

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de master II en biologie

Spécialité : Microbiologie

Option : **Microbiologie appliquée**

Réaliser par :

Mlle HALIL Nadjat et Mlle YAHMI Hamida

Thème

**Recherche de l'effet d'une culture mixte
(fongique-parasitaire) sur la croissance de
Leishmania.**

Soutenu le 20 juillet 2017

Devant le jury composé de :

Mme AICHE IRATNI Ghenima	MCB	UMMTO	Présidente
Mr MOUALEK Idir	MA	UMMTO	Examineur
Mr HOUALI Karim	Professeur	UMMTO	Promoteur

Promotion : 2016/2017

Remerciements



Nous tenons à exprimer notre gratitude ainsi que notre profond respect et remerciements les plus sincères à :

Notre promoteur, Mr HOUALI Karim, Professeur à l'université MOULOUD MAMMERY de Tizi-Ouzou pour son aide, ses orientations, ses conseils précieux et surtout sa disponibilité à tout moment.

Notre Co-promoteur, Mr MOULOUA Abdelkamel.

Notre seconde Co-promotrice, Dr AFFROUN Rekia pour son aide et sa générosité.

Nous remercions vivement, Mme AICHE IRATNI Ghenima, Maitre de Conférences B à l'université MOULOUD MAMMERY de Tizi-Ouzou pour nous avoir honoré d'examiner notre travail et d'avoir accepté de présider notre jury.

Nous remercions, Mr MOUALEK Idir, Maitre Assistant à l'université MOULOUD MAMMERY de Tizi-Ouzou pour avoir participé à l'évaluation et l'analyse de notre mémoire.

MERCI

Dédicaces



Avant tout, je remercie le **bon Dieu** de m'avoir toujours accompagné durant mes études et de m'avoir accordé la chance de découvrir et de comprendre un monde autre que le notre.

El Hamdoulillah.

Je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers Parents, qui m'ont toujours accompagné, encouragé et soutenu durant mon parcours d'études, merci infiniment pour votre confiance. Je ferai de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

A mes trois frères adorés : **Cherif, Saïd et Ahmed.**

A mes chères sœurs : **Ferroudja, Naima, Yamina, Rachida, Nassima et Lilia.**

A mes **nièces** et **neveux** que j'adore.

A mon cousin **Billel.**

A mon cher binôme, **Nadjat.**

A tout mes **amis(es)** et **camarades** de la promo microbiologie appliquée.

HAMIDA

Merci pour votre soutien

Dédicaces



Avant tout, je remercie **le bon** Dieu de m'avoir toujours accompagné durant mes études et de m'avoir accordé la chance de découvrir et de comprendre un monde autre que le notre.

El Hamdoulillah.

Je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers Parents DJAMEL et Malika, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessés de me donner depuis ma naissance, jusqu'à aujourd'hui.

C'est grâce à vous que je suis arrivé à cette étape.

Je saurai vous rendre fiers inchallah !

A mon frère adoré : **MOUHEND AREZKI.**

A mes chères sœurs : **SEMHANE et RADIA.**

A mon beau frère : **IDRIS.**

A mon cher binôme : **HAMIDA.**

A tout mes **amis(es)** et **camarades** de la promo microbiologie appliquée.

NADJAT

Merci pour votre soutien

ADN	Acide désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique.
ATB	Antibiotique.
BHI	Brain Heart Infusion.
BHIA	Brain Heart Infusion Agar.
CCS	Cœur-cerveau-sang.
CHU	Centre hospitalo-universitaire.
CMP	Chloramphénicol.
DDT	Dichlorodiphényl-tricholoéthane.
ELIZA	Enzyme-linked immunosorbent assay.
LC	Leishmaniose cutanée.
LCL	Leishmaniose cutanée localisée.
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse.
LCM	Leishmaniose cutanéomuqueuse.
LCZ	Leishmaniose cutanée zoonotique.
LV	Leishmaniose viscérale.
NNN	Novy Nicole Mc Neal.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
PCR	Polymerase chain reaction.
PCR RFLP	PCR Restriction Fragment Length Polymorphism.
PSA	Promastigotes surface antigen.
SPM	Système des phagocytes mononuclées.
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise.

Figure 01 : Représentation schématique de la cellule de <i>Leishmania</i> indiquant les principaux organites.	5
Figure 02 : Leishmanies en culture, forme promastigote (MGG, G × 1 000).....	6
Figure 03 : Formes amastigotes de <i>Leishmania</i> sur un frottis de moelle osseuse après fixation au méthanol et coloration au Giemsa (G× 1 000)	6
Figure 04 : Phlébotomes de <i>Lutzomyia</i> (à gauche) et <i>Phlebotomus</i> (à droite).....	8
Figure 05 : Phlébotome femelle gorgé de sang	9
Figure 06 : Cycle évolutif de <i>Leishmania</i>	12
Figure 07 : Répartition mondiale des zones d'endémies des leishmanioses cutanées, Cutanéomuqueuse et viscérales	14
Figure 08 : Cas de leishmanioses viscérales en Algérie années 2000 à 2004.....	14
Figure 09 : Cas de leishmanioses cutanées en Algérie de 2000 à 2004.....	15
Figure 10 : Lésions de leishmaniose cutanée	16
Figure 11 : Cas clinique de leishmaniose, à gauche : LCD (Castellon, 2007), à droite : LCM	17
Figure 12 : Aspect clinique d'un enfant atteint de la LV	18
Figure 13 : schéma récapitulatif des champignons reçus.....	34
Figure 14 : Contention du lapin	38
Figure 15 : préparation et rasage de l'oreille du lapin.....	38
Figure 16 : désinfection de l'oreille du lapin	39
Figure 17 : Anesthésie de la peau de l'oreille du lapin	39
Figure 18 : Ponction du lapin	40
Figure 19 : <i>A. flavus</i> sous microscope coloré au bleu coton	43
Figure 20 : <i>A. niger</i> sous microscope coloré au bleu coton	43

Figure 21 : <i>Rhizopus sp</i> sous microscope coloré au bleu coton	43
Figure 22: <i>Trichophyton mentagrophites</i> sous microscope coloré au bleu coton.....	43
Figure 23 : <i>Cladosporium sp</i> au bleu coton sous microscope.....	43
Figure 24 : <i>Candida albicans</i> au bleu coton sous microscope.....	43
Figure 25 : Deux photos microscopiques représentent le développement du parasite en présence de champignon et l'apparition des filaments mycéliens sur milieu NNN.....	45
Figure 26 : Contamination à la fois par des bactéries et par une autre espèce fongique qui est <i>Fusarium sulanis</i> (en forme incurvée).....	46
Figure 27 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l'essai 1).....	48
Figure 28 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l'essai 1).....	48
Figure 29 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l'essai 1).....	49
Figure 30 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l'essai 2).....	50
Figure 31 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l'essai 2).....	51
Figure 32 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l'essai 2).....	51
Figure 33 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l'essai 3).....	53
Figure 34 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l'essai 3).....	53
Figure 35 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l'essai 3).....	54

Liste des Tableaux

Tableau I : Distribution géographique des différentes espèces de Leishmania.....	13
Tableau II : Les milieux de cultures utilisés en mycologie	24
Tableau III : Résultats de la 1ere lecture : le 16.03.2017 (1 ^{er} essai)	47
Tableau IV : Résultats de la 2eme lecture : le 20.03.2017 (1 ^{er} essai).....	47
Tableau V : Résultats de la 3eme lecture : le 23.03.2017 (1 ^{er} essai)	47
Tableau VI : Résultats de la 1ere lecture : le 23.03.2017 (2eme essai)	49
Tableau VII : Résultats de la 2eme lecture : le 27.03.2017 (2eme essai).....	49
Tableau VIII : Résultats de la 3eme lecture : le 30.03.2017 (2eme essai)	50
Tableau IX : Résultats de la 1ere lecture : le 23.03.2017 (3eme essai)	52
Tableau X : Résultats de la 2eme lecture : le 27.03.2017 (3eme essai).....	52
Tableau XI : Résultats de la 3eme lecture : le 30.03.2017 (3eme essai)	52

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction 1

Chapitre I : Rappel bibliographique

I . Leishmanies et leishmaniose..... 3

1. Historique 3

2. Epidémiologie 4

2.1. Le parasite 4

2.1.1. Classification 4

2.1.2. Morphologie de *Leishmania*..... 5

2.1.2.1. La cellule de *Leishmania*..... 5

2.1.2.2. La forme parasitaire de *Leishmania* 5

2.1.3. Génome et reproduction 7

2.1.3.1. Génome nucléaire..... 7

2.1.3.2. Génome kinétoplastique 7

2.2. Le vecteur 8

2.2.1. Morphologie 8

2.2.2. Taxonomie..... 9

2.2.3. Biologie 10

2.3. Hôtes réservoir 10

2.4. Cycle du parasite et transmission	11
2.4.1. Transmission	11
2.4.2. Cycle évolutif	11
3. Répartition géographique	12
4. Expression clinique de la leishmaniose.....	15
4.1. Leishmaniose cutanée (LC).....	15
4.1.1. Leishmaniose cutanée localisée (LCL)	16
4.1.2. Leishmaniose cutanée diffuse (LCD).....	16
4.2. Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)	16
4.3. Leishmaniose viscérale (LV).....	17
5. Diagnostic.....	18
6. Traitements des leishmanioses	19
6.1. Les médicaments	19
6.2. La vaccination	20
7. Prévention et prophylaxie.....	20
7.1. Action au niveau de l'Homme	21
7.2. Action au niveau du réservoir	21
7.3. La lutte contre le vecteur	21
II . Champignons	23
1. Définition	23
2. Milieux de culture	23
3. Classification	26
4. Les genres étudiés	26
4.1. <i>Aspergillus flavus</i>	26
4.2. <i>Aspergillus neiger</i>	27

4.3. <i>Cladosporium</i>	28
4.4. <i>Rhizopus</i>	28
4.5. <i>Penicillium sp</i>	29
4.6. <i>Candida albicans</i>	30
4.7. <i>Microsporium canis</i>	30
4.8. <i>Trichophyton mentagrophyte</i>	31
5. Interaction champignons-hôtes	31

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Type de l'étude.....	33
2. période et lieu d'étude	33
3. Matériels	33
3.1. Matériels biologiques	33
3.1.1. La souche du parasite utilisée.....	33
3.1.2. Les espèces fongiques utilisées	33
3.2. Matériels non biologiques	35
3.2.1. Réactifs et produits chimiques	35
3.2.2. Appareillage et verrerie	35
3.2.3. Consommable et autres produits	35
4. Déroulement de l'étude	36
5. Méthodes	36
5.1. Examen parasitologique direct	36
5.2. La culture.....	37
5.2.1. Culture de parasite.....	37
5.2.1.1. Ponction du lapin.....	37
5.2.1.2. Préparation du milieu CCS.....	40

5.2.1.3. Préparation de la gélose NNN	41
5.2.1.4. Préparation des milieux NNN	41
5.2.1.5. Préparation de l'urine stérile	41
5.2.2. Culture des champignons	42
5.2.2.1. Préparation du milieu Sabouraud	42
5.2.2.2. Coloration au bleu coton	42
5.2.3. Ensemencements	44
5.2.3.1. Ensemencement du parasite	44
5.2.3.2. Culture des champignons	44
5.2.3.3. Ensemencements de la culture mixte fongique-parasitaire	44
5.2.4. Lecture.....	45

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats de l'effet de la culture mixte sur la croissance de parasite <i>Leishmania</i> sur milieu NNN	47
1.1. Résultats du 1er essai : le 13.03.2017	47
1.2. Résultats du 2eme essai : le 20.03.2017.....	49
1.3. Résultats du 3eme essai : le 20.03.2017	52
2. Discussion	54

Conclusion et perspectives.....	56
--	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les leishmanioses sont des parasitoses du système réticulo-endothélial dont l'agent pathogène est un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Il s'agit d'une zoonose ou une anthroponose transmise par un moucheron hématophage qui est le phlébotome. Ces maladies incluent des formes viscérales (LV), des formes cutanées localisées (LCL), cutanées diffuses (LCD) et des formes cutanéomuqueuses (LCM). Cette multiplication de tableau clinique résulte à la fois d'un large éventail d'espèces et de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté (ANOFEL, 2014).

Les leishmanioses sont endémiques dans les zones tropicales et subtropicales de 98 pays et quatre continents : Afrique du nord et l'est, Amérique centrale et du sud, Asie du sud et Europe du sud. Au total, 350 millions de personnes sont exposées au risque de la maladie dont 12 millions sont atteints et 1.5 à 2 millions de nouveaux cas sont déclarés chaque année (Aubry et Gauzere, 2016).

Les leishmanioses se révèlent aujourd'hui beaucoup plus répandues qu'on ne le croyait. L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde (Moumni, 2015).

Les micromycètes sont des champignons microscopiques qui regroupent les levures et les champignons filamenteux (moisissures). Ce sont des microorganismes eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et de mitochondries. Ils sont ubiquitaires et très répandus dans la nature, notamment au niveau des végétaux en décomposition (Lecellier, 2013).

La liste des nouveaux champignons émergeant en médecine ne cesse de s'augmenter. Beaucoup d'espèces, en particulier les moisissures, issues du sol, de l'air ou des plantes et jadis inconnues de biologiste, ou qualifiées de « contaminants de laboratoire », sont réellement impliquées dans un processus pathologique (Chabasse et *al.*, 2002).

Ces champignons sont hétérotrophes, incapable d'assurer la photosynthèse. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Par conséquent, ils sont totalement dépendants d'autres êtres vivants pour leur fourniture en nutriments (glucides et hydrates de carbone) (Olivier et *al.*, 1991).

Cette incomplétude a poussé ces microorganismes à établir des interactions avec leurs hôtes allant du saprophyte au parasitisme, passant parfois par le commensalisme.

A ce jour, la contamination fongique dans des laboratoires de recherche est considérée comme un échec ; mais par curiosité scientifique, on a opté à prendre cet échec pour un début d'une nouvelle étude.

L'objectif de la présente étude est la recherche de l'effet d'une culture mixte : champignon-parasite *Leishmania* sur la croissance de ce dernier.

Est-ce que le champignon a un effet inhibiteur, ou par contre favorise le développement de *Leishmania* ? C'est ce qu'on va voir dans nos résultats.

Chapitre I :

Rappel bibliographique

I. *Leishmania* et leishmaniose

1. Historique

Les leishmanioses font partie des premières parasitoses à avoir été décrites, du moins dans leur forme cutanée. Déjà dès la plus haute antiquité, au troisième millénaire avant J.C des statuettes présentaient des lésions caractéristiques de la face. Al Bokhari, médecin Ouzbek, décrivit au X^{ème} siècle, cette affection cutanée et Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique. La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1982 puis en 1985 Cunningham découvrit le parasite dans un prélèvement du bouton d'Orient (Jarry, 1999).

Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* par Sir Ronald Ross en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (Forget, 2004).

La première culture fut obtenue par Nicolle en 1908, il compare les organismes de la peau décrits par Wright avec ceux de la rate découverts en 1903 par Leishman et Donovan et conclue qu'ils sont presque identiques du point de vue morphologique (Forget, 2004).

En 1921, les frères Sargent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur les scarifications cutanées. Mais la transmission par la pique ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber. Knowles, en 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot et Donatien le font pour la leishmaniose canine en 1930 (Mazlet, 2004).

En Algérie, le premier cas de leishmaniose cutanée appelé « clou de Biskra » a été décrit par Hamel en 1860 à Biskra, alors que le premier cas de leishmaniose viscérale a été décrit en 1911 par Lemaire en Kabylie.

En 1990, Rioux et *al*, présentent une nouvelle classification des *Leishmania*, basée sur les caractères biochimiques et le profil iso-enzymatique des souches des différents complexes.

En 2002, Papierok et *al* ainsi que Hugnet et *al*, démontrent que l'administration d'antigènes d'excrétion-sécrétion de promastigote (brevet Institut de recherche pour le développement et laboratoire Bio Vêto Test) induit une réaction immunitaire de type Th1 à l'encontre des *Leishmanies* amastigotes intramacrophagiques. En 2011, le groupe VIBRAC commercialise en France ce même vaccin sous le nom de Canileish (Mouloua et *al.*, 2014).

2. Epidémiologie

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania* transmis par la piqûre infectante d'un petit moucheron : le phlébotome femelle (Samba et al., 2013).

Il existe pas moins d'une vingtaine d'espèces pathogènes pour l'Homme, chez lequel elles déterminent des tableaux cliniques variés : forme cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale (Dedet, 1998). Cette dernière, est la plus grave puisqu'elle peut être mortelle sans prise en charge adéquate (OMS, 2010).

2.1. Le parasite

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés, parasites dihéteroxyènes à deux hôtes obligatoires : le diptère hématophage et un mammifère (Handman, 2001). Ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades successifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré dont l'homme (Dedet, 2009).

2.1.1. Classification

La classification du genre *Leishmania* d'après LEVINE et al. (1980), est la suivante :

Règne	Protista (Haeckel, 1866).
Sous-règne	Protozoa (Golfuss, 1817 et enend Siebold, 1848).
Phylum	Sarcomastigophora (Honigberg et Balanuth, 1963).
Sous-phylum	Mastigophora (Diesting, 1866).
Classe	Zoomastigophora (Calkins, 1999).
Ordre	Kinetoplastida (Honigberg, 1963 et enendVickerman, 1976).
Sous-ordre	Trypanosomatina (Kent, 1880).
Famille	Trypanosomatidae (Dofleinenend ; Grobben, 1905).
Genre	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903).

Bien qu'il n'y ait qu'un genre appelé *Leishmania*, on différencie deux sous-genres; *Leishmania* et *Viannia* selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur respectivement (Samake, 2006).

2.1.2. Morphologie de *Leishmania*

2.1.2.1. La cellule de *Leishmania*

Les *Leishmania* sont des eucaryotes unicellulaires pourvus d'un organe spécifique aux Kinetoplastidés, le kinétoplaste, situé en position antérieure. Il contient deux types de molécules d'ADN, les maxi-cercles et les mini-cercles. La composition cellulaire des *Leishmania* inclue des organites plus classiques tels que le noyau, le flagelle et sa poche flagellaire ou encore l'appareil de Golgi. La membrane plasmique est composée principalement de glycolipides de haut poids moléculaire, de glycoinositol-phospholipides de faible poids moléculaire et de protéines membranaires (McConville et Blackwell, 1991).

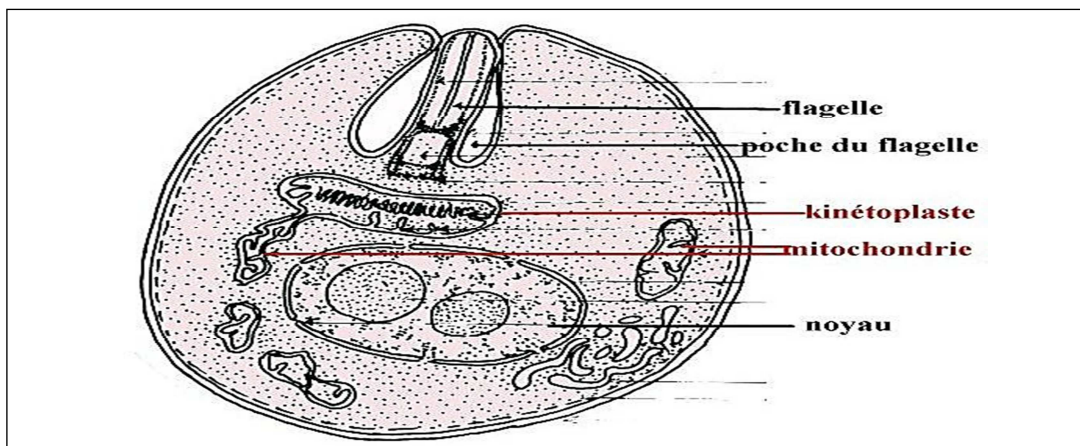


Figure 01 : Représentation schématique de la cellule de *Leishmania* indiquant les principaux organites (Mallorie, 2004).

2.1.2.2. La forme parasitaire de *Leishmania*

Les *Leishmania* ont un cycle de vie dimorphique qui se manifeste sous deux formes : non flagellée, intracellulaire dite amastigote chez les hôtes vertébrés dont l'homme et flagellée dite promastigote libre dans le tube digestif du phlébotome et dans le milieu de culture (ANOFEL, 2005).

- **Les promastigotes**

Ils sont des parasites extracellulaires, mobiles, se trouvent dans le tube digestif du phlébotome. Ils sont fusiformes, mesurent environ 20 micromètres de longueur et de 1 à 4 micromètres de largeur prolongés par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 micromètres de longueur et qui émerge dans leur pôle antérieur (Louis, 2009). Leurs noyaux sont approximativement centraux, les Kinétoplastes situés en position antérieure (Dedet, 2009).

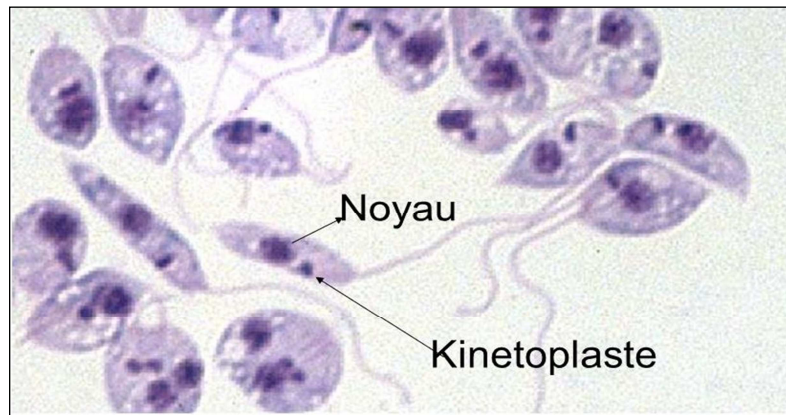


Figure 02 : Leishmanies en culture, forme promastigote (MGG, G \times 1 000) (Anofel, 2014).

- **Les amastigotes**

Étymologiquement signifie sans flagelles.

Ils sont des parasites immobiles et intracellulaires, nichent à l'intérieur du système des phagocytes mononucléés des mammifères. A ce stade, les leishmanies deviennent ovoïdes ou sphériques, mesurent 2 à 3 micromètres de diamètres (Samake, 2006). Leurs noyaux occupent un tiers du cytoplasme, les kinétoplastes sont situés tout près du noyau (Guillaume, 2009).

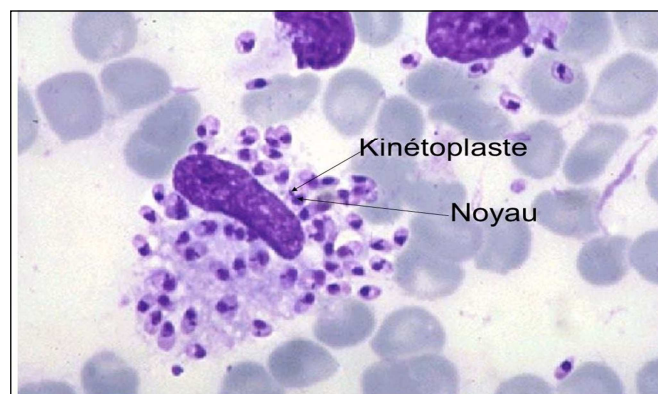


Figure 03 : Formes amastigotes de *Leishmania* sur un frottis de moelle osseuse après fixation au méthanol et coloration au Giemsa (G \times 1 000) (Anofel, 2005).

2.1.3. Génome et reproduction

Les *Leishmania* se multiplient par division binaire dans les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM) où elles inhibent la fonction phagocytaire du complexe lysosomes-phagosomes ainsi que l'activité péroxydasique et cytokinique (Moulinier, 2003).

Leishmania, comme tous les kinétoplastidés possède deux génomes, l'un nucléaire et l'autre kinétoplastique (Dedet, 2009).

2.1.3.1. Génome nucléaire

Sa taille est d'environ 35 méga bases. Il est haploïde et composé de 36 chromosomes (Wincker et *al.*, 1996). Il est caractérisé par sa grande densité des gènes qui est de 1 gène pour 3,5 kilo bases. Il ne possède pas d'introns et les gènes s'organisent en grandes unités polycistroniques. Il est riche en G/C avec une proportion de 60 % (Alvarez et *al.*, 1994) et contient peu de séquences répétées (Ouellette et *al.*, 2003).

Grace aux travaux de séquençage, le génome des *Leishmania* est de mieux en mieux connu. Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. De cette réunion est né le *Leishmania* Génome Network, un consortium de laboratoires impliqués dans la cartographie, le séquençage et l'annotation des génomes (Ouellette et *al.*, 2003).

2.1.3.2. Génome kinétoplastique

Il est constitué de deux types d'ADN circulaires : les maxi-cercles et les mini-cercles entrelacés dans un réseau compact (Simpson et *al.*, 1987).

Les maxi-cercles, équivalent de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs, sont en nombre de 10 à 30 identiques, d'une taille de 20 à 40 kilo bases, codent pour les protéines de la chaîne de transport des électrons, l'ARN ribosomal et l'ARN guide qui intervient dans un processus de modification post transcriptionnelle original de l'ARN messenger appelé : ARN-editing (Ravel et *al.*, 1998).

Les mini-cercles sont en nombre de 1000 à 10 000 et ont une taille inférieure à 1 kilo base. Ils codent pour l'ARN guide qui intervient dans le processus de modification de l'ARN transcrit des gènes des maxi-cercles par insertion ou délétion d'uridine (Ravel et *al.*, 1998). Ces mini-cercles contrairement aux maxi-cercles sont variables d'une espèce à une autre et à l'intérieur même d'une même espèce (Stuart, 1991).

2.2. Le vecteur

Le phlébotome est un insecte, diptère, nématocère de la famille des Psychodidae et de la sous famille des Phlebotominae qui regroupe environ 800 espèces largement réparties dans les régions tropicales et tempérées. Deux genres sont impliqués dans la transmission des leishmanioses : le genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et le genre *Lutzomya* dans le Nouveau Monde (Izri et *al.*, 2006).



Figure 04 : Phlébotomes de *Lutzomya* (à gauche) et *Phlebotomus* (à droite) (Wilson et Ray, 2010).

2.2.1 Morphologie

Le phlébotome est un moucheron appelé encore mouche des sables. Il mesure de 1,5 à 3 mm. Sa tête fait avec l'axe de son corps un angle de 45° lui donnant un aspect trapu. Il est velu, de couleur jaunâtre. Il possède de longues pattes. Ses ailes sont lancéolées, dressées en V au repos (Dolmatova et Demina, 1971). Seule la femelle est hématophage et assure la transmission de la leishmaniose (Dedet, 2001).

Ses œufs sont fusiformes de 0,35 à 0,40 mm de longueur, de couleur blanchâtre à jaunâtre puis deviennent brunâtre quelques heures après la ponte (Dolmatova et Demina, 1971).



Figure 05 : Phlébotome femelle gorgé de sang (Dedet, 2001).

Ses larves sont vermiformes, longues de 0,5 à 4 mm et ont un corps à 12 segments dont le dernier porte deux paires de soies caudales longues (Dolmatova et Demina, 1971).

2.2.2. Taxonomie

Position systématique selon Dolmatova et Demina (1971).

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous-Classe	Pterygota
Super-Ordre	Endopterygota
Ordre	Diptera
Famille	Psychodidae
Sous-Famille	Phlebotominae
Genre	<i>Phlebotomus</i> (Loew, 1845)

Selon Bitam (2010) plus de 24 espèces de phlébotomes sont répertoriées en Algérie, quatre d'entre elles sont impliquées dans la transmission de cette parasitose, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlébotomus perfiliewi*, *Phlebotomus longicuspis* et *Phlebotomus papatasi*.

2.2.3. Biologie

Les phlébotomes présentent un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago. Les phlébotomes ont une activité essentiellement nocturne et crépusculaire, mais très sensibles aux courants d'air, ils ne sortent que lorsque la soirée est calme. Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils disparaissent l'hiver, la pérennité de l'espèce étant assurée par les larves hibernantes de stade IV. Leur densité, leur période et leur disparition varient suivant l'altitude, la saison et l'espèce (Abonnenc, 1972).

Seules les femelles sont hématophages. Après un repas sanguin suffisant, elles déposent des œufs isolément ou par petits groupes dans les gîtes où se développent les larves. Le nombre d'œufs pondus est assez variable et peut dépasser la centaine. La piqûre est douloureuse car ces insectes dilacèrent les téguments avec leurs pièces buccales pour aspirer le sang (Ripert, 1996).

2.3. Hôtes réservoirs

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées. Les mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres, selon les espèces de *Leishmania* : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (Dedet, 2009).

On peut qualifier les leishmanioses d'anthroponose ou de zoonoses selon que l'humain soit l'hôte direct ou l'hôte accidentel du parasite. En effet, certains vecteurs sont attirés par l'humain alors que la majorité a plutôt tendance à infecter d'autres mammifères.

Ceux-ci varient selon l'habitat. Les réservoirs présents dans le Nouveau Monde sont entre autres les paresseux, les lapins, les primates et les chauves-souris (Pinto et *al.*, 2001). Dans l'Ancien Monde, ce sont surtout les petits rongeurs et les chiens (Handman, 2001).

En Algérie les leishmanioses sont zoonotiques, ainsi les réservoirs sont présentés par les rongeurs et les chiens (Bachi, 2006).

2.4. Cycle du parasite et transmission

2.4.1. Transmission

La piqûre infectante du phlébotome représenté le mode habituel de contamination. Des cas exceptionnels de transmission transplacentaire et par la transfusion sanguine ont été rapportés dans la littérature. La transmission par échange de seringue usagée est responsable de l'atteinte élevée des toxicomanes intraveineux au cours de la co-infection leishmaniose/Sida dans le sud de l'Europe (Alvar et Jimenez, 1994).

2.4.2. Cycle évolutif

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, le diptère hématophage et un mammifère (Handman, 2001).

Lors de son repas sanguin, une femelle phlébotome infectée peut injecter entre 10 à 100 parasites dans le derme de l'hôte vertébré (Sacks et Kamhawi, 2001a). Les promastigotes de *Leishmania* sont introduits dans les capillaires sanguins par la piqûre du vecteur. A l'intérieur, ils pénètrent le macrophage par phagocytose. Les parasites sont enfermés dans une vacuole parasitophore et soumis à une série d'attaques de la part du système de défense du macrophage pour l'éliminer, ceci inclut la libération d'oxyde nitrique et des hydrolases lysosomales. Le parasite se protège de ces attaques et, sous la forme d'amastigote, se produit à l'intérieur du macrophage jusqu'à la mort de celui-ci, ce qui libère les parasites qui vont pouvoir infecter d'autres macrophages (Alvar, 2001).

Cependant, la femelle phlébotome peut aussi ingérer des parasites présents dans le derme du vertébré en aspirant des macrophages infectés et ainsi se contaminer. Ces macrophages vont être lysés dans le tractus digestif du vecteur et les amastigotes libérés vont ainsi pouvoir se transformer en promastigotes de division. Ces derniers vont se multiplier par scissiparité et sous l'influence du pH qui s'acidifie peu à peu lorsque le parasite remonte le tractus digestif, les formes de division vont arriver à maturation et réaliser leur métacyclogenèse, c'est-à-dire devenir infectieuse (Sacks et Kamhawi, 2001).

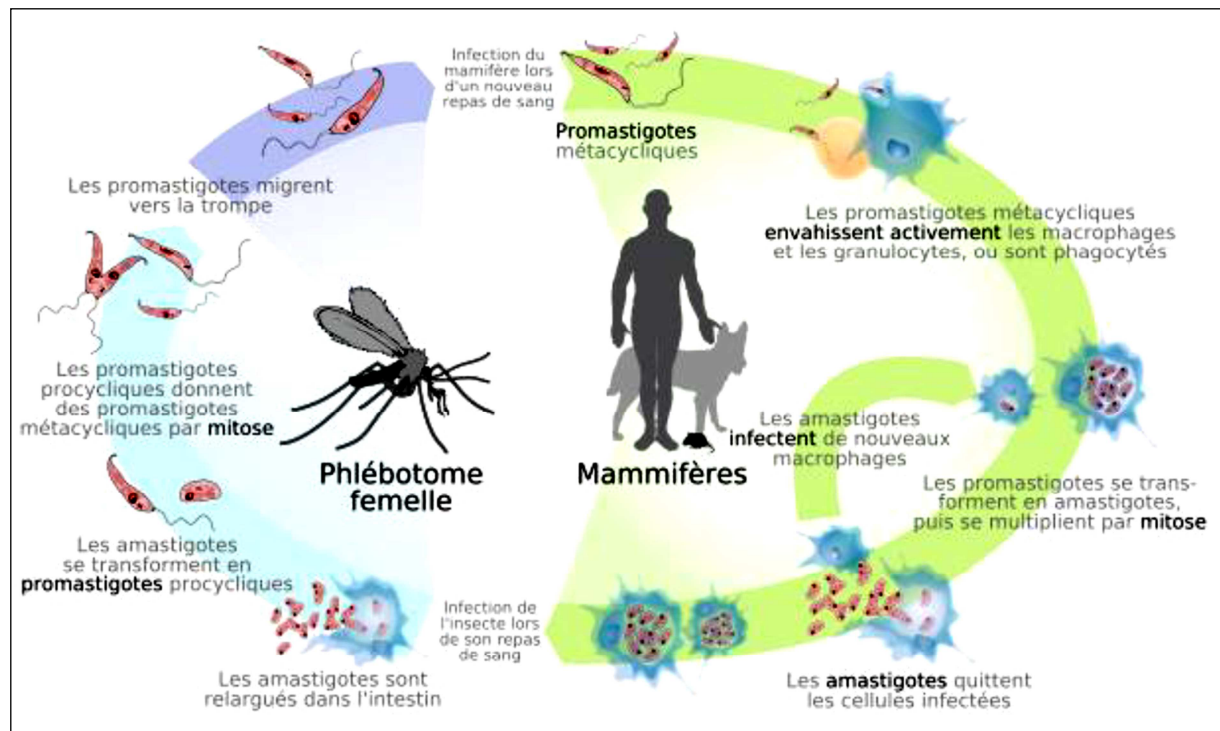


Figure 06 : Cycle évolutif de *Leishmania* (Alvar, 2001).

3. Répartition géographique

- **Les leishmanioses dans le monde**

Les leishmanioses sont présentes dans les zones tropicales et subtropicales de 98 pays, dont 72 pays en développement exposant 350 millions de personnes (Aubry et Gauzere, 2016). Les deux grandes situations géographiques sont l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amérique de Nord, du Sud et Centrale). Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania*. Par contre, le sous genre *Viannia* ne se retrouve qu'en Amérique (Handman, 2001).

Tableau I : Distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania* (Handman, 2001).

Espèce	Distribution géographique
Leishmaniose cutanée	
<i>L. aethiopica</i>	Ethiopie, Kenya.
<i>L. major</i>	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique.
<i>L. Mexicana</i>	Amérique centrale et du sud.
<i>L. tropica</i>	Europe, Asie et Afrique du Nord.
Leishmaniose cutaneo-muqueuse	
<i>L. braziliensis</i>	Amérique centrale et du sud.
<i>L. peruviana</i>	Amérique du sud.
Leishmaniose viscérale	
<i>L. chagasi</i>	Amérique du sud.
<i>L. donovani</i>	Afrique et Asie.
<i>L. infantum</i>	Bassin méditerranéen.

La prévalence mondiale est estimée à 12 millions de cas. L'incidence des leishmanioses est en augmentation dans le monde. On enregistre entre 1,5 et 2 millions de nouveaux cas de leishmaniose chaque année dans le monde et environ 40 000 décès, ceux-ci dus à la leishmaniose viscérale. Six pays recensent 90 % des cas de leishmaniose viscérale : Inde, Bangladesh, Népal, Soudan, Soudan du sud et Brésil. Cette situation alarmante résulte de l'augmentation de la transmission vectorielle et pour la leishmaniose viscérale de l'augmentation du réservoir humain lié à l'infection à VIH/Sida (Aubry et Gauzere, 2016).

Dans le bassin méditerranéen occidental, le nombre de cas humains, autrefois relativement faible, s'est accru au cours de la dernière décennie. Cette augmentation est essentiellement liée à deux facteurs :

- L'immunodépression acquise à la suite de l'infection par le VIH ou induite par des thérapeutiques diverses dans les cas de transplantation d'organes ou de traitements corticoïdes au long cours ;
- L'accroissement récent de la population canine, sous la dépendance de facteurs socioculturels (Mouloua, 2014).

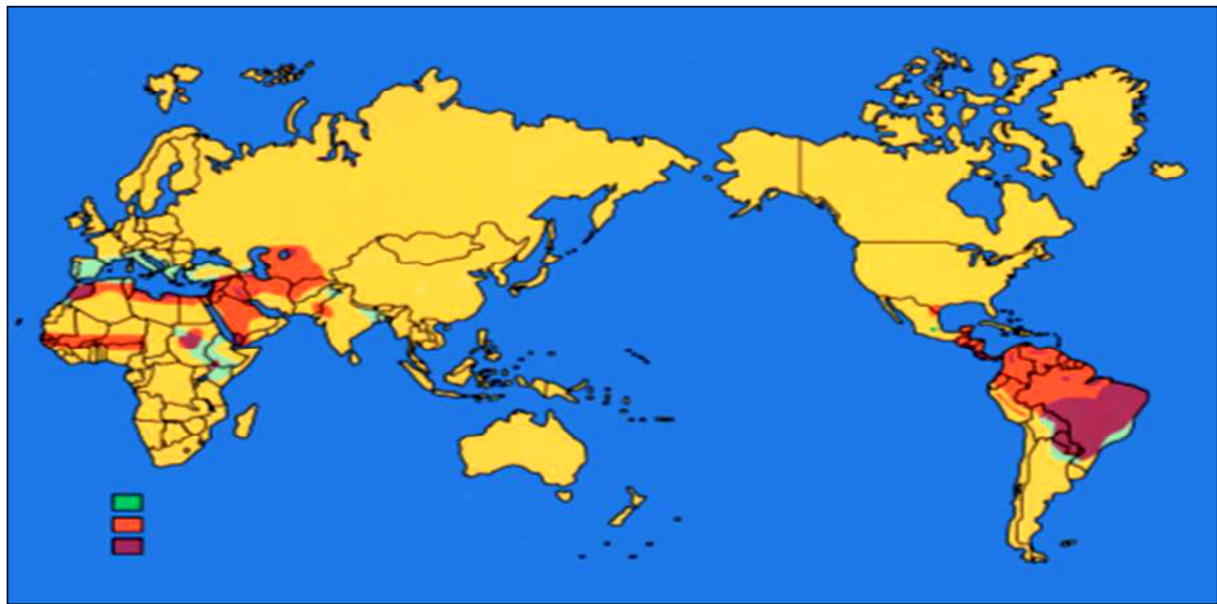


Figure 07 : Répartition mondiale des zones d’endémies des leishmanioses cutanées, Cutanéomuqueuse et viscérales (Benyahia, 2009).

- **Les leishmanioses en Algérie**

L’Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde, selon le Ministère de la santé, un totale de 7784 cas de leishmaniose a été déclaré en 2008 (Ramli, 2013). A côté des anciens foyers, Tizi-Ouzou, Boumerdès, Médea, Constantine, Jijel, de nouveaux foyers sont apparus ; à l’Est, Annaba et Collo ; au centre, la Mitidja, la Chiffa et Chlef et à l’Ouest, Tlemcen et Oran. L’existence de leishmaniose canine dans la région de Tlemcen rend cette ville de l’Ouest un territoire potentiel pour cette forme viscérale (Moumni, 2015).

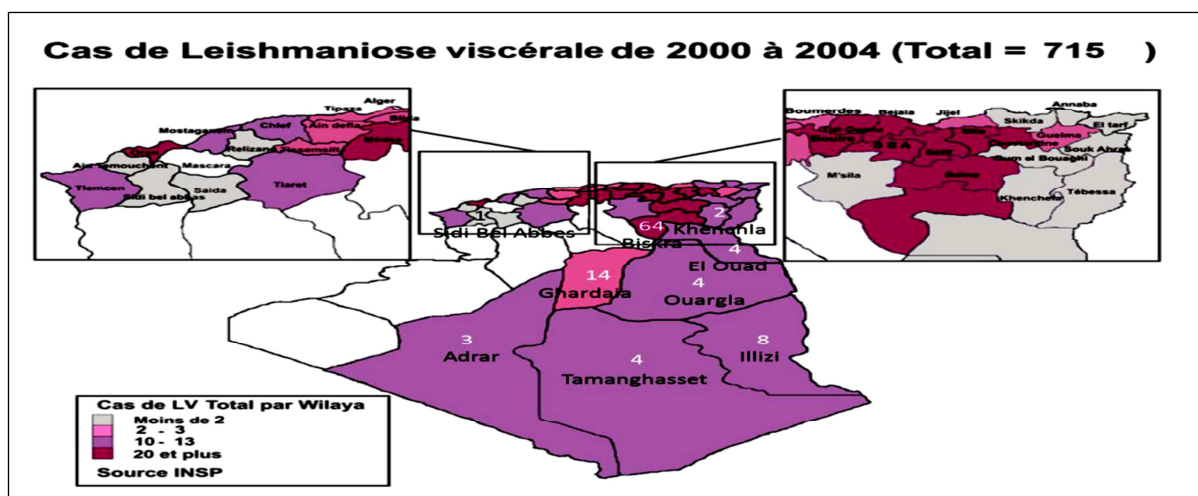


Figure 08 : Cas de leishmanioses viscérales en Algérie années 2000 à 2004 (Rezalleh, 2008).

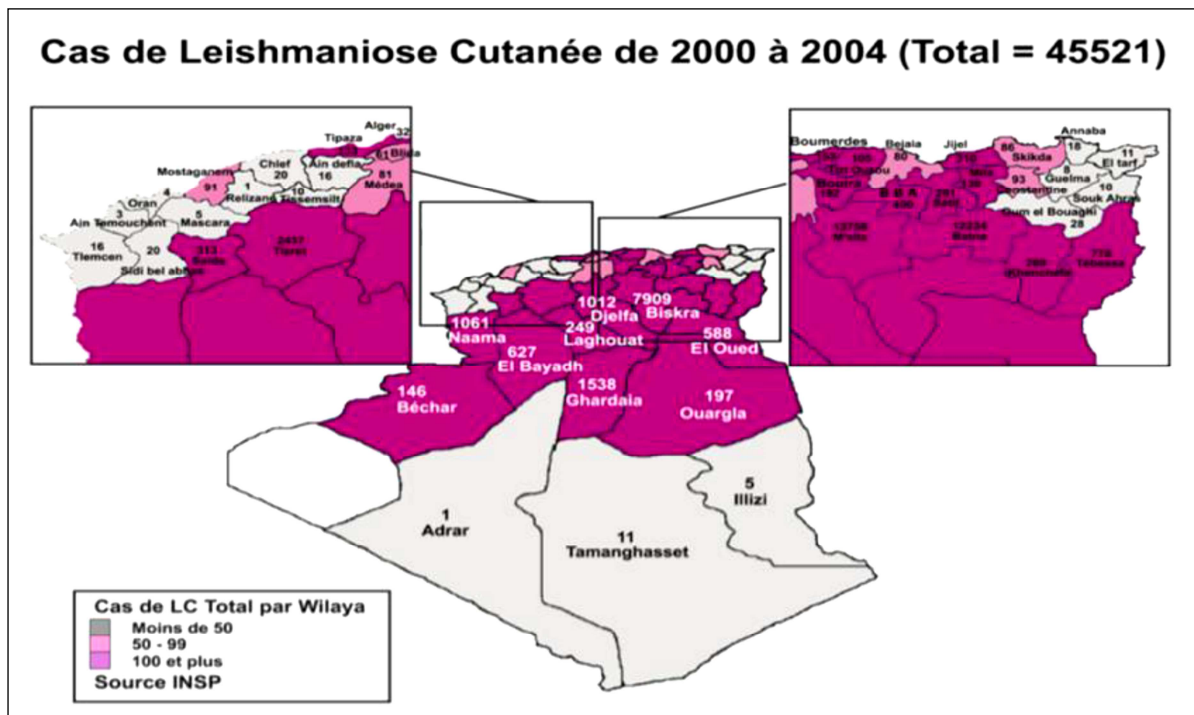


Figure 09 : Cas de leishmanioses cutanées en Algérie de 2000 à 2004 (Rezalleh, 2008).

4. Expression clinique de la leishmaniose

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies d'expression cliniques variées ayant des caractéristiques symptomatologiques communes : fièvre, abdomen volumineux, apathie généralisée, maux de tête et vertiges, perte du poids, transpiration abondantes et diarrhée (Jebbour, 2013).

4.1. La leishmaniose cutanée (LC)

Selon l'origine géographique on distingue dans l'Ancien Monde la leishmaniose cutanée zoonotique due à *Leishmania major* avec des rongeurs sauvages comme réservoirs et la leishmaniose cutanée anthroponotique due à *Leishmania tropica*. Dans le Nouveau Monde, les LC sont principalement dues à des espèces à large distribution sud-américain (*L. amazonensis* et *L. guyanensis*) ou à des espèces limitées à l'Amérique centrale (*L. mexicana* et *L. panamensis*) (Marty et Rosenthal, 2002).



Figure 10 : Lésions de leishmaniose cutanée (David et Craft, 2009).

4.1.1. La leishmaniose cutanée localisée (LCL)

C'est le classique bouton d'orient, clou de Biskra ou bouton de Gafsa causé par *L. major*, a pour réservoir de parasites des rongeurs sauvages et évolue spontanément vers la guérison en 2 à 4 mois, alors que *L. tropica* donne des formes uniquement anthroponotiques (réservoir humain) évoluant lentement (Aubry et Gauzere, 2016).

Toutes les espèces anthropophiles de *Leishmania* peuvent être responsables de LC, y compris les espèces habituellement viscérotropes comme *L. infantum*, qui peut provoquer un grand nombre d'ulcérations dermiques jusqu'à 200 dans certains cas sur les parties exposées du corps (visage et bras), ce qui entraîne un grave handicap et laisse au malade des cicatrices indélébiles (Mallorie, 2004).

4.1.2. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Cette forme produit des lésions cutanées étendues nodulaires, non ulcérées, anergiques, pseudolépromeuses et particulièrement difficiles à traiter. Cette forme de la maladie est attribuée aux espèces *L. aethiopica* et *L. amazonensis* (Bachi, 2006).

4.2. Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Limitée géographiquement au continent Sud-Amérique, la LCM, appelée Espundia, est due aux espèces appartenant au complexe *L. braziliensis* (Mihoubi et al., 2006). C'est une atteinte cutanée initiale classique, puis 1 à 40 ans plus tard, apparaissent des métastases

muqueuses de la sphère ORL (nez, bouche), entraînant une perforation de la cloison nasale (Sacks et Kamhaoui, 2001).

Un à trois pour cent des patients ayant contracté une LC feront une LCM (Aubry et Gauzere, 2016).



Figure 11 : Cas clinique de leishmaniose, à gauche : LCD (Castellon, 2007), à droite : LCM (Dedet, 2009).

4.3. Leishmaniose viscérale (LV)

Appelée également Kala-azar, pour la forme indienne, c'est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100 % en l'absence de traitement.

La LV se caractérise par des poussées de fièvre irrégulière, une perte de poids importante, une hépato-splénomégalie (gonflement de la rate et du foie) et de l'anémie. Il existe deux formes cliniques de leishmaniose viscérale : la LV infantile et la LV de l'adulte, l'agent causal étant *L. infantum* (Ramli, 2013).

Il existe d'autres agents causaux de la LV, c'est l'état immunodépresseur, en particulier la corticothérapie au long cours et les transplantations d'organes (foie, rein) favorisent le développement de la LV (Aubry, 2012).

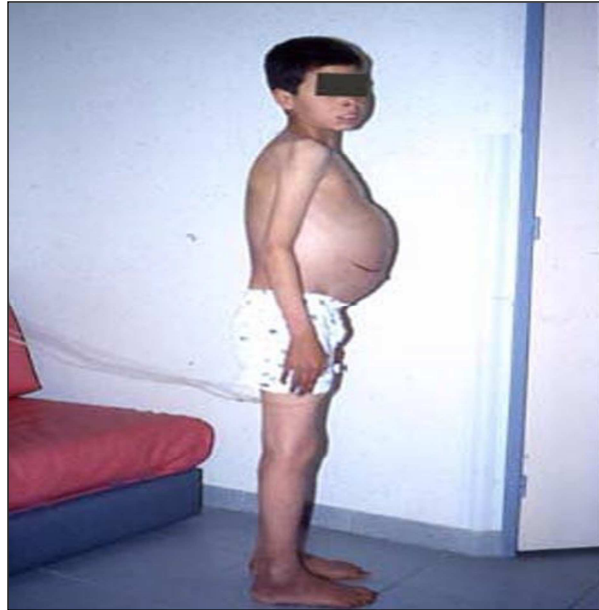


Figure 12 : Aspect clinique d'un enfant atteint de la LV (Anofel, 2014).

5. Diagnostic

Le vaste spectre clinique de la leishmaniose a souvent amené les chercheurs à trouver plusieurs façons de l'identifier et de la différencier des symptômes provoqués par d'autres maladies communes dans les zones endémiques de la leishmaniose (la lèpre, les cancers de peau, la tuberculose et les mycoses cutanées). Les méthodes utilisées pour le diagnostic de la leishmaniose sont divisées en méthodes d'isolement et en méthodes immunologiques (Piscopo et Azzopardi, 2007).

La détection au microscope est la méthode habituellement utilisée pour le diagnostic des deux types de leishmaniose (LC et LV) ; le parasite étant sous la forme amastigotes dans des prélèvements des macrophages sur frottis (moelle osseuse, rate et lésions cutanées). Les frottis fixés au méthanol, sont colorés au Giemsa (Mihoubi et *al.*, 2006). Une autre option consiste en la culture de tissus dans un milieu spécial (NNN) suivie d'une inoculation d'animaux comme les hamsters (Cabanillas, 2001).

L'ADN de *Leishmania* peut être aussi détecté par PCR au sein de l'échantillon à analyser, cette technique permet l'amplification *in vitro* des séquences d'ADN définies. En quelques heures, on peut obtenir jusqu'à un million de copies d'une séquence d'ADN spécifique (Frahtia-Bentamane, 2015). D'autres techniques immunologiques (IFI, ELISA et test d'agglutination) sont utilisées dans le diagnostic de la LV ; elles font appel à des antigènes qui sont couramment préparés à partir des formes promastigotes de culture d'espèce de *Leishmania* (Mihoubi et *al.*, 2006).

6. Traitement des leishmanioses

6.1. Les médicaments

- **Antimoniés pentavalents**

Les dérivés pentavalents de l'antimoine (Glucantime ou antimoniate de meglumine et Pentostam ou Stibogluconate de sodium) sont utilisés en première intention contre la leishmaniose, et ce depuis les années 1920. Ils servent à traiter la majorité des leishmanioses humaines excepté la LCD. Il est à noter que la toxicité de ces dérivés est bien connue ainsi que les nombreux effets secondaires et la résistance parasitaire croissante à ces composés. Cette résistance développée par *Leishmania* envers ces médicaments est de plus en plus préoccupante (Sundar, 2001).

Le traitement aux antimoniés (par voie intramusculaire, intraveineuse ou par voie sous-cutanée) dure 20 jours pour une LC et un mois pour une LV. Dans les cas de non réponse au traitement par antimoniés, la pentamidine et l'amphotéricine B prennent le relais (Anofel, 2014).

- **La pentamidine**

Pour une leishmaniose cutanéomuqueuse, la pentamidine est préférentiellement utilisée, il s'agit d'une diamine aromatique commercialisée sous le nom de Pentacarinat[®] (Sundar et al., 1997a). Elle s'administre par voie parentérale et par l'injection. La pentamidine peut induire des effets secondaires immédiats, de type allergique ou local, surtout en cas de perfusion rapide (Anofel, 2014).

- **Amphotéricine B**

Connue sous le nom de Fungizone[®] est un antibiotique utilisé depuis les années 1950. De nos jours, elle est utilisée sous forme liposomiale (Ambisome[®]) beaucoup moins toxiques, et en particulier dans le cas d'infections résistantes aux antimoniés (Sundar et al., 1997a).

Cependant, la pentamidine et l'amphotéricine B ont un coût élevé et ne peuvent pas être utilisées en routine dans les pays pauvres (Anofel, 2014).

- **La Miltéfosine[®]**

Outre les dérivés classiques des antimoine, un nouveau médicament est venu redonner espoir aux malades (et aux chercheurs) en 2002 : la Miltéfosine[®] (Fischer, 2001 ; Bhattacharya et *al.*, 2004).

Ce médicament oral est commercialisé par Zentaris/ASTA Medica AG (Allemagne). Son efficacité est estimée à 97 % de guérison chez les patients indiens atteints de la LV (Bhattacharya et *al.*, 2004).

- **Autres anti-*Leishmania***

D'autres molécules peuvent être utilisées en complément telles : l'allopurinol, le kétoconazole, l'itraconazol (Kuyucu et *al.*, 2001), la paromycine (Thakur et *al.*, 2000) et l'imukin[®] (Falcoff et *al.*, 1994).

6.2. La vaccination

La voie de la leishmanisation, inoculation de parasites vivants, est actuellement très étudiée. En effet les personnes atteintes d'une leishmaniose dans le passé, se retrouvent immunisées contre de nouvelles infections. De cette constatation est née l'idée que l'injection de parasite vivants pouvait conduire au même résultat (Gradoni, 2001).

Différentes formes d'inoculations ont donc été étudiées : des parasites atténués, des fractions purifiées de lysats parasitaires, des protéines recombinantes et des peptides synthétiques (Spitzer, 1999 ; Rafati, 2000) ou bien encore des vaccins d'ADN (Melby, 2000).

Mais à ce jour, aucun vaccin n'est commercialisé. Notons que la recherche vaccinale avance plus vite du côté de la leishmaniose canine. En effet l'équipe de docteur Lemesre (laboratoire pathogénie des Trypanosomatidae) de l'IRD de Montpellier a identifié des antigènes candidats (PSA : Promastigote Surface Antigène) qui ont révélé une protection de 90 % contre la leishmaniose canine en région méditerranéenne. Ce vaccin est au cour de commercialisation et de publication (Holzmuller et *al.*, 2003 ; Lemesre, 2003).

7. Prévention et prophylaxie

Les leishmanioses sont considérées comme l'une des maladies tropicales négligées. Elles constituent l'une des maladies tropicales négligées. Elles constituent l'une des préoccupations majeure de l'OMS, au même titre que le SIDA, le paludisme et la tuberculose ; c'est d'ailleurs un des six programmes de lutte prioritaire pour l'OMS (Carré et *al.*, 2010).

En 2010, l'OMS estime qu'il est possible de mettre à l'échec les leishmanioses grâce à l'amélioration des moyens diagnostiques et thérapeutiques ainsi que la lutte contre le vecteur et les réservoirs (OMS, 2010).

La lutte contre les leishmanioses consiste à agir sur les différents maillons de la chaîne de transmission afin de rompre le cycle évolutif du parasite (Rezkallah, 2009).

7.1. Action au niveau de l'Homme

Le renforcement du dépistage actif permet de déterminer les sujets atteints qui doivent être suivis et traités, de mieux cibler la lutte dans les foyers humains et prévenir les flambées épidémiologiques. L'amélioration des moyens diagnostiques ainsi que la disponibilité des médicaments est un axe de lutte. La prophylaxie individuelle repose sur l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthriinoïdes de synthèse, le port de vêtements recouvrant le maximum de la surface corporelle et l'utilisation des produits répulsifs sur les zones de peau découvertes. Chez les patients immunodéprimés traités pour une LV, une prophylaxie secondaire est recommandée pour éviter les rechutes (Dedet, 2001 ; Carré *et al.*, 2010).

7.2. Action au niveau du réservoir

Le réservoir principal est le chien. Le traitement de tous les chiens atteints ne semble pas être une stratégie efficace du fait des rechutes fréquentes et du risque de développement de résistance de parasite par l'utilisation répétée des molécules anti-leishmaniennes. Leur abattage semble être la seule solution. La prévention de l'infection canine est la lutte contre le réservoir ; elle consiste à faire porter des Scalibor (colliers imprégnés d'insecticides) aux chiens vivant en zone d'endémie (Afroune, 2016).

7.3. La lutte contre le vecteur

Parmi les outils utilisés dans la lutte antivectorielle, on trouve la pulvérisation à l'intérieur et autour des habitations d'insecticides pyréthriinoïdes à effet rémanent (persistant) et l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides. Cette méthode est la plus efficace contre le vecteur endophile. La pulvérisation à large échelle de DDT (Dichlorodiphényl-Trichloroéthane), donne également de bons résultats. La lutte contre les larves est plus difficile en raison de leur caractère terricole (Carré *et al.*, 2010).

L'éducation pour la santé en vue d'encourager la participation active du public à des mesures vivantes à l'éradication des phlébotomes dans les secteurs urbains (Safjanova, 1971).

Les pays doivent être incités à collaborer sur une base régionale ou sous-régionale, aux études épidémiologiques et aux mesures de lutte. Des protocoles types permettraient l'analyse comparative des données, l'échange et la diffusion des renseignements doivent être encouragés. Dans ce contexte, l'OMS peut jouer un rôle important en tant qu'organe de coordination (Zahar, 1979).

II .Champignons**1. Définition**

Les champignons appelés aussi mycètes, sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou levuriforme. Cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature (Chabasse et *al.*, 2002).

Les champignons ont un matériel génétique confiné dans un noyau au même titre que les plantes et les animaux. Ils possèdent toute fois un certains nombre de caractéristiques qui en font un groupe à part : parois contenant de la cellulose et de la chitine, absence de chlorophylle et de mobilité (Marie-Alix et *al.*, 2002).

Une autre de leur caractéristique remarquable est leur reproduction. Ils produisent en effet un grand nombre de spore, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion et de contamination considérable. Ces spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui seront la base de leur classification (Chabasse et *al.*, 2002).

Leur principal approvisionnement en carbone est constitué par de la matière organique préformée. Ils sont donc totalement dépendants des végétaux ou animaux, vivants ou morts pour leur fourniture en glucides ou hydrates de carbone (Olivier et *al.*, 1991).

2. Milieux de culture

De très nombreux milieux sont utilisables pour la culture des champignons, certains sont très spécifiques d'un groupe d'espèces d'autres permettent la culture de très nombreuses espèces.

L'aspect cultural des moisissures peut considérablement changer d'un milieu à l'autre (ESIAB, 2017).

Tableau II : Les milieux de cultures utilisés en mycologie (Brigitte Veron, 2016).

	Milieux	Principaux constituants	Intérêts
Milieux d'enrichissement	Milieu de Sabouraud (liquide)	-peptone -glucose	-Etude morphologique des levures. -Contrôles de stérilité.
Milieu d'isolement non sélectif	Gélose Sabouraud pH= 5-5.6	-peptone -glucose -agar	-Isolement des champignons pathogènes à partir de produits non souillés par des bactéries ou champignons saprophytes. -Contrôles de stérilité (produits pharmaceutiques).
Milieux d'isolement sélectifs	Gélose Sabouraud+chloramphénicol(CMP)	-Sabouraud -CMP : ATB à large spectre	Inhibition de la plupart des contaminants bactériens.
	Gélose Sabouraud +gentamicine	-Sabouraud + gentamicine : inhibition des bacilles à Gram - résistants au CMP.	Inhibition des bacilles à Gram-résistants au CMP.
	Gélose Sabouraud+cycloheximide (=actidione)	-Sabouraud Cycloheximide : inhibe les	Isolement sélectif des dermatophytes (et

		champignons saprophytes.	autres.champignons pathogènes).
	Milieu DTM (Dermatophytes Test Medium) de Taplin	-Peptone -Glucose -Cycloheximide -Chloramphénicol -Rouge de phénol -Agar	Tous les dermatophytes font virer au rouge violacé le milieu Taplin (mais aussi d'autres moisissures).
	chromID Candida/SGC	Substrat chromogène d'hexosaminidase/ Gentamicine et chloramphénicol	Isolement des levures et moisissure et identification de <i>C.albicans</i> .
Milieus d'identification	PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile)	-Pomme de terre -Carotte -Bile (agent tensio-actif : favorise la formation de pseudo-mycélium)	Milieu pauvre pour la mise en évidence de : -pseudomycélium -blastospores -chlamydozoospores (identification de <i>C.albicans</i>).
Milieus d'identification	RAT (Riz, Agar, Tween)	-Riz -Tween (agent tensio-actif) -Agar	Idem PCB.
	Milieu pour blastèse		Identification de <i>C.albicans</i>
	Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar)	-Pomme de terre -Dextrose -Agar	Culture et numération des levures et moisissures.

Milieu de Czapek	-saccharose -Sels -Agar	Identification des <i>Aspergillus</i> .
Milieu peptoné à 3% (Sabouraud conservation)		Différencier <i>M.persicolor</i> (colonies Rose-lilas), de <i>T.mentagrophytes</i> (colonies Blanc-crème).

3. Classification

La classification de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (1970) modifiée par Kwon Chung et Bennett (1992), puis par de Hoog (1995), est la plus utilisée actuellement.

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée : les Mastigomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou *Fungi imperfecti* (Chabasse et al., 2002).

4. Les genres étudiés

4.1. *Aspergillus flavus*

- Caractères cultureux

- Recto : colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert jaune.

- Verso : incolore, rosé ou brun-rouge foncé.

- Croissance rapide (2 à 3 jours).

- Optimum thermique : 37°C (Chabasse et al., 2002).

- Morphologie microscopique

- Conidiophore : long, 1 mm et parfois jusqu'à 2.5 mm, hyalin, verruqueux avec des aspérités.

- Vésicules : sphérique, 25 à 45 μm .

- Phialide : directement insérées sur la vésicule et portées par des métules.

- Conidies : globuleuse à subglobuleuses, vert pale, échenillées, 3.5 à 4.5 μm .

- Tête aspergillaire : unisériée ou bisériée, 300 à 400 μm de long, radiée, puis se devisant en plusieurs colonnes sporales mal individualisées.

- Pas de reproduction sexuée connue (Chabasse et *al.*,2002).

4.2. *Aspergillus neiger*

- Caractères cultureux

- Recto : colonies d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires.

- Verso : incolore à jaune pâle.

- Croissance rapide (2 à 3 jours).

- Optimum thermique : 25 à 30 C, mais il peut croître jusqu'à la température de 47 à 48C° (Osmani, 2007).

- Morphologie microscopique

- Conidiophore : lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long (1.5 à 3 mm).

- Vésicule : supérieure de 40 μm de diamètre, porte des Phialide.

- Phialide : disposés sur tout le pourtour de la vésicule et sont portés par une cellule stérile (ou métule) directement insérée sur la vésicule.

- Conidies : spores asexuées, unicellulaire, globuleuse de 2 à 3 μm de diamètre, produite par les phialides, noires ou brun foncé. Elles sont souvent disposées en chaîne et dispersées par le vent.

-Tête aspergillaire : globuleuse et radiée, noire à maturité.

-Pas de reproduction sexuée connue (Quatresous, 2011).

4.3. *Cladosporium*

- Caractères cultureux

- Leur croissance est lente à modérément rapide sur tous les milieux de mycologie.

- Ils ne poussent généralement qu'à 20-25 C°, (mais certaines espèces sont thermophiles).

- Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse. La couleur va du vert olive au brun noir très foncé, et le revers est brun noir (Chabasse et *al.*, 2002).

- Morphologie microscopique

- Les hyphes septés et pigmentés. Ils produisent des conidiophores de longueur variable. Les 1^{ères} conidies formées à l'extrémité des conidiophores sont de grande taille, uni ou pluricellulaire, les suivantes sont plus petites et unicellulaires ; l'ensemble forme de longues chaînes acropètes, ramifiées réalisant des arbuscules fragiles qui se dissocient lors du montage.

- Les *Cladosporium* sont largement retrouvés dans le sol et sur de nombreux végétaux. Ils sont souvent isolés de l'air ambiant, et de ce fait, ce sont de fréquents contaminants de laboratoire (Chabasse et *al.*, 2002).

4.4. *Rhizopus*

- Caractères cultureux

- Leur croissance est très rapide et extensive, ont une texture cotonneuse.

- Les colonies, blanches au départ puis deviennent grises et foncées en vieillissant.

- L'optimum thermique est de 25 C° ou 37 C° selon l'espèce.

- Morphologie microscopique
 - Filaments larges non ou peu septés.
 - Stolons, rhizoïdes et sporocystophores sont bien différenciés. Ces trois éléments naissent d'une même origine ; le nœud.
 - Les sporocystophores bruns sont isolés ou disposés en bouquets de 2 à 6 éléments.
 - Les sporocystes sont globuleux avec une columelle globuleuse ou cylindrique et une apophyse courte et anguleuse. Après rupture de sporocyste, la columelle s'affaisse sur le sporocystophore (aspect en parapluie).
 - Les spores sont ovoïdes.
 - Des chlamydo-spores peuvent être présentes, isolées ou disposées en chaînes (Chabasse et *al.*, 2002).

4.5. *Penicillium sp*

- Caractères culturaux
 - Leur croissance est rapide, la colonie est habituellement duveteuses, poudreuse, de couleurs variable, le plus souvent verte, mais parfois grise, jaune ou rose. Le revers est incolore ou foncé. Un pigment diffuse parfois dans la gélose (Chabasse et *al.*, 2002).
- Morphologie microscopique
 - Les hyphes : septés, hyalin, portent des conidiophores simples ou ramifiés, parfois regroupés en buisson ou corémie.
 - Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Elles sont insérées directement ou par l'intermédiaire de métules sur les conidiophores. Elles sont serrées les une contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau (ou pénicille).
 - Les conidies : rondes à ovoïdes, hyalines ou pigmentées, lisse ou échinulées, mesurant 2 à 4 μm de diamètre.
 - Présence de reproduction sexuée (Chabasse et *al.*, 2002).

4.6. *Candida albicans*

Candida albicans, le plus fréquent des champignons pathogènes, est une espèce saprophyte des muqueuses humaines et animales, jamais rencontrée dans la nature ou sur la peau en dehors des contaminations fortuites. Elle se distingue aisément par sa morphologie et sa physiologie. En culture à 25 C°, elle forme un mycélien ou un pseudomécyléien portant des blastoconidies de 3 à 4 µm. Sur certains milieux (milieu PCB, milieu au Riz), ces filaments donnent naissance à des chlamydoconidies terminales ou latérales, sphériques à ovoïdes et à paroi épaisse mesurant 6 à 12 µm. Les blastoconidies de *C. albicans* forment des tubes mycéliens si elles sont incubées 3-4 heures dans un sérum humain ou animal à la température de 37 C° (Larpen et *al.*, 1990).

4.7. *Microsporium canis*

- Caractères cultureux

La croissance de surface a été décrite comme duveteuse à laineux, velue et soyeuse. Typiquement, il présente un pigment jaunâtre léger à la périphérie et la croissance montre des rainures radiales étroitement espacées. Le revers est beige pâle à jaunâtre (jaune-orange – dépendant des milieux) qui tend à devenir brunâtre à mesure qu'il vieillit.

- Morphologie microscopique

Microsporium canis a des hyphes septiques qui produisent de nombreuses macroconidies. Les macroconidies sont assez longues (10-25 x 35-110 µm) et sont épais, murés avec une texture échinulée (rugueuse). Les extrémités se déversent typiquement à une extrémité semblable à un bouton qui peut être quelque peu recourbée à l'apex. Les macroconidies ont généralement six compartiments ou plus lorsqu'ils sont matures et peu de macroconidies en forme de massue peuvent être observés le long des hyphes. Les microconidies en forme de massue, à parois lisses, sont rarement vues formant le long des hyphes (Yuri, 2013).

4.8. *Trichophyton mentagrophyte*

- Caractères culturaux

T. mentagrophyte présente une croissance modérément rapide et mûrit dans les 6 à 10 jours. Les sources ont déjà décrit des isolats anthropophile ayant une texture duveteuse et poudreuse, alors que les zoophiles isolés étaient plus granulaires en apparence. Les colonies peuvent varier en couleur du blanc au crème ou jaunâtre. Le revers peut également varier du jaune au brun rougeâtre ou à l'ocre, selon l'isolat et le milieu.

- Morphologie microscopique

T. montagrophyte produit des hyphes septiques à partir desquels les conidiophores ramifiés s'étendent. Les microconidies sessiles (non sur la tige) sont produites dans des grappes assez denses, de cépages, sur le conidiophores. Les microconidies (~ 2 µm à 4 µm) sont sphériques à pyriforme en forme. Les macroconidies (20-µm à 6-8 µm) sont en forme de cigare au Club et peuvent montrer une certaine distorsion. Les macroconidies ont un extérieur lisse et une paroi mince, ont habituellement entre 3 à 8 cellules divisant l'intérieur. Les macroconidies peuvent être trouvées plus facilement dans les cultures plus jeunes. La production de conidies micro et macro peut varier avec l'isolat. Les hyphes enroulés ou spiralés peuvent être présents et, dans certaines souches, les structures décrites comme des corps nodulaire ou des chlamydo-spores peuvent être présentes (Yuri, 2013).

5. Interactions champignons-hôtes

Les champignons, par tout présent établissent avec les espèces animales ou végétales des interactions qui vont du saprophyte au parasitisme, en passant parfois par le commensalisme, ou encore participent à des phénomènes symbiotiques, traduction vraisemblable de leur co-évolution avec les végétaux d'une part, et les animaux d'autre part. (Chabasse et *al.*, 2002).

Un substrat donné peut être attaqué par plusieurs micro-organismes simultanément ou successivement. Supposons qu'un champignon utile soit susceptible de dégrader et l'utiliser une partie de substrat, il peut se trouver en composition avec un autre organisme. Au delà de la simple compétition pour la source de nourriture, existe un véritable antagonisme où l'un des partenaires cherche à éliminer l'autre: il possède pour cela le pouvoir de sécréter des

substances toxiques ou simplement l'adversaire ne peut résister aux substances rejetées naturellement par le premier comme résultats de son métabolisme (CO₂, alcool et phénol). Ainsi les champignons tels que les basidiomycètes et ascomycètes produisent des ATB qui leurs confèrent un avantage écologique certain vis-à-vis des bactéries ou des champignons compétiteurs. Les substances émises peuvent être toxiques même pour l'espèce qui les produit et qui ne présente vis-à-vis d'elle qu'un degré de tolérance plus ou moins élevé (Delmas, 1989).

Finalemment, la possibilité pour un champignon de coloniser un substrat dépend de sa capacité saprophytique de compétition ; soit par son taux élevé de germination, rapidité de germination, rapidité de croissance mycélienne, utilisation rapide du substrat, production de substances antibiotiques ou tolérance au ATB de l'adversaire (Delmas, 1998).

Chapitre II :

Matériels et méthodes

1. Type de l'étude

Etude évaluative consiste en la recherche de l'effet d'une culture mixte ; fongique-parasitaire sur la croissance du parasite.

2. Période et lieu d'étude

L'étude est prospective, menée du mois de Mars au mois d'Avril 2017 et réalisée au niveau du laboratoire parasitologie-mycologie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

3. Matériels**3.1. Matériels biologiques**

Sang du lapin ;

Urine humaine.

3.1.1. La souche du parasite utilisée

Dans notre étude, nous avons utilisé la souche qui est isolée de la moelle osseuse d'un patient atteint de leishmaniose viscérale hospitalisé au CHU de Tizi Ouzou. Elle est identifiée comme *Leishmania infantum* par PCR RFLP à l'IPA d'Algérie. Elle porte le code suivant : MHOM/DZ/2016/1'IPA 533/16.

3.1.2. Les espèces fongiques utilisées

Pour notre étude, on a opté à utiliser huit espèces fongiques différentes (levures et moisissures).

Le choix s'est fait au hasard en prenant un exemple d'une espèce de chaque classe : *Aspergillus flavus* (*A.f*), *Aspergillus niger* (*A.n*), *Cladosporium* (*Cld*), *Rhizopus* (*Rzp*), *Penicillium sp* (*P.sp*), *Candida albicans* (*C.a*), *Micrsporium canis* (*M.c*), *Trichophyton montagrophyte* (*T.m*).

Ces espèces ont été isolées au niveau du laboratoire parasitologie-mycologie de CHU de Tizi-Ouzou.

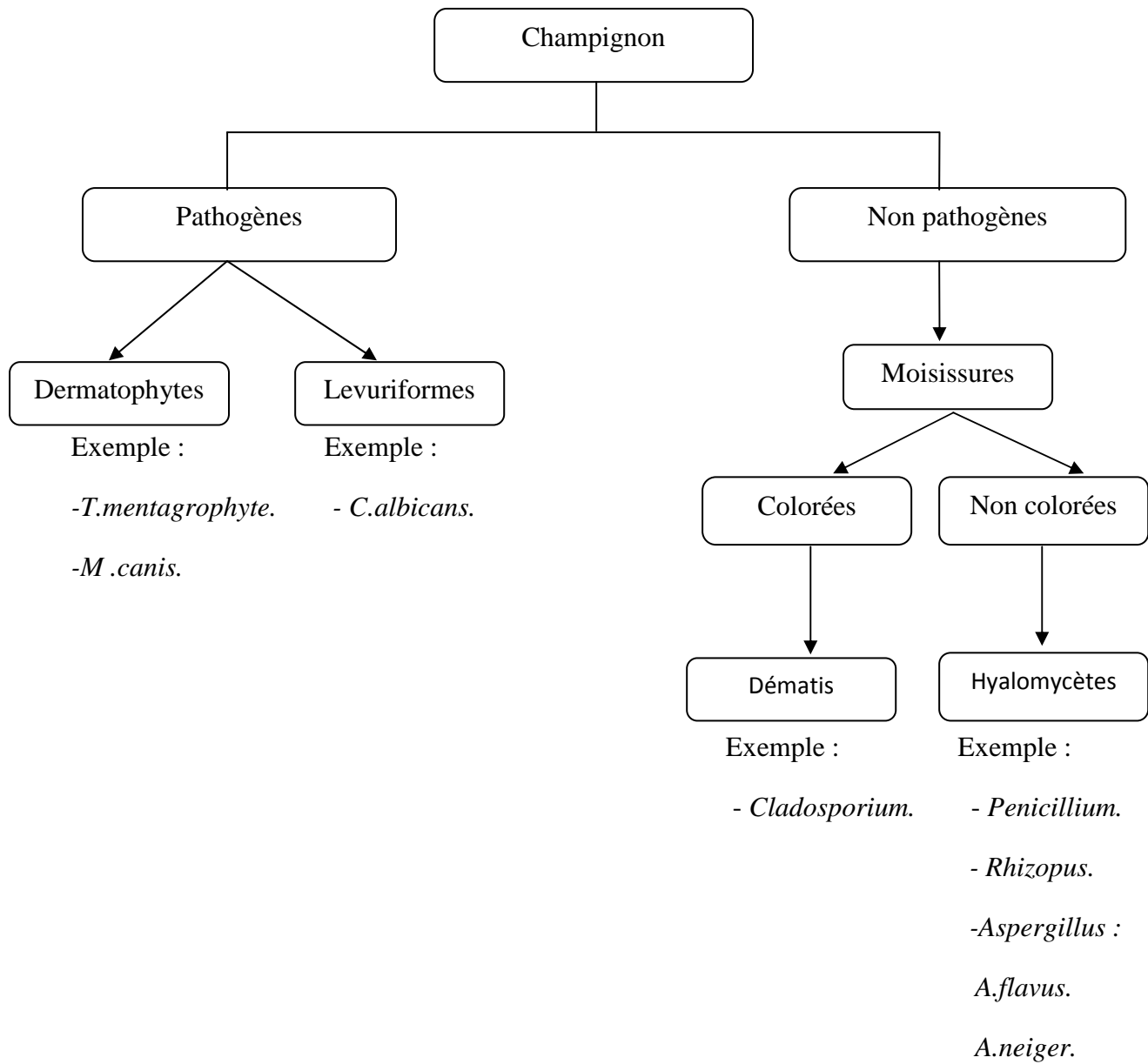


Figure 13 : schéma récapitulatif des champignons reçus.

3.2. Matériels non biologiques**3.2.1. Réactifs et produits chimiques**

- Agar-agar;
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA). / Brain Heart Infusion (BHI);
- Bleu coton ;
- Chlorure de sodium (Na Cl) ;
- Citrate de sodium ;
- Sabouraud+chloramphénicol.

3.2.2. Appareillage et verrerie

- Autoclave ;
- Balance de précision ;
- Bain marie ;
- Bâtonnet en verre ;
- Cuve pour lavage ;
- Distillateur ;
- Erlenmeyer ;
- Etuve d'incubation réglée à 24C° ;
- Etuve d'incubation réglée à 28C° ;
- Etuve d'incubation réglée à 37C° ;
- Etuve pour stérilisation réglée de 180C° à 200C° ;
- Microscope optique ;
- Réfrigérateur réglée à 4C°.

3.2.3. Consommable et autres produits

- Alcool iodé ;
- Antibiotiques : pénicilline G et Gentamycine ;
- Bavettes ;
- Bec bunsen ;
- Boîtes de Pétri ;
- Boîtes de congélation ;
- Casserole ;
- Coton / compresses ;

- Eau distillée ;
- Eau distillée stérile ;
- Eau de Javel ;
- Eau physiologique ;
- Epicrânienne 23G ;
- Etiquettes ;
- Flacon à sirop ;
- Gants ;
- Lames et lamelles ;
- Lidocaine gel 2% ;
- Parafilm ;
- Papier aluminium ;
- Pipettes pasteur stériles ;
- Poire ;
- Rasoir ;
- Sac de contention ;
- Seringues : 5 mL et 10 mL ;
- Savon ;
- Tubes à essai ;
- Tubes vacutainer citratés.

4. Déroulement de l'étude

Après une recherche bibliographique et un inventaire du matériel et de produits chimiques disponible au laboratoire, notre choix s'est porté sur la répartition du travail en trois étapes : culture de parasite au laboratoire de parasitologie, culture des champignons et l'étude de l'interaction parasite-champignon au laboratoire de mycologie.

5. Méthodes

5.1. Examen parasitologique direct

L'examen direct consiste en la recherche du parasite dans les prélèvements de la moelle osseuse après réalisation d'un frotti.

5.2. La culture

5.2.1. Culture de parasite

La moelle osseuse recueillie dans des tubes stériles est mise en culture sur des milieux NNN (Novy Nicole Mc Neal). La culture permet au parasite de se transformer en forme promastigote mobile facile à repérer et aussi se multiplier.

Le milieu NNN est un milieu diphasique. La phase solide est composée d'une gélose enrichie au sang du lapin à une concentration de 10%, et la phase liquide formée de l'exsudat de ce mélange.

Pour avoir une culture de masse de Leishmanie, on utilise le milieu CCS (Cœur-Cerveau-Sang).

5.2.1.1. Ponction du lapin

Lors de notre expérimentation, on a utilisé deux lapins du sexe masculin, âgés de quatre mois et pesant tous les deux plus de deux kilos. Les normes en termes de quantité du sang prélevé et le rythme des ponctions selon les règles de protection des animaux sont respectées.

Il est admis que les prélèvements de 20% de la valeur inférieure du volume sanguin total estimé du lapin en l'espace de deux semaines, ne provoque aucune contrainte notable chez celui-ci.

Dans notre cas, le volume de sang prélevé ne dépasse pas 15 mL et les ponctions se font au rythme d'une fois par 15 jours.

L'endroit idéal pour pratiquer la phlébotomie chez le lapin est l'oreille, en utilisant soit les larges veines soit l'artère centrale par alternance dans la mesure du possible.

La ponction se fait suivant ces étapes :

- **Contention du lapin**

Le lapin doit être contenu en l'enveloppant dans un linge ou un sac de contention pour éviter de bouger surtout au moment de la ponction. Un morceau de gaze nous a servi à cet effet.



Figure 14 : Contention du lapin (laboratoire parasitologie de l'UMMTO 2017).

- **Préparation de la peau à l'endroit de la collecte du sang**

Les poils de l'oreille sont rasés à l'aide d'un rasoir. Puis, la peau est désinfectée avec de l'alcool iodé et anesthésiée localement au dessus de la veine par application d'une crème contenant de la lidocaïne.une durée de 20 à 30 minutes est nécessaire pour obtenir l'anesthésie de la couche cutanée.



Figure 15 : préparation et rasage de l'oreille du lapin (laboratoire de parasitologie UMMTO 2017).



Figure 16 : désinfection de l'oreille du lapin (UMMTO 2017).

Figure 17 : Anesthésie de la peau de l'oreille du lapin (UMMTO 2017).

- **Prélèvement du sang**

Un dispositif fait d'une épicroânienne 23G et d'une seringue de 10 mL est monté. Des tubes de types vacutainer stériles d'un volume de 10 mL contenant 0.7 mL de citrate à 10% (voir sa préparation en annexe), sont préparés pour accueillir le sang prélevé. Ces tubes sont plus pratiques et la manipulation ne nécessite pas de zone stérile.

Après désinfection de l'endroit de la ponction avec de l'alcool iodé, l'épicroânienne reliée à la seringue est insérée dans la veine marginale ou l'artère centrale. Après avoir prélevé la quantité souhaitée, l'épicroânienne est retirée et une gaze de coton est appliquée fermement sur le site de ponction pendant au moins une minute, afin d'arrêter le saignement et de prévenir la formation d'hématome. Le sang est immédiatement injecté dans les tubes citratés. Nous rajoutons deux ATB (Pénicilline G à raison de 100 UI/mL et la Gentamycine à raison de 100 µg/mL).

Le sang est conservé au réfrigérateur à 4 C°.

NB : Ces ATB sont les mêmes qu'on utilise dans tous ce qui suit.



Figure 18 : Ponction du lapin (laboratoire de parasitologie UMMTO 2017).

5.2.1.2. Préparation du milieu CCS

- **Composition**

- BHIA 26g ;
- Eau distillée 500 mL ;
- Sang du lapin 20%.

A défaut d'avoir le BHIA, nous avons utilisé le BHI en poudre et de l'agar, avec des proportions de sorte à avoir la même composition (18.5 g de BHI et 7.5 g d'agar).

- **Préparation**

- Peser et verser les poudres dans une casserole ;
- Rajouter l'eau distillée et remuer ;
- Chauffer le mélange et laisser bouillir quelque minute ;
- Répartir la gélose dans des flacons à sirop à raison de 15 mL par flacon ;
- Stériliser à l'autoclave à 120 C° pendant 20 minutes ;
- Ramener la température de la gélose entre 46 C° et 54 C° dans un bain marie ;
- Rajouter stérilement le sang du lapin à raison de 3 mL par flacon ;
- Homogénéiser et laisser refroidir à température ambiante pendant 24 heures ;
- Conserver au réfrigérateur à 4 C° pendant un mois.

5.2.1.3. Préparation de la gélose NNN

- **Composition**
 - Agar-agar 5g ;
 - Chlorure de sodium (Na Cl) 3g ;
 - Eau distillée 500mL.
- **Préparation**

Le Na Cl est dissout à froid dans l'eau distillée. Le mélange est mis sur le feu. Quand il commence à frémir, l'agar est rajouté et mélangé à l'aide d'un bâtonnet en verre, puis laissé bouillir pendant quelque minute. La gélose est répartie dans des tubes à vis stérilisés au préalable à raison de 6 mL par tube. Puis elle est stérilisée à l'autoclave à 120 C° pendant 20 minutes.

5.2.1.4. Préparation des milieux NNN

La gélose NNN préalablement préparée est ramenée à une température comprise entre 46 C°- 54C° dans un bain marie. Ensuite elle est additionnée de sang de lapin à raison de 1 mL par tube en respectant les conditions de stérilité. Le mélange est homogénéisé doucement puis déposé sur un support incliné jusqu'à la solidification de la gélose.

Les milieux prêts sont étiquetés en mentionnant la date de préparation et conservés au réfrigérateur à 4 C°, et sont utilisés dans les limites d'un mois. Un tube de chaque lot est incubé à 37 C° pendant 24h pour vérifier la stérilité du milieu.

5.2.1.5. Préparation de l'urine stérile

Une urine humaine est récupérée, c'est celle d'un enfant de 13 ans de bonne santé et n'ayant pas d'infection urinaire (examens cytot bactériologique négatif). Elle est récoltée dans un pot stérile. Puis elle est filtrée à l'aide d'un filtre de 0.2µm et contrôlée par ensemencement sur des milieux bactériologiques : gélose nutritive, gélose au sang frais, gélose au sang cuit et le Chapman ; et sur milieu mycologique : Sabouraud+chloramphénicol.

L'urine est additionnée d'ATB (pénicilline G et Gentamycine). Puis aliquotée dans des tubes à vis stérile et conservée au réfrigérateur.

5.2.2. Culture des champignons

Les champignons récupérés sont mis en culture sur des milieux Sabouraud+chloramphénicol, additionnés à des ATB pour éviter toute contamination bactérienne et stimuler une contamination fongique voulue.

L'ensemencement de ces champignons se fait sur des boîtes de Pétri, car la gélose résiste beaucoup mieux sur des boîtes sèches que dans des tubes, comme elles facilitent l'observation des colonies sous forme isolées.

5.2.2.1. Préparation du milieu Sabouraud

- Faire fondre la gélose au bain marie (à 80C°) ;
- Rajouter stérilement les ATB ;
- Couler la gélose dans des boîtes de Pétri à l'aide d'une seringue à raison de 7 mL par boîte ;
- Homogénéiser et laisser refroidir à température ambiante pendant quelques minutes et mettre au réfrigérateur.

5.2.2.2. Coloration au bleu coton

- **Réalisation des frottis colorés au bleu coton**

C'est une coloration qui nous permet d'observer sous microscope les formes des champignons, en réalisant des frottis colorés au bleu coton.

On étale un bout de champignon sur une lame, on ajoute quelques gouttes de bleu coton puis on le couvre avec une lamelle tout en appuyant doucement pour bien écraser le champignon et faire propager le colorant sur toute la surface. Une fois fait, on observe sous microscope au G×40.

- **Quelques images sous microscope**

Ci-dessous, les images de quelques espèces fongiques qu'on a utilisées lors de l'étude ; coloré au bleu coton vues sous microscope optique au G×40.

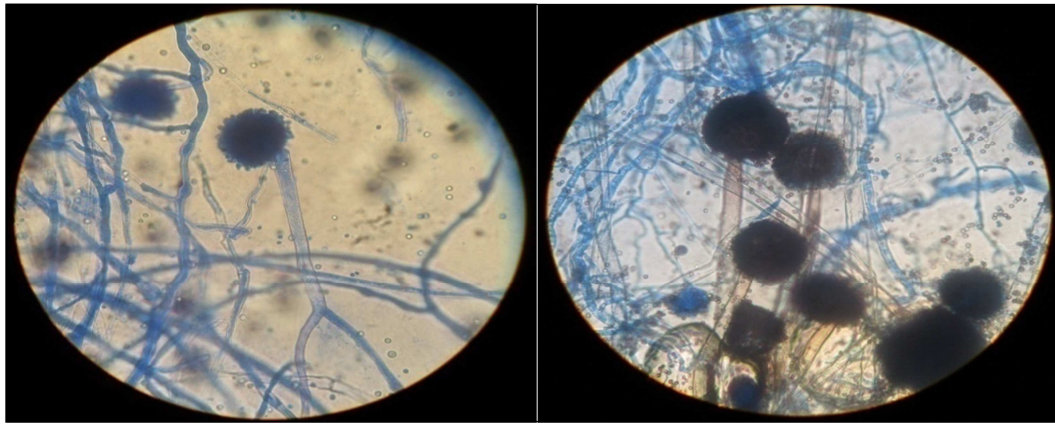


Figure 19 : *A. flavus* sous microscope coloré au bleu coton (UMMTO 2017).

Figure 20 : *A. niger* sous microscope coloré au bleu coton (UMMTO 2017).

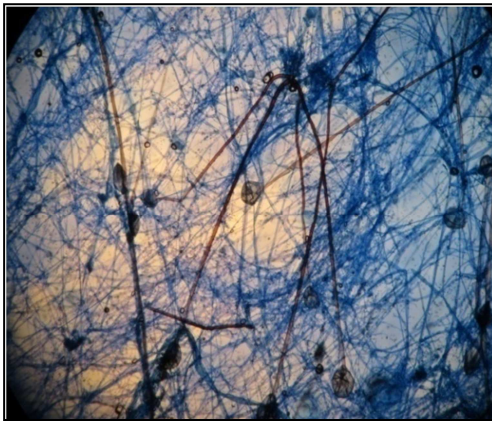


Figure 21 : *Rhizopus sp* sous microscope coloré au bleu coton (UMMTO 2017).

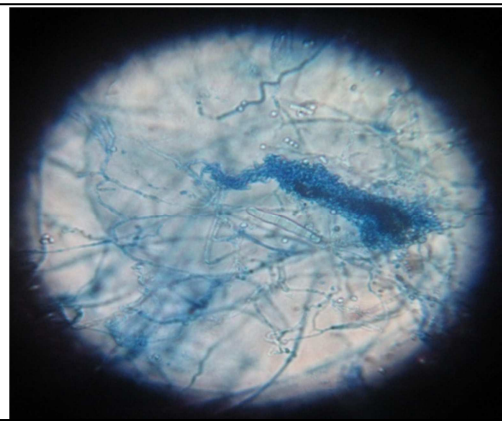


Figure 22 : *Trichophyton mentagrophytes* sous microscope coloré au bleu coton (UMMTO 2017).

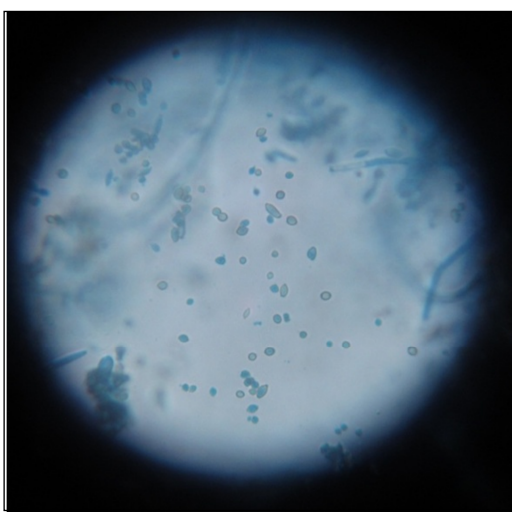


Figure 23 : *Cladosporium sp* au bleu coton sous microscope (UMMTO 2017).

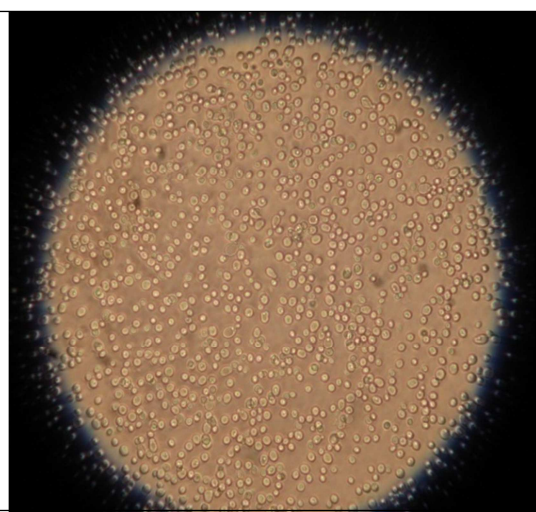


Figure 24 : *Candida albicans* au bleu coton vue sous microscope (UMMTO 2017).

5.2.3. Ensemencement**5.2.3.1. Ensemencement du parasite**

La souche reçue dans des tubes stérile est aspirée stérilement à l'aide d'une pipette munie d'une poire et injectée dans le milieu CCS à qui on ajoute 0.5 mL de la solution stérile (2 mL d'urine stérile, 0.5 mL de Pénicilline et 0.2 mL de Gentamycine dans 9 mL d'eau physiologique). Puis incuber à 24 C° pendant 24 heures.

Après incubation, on réalise un contrôle sous microscope au G×40 pour vérifier la richesse du milieu en promastigote.

Si le contrôle est positif, on procède à l'ensemencement des milieux NNN.

A partir du milieu CCS, on ensemence stérilement une série de 9 tubes de milieu NNN à raison de 0.5 mL par tube, additionnés au préalable de 0.5 mL de la solution stérile. Puis incuber à 24 C° pendant 72 heures.

5.2.3.2. Culture des champignons

Les souches fongiques récupérées sont ré-isolées sur des milieux Sabouraud+chloramphénicol ; en réalisant des stries. Puis incuber à 28 C° pendant 3 jours.

5.2.3.3. Ensemencement de la culture mixte fongique-parasitaire

Pour l'étude de la croissance du parasite en présence de champignon, on procède à l'ensemencement de huit (8) tubes de milieu NNN contenant des promastigotes par des champignons et le neuvième (9^{ème}) tube reste comme témoin.

Les tubes à ensemercer doivent être étiquetés en désignant le champignon et la date de l'ensemencement.

A partir de chaque espèce fongique, on prélève un petit cadran de 0.25cm² qu'on ensemence dans le tube NNN qui lui convient. Puis incuber à 28 C° pendant 3 jours.

Notre expérimentation s'est réalisée en trois essais hebdomadaires, et le protocole à suivre est le même.

5.2.4. Lecture

Tout les trois jour, les cultures sont vérifiées.

Une goutte de la phase liquide est déposée entre lame et lamelle, puis observée sous microscope optique au G×40. La mise en évidence des formes promastigotes est facile car sont mobile. Seulement le nombre de promastigote peut être réduit et donc la lame doit être lue entièrement, notamment au début de la positivité. Cet examen permet également de vérifier la présence ou non de contamination microbienne et la présence des hyphes fongiques.

Ci-dessous, quelques résultats de ces contrôles :

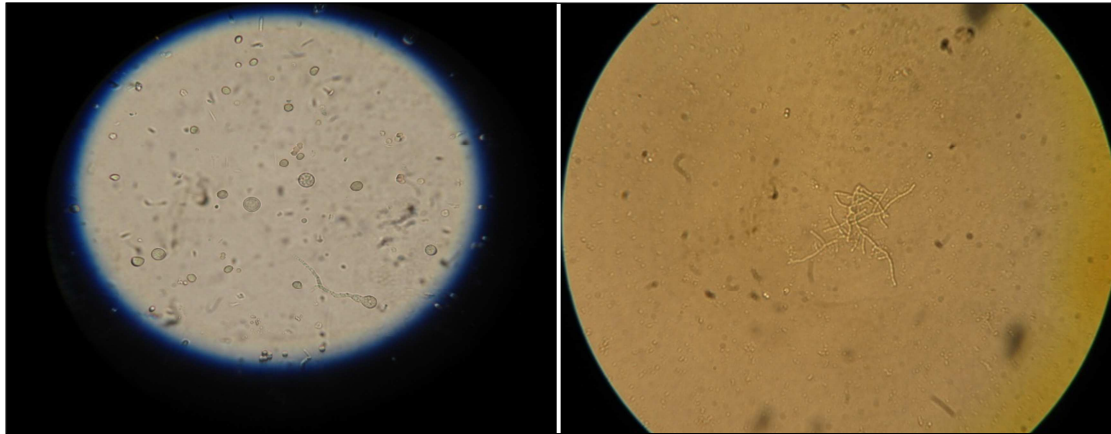


Figure 25 : Deux photos microscopiques représentent le développement du parasite en présence de champignon et l'apparition des filaments mycéliens sur milieu NNN (UMMTO 2017).

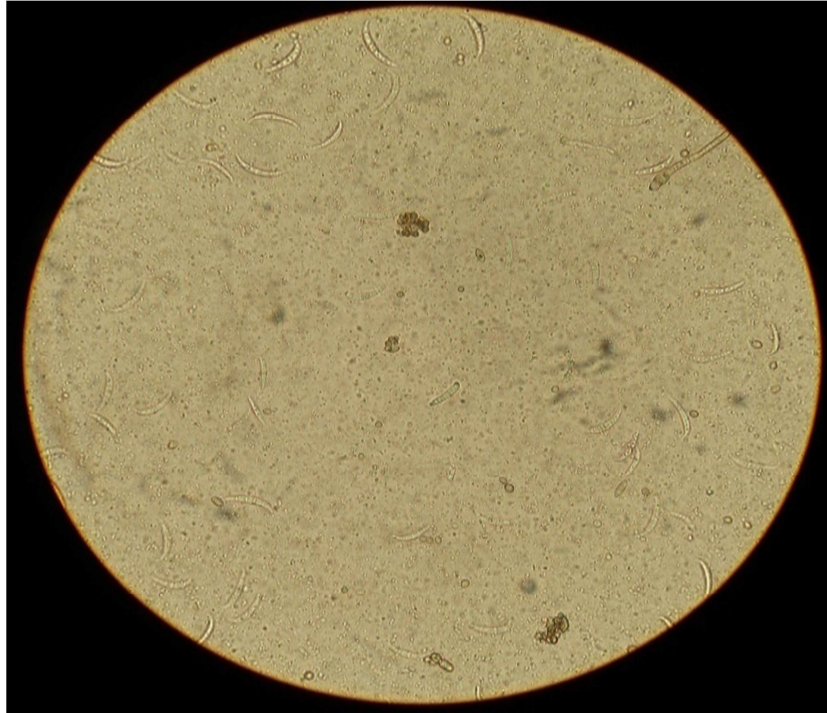


Figure 26 : Contamination à la fois par des bactéries et par une autre espèce fongique qui est *Fusarium sulanis* (en forme incurvée) (UMMTO 2017).

Une autre goutte de la culture est étalée sur milieu Sabouraud neuf en faisant des stries, pour vérifier la présence ou non d'une contamination fongique non voulue et s'assurer de la pureté de l'espèceensemencée.

Cette opération est répétée tout les trois jour avant de conclure à un résultat final. Trois lectures sont réalisées pour chaque essai.

Chapitre III :

Résultats et Discussion

1. Résultats de l'effet de la culture mixte sur la croissance de parasite *Leishmania* sur milieu NNN

Les tableaux ci-dessous présentent les résultats des trois essais réalisés. Comme on a bien cité auparavant, la lecture pour chaque essai se réalise trois fois tous les trois jours.

1.1. Résultats du 1^{er} essai : le 13.03.2017

Les résultats obtenus pour l'évaluation de l'effet de la culture mixte (fongique-parasitaire) sur le développement des promastigotes de *Leishmania* sur milieu NNN sont résumés dans les tableaux III, IV et V ci-dessous.

Tableau III : Résultats de la 1ere lecture : le 16.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	20	20	140	20	20	0	100	60
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau IV : Résultats de la 2eme lecture : le 20.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	33.33	33.33	16.66	0	41.66	8.33
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tableau V : Résultats de la 3eme lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	0	409.09	0	0	36.36	0
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	+	-	+	-	-	-

Le nombre de promastigotes en % (comparant au témoin) indiquent que les espèces fongiques qu'on a utilisées influencent la croissance du parasite. Il pousse différemment selon le champignon ensemencé.

On a trouvé qu'en présence de *A.f*, *A.n*, *P.sp*, *C.a* et *T.m* ; le parasite est inhibé et le nombre diminue jusqu'à 0% dans les deux dernières lectures.

Par contre, en présence de *Rzp*, on a marqué une augmentation importante de la richesse parasitaire qui atteint plus de 400% dans la troisième lecture.

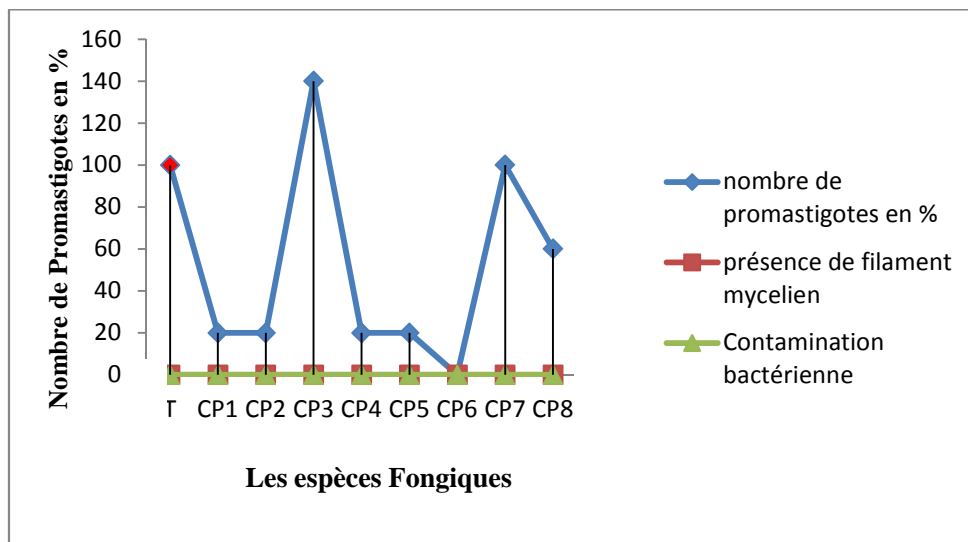


Figure 27 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l'essai 1).

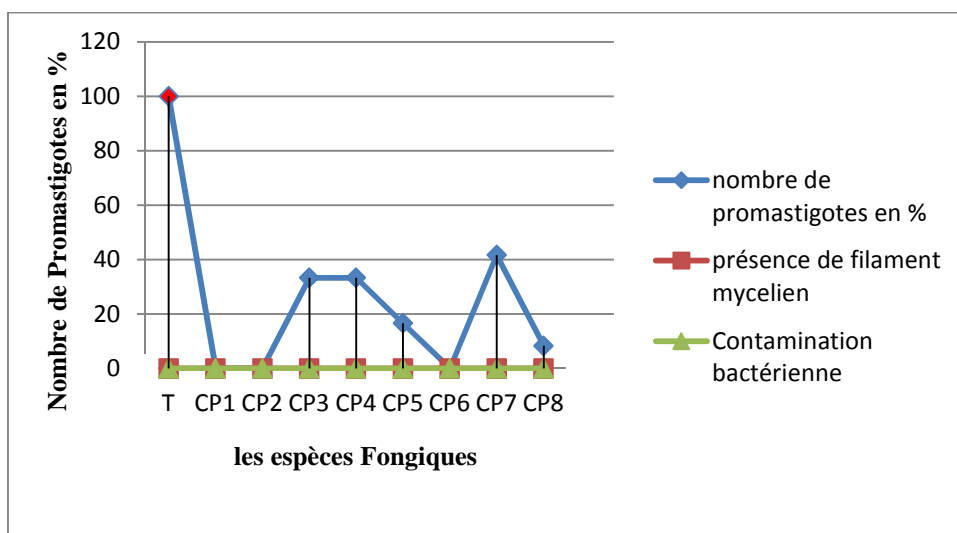


Figure 28 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l'essai 1).

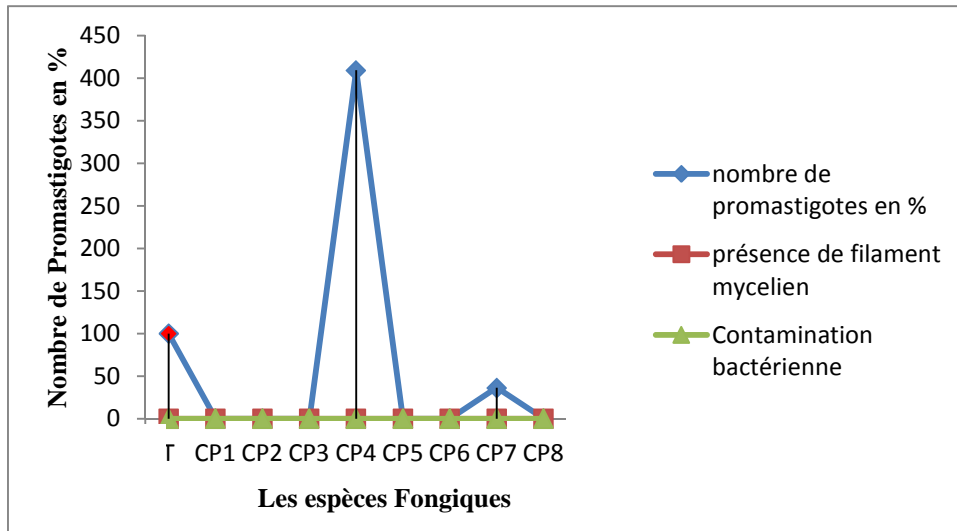


Figure 29 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l’essai 1).

1.2. Résultats du 2eme essai : le 20.03.2017.

Les résultats obtenus dans cet essai sont résumés dans les tableaux VI, VII et VIII ci-dessous.

Tableau VI : Résultats de la 1ere lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	2	4	2	36	30	0	54	8
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau VII : Résultats de la 2eme lecture : le 27.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	0	0	13.33	2.22	2.22	4.44
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Tableau VIII : Résultats de la 3eme lecture : le 30.03.2017.

	T	A.f	A.n	Cld	Rzp	P.sp	C.a	M.c	T.m
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	0	0	8.88	0	0	0
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	-	+	-	-	-	+

Le nombre de promastigotes n’a cessé de diminuer en présences des filaments mycéliens (diminution jusqu’à 0%).

Ce qui est à noter dans cet essai que même en présence de *Rzp*, le parasite est disparu. Cela peut être dû à la contamination bactérienne qu’on a rencontrée dans la 2eme et la 3eme lecture.

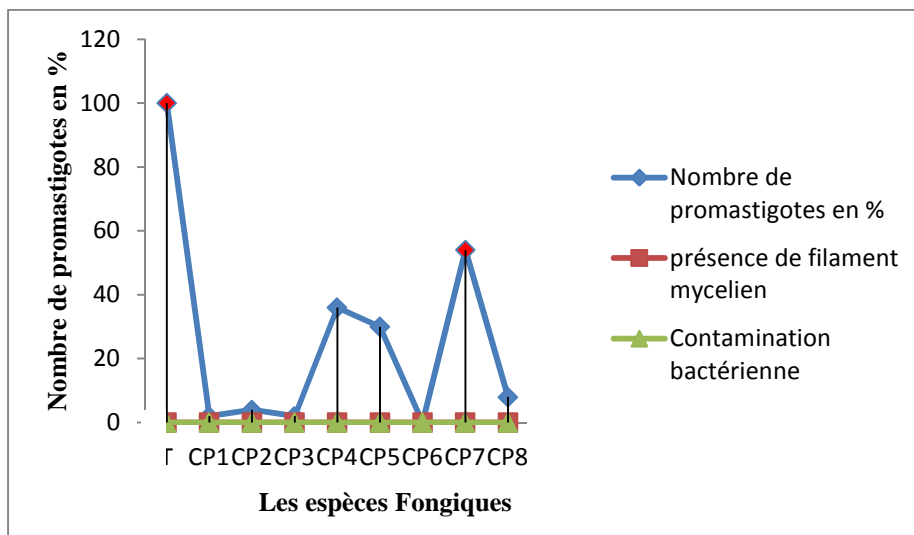


Figure 30 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l’essai 2).

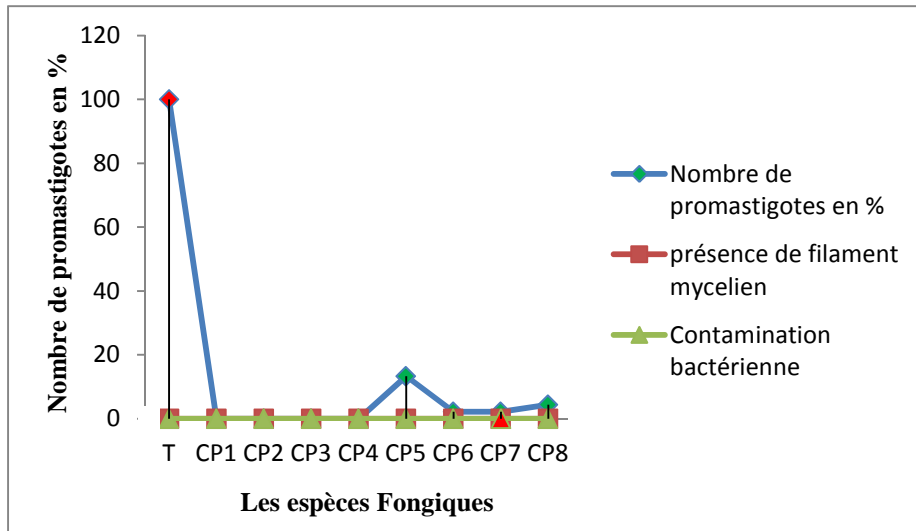


Figure 31 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l’essai 2).

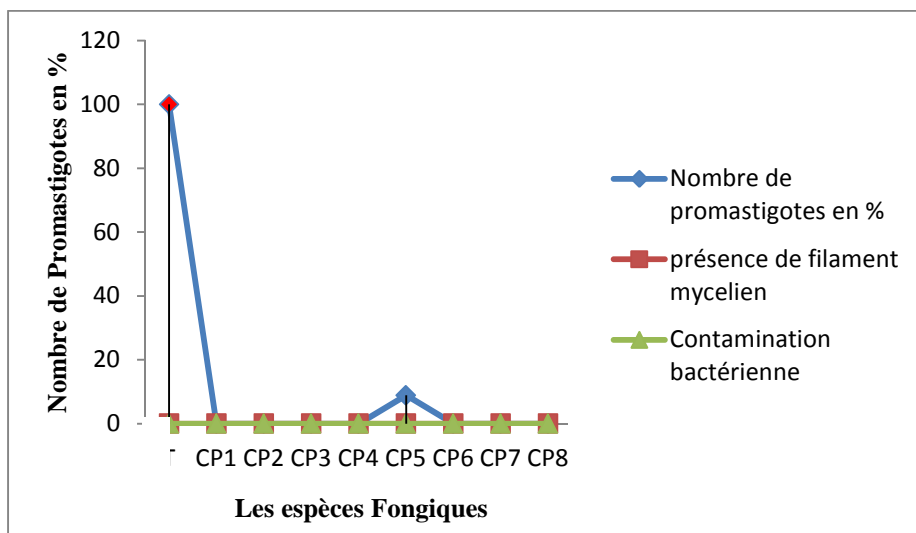


Figure 32 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l’essai 2).

1.3. Résultats du 3eme essai : le 20.03.2017

Les résultats obtenus dans cet essai sont résumé dans les tableaux IX, X et XI ci-dessous.

Tableau IX : Résultats de la 1ere lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	20	2	54	12	6	8	100	16
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau X : Résultats de la 2eme lecture : le 27.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	0	15	20	5	25	60
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	- (*)	-	-	-	-	-

Tableau XI : Résultats de la 3eme lecture : le 30.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes en %	100	0	0	0	500	10	0	30	20
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	+	-	-	-	-	-
				(+ *)					

En présence d’*A.f*, *A.n* et *C.a*, le nombre de promastigotes diminue et la croissance parasitaire est nulle (0 %). Et en présence de *Cld*, le nombre de départ était voisinant de 50% mais dans les deux lectures suivantes, on a marqué une disparition totale du parasite (0%), et cela revient peut être à la présence d’une contamination à la fois bactérienne et fongique par *Fusarium sulanis*.

Ce qui est important par contre, est l’estimation d’une croissance maximale du parasite qui atteint les 500% en présence de *Rzp*.

Et aussi, il est à noter que le parasite pousse aussi bien en absence de *M.c* (c'est ce qu'on a remarqué dans le tableau VI et IX).

NB : Le (-) signifie absence.

Le (+) signifie la présence.

Le (*) contamination fongique par une autre espèce (*F.sulanic*).

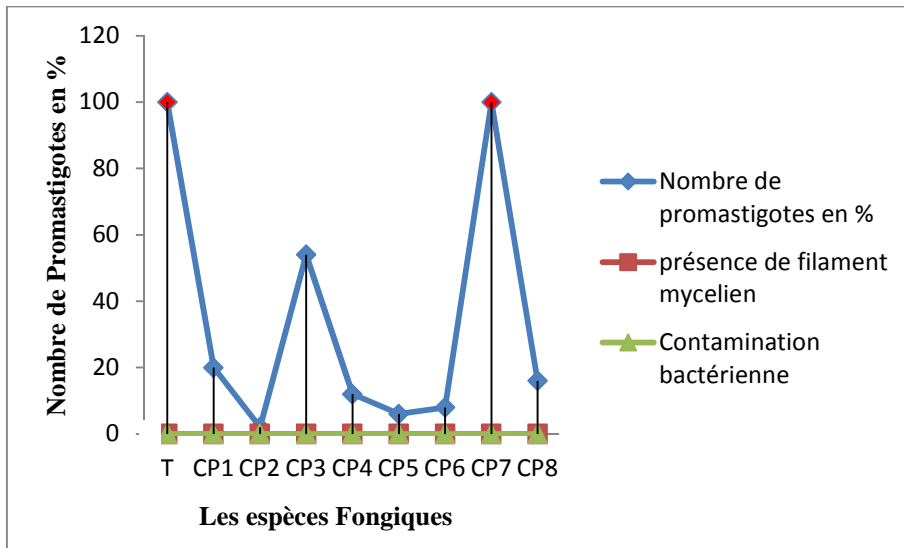


Figure 33 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 1 de l'essai 3).

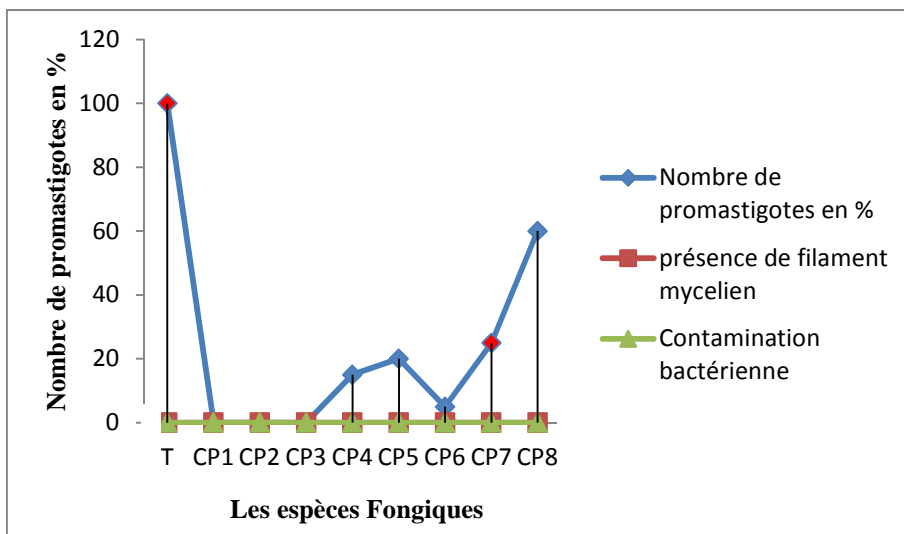


Figure 34 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 2 de l'essai 3).

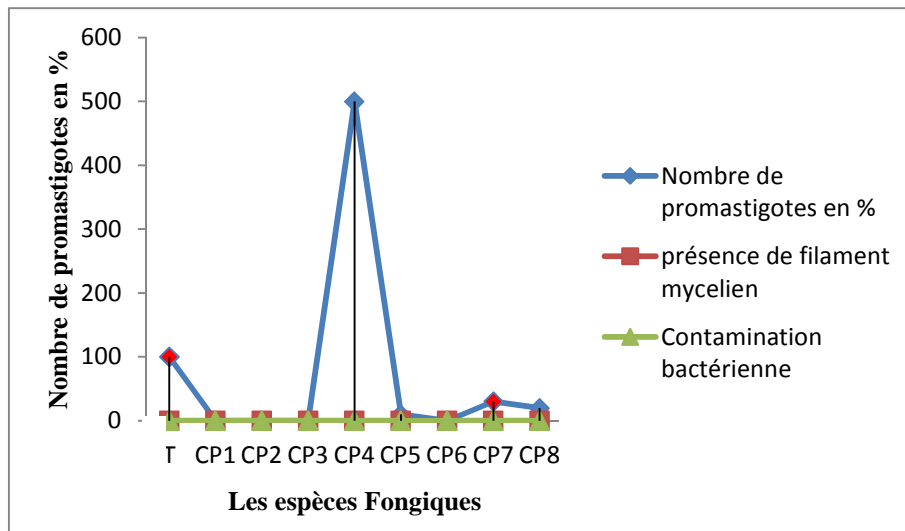


Figure 35 : Résultats de variation de nombre de promastigotes (en%) en présence ou en absence de filaments mycéliens (lecture 3 de l'essai 3).

2. Discussion

Lors de l'étude à visé diagnostique, la culture ne doit pas être jetée dès la première contamination fongique. En revanche, on doit identifier l'espèce contaminante.

Grace à ces contaminants on a opté à faire notre étude prospective qui a pour but de rechercher l'effet d'une culture mixte sur le développement de *Leishmania* et établir les types d'interactions qui peuvent exister entre les champignons et ce parasite.

Dans la présente étude, nous avons constatée que les huit espèces fongiques utilisées (prises au hasard) ont un effet sur le développement de notre parasite et que ce dernier pousse différemment selon le champignon ensemencé. Mais comme cette thématique n'a jamais été abordée ; la variabilité d'interaction n'a pas été citée dans la littérature. Nos résultats donc peuvent être interprétés dans un contexte hypothétique ; pour cela des hypothèses sont établies.

Hypothèse 01 : « Il existe une corrélation entre les champignons et le parasite *Leishmania* ».

De tous ces résultats, on constate qu'il existe une corrélation entre le parasite et l'espèce fongique ensemencé. Cette corrélation peut être positive (symbiose), stimule et favorise la croissance parasitaire (cas de la culture avec le *Rzp*). Comme elle peut être

négative (parasitisme ou compétition vis-à-vis des nutriments), fragilise le parasite et ralentie sa croissance (cas de culture avec *A.f*, *A.n* et *M.c*).

Cette hypothèse est pratiquement prouvée par nos résultats, mais d'autres études ultérieures plus poussées pourront mieux l'expliquer et identifier le type exact de l'interaction et arriveront même à définir ces causes.

Hypothèse 02 : « Le parasite *Leishmania* et le champignon *Rhizopus* vivent en symbiose ».

La symbiose consiste en une association biologique durable et réciproque entre deux ou plusieurs organismes vivants (Francis et Marc, 2009).

L'apparition d'une symbiose nécessite l'apparition d'une coexistence d'une relation à bénéfice mutuel. C'est justement ce qu'on a tiré de nos résultats obtenus lors de la culture de *Leishmania* avec le champignon *Rhizopus* (*Rzp*). A chaque fois que l'un des deux est présent, l'autre se développe beaucoup mieux.

L'émergence du mutualisme reste dans ce cas mal comprise, parce qu'on n'a pas pu bien expliquer ce qui a poussé l'un des deux partenaires à aider l'autre.

Cette hypothèse porte sur un point très important qui doit être bien traité dans des études ultérieures.

Hypothèse 03 : « Il existe une corrélation négative entre la croissance du parasite et la présence du champignon *Aspergillus flavus* et *Aspergillus neiger* (*A.f* et *A.n*) ».

Il arrive aussi, que dans certaines conditions (épuisement des milieux, compétition vis-à-vis des nutriments ou bien dans le cas de la réponse au stress) l'un des partenaires de la symbiose change de comportement. Et contrairement au mutualisme, une autre interaction non réciproque s'installe ; c'est bien le parasitisme qui consiste en une symbiose profitable pour un seul microorganisme. Cela se résume surtout dans les résultats de la culture avec l'*A.f* et *A.n* ; à chaque fois que le champignon pousse, on marque la disparition du parasite. Le facteur responsable de cet effet est mal connu, et pour le désigner, des travaux ultérieurs préciseront peut être sa nature et arriveront à éclaircir cette idée.

A notre stade, la discussion reste ouverte et incite à s'élargir dans cette étude pour mieux comprendre les phénomènes de cohabitation entre ces deux microorganismes.

Conclusion et perspectives

Les leishmanioses sont des maladies à transmission vectorielle et représentent un problème de santé public dans le monde qui comprend l'Algérie. Ces parasitoses font partie des maladies à déclaration obligatoire.

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés trop sensibles et exigeants en point de vue conditions et milieux de cultures. Tout défaut de prélèvement, conservation ou ensemencement dans des laboratoires de recherche peut tuer le parasite. La contamination fongique qualifiée de contaminants de laboratoire a aussi un effet très important plus que l'on croyait.

Dans la présente étude on a essayé de comprendre les relations qui peuvent unissent le parasite *Leishmania* et huit espèces fongiques différentes.

L'étude s'est portée sur le suivi de la croissance parasitaire dans une culture mixte sur milieu NNN en présence des champignons.

D'après les résultats, on a constaté qu'il existe une variété d'interaction entre ces microorganismes allant de la symbiose mutuelle au parasitisme, cela varie selon l'espèce ensemencée. Le *Rhizopus* peut être désigné pour un symbiote mutuel, aide le parasite à mieux se développer, contrairement à *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* qui ont un effet nuisible et fragilisent le parasite et diminuent sa croissance.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour ce travail. Et comme on est arrivé à mettre en place quelques pièces de puzzle, notre souhait est d'accomplir cette mission. C'est aux chercheurs spécialistes plus compétents et avec plus de moyens de le réaliser et compléter le reste des pièces manquantes pour avoir l'image entière ; qui veut dire définir plus exactement l'effet de la culture mixte (fongique-parasitaire) sur la croissance de *Leishmania*. Et peut-être ils arriveront à élaborer ou à extraire un composant ou une substance fongique qui servira au futur pour un anti leishmanien. Il est à noter aussi la nécessité de prendre en compte d'autres espèces fongiques autre que celles étudiées tel que *Fusarium sulanis*.

Références bibliographiques

1. **ABONNENC E., 1972.** Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). Mémoire de l'ORSTOM, 289p.
2. **AFROUN R., 2016.** *Etude des performances des moyens diagnostiques de la leishmaniose viscérale en zone d'endémie.* Mémoire de fin de résidanat en parasitologie et mycologie médicales. Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, 124p.
3. **ALVAR J.P. et JIMENEZ M., 1994.** Could infected drug-users be potential *L.infantum* reservoirs?. *AIDS*, 8, p 854.
4. **ALVAR J.P., 2001.** *La leishmaniasis : de la biologia al control.* 2 Ed, Laboratorios Intervert S.A, Madrid, 389p.
5. **ALVAREZ F., ROBELLO C. et VIGNALI M., 1994.** Evolution of codon usage and base contents in kinétoplastid protozoans. *Mol Biol Evul*, 11, 5, 790-802.
6. **ANOFEL., 2005.** Campus National de Parasitologie-Mycologie TICEM-UMVF.
7. **ANOFEL., 2014.** Association Française des Enseignant de Parasitologie et Mycologie, UMVF. Université Médicale Virtuelle Francophone ; leishmaniose.
8. **AUBRY P., 2012.** Leishmanioses, diplôme de médecine tropicale des Pays de l'Océan Indien, 1, p 8.
9. **AUBRY P. et GAUZERE B.A., 2016.** Leishmanioses. Actualité 2016. Médecine Tropicale : Diplôme de Médecine Tropicale des Pays de l'Océan Indien, 76, 1-6.
10. **BACHI F., 2006.** Aspect épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre d'Infectiologie*, 1, 9-15.
11. **BENYAHIA D., 2008.** Mise au point de la leucocytoconcentration et son application dans le diagnostic de la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale humaine. Mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 68p.
12. **BHATTACHARYA S.K., JHA T.K., SUNDAR S., THAKUR C.P., ENGEL J., SINDERMAN H., JUNGE K., KARBWANG J., BRYCESON A.D. et BERMAN J.B., 2004.** Efficacy and tolerability of niltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis*, 38, 2, 217-227.

13. **BITAM I., 2010.** Inventaire et écobiologie des phlébotomes en Algérie. SABC. 2^{ème} congrès.
14. **BRIGITE V., 2016.** Microbiologie Médicale, *les milieux de culture utilisés en mycologie.*
15. **CARRE N., COLLOT M., GUILLARD P., HORELLOU M. et GAGNEUX J.P., 2010.** La leishmaniose viscérale : Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *J. pharm Clin*, 29, 3, 121-48.
16. **CHABASSE D., BOUCHARA J.P., GENTILE L., BRUN S., CIMON B. et PENN P., 2002.** *Les moisissures d'intérêt médical.* Bioforma 230 bd raspail 75014 Paris, 161p.
17. **DAVID V.D. et CRAFT N., 2009.** Dermatologic Therapy. *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*, 22, 491-502.
18. **DEDET J.P., 1998.** *Les leishmanioses.* Ellipses, Paris, 356p.
19. **DEDET J.P., 2001.** Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 8, 506-510.
20. **DEDET J.P., 2009.** Leishmanies, leishmanioses: biologie, Clinique et thérapeutique. *Maladies infectieuses*, 8-506-A-10, 14p.
21. **DELMAS J., 1989.** *Les champignons et leur culture.* Flammarion, la Maison Rustique, Paris, 969p.
22. **DOLMATOVA A.V. et DEMINA N.A., 1971.** Les phlébotomes (phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. *O R S T O M*, 18, p168.
23. **FALCOFF E., GIMENEZ A.L., BERNADO J.G. et BOTTASSO O., 1994.** Interferon gamma as an immunological strategy for the treatment of human leishmaniasis. *Medicina (B Aires)*, 54, 3, 265-271.
24. **FISCHER C., VOSS A. et ENGEL J., 2001.** Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*, 190, 85-87.
25. **FORGET G., 2004.** Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrôler la réponse immunitaire innée. Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine, 186p.

- 26. FRAHTIA-BENOTMANE K., 2015.** Détection moléculaire des leishmanies à partir du genre *Phlebotomus* (Diptera : psychodidae) : tendance vers la régression de la leishmaniose à Constantine. Thèse de doctorat en science en biologie animale. Option : Entomologie, université des Frères Mentouri-Constantine, 185p.
- 27. FRANCIS M. et MARC A.S., 2009.** *Microorganismes symbiotiques*, 296, p 4.
- 28. JARRY D.M., 1999.** *Historique des leishmanioses et leurs complexes pathogènes*. In Dedet J.P. les leishmanioses. Edition ellipses, 253p.
- 29. JEBBOUR Y., 2013.** Profil épidémiologique, thérapeutique et évolutif de la leishmaniose cutanée (à propos de 52 cas). Expérience du service de dermatologie de l'hôpital militaire sidi M^{ed} Ben Abdellah. Fés. Maroc. 175p.
- 30. HANDMAN E., 2001.** Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews*, 14, p 229.
- 31. HARRAT Z. et BELKAID M., 2002.** Les leishmanioses dans l'Algérois. Données Épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot*, 96, 212-214.
- 32. HOLZMULLER P., CAVALEYRA M., MOREAUX J., KOVACIC R., PAPIEROK G., et LEMESRE J.L., 2003.** Cellular immune response in dogs immunised with excreted-secreted *Leishmania infantum* promastigote antigens leads to nitric oxide-mediated apoptotic amastigote death. *Infection and Immunity Soumis*.
- 33. IZRI A., DEPAQUET J. et PAROLA P., 2006.** Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine Tropicale*, 66, 429-435.
- 34. GRADONI L., 2001.** An update on antileishmanial vaccine candidates and prospectes for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol*, 100, 87-103.
- 35. GUILLAUME V., 2009.** *Parasitologie sanguine*. Ed. De Boeck Université, 200p.
- 36. KUYUCU N., KARA C., BAKIRTAC A. et TEZIC T., 2001.** Successful treatment of visceral leishmaniasis with allopurinol plus ketoconazole in an infant who developed pancreatitis caused by meglumine antimouiate. *Pediatr Infect Dis J*, 20, 4, 455-457.

37. Larpent J.P., Bottom B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P., 1990. *Biotechnologie des levures*. Masson, Paris, 426p.
38. LECELLIER A., 2013. Thèse: caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle, 196p.
39. LOUIS C., 2009. *Les leishmanioses canines: ce qui doit savoir le pharmacien d'officine*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Nancy I, 108p.
40. LEVINE N.D., CORLIS J.O., COX F.F.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.G., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J. et WALLACE F.G., 1980. A newley revised classification of the protozoa. *J. Protozool*, 27, 37-58.
41. MALLORIE H., 2004. Variabilité pathologique du complexe leishmania (L. donovani). Agent de la leishmaniose viscérale. Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique. Thèse de doctorat, université de Montpellier II, 269p.
42. MARIE-ALIX D'HALEWYN M., JEAN MARC LECLERC M., NORMAN KING M., MARCEL B., MICHEL L. et YVES F., 2002. *Les risques à la santé associés à la présence des moisissures en milieu intérieur*. Institut national de santé public, Québec, 159p.
43. MARTY P. et ROSENTHAL E., 2002. Treatment of visceral leishmaniasis 3 a review of curent treatments practices. *Expert. Opin. Pharmacother*, 3, 8, 1101-1108.
44. MAZELET L., 2004. *La leishmaniose canine dans le Bassin Méditerranéen français*. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 32p.
45. McCONVILLE J.M. et BLACKWELL J.M., 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmaniadonovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J.Biol.Chem*, 266, 23, 15170-15179.
46. MELBY P.C., OGDEN G.B., FLORES H.A., ZHAO W., GELDMACHIER C., BIEDIGER N.M., AHUJA S.K., URANGA J. et MELENDEZ M., 2000. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis. *Iffect Immus*, 68, 10, 5595-5602.

- 47. MIHOUBI I., MONBRISON F.D.E., ROMEUF N., MOULAHM T. et PICOT S., 2006.** Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Med Trop*, 66, 1-6.
- 48. MOULINIER C., 2003.** *Parasitologie et mycologie médicale*. Ed. Lavoisier, 289p.
- 49. MOUMNI H., 2015.** *Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen*. Thèse de doctorat, université ABOU BEKR BELKAID de Tlemcen, 95p.
- 50. MOULOUA A.K., 2014.** *Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie*. Thèse de doctorat en science biologiques, université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou, 185p.
- 51. NICOLLE C. et COMTE C., 1908.** Origine canine du kala-azar. *Bull. Soc. Path. Exot*, 1, 299-301.
- 52. OLIVIER J.M., LABORDE J., GUINBERTEAU J., POITOU N. et HOUDEAU G., 1991.** *La culture des champignons*. Armand Colin Editeur, Paris, 160 p.
- 53. OMS, 2010.** La lutte contre les leishmanioses. *OMS séries de rapports techniques*. N° 949.
- 54. OSMANI S.A., 2007.** *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, C R C Press.
- 55. OUELLETTE M., OLIVIER M., SATO S. et PAPADOPOULON B., 2003.** Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *Médecine/science*, 19, 900-909.
- 56. PINTO M.C., CAMPBELL-LENDRUM D.H., LOZOVIE A.L., TEODORO U. et DAVIES C.R., 2001.** Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol*, 15, 123-139.
- 57. PISCOPO T.V. et AZZOPARDI C.M., 2007.** Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J*, 83, 649-657.
- 58. QUATRESOUS N., 2011.** *Aspergillose humaine Epidémiologie, diagnostic biologique, contrôle*. Thèse de doctorat, université de Limoge, 269p.

- 59. RAFATI S., BABA A.A., BAKHSHAYESH M. et VAFA M., 2000.** Vaccination of BALB/ C mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. *Clin Exp Immunol*, 120, 1, 134-138.
- 60. RAMLI I., 2013.** Etude, in vitro, de l'activité anti leishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des lamiacées. Thèse de magister : biologie appliqué, université Constantine 1, 183p.
- 61. RAVEL C., WINCKER P. et BLAINEAU C., 1998.** *Biologie moléculaire de Leishmania. Les leishmanioses.* Collection Médecine tropicale. Ellipses, 289p.
- 62. REZKALLAH L., 2008.** *Leishmanies et leishmanioses.* Laboratoire Parasitologie-Mycologie, 23p.
- 63. RIPERT C., 1996.** *Epidémiologie des maladies parasitaires.* Editions Médicales internationales, Cachan, 290p.
- 64. SAMBA S., BARRO-TRAORE F., DRABO M.K., AGOUBA F., TRAORE A. and. GUIGUEMDE A., 2013.** Epidemiological profile, clinical and therapeutic cutaneous leishmaniasis in the department of dermatology at University Hospital in Ouagadougou, Borkina Faso. *Rev Med Brux*, 34, 392-396.
- 65. SACKS D. et KAMHAOUI S., 2001a.** Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annal Reviews in Microbiology*, 55, 453-483
- 66. SAFJANOVA V.M., 1971.** Leishmaniasis control. *Bultin de l'organisation mondiale de la santé*, 44, 561-566.
- 67. SAMAKE S., 2006.** Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (cercle de Beroueli). Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Mali. 120p.
- 68. SARROUY C., COMBE P. et CLAUDE H., 1946.** Un cas de Kala-azar infantile traité par la diamidine. *Algérie, Médical*, 447-448.
- 69. SERGENT ED. et SERGENT ET., 1910.** Kala-azar, existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger. *Bull. Soc. Path. Exot*, 3, 510-511.

- 70. SIMPSON L., NEEKELMAN N., DELACRUZ V., SIMPSON A., FEAGIN J., JASMES D. et STUART K., 1987.** Composition of the maxicere (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem*, 262, 13, 6182-6196.
- 71. SPITZER N.A., ARDIN J., LIPPERT D. et OLAFSON R.W., 1999.** Long-term protection of mice against *L. major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, 11, 12, 1298-1300.
- 72. STUART K., 1991.** RNA editing in trypanosomatids mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol*, 45, 327-344.
- 73. SUNDAR S., AGRAWAL N.K., SINHA P.R., HORWITH G.S. et MURRAY H.W., 1997a.** Short-course, antimony. *An Intern Med*, 127, 2, 133-137.
- 74. SUNDAR S., 2001.** Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, 6, 11, 849-854.
- 75. THAKUR C.P., KANYOK T.P., PANDEY A.K., SINHA G.P., ZANIEWSKI A.E., HOULIHAN H.H. et OLLIARO P., 2000.** A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94, 4, 429-431.
- 76. WILSON. et RAY., 2010.** Arthropod Vectors of Disease. *Phlebotomine Sand Flies*.
- 77. WINCKER P., RAVEL C., BLAINEAU C., PAGES M., JAUFFERT Y., DEDET J. et BASTIEN P., 1996.** The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*, 24, 9, 1668-1694.
- 78. YURI P., 2013.,** fun with Microbiology. *Trichophyton mentagrophyte*.
- 79. ZAHAR A.R., 1979.** Studies on leishmaniasis. Vectors/ reservoirs and their control in the old world. *General review and inventory*, 179, p 749.

Annexes

Annexe 01 : Matériels et outils utilisés



Distillateur.



Balance à précision.



Bain marie.



Bec bunsen.



Microscope optique.



Etuve pour incubation.



Réfrigérateur.



Outils pour ensemerer.



Outils pour la ponction du lapin.



Des flacons contenant les poudres des milieux de culture utilisés.

Annexe 02: Préparation des milieux de culture utilisés et produits utilisés

- Milieu CCS
 - BHIA26g.
 - Eau physiologique500mL.
 - Sang du lapin.....20%.
- Milieu NNN
 - Agar-agar.....5g.
 - Chlorure de sodium.....3g.
 - Eau distillée.....500mL.
- Milieu Sabouraud+chloramphénicol
 - Gélose Sabouraud fondue au bain marie (à80C°), à qui on ajoute des ATB (pénicilline G et gentamycine). Puis répartir cette gélose dans des boites de pétri à l'aide d'une seringue à raison de 7mL dans chacune.
- Solution stérile
 - Dans un tube de 9mL de l'eau physiologique, on ajoute 2mL d'urine stérile, 0.2mL de gentamycine et 0.5mL de pénicilline G.
- Citrate à 10 %
 - Citrate de sodium poudre.....10g.
 - Eau distillée100mL

Annexe 03 : Résultats

1. Comptage de promastigotes vivants sur lame en présence ou en absence des filaments mycéliens

1.1. Méthodes de calcul

Après ensemencement, les cultures sont vérifiées. A partir de chaque tube de la culture mixte, on prélève une goutte de la phase liquide, on la dépose sur une lame et puis on fait le comptage sous microscope.

On refait cette opération trois fois pour chaque essai à l'intervalle de trois jours.

Les résultats sont donnés sous forme de tableaux.

Comment faire le calcul ?

Le calcul s'est fait par champs de développement : sur chaque lame, on a calculé pour cinq champs puis on a fait la moyenne.

Exemple : pour A.f : 1^{er} champ : 5 promastigotes.

2^{eme} champ : 8 promastigotes.

3^{eme} champ : 5 promastigotes.

4^{eme} champ : 2 promastigotes.

5^{eme} champ : 10 promastigotes.

Le total = 30 promastigotes.

La moyenne : $30/5 = 6$ promastigotes/champ.

1.2. Les tableaux

- 1^{er} essai : ensemencé le 13.03.2017

1ere lecture : le 16.03.2017.

	Témoin	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	5	1	1	7	1	1	0	5	3
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2eme lecture : le 20.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	12	0	0	4	4	2	0	5	1
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	-	-	-	-	-	-

3eme lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	11	0	0	0	45	0	0	4	0
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	+	-	+	-	-	-

- 2eme essai : ensemencé le 20.03.2017

1ere lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	50	1	2	1	18	15	0	27	4
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2eme lecture : le 27.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	45	0	0	0	0	6	1	1	2
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	- *	+	+	-	-	-

3eme lecture : le 30.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	45	0	0	0	0	4	0	0	0
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Contaminations bactériennes	-	-	+	- *	+	-	-	-	+

- 3eme essai : ensemencé le 20.03.2017

1ere lecture : le 23.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	50	10	1	27	6	3	4	50	8
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2eme lecture : le 27.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	20	0	0	0	30	4	1	5	12
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	- *	-	-	-	-	-

3eme lecture : le 30.03.2017.

	T	<i>A.f</i>	<i>A.n</i>	<i>Cld</i>	<i>Rzp</i>	<i>P.sp</i>	<i>C.a</i>	<i>M.c</i>	<i>T.m</i>
Nombre de promastigotes/champ	10	0	0	0	50	1	0	3	2
Présence ou non des filaments mycéliens	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Contaminations bactériennes	-	-	-	+	-	-	-	-	-
				(+*)					

NB :le (+) : présence.

Le (-) : absence.

Le (*) : contamination fongique par *Fusarium sulanis*.

Le (+*) : contamination bactériennes et fongique.

Les chiffres utilisés dans la partie résultats et discussions sont des chiffres pris en pourcentages (prenant le témoin comme étant le 100%).

2. Contrôle de la culture mixte sur milieu Sabouraud (boîtes de Pétri)

C'est fait pour vérifier la contamination ou non par d'autres espèces fongiques (pour les trois essais).

- 1er essai

souches	1 ^{er} contrôle : 20.3.2017		2eme contrôle : 23.3.2017		3eme contrôle : 27.3.2017	
	culture	contamination	culture	contamination	culture	contamination
<i>A.f</i>	+	-	+	-	+	-
<i>A.n</i>	+	-	+	-	+	-
<i>Cld</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Rzp</i>	-	-	-	-	+	-
<i>P.sp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>C.a</i>	+	-	+	-	+	-
<i>M.c</i>	-	-	-	-	-	-
<i>T.m</i>	+	-	+	-	+	-

- 2eme essai

souches	1 ^{er} contrôle : 27.3.2017		2eme contrôle : 30.3.2017		3eme contrôle : 3.4.2017	
	culture	contamination	culture	contamination	culture	contamination
<i>A.f</i>	+	-	+	-	+	-
<i>A.n</i>	+	-	+	-	+	-
<i>Cld</i>	+	+ : par <i>A.neiger</i>	+	+ : par <i>A.neiger</i>	-	+ : par <i>A.neiger</i> et <i>F.sulanic</i>
<i>Rzp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>P.sp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>C.a</i>	+	-	+	-	+	-
<i>M.c</i>	+	-	+	-	+	-
<i>T.m</i>	+	-	+	-	+	-

- 3eme essai

souches	1 ^{er} contrôle : 27.3.2017		2eme contrôle : 30.3.2017		3eme contrôle : 3.4.2017	
	Culture	contamination	culture	contamination	culture	contamination
<i>A.f</i>	+	-	+	-	+	-
<i>A.n</i>	+	-	+	-	+	-
<i>Cld</i>	Erreur de manipulation	Erreur	-	+ : par <i>Fusarium sulanis</i>	-	+ : par <i>F.sulanis</i>
<i>Rzp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>P.sp</i>	+	-	+	-	+	-
<i>C.a</i>	+	-	+	-	+	-
<i>M.c</i>	-	-	+	-	+	-
<i>T.m</i>	+	-	+	-	+	-

Annexe 04 : Observation macroscopique de la culture mixte (tubes) et la culture fongique (boîtes de Pétri : recto-verso).

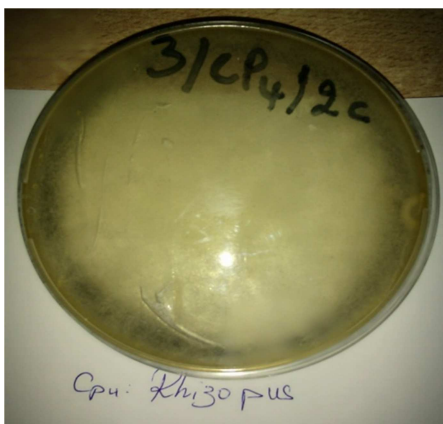
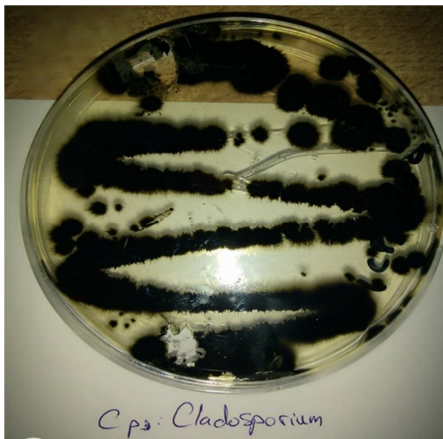
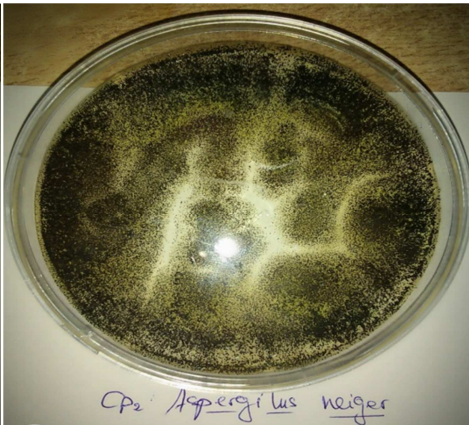
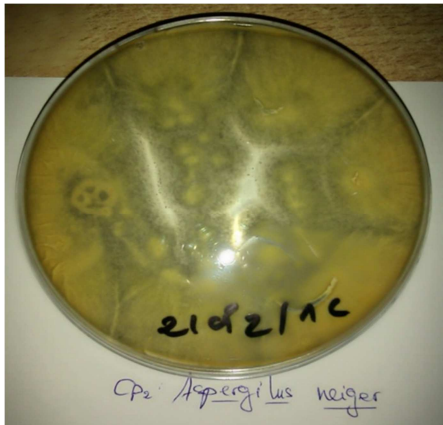


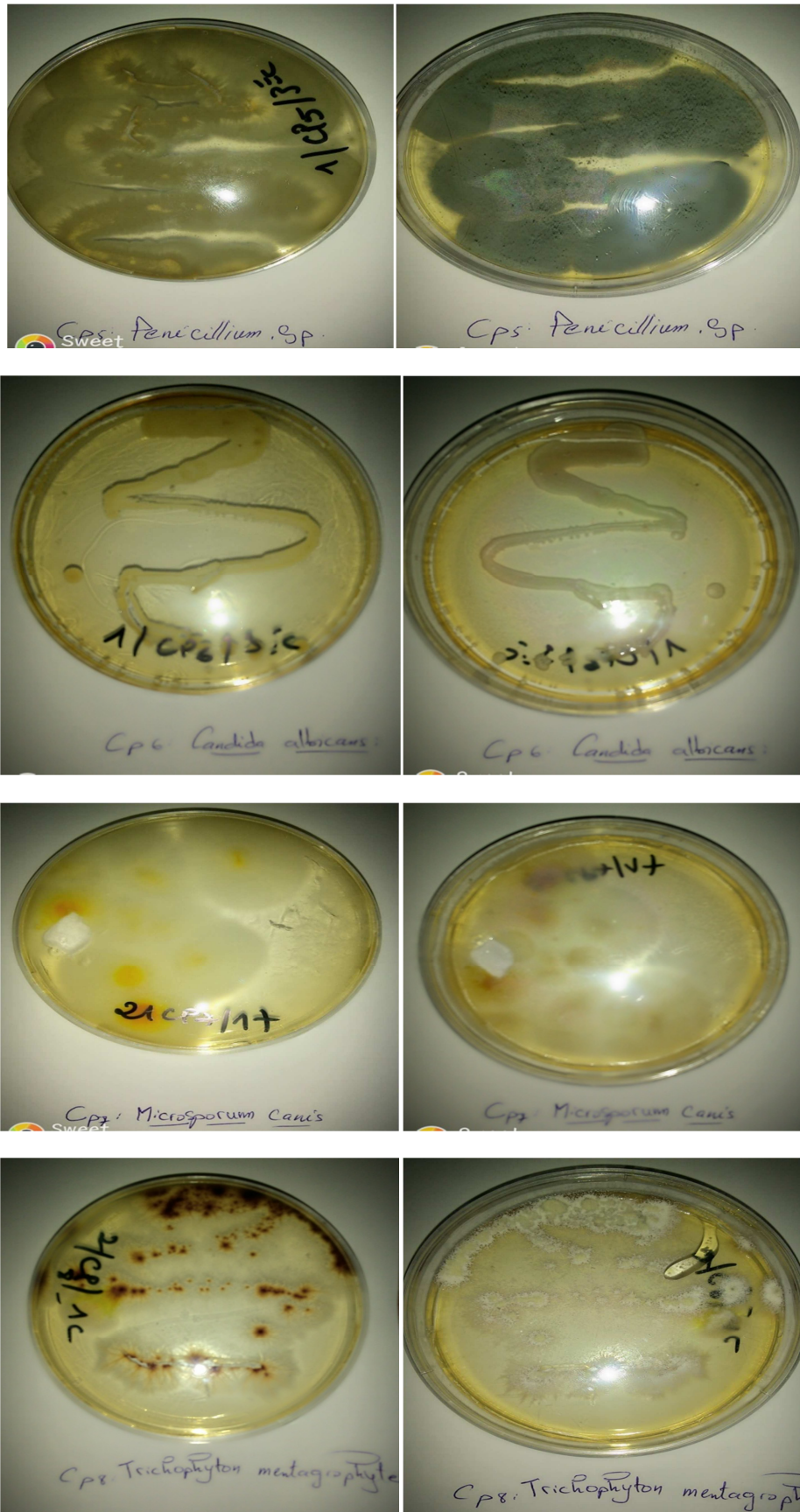
Tubes de la culture mixte.



Quelques photos représentant des résultats trouvés lors de notre étude

(Culture mixte : parasite-champignon).





Culture des champignons sur milieu Sabouraud, photos présent en recto-verso

(Laboratoire de mycologie UMMTO 2017).

Résumé

La leishmaniose est une maladie parasitaire vectorielle très diverse et complexe à répartition mondiale y compris l'Algérie. Elle est due à un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. En effet, il est à noter la sensibilité particulière de ce parasite et son exigence en point de vue conditions et milieux de cultures. Tout défaut de prélèvement, conservation ou ensemencement dans des laboratoires de recherche peut tuer le parasite. La contamination fongique qualifiée de contaminants de laboratoire a aussi un effet très important. Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet de la culture mixte fongique-parasitaire sur la croissance de *Leishmania*.

Au cours de ce travail nous avons suivi la croissance parasitaire dans une culture mixte sur milieu NNN en présence des huit espèces fongiques différentes. Nos résultats ont révélés l'existence d'une variété d'interaction entre le parasite *Leishmania* et le champignon. *Rhizopus* favorise *Leishmania* à mieux se développer, par contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus neiger* et *Microsporium canis* fragilisent le parasite et ralentissent sa croissance.

Mots clé : leishmaniose, *Leishmania*, champignon, culture mixte fongique-parasitaire, interactions.

Abstract

The leishmaniasis is extremely diverse and complex vectorial parasitic disease with a global distribution including Algeria. It is caused by a flagellate protozoan belonging to the kind of *Leishmania*. The sensibilities of this parasite and its requirements for survival and growth conditions have been noted. Any removing, preservation or seedling can kill the parasite in laboratories research. Similarly, laboratory research revealed that fungal contamination qualified as laboratory contaminants also has a very significant killing effect. In this study, the effect of fungal-parasitic mixed growing on the *Leishmania* growth has been determined.

During this study we followed the parasite growth in a mixed growing on the NNN mild with the presence of eight different sorts of fungal species. Our results revealed the existence of a variety of interaction between the parasite *Leishmania* and the mushroom. *Rhizopus* favors *Leishmania* to develop better, however, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus neiger* and *Trichophyton mentagrophyte* weakens the parasite and slows down its growth.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania*, mushroom, fungal-parasitic mixed growing, interaction.