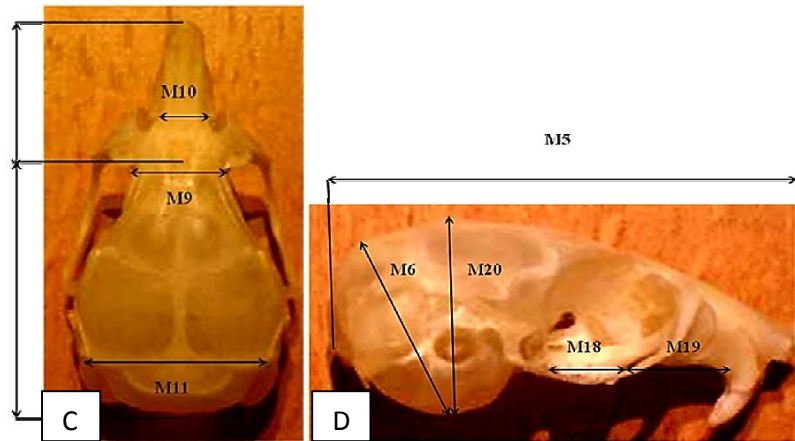


Figure 14 - Mensurations crâniennes prises sur les *Gerbillus* sp (Berengere, ,2003).

A: Mandibules, **B:** Vue ventrale, **C:** Vue dorsale, **D:** Vue latérale.

M.1: Longueur du foramen incisif.

M.2: Longueur du palais entre la partie postérieure du foramen incisif et le basi-sphénoïde. M.3: Longueur arrière crânienne entre le basi-sphénoïde et le bord antérieur du foramen magnum.

M.4: Largeur du foramen magnum.

M.5: Longueur maximale du crâne entre le nasal et l'occipital.

M.6: Hauteur maximale du crâne entre l'extrémité de la bulle tympanique et l'interpariétal.

M.7: Longueur de la bulle tympanique entre l'extrémité antérieure de la bulle et le processus paramastoïde.

M.8: Longueur maximale du rostre.

M.9: Largeur maximale du rétrécissement inter-orbitaire.

M.10: Largeur du rostre.

M.11: Largeur du crâne au niveau de l'extrémité postérieure des pariétaux.

M.12: Longueur du crâne entre l'extrémité postérieure du rostre et l'extrémité postérieure de l'interpariétal.

M.13: Longueur de la mandibule entre l'extrémité de l'incisive et le processus articulaire.

M.14: Longueur de la rangée des molaires inférieures.

M.15: Hauteur de la mandibule.

M.16: Longueur de la première molaire M1 inférieure.

M.17: Largeur de la M1 supérieure.

M.18: Longueur de la rangée des molaires supérieures.

M.19: Longueur du diastème.

M.20: Hauteur entre le haut du crâne et un plan défini par les bulles tympaniques et les incisives supérieures.

M.21: Largeur de la bulle tympanique entre le canal auditif et le processus paramastoïde (Berengere, ,2003).

II.1.3 - Identification moléculaire

Différentes étapes ont été respectées pour faire l'identification moléculaire, d'abord l'extraction d'ADN ensuite la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis la visualisation des produits de PCR et enfin le séquençage et la construction d'arbre phylogénique.

II.1.3.1 - Extraction d'ADN

L'ADN des rongeurs a été isolé à partir des fèces à l'aide de kit d'extraction Qiagen suivant le protocole fourni par le fournisseur. En bref, 25 mg de crotte de chaque spécimen est placée dans un tube Eppendorf contenant 200 µl de tampon TE 1X puis broyée à l'aide d'une tige en plastique stérile. Une fois la dilacération maximale est observée, 180 µl de tampon ATL, 20µl de PK (protéinase K) et 20 µl d'ARNase sont ajoutés. Le mélange est par la suite incubé à 37°C dans un bain marie durant toute une nuit ou à 56°C minimum 1 heure. Une fois l'incubation terminée, 200 µl de tampon AL sont rajoutés et incubé à nouveau à 70°C pendant 10 minutes. Les tubes sont récupérés et 200 µl d'éthanol absolu froid sont ajoutés, puis centrifuger 1minute à 8000 tr/min. Les tubes sont centrifugés pendant 1 minute à 8000 tr/min. le surnageant est transféré vers une nouvelle colonne puis centrifuger pendant 01 minute à 8000 tr/min. les éluats sont jetés et 500 µl de solution AW1 sont ajoutés puis recentrifuger pendant 1 minute à 8000 tr/min. Un deuxième lavage avec 500 µl de solution AW2 est réalisé après l'élimination des éluats. Une centrifugation finale pendant 3min à 12000 tr/min à vide est faite pour éliminer toute trace de la solution AW2. Chaque colonne est placée dans un tube nouveau tube Eppendorf stérile et 150 µl de la solution d'éluion est ajoutée et les tubes sont centrifugés pendant 1 minute à 8000 tr/min. les extraits d'ADN sont par la suite conservés à -20°C.

II.1.3.2 - La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) séquençage

La PCR est une technique moléculaire qui une enzyme polymérase pour amplifier un fragment d'ADN cible à l'aide d'amorces spécifique à la région d'intérêt en millier de copies afin de le visualiser sur un gel d'agarose.

Cette technique, grâce aux propriétés physicochimique de la molécule d'ADN, se déroule en trois phases : la dénaturation, hybridation et élongation.

- **La phase de dénaturation** : consiste à chauffer l'extrait d'ADN à 95°C ce qui permet la séparation de la double hélice d'ADN en deux chaînes.
- **La phase d'hybridation** : consiste à baisser la température ce qui permet aux amorces de s'accrocher à leurs cibles sur chaque chaîne pour amorcer la synthèse des régions cibles.
- **La phase d'élongation** : consiste à ramener la température à 72°C pour permettre à l'enzyme ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire de chaque amorce. Les trois phases sont répétées au moins 33 fois afin d'obtenir un nombre suffisant d'amplicons pour la visualisation sur un gel d'agarose.

Pour notre étude, deux paires d'amorces ont été utilisées. Une paire d'amorce pour l'identification d'espèce des rongeurs ciblant le gène cytochrome B (CytB) de l'ADN mitochondrial (Tableau 02). La deuxième paire d'amorce ITS1 ciblant l'espace intergénique du gène ribosomal pour la détection du parasite *Leishmania* sp chez les rongeurs avant leur infection expérimentalement (Tableau 03), afin de vérifier qu'ils sont indemnes d'une infection antérieure par le parasite de la leishmaniose.

Tableau 02 – Protocole expérimental CytB (Ali Oshaghi, 2016).

Réactifs	Volume pour l'échantillon	Profil thermique	Phases
H ₂ O	6 µl	95°C → 5 min	1 ^{ère} dénaturation
Amorce sens	1 µl [10µM] initial		36 cycles
Amorce antisens	1 µl [10µM] initial	95°C → 30 sec	Dénaturation
Master Mix	10 µl	58°C → 50 sec	Hybridation
ADN	2µl	72°C → 40 sec	Elongation
Volume total	20µl	72°C → 10' min	Elongation finale

Master mix : Contient de l'ADN polymérase, des désoxyribonucléotides triphosphate A, G, C, T (DNTP), MgCl₂ et le tampon de la réaction. Amorce sens

F: 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' et

AntisensR: 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

Amorce sens F : 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'et

antisens R : 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'

Tableau 03 - Protocole expérimentale ITS1 (E1 Tai et al, 2000).

Réactifs	Volume pour l'échantillon	Profil thermique	Phases
H ₂ O	6 µl	95°C → 5 min	1 ^{ère} dénaturation
Amorce sens	1 µl [10µM] initial		36 cycles
Amorce antisens	1 µl [10µM] initial	95°C → 30 sec	Dénaturation
Master Mix	10 µl	58°C → 50 sec	Hybridation
ADN	2µl	72°C → 40 sec	Elongation
Volume total	20µl	72°C → 10' min	Elongation finale

II.1.3.3 - Visualisation des produits PCR

Pour la visualisation des produits d'amplification d'une électrophorèse (Annexe II) horizontale sur gel d'agarose à 1.5% a été réalisée. 1.5 g d'agarose sont dissouts dans 100ml de TAE 1x concentré et chauffé dans un micro-onde. Une fois l'agarose complètement dissout, 5µl de bromure d'éthidium (BET) (Annexe I) sont ajoutés. La solution d'agarose est par la suite versée dans un moule contenant un peigne pour la polymérisation du gel.

5µl du produit PCR de chaque échantillon sont mélangé avec 5µl du bleu de bromophénol puis sont déposés dans les puits, les trois derniers puits sont réservés pour le témoin positif, le témoin négatif et le marqueur de poids moléculaire. Les produits sont laissés migrer pendant 45 minutes sous une tension de 80 V.

II.1.3.4 - Séquençage et construction d'arbre phylogénique

Le séquençage des produits PCR s'est fait par la méthode Sanger qui consiste à séquencer chaque brin d'ADN seul (sens et antisens) en utilisant les mêmes amorces utilisées pour la réaction d'amplification PCR.

II.1.3.4.1 – Principe

La méthode de Sanger reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires dont le principe est :

À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique à celle utilisée pour la PCR, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce. De l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', cette enzyme ajoute les désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) complémentaires et de manière aléatoire des didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) marqués par quatre fluorophores différents. Chaque fragment sera excité par un laser et le signal obtenu est analysé par un logiciel spécifique. Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase arrête la polymérisation et l'extension du brin d'ADN, en effet, le didésoxyribonucléotides ne possède pas de groupement 3-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme, ce qui engendre l'obtention de fragments de taille différente (Lamoril et al, 2008).

II.1.3.4.2 - Protocole expérimental

Les échantillons présentant des bandes nettes et sans trainées sur le gel d'agarose sont sélectionnés pour la réaction de séquençage. Les échantillons sont tout d'abord purifiés pour éliminer le reste du milieu réactionnel (amorce, dNTP), 5µl de chaque produit PCR sont incubés avec 2µl de l'enzyme ExoSap (Annexe II) à 37°C pendant 15 minutes puis à 85°C pendant 15 minutes. Une fois purifiés, une deuxième amplification génique dite réaction de PCR- séquençage est réalisée. Chaque produit est amplifié en utilisant chaque amorce à part afin de séquencer chaque brin seul dans un seul sens.

Tableau 04 - Protocole expérimentale PCR, séquençage (amorce sens)

Réactifs	Volume pour 1 échantillon	Profil thermique	
Déionisée H ₂ O	5,5 µl	96°C → 1 min	1 X
Amorce sens	0,5 µl [10µM] initial	96°C → 10 sec	25 X
Tampon	1 µl	50°C → 5 sec	
BigDye Terminator v3.1	2 µl	60°C → 4 min	
ADN	2µl		
Volume total	10µl		

Tableau 05 - Protocole expérimentale PCR, séquençage (Amorce antisens)

Réactifs	Volume pour 1 échantillon	Profil thermique	
Déionisée H ₂ O	5,5 µl	96°C → 1 min	1 X
Amorce antisens	0,5 µl [10µM] initial	96°C → 10 sec	25 X
Tampon	1 µl	50°C → 5 sec	
BigDye Terminator v3.1	2 µl	60°C → 4 min	
ADN	2µl		
Volume total	10µl		

Les produits post PCR-séquençage sont purifiés une deuxième fois en utilisant les colonnes de sephadex g50. 200 µl de sephadex g50 sont mise dans les colonnes puis centrifugé à 1200 tr/min pendant 1 minute. Les éluas sont éliminés et 400 µl de sephadex g50 sont déposés à nouveau et centrifugés à la même vitesse. 10µl de Rnase free H₂O sont mélangés avec chaque échantillons et déposés dans les puits de la colonne pour une dernière centrifugation à 1200 tr/min. les éluas sont ensuite introduits dans le séquenceur pour analyse.

Les résultats issus du séquenceur sont ensuite édités avec le logiciel BioEdit (Hall, 1999) afin d'analyser la qualité du séquençage et enlever les séquences d'amorces. Chaque séquence est ensuite blastée dans la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences des rongeurs ainsi que les séquences des blasts sont ensuite analysées avec le logiciel Mega version 10.1.7 pour l'alignement et la construction d'arbre phylogénique.

II.2 - Infection des rongeurs

L'infection des rongeurs a suivi un protocole spécifique citer comme ceci, revitalisation des parasites, monitoring et récoltes des parasites revitalisés, infection expérimentale des gerbilles et Balb/c, comptage des parasites dans les cultures et pour l'inoculum, inoculation des parasites en intradermique des oreilles et suivi de l'évolution de l'infection.

II.2.1 - Revitalisation de la souche de parasite *Leishmania major*

La souche *Leishmania major* MHOM/DZ/09/LIPA100/09/MON-25 provient de la cryobanque du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). Cette souche est originaire d'un patient de M'Sila. Pour restaurer la virulence de cette

souche et avoir une souche avec un statut P0, nous avons réinjecté à nouveau la souche chez des souris Balb/c au niveau de la patte arrière. Elle a été décongelée avant son utilisation par chauffage à 37°C dans un bain marie, puis directement ensemercer dans le milieu Novy McNeal, Nicolle (NNN) (Annexe I). Un examen microscopique entre lame et lamelle est fait pour vérifier l'état des parasites ainsi que d'éventuelle contamination.

Une fois les parasites ont atteint la phase stationnaire de croissance, les cultures sont centrifugées à 2500 rpm pendant 10 min à 26°C et les parasites re-suspendus dans un tube conique contenant de l'eau physiologique 0,9% stérile. Les parasites sont lavés 3 fois avec de l'eau physiologique 0,9% stérile.

Par la suite, cinq souris Balb/c sont infectées au niveau de la patte arrière par l'injection intradermique de la suspension parasitaire contenant des formes promastigotes.

II.2.2 - Monitoring et récolte des parasites revitalisés

Après quatre semaines post-infection, la patte infectée des souris Balb/c est grattée à l'aide d'une aiguille stérile. A l'aide d'une seringue de 5 ml stérile contenant 1 ml d'eau physiologique 0,9% stérile supplémentée d'antibiotiques (Pénicilline 1.000.000 UI et streptomycine 1 mg/ 5ml), les parasites présents dans le sang au niveau des lésions sont aspirés et ensemercés sur milieu NNN et incubés à 25°C. Après une semaine, les parasites d'une partie des cultures sont transférés dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Annexe I) supplémenté de 20% sérum de veau fœtal (SVF) pour atteindre la phase stationnaire de croissance (phase plateau), correspondant à la présence des formes promastigotes métacycliques infectant.

La deuxième partie des cultures sont destinées à la conservation dans de l'azote liquide (cryoconservation).

La cryoconservation permet de conserver les cellules de façon viable à ultra-basse température (Kemouch, 2017)

La deuxième partie des cultures parasitaires sont collectées dans un seul tube et centrifugées. Le culot, puis le milieu de culture supplémentaire est éliminé. Trois volumes de la suspension parasitaire (culot) mélangé dans un volume de DMSO à 5%, qui est un agent protecteur destiné à éviter la création des dommages intracellulaires durant le processus de congélation (Grondin, 2008). L'ensemble est réparti en cryotube, puis congeler. La congélation est faite étape par étape.

1h à +4C° → 1h à -20°C → 24h à -80°C → Azote liquide à long terme.

II.2.3 - Infection expérimentale des rongeurs et Balb/c

Les cultures dont les parasites ont atteint la phase de promastigotes métacycliques infectant subissent 3 lavages successifs à l'eau physiologique stérile à 0.9 %, après centrifugation à 2500 tour pendant 10 minutes à 26 °C.

II.2.4. - Comptage du nombre et différentes formes de parasites *Leishmania* dans l'inoculum

II.2.4.1. - Comptage des différentes formes de parasites dans les cultures

Une fois les cultures lavées et homogénéisées, un frottis au Giemsa des parasites a été réalisé afin de faire le comptage des différentes formes des parasites présentes dans la suspension parasitaire sous microscope optique dans cinq champs différents suivant (Sádlová et al., 2010).

II.2.4.2. - Comptage des parasites pour l'inoculum

Après les trois lavages, les parasites sont re-suspendus dans 1 ml d'eau physiologique 0,9%. 10 µl de la suspension est mélangé avec 10 µl de formol à 10% et 10 µl de Bleu de Trypan à 0.04%. Le mélange est déposé dans la cellule THOMA pour le comptage. Les parasites sont comptés dans 6 différents champs en formant la lettre Z (figure 15).

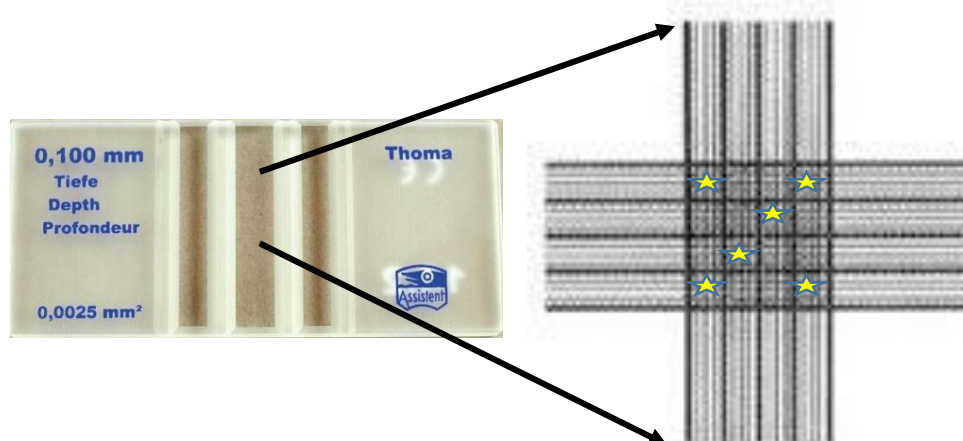


Figure 15 - Champs de comptage de la cellule THOMA.

Le nombre de parasites présents dans la solution est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Nbre de parasites} = (\text{nombre total des parasites comptés} / 6) * 3 * 16 * 10^4$$

3 : le facteur de dilution ;

16 : le nombre total des champs présent dans la cellule THOMA ;

10^4 : facteur pour revenir à 1 ml de solution car la cellule contient un volume de 0.1 μ l.

Une fois les parasites comptés, la suspension est ajustée à 10^6 parasites /ml ce qui représente 1 million de parasite par ml de solution.

II.2.6 - Inoculation des parasites dans le pavillon de l'oreille

Un nombre minimum d'animaux pour produire des résultats statistiquement reproductibles a été utilisé, 05 rongeurs et 05 souris Balb/c comme témoins positives. Dix seringues type insuline à usage unique ont été préparées. Chaque seringue contenait une unité (100 μ l) de la suspension parasitaire. Les animaux sont préalablement anesthésiés par de l'éther afin de faciliter leur manipulation. La mensuration de l'épaisseur des oreilles avant infection a été enregistrée pour chaque rongeur. Par voie intradermique au niveau du pavillon interne de l'oreille gauche ou droite, 10 μ l de la suspension parasitaire ont été injectées correspondant à une charge parasitaire de 10^4 parasite/ml. Les animaux ont été remis dans les cages et nourris à volonté dans une ambiance de 25°C et une photopériode de 12h/12h (lumière et d'obscurité).

II.2.7 - Suivi de l'évolution de l'infection (monitoring)

Durant 13 semaines post-infection, un monitoring hebdomadaire est effectué sur l'ensemble des rongeurs (Balb/c et gerbilles). A l'aide d'un pied à coulisse électronique, la taille des indurations sont mesurées et des prises de photos de l'oreille infectée ont été effectuées sur chaque souris au niveau des lésions pour mieux visualiser et suivre le développement de l'infection.

II.3 - Exploitation des résultats par les analyses statistiques

L'analyse statistique des différentes indurations observées entre *G. nanus* et Balb/c s'est faite par le test non paramétrique Mann Whitney avec le logiciel GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad, San Diego, California, USA). Le test est considéré comme significatif si $P < 0.05$, le graphe de l'évolution des indurations a été réalisé avec le logiciel Microsoft Office Excel 2013.

The page features a decorative design with three sets of concentric orange circles. One large set is in the top right, a smaller set is in the middle right, and another large set is in the bottom right. Two thin orange lines originate from the top left and extend towards the middle-right circles, and another line extends from the top left towards the bottom-right circles.

Chapitre III

Résultats et discussions

III - Résultats et discussions

Ce chapitre met en avant les résultats obtenus lors des identifications corporelles, crâniennes, dentaires et moléculaires sur des gerbilles, dans un premier temps puis par la suite, la souche *Leishmania major* MHOM/DZ/09/LIPA100/09/MON-25 a été utilisée pour tester la sensibilité des rongeurs collectés à Illizi aux parasites *Leishmania* et pour fournir des données préliminaires sur le rôle possible que pourrait jouer cette espèce dans le maintien et la dissémination des parasites dans la nature. L'infection expérimentale a été effectuée dans le laboratoire sur cinq spécimens capturés en 2020, en plus sur des souris Balb/c sensibles aux parasites *Leishmania* qui ont servi comme control positif de l'expérimentation.

III.1. – Identification morphologique et moléculaire des rongeurs

L'identification des rongeurs a été faite avec trois différentes méthodes représentées comme suit, morphométrie corporelle, morphométrie des ossements et l'identification moléculaire, pour la confirmation des espèces des rongeurs piégés.

III.1.1. – Morphométrie corporelle

L'étude de la morphologie corporelle nécessite la prise d'un ensemble de mensurations du corps du rongeur capturé comme le montre le tableau suivant (Tableau 06).

Tableau 06 – Mensurations corporelles des Gerbilles échantillonnés dans la région d'Illizi (Algérie) durant l'année 2020 - 2021 (les mesures sont en millimètre).

	Corps + Têtes	Oreille	Queue	Patte postérieures	Poids (g)
Rongeur n°2	85	11	75	25	25
Rongeur n°3	83	12	112	23	18
Rongeur n°4	145	15	110	35	45
Rongeur n°5	82	11	111	22	19
Rongeur n°6	100	13	110	22	22

Chez les gerbilles les valeurs obtenues révèlent que le corps et la tête font entre (82 à 100 mm) et les oreilles font entre (11 à 13 mm). La queue entre (75 à 112 mm), les pattes postérieures sont entre (22 à 25 mm). Le poids est entre 18 à 25 g. Ces mensurations correspondent aux

résultats trouvés chez l'espèce *G. nanus*. Les mêmes résultats sont mentionnés à l'ouest de la Mauritanie par Berengere (2003) qui note que la longueur moyenne du corps de *G. nanus* est de 72,8 mm, alors que la queue n'est que de 111,9 mm. Les pattes postérieures atteignent 20,3 mm, et l'oreille mesure 10,9 mm. De même pour Hadjoudj (2017) dans les stations d'Oued Righ révèle que la taille moyenne du corps de *G. nanus* est de $70,64 \pm 7,98$ mm. Celle de la queue est supérieure à la taille du corps elle fait en moyenne $116,5 \pm 7,26$ mm. La longueur moyenne des oreilles est de $7,77 \pm 0,98$ mm. La patte postérieure a une longueur égale à $22,05 \pm 1,26$ mm et la poids moyen est de $15,41 \pm 2,11$ g. Les valeurs mentionnées dans la présente étude corroborent de celle de Berengere (2003) et Hadjoudj (2017).

Pour le rongeur N°4 la tête et le corps font 145 mm. La queue fait 110 mm. Sa patte postérieure fait 35 mm, et pour finir la hauteur de l'oreille fait 15 mm. Ces résultats des mensurations correspondent à ceux de *G. pyramidum*. Comme Ahmim, (2019) l'affirme que la tête plus le corps de *G. pyramidum* fait entre 80 à 130 mm. La queue entre 120 à 180 mm. La patte postérieure entre 25 et 37 mm. et en dernier la hauteur de l'oreille qui fait entre 11 et 16 mm.

III.1.2. – Mensurations crâniennes et dentaires

Cette partie s'est faite à l'aide de pieds à coulisse pour les mensurations du crâne suivant (Tableau 07) et d'une loupe pour l'observation des dents des gerbilles.

Tableau07 - Mensurations crâniennes et mandibulaires de gerbilles (les mesures sont en mm).

	Mensurations	Crâniennes
Avant crâne	M1	3,14
	M2	4,63
	M3	7,4
	M4	4,16
	M5	24,54
	M6	9,57
	M7	7,72
	M9	3,83
	M10	2,92
	M11	10,07
	M12	12,83
	Mandibules	M13
M14		3,29
M15		2,72
M16		1,64
Avant crâne	M17	1,25
	M18	4
	M19	5,75
	M20	9
	M21	5,2

Les résultats montrent que pour la taille du crâne (M5) de *Gerbillus nanus* est égale à 24,54 mm celle de l'inter-orbitaire (M9) mesure 3,83 mm. L'avant crâne porte des bulles tympaniques très développées (M7) faisant 7,72 mm. La mâchoire (M13) mesure 13,83 mm. La taille de la rangée molaire (M14) est de 3,29 mm. La taille de la rangée molaire supérieure (M18) est égale à 4 mm. La hauteur du crâne (M20) mesure 5,2 mm. Selon Hadjoudj (2017) lors de ses mensurations crâniennes effectuées sur des *G. nanus* capturées dans les stations d'Oued Righ, la taille moyenne du crâne (M5) est égale à $25,13 \pm 1,13$ mm et celle de l'inter-orbitaire (M9) mesure $4,66 \pm 0,50$ mm. L'avant crâne porte des bulles tympaniques (M7) faisant $8,18 \pm 0,60$ mm. La mâchoire (M13) mesure $13,68 \pm 0,83$ mm de long. Cette partie est pourvue par une rangée molaire dont la longueur (M14) est de $3,25 \pm 3,23$ mm. La taille de la rangée molaire supérieure (M18) est égale à $3,19 \pm 0,21$ mm. La hauteur du crâne (M20) mesure $10,23 \pm 0,47$ mm. Par ailleurs, Bebbba et Baziz (2008) annoncent que la bulle tympanique (M7) est un critère important pour l'identification de *G. nanus* sa longueur varie entre 7,68 et 7,98 mm et la taille du crâne (M5) est petite ($25,25 \pm 0,69$). Les résultats obtenus dans la présente étude sont les mêmes que ceux de Hadjoudj (2017) et de Bebbba et Baziz (2008).

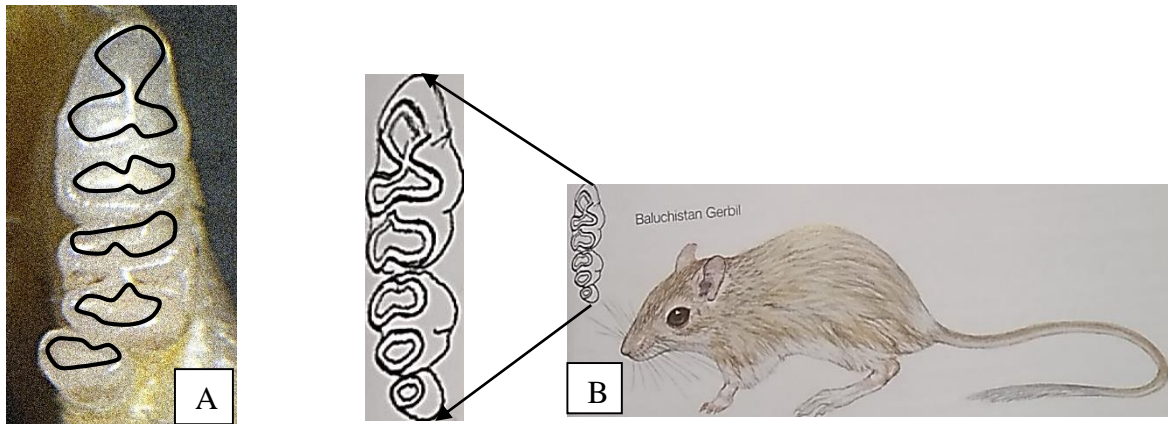


Figure 16 – Empreinte dentaire de *Gerbillus* sp (Figure A). Empreinte de *Gerbillus nanus* (Figure B) (Aulagnier et al., 2008).

III.1.3. – Identification moléculaire

Dans cette partie y'aura visualisation des produits PCR et séquençage puis construction de l'arbre phylogénique.

III.1.3.1. – Visualisation des produits PCR

Le résultat de la PCR présente des bandes bien visibles (1, 2, 3, 4) (Figure 17), signifiant que le résultat est positif. Pour le témoin négatif, le résultat est bien négatif ce qui signifie qu'il n'y a aucune éventuelle contamination survenue au cours du test d'amplification.

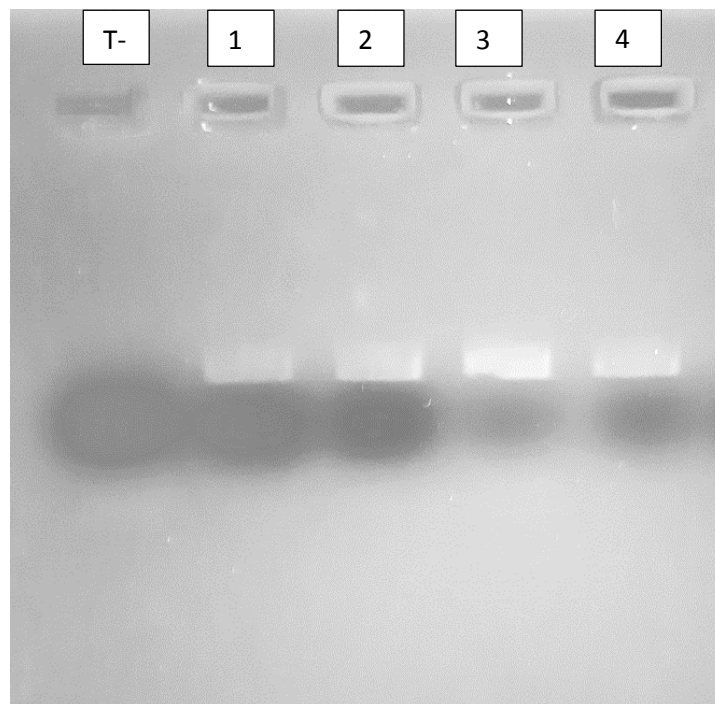


Figure 17 – Résultats de la PCR.

III.1.3.2. - Séquençage et construction d'arbre phylogénique

Les résultats de séquençage des produits PCR des différentes gerbilles ont été édités avec le logiciel BioEdit pour éliminer les séquences d'amorces ainsi que vérifier la qualité du séquençage (Figure 18). Seul les sens « forward » ont été retenus pour l'analyse phylogénétique et le blast des séquences sur NCBI.

Après le nettoyage des séquences sur BioEdit, chaque séquence a été blastée seule dans la base de données NCBI. Le blast et la construction de l'arbre phylogénétique (Figure 19), a permis de classer les rongeurs 2 et 3 et 6 parmi l'espèce *G. nanus* et le rongeur 4 comme étant *G. pyramidum* avec un taux de ressemblance de 99% et 95% respectivement. A noter que l'espèce *G. nanus* et *G. amoenus* sont des espèces sœurs (Meunier et al, 2020).

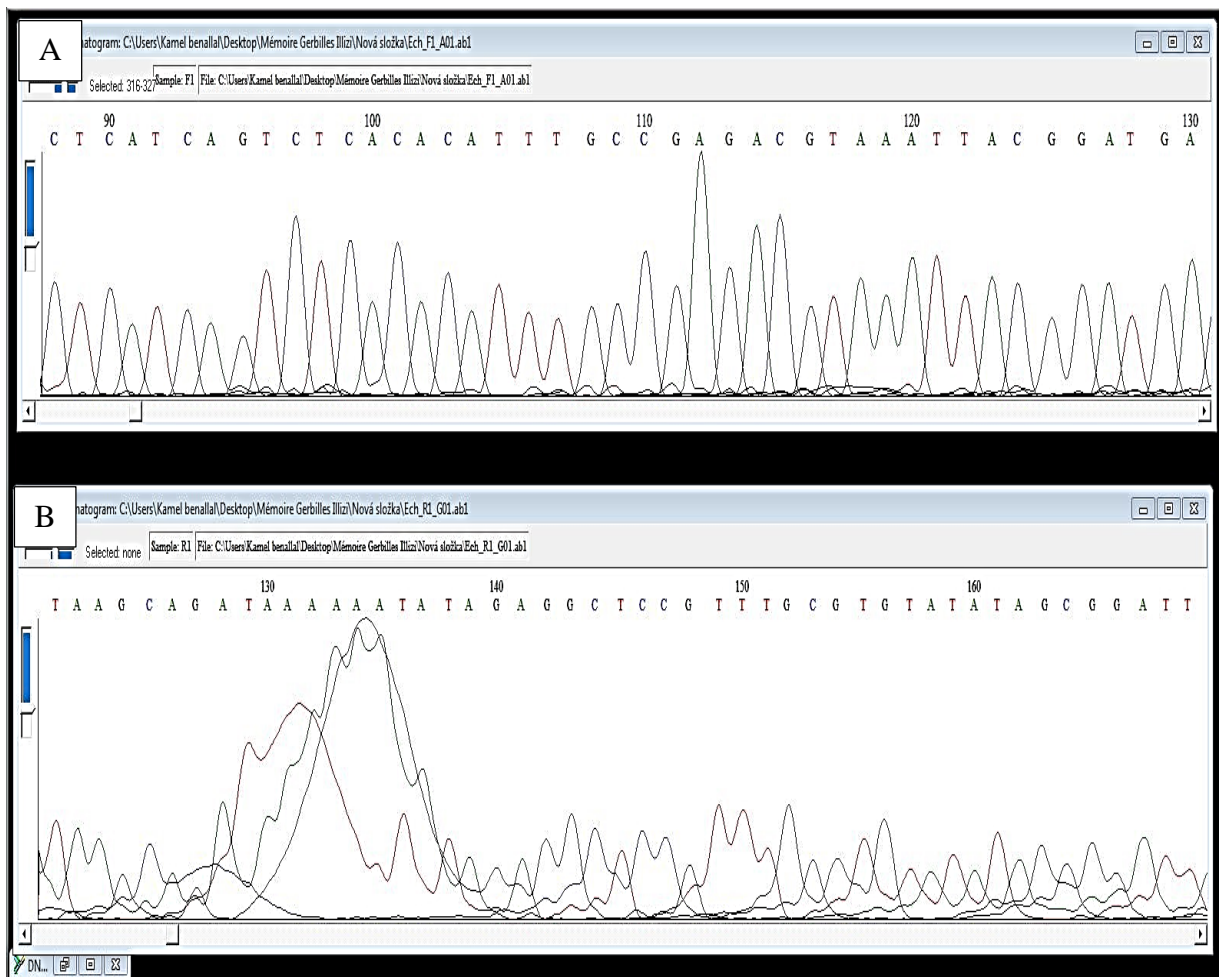
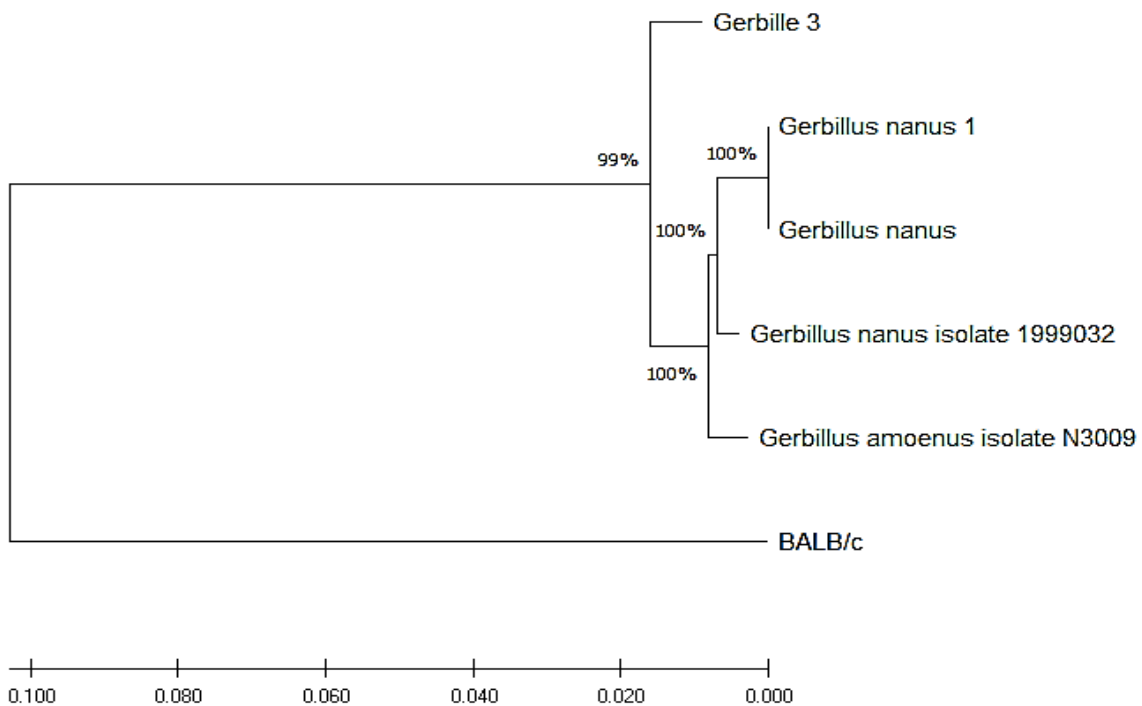


Figure 18 - Profile de séquençage, chaque couleur de pic correspond un des quatre fluorochromes différents (A : vert, T : rouge, C : bleu, G : noire). Cette figure montre la différence entre une séquence de bonne qualité (A) et de mauvaise qualité (B).

L'alignement des séquences par le logiciel Mega nous a permis de confirmer que l'espèce du rongeur N°3 appartient à l'espèce *G. amoenus* qui est la même que l'espèce *G. nanus* avec un pourcentage de ressemblance de 99% le rongeur N°4 appartient à l'espèce *G. pyramidum* avec un pourcentage de ressemblance de 95%.

Shehata *et al* en 2009 ont utilisé les mêmes étapes pour l'identification des espèces de rongeurs alors qu'à l'ouest de la Mauritanie, Berengere (2003) et dans les stations d'Oued Righ, Hadjoudj (2017) ou encore Bebba et Baziz (2008), n'ont jamais eu recours à l'identification moléculaire à l'aide de séquençage pour confirmer une espèce capturée, l'identification morphométriques et crâniennes leurs a suffi pour la confirmation du genre *Gerbillus nanus*. Dans cette précédente étude l'identification par PCR Séquençage est venue appuyer et confirmer les résultats de la morphologie corporelle et des ossements obtenus au départ et confirmer par Berengere (2003), Hadjoudj (2017) et Bebba et Baziz (2008).



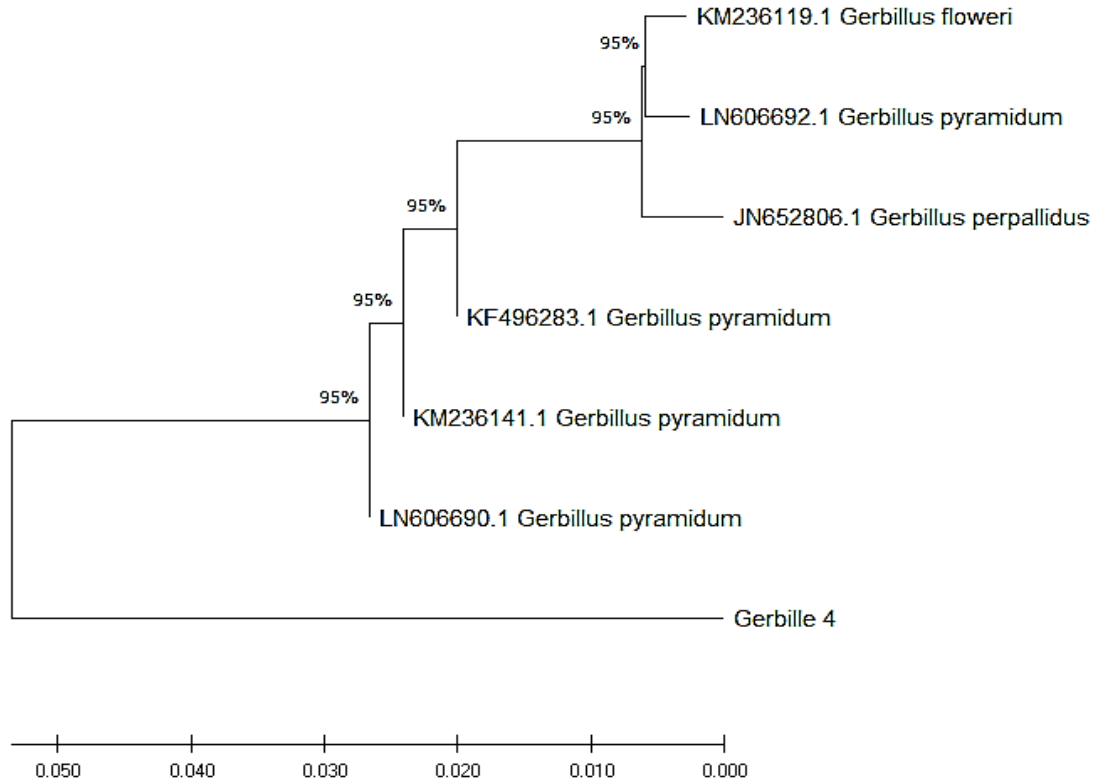


Figure 19 - Arbre phylogénique par la méthode de Neighbor-Joining (1000 bootstraps) du rongeur N°3 et N°4.

III.2. – Comptage du nombre et différentes formes de parasites *Leishmania* dans l'inoculum

Ce titre parle du comptage des différentes formes de parasites et leurs nombres pour l'inoculum qui sera par la suite injecter en IDO des rongeurs au cours de l'expérimentation.

III.2.1. – Comptage des différentes formes de parasite *Leishmania*

Dans ce titre un pourcentage des différentes formes parasitaires de *Leishmania* a été déterminés par un comptage sur des frottis colorés au MGG et observés au microscope photonique (Gx100) (Figure 20), les résultats du comptage montrent que le parasite sous forme de petit promastigote est de 45% alors que la forme nectomonade allongée est présente à 25%. La forme arrondie est à 18% et pour finir la forme promastigote metacyclique est présente à 12% (Sádlová *et al.*, 2010).

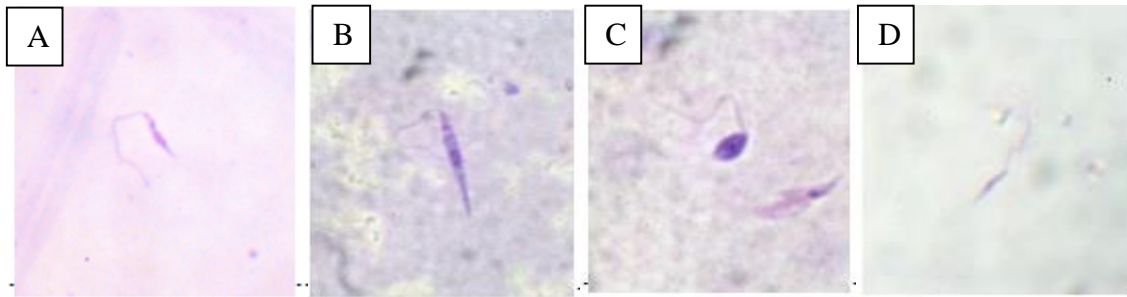


Figure 20 – Les différentes formes de parasite *Leishmania* colorés au MGG observés au microscope photonique (Gx100). **A** : promastigote metacyclique. **B** : nectomonade allongée. **C** : arrondie. **D** : petite promastigote.

III.2.2. – Comptage des parasites pour l'inoculum

Le comptage des parasites sous microscope optique (Gx40) est fait sur cellule THOMA. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 08).

Tableau 08 – Nombre de parasites comptés sur cellule THOMA.

Champs du comptage parasitaire	Nombre de parasites
Champ 1	17
Champ 2	15
Champ 3	20
Champ 4	25
Champ 5	27
Champ 6	19
Nombre total des parasites	123

Le nombre de parasites présents dans la solution est :

$$\text{Nombre de parasites} = (\text{nombre total des parasites comptés} / 6) * 3 * 16 * 10^4$$

$$= (123 \text{ parasites} / 6) * 3 * 16 * 10^4.$$

$$= 960 \times 10^4.$$

La suspension parasitaire est ajustée à 10^6 . Selon les travaux de Maquaire, (1997).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

C_1 : Concentration initiale des parasites dans l'inoculum.

V_1 : Volume initiale la solution parasitaire.

C_2 : Concentration finale des parasites dans l'inoculum.

V_2 : Volume finale d'inoculum.

$$V_2 = (960 \times 10^4 \times 1 \text{ ml}) / 10^6.$$

$$V_2 = 9,6 \text{ ml.}$$

Le volume final de l'inoculum est $V_2 = 9,6 \text{ ml}$.

III.3. – Suivi de l'évolution de l'infection (Monitoring)

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle, fréquentes dans le bassin méditerranéen. En Algérie elles occupent la première place dans les maladies parasitaires et représentent 35 % des maladies à déclaration obligatoire (Barchiche et Madiou, 2009), et elle connaît ces dernières années une augmentation remarquable de l'incidence annuelle des deux formes cliniques de la leishmaniose. Cette extension est de plus en plus importante à travers tout le pays (Djezzar, 2007).

Au cours de cette étude, on a au total 10 rongeurs (05 capturés à Illizi et 05 Balb/c) ont été infectés par la souche *Leishmania major* MHOM/DZ/09/LIPA100/09/MON-25. 1 seul spécimen parmi les rongeurs a répondu à l'infection ainsi qu'une seule souris Balb/c. Les résultats sont basés seulement sur les observations des deux spécimens donc statistiquement sont insuffisants pour en conclure un rôle éventuel de cette espèce de rongeur dans le maintien et la dissémination du parasite *Leishmania* dans la nature.

Les données représentées sur le graphe sont exprimées par la différence d'épaisseur de l'oreille infectée et non infectée. Le premier signe d'infection par la *Leishmania major* MHOM/DZ/09/LIPA100/09/MON-25 inoculée au niveau des pavillons internes des oreilles de la souris Balb/c est apparu sous forme de rougeur à partir de la 4^{ème} semaine qui a évolué en induration (gonflement de l'oreille au site d'inoculation des parasites) à partir de la 6^{ème} semaine. L'induration augmentait de taille jusqu'à la semaine 13 où une diminution de la l'induration a été observée signe de début de guérison (Figure 21). Important à noter que

l'apparition d'une croute au niveau de l'oreille infectée a été observée à la 8^{ème} semaine post infection (Tableau 09),

En ce qui concerne le *G. nanus* testé, le même schéma d'évolution de la maladie a été enregistré mais avec un décalage d'une semaine entre la souris Balb/c et le rongeur (Figure 20). Ces résultats s'accordent avec les travaux de Mekarnia et *al.*, (2018), sur l'étude biologique de l'infection du rongeur réservoir *Meriones Shawii* par une souche de *L. major*.

Le parasite *Leishmania major* est bien présent après l'infection lors de l'expérimentation ce qui signifie que *Gerbillus nanus* peut être infecté par ce parasite. Comme l'a déjà prouvé Azizi et *al.*, (2012) lors d'une précédente recherche dans la province d'Hormozgan il affirme que l'espèce *G nanus* était la quatrième espèce capturée dans laquelle l'infection par *Leishmania* a été observée au microscope dans un échantillon mâle et dans deux échantillons mâle et femelle par la méthode moléculaire PCR. Selon des recherches approfondies, l'infection de ce rongeur *G. nanus* avec *L. major* n'a jamais été mentionnée avant Azizi et *al.* (2012) dans le monde. Il y avait l'étude de Mehrabani et *al* (2007) qui ont rapporté pour la première fois que deux échantillons de rongeurs *Gerbillus* sp à la Larestan de Fars étaient infectées par *L. major* par des techniques microscopiques et moléculaires mais ils n'ont jamais mentionné l'espèce de ce rongeur. En observant la taille des corps des échantillons, ils étaient trop grands donc ces deux espèces ne sont certainement pas *G. nanus*. Cependant, dans les pays du Moyen-Orient, y compris l'Egypte, la Jordanie et la Palestine quelques infections de l'espèce *Gerbillus* par *L. major* ont été rapportées, mais aucun de ces rapports ne concernait l'espèce *G.nanus*. Wesserberg et *al* (2002) ont rapporté l'infection de *Gerbillus dasyurus* avec le même parasite dans le Negey Oriental en Palestine. Dans cette étude l'infection des rongeurs du genre *G. nanus* a été confirmée par la méthode moléculaire (PCR).

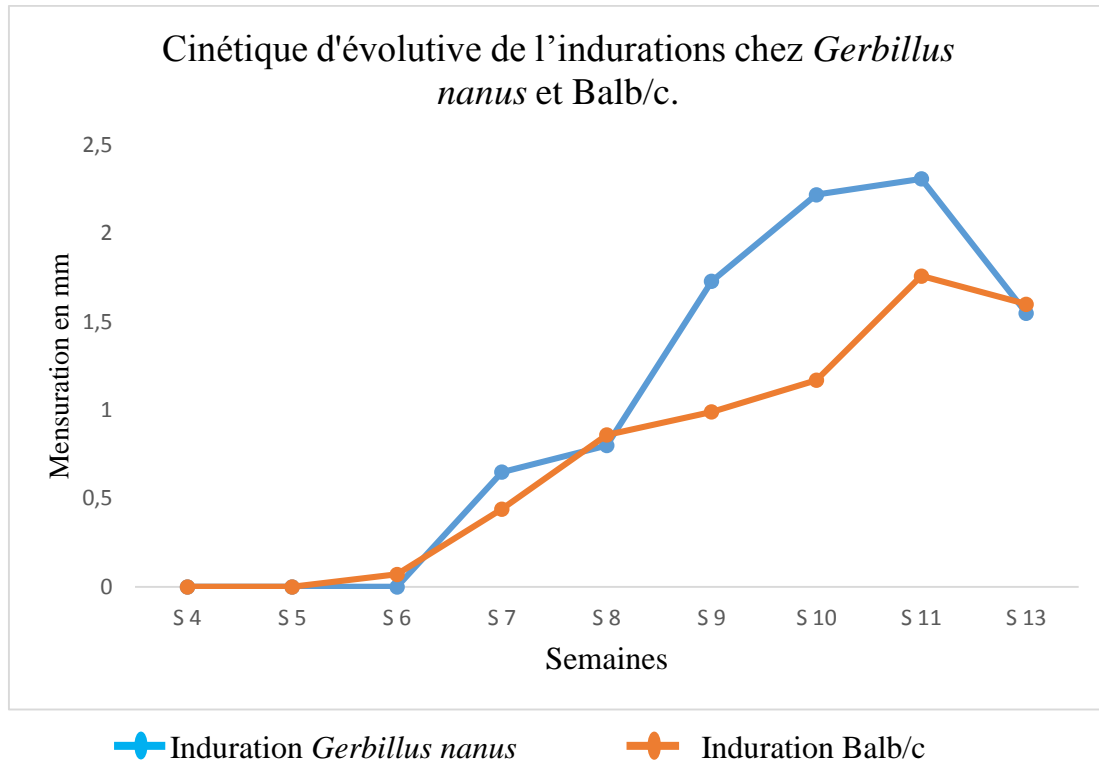




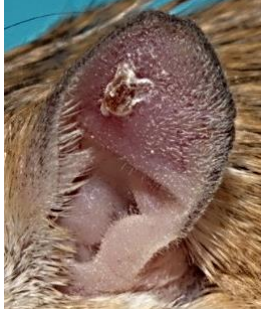



Figure 21 - Cinétique d'évolutive de l'induration chez *Gerbillus nanus* et Balb/c.

Tableau 09 – Évolution des indurations au niveau des oreilles des *Gerbillus* sp et des Balb/c.

Infections	Avant l'induration	Après l'induration	
		Pavillon interne	Pavillon externe
Balb/c			
<i>Gerbillus nanus</i>			

III.3. – Résultats des analyses statistiques

L'analyse statistique par le test Mann Whitney (McKnight, Najab, 2010) a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux rongeurs $p= 0,789$ confirmant que les deux espèces de rongeurs ont répondu de la même manière aux parasites.

Concernant les 04 autres rongeurs capturés qui n'ont pas montré de signe d'infection (Au cours du monitoring post-infection), au niveau des pavillons internes des oreilles, différentes hypothèses sont citées comme une mauvaise injection de l'inoculum en vue du faible épaisseur au niveau de l'oreille de chaque rongeur, mais aussi une faible homogénéisation de l'inoculum juste avant l'injection, donc un nombre insuffisant d'agents pathogènes, qui selon Rioux et *al.*, (1990), est une condition préalable à la perpétuation des maladies à transmission vectorielle, ou bien un manque considérable des parasites promastigotes métacycliques dans l'inoculum. Ces erreurs ont fait qu'un spécimen a répondu à l'infection au lieu de 05, pareil pour les Balb/c.

The background features three decorative orange circles of varying sizes, each composed of multiple overlapping layers. Two thin orange lines originate from the top left and extend towards the circles, while another line extends from the top right towards the bottom right circle. The text is centered horizontally and has a slight drop shadow.

Conclusion et perspectives

Cette étude, s'est portée sur une identification au niveau morphologiques et moléculaires des gerbilles capturés dans la région d'Imihrou wilaya d'Ilizi puis s'est intéressée à tester leurs sensibilités aux parasites *Leishmania major*, pour cela, une infection expérimentale a été réalisée sur 05 rongeurs du genre *Gerbillus*, et sur 05 souris Balb/c qui ont servi comme control positif de l'expérimentation.

Les résultats d'identification corporelles et crâniennes ont démontré que 04 des gerbilles capturées à Ilizi sont des espèces du genre *Gerbillus nanus* et 01 est du genre *Gerbillus pyramidum* puis une identification moléculaire a été réalisée pour consolider ces résultats.

Les résultats obtenus montrent que l'infection à *L. major* chez les souris Balb/c et les *Gerbillus nanus* se traduit par une augmentation des indurations des oreilles et l'apparition des lésions, ce qui signifie l'augmentation de la charge parasitaire dans le site d'inoculation. Les résultats à la fin ont démontré qu'un seul rongeur du genre *Gerbillus nanus* et une seule Balb/c ont montré des signes d'infections donc statistiquement ils sont insuffisants pour en conclure un rôle éventuel de cette espèce de rongeur dans le maintien et la dissémination du parasite *L. major* dans la nature. L'expérimentation n'a pas fonctionné comme prévu pour plusieurs raisons possibles tels qu'un manque de parasites promastigotes métacycliques dans l'inoculum, une mauvaise injection au niveau de l'IDO (en vue de son faible épaisseur) des *Gerbillus nanus*, ou bien un mauvais mélange de l'inoculum avant de l'inoculer dans l'oreille du rongeur.

En obtenant un résultat positif à l'infection par *L. major*, on suppose que les rongeurs du genre *Gerbillus nanus* peuvent être des réservoirs à ce parasite dans la nature. Pour pouvoir confirmer ou démentir cette hypothèse il faudrait élargir les stations d'études et le terrain d'échantillonnage pour pouvoir capturer un grand nombre d'individus afin d'assurer qu'aucun d'entre eux n'est porteur de la maladie et surveiller continuellement les foyers de dissémination de la leishmaniose afin de lutter contre cette maladie.

The background features three decorative orange circles of varying sizes, each composed of multiple overlapping outlines. These circles are connected by thin orange lines that form a triangular shape pointing downwards. The largest circle is at the top, a medium one in the middle, and the smallest one at the bottom.

Références bibliographiques

Aarab K., (2018) - Les actualités sur la leishmaniose viscérale, Thèse de doctorat, Université Mohamed V -Faculté de médecine et de pharmacie - Rabat,Maroc. 66p.

Ahmim M., (2019) - Les mammifères sauvages d'Algérie, Répartition et Biologie de la Conservation.HAL, Les Éditions du Net. 295p.

Annequin L., (2020) - La recherche de nouveaux outils de diagnostic pour la leishmaniose canine, un enjeu «One Health». Mémoire de Master, Université de médecine vétérinaire – Liège, France : 29p.

Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales (ANOFEL) et Chabasse, (2016) - Parasitoses et mycoses : des régions tempérées et tropicales. 5^e, Elsevier Masson, Paris, 504p.

Aulagnier S., Haffner P., Mitchell-Jones A. J., Moutou F., Zima J., Chevallier J., Norwood J., Varela Sim J. (2008) - Mammals of Europe, North Africa and the Middle East. AetC. Paris, 272p.

Azizi K., Kalantari M., Asgari,Q., Turki H., Shahi M., et Fekri, - S., (2012) - Rapport sur l'infection par *Leishmania* de *Gerbillus nanus* (Rodentia : Muridae) en tant qu'hôte réservoir de *Leishmania Major* dans la province d'Hormozgan. *Journal de recherche en sciences médicales de Zahed*, 14 (18), pp 6-10.

Bachi F., Icheboudene K., Benzitouni A., Taharboucht Z., et Zemmouri M., (2019) - Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Algérie à travers la caractérisation moléculaire. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 112, 147-152.

Barchiche N. A., et Madiou M., (2009) - Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathologie Biologie*, 57(1), 65-70.

Bebba K., et Maziz B. (2008) - Les micromammifères dans la vallée d'Oued Righ. Mémoire Ing. Agr., Université KasdiMerbah, Ouargla. Actes du Séminaire International sur la Biodiversité Faunistique en Zones Arides et Semi-arides, 122p.

Belazzoug S., (1983) - Isolation of *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 876.

Belazzoug S., (1983) - Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'Sila (Algérie). Infestation naturelle de *Psammomys obesus* ;(Rongeur, Gerbillidea). *Bulletin de la société de pathologie exotique*, 76, 146-149.

Belazzoug S., (1986) - Découverte d'un *Meriones shawi* (rongeur, gerbilibé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée à Ksar Chellala (Algérie). *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*, 79(5), 630p.

m

Bell J. R., (2008) - A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *Biotechniques*, 44(6), 834p.

Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M., (2004) - Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Médecine tropicale, revue du Corps de santé colonial*, 64(4), pp.381-401.

Beniklef R., Aoun K., Boudrissa K., Ben Abid M., Cherif K., Aissi W., ouratbine A., (2021) - Cutaneous *Leishmaniasis* in Algeria; Highlight on the Focus of M'Sila. *Microorganisms*, 9. 962p.

Benoist G., Bourrillon A., Chabrol B., Chéron G., Grimprel E., (2020) - Pédiatrie pour le praticien : Médecine de l'enfant et de l'adolescent. 7^e édition Elsevier Health Sciences. 992p.

Berengere B., (2003) - Taxonomie et identification des *Gerbillus* de l'Afrique de l'Ouest. Université Pierre et Marie Curie, Paris, 36 p.

Bessad A., Mouloua K., Kherrachi I., Benbetka S., Benikhlef R., Mezai G., et Harrat Z., (2012) - *Leishmaniainfantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*, 1(105), pp.5-7.

Bettache N. E., et Bouafia F. Z., (2019) - Recherche de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* par une approche PCR-électrophorèse, Mémoire de Master, Université Mohamed Boudiaf de M'Sila. 45p.

Bluteau M., (1999) - Détection des cellules myéloïdes immatures sanguines par cytométrie en flux et Pentra 120, Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, Num : 349, 95p.

Boubidi S. C., Benallal K., Boudrissa A., Bouiba L., Bouchareb B., Garni R., Bouratbine A., Ravel C., Dvorak V., Votypka J., Volf P., et Harrat Z., (2011) - *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes and Infection*, 13(7), 691–696.

Bouchaud O., Consigny P. H., Cot M., Le Loup G., Odermatt-Biays S., (2019) - Médecine des voyages et tropicale : médecine des migrants, 4^e, Elsevier Health Sciences, Paris, 428p.

Boudrissa A., (2018) - Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose cutanée du sud de l'Algérie, Thèse de doctorat, Université de Sétif 1 – Farhat Abbas, Algérie 170p.

Bounamous A., (2010) - Biosystématique et caractérisation par la biologie moléculaire des phlébotomes de l'Est algérien. Thèse Doctorat en biologie animale option entomologie : Université de Mentouri Constantine, Algérie. 302p.

Bouratbine A., Aoun K., Gharbi M., Haouas N., Zaroui J., Harrat Z., Baba H., et Darghouth M.A., (2005) - Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques sur la leishmaniose générale canine en Tunisie. *Parasitologie. Bull Soc Pathol Exot*, 2005, 98, 5, pp359-362.

Brunet J. L., (2006) - *Les insectes et la santé*. John Libbey Eurotext, Paris, France. 124 p.

Buffet P. A., Rosenthal É., Gangneux J. P., Lightburne E., Couppié P., Morizot G., Lachaud L., Marty P., et Dedet J. P., (2011) - Traitement des leishmanioses en France : Proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Medicale*, 40(2), pp.173-184.

Camuset G., Remy V., Hansmann Y., Christmann D., d'Albuquerque C. G., et Casseb G. A. S., (2007) - Leishmaniose cutanéomuqueuse en Amazonie brésilienne. *Médecine et maladies infectieuses*, 37(6), 343-346.

Chavy A. C., (2019) - Influence de l'environnement sur le cycle de transmission de la leishmaniose cutanée en Guyane, à multi-échelle spatiale, Thèse de doctorat en Physiologie et biologie des organismes et Populations. Santé et développement en Amazonie, 141p.

Chemkhi J., Souguir H., Ali I. B. H., Driss M., Guizani I., et Guerbouj S. (2015) - Natural infection of Algerian hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* parasites in Tunisia. *Acta Tropica*, 150(Lereboullet 1842), pp.42–51.

Cherif K., Boudrissa A., Cherif M. H., et Harrat Z., (2012) - Un programme social pour la lutte physique contre la leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie. *Santé Publique*, 24(6), 511-522.

Coosemans M., et Van Gompel A., (1998) - Les principaux arthropodes vecteurs de maladies. Quels risques pour le voyageur d'être piqué ? D'être contaminé. *Bull Soc PatholExot*, 91, 467-73.

Dedet J. P., (2008) - Leishmanioses cutanées. In *Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques* Springer, Paris. pp. 199-217.

Dedet J. P., Addadi K., et Belazzoug S., (1984) - Les phlébotomes (*Diptera, Psychodidae*) d'Algérie. *Cahiers-ORSTOM. Entomologie médicale et parasitologie*, 22(2), pp.99-127.

Dedet J. P., Addadi K., Lannuzel B. (1977) - Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. *Bull Soc Pathol Exot*. 70 :p250.

Dedet J. P., Addadi K., Lannuzel B., - Épidémiologie des leishmanioses en Algérie : la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. *Bull Soc Pathol Exot* 1977 ; 70: pp.250-65.

Depaquit J., et Léger N., (2017) - Entomologie médicale et vétérinaire Les phlébotomes (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*). Duvallet G, Fontenille D et Robert V (Ed.), Editions Quae. Marseille, Versailles, pp.295-320.

Desjeux P., (1996) – *Leishmaniasis: public health aspects and control. Clinics in dermatology, 14(5)*, pp.417-423.

Djezzar M. I., (2007) - Étude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire Ben Baddis de Constantine. Thèse de doctorat, Université Claude-Bernard-Lyon1. 116p.

Dostálová A., et Volf P., (2012) - *Leishmania* development in sandflies: parasite-vector interactions overview. *Parasites et vectors, 5(1)*, pp.1-12.

Eddaikra N., Ait-Oudhia K., Kherrachi I., Oury B., Moulti-Mati F., Benikhlef R., et Sereno D., (2018) - Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. *PLoS neglected tropical diseases, 12(3)*, e0006310.

Eddaikra N., Kherachi-Djenad I., Benbetka S., Benikhlef R., Aït-Oudhia K., Moulti-Mati F., et Harrat Z., (2016) - Development of a murine infection model with *Leishmania killicki*, responsible for cutaneous *leishmaniosis* in Algeria: application in pharmacology. *BioMed research international*, 2016.

El Tai N. O., Osman O. F., El Fari M., Presber W., et Schönian G., (2000) - Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94(5)*, pp.575-579.

Estevez Y., (2009) - Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure activité. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse III, France. 92p.

Fourati E., (2012) - Enquêtes entomologiques dans un foyer de Leishmaniose cutanée zoonotique du Centre Tunisie, 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 ». Tunisie. 56p.

Frahtia-Benotmane K., (2015) – Détection moléculaire des *leishmanies* à partir du genre *Phlebotomus* (Diptera : Psychodidae) : Tendances vers la régression de la leishmaniose à Constantine (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie. 141p.

Galluzzo C. W., Eperon G., Mauris A., et Chappuis F., (2013) - Leishmaniose cutanée. *Rev Med Suisse*, 9, 990-5.

Granier M., (2013) - Etude de la perception du vaccin contre la leishmaniose par les vétérinaires et les propriétaires de chiens en zone d'enzootie sur le territoire de France métropolitaine, Thèse de doctorat en Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France. 170 p.

Granjon L., et Duplantier J. M., (2009) - Les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanienne (pp. 173-174). IRD.

Grondin M., (2008) - Les protéines de blé d'hiver ; Nouveaux agents cryoprotecteurs pour les hépatocytes de rat. Thèse de doctorat en biochimie, Université du Québec à Montréal, 255p.

Hadjoudj M., (2017) - Relation de micromammifères en milieux cultivés et en milieux naturels en Algérie. Thèse de doctorat, Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach. Algérie. 111p.

Hall T.A., (1999) - BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, pp.95-98.

Harrat Z., et Belkaid M., (2002) - Les leishmanioses dans l'Algérie. Données épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot*, 96, pp 212-214.

Harrat Z., Hamrioui B., Belkaïd M., et Tabet-Derraz O., (1995) - Point actuel sur l'épidémiologie. *Bull. Soc. Path. Ex*, 88, 180-184.

Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J. A., et Dedet J. P., (1996) - *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 625-629.

Idir T., et Taleb S., (2018) -Préparation des milieux de cultures pour le diagnostic des leishmanioses et étude rétrospective de la prévalence des leishmanioses humaines dans la wilaya de Tizi-Ouzou durant la période 2007-2018, thèse de doctorat en sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie. 53p.

Igbokwe N., (2020) - Immunomodulation of the STAT6 pathway for treatment of *Visceral Leishmaniasis*. Division of experimental medicine, department of medicine, McGill University. 76p.

Institut National de Santé Public (INSP). Relevé Epidémiologique Mensuel, 2017 [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 31]. Available from: http://www.insp.dz/images/PDF/Epidemio/REM_annuel2017f.pdf.

Izri M. ., Belazzoug S., Pratlong F., et Rioux J., (1992) - [Isolation of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* in Biskra (Algeria). The end of an ecoepidemiological saga]. - PubMed NCBI. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 67(1), 31–32.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642393>.

Izri M. A., Belazzoug S., Boudjebba Y., Dereure J., Pratlong S., Delalbre-Belmonte A., et Rioux J. A., (1990) – *Leishmania infantum* Mon-1 isolated of *Phlebotomus perniciosus*, in Kabylia (Algeria). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65(3),pp.151–152.

Izri M. A., et Belazzoug S., (1993) -*Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), pp383-385.

Jarry D. M., (1999) - Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. *Les Leishmanioses. Paris : Ellipses Aupelf/Uref*, 13-20.

Jutras J., (2005) - Protocole pour les inventaires de micromammifères. Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec, direction du développement de la faune, Québec, Canada. 10p.

Kabbout N., Merzoug D., et Chenchouni H., (2016) - Ecological Status of Phlebotomine Sandflies (Diptera : *Psychodidae*) in Rural Communities of Northeastern Algeria. *Journal of Arthropod-Borne-Diseases*, 10(March), pp.24–38.

Kaput J., et Rodriguez R. L. (Eds.), (2006) - Nutritional genomics: discovering the path to personalized nutrition. John Wiley et Sons.Pp.1-21.

Keita F., (2005) - La Leishmaniose cutanée chez les patients reçus à l'unité biologie du CNAM de Janvier 2002 à Octobre 2004, Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Bamako, Mali. 45p.

Kemouch A., Mechekkef A., et Amira S. E., (2017) - Evaluation de l'effet de la conservation sur la viabilité de quelques bactéries lactiques libres et encapsulées, Thèse de doctorat, Université de Jijel, Algérie. 37p.

Khalida F. B., (2017) - Détection moléculaire des leishmanies à partir du genre *Phlebotomus* (*Diptera : Psychodidae*). Thèse de doctorat en biologie animale, Université des Frères Mentouri – Constantine, Algérie. 120p.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J. C., Bouizegarène P., et Bogard M., (2008) - Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 23(5), pp.260-279.

Larivière M., (1987) - Parasitologie médicale. Ellipses Marketing, Paris. 2 38 p.

Le Fichoux Y., Quaranta J. F., Aueuvre J. P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Kubar J., (1999) - Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), pp1953-1957.

Léger N., et Depaquit J., (2001) - Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Française des Laboratoires*, 2001(338), pp.41-48.

Lenvers P., Marty P., et Peyron F., (2013) - Ulcération chronique du visage : penser à une leishmaniose cutanée métropolitaine due à *Leishmania infantum*. In *Annales de dermatologie et de vénéréologie* (Vol. 140, No. 11, pp. 704-707). Elsevier Masson.

Lutte contre la Leishmaniose : rapport du secrétariat. Conseil exécutif, 118. (2006) . Lutte contre la leishmaniose : rapport du Secrétariat. Organisation mondiale de la Santé. 7p.

Manel M. E. A., (2018) - Urbaine émergente, d'allure épidémique à profil épidémiologique particulier, le réservoir reste inconnu. Thèse de doctorat à l'université de Mostaganem. Algérie. 67p.

Mans D. R., Kent A. D., Hu R. V. P. F., et Schallig H. D., (2017) - Epidemiological, biological and clinical aspects of *Leishmaniasis* with special emphasis on BusiYasi in Suriname. *J Clin Exp Dermatol Res*, 8(2), pp10-4172.

Maquaire S., (1997) - Etude des activités protéasiques constitutives et excrétées-sécrétées au cours du cycle de développement parasitaire de *Leishmania amazonensis*. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc - Montpellier II, France. 26p.

Marc F., Saihi M., Teyssandier M., Legeas M., et Junod B., (2006) - Maladies transmissibles et insectes piqueurs sur le territoire métropolitain. Atelier Santé Environnement. ENSP-IGS, 2007. Ecole nationale de la santé publique, Rennes. 59p.

Marinkelle C. J., (1981) - La lutte contre les leishmanioses. *Bulletin of the World Health Organization*, 59(2), 189p.

Masmoudi A., Ayadi N., Boudaya S., Meziou T. J., Mseddi M., Marrekchi S., et Zahaf A., (2007) - Polymorphisme clinique de la leishmaniose cutanée du centre et sud tunisien. *Bull Soc Pathol Exot*, 100(Suppl 1), pp36-40.

McKnight P. E., et Najab J., (2010) - Mann- Whitney U Test. *The Corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.

Mehrabani D., Motazedian M. H., Oryan A., Asgari Q., Hatam, G. R., et Karamian M., (2007) - A search for the rodent hosts of *Leishmania major* in the Larestan region of southern Iran: demonstration of the parasite in *Tatera indica* and *Gerbillus* sp., by microscopy, culture and PCR. *Annals of Topical Medicine & Parasitology*, vol 101,2007. Pp 315-322.

Mekarnia N., Harrat Z., Cojean S., Loiseau P. M., (2018) - Etude des paramètres biologiques de l'infection du rongeur *Meriones shawii* par une souche de leishmania major sensible aux antimoniés. Faculté de pharmacie de l'Université Paris-Sude, 1p.

Mellano S., (2016) - La leishmaniose canine et humaine à *Leishmania infantum* en France, Thèse de doctorat Université Toulouse III-Paul Sabatier, France. 116p.

Meunier M., Stoetzel E., Souttou K., Sekour M., Moussa H., Boukhemza M., Doumandji S., et Denys C., (n.d.). Mise à jour de la liste des rongeurs de l'Algérie, biogéographie et implications paléoécologiques. *Bull. Soc. Zool. Fr*, 2020(4), 413-474.

Mokni M., (2019) - Leishmanioses cutanées. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* Elsevier Masson. Vol. 146, pp232-246.

Moulinier C., (2003) - Parasitologie et mycologie médicales : éléments de morphologie et de biologie. Cachan : Editions Médicales Internationales. 796p.

Organisation mondiale de la santé. (2011) - La lutte contre les leishmanioses : rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22-26 mars 2010. Genève : Organisation mondiale de la Santé. 212p.

Organisation mondiale de la santé. (2020) - Surveillance mondiale de la leishmaniose, 2017-2018, et premier rapport sur 5 indicateurs supplémentaires. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 95(25), pp265-279.

Papierok G. M., Hugnet C., Bourdoiseau G., et Lemesre J. L., (2008) - A-15 Le CaniLeish®, un vaccin contre le réservoir canin de la leishmaniose : des résultats prometteurs pour un futur vaccin humain. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38, pp 133–136.

Parrot L., et Foley H., (1925) - Epidemiology of Oriental Sore in Algeria. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 18(6), pp485-495.

PetitDidier E., (2015) - La PSA (Promastigote Surface Antigène) soluble de *Leishmania* induit, sous forme recombinante ou peptidique, une réponse immune protectrice chez le chien. Mémoire de Master, École pratique des hautes études, France. 147p.

Prudhomme J., (2015) - Phlébotomes et écosystèmes : impact des facteurs biotiques et abiotiques sur la structure génétique et phénotypique des populations. Thèse de doctorat en Biologie Santé, Université Montpellier, France. 259p.

Ramdane E., Berchi S., et Louad K., (2018) - Les phlébotomes (*Diptera, Phlebotomidae*), vecteurs d'agents pathogènes responsables de la leishmaniose humaine dans la région de Constantine (Algérie). *Entomofauna*, 39(4), pp.537-555.

Reithinger R., Dujardin J. C., Louzir H., Pirmez C., Alexander B., et Brooker S., (2007) - Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), pp581-596.

Rhamirich O., (2012) - Les leishmanioses : actualité thérapeutique. Université Mohammed v – Soussi, Rabat, thèse de doctorat en pharmacie, Maroc. pp.89. 51.

- Rioux J. A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., et Perieres J., (1990) - Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 65(3), pp111-125.
- Rioux JA, Dereure J, Perieres J., (1990) - Approche écologique du « risque épidémiologique ». Exemple des leishmanioses. *Bull Ecol* 22, pp1–9.
- Ripert C., et Pajot F. X., (1996) - Epidémiologie des maladies parasitaires : *Protozooses* et *Helminthoses* : réservoirs, vecteurs et transmission. Tome1 : Protozooses. Cachan : Editions médicales internationales, France, pp.303-312.
- RNL Sénégal, (2004) - Manuel de procédures des techniques de laboratoires d'analyses médicales. 1 ère édition. Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale, 97p.
- Rosenthal E., et Marty P., (2002) - Treatment of visceral *Leishmaniasis*: a review of current treatment practices. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 3(8), pp1101-1108.
- Sádlová J., Price H. P., Smith B. A., Votýpka J., Volf P., et Smith D. F., (2010) - The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cellular microbiology*, 12(12), pp1765-1779.
- Sánchez-Saldaña L., (2015) – Educación médica continua. *Dermatologia Peruana*, 25(3), pp164-172.
- Saurat J. H., Lachapelle J. M., Lipsker D., et Thomas L., (2004) - *Dermatologie et infections sexuellement transmissibles*. Elsevier Masson. 1288 p.
- Sharma U., et Singh S., (2008) - Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45(4), pp255-72.
- Shehata M. G., Samy A. M., Doha S. A., Fahmy A. R., Kaldas R. M., Furman B. D., et Villinski J. T. (2009) - First report of *Leishmania tropica* from a classical focus of *L. major* in North-Sinai, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81 (2), pp213-218.

Wasserberg G., Abramsky Z., Anders G., El-Fri M., Schoenian G., Schnur, L., et Waeburg A., (2002) - The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host, and epidemiological implications. *International journal for parasitology*, 32 (2), pp 133-143.

World Health Organization. (2009) - Maladies tropicales négligées : de vieux compagnons de pauvreté (No. WHO/HTM/NTD/2009.1). Genève, France. 1p.

World Health Organization. (2014) - Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région OMS de la Méditerranée orientale. 49p.

Zait H., et Hamrioui B., (2009) - Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue francophone des laboratoires*, 2009(412), pp33-39.

Zait H., Ferhani Y., Achir I., et Hamrioui B., (2012) - Étude de 71 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009. *Médecine et maladies infectieuses*, 42(3), pp.119-125.

Zapata S. M., (2012) - Contribution à l'étude des Psychodopygina d'Equateur (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) : Systématique et biologie, Thèse de Doctorat en science Parasitologie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France 123p.

Zougaghi L., Bouskraoui M., Amine M., Akhdari N., et Amal S., (2011) - Leishmaniose cutanée à *Leishmaniatropica* dans la région de Marrakech (Maroc) : un foyer rebelle! *Revue francophone des laboratoires*, 2011(429), pp35-39.

The page features a decorative design with three orange circles of varying sizes, each composed of multiple overlapping lines. These circles are positioned in the upper right and lower right areas. Two thin orange lines originate from the top left and extend towards the circles, and another line extends from the top right towards the circles.

Annexes

Annexe I - Milieux de culture et agents révélateurs

I.1. - Milieux de cultures

I.1.1. - Milieu et NNN (*Novy, McNeal, Nicolle*)

C'est la méthode classique de culture des *Leishmania*. Elle sert notamment à l'isolement des souches de *Leishmania* à partir des produits pathologiques (Figure 22) (Ripert et Pajot, 1996).

Composition

Gélose (14 g bacto agar diffco), NaCl (6 g), eau distillée stérile (900 ml).

Préparation

Mélanger et faire bouillir. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissolution, puis distribuer dans des tubes à essai et stériliser à l'autoclave.

Au moment de l'emploi, faire, refroidir à 48°C et ajouter à chaque tube le tiers de volume de sang de lapin stérile et défibriné. Refroidir dans la glace pour obtenir de l'eau de condensation car c'est là que se développent les micro-organismes. Inoculer et incuber à 28°C. Les parasites se multiplient sous forme flagellée promastigote en 2 à 3 semaines, en petites colonies.

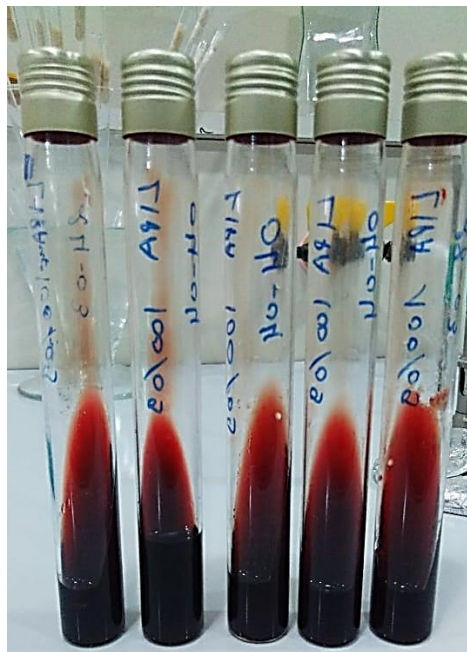


Figure 22 - *Leishmania major* MHOM/DZ/09/LIPA100/09/MON-25 cultivé en milieu NNN (*Novy, McNeal, Nicolle*).

I.1.2. - Milieu RPMI 1640

Lorsqu'une souche de *Leishmania* a été isolée, il est possible d'obtenir de grandes quantités de matériel parasitaire en cultivant les promastigotes en milieu synthétique liquide RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Figure 23), additionné d'un tampon bicarbonaté et de *sérum de veau fœtal* (Ripert et Pajot, 1996).

Composition

RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) : 16,4 g, eau distillé stérile : 1000 ml.

Composition RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640

- **Selsinorganiques:** Ca (NO₃)₂. 4H₂O: 100 mg/l, KCL: 400 mg/l, MgSO₄.7H₂O / 100 mg/l, Na CL: 6000 mg/l, NaHCO₃: 2000 mg/l, Na₂HPO₄: 800 mg/l.
- **Autres composants :** D-Glucose : 2000 mg/l, Glutathion (réduit) : 1 mg/l, Rouge de phénol : 5 mg/l.
- **Acides aminés :** L- arginine (base libre): 200 mg/l, L- Asparagine (base libre) : 50 mg/l, Acide L- Aspartique : 20 mg/l, L- Cystine : 50 mg/l, Acide L- Glutamique : 20 mg/l, Glycine : 10 mg/l, L- Histidine (base libre) : 15 mg/l, L- Hydroxyproline: 20 mg/l, L- Isoleucine : 50 mg/l, L- Leucine : 50 mg/l, L- Lysine.HCL : 40 mg/l, L- Méthionine : 15 mg/l, L- Phénylalanine : 15 mg/l, L- Proline : 20 mg/, L- Sérine : 30 mg/l, L- Thréonine : 20 mg/l, L- Tryptophane : 5 mg/l, L- Tyrosine : 20 mg/l, L- Valine : 20 mg/l.
- **Vitamines :** D- Biotine : 0.20 mg/l, Pantothénate de calcium D : 0.30mg/l, Chlorure de Choline : 3mg/l, Acide Folique : 1.00 mg/l, i-Inositol: 35 mg/l, Nicotinamide : 1.00 mg/l, Acide-Para- Aminobenzoïque : 1 mg/l, Pyridoxal •HCl: 1 mg/l, Riboflavine : 0.20 mg/l, Thiamine • HCl: 1 mg/l, Vitamin B₁₂: 0.005 mg/l. mg/l (Ripert et Pajot, 1996).

Préparation

Mesurer environ 900 ml d'eau distillée et tout en le soumettant à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissolution sans chauffer puis ajouter 2 ml de L-Glutamine, 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine, ajuster le Ph à 7 et compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml. Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm et additionner aseptiquement le sérum de veau fœtal à raison de 10 %. La conservation se fait à +4 °C.

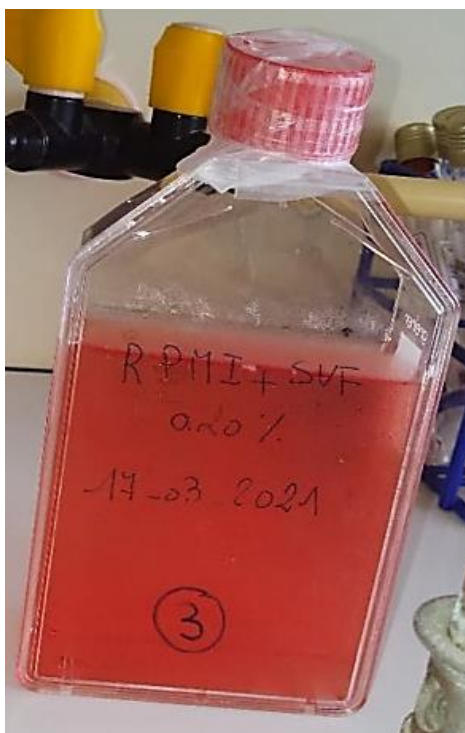


Figure 23 - Milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 supplémenté de 20% de SVF (*Sérum de veau fœtal*).

I.2. - Bromure d'éthidium (BET)

C'est un colorant fluorescent, permet de voir les fragments d'ADN sur le gel d'agarose. En effet, il est capable de s'intercaler entre les paires de bases empilées de l'ADN et permet, lors de l'illumination sous lumière UV du gel d'agarose, l'apparition de l'ADN sur le gel comme une bande de fluorescence (Bettache, et Bouafia, 2019).

I.3. - Coloration au May Grünwald Giemsa (MGG)

La méthode la plus couramment utilisée. La coloration MGG associe deux colorants, le May Grünwald et le Giemsa. Chaque colorant est constitué de deux composés : l'un basique et l'autre acide. Ils forment un mélange neutre et inactivé dans du méthanol (Bluteau, 1999).

Tableau 10 - Composition des colorants MGG.

	Colorant acide	Colorant basique
May Grünwald	Eosine	Bleu de méthylène
Giemsa	Eosine	Azur de méthylène

Il existe des kits de coloration rapide équivalente à celle du MGG : RAL 555 (Figure 24) (Duo1ng et Lenoble, 2008). Cette coloration est utilisée dans la présente étude.



Figure 24 - Kit RAL 555 : KIT de coloration rapide.

Description du kit RAL 555

Flacon 1 : FIX-RAL 555 100ml

Flacon 2 : EOSINE-RAL 555 100ml

Flacon 3 : BLEU-RAL 555 100ml

Modes opératoires

1. Fixation

- Placer la lame du frottis sur un support horizontal au-dessus d'un bac de coloration.

2. Coloration

- Fixez le frottis mince en plongeant la lame dans du méthanol pendant une seconde ou deux.
- Sécher soigneusement.
- Plonger la lame 10 fois 1 seconde dans le flacon 1 Égoutter l'excédent sur papier buvard.
- Plonger la lame 10 fois 1 seconde dans le flacon 2 Égoutter l'excédent sur papier buvard.
- Plonger la lame 10 fois 1 seconde dans le flacon 3
- Rincer à l'eau tamponnée (à défaut utiliser l'eau de robinet).

3. Séchage

- Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier buvard.

- Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis. (RNL Sénégal, 2004).
- Mettre une goutte d'huile à immersion et observer sous microscope optique (Gx100).

Annexe II – Réactifs

II .1. - Enzyme Exosap

Il s'agit d'un traitement enzymatique en une seule étape des produits PCR pour éliminer les amorces et les dNTP non incorporés afin qu'ils ne puissent pas interférer avec les réactions de séquençage en aval. L'enzyme est basé sur l'exonucléase I et la phosphatase alcaline de crevette, elle est ajoutée directement au produit PCR pour dégrader les amorces et déphosphoryler les dNTP qui n'ont pas été consommés dans la réaction (Bell, 2008).

II.2. - L'électrophorèse

Réactifs

- TAE 1X (Tris Acide EDTA)
- BET (Bromure d'éthidium).

Préparation du gel d'agarose à 1.5% :

- Peser 1.5 g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après chauffage, mélanger au micro-onde jusqu'à obtention d'un liquide.
- Pour le refroidir, mettre le mélange sous l'eau courante puis ajouter 5µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne.
- Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

II .3. - La PCR

Réactifs

Les réactifs du Kit QIAGEN (Tableau 11) ont été utilisés pour la PCR.

Tableau 11 - Les produits du mix et leurs rôles.

Produits	Rôle
Tampon	Stabiliser le PH du milieu réactionnel
MgCl ₂	Cofacteur positif de la Taq polymérase
DNTPs	Elongation des 2 brins d'ADN
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN
Amorce 1	La reverse et Forward
Amorce 2	La reverse et Forward

- **Témoin positif**

Permettent de contrôler le déroulement général du test d'amplification et la validité des réactifs utilisés.

- **Témoin négatif :**

Ont pour but de dépister une éventuelle contamination survenue au cours du test d'amplification. Les causes de contamination sont variées (réactif, petit matériel ou environnement contaminé, erreur de manipulation ...).

Résumé

Après un cas de leishmaniose cutanée dans la zone d'Imihrou à Illizi, 05 rongeurs ont été capturés afin de tester leur sensibilité au parasite *Leishmania major* avant qu'une identification corporelle, crânienne, dentaire et moléculaire a été faite sur ces rongeurs puis une infection expérimentale par *L. major* a été réalisée comme deuxième partie de ce travail dans le laboratoire d'eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'IPA. Les résultats des différentes techniques d'identifications ont prouvé que 04 des rongeurs étaient du genre *Gerbillus nanus* et 01 du genre *Gerbillus pyramidum*. Les résultats de l'infection sur ces 05 rongeurs se sont avérés positifs sur un seul spécimen identifié comme étant *Gerbillus nanus*.

Mots clés : Leishmaniose Cutanée, *Leishmania major*, PCR, *Gerbillus nanus*, Promastigotes Métacycliques, Infection Experimental,

Summary

After a case of cutaneous leishmaniasis in the Imihrou area of Illizi, 05 rodents were captured in order to test their susceptibility to the parasite *Leishmania major* before that a body, cranial, dental and molecular identification was made on these rodents and then an experimental infection by *L. major* was carried out as a second part of this work in the Laboratory of Parasitic Eco-epidemiology and Population Genetics of the IPA. The results of the different identification techniques proved that 04 of the rodents were of the genus *Gerbillus nanus* and 01 of the genus *Gerbillus pyramidum*. The results of the infection on these 05 rodents were positive on a single specimen identified as *Gerbillus nanus*.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania major*, PCR, *Gerbillus nanus*, Promastigotes Metacyclic, Experimental Infection,