

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار – عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

Faculté des Sciences
Département de Biochimie



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Aspects biologiques, génétiques et diagnostiques de
la leishmaniose dans la région d'Annaba**

Présentée par : M^{elle} BELDI Nadia

Devant le jury :

Présidente :	Pr. GACEMI KIRANE Djamila	Université d'Annaba.
Directrice de thèse :	Pr. MANSOURI Roukaya	Université d'Annaba.
Examinatrice :	Pr. AOUN Leila	Université d'El Tarf.
Examinatrice :	Pr. OUCHENANE Zoulikha	Université de Constantine.
Examinatrice :	MCA. BERREDJEM Hadjira	Université d'Annaba.

Année universitaire : 2016 - 2017

À tous ceux qui comptent pour moi.

REMERCIEMENTS

Je tiens, sincèrement, à remercier en tout premier lieu Madame **MANSOURI Roukaya**, Professeur & chef service du Laboratoire de « Parasitologie - Mycologie Médicale » (Université Badji Mokhtar-Annaba, Faculté de Médecine), d'avoir assumé la lourde tâche d'être la directrice de cette thèse.

Ce travail a été réalisé, en partie, au Laboratoire de « Parasitologie – Mycologie » (C.H.U. d'Annaba) dirigé par Madame **MANSOURI Roukaya**, Je remercie tous le personnel du laboratoire (Maitres assistantes, assistants, résidents et paramédicaux) pour m'avoir bien accueilli et de toute aide fournis généreusement de leurs part.

A Madame **GACEMI KIRANE Djamila**, Professeur au département de Biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba, qui a accepté et bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury. Je lui adresse mes vifs remerciements.

A Madame : **AOUN Leila**, Professeur à l'Université d'El Tarf, qui me fait un grand honneur d'accepter aimablement de juger ce travail et de participer à mon Jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.

A Madame : **OUCHENANE Zoulikha**, Professeur au « Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine », qui m'a honoré en acceptant, aimablement et malgré ses nombreuses occupations, de juger mon travail en participant à mon Jury. Je l'adresse tous mes remerciements les plus sincères.

A Madame : **BERREDJEM Hadjira**, Maitre de conférences classe A au département de Biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba, qui a accepté d'examiner mes travaux. Ses conseils m'ont été bénéfiques et son soutien d'un grand réconfort.

A Madame **GUERBOUJ Souheila**, Enseignante/chercheur associée au « Laboratoire d'épidémiologie Moléculaire de l'Institut Pasteur Tunis (IPT) », pour tous ses conseils judicieux et son amicale disponibilité. Je la remercie particulièrement pour sa confiance, sa générosité et sa gentillesse.

A Madame **GUIZANI Ikram**, Professeur et directrice du laboratoire d'épidémiologie Moléculaire de l'IPT, de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et de tous ses précieux conseils.

Je remercie surtout Monsieur **BOUKACHABIA Mohammed Nadjib**, un technicien de laboratoire doté de grandes capacités pour le temps qu'il m'a consacré et de toute aide qu'il m'a donné dans la pratique afin de mener à bien et à terme cette thèse.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont accompagné dans ce travail de recherche : médecins, malades et collègues.

Une partie de ce travail a été financée par le ministère de la santé publique et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique en Algérie : FNR (DGRSDT) et ATRSS (Ex : ANDRS) et le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique en Tunisie (LR11IPT04). Pr. Mansouri R. et Dr. Guerbouj S. ont reçu une subvention de coopération bilatérale Tuniso-Algérienne (Projet de coopération Algéro-Tunisien [EEP47_2013-15]).

Liste des abréviations

DMSO : Di-Methyl Sulf Oxide

ED : Examen Direct

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay

HAI : HémAgglutination Indirecte

IFI : ImmunoFluorescence Indirecte

ITS1 : Internal Transcribed Spacer 1

LC : Leishmaniose Cutanée

LCD : Leishmaniose Cutanée Diffuse

LCM : Leishmaniose Cutané-Muqueuse

LCS : Leishmaniose Cutanée Sporadique

LCZ : Leishmaniose Cutanée Zoonotique

LTR : Long Terminal Repeat

LV : Leishmaniose Viscérale

MGG : May-Grünwald Giemsa

MLEE : Multi Locus Enzyme Electrophoresis

MLMT : Multilocus Microsatellite Typing

MLST : Multilocus Séquence Typing

NNN : Novy Mac Neal et Nicolle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PMO : Ponction de Moelle Osseuse

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RT-PCR : Real Time PCR (PCR en temps réel)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

SRE : Système Réticulo-Endothélial, ou SRH (Système Réticulo Histiocytaire)

SVF : Sérum de Veau Fœtal, ou FBS (Fetal Bovine Serum)

Ta : annealing Temperature (température d'hybridation)

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TBE : Tris-Borate-EDTA

TMAC : Tetra Methyl Ammonium Chloride

Th : T helper

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des tableaux

Tableau 1. Informations générales sur les phlébotomes.	12
Tableau 2. Indications principales des produits antileishmaniens classiques.	24
Tableau 3. Clinique et composition du génome des espèces de <i>Leishmania</i>	28
Tableau 4. Comparaison entre les génomes de <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> et <i>L. braziliensis</i>	38
Tableau 5. Techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de la leishmaniose.	43
Tableau 6. Comparaison des outils moléculaires utilisés pour l'épidémiologiques de la leishmaniose méditerranéenne.	47
Tableau 7. Caractéristiques de souches utilisées dans ce travail.	55
Tableau 8. Caractéristiques de chaque couple d'amorces utilisées.	56
Tableau 9. Les enzymes de restriction et les conditions de réaction utilisées en RFLP.	56
Tableau 10. Taille de l'amplicon obtenu après digestion par les enzymes de restriction (RFLP).	57
Tableau 11. Les plus importants matériels de laboratoire utilisé lors de ce travail.	58
Tableau 12. Composants du milieu de culture utilisé pour la culture en masse.	64
Tableau 13. Composants du milieu de conservation.	65
Tableau 14. Interprétation des résultats de lecture des D.O.	69
Tableau 15. Mélange réactionnel de la PCR PO.	75
Tableau 16. Programme de la PCR PO.	76
Tableau 17. Mélange réactionnel de la PCR ITS1.	76
Tableau 18. Programme de la PCR ITS1.	77
Tableau 19. Mélange réactionnel de la PCR mini-exon.	78
Tableau 20. Programme final de la PCR mini-exon.	78
Tableau 21. Composants de la RFLP ITS1.	79
Tableau 22. Composants de la RFLP mini-exon.	80
Tableau 23. Relation entre la taille de fragment d'ADN à révéler et le pourcentage du gel d'agarose à utiliser.	81
Tableau 24. Représentation des prélèvements cutanés positifs en fonction du résultat obtenu.	87
Tableau 25. Représentation des prélèvements cutanés étudiés selon l'année.	87
Tableau 26. Représentation générale des prélèvements cutanés positifs durant la période d'étude (mois).	88

Tableau 27. Représentation générale des prélèvements cutanés durant la période d'étude (saisons).....	88
Tableau 28. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon l'âge.	89
Tableau 29. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon le sexe.	89
Tableau 30. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon le lieu de contamination.....	90
Tableau 31. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon le nombre de lésions. ...	91
Tableau 32. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la localisation de la lésion.	91
Tableau 33. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la nature de la lésion. ...	92
Tableau 34. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon l'évolution de la lésion.	93
Tableau 35. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la notion de présence de piquûre.....	93
Tableau 36. Représentation des résultats obtenus lors du diagnostic de la leishmaniose cutanée.	94
Tableau 37. Les résultats obtenus selon la technique de diagnostic (Examen direct et culture parasitaire).....	94
Tableau 38. Comparaison des résultats obtenus selon la technique utilisée (Examen direct <i>versus</i> culture).	94
Tableau 39. Les résultats globaux des cas de LV diagnostiqués.	95
Tableau 40. Nature des cas de LV diagnostiqués.....	95
Tableau 41. Les résultats globaux des cas de LV infantile diagnostiqués.	95
Tableau 42. Les résultats globaux des cas de co-infection LV-VIH diagnostiqués.....	96
Tableau 43. Représentation générale des prélèvements de LV durant la période d'étude (mois).	96
Tableau 44. Représentation générale des prélèvements de LV durant la période d'étude (saisons).....	97
Tableau 45. Répartition des prélèvements de LV positifs selon l'âge.	97
Tableau 46. Répartition des prélèvements de LV selon le sexe.....	97
Tableau 47. Répartition des prélèvements de LV positifs selon le lieu de contamination.	98
Tableau 48. Représentation des cas de la LVI selon les signes cliniques.....	98
Tableau 49. Représentation des cas de la LVI selon l'hémogramme.	99
Tableau 50. Distribution des cas de la LV selon la technique de diagnostic utilisée.....	99
Tableau 51. Représentation des résultats obtenus par IFI des cas de la LV positifs.....	99

Tableau 52. Comparaison de l'examen direct avec la sérologie.....	100
Tableau 53. Description des échantillons utilisés selon la nature du prélèvement.	107
Tableau 54. Description des échantillons utilisés selon l'année du prélèvement.	107
Tableau 55. La distribution géographique des échantillons utilisés.....	108
Tableau 56. Description des échantillons utilisés selon la richesse de la lame en parasites..	108
Tableau 57. La concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames archivées.....	113
Tableau 58. Résultats des PCRs selon la concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames de LC archivées.	114
Tableau 59. Résultats des PCRs selon la concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames de LV.....	114
Tableau 60. Résultats des PCRs selon la richesse des lames de LC en parasites.	115
Tableau 61. Résultats des PCRs selon la richesse des lames de LV en parasites.	115
Tableau 62. Résultats globaux des PCRs.	116
Tableau 63. Comparaison des résultats de la PO PCR (acidic ribosomal phosphoprotein fragment, PO) avec les autres PCRs.....	116
Tableau 64. Résultats des PCR-ITS1 <i>versus</i> PCR-Mini-exon.	117
Tableau 65. Représentation des résultats des PCRs selon l'ancienneté des lames archivées.	117
Tableau 66. Résultats comparées des RFLPs selon les PCRs positives.....	118
Tableau 67. Résultats comparées des espèces identifiées.....	118
Tableau 68. Résultats comparés des RFLPs.....	119
Tableau 69. Distribution géographique des espèces identifiées responsables de la leishmaniose.	120
Tableau 70. Caractéristiques des agents utilisés dans le modèle NetLogo.	126

Liste des figures

Figure 1. Taxonomie des <i>Leishmania</i> pathogènes pour les humains.....	7
Figure 2. Organisation cellulaire de <i>Leishmania</i>	9
Figure 3. Structure du lipophosphoglycane.....	10
Figure 4. Diagramme de l'organisation du gène gp63 chez <i>L. chagasi</i>	11
Figure 5. L'agent responsable : le phlébotome	13
Figure 6. Cycle de développement du phlébotome.....	13
Figure 7. Premières étapes de l'infection par <i>Leishmania</i>	16
Figure 8. Cycle parasitaire des <i>Leishmania</i> et transmission	17
Figure 9. Distribution géographique des leishmanioses viscérales dans le monde.....	21
Figure 10. Distribution géographique des leishmanioses cutanées dans le monde.....	22
Figure 11. Distribution géographique de la leishmaniose en Algérie.....	23
Figure 12. Organisation génique et maturation des ARN messagers.....	31
Figure 13. Mécanisme d'U insertion et déletion Editing chez les mitochondries des <i>Trypanosomatidaeae</i>	35
Figure 14. L'espaceur transcrit interne (ITS) de l'opéron ribosomal et la position de toutes les amorces utilisées pour l'amplification de la séquence ITS	39
Figure 15. Les gènes mini-exon de <i>Leishmania</i>	39
Figure 16. Protocole de l'étude.....	52
Figure 17. Région incluse dans l'étude.....	54
Figure 18. Schéma de lecture des cultures parasitaires.....	63
Figure 19. Protocole de l'utilisation de l'IT- <i>Leish</i> [®] test.....	70
Figure 20. L'interprétation des résultats de l'IT- <i>Leish</i> [®] test.....	71
Figure 21. Protocole de dosage de la densité optique pour quantifier l'ADN dans les échantillons.....	73
Figure 22. Position des amorces sur les séquences cibles.....	75
Figure 23. Résultats comparés des RFLPs selon les PCRs positives et les espèces identifiées.....	119
Figure 24. Distribution des espèces identifiées de la LV selon l'origine géographique.....	121
Figure 25. Distribution des espèces identifiées de la LC selon l'origine géographique.....	121
Figure 26. ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose cutanée.....	122
Figure 27. ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose viscérale.....	123

Figure 28. ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose.....	123
Figure 29. Interface du programme « NetLogo » quand il est initialisé	128
Figure 30. Interface du programme « NetLogo » quand il est terminée (Après 1000 Tiques de temps).....	129

Liste des photos

Photo 1. Formes parasitaires de <i>Leishmania sp.</i>	8
Photo 2. L'ingestion du macrophage de deux Promastigotes	15
Photo 3. Manifestations cliniques des leishmanioses.....	18
Photo 4. Prélèvements à partir de lésions suspectes de leishmaniose cutanée.....	61
Photo 5. Ponction cardiaque du lapin.....	62
Photo 6. Prélèvement pour la mise en culture du parasite.	63
Photo 7. Formes amastigotes observées au microscope optique après coloration au MGG....	83
Photo 8. Formes promastigotes observées à l'état frais au microscope optique (X 40).	84
Photo 9. Culture en masse d'une souche de <i>Leishmania sp.</i> (X 40).	85
Photo 10. Observation de corps de <i>Leishmania sp.</i> fluorescents par IFI.	85
Photo 11. Plaque d'ELISA.	86
Photo 12. Plaque de l'IT- <i>Leish</i> [®] test.	86
Photo 13. Lésions cutanées dues au parasite <i>Leishmania sp.</i>	90
Photo 14. Forme clinique de la leishmaniose viscérale.	98
Photo 15. Profils des produits PCR PO chez les espèces de la leishmaniose de l'Ancien Monde.	101
Photo 16. Profils des produits PCR ITS1 chez les espèces de la leishmaniose de l'Ancien Monde.....	102
Photo 17. Profils de restriction des différentes espèces de leishmanies par PCR-RFLP ITS1.	103
Photo 18. Résultat de l'amplification par PCR mini-exon de différents isolats de l'Ancien Monde.....	104
Photo 19. Profils de restriction des souches de culture par PCR-RFLP mini-exon.	106
Photo 20. Résultats de la PCR PO sur de l'ADN de lames archivées.....	109
Photo 21. Résultats de la PCR ITS1 sur de l'ADN de lames archivées.....	110
Photo 22. Résultat de la PCR-RFLP après la digestion avec l'enzyme de restriction <i>HaeIII</i> .111	
Photo 23. Résultats de la PCR mini-exon sur de l'ADN de lames archivées.	112
Photo 24. Résultats de la PCR mini-exon RFLP <i>EaeI</i> sur de l'ADN de lames archivées.	113

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I. <i>Leishmania</i> et leishmanioses	4
1. Generalités sur les leishmanioses	4
1.1. Définition des leishmanioses	4
1.2. Historique.....	4
2. L'agent responsable.....	5
2.1. Taxonomie des <i>Leishmania</i>	5
2.2. Morphologie.....	6
3. Le vecteur	12
3.1. Définition et taxonomie	12
3.2. Morphologie.....	12
3.3. Mode de transmission des leishmanies	13
3.4. Espèces de phlébotomes en Algérie.....	14
4. Le reservoir	14
5. Cycle évolutif.....	15
6. Formes cliniques des leishmanioses.....	17
6.1. La leishmaniose viscérale (LV) (Kala Azar)	17
6.2. La leishmaniose cutanée (LC)	19
6.3. Autres formes de la leishmaniose	19
6.4. Coinfection VIH/ leishmaniose.....	20
7. Répartition géographique de la leishmaniose.....	20
7.1. Dans le monde.....	20
7.2. En Algérie	23
8. Traitement et prophylaxie	23
8.1. Traitement.....	23

8.2. Prophylaxie	24
CHAPITRE II. Génétique des <i>Leishmania</i>	26
1. Structure	26
1.1. Principales différences entre les espèces de <i>Leishmania</i>	29
1.2. Bases de données du génome <i>Leishmania</i>	29
2. Ploïdie (l'AND nucléaire)	30
3. L'expression des gènes.....	31
3.1. La transcription	31
3.2. La traduction	33
3.3. Modifications post-traductionnelles.....	33
3.4. Analyse du protéome	34
4. Le kinétoplaste (Génome mitochondrial).....	34
5. Les gènes exprimés différemment selon le stade de vie du parasite.....	36
5.1. Les gènes spécifiques au stade promastigote.....	36
5.2. Les gènes spécifiques au stade amastigote	36
6. Mode de reproduction	37
7. La diversité génique	37
8. Arrangement des gènes	38
CHAPITRE III. Diagnostic biologique des leishmanioses	40
1. Diagnostic clinique.....	40
1.1. Leishmaniose cutanée	40
1.2. Leishmaniose viscérale	40
2. Méthodes parasitologiques.....	40
2.1. Les prélèvements	40
2.2. Mise en évidence du parasite	41
3. Méthodes sérologiques.....	42
3.1. Hémagglutination indirecte.....	44

3.2.	Immumofluorescence indirecte.....	44
3.3.	ELISA.....	44
3.4.	Agglutination directe (DAT).....	44
3.5.	Test au Latex.....	45
3.6.	Electrosynérèse.....	45
3.7.	Western Blot (électrophorèse de SDS-PAGE et immunoblotting).....	45
3.8.	L'immuno-chromatographie avec un antigène recombinant (K39).....	46
3.9.	Test d'hypersensibilité retardée (Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine).....	46
4.	Outils moléculaires utilisés dans le diagnostic et l'étude du polymorphisme de <i>Leishmania sp.</i>	46
5.1.	Identification du parasite.....	46
5.2.	Typage des souches.....	49
5.3.	Le séquençage.....	51
	MATERIEL ET METHODES.....	52
I.	Matériel biologique.....	53
1.	Prélèvements.....	53
2.	La zone d'étude.....	53
3.	ADN de souches de référence.....	53
4.	Les amorces.....	56
5.	Les enzymes de restriction.....	56
II.	Matériel de laboratoire.....	57
III.	Logiciels.....	57
1.	QGIS 2.10.1-Pisa.....	57
2.	Legend SVG.....	57
3.	GIMP 2.8 ou Inkscape-0.91-1.....	59
4.	XLSTAT.....	59

5.	NetLogo 5.3.1.....	59
IV.	Méthodes	60
1.	Recrutement de malades.....	60
2.	Etude parasitologique des prélèvements	60
2.1.	Prélèvements cutanées	60
2.2.	Prélèvements de moelle osseuse	61
2.3.	Examen direct	61
2.4.	La mise en culture du parasite	61
2.5.	Culture en masse des souches	64
3.	Etude sérologique des prélèvements	66
3.1.	La technique de l'immunofluorescence indirecte (IFI)	66
3.2.	La technique ELISA	67
3.3.	L'immunochromatographie pour la détection de l'antigène recombinant : rK39 .	70
4.	Etude Moléculaire des prélèvements.....	71
4.1.	Extraction d'ADN parasitaire par phénol/chloroforme	71
4.2.	Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN	73
4.3.	Outils bioinformatiques	74
4.4.	Amplification de l'ADN par PCRs	74
4.5.	PCR RFLP	78
4.6.	Révélation des produits amplifiés et digérés	80
	RESULTATS	83
I.	Résultats et interprétations du diagnostic biologique des leishmanioses.....	83
1.	L'examen direct.....	83
2.	Culture cellulaire des leishmanies.....	84
3.	L'immunofluorescence indirecte.....	85
4.	L'ELISA.....	86
5.	IT <i>Leish</i> test.....	86

II.	La leishmaniose cutanée.....	86
1.	Données épidémiologiques des patients.....	87
2.	Clinique des patients	90
3.	Diagnostic biologique	93
III.	La leishmaniose viscérale.....	94
1.	Données épidémiologiques des patients.....	95
2.	Clinique des patients	98
3.	Diagnostic biologique	99
IV.	Identification des espèces <i>Leishmania</i>	100
1.	Evaluation de la qualité de l'ADN par la PCR PO	100
2.	Identification des espèces <i>Leishmania</i> par PCR-RFLP ciblant la région ITS1 des gènes ARNr	101
2.1.	Validation de la PCR ITS1 pour détection des parasites <i>Leishmania</i> en culture.	101
2.2.	Identification des espèces de leishmanies en culture par PCR-RFLP ITS1	102
3.	Identification des espèces de <i>Leishmania</i> par PCR-RFLP du gène mini-exon.....	103
3.1.	Amplification d'isolats <i>Leishmania</i> de l'Ancien Monde par PCR mini-exon.....	104
3.2.	Identification des espèces <i>Leishmania</i> par la PCR-RFLP du gène mini-exon	106
4.	Description des échantillons utilisés dans l'étude moléculaire.....	107
5.	Evaluation des PCRs et PCR RFLPs appliqués sur des lames archivés	108
5.1.	Evaluation des ADN extraits par la PCR PO	108
5.2.	Evaluation de la PCR ITS1 sur des ADN parasitaires extraits de lames de patients	109
5.3.	Evaluation de la PCR mini-exon sur les échantillons prélevés de patients	111
6.	Résultats des PCRs et PCR RFLPs appliqués sur des lames archivés	113
6.1.	Résultats obtenus selon la concentration initiale de l'ADN extrait.....	113
6.2.	Résultats obtenus selon la richesse des lames en parasites.....	115
6.3.	Résultats comparés des PCRs	116

6.4.	Résultats obtenus des PCRs selon l'ancienneté des lames archivées	117
6.5.	Résultats comparées des RFLPs obtenus	118
7.	Etude statistique	122
7.1.	Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la LC.....	124
7.2.	Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la LV.....	124
7.3.	Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose.....	125
V.	Construction d'un modèle du cycle de transmission et infection à <i>Leishmania sp.</i>	125
1.	Données initiales	125
2.	Le programme	127
	DISCUSSION	130
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	140
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142
	ANNEXE	181
	Résumé	189
	Abstract	190
	الملخص	191

INTRODUCTION

La leishmaniose est une maladie infectieuse tropicale/subtropicale qui est transmise par la piqûre infestante des phlébotomes femelles hématophages [1,2]. Ceux sont des parasitoses animales et humaines dont leurs agents causales sont les *Leishmania* (*L.*), des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des *Kinetoplastidae* [3,4]. La plupart des leishmanioses humaines sont zoonotiques [5]. Lors de la piqûre, les parasites sont injectés dans le sang et ingérés essentiellement par les macrophages à l'intérieur desquels ils bloquent la réponse immunitaire et se multiplient jusqu'à atteindre d'autres tissus du corps [6,7].

L'infection peut se manifester principalement sous forme cutanée (LC), généralement guérissable, sous forme viscérale (LV), plus grave et potentiellement mortelle, ou bien sous forme cutanéomuqueuse (LCM), sévèrement mutilante. Cette variabilité de l'expression clinique dépend de l'existence d'espèces parasitaires distinctes mais également de la réponse immunitaire de l'hôte infecté [8,9].

Malgré les avancées de la recherche, la Leishmaniose constitue encore un grand problème de santé publique surtout dans les pays en voie de développement en raison de sa mortalité/morbidité, la difficulté de la mise en évidence du parasite responsable par les méthodes usuelles comme l'examen direct (ED) et les problèmes liés aux traitements (souches de *Leishmania* résistantes, toxicité, coût,...) [10–13].

Selon les données de l'OMS, environ 350 millions de personnes de la population mondiale sont exposées à ce risque infectieux dans un total de 98 pays et le nombre de personnes infectés par différentes espèces de *Leishmania* s'élève, à quelque 12 millions [14]. Cette situation préoccupante tend à s'amplifier avec la co-infection *Leishmania*-VIH fréquentes dans plusieurs régions notamment le bassin méditerranéen [15].

La leishmaniose est connue en Algérie depuis longtemps, elle a été identifiée par la première fois en 1860 pour la LC [16] et en 1911 pour la LV [17].

Les leishmanioses occupent deux zones bioclimatiques distinctes : au Nord, à l'étage Subhumide, s'observe une forme endémique dont l'agent pathogène est une variété enzymatique de *L. infantum* responsable de la LV et au Sud, à l'étage aride, sévit la forme endémoépidémique de la leishmaniose zoonotique (LCZ) due à *L. major*. Néanmoins, il existe une autre forme de la LC : la leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS) [18].

Donc, la leishmaniose cutanée et à un degré moindre la leishmaniose viscérale sévissent à l'état endémique. L'Algérie est compté parmi les dix pays les plus touchés dans le monde [19]. En

plus, un changement du profil épidémiologique des leishmanioses a été observé avec leurs extension en dehors des anciens foyers, l'augmentation de leurs incidences annuelles et la possibilité de coexister au niveau d'un même foyer [20].

Dans ce travail, nous allons apporter l'état des lieux de la situation générale de cette parasitose en Algérie et surtout dans notre région d'étude.

Dans le premier objectif, et afin de démontrer que la prise en charge est souvent mise en défaut par la complexité des cas, nous avons réalisé une étude prospective sur la prise en charge des leishmanioses cutanées et viscérales chez différents patients reçus au sein du « Laboratoire de Parasitologie/Mycologie » et qui sont des externes ou des hospitalisés dans différents services tel que : le service de « Pédiatrie », le Service des « Maladies Infectieuses » et le Service de la « Médecine interne ».

Il faut noter que le diagnostic biologique des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite par examen direct [21]. Cette technique qui peut être couplée avec la culture *in vitro* du parasite [22]. Toutefois, cette dernière est une technique exigeante et fastidieuse [23]. Les techniques immunologiques peuvent présenter un choix alternatif tout en tenant compte de la spécificité et la sensibilité de chacune [24].

Enfin, en plus de la situation endémique de la leishmaniose en Algérie, le problème de la co-existence des espèces de *Leishmania* qui se pose au sein d'un même foyer et l'incapacité de les distinguer par les outils parasitologiques et immunologiques. Le recours à la LMEE ou des techniques de Biologie moléculaire est obligatoire. C'est dans ce cadre que se place notre second objectif à savoir la mise au point et la validation de techniques PCR, simples et fiables permettant de diagnostiquer et identifier le parasite *Leishmania* et déterminer au même temps l'espèce en question, en utilisant une technique d'extraction d'ADN simple, à partir des lames, où les parasites ont été étalés pour préparation à l'examen direct, sans recours à la culture cellulaire du parasite.

Au début, nous décrivons, avec une revue de littérature, tous ce qui concerne l'agent pathogène dans son contexte biologique en insistant sur la démarche clinique et diagnostique de la leishmaniose.

Une série des cas enregistrés durant la période de l'étude (2011-2013) est présentée dans une deuxième partie de notre thèse. Nous discuterons les caractéristiques épidémiologiques, la présentation clinique typique et/ou atypique chez les différents patients immunocompétents et

immunodéprimés par le VIH. Aussi, la démarche utilisée pour poser le diagnostic parasitologique, immunologique et par PCRs des leishmanioses ainsi que l'identification des espèces parasitaires causales.

La troisième partie de ce travail est consacrée à la présentation et la comparaison des résultats obtenus. A la fin, une approche du cycle parasitaire dans notre région basée sur nos résultats obtenus sera présentée.

Donc, les objectifs globaux de ce travail sont les suivants :

- Etablir le profil épidémiologique de la leishmaniose cutanée et viscérale dans le Nord-Est Algérien (la région d'Annaba surtout).
- Optimiser le diagnostic de la leishmaniose par différentes techniques de diagnostics : parasitologiques, immunologique et moléculaire.
- Identification des espèces responsables de la leishmaniose dans la région d'étude.
- Etude statistique des résultats obtenus.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. *Leishmania* et leishmanioses

Les leishmanioses demeurent aujourd'hui encore un grave problème de santé publique. Cette parasitose fait partie des maladies négligées des tropiques [25,26].

Ce premier chapitre traite des généralités sur cette parasitose, du parasite, de son insecte vecteur, leurs réservoirs, les formes cliniques ainsi que leurs distributions géographiques.

1. Généralités sur les leishmanioses

1.1. Définition des leishmanioses

"La leishmaniose" est un nom donné aux maladies dues aux protozoaires parasites du genre *Leishmania* [27], famille des *Trypanosomatidae* [28,29] dont plus de 20 espèces sont pathogènes pour l'homme [30]. Ce sont des anthroponoses [31–35]. Ils sont des flagellés endocellulaires qui parasitent les cellules du SRH (Système Réticulo Histiocytaire) [36,37] : les cellules mononuclées [36]. Ces parasites obligatoires dihéteroxyènes [38,39] affectent de nombreuses espèces de mammifères domestiques et sauvages (une zoonose) [28,40,41] auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestante d'un insecte diptère vecteur hématophage [20,42,43] appartenant au genre *Phlebotomus* dans l'Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde [14,44].

L'infection est responsable de manifestations cliniques très variées allant des simples lésions cutanées à guérison spontanée aux infections viscérales pouvant être fatales en absence de traitement [8].

1.2. Historique

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires très anciennes : la première description clinique était des leishmanioses tégumentaires d'Amérique latine datant du **XVI^{ème} siècle**. Cependant, bien avant cela, des visages présentant des mutilations faciales probablement dues à des leishmanioses cutanéomuqueuses étaient déjà représentés sur des figurines provenant du Pérou et d'Equateur (400-900Avant js) [45].

En 1824, en Inde, les médecins remarquent pour la première fois la LV, confuse avec la malaria. On lui a donné son nom traditionnel « kala-azar », qui signifie « la fièvre noire ».

En 1882, McNaught donne la première description clinique moderne de cette maladie.

En 1885, Cunningham découvrit les parasites dans un prélèvement de « bouton d'Orient » en Inde et Il a cru que ça été des mycoses. Borovsky a aussi observé des amastigotes dans des biopsies des lésions cutanées et il les a identifiés comme des protozoaires dans ces études à Turkménistan [45,46].

En 1900, Sir William Leishman a découvert le parasite *Leishmania* [45] dans des frottis de la rate d'un soldat mort en Inde.

En 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans des biopsies de rate des patients que l'on croyant morts par malaria chronique [47,48].

En 1903, Laveran et Mesnil ont cru que cet organisme est un piroplasma et ils l'ont nommées : "*Piroplasma donovani*". Ross a modifié plus tard ce nom à : "*Leishmania donovani*" [45].

En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur les scarifications cutanées [49,50].

En 1942, Niyogi et Ray inaugurèrent les tests immunologiques avec une déviation du complément.

A partir de 1970, Chance mis en place la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies.

A partir de 1985, Les premiers cas de co-infection VIH- *Leishmania* furent signalés.

En 1987, Lainson et Show découvraient le sous genre *viannia* [51,52].

Aujourd'hui, différentes études apparaissent sur plusieurs sujets concernant les leishmanies comme : le génome, l'immunité, le diagnostic, le traitement, le séquençage du génome de *Leishmania sp.*,...

2. L'agent responsable

2.1. Taxonomie des *Leishmania*

2.1.1. Les critères de la taxonomie

La taxonomie des leishmanies représente des difficultés liées au parasite lui-même : ressemblance morphologique et absence de reproduction sexuée [45]. Par conséquence, elle a été basée sur un ensemble de caractères « extrinsèques » afin de construire une classification cohérente. La taxonomie est basée sur le comportement du parasite dans le vecteur [51]. Le genre *Leishmania* a été divisé en 2 sous-genres selon la position des parasites autour du pylore de l'insecte vecteur :

- Le sous-genre *Leishmania* (Saf'janova. 1982) à développement suprapylorique (en amont)
- Le sous-genre *Viannia* (Lainson, 1987) à position péripylorique [45].

Cette classification était établie sur des données cliniques, épidémiologiques et sur les caractéristiques biologiques des parasites chez les animaux de laboratoire et chez les vecteurs [53]; tandis que la classification actuelle privilégie des critères biochimiques et immunologiques d'investigation. C'est l'électrophorèse des isoenzymes (MLEE) [51].

Actuellement, la MLEE demeure incapable de distinguer précisément entre les différents espèces d'où la nécessité d'aboutir à d'autres techniques (comme le montre la phylogénie) et de réviser la nomenclature actuelle [54].

2.1.2. Taxonomie

Ce protozoaire flagellé est de l'ordre des *Kinetoplastidae* et la famille des *Trypanosomatidae*. Les *Trypanosomatidae* sont répartis en 9 genres dont *Leishmania* qui contient deux sous-genres, *Leishmania* (appartient à l'Ancien et le Nouveau Monde) et *Viannia* (appartient au nouveau monde) [51,52] (Figure 1).

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui causent une panoplie de manifestations cliniques [55].

2.2. Morphologie

2.2.1. La leishmanie

Les *Leishmania* sont des eucaryotes unicellulaires pourvus d'un organite spécifique aux kinétoplastidés, le kinétoplaste, situé en position antérieure. 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 (GIPLs) de faible poids moléculaire et de protéines membranaires [56].

2.2.2. Les formes parasitaires

Le parasite est dimorphique, amastigotes intramacrophagiques chez les hôtes vertébrés dont l'homme et promastigotes libres dans l'intestin du phlébotome. Un stade sexuel n'a pas été identifié [45]. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire simple [55].

2.2.2.1. Forme promastigote

Les promastigotes sont des parasites extracellulaires très mobiles. Munie d'un flagelle antérieur, cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Il s'agit d'un organisme qui a un corps long (environ 10 à 25µm) et mince (2µm) (Photo 1). Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure. Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au pharynx. Les amastigotes se transforment en promastigotes aussi en culture (Photo 1).

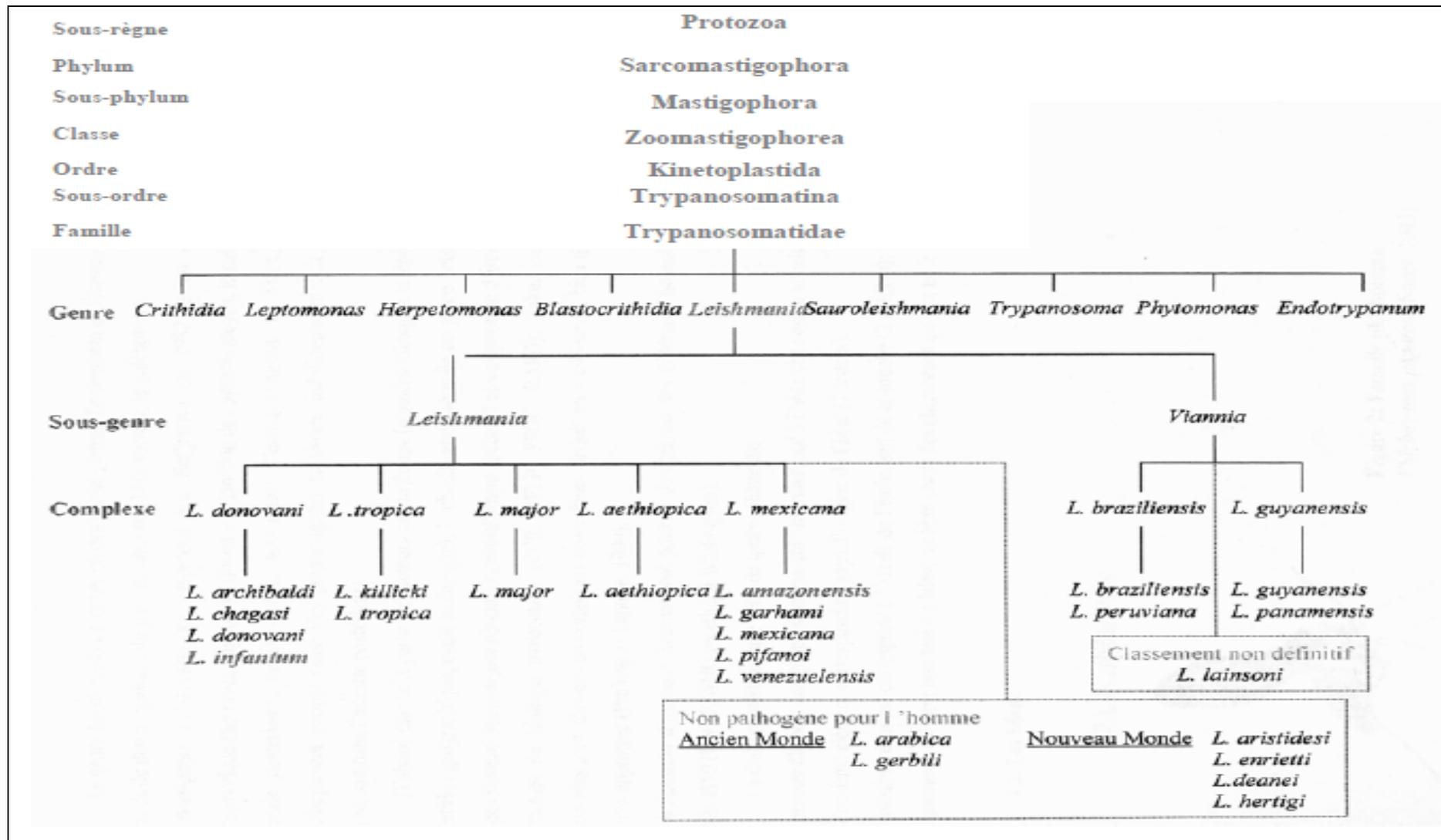


Figure 1. Taxonomie des *Leishmania* pathogènes pour les humains [47].

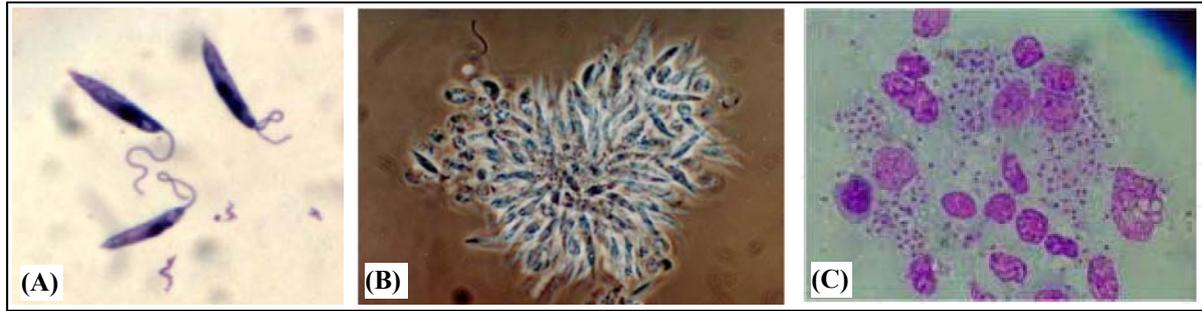


Photo 1. Formes parasitaires de *Leishmania sp.*

(A) Des promastigotes en culture colorés par MGG [57]; (B) Rosette de promastigotes procycliques en culture [58]; (C) Les amastigotes [59].

Pendant la phase de culture exponentielle les promastigotes dites procycliques se multiplient par scissiparité longitudinale.

Quand la culture atteint son plateau la majorité a évolué en promastigotes métacycliques qui sont seuls infectieux pour les macrophages mais qui ne se multiplient plus à moins qu'ils ne soient phagocytés et ensuite évoluent en amastigotes [58].

2.2.2.2. **Forme amastigote**

C'est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve à l'intérieur des macrophages des mammifères, au sein de vacuoles parasitophores des cellules du SRH des hôtes vertébrés et dans les cellules mises en culture. Il s'agit de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2,5 à 6,5 μm de diamètre [60] (Photo 1-(C)), immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentent en microscopie optique après coloration panoptique de routine (MGG) deux inclusions pourpres juxtaposés caractéristiques: le noyau, arrondi, et le kinétoplaste en bâtonnet plus sombre à la base de la poche flagellaire [45,58].

Ils sont anaérobies, acidophiles et capable de résister aux hydrolases lysosomales et sont donc parfaitement adaptés aux conditions de température et de pH des vacuoles parasitophores des macrophages. Cette résistance est due à la présence des protéines telles que la hsp70 qui protège le parasite contre le stress oxydatif déclenché lors de son entrée dans le macrophage [61].

2.2.3. **Ultrastructure des *Leishmania***

Une cellule de *Leishmania* a une grande variabilité morphologique entre les différentes espèces, et même durant le cycle de vie d'une même espèce. Le premier constat de l'organisation de ces cellules est l'abondance d'organites en copie unique. Les *Leishmania* ont un seul flagelle, une seule mitochondrie, un seul appareil de Golgi face à la poche flagellaire et un seul noyau dont la membrane externe est fusionnée au réticulum endoplasmique. Cette

organisation a pour rôle une régulation précise de la réplication des organelles lors de la division cellulaire [62] (Figure 2).

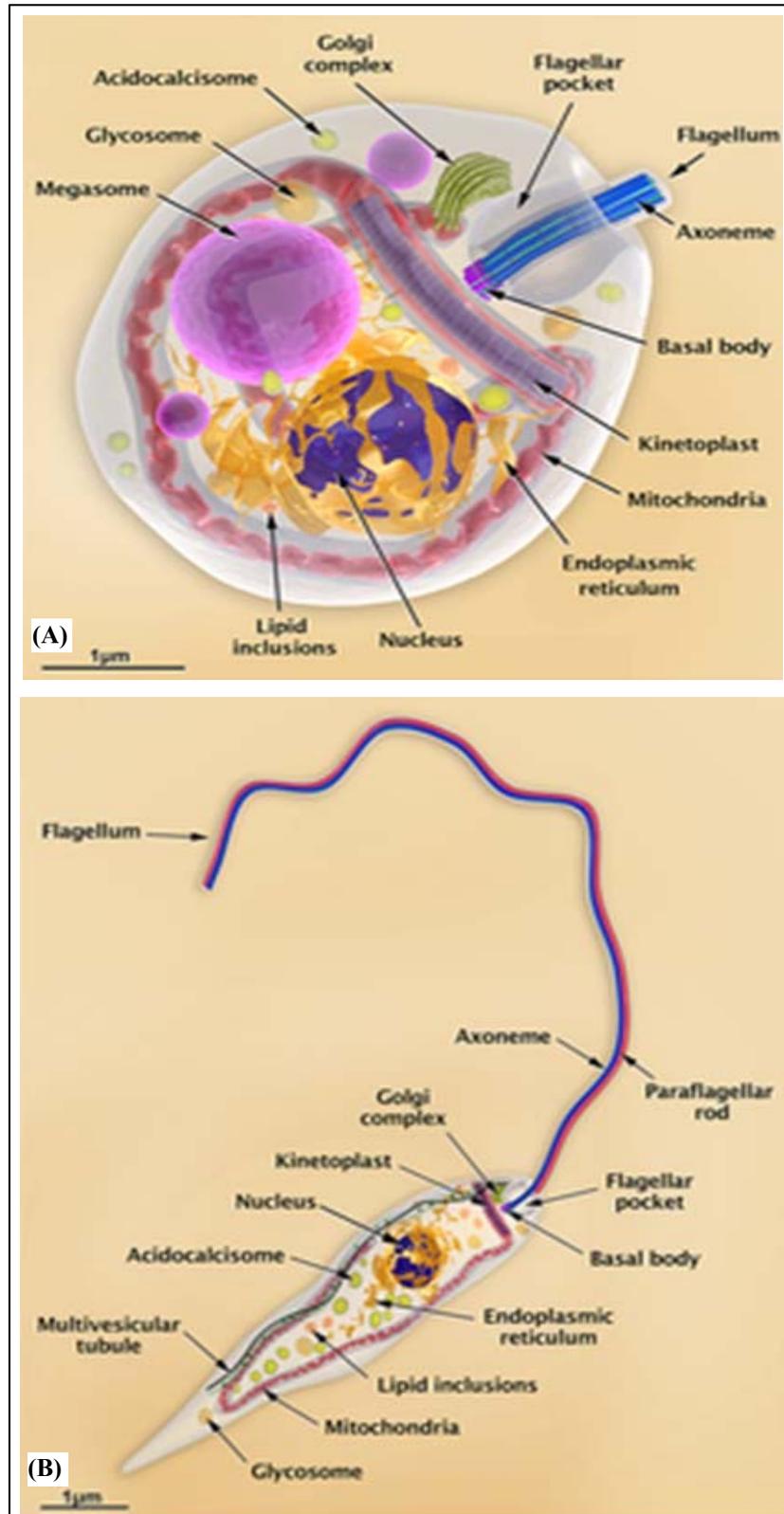


Figure 2. Organisation cellulaire de *Leishmania* [63].

(A) Ultrastructure d'un amastigote de *Leishmania sp.*; (B) Ultrastructure d'un promastigote de *Leishmania sp.*

2.2.4. Structure biochimique des formes promastigotes et amastigotes

Les composants de la membrane du parasite *Leishmania* sont parmi les meilleurs caractéristiques des protozoaires parasites, ils peuvent être subdivisés en 2 groupes :

- Le premier groupe : sont identifiés par leurs fonctions, ils sont présentés par un nombre faible de copies par cellule et ont un mode catalytique (ex: transporteurs, ectoenzymes,...).
- Le second groupe : sont identifiés parce qu'ils sont des composants majeurs de la structure membranaire. Trois parmi eux sont les plus importants : gp63 (promastigote surface protease, PSP), lipophosphoglycane (LPG) et glycosylphosphatidylinositols (GIPLs) [64].

Les différents stades du parasite *Leishmania* peuvent être identifiés selon leur morphologie ou leur emplacement dans le tube digestif du vecteur mais également selon les molécules qui composent leur surface.

Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus [65]. Ce manteau est constitué de composés glycosylés et de protéines ayant tous une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Chez les promastigotes, la molécule de surface la plus abondante est le **lipophosphoglycan (LPG)**. Sa structure (Figure 3) varie d'une espèce de *Leishmania* à l'autre mais est principalement composée d'unités répétées d'un disaccharide et d'un phosphate suivant l'ancre GPI. Les espèces se différencient par la présence de chaînes latérales de glycanes, ainsi que par la composition et la situation de celles-ci sur la structure de base du LPG. Cette molécule de surface est très importante dans l'infection des phlébotomes et joue un rôle dans l'interaction avec les macrophages de l'hôte mammifère [9,66].

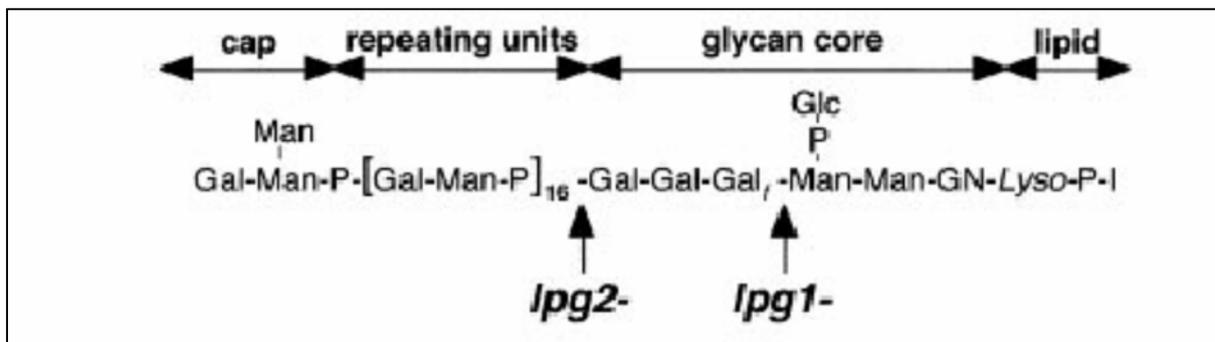


Figure 3. Structure du lipophosphoglycane [67].

Le LPG est composé d'une coiffe, d'unités répétées, d'un glycan et il est ancré dans la membrane plasmique par un lipide. Les formes tronquées engendrées par les mutants lpg1- et lpg2- de *L. donovani* sont indiquées par les flèches.

Il ya 2 molécules associés au LPG : « the kinetoplastid membrane protein » (KMP-II) nommée: LPG-associated protein (LPGAP) et « the gene B protein », elle se trouve entre le LPG et le GIPL [64].

La deuxième molécule importante chez le promastigote est une métallo-protéase nommée : **la glycoprotéine gp63** qui est aussi connue sous le nom de leishmanolysine ou MSP (Major Surface Protein) ou PSP (Promastigote Surface Protein) [68]. Elle est ancrée dans la membrane grâce au résidu GPI. Elle est environ 10 fois moins abondante que le LPG mais tout comme lui, elle recouvre toute la surface du parasite [66].

Les promastigotes expriment 500 000 copies de gp63 par cellule soit 1% des protéines cellulaires au contraire des amastigotes où elle est exprimée à des niveaux bas [69]. Cette protéine est présente sous différentes isoformes selon le stade de développement et l'espèce de *Leishmania* étudiée ce qui va avoir un effet sur la pathogénicité. Son expression est considérablement augmentée au stade métacyclique [70](figure 4). Le polymorphisme du gène gp63 est strictement dans les régions codantes pour les domaines de surface de cette protéine [71].

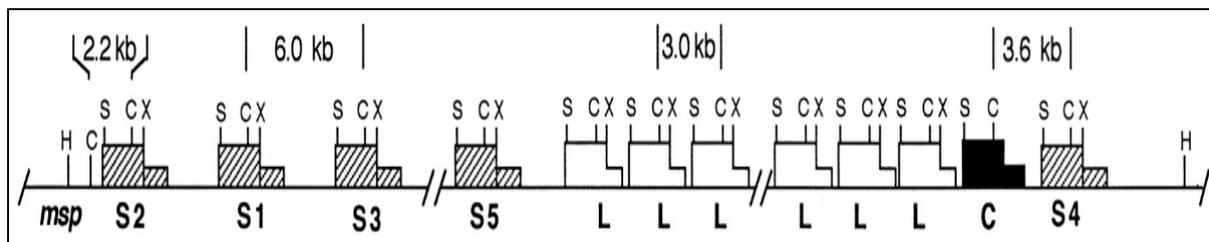


Figure 4. Diagramme de l'organisation du gène gp63 chez *L. chagasi* [72].

De gauche à droite, les copies mspS (exprimées à la phase stationnaire), les copies mspL (exprimées en phase logarithmique), la copie mspC (exprimée constitutivement) et la copie mspS4.

Une autre classe de glycolipides ayant une ancre GPI est le **phospholipide de glycosylinositol (GIPL)**. Ces molécules sont 10 fois plus abondantes que le LPG [9].

Certaines molécules peuvent aussi être sécrétées par le parasite telles que les phosphatases acides et les protéophosphoglycanes (PPG) [73,74].

Concernant les molécules retrouvées à la surface des amastigotes, on observe deux différences majeures : une diminution marquée de l'expression du LPG [75] et la localisation de la majorité des gp63 dans la poche flagellaire du parasite [70,76].

3. Le vecteur

3.1. Définition et taxonomie

Les vecteurs de transmission de la leishmaniose sont de l'ordre *Diptera*, de la famille des *Psychodidae* et de la sous-famille des *Phlebotominae* [77] qui compte actuellement 700 espèces décrites dans 6 genres [78]. Les vecteurs sont relativement des aviateurs faibles [45,79].

Il existe un genre prédominant dans le Nouveau Monde, *Lutzomyia* et un dans l'Ancien Monde, *Phlebotomus* qui sont responsables d'à peu près toutes les transmissions connues du parasite *Leishmania* aux humains (Tableau 1).

Sur 81 espèces de mouches, au moins 19 ont été confirmées comme vecteurs des différentes espèces de *Leishmania* [77]. Seule la femelle transmet la maladie en prenant un repas sanguin chez l'hôte qui servira au développement des œufs [80].

Tableau 1. Informations générales sur les phlébotomes [79].

Taxonomie	<i>Psychodidae: Phlebotominae</i>		
Distribution	les tropiques, subtropiques, régions tempérées chaudes		
Genres pathogènes aux humains	Nombreuses espèces des <i>Phlebotomus</i> et <i>Lutzomyia</i>		
Stades hématophages	Femelle		
Pathogènes	Nombreux arbovirus du <i>Bartonella bacilliformis</i> <i>Leishmania sp.</i> <i>Bunyaviridae</i> (Phlebovirus)		
Principales maladies causes	Fièvre de Pappataci, Fièvre de phlébotome de Toscana	Fièvre d'Oroya, Verruga peruana (maladie de Carrion)	Différentes formes de leishmaniose viscérale et cutanée

Il faut noter qu'il existe une forte relation entre l'espèce de phlébotome et l'espèce de *Leishmania* qu'il transmet [81], mais il existe aussi quelques cas exceptionnels récemment découverts [82].

3.2. Morphologie

Le vecteur appartient à une famille d'insectes diptères nématocères [81]. C'est un petit insecte avec une longueur de corps dépassant rarement 3 mm et sont jaunâtres avec des yeux sombres, leur corps est couvert de soies et ils présentent des ailes lancéolées dressées [83] (Figure 5). Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement (œuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide (Figure 6) [84].

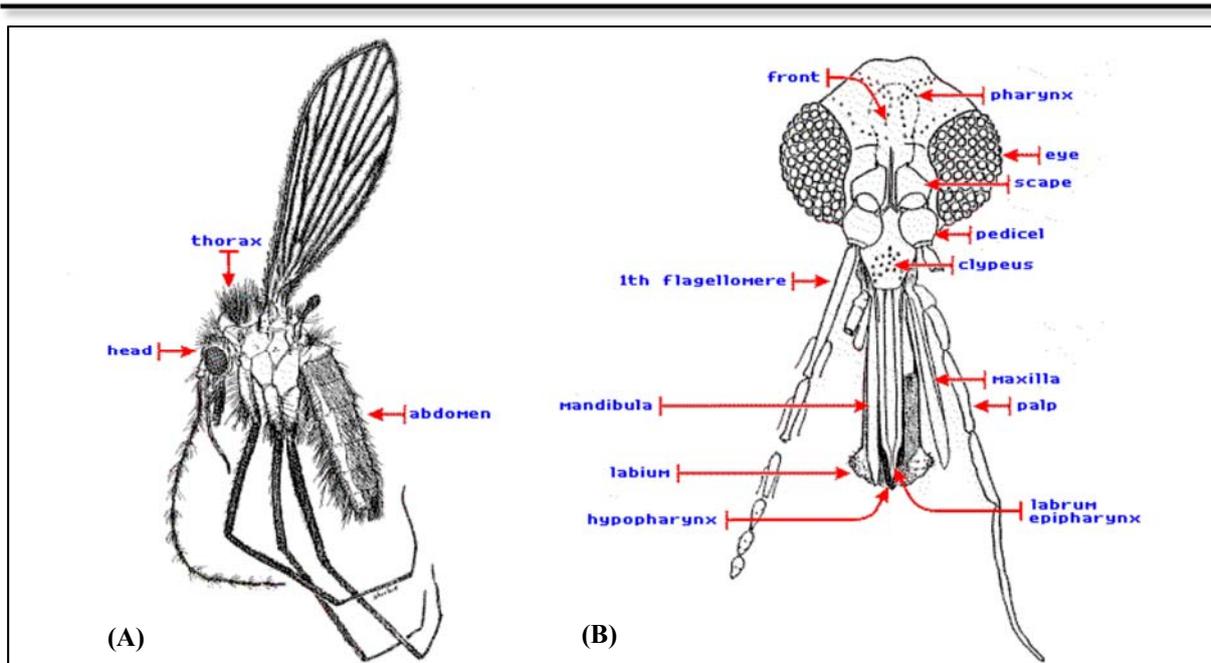


Figure 5. L'agent responsable : le phlébotome [85].

(A) Le corps; (B) La tête.

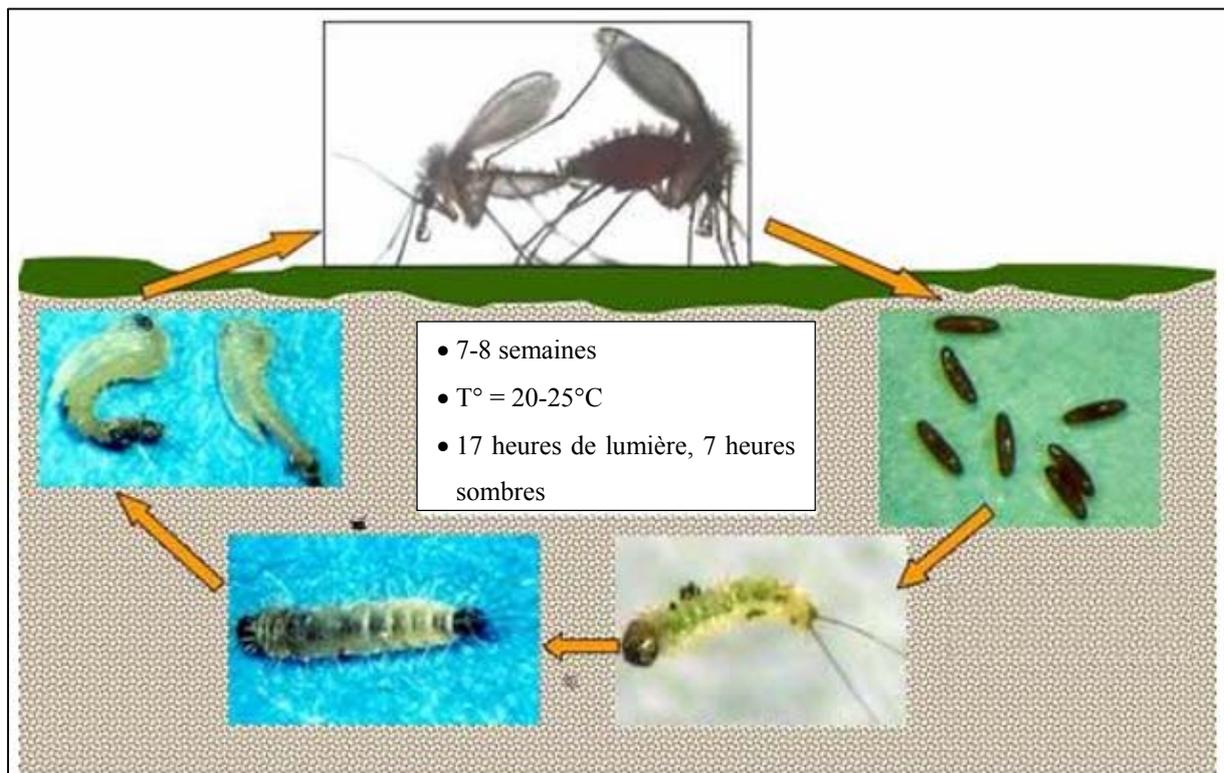


Figure 6. Cycle de développement du phlébotome [86].

3.3. Mode de transmission des leishmanies

3.3.1. Vectorielle

La piqûre infectante du phlébotome représente le mode habituel de contamination. Donc, la présence du phlébotome conditionne la répartition de la maladie [87].

3.3.2. Les autres modes

Des cas exceptionnels de transmission transplacentaire et par la transfusion sanguine ont été rapportés dans la littérature. La transmission particulièrement par l'échange de seringue usagée, est incriminé pour expliquer l'atteinte élevée des toxicomanes intraveineux au cours de la co-infection leishmaniose/SIDA dans le sud de l'Europe surtout en Espagne [43,88–90]. Les voies transfusionnelle et congénitale sont rares [80].

3.4. Espèces de phlébotomes en Algérie

En Algérie, 22 espèces de phlébotomes ont été recensées et identifiées par Belazzoug (1991), dont 12 du genre *Phlebotomus* et 10 du genre *Sergentomyia*.

Concernant la leishmaniose viscérale, depuis les travaux de Parrot, Donatien et Lestoquard en 1930, le vecteur est identifié comme étant *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (naturellement infesté par *Leishmania infantum* zymodème MON 1) [91]. D'autres espèces du genre *Phlebotomus* et le genre *Sergentomyia* ont été trouvées récemment au Sud Algérien comme étant des vecteurs de la LV [92].

Quant à la leishmaniose cutanée du Nord, *Leishmania infantum* zymodème MON-24 a été isolé à partir du vecteur *Phlebotomus (larroussius) perfiliewi* [93].

Le vecteur de la leishmaniose cutanée zoonotique admis depuis les frères Sergent et Louis Parrot 1926 est *Phlebotomus papatasi* confirmé par Dedet et al (1973) [94].

Et enfin, Le vecteur de la leishmaniose cutanée à *L. killicki* est *Phlebotomus sergenti* [95].

4. Le réservoir

Il faut noter qu'un animal est considéré d'être un réservoir que s'il contient l'AND de *Leishmania sp.* [96]. Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres: carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite [97]. Il faut noter que certaines espèces uniquement sont impliquées dans le cycle de la transmission des leishmanies. Chez les rongeurs par exemple, 3 espèces sont responsables de la transmission de *Leishmania major*: *Psammomys obesus*, *Meriones shawi* et *Meriones libycus* [98].

On peut classer les leishmanioses comme des anthroponoses ou de zoonoses selon que l'humain soit l'hôte direct ou l'hôte accidentel du vecteur. 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 [99,100]. Dans l'Ancien Monde, ce sont surtout les rongeurs et les chiens [101].

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet comme réservoir le chien [102–105]. Les zymodemes MON-34, MON-77 [106] zymodeme MON-24 [107] et *L. infantum* MON-80 [108] ont été identifiés à partir des chiens. Une étude récente a permis d'isoler *L. infantum* MON-1 à partir du chacal doré (*Canis aureus*) [109].

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages : *Psammomys obesus*, naturellement infesté par *Leishmania major* [94,101,106,110,111] et *Meriones shawi* [112].

Quant à la leishmaniose cutanée variant enzymatique de *L. infantum*, le réservoir demeure inconnu, bien que le chien soit fortement suspecté [113].

Et enfin, le réservoir potentiel de la leishmaniose cutanée due à *L. killicki* est le rongeur gundi (*Ctenodactylus gundi*) [95,114].

5. Cycle évolutif

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, un vertébré (homme, chien, rongeur, ...) et un insecte vecteur : le phlébotome, impliquant le passage alterné d'un hôte mammifère à un autre par l'intermédiaire du phlébotome vecteur [115].

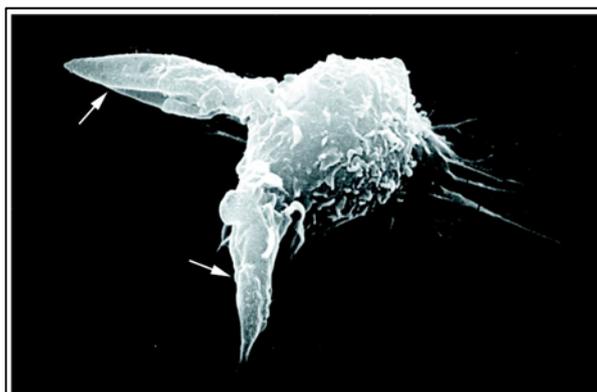


Photo 2. L'ingestion du macrophage de deux Promastigotes [57].

Les amastigotes du vertébré sont ingérés par le phlébotome femelle avec son repas sanguin; ils se multiplient sous forme de promastigotes procycliques dans l'intestin moyen, évoluent en promastigotes métacycliques infectieux obstruant la cavité buccale de l'insecte. Lors du repas sanguin du phlébotome femelle infecté, elle émet sa salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion le parasite (entre 10 et 100 parasites) sous sa forme promastigote. Il infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages) du

système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote. Ceux-ci résistent à l'environnement hostile du phagolysosome et s'y multiplient. La multiplication du parasite se fait dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par les cellules avoisinantes où le processus se poursuit (figure 7) [6].

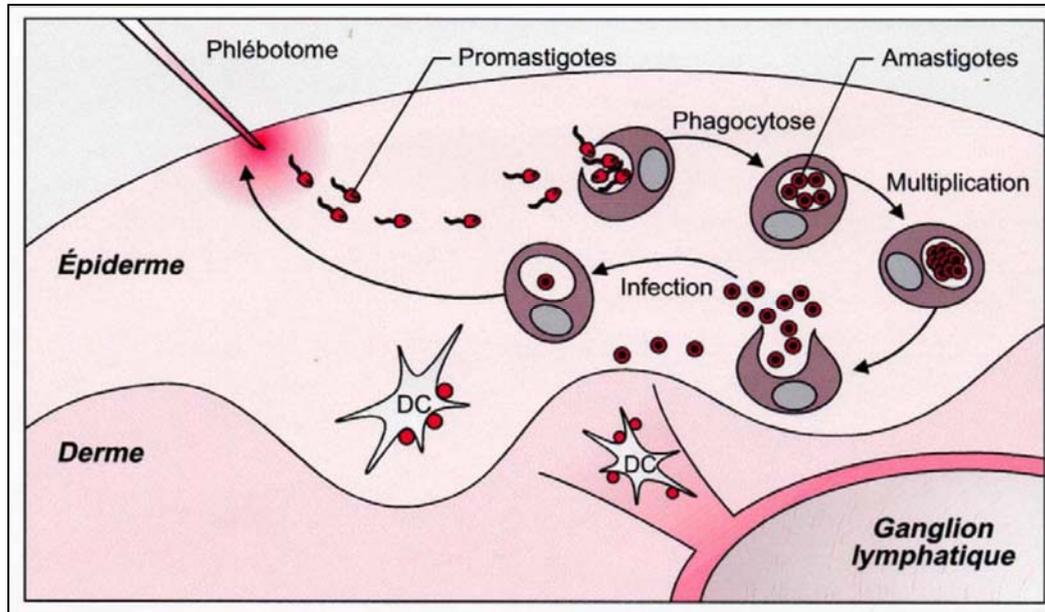


Figure 7. Premières étapes de l'infection par *Leishmania* [7].

L'invasion des macrophages par les promastigotes, leur transformation en amastigote, et la capture des leishmanies ou de leurs antigènes par les cellules dendritiques (DC). Cette capture par les cellules dendritiques induit leur maturation et leur migration vers le ganglion lymphatique drainant le site de l'infection.

Le cycle est complété lorsqu'une phlébotome prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant des *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes métacycliques. C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères [6].

Le développement des amastigotes en promastigotes dure 1 à 2 semaines selon l'espèce de *Leishmania* [45]. Après maturation, les promastigotes métacycliques migrent jusqu'à la trompe du Phlébotome pour infecter l'hôte lors du prochain repas sanguin (Figure 8) [45].

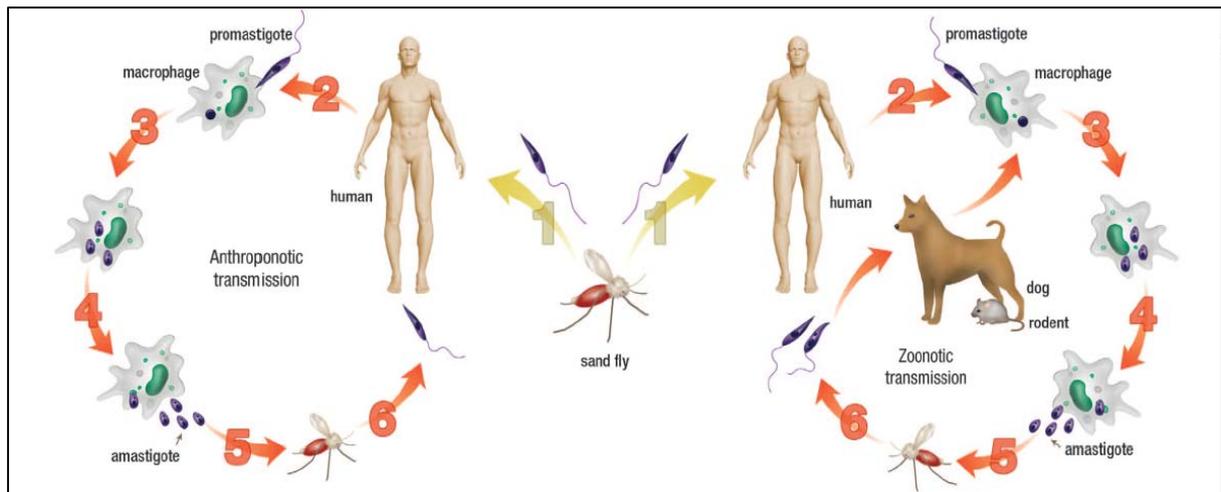


Figure 8. Cycle parasitaire des *Leishmania* et transmission [116].

La transmission des parasites *Leishmania* peut être soit anthroponique ou zoonotique.

6. Formes cliniques des leishmanioses

Les infections leishmaniennes peuvent aboutir à des cas asymptomatiques comme ils peuvent avoir une panoplie de manifestations cliniques plus ou moins graves (Photo 3) selon les espèces de *Leishmania* responsables [117].

6.1. La leishmaniose viscérale (LV) (Kala Azar)

Elle est causée par différents complexes dont *L. donovani* et *L. infantum* dans l'Ancien Monde et *L. chagasi* dans le Nouveau Monde [13].

C'est une forme grave, mortelle en absence du traitement spécifique. Elle résulte d'une atteinte systémique généralisée des phagocytes mononuclés [118]. On distingue deux formes cliniques :

6.1.1. La leishmaniose viscérale infantile (LVI)

C'est la forme la plus fréquente dans le pourtour méditerranéen, particulièrement en Afrique du Nord [119].

Les parasites migrant vers les organes lymphoïdes tels que le foie, la rate et la moelle osseuse via les systèmes sanguin et lymphatique. La période d'incubation est d'une durée variable (habituellement 2 à 4 mois). Les symptômes sont la fièvre [120], les frissons, la nausée, l'œdème facial, le saignement des muqueuses, la diarrhée, les difficultés respiratoires, l'anémie avec la lymphadenopathie [120,121], l'hépatomégalie et la splénomégalie (Photo 3-(A)) [37,120]. Sans traitement spécifique, l'évolution est fatale, la mort survient par surinfections et/ou hémorragies [122,123].

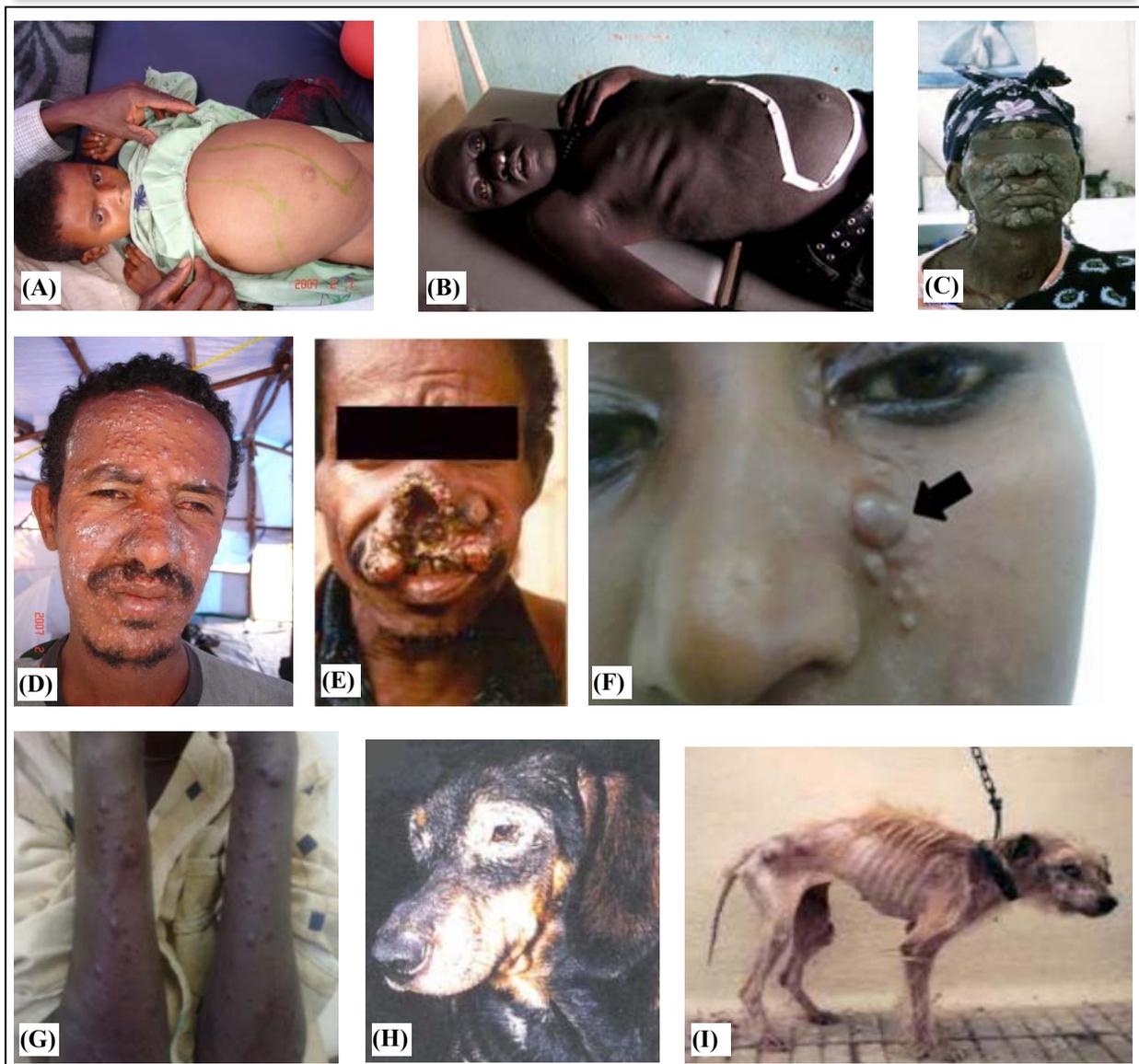


Photo 3. Manifestations cliniques des leishmanioses

(A) : La leishmaniose viscérale infantile [124]; (B) : La leishmaniose viscérale de l'adulte [125]; (C) : La leishmaniose cutanée diffuse [58]; (D) : La leishmaniose cutanée post Kala-azar [124]; (E) : Différentes lésions de la leishmaniose cutanéomuqueuse [58]; (F) et (G) : Leishmaniose cutanée Disséminée ressemblant à PKDL causée par *Leishmania donovani* chez des patients co-infectés par VIH/LV [126] ; (H) et (I) : La leishmaniose canine (dépilation péri-orbitaire, dépilation et cachexie) [38,127].

6.1.2. La leishmaniose viscérale de l'adulte

Elle est beaucoup moins fréquente que la LVI avec un tableau clinique beaucoup moins typique avec des manifestations inhabituelles [118,128]. Il peut s'agir de forme fébrile prolongée. La splénomégalie peut être absente ou constituer le seul élément clinique, de même que les adénopathies. Les signes cutanés sont prédominants, d'installation brutale rendant le diagnostic difficile [20].

6.2. La leishmaniose cutanée (LC)

Est une forme bénigne, caractérisée par une atteinte exclusive de la peau, localisée au site d'inoculation du parasite par le phlébotome, au niveau des parties découvertes du corps [129]. Elle est principalement due aux complexes *L. tropica* et *L. major* (Ancien Monde). Le complexe *L. mexicana* [130] et *L. peruviana* (complexe *L. braziliensis*) causent la leishmaniose cutanée dans le nouveau monde [129]. Elle est sous plusieurs formes :

6.2.1. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales. Après une incubation courte, apparaît la lésion caractéristique : la forme ulcéro- croûteuse, avec une ulcération recouverte d'une épaisse croûte brune, indolore, de taille variable (habituellement de 1 à 4 cm de diamètre), d'évolution chronique [20,131]. Les formes cliniques multiples diffèrent d'un sujet à l'autre, d'une lésion à l'autre chez un même individu, selon la localisation sur le corps, d'un biotope à l'autre.

La durée d'évolution de la leishmaniose cutanée zoonotique est habituellement courte et l'agent pathogène est *L. major*. Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois en laissant d'importantes cicatrices [20].

6.2.2. La leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS)

Elle se présente sous forme d'une petite lésion unique, siégeant au niveau de la face, très inflammatoire, sans ulcération et sans croûte épaisse. Sa durée d'incubation est longue tout comme sa durée d'évolution. L'agent pathogène est *L. infantum*.

La leishmaniose cutanée du Nord nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation, qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an [20].

6.2.3. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

C'est une forme qui ne guérit jamais spontanément et qui présente une tendance aux rechutes après le traitement [132].

6.2.4. Leishmaniose cutanée post Kala-azar (PKDL)

Elle est fréquemment développée par un patient guérit d'une LV. Cela se produit dans 30% à 40% des cas. Elle apparaît habituellement dans les 2 ans qui suivent la guérison complète de la forme viscérale. L'évolution est équivalente à la LC diffuse et très mutilante (Photo 3) [133].

6.3. Autres formes de la leishmaniose

6.3.1. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Elle est principalement causée par le complexe *L. braziliensis* et se retrouve dans le Nouveau Monde et dans le Nord-Ouest de l'Afrique [8].

C'est une des formes les plus sévères de la leishmaniose, les lésions muqueuses métastatiques sont le plus souvent secondaires aux lésions cutanées initiales. Les localisations muqueuses sont : le nez, les lèvres, la cavité buccale, le pharynx et le larynx (Photo 3) [134].

6.3.2. La leishmaniose canine

Le chien présente cliniquement : une modification du caractère, un amaigrissement, une hépato-splénomégalie, des adénopathies, la dépilation périorbitaires et l'onychogryphose (Photo 3).

L'évolution de la maladie est chronique, elle évolue vers la cachexie puis la mort est de règle et seul 10% des chiens vont rester « porteurs sains » [129].

6.4. Coinfection VIH/ leishmaniose

6.4.1. Leishmaniose viscérale et SIDA

L'infection VIH a considérablement augmenté la fréquence de la LV [135,136].

Le tableau clinique est typique de la LV dans 84,2% des cas [137], mais la fréquence des différents symptômes classiques est variable. Les principaux symptômes rencontrés par ordre décroissant sont les suivants: fièvre, hépatomégalie, splénomégalie et adénopathie [138].

La leishmaniose accélère la progression vers le SIDA et réduit ainsi l'espérance de vie des individus infectés par le VIH [139,140].

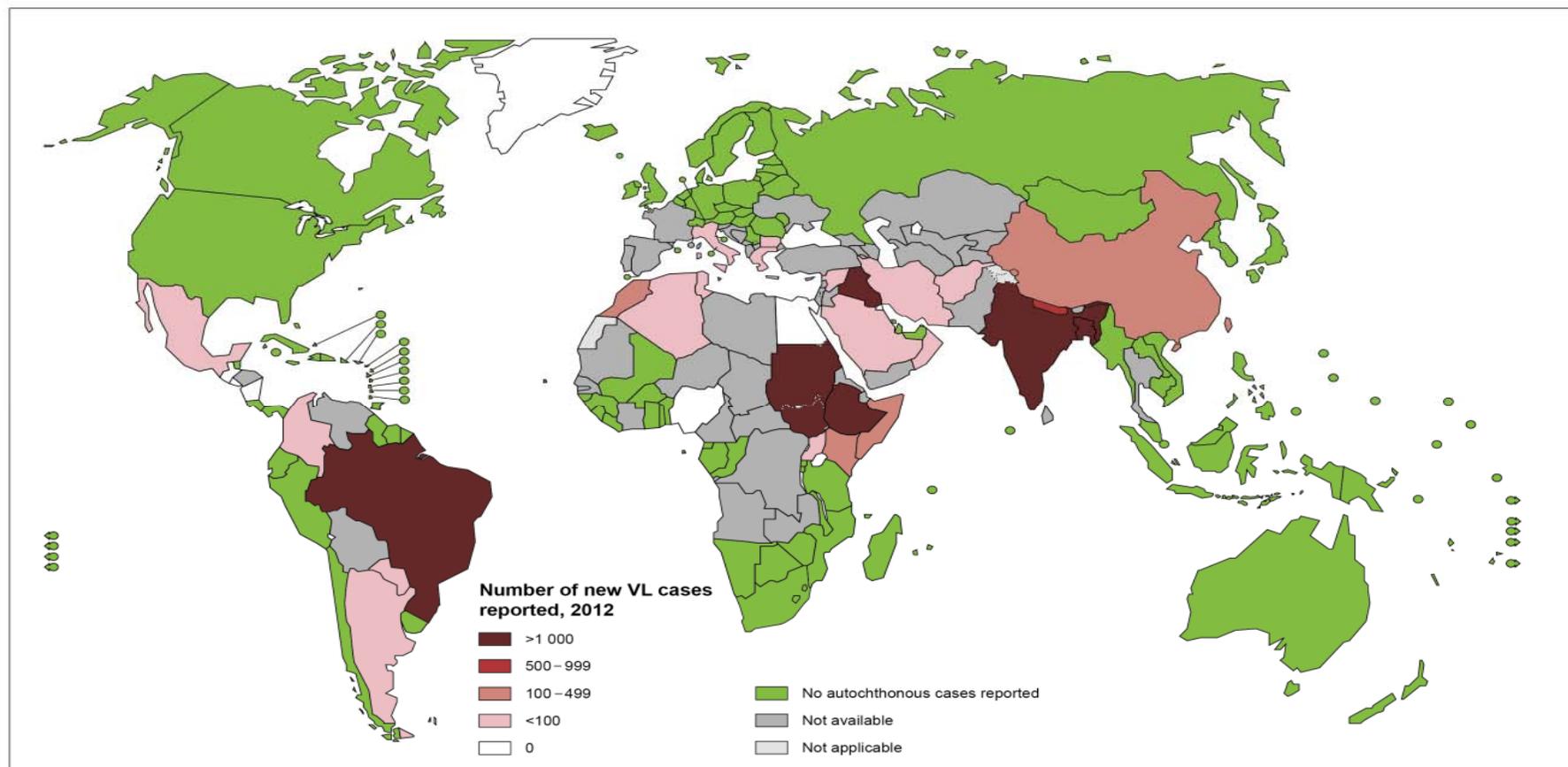
6.4.2. Leishmaniose cutanée et SIDA

Elle est moins fréquente que la co-infection LV/SIDA : fréquemment le cas de la PKDL [141]. Les manifestations cliniques sont des lésions graves extensives pouvant toucher les muqueuses et dont l'évolution est lente avec possibilités de récives [142].

7. Répartition géographique de la leishmaniose

7.1. Dans le monde

La leishmaniose se trouve dans environ 98 pays des zones tropicales et sub-tropicales répartis en 5 foyers : Méditerranéen, chinois, indien, africain (leishmaniose de l'Ancien Monde) et Centre- et Sud- américain (leishmaniose du Nouveau Monde) (Figures 9 et 10) [143].

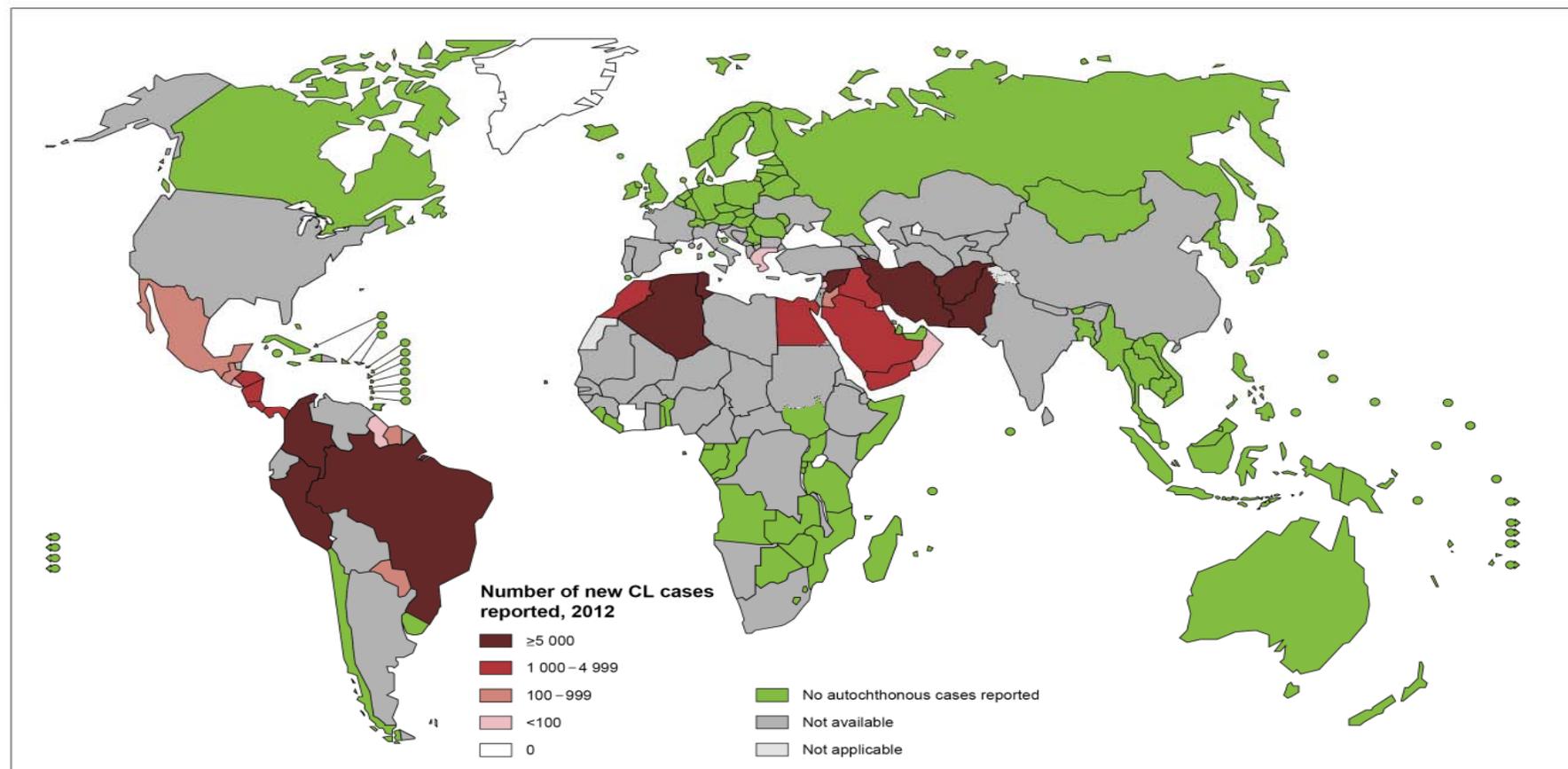


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

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



Figure 9. Distribution géographique des leishmanioses viscérales dans le monde [125].



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

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



Figure 10. Distribution géographique des leishmanioses cutanées dans le monde [125].

La population à risque est estimée à 350 millions d'individus avec une prévalence de la maladie de plus de 12 millions et l'incidence à 2 millions : 1,5 millions de LC dont 90% en : Algérie, Afghanistan, Arabie Saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie et 500.000 de LV dont 90% au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal, Soudan [19].

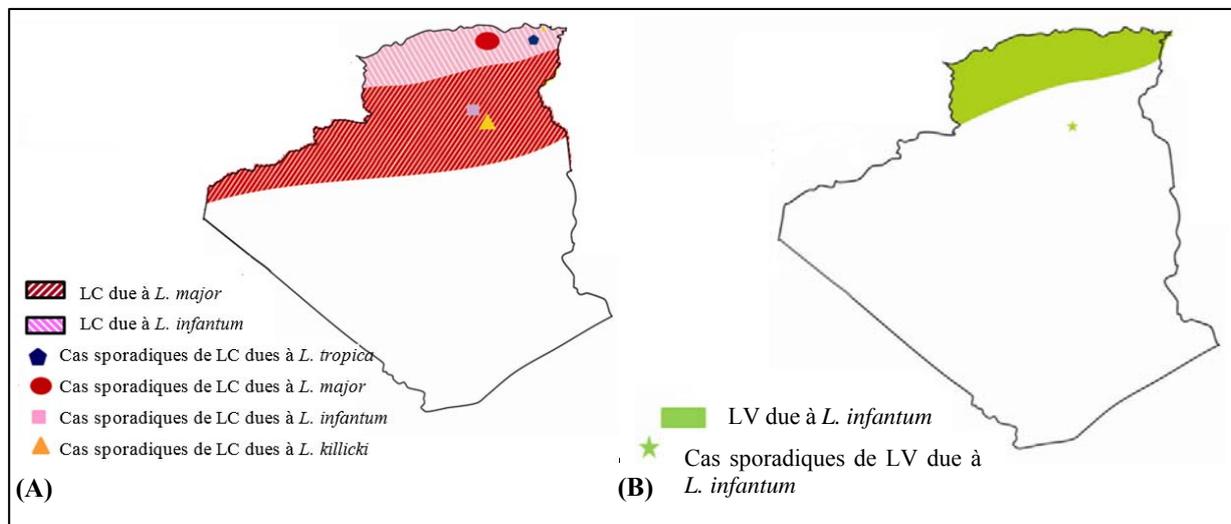
7.2. En Algérie

Deux types de leishmanioses sévissent à l'état endémique en Algérie : la LC et la LV.

La LC : est distribuée comme suit :

- La LCZ à *L. major* se trouve dans les zones arides et semi arides. Les foyers anciennement connus sont Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest [20].
- La leishmaniose cutanée du Nord (LCN) à *L. infantum* s'étend tout au long du littoral et du Tell algérien et sa répartition géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale [144], allant d'Oran, Tlemcen à Ouest jusqu'à Annaba, Sétif, Collo à l'Est [145].

La LV : s'étend sur tout le Nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humide et sub-humide (Figure 11). Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de la LCZ [144]. Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% de cas [146].



8. Traitement et prophylaxie

8.1. Traitement

Le manque de médicaments efficaces et accessibles et la résistance du parasite ou les insectes vecteurs aux molécules anti-parasitaires existantes est un véritable problème dans les

pays en voie de développement qui nécessite la recherche sur les cibles potentielles des molécules thérapeutiques.

Dans la majorité des cas (Tableau 2), les différentes formes de leishmanioses sont traitées à l'aide d'antimoine pentavalent [13].

Toutefois, il y a beaucoup d'autres molécules déjà connues et font l'objet d'essais thérapeutiques dans les leishmanioses dont : la pentamidine, l'allopurinol, l'Amphotéricine B, la paromomycine, les imidazolés, Miltéfosine [147], Aminosidine sulfate [148,149], Atovaquone [150], l'interféron gamma (Il a une certaine efficacité dans les LV [151] et LCM résistantes [152]).

Tableau 2. Indications principales des produits antileishmaniens classiques [55].

Médicament	Indication
Antimoniote de N-méthylglucamine (Glucantimet)	LV, LCM
Amphotéricine B (Fungizonet)	LV, LCM
Amphotéricine B liposomale (AmBisomet)	LV de l'immunocompétent LV de l'immunodéprimé
Pentamidine (Pentacarinatt)	LC

Toutefois, on peut noter que même en cas de traitement, la leishmaniose viscérale provoque encore un taux de mortalité pouvant atteindre 15% [153].

8.2. Prophylaxie

8.2.1. Lutte contre le vecteur

Un premier moyen de contrer la leishmaniose est évidemment de éliminer la présence du vecteur ou du moins, de réduire les possibilités de piqûres.

On utilise également des moustiquaires imprégnées d'insecticides autour des lits pour empêcher les piqûres durant la nuit [154].

8.2.2. Lutte contre le réservoir animal

Afin de contrôler les réservoirs, dans les régions de zoonoses, le problème des chiens infectés semble très important dont la nécessité de les éliminer. Aussi, quelques études ont démontré l'efficacité des colliers imprégnés d'insecticides pour la protection des chiens contre l'infection [155,156].

8.2.3. La vaccination

Le fait que la guérison de la leishmaniose cutanée induit une immunité à vie chez les individus touchés incite au développement d'un vaccin prophylactique. Malheureusement, et malgré plusieurs études à ce sujet, il n'existe toujours pas de vaccin contre la leishmaniose. Pour être efficaces, les vaccins potentiels doivent être spécifiques, induire une réponse

immunitaire à médiation cellulaire (type Th1) et provoquer une mémoire immunologique à long terme.

La salive du vecteur est utilisée comme vaccin contre une infection à *L. major* [157] et semble une avenue très intéressante pour la création d'un vaccin contre la LV [158].

CHAPITRE II. Génétique des *Leishmania*

Les études récentes sur les génomes des espèces de *Leishmania* ouvrent de nouvelles perspectives au développement de diagnostics, de vaccins et de traitements, qui constituent des priorités de recherche encore d'actualité pour la lutte contre les leishmanioses. Pour cela, diverses méthodes pour identifier les cibles potentielles (gènes candidats de virulence) de lutte contre les leishmanioses ont été utilisées comme les données de la littérature et la biologie du parasite (les gènes *CPB*, *LeIF*, *PSA2*, *Gp63*, *A2* et *PSA1...*).

1. Structure

Comme tous les kinétoplastidés, les *Leishmania* ont un génome nucléaire et un génome kinétoplastique, qui ont tous les deux des caractéristiques inhabituelles, en particulier dans les mécanismes de transcription. Certains mécanismes liés à l'expression de ces génomes sont originaux (transcription polycistronique, épissage en transsystématique et la révision de l'ARN transcrit « RNA editing ») ce qui justifie l'intérêt de leur étude [159].

La bonne connaissance de la structure du génome de *Leishmania* obtenue ces dernières années fait de ce parasite un modèle pour la génomique des protozoaires. La taille du génome haploïde a pu être précisément déterminée par l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé (car les chromosomes ne se condensent pas au cours du cycle cellulaire). Elle est de 36 millions de paires de bases, relativement constante selon les espèces. Le nombre de chromosomes est de 36 pour les espèces de l'Ancien Monde [160] et pour celles du Nouveau Monde : *L. braziliensis* et *L. mexicana* en contiennent 35 et 34, respectivement (fusion des chromosomes 8-29 et 20-36 pour le groupe *L. mexicana* et 20-34 pour le groupe *L. braziliensis* [161,162]) pour un total de 34 Mb [52,160]. Bien que ce nombre varie, l'organisation et l'ordre des gènes restent conservés entre les espèces qu'ils soit pathogènes ou non [162]. La taille de chaque chromosome varie de 0,28 à 2,80 Mb. La densité de gènes est de 1 gène pour 3,5 kb [161]. Le génome est riche en GC avec un taux de 64% et code pour environ 8300 gènes [163].

L'ADN des *Leishmania* est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques [164,165]. Il s'agit d'un génome de faible complexité, 30% du génome de *Leishmania* est composé d'éléments répétés dont la moitié à peu près sont des répétitions télomériques ou subtélomériques. Aucun centromère n'a été identifié chez *Leishmania* [166]. Si entre les 30 espèces de leishmanies, la disposition des gènes est très conservée (même si les distances inter-loci peuvent varier), il y a un fort degré de polymorphisme au niveau des séquences d'ADN [167].

C'est en 1994 à Rio de Janeiro que le projet de séquençage du génome de *Leishmania* a été lancé. Le « *Leishmania* Genome Network » est né de cette réunion avec pour tâche le séquençage, la cartographie et l'annotation des génomes *Leishmania*.

Leishmania major friedlin (LmjF) a été choisi comme souche représentative pour un séquençage complet du génome qui est à présent terminé [168] et dont les données sont disponibles sur le site http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major. Depuis lors, les génomes de *L. infantum* et de *L. braziliensis* ont été séquencés [169], ainsi certains gènes codants sont absents ou sont sous forme de pseudogènes dans une espèce par rapport à l'autre. Il faut noter aussi que les génomes de *L. donovani* et *L. mexicana* ont également été séquencés [162,170] (Tableau 3). De plus, le génome de *L. (S) tarentolae*, une espèce non-pathogène pour les humains, a également été séquencée récemment, ce qui permettra d'établir des comparaisons avec les autres espèces afin de mieux comprendre la pathogenèse [163,171].

Les études de génomique fonctionnelle s'emploient actuellement à identifier la fonction des nombreuses protéines (60 %) codées par des gènes « orphelins » [172].

Tableau 3. Clinique et composition du génome des espèces de *Leishmania* [173].

	Sous-genre	Espèces	Clinique	Chromosomes	Séquençage du génome	Gènes pseudo-gènes	et Gènes spécifiques aux espèces	Gènes partagés
Ancien Monde	<i>Leishmania</i>	<i>L. major</i> (<i>Lmaj</i>)	LC	36	Complété	8395	5	71 avec Linf 5 avec Lbra
		<i>L. tropica</i>	LC, difficile à traiter	36	ND	ND	ND	ND
		<i>L. infantum</i> (<i>Linf</i>)	LV, LC, asymptomatique	36	Complété	8195	27	71 avec Lmaj
		<i>L. donovani</i>	LV, PKDL, asymptomatique, résistance aux médicaments	ND	Complété	ND	ND	33 avec Lbra
Nouveau Monde	<i>Leishmania</i>	<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	34 (fusionné 8–29, 20–36)	Complété	ND	ND	ND
		<i>Viannia</i> <i>L. braziliensis</i> (<i>Lbra</i>)	LC (sévère), LCM	35 (fusionné 20–34)	Complété	8314	49	33 avec Linf 5 avec Lmaj
		<i>L. peruviana</i>	LC (bénigne)	35 (fusionné 20–34)	ND	ND	ND	ND

LC : Leishmaniose cutanée; LV : Leishmaniose viscérale; PKDL : Leishmaniose cutanée post kala-azar; LCD : Leishmaniose cutanée diffuse; LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse; ND : non déterminé.

1.1.Principales différences entre les espèces de *Leishmania*

Le génome de *Leishmania* est composé de plusieurs familles de gènes qui se diffèrent chez une ou plusieurs espèces. C'est le cas de la famille des protéines associées au microtubule qui possède près de 15 membres de plus sur le chromosome 9 chez *L. major*.

Chez *Leishmania*, la plus grande famille de protéines de surface est celle des amastines. Ils existent avec 55, 50 et 41 amastines chez *L. major*, *L. braziliensis* et *L. infantum* respectivement.

La protéine de surface GP63 qui est importante dans la liaison avec la cellule hôte et aussi dans la protection du parasite contre la lyse par le complément est encodée par un cluster de gènes en tandem qui semble être augmenté de quatre fois chez *L. braziliensis* comparé à *L. major* et *L. infantum* [169]. Les protéines de surface GP46 ou protéines de surface 2, qui possèdent des fonctions semblables à GP63, sont présentes aussi en un nombre différent chez les espèces. *L. braziliensis* possède une seule copie du gène, contrairement à *L. major* possédant 25 copies et *L. infantum* avec quelques-unes [174].

Les gènes les plus importants en étude sont ceux qui sont uniques à une espèce, ce qui pourraient expliquer les différentes pathologies de *Leishmania*. Jusqu'à présent un seul gène nommé : A2, présent chez *L. donovani*, a été identifié comme étant important dans la viscéralisation [175]. Il est un pseudogène chez *L. major* [176]. Parmi les quelques 200 gènes qui sont différents entre les trois espèces de *Leishmania*, seulement 34% ont pu être annotés, les autres codent pour des protéines hypothétiques (protéines dont la fonction reste inconnue). Parmi les gènes uniques que possède *L. infantum* on trouve : le gène codant pour une protéine phosphatidylinositol ou phosphatidylcholine transférase (PITP), le gène codant pour une phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et le gène codant pour une glutathionylspermidine synthase (GspS) (protection contre le stress oxydatif) [169,177].

1.2. Bases de données du génome *Leishmania*

La cartographie et le séquençage systématique du génome leishmanien est établi à travers différents bases de données dont les plus importantes sont :

1.2.1. Gene DB

GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) est une base de données du génome des organismes procaryotes et eucaryotes. Elle offre un portail à travers lequel les données générées par les centres de séquençage collaborateurs (comme l'unité de séquençage de pathogènes au « Wellcome Trust Sanger Institute ») peuvent être rendues accessibles au public. Il combine les

données du génome finis et en cours de séquençage ainsi que les « Expressed Séquence Tag » (EST) des projets avec l'annotation organisée [178].

1.2.2. TriTryp DB

TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) est une base de données offrant un accès aux ensembles de données du génome des kinétoplastidés, et supportant un ensemble de requêtes complexes. TriTrypDB est un projet collaboratif, utilisant l'infrastructure de calcul développé par la base de données «Eukaryotic Pathogen Bioinformatics Resource Center» (EuPathDB.org) pour intégrer les analyses et les annotations fonctionnelles des génomes disponibles dans la base de données « Gene DB ».

TriTrypDB intègre des ensembles de données de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tarentolae*, *Trypanosoma brucei* et *T. cruzi*. Les gènes peuvent être examiner individuellement ou par régions chromosomiques dans leur contexte génomique avec d'autres organismes *Kinetoplastidae* [179].

1.2.3. NCBI/BLAST

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) trouve des régions de similarité locale entre les séquences. Le programme compare des séquences de nucléotides ou de protéines aux bases de données de séquence et calcule la signification statistique des résultats. BLAST peut être utilisée pour déduire les relations fonctionnelles et évolutives entre les séquences. Il aide aussi à identifier les membres des familles de gènes.

2. Ploïdie (l'AND nucléaire)

C'est un organisme longtemps considéré comme diploïde [172,180] mais récemment des variations de ploïdie sont observées aussi bien par la technique du FISH [181,182] que par des analyses de séquençage à grande échelle [170], les souches sont aujourd'hui considérées comme aneuploïdes [44,183,184]. De plus elles utilisent fréquemment des mécanismes d'amplification de gènes aux laboratoire lors de la tentative de construction de knockouts ou après l'induction des médicaments, ce qui conduit à des aneuploïdies facultatives ou transitoires [184].

En effet, des doubles Knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique [185]. D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation) [185,186] ont été mis en évidence. Il faut noter que les translocations sont rares [52].

3. L'expression des gènes

Il y a une grande différence entre les membres de la famille des *Trypanosomatidae* et les autres eucaryotes au niveau de la régulation génique. Chez la grande majorité des organismes vivants, à l'exception des *Trypanosomatidae*, le point de contrôle le plus important constitue l'initiation de la transcription. Par contre, chez les *Trypanosomatidae* particulièrement, la régulation génique survient de manière post-transcriptionnelle (Figure 12) [161,168,187].

La régulation de l'expression des gènes se fait via deux mécanismes majeurs: l'épissage (ajout d'une coiffe mini exon de 39 nucléotides en 5') et la polyadénylation en 3' [188–190] (Figure 12). Par ce processus, les unités polycistroniques deviennent monocistroniques et chaque ARNm devient équipé du splice-leader en 5' et d'une queue polyA en 3'. D'autres facteurs tels que la stabilité des messagers et la régulation de la traduction viennent moduler l'expression génique.

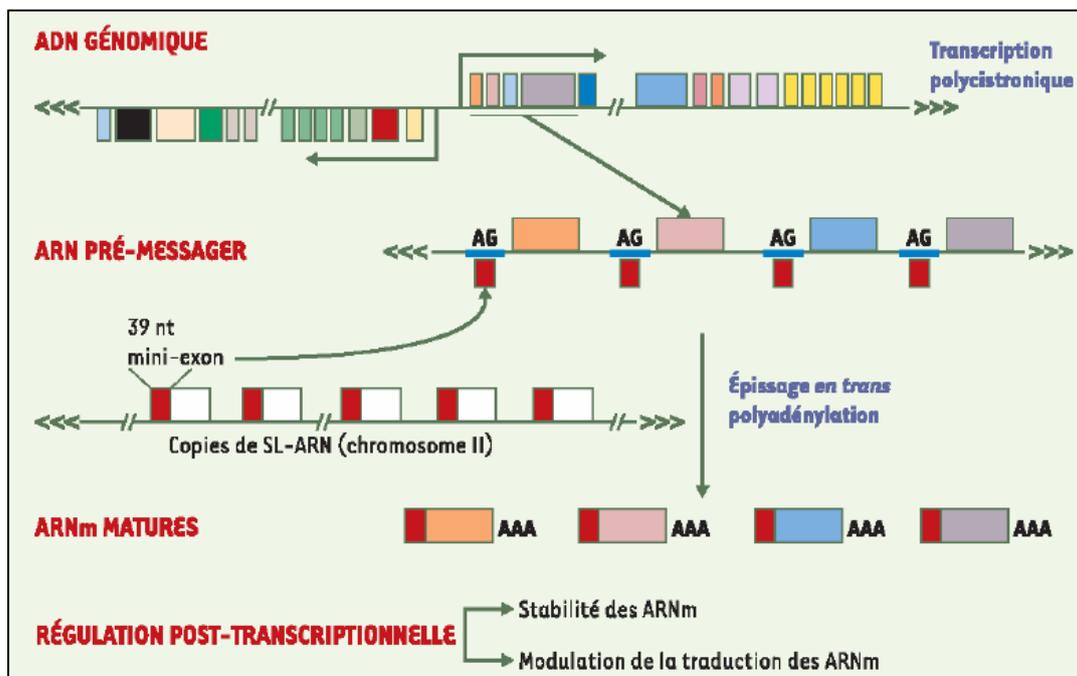


Figure 12. Organisation génique et maturation des ARN messagers [161].

3.1. La transcription

Chez *Leishmania*, la transcription est discontinue, elle résulte de la production de l'ARNm par *trans* splicing. La transcription se fait sur les gènes SL RNA (Short discrete Tandemly repeated genes) et par les régions codantes de protéines polycistroniques [191].

Selon les études menées sur les chromosomes 1 et 3 de *L. major* comme exemples, les gènes sont transcrits en de longues unités polycistroniques par une ARN polymérase II à partir de la

région de changement de brins entre deux unités polycistroniques opposées ce qui constitue une région promotrice qui ne contient pas les éléments caractéristiques des promoteurs habituels [192–195]. De plus, on note l'absence d'introns dans les gènes codant pour des protéines chez les *Trypanosomatidae*, sauf dans le cas de la poly(A) polymérase des trypanosomes [196]. Les longs ARN messagers (ARNm) polycistroniques produits subissent la maturation par épissage en *trans* en 5' avec l'ajout d'un mini-exon de 39 nucléotides [197] couplé à un clivage et à une polyadénylation en 3' (Figure 12) [161,198].

3.1.1. Épissage en *trans*

Il consiste en l'ajout du mini-exon (ou spliced leader (SL)) à l'extrémité 5' des gènes. Cette séquence du mini-exon est une séquence commune à toutes les espèces de *Leishmania*. La séquence SL est donnée par le SL-RNA [199]. L'épissage en *trans* sert à la maturation des transcrits et apporte aux ARNm la coiffe (the cap) qui est unique comparée aux autres eucaryotes [200]. L'ajout de la coiffe est post-transcriptionnel [201] et est essentiel pour l'épissage en *trans*, l'exportation des ARNm, la stabilité et la traduction [202]. L'épissage s'effectue en 5' du transcrit, à environ 50-100 nucléotides en moyenne en amont du site d'initiation de la traduction [203,204].

3.1.2. La polyadénylation

La polyadénylation consiste à l'ajout d'une queue poly(A) en 3' du transcrit nécessaire pour la maturation des transcrits. Il faut noter qu'il n'y a pas de séquence consensus du type AAUAAA en 3' des transcrits des *Trypanosomatidae* comme c'est le cas chez les autres eucaryotes [205]. La polyadénylation d'un gène et l'épissage en 5' du gène suivant sont deux mécanismes couplés, le site de polyadénylation est déterminé par la reconnaissance du site d'épissage suivant [198,206] (Figure 12).

La polyadénylation d'un gène s'effectue en moyenne à environ 500 nucléotides en amont du site d'épissage du gène suivant [198,207]. L'ARNm obtenu est composé du mini-exon en 5', suivi d'une région non traduite (5'UTR), de la région codante, d'une région non traduite en 3' et de la queue de poly(A). Chez les eucaryotes supérieurs, la polyadénylation augmente la stabilité de l'ARNm et la traduction [208–210] ce qui est démontré aussi chez les transcrits du SL RNA polyadénylés des amastigotes de *Leishmania* [211]. En fait, la coiffe et la queue poly(A) protègent l'ARNm contre la dégradation par les exonucléases ce qui lui rends stable [212].

3.1.3. Dégradation des ARNs messagers

Il existe deux voies de dégradation de l'ARNm utilisées chez la famille des *Trypanosomatidae* : la déadénylation suivi de la dégradation de l'ARNm à partir de l'extrémité 3' [213,214]. La transcription polycistronique et l'absence de promoteur pour l'ARN polymérase II suggèrent que la régulation génique survient de manière post-transcriptionnelle. Au niveau de l'ARNm, la régulation se fait surtout au niveau de la stabilité, ce qui implique plus particulièrement certains éléments situés dans la partie 3' non-traduite de l'ARNm [190,214].

3.2. La traduction

Les mécanismes impliqués dans l'initiation et la régulation de la traduction chez les *Trypanosomatidae* sont peu connus. Toutefois, des homologues des protéines de la famille *eIF4* (impliqués dans l'initiation de la traduction chez les eucaryotes [215,216]) ont été retrouvés dans le génome de *Leishmania*, mais leurs rôles exacts n'ont pas encore été élucidés [217,218]. Il a été trouvé que l'initiation de la traduction est régulée par des séquences situées à proximité du codon d'initiation AUG [219].

3.3. Modifications post-traductionnelles

Après leur traduction, les protéines subissent plusieurs modifications [220], les plus connues chez *Leishmania* sont :

3.3.1. La phosphorylation

La phosphorylation des protéines est la modification post-traductionnelle la plus importante. Elle implique l'action de kinases qui phosphorylent les chaînes latérales des résidus serine, threonine et tyrosine et de phosphatases qui déphosphorylent ces mêmes résidus. Le génome de *Leishmania* contient un nombre relativement élevé de ces kinases et de phosphatases [163]. Chez *Leishmania*, plusieurs kinases et phosphatases sont connues, qui sont impliqués dans différents phénomènes comme la régulation du cycle cellulaire (la croissance cellulaire) et de la différenciation [221–225] et le contrôle de la croissance du flagelle [226–228].

3.3.2. La méthylation

Les fonctions potentielles de la méthylation des protéines de *Leishmania* sont mal connues. Cependant, une étude suggère que la méthylation puisse jouer un rôle dans la stabilité des protéines chez ce parasite et ainsi permettre d'augmenter la synthèse de ces protéines [220].

3.3.3. L'acétylation

L'acétylation du N-terminal des protéines peut les protéger de la dégradation prématurée [229]. Chez *Leishmania*, les rôles possibles de l'acétylation des protéines sont peu connus

[220]. Cependant, une étude suggère qu'une régulation globale de l'initiation de la transcription polycyclique peut être dépendante du niveau d'acétylation des histones H3 [230].

3.3.4. La glycosylation

La glycosylation ou l'ajout des polysaccharides à certaines protéines est très importante, car elle permet aux protéines d'acquérir des fonctions primordiales comme dans les interactions entre le parasite et son environnement, dans la sécrétion de certaines protéines [231] et dans la maturation et la stabilité de certaines protéines retrouvées dans les différentes organelles [220].

3.3.5. L'acylation

L'acylation des protéines facilite l'attachement à la membrane plasmique ainsi que les interactions protéine-protéine [232,233].

3.4. Analyse du protéome

L'analyse protéomique permet une description dynamique de la régulation de l'expression des gènes, grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications posttraductionnelles [234]. Il existe diverses méthodes connues permettant d'analyser le protéome d'un organisme :

3.4.1. Méthodes classiques basées sur les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide consiste à la séparation des protéines selon leur poids moléculaire respectif [235]. Cette technique a été beaucoup utilisée pour l'étude du protéome des *Leishmania* [236,237].

3.4.2. Analyse à grande échelle basées sur la spectrométrie de masse (MS)

Les techniques basées sur la spectrométrie de masse présente plus d'avantages par rapport à la méthode classique au gel de polyacrylamide. Ils permettent d'obtenir plus d'informations sur le protéome total de *Leishmania* [238].

La spectrométrie de masse est couplée à l'électrophorèse bidimensionnelle ou bien à la séparation chromatographique des protéines [239,240]. Pour cela, il existe différents spectromètres de masse disponibles : MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) [241–245]; SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) [246,247] et MS/MS (Tandem Mass Spectrometry) [248–250].

4. Le kinétoplaste (Génome mitochondrial)

Outre l'ADN nucléaire, les *Trypanosomatidae* se caractérisent par leur ADN kinétoplastique (ADN mitochondrial). Il se compose d'un réseau de deux classes de molécules d'ADN circulaire interconnectées : plusieurs milliers de minicercles (5 000 à 10 000 copies par organelle avec une taille de 0.65-2.5 kb) et 25-50 maxicercles (20-40 kb). La surface

membranaire contient des revêtements de rangés de microtubules rapprochés comme la structure d'un parapluie sur ses entretoises [45,251–253].

Les minicercles sont impliqués dans les phénomènes « d'editing » (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN [254,255] et les maxicercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques. Le mécanisme « d'editing » commun à tous les kinétoplastidés permet d'exprimer les transcrits des maxicercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités (Figure 13). La formule « insertion » d'uridine semble être majoritaire, à tel point, que la taille du transcrit final peut quasiment avoir doublée [183,251].

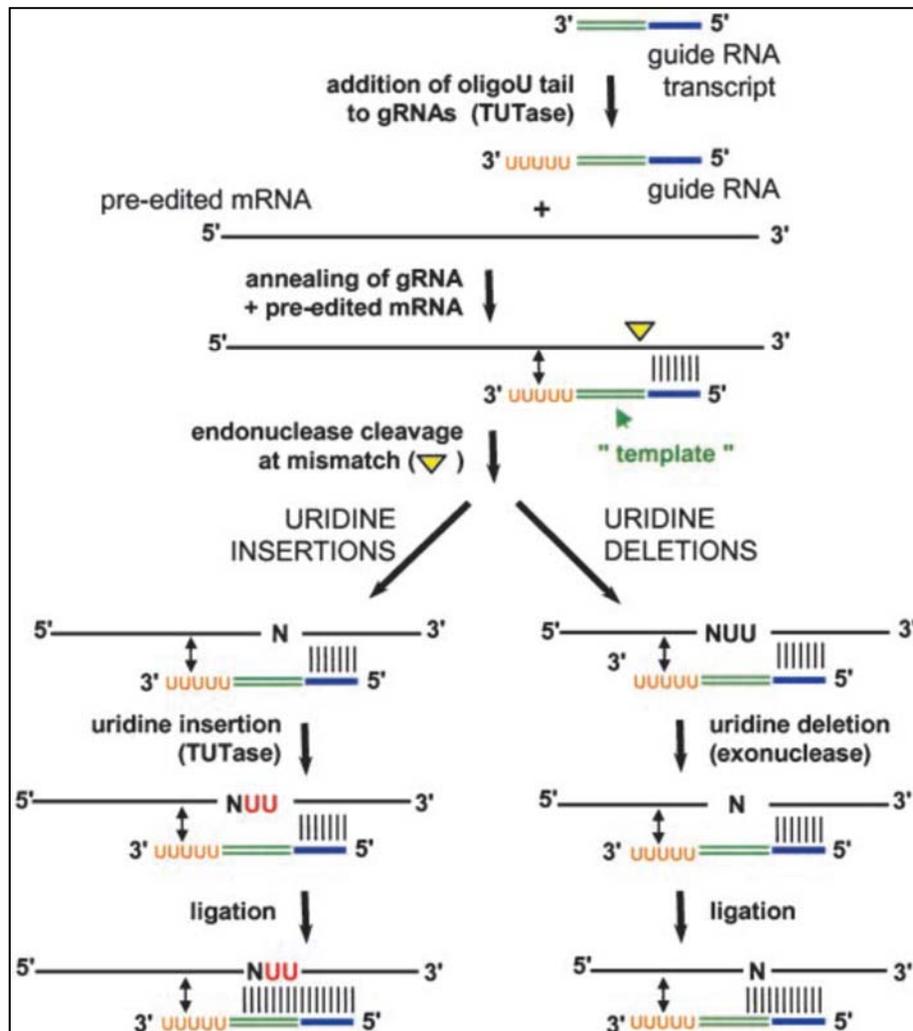


Figure 13. Mécanisme d'U insertion et délétion Editing chez les mitochondries des *Trypanosomatidae* [255].

Les Us ajoutés sont représentés en rouge, la région d'ancrage des ARN guides en bleu et la région de guidage en vert, la queue oligo (U) en orange.

Les ARN guides (en bleu et vert) viennent s'ajouter aux ARNm préédités puis le couple subit une insertion (voie de gauche) ou une délétion (voie de droite) d'uridines [255].

5. Les gènes exprimés différemment selon le stade de vie du parasite

Afin d'identifier les gènes différemment exprimés entre les deux stades de *Leishmania* (promastigote et amastigote) il existe des méthodes de criblage différentiel de banques d'ADNc [177,256–258] ou de filtres de haute densité [211,259,260]. Le problème principal avec ces techniques vient du fait que seul les ARNms abondants vont être détectés.

5.1. Les gènes spécifiques au stade promastigote

Les gènes préférentiellement exprimés au stade promastigote sont essentiellement :

- Ceux qui codent pour des protéines de surface telles que LPG [261] et GP63 [262,263]. Ces molécules protègent les promastigotes des enzymes hydrolytiques intestinales de l'insecte, facilitent l'attachement à son épithélium intestinal et protègent les promastigotes contre la lyse du complément.
- Les gènes qui ont un rôle dans la morphologie du parasite, le cytosquelette et la motilité.
- Plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du glucose [264] ou des enzymes impliquées dans la glycolyse [265–267] démontrent bien le rôle du glucose comme une source importante d'énergie au stade promastigote.
- Les gènes *HASP* et *SHERP* soupçonnés de donner aux promastigotes une protection contre la lyse par le complément [268]. Les cystéines protéases semblent également avoir un rôle au niveau de la virulence [269].

5.2. Les gènes spécifiques au stade amastigote

Les gènes exprimés différemment au stade amastigote jouent un rôle important dans la survie intracellulaire du parasite. Les plus essentiels sont :

Le gène *A2* qui code pour une protéine présente uniquement au stade intracellulaire qui semble être impliqué dans le processus de viscéralisation [176].

- Le gène amastigote *LcPxn1* impliqué dans la détoxification des radicaux d'hydrogène [270]. C'est un gène impliqué dans la réponse au stress oxydatif.
- Plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés sont plus abondants au stade amastigote. De même que plusieurs gènes impliqués dans le transport des acides aminés, ainsi que quelques transporteurs ABC (ATP-binding cassette transporters) et qui pourrait être impliqués dans le transport de plusieurs autres composés qui sont présents dans le phagolysosome des macrophages. Plusieurs autres transcrits codant pour des protéines de surface ont été décrits comme étant plus abondants au stade amastigote mais leurs rôles sont encore inconnus [177].

6. Mode de reproduction

Le mode de reproduction des *Leishmania* est jusqu'à maintenant en débat. Deux hypothèses majeures coexistent : clonale versus sexuelle [271]. *Leishmania* se reproduit de façon majoritairement clonale comme les autres *Trypanosomatidae* [185,272,273]. Malgré ce mode de reproduction, ces organismes présentent la capacité de faire de la recombinaison sexuée et cela a été démontré grâce à des hybrides mises en évidence dans les populations naturelles [274,275]. Les mécanismes moléculaires mis en jeu restent indéterminés [276] et ces événements n'ont pas pu être reproduits *in vitro* [277]. La fréquence des événements de recombinaison sexuée étant estimée inférieure à 4×10^{-4} [278]. Ils ont donc un impact faible sur la structure génétique globale.

7. La diversité génique

Les espèces de *Leishmania* présentent une homologie génétique qui varie de 69% à 90%. À cause de cette homologie, les antigènes hétérologues ont été utilisés dans l'immunodiagnostic et le développement du vaccin contre les infections à *Leishmania* [279]. Les espèces de *Leishmania* sont mise en évidence par différentes méthodes, comme :

- L'analyse isoenzymatique.
- Le caryotypage par l'électrophorèse en champ pulsé des chromosomes qui sont des indicateurs de variations génétiques : la variation de la longueur du chromosome à cause du nombre des séquences répétées en tandem (ADNr au chromosome 27)[52,280], mini-exon (chromosome 2) [281], gp63 (chromosome 10) [282]. Mais cette technique n'est pas efficace puisque les chromosomes subissent un grand nombre de mutations.
- La PCR-RFLP qui met en évidence les réarrangements chromosomiques : amplification du gène, ensuite le clivage par les enzymes de restriction pour étudier le polymorphisme. Ces techniques vont permettre d'avoir des informations de la diversité parasitaire [71].

La comparaison entre les génomes de *Leishmania* a identifié la présence de 25 gènes spécifiques chez les espèces de *Leishmania infantum* qui sont absents ou sont des pseudogènes chez *Leishmania major* et *Leishmania braziliensis*. Donc la génomique comparative a un rôle important pour comprendre les pathologies de *Leishmania sp.* et le rôle joué par les gènes spécifiques de différentes espèces de *Leishmania* dans le tropisme tissulaire et la virulence [136].

Tableau 4. Comparaison entre les génomes de *L. major*, *L. infantum* et *L. braziliensis* [169].

	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>
Nombre de chromosomes	36	36	35
Contigs	36	562	1041
Taille (pb)	32816678	32134935	32005207
C+G (%)	59.7	59.3	57.76
Gènes codants	8298	8154	8153
Pseudogènes	97	41	161

Par exemple le gène A2 représente le prototype des gènes spécifiques de *L. donovani* parce que son expression est préréglée dans le stade amastigote: il a été montré par la suite qu'il est un pseudogène chez *L. major* et *L. tropica* et il est indispensable pour l'infection à la leishmaniose viscérale par *L. donovani* chez la souris [136].

8. Arrangement des gènes

Les gènes chez *Leishmania* sont arrangés soit en copies uniques soit en plusieurs copies en tandem, formant des familles multigéniques sur un même chromosome ou sur des chromosomes différents. En général, les gènes copies unique sont des gènes de ménage (HKG genes) codant pour des protéines impliquées dans les processus cellulaires du métabolisme du parasite. Par contre, les gènes multicopies, spécifique du génome de *Leishmania* codant surtout pour des protéines de surface intervenant dans la virulence du parasite ou bien intervenant dans la régulation des processus de transcription et traduction. On va citer deux exemples des séquences fortement répétées :

Les gènes 18S de l'ARNr : ou les gènes de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (SSU ARNr), c'est des séquences fortement répétées en multicopies dans le génome de *Leishmania* [283,284]. Environ 100 copies par cellule, consistant en des segments conservés entourées par des espaceurs variées ont été décrits. Ces gènes ont été utilisées pour l'identification du parasite *Leishmania* en genre et sous genre [285–288].

L'espaceur transcrit interne de l'ARNr (ITS) correspond à la séquence qui sépare le gène codant pour la petite sous unité (SSU) et la grande sous unité (LSU) de l'ARN ribosomal. Cette séquence est divisé en deux régions ITS1 et ITS2 qui sont séparés par le gène codant pour la 5.8S (Figure 14). Ces deux espaceurs ont été utilisés comme des marqueurs spécifiques pour la discrimination des espèces de *Leishmania* dans différents études : pour ITS1 voir [288–292] et pour ITS2 voir [291,293]. En effet, le polymorphisme de taille du produit d'amplification de la région TTS a permis d'identifier les différents espèces de *Leishmania*. De plus le séquençage

de cette région a révélé que la composition des nucléotides de cet espaceur varie selon l'espèce [2].

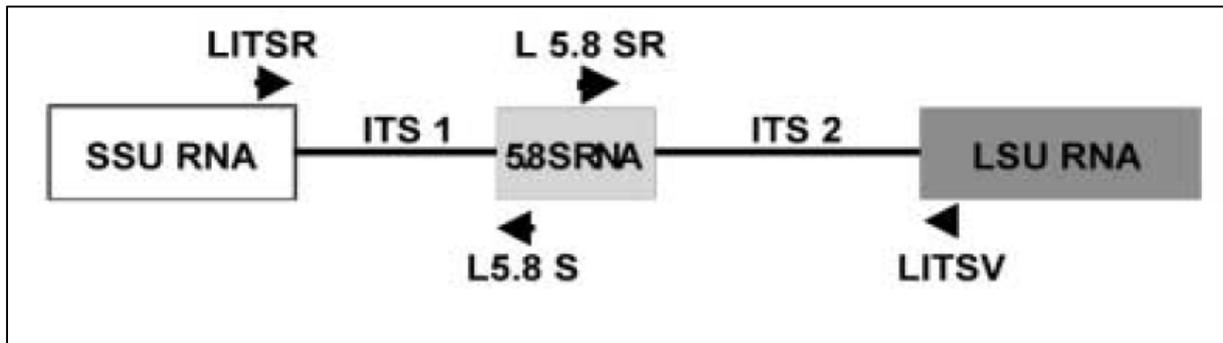


Figure 14. L'espaceur transcrit interne (ITS) de l'opéron ribosomal et la position de toutes les amorces utilisées pour l'amplification de la séquence ITS [272].

L'espaceur transcrit interne (ITS) se trouve entre le gène codant pour la petite sous unité (SSU RNA) et le gène codant pour la grande sous unité (LSU RNA) de l'ARN ribosomal. Cette séquence est ciblée par les deux amorces LITSR et LITSV indiqués par les flèches. La séquence située entre le gène de la petite sous unité (SSU RNA) de l'ARN ribosomal et le gène 5.8S de l'ARN ribosomal (5.8S RNA) est (ITS1) ciblée par les deux amorces LITSR et L5.8S. Alors que la séquence entre le gène de 5.8S de l'ARN ribosomal et le gène de la grande sous unité (LSU RNA) est (ITS2) ciblée par les amorces L5.8SR et LITSV.

Les gènes mini-exon : ce sont des gènes répétés en tandem d'environ 200 copies, présent dans le génome nucléaire sur le chromosome 2. Chaque répétition contient une région fortement conservée transcrite, comprenant un exon de 39 nucléotides, une séquence modérément conservée de 53 à 58 pb et une région variable non transcrite, inter-génique qui fait 51 à 341 pb et qui diffère selon le genre et l'espèce tant dans la séquence que dans la taille (Figure 15) [294,295].

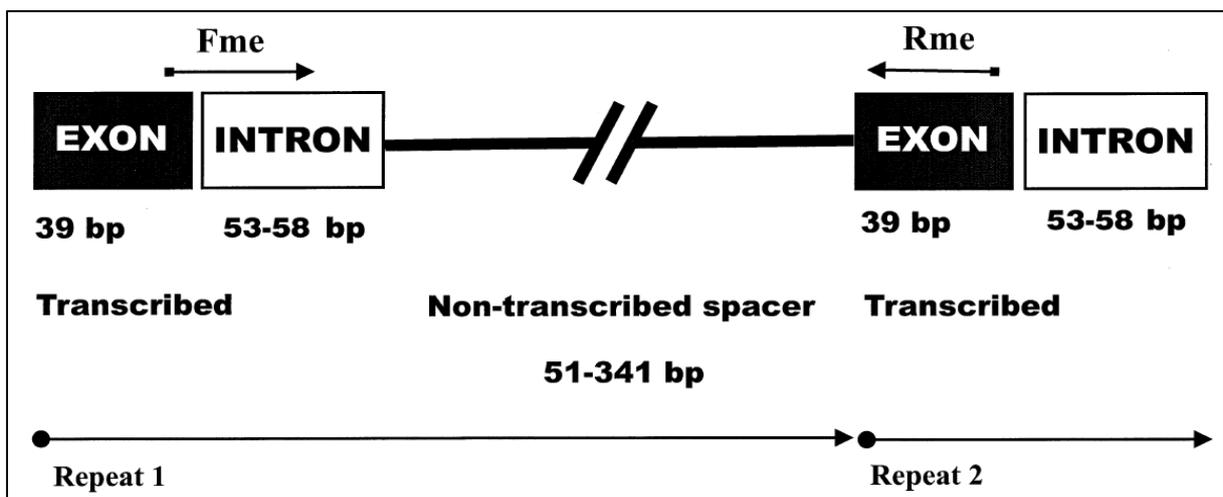


Figure 15. Les gènes mini-exon de *Leishmania* [295].

Chaque répétition contient un exon hautement conservé (39 pb), une région transcrite modérément variable (55 à 101 pb) et une séquence inter-génique très variable non transcrite (51 à 341 pb).

CHAPITRE III. Diagnostic biologique des leishmanioses

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, de son ADN ou sur la recherche des traces immunologiques de l'infection : anticorps circulants ou hypersensibilité retardée [296].

Le diagnostic de la leishmaniose quel que soit la forme clinique doit être fait avant tout traitement antileishmaniens afin d'éviter des faux résultats.

1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques se diffèrent selon la nature de leishmaniose suspectée :

1.1. Leishmaniose cutanée

L'aspect clinique des lésions constitue l'élément d'orientation pour suspecter une LC [14].

1.2. Leishmaniose viscérale

Il y a plusieurs éléments qui permettent de suspecter une LV :

- Numération-formule sanguine, plaquettes (FNS)
- vitesse de sédimentation (VS), C-reactive protéine (CRP)
- profil protéique et immunoélectrophorèse des protéines [14].

1.2.1. Pancytopenie

L'anémie normochrome arégénérative apparaît d'abord. La leucopénie intéresse surtout les granulocytes. La thrombopénie est plus tardive.

1.2.2. Hypergammaglobulinémie

Elle est polyclonale et s'accompagne d'hypoalbuminémie. Le déséquilibre protéique est à l'origine de la positivité de l'historique réaction de formol-gélification.

1.2.3. Syndrome inflammatoire

La VS est de plus de 100 mm à la 1^{ère} heure. Les marqueurs protéiques de l'inflammation sont augmentés [297].

2. Méthodes parasitologiques

Il est indispensable de les réaliser. En plus du diagnostic, ils donnent la possibilité de cultiver la souche en vue de son identification précise.

2.1. Les prélèvements

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite à partir du matériel récolté de façon variable suivant la forme de leishmaniose en cause.

Dans la LV, c'est la ponction de moelle osseuse pratiquée au sternum ou à la crête iliaque chez le jeune enfant qui est le plus couramment utilisée. Le sang (total ou encore mieux : la couche leucocytaire : LCC) est de plus en plus privilégié pour la mise en culture chez l'immunodéprimé, en raison du caractère peu invasif du prélèvement. La recherche peut s'effectuer sur des prélèvements de foie, rate, ganglions lymphatiques, muqueuse digestive ou liquide bronchioloalvéolaire [58]. Toutefois, les ponctions de rate sont les plus efficaces mais elles peuvent être contre indiquées et dangereuses dans certains cas [13].

Dans la LC, le prélèvement se fait préférentiellement au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion. Il est pratiqué par grattage au vaccinostyle ou à la curette, ou par carottage à l'aide d'un tire-nerf (utilisé en chirurgie dentaire), ou encore sur du matériel de biopsie [58,298].

Dans la LCM, la lésion muqueuse est prélevée à la pince à biopsie [55].

2.2.Mise en évidence du parasite

2.2.1. Examen microscopique

Il permet la recherche des amastigotes intracellulaires (corps de Leishman-Donovan) dans les macrophages sur frottis. Les formes amastigotes sont, soit intracellulaires ou extracellulaires [58].

Dans les leishmanioses cutanées, les anticorps anti-leishmaniens des sérums peuvent être détectés avec une technique standard et sensible, cependant, en pratique le diagnostic est basé sur la microscopie par identification des amastigotes dans les différents échantillons [299].

Pour la leishmaniose viscérale, il est conseillé de faire la culture des échantillons pour augmenter le nombre de parasites présents car l'identification des amastigotes au microscope n'est pas toujours possible [130].

Réalisé par un opérateur expérimenté, la microscopie semble être le meilleur examen pour le diagnostic [300].

2.2.2. Culture

Elle permet la croissance des formes promastigotes à partir des ponctions ou des biopsies, dans des milieux d'isolement appropriés (NNN, Schneider, RPMI, ...) [14,23,301–303].

Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques : pénicilline streptomycine ou pénicilline-gentamycine et exceptionnellement d'antifongiques, la 5-fluorocytosine [22,304].

En cas de positivité, les formes promastigotes flagellées mobiles sont visibles. Les souches isolées pourront alors faire l'objet d'un typage iso-enzymatique [45].

2.2.3. Inoculation aux animaux

L'inoculation à l'animal n'est réalisée que par de rares laboratoires spécialisés qui disposent d'une animalerie [305]. Le hamster doré de Syrie et le cobaye sont les animaux les plus réceptifs (aussi les souris BalbC, *Meriones libycus* ou *M. shawi*...) [305,306]. L'inoculation se fera dans le coussinet plantaire pour les parasites de la peau, par voie intrapéritonéale pour les parasites viscéraux. Une période pré-patente de plusieurs semaines est souvent observée. Les animaux sont aussi utilisés comme intermédiaire entre un prélèvement impossible à stériliser et la mise en culture, lorsqu'il est important d'isoler la souche [307].

3. Méthodes sérologiques

Le dépistage par les tests parasitologiques est loin d'être concluant, il est même envahissant comme ils exigent des biopsies d'organes affectés, et donne des résultats avec une sensibilité basse. Donc, l'usage de techniques sérologiques pour détecter les anticorps anti-*Leishmania* constituent un outil important pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale en particulier [279].

Malgré leurs avantages, les méthodes indirectes de diagnostic des leishmanioses peuvent être limitées par de possibles réactions croisées avec d'autres maladies et la non-différentiation entre les formes cutanées et viscérales de *Leishmania* [279,308,309].

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées dans le diagnostic des leishmanioses (Tableau 6). Elles font appel à des antigènes de nature et de modalités de préparation variées. Les antigènes sont couramment préparés à partir des formes promastigotes de culture d'espèces viscérotropes de *Leishmania*. Les préparations contiennent soit des antigènes figurés, soit des extraits antigéniques [24,310].

La LV s'accompagne d'une réponse immunitaire humorale, avec apparition de titres élevés d'anticorps sériques, qui peuvent toutefois faire défaut chez l'immunodéprimé. Le diagnostic immunologique, technique diagnostique non invasive, présente toutefois un intérêt certain. Dans la LC et la LCM, la réponse immunitaire prépondérante est de type cellulaire et peut être explorée par un test d'hypersensibilité retardée (Tableau 6) [55].

Tableau 5. Techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de la leishmaniose.

	Méthode	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients	Références
Détection d'anticorps	IFI	87–100	77–100	Positive dans les premiers stades de l'infection et indétectable 6 à 9 mois après la guérison.	Nécessite un laboratoire sophistiqué. Aucune application sur le terrain.	[311–313]
	ELISA (utilisant le CSA comme antigène)	80–100	84–95	Peut être utilisé pour cribler une grande échelle des études épidémiologiques.	La sensibilité et la spécificité sont grandement influencées par l'antigène utilisé. Nécessite un personnel qualifié et des équipements sophistiqués.	[314,315]
	avec le FML	95–100	95			[316,317]
	rK39 comme antigène	75–98	79–89			[318,319]
	Western blot	90–98	98–100	Fournit des réponses d'anticorps détaillées aux divers antigènes de <i>Leishmania</i> .	Consommation de temps. Techniquement encombrante et coûteuse.	[320–324]
	DAT	85–100	91–100	Rapid test, applicable in the field.	Limitée à utiliser dans les régions d'endémie. Longue durée d'incubation est nécessaire. Indisponibilité de source commerciale de l'antigène positive.	[325–329]
	IC test avec rK39	90–100	93–100	Peu coûteux, rapide, simple, et peut être réalisée par une personne non-formée.		[330–334]
Détection d'antigènes	KAtex test dans les urines	79–100	60–100	Simple, facile à utiliser. Utile dans le diagnostic des patients immunodéprimés.	Difficile de distinguer les résultats faiblement positifs des résultats négatifs. L'urine doit être bouillie pour éviter des réactions faussement positives.	[335–340]

CSA : Antigène soluble complet; FML : le ligand de fucose-mannose; DAT : Direct Agglutination Test; IC test : immunochromatographic test; KAtex : latex agglutination test.

Le diagnostic sérologique: en générale consiste à détecter les anticorps anti-*Leishmania* produits par le patient [308].

3.1.Hémagglutination indirecte

Elle consiste à mettre en présence des dilutions croissantes de sérum et des globules rouges sensibilisés par un antigène leishmanien sur des plaques de microtitration. Si l'échantillon sérique contient des anticorps spécifiques, ceux-ci seront agglutinés par les érythrocytes sensibilisés. Au contraire, la négativité provoque la chute des hématies dans le fond des cupules formant un bouton. Le seuil de positivité est de 1/32 [341].

C'est une technique peu utilisée en raison de son défaut de sensibilité et de spécificité [342].

3.2.Immunofluorescence indirecte

Elle consiste à mettre en présence un antigène figuré avec des dilutions successives de sérum suspect. Si le sérum contient des anticorps spécifiques, ceux-ci se fixent sur les parasites puis retiennent le conjugué fluorescent (anti-immunoglobuline marquée à l'isothiocyanate de fluoresceine). Le parasite apparaît fluorescent à l'examen en lumière UV.

Cette technique donne d'excellents résultats si l'on respecte certaines règles : utilisation d'un matériel parasitaire convenable, élimination des fluorescences non spécifiques, détermination des titres significatifs [343].

3.3.ELISA

C'est une technique qui utilise des antigènes solubles anti *Leishmania* fixés par absorption sur l'alvéole des plaques de microtitration. Après l'ajout des anticorps (IgG, IgM ou IgA) pour conjuguer des antigènes de *Leishmania* avec ces anticorps ajoutés. Les anticorps qui viennent s'y fixer sont révélés par des Ig humaines liées par une enzyme (souvent la peroxydase : horse reddish peroxidase ou : HRP) qui, en agissant sur un substrat incolore entraîne l'apparition d'une coloration plus ou moins intense en fonction de la quantité d'enzymes présentes, donc du complexe anticorps-antiglobulines humaines fixés [96,343].

Les avantages de cette technique sont nombreux : grande sensibilité, automatisation, détection sélective (une technique qualitative: spécifiques à 100%) possible des immunoglobulines présents dans les échantillons des sérums (IgG, IgM, IgA), économie de réactifs et de sérums [96], peu ou pas de réactions croisées avec d'autres maladies [127,344], mais il n'existe toujours pas de trousse commerciale [13].

3.4.Agglutination directe (DAT)

Elle consiste à mettre en présence des dilutions successives de sérum avec des formes promastigotes de *Leishmania* trypsinées et colorées au bleu d'Evans ou au bleu de coomassie.

Une réaction positive s'observe par un tapis d'agglutination. Le titre seuil de cette technique se situe aux environs de 1/1600 ou 1/3200. Le seuil élevé fait perdre à la technique sa valeur. Elle se négativerait plus précocement en post thérapeutique [345].

Le test DAT, il est bien adapté aux situations de terrain et a un bon rapport qualité-prix [346]. Malgré cela, cette technique ne donne pas de bons résultats par rapport à la technique ELISA [96].

3.5. Test au Latex

Il consiste à mettre en présence le sérum avec des billes de latex sensibilisées par l'antigène leishmanien. Une réponse positive donne une agglutination visible à l'œil nu. Ce test est appliqué au cours des enquêtes éco-épidémiologiques. Il a une bonne sensibilité avec cependant un inconvénient: test qualitative seulement.

Il trouve son intérêt surtout dans le diagnostic de la leishmaniose canine à *L. infantum* avec des applications éco-épidémiologiques [347].

3.6. Electrosynérèse

C'est une technique d'immunoprécipitation, elle consiste à faire migrer conjointement l'antigène et l'anticorps sous une différence de potentielle. Au point de rencontre, il se forme un complexe Ag-Ac matérialisé par un arc de précipitation [55].

L'électrosynérèse est plus sensible en début de la maladie qu'à la fin. La concentration d'anticorps précipitant diminue avec le traitement spécifique, ce qui la rend aussi adaptée au suivi thérapeutique [348].

3.7. Western Blot (électrophorèse de SDS-PAGE et immunoblotting)

La réponse humorale au cours de la LV est détectée en routine par des techniques immunologiques (l'IFI, l'ELISA, ...) sensibles et spécifiques. Cependant, la recherche de cette maladie sur des terrains immunologiques particuliers (comme les personnes atteintes de SIDA) nécessitent la mise au point de moyens diagnostics encore plus sensibles tout en conservant une excellente spécificité [323].

L'identification d'antigènes très spécifiques de l'espèce *Leishmania* serait désirable pour le diagnostic rapide de l'infection. Ces antigènes très spécifiques de *Leishmania* ont été identifiés par la méthode de l'immunoblotting [279]. Les antigènes recherchés sont ceux correspondant aux poids moléculaires suivants : 14-16 KDa, 30-46 KDa et la 90 KDa qui se révèlent immunogènes et spécifiques, notamment ceux de 16 et 14 KDa dont leur présence seule suffit pour poser le diagnostic [322].

L'extrait protéique résolu par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) est transféré sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse transversale permettant d'avoir une réplique fidèle des protéines transférées. Les protéines ainsi transférées sont incubées avec les sérums et les couples Ag-Ac sont révélés par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à la phosphatase alcaline. La révélation du ligand immunoenzymatique se fait par l'addition du substrat spécifique de l'enzyme.

3.8.L'immuno-chromatographie avec un antigène recombinant (K39)

Une méthode sérologique très sensible et spécifique [327,330,332,334], mais elle représente quelques inconvénients : son incapacité de différencier entre le sujet cliniquement atteint et le porteur sain et elle donne de résultats positifs après traitement [349].

3.9.Test d'hypersensibilité retardée (Intradermo-réaction de Monténégro à la leishmanine)

Un test d'hypersensibilité retardée par intradermoréaction a été mis au point en 1926 par Montenegro au Brésil [350] et a été utilisé depuis largement dans les divers types de LC et LCM.

Les antigènes les plus courants sont constitués par des suspensions de promastigotes de cultures de diverses espèces de *Leishmania* tuées par la chaleur et phénolées (appelés : leishmanine). L'injection intradermique d'une suspension de parasites est suivie de l'apparition d'une zone indurée dont le diamètre est supérieur ou égal à 5 mm en cas de positivité.

La réaction d'hypersensibilité retardée possède un bon degré de spécificité, bien que des réactions croisées avec diverses maladies infectieuses (lèpre, tuberculose, ...) existent. Sa positivité persiste de nombreuses années après la guérison de la lésion cutanée.

Le facteur limitant l'utilisation de ce test est la disponibilité du produit qui n'est plus fabriqué [55].

En Algérie, l'exploitation de l'immunité cellulaire par l'IDR de la leishmanine ou test de Montenegro n'est plus utilisée [305].

4. Outils moléculaires utilisés dans le diagnostic et l'étude du polymorphisme de *Leishmania sp.*

5.1. Identification du parasite

Il existe différents outils qui permettent l'identification des *Leishmania* et qui sont comparés dans le Tableau 6 :

Tableau 6. Comparaison des outils moléculaires utilisés pour les études épidémiologiques de la leishmaniose méditerranéenne [351].

Cible	Isoenzymes	Empreinte	ADNk	cpB/gp63	ITS1	Gènes de ménage	Microsatellites
Méthode	MLEE	DNA-FP	PCR-RFLP	PCR-RFLP	Séquençage	MLST séquençage	MLMT fragment analysis
Résolution							
Espèces	✓	✓	-	✓	✓	✓	-
Clade	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓
Souche	-	(✓)	✓	(✓)	(✓)	-	✓
Type d'échantillon	Culture	Culture	échantillon clinique				
Reproductibilité	Bonne	Pauvre	Pauvre	Bonne	Bonne	Bonne	Bonne
Comparaison inter laboratoires	Possible avec la même méthodologie	Difficile	Difficile	✓	✓	✓	✓
Haut débit	-	-	-	-	✓	✓	✓

« ✓ » : oui; « - » : non; « (✓) » : signifie un pouvoir discriminatoire limité pour la différenciation des souches en fonction des espèces étudiées.

5.1.1. Différentiation au niveau du Genre

La différenciation au niveau du Genre est basée en général sur l'amplification de l'ADN kinétoplasmique (kDNA) qui se trouve avec environ 10000 copies par cellule, ou une petite séquence de l'ADN ribosomale (the variable sequences of the SSU rDNA genes) qui sont de 40 à 200 copies par cellule [284,288,289].

Les amorces du kDNA et SSU rDNA permettent l'identification des *Trypanosomatidae* comme: *Leishmania*, *Sauroleishmania* et *Trypanosoma*. Ces amorces sont utilisées dans la PCR en temps réel afin de déterminer la charge parasitaire dans les échantillons des patients [352,353].

5.1.2. Différentiation au niveau de l'espèce

La différenciation entre les espèces de *Leishmania* est essentielle au cours du diagnostic, pour le choix du traitement et pour des mesures de contrôle du parasite surtout dans les zones où plusieurs espèces de *Leishmania* coexistent.

Plusieurs PCRs qui ciblent différentes régions du génome de *Leishmania* ont été utilisés comme : « the ITS genes » [288], « the mini-exon genes » [295], « gp63 genes » [354–356], « hsp70 genes » [357–360] et « cpB gene » sequences [361–363].

5.1.2.1.RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

Cette technique a été mise au point en 1990 par William *et al.*, Welsh et Mc Clelland [364]. C'est une technique basée sur une PCR pour amplifier des fragments d'ADN en utilisant seulement une courte amorce choisie arbitrairement. Le fragment d'ADN est amplifié si les deux sites d'hybridation sont proches (distance inférieure à 3 kb) l'un de l'autre sur les brins opposés. Les produits d'amplification obtenus sont généralement analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique permet la discrimination entre les espèces de *Leishmania* et l'estimation des relations génétiques à l'échelle inter et intra-spécifique.

La RAPD peut être appliquée à n'importe quel organisme sans avoir besoin de connaissances prérequis sur son génome [353,364,365].

Le problème de la technique RAPD vient du fait qu'elle est particulièrement sensible à la concentration initiale d'ADN lors de l'amplification. Ainsi il peut facilement y avoir des variations d'intensité entre bandes même si elles sont présentes chez différentes souches [273].

5.1.2.2.PCR-RFLP

La PCR-RFLP est l'une des techniques de génotypage les plus connues et les plus utilisées. Elle est basée sur la comparaison de la longueur des fragments de restriction d'une région bien déterminée du génome préalablement amplifiée par PCR afin de déterminer le polymorphisme au niveau des sites de restriction des endonucléases au niveau de l'allèle. Cette approche permet la détection et l'identification des espèces de *Leishmania* en ayant recours à différents gènes cibles tels que : les gènes de l'ARN ribosomiaux, les gènes mini-exon et l'ADN kinétoplastique [366–368]. Son pouvoir discriminatif avec différentes cibles a été prouvé dans plusieurs études.

Les inconvénients de cette technique résident dans le fait que les bandes sont parfois très complexes à analyser et elle requiert une grande quantité d'ADN et son coût relativement élevé.

5.1.2.3.PCR quantitative

Elle permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière. La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant ses différentes phases [369].

5.1.2.4.AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Les AFLP sont des marqueurs moléculaires nucléaires qui mettent en évidence un polymorphisme de sites de restriction et un polymorphisme d'hybridation d'amorce arbitraire. Ils sont reproductibles et révèlent un grand nombre de locus qui sont répartis régulièrement sur

le génome et très polymorphes. Elle a été mise au point en 1995 [370]. Elle est comparable à la technique des RAPD et repose sur trois phases successives : une digestion-ligation, une amplification pré-sélective et une amplification sélective.

Tout comme la RAPD, l'AFLP ne requiert aucune connaissance préalable du génome étudié, synthèse d'amorces ou caractérisation de sondes. Elle permet ainsi une mise au point rapide, présente une bonne reproductibilité et génère une grande quantité de marqueurs [370,371].

Le recours à la technique AFLP pour caractériser et identifier les espèces de *Leishmania* est limité par rapport à d'autres techniques [372–374].

5.1.2.5.LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification)

La réaction LAMP est une méthode d'amplification d'acide nucléique simple et rapide, développée exclusivement par Eiken Chemical Co., Ltd et qui amplifie l'ADN avec une spécificité, une efficacité et une rapidité élevées dans des conditions isothermes. Elle se caractérise par l'emploi de quatre amorces spécifiquement conçues qui reconnaissent un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible. La réaction utilise une ADN polymérase dotée d'une activité de déplacement du brin, et se déroule à une température constante avoisinant les 65°C/1 heure. Les opérations d'amplification et de détection de la séquence cible peuvent ainsi être effectuées en une seule étape [375,376].

C'est une méthode de diagnostic rapide, précise et rentable pour les maladies infectieuses [377] notamment le diagnostic des *Leishmania sp.* [378–380].

5.2. Typage des souches

5.2.1. Analyse biochimique des isoenzymes (MLEE)

C'est une technique très utilisée dans plusieurs études du polymorphisme de *Leishmania sp.* [381,382] et son relation avec la clinique et l'épidémiologie des leishmanioses [383]. Elle est considérée comme la technique «gold standard» pour l'identification des parasites *Leishmania* aux niveaux spécifiques et subs spécifiques et pour les études sur la diversité génétique, a été largement utilisé depuis son introduction [285]. MLEE détecte les différents allèles des gènes de ménage indirectement, en marquant la mobilité électrophorétique des enzymes qu'ils codent. Les différences de nucléotides dans les gènes codant pour les enzymes se reflètent par leurs différences de mobilité. Ainsi, les parasites sont identifiés par leur profil enzymatique et sont regroupés en unités taxonomiques appelé zymodèmes, dont chacun se compose de toutes les souches présentant exactement les mêmes profils pour tous les systèmes enzymatiques de l'étude. Des combinaisons distinctes de mobilités des isoenzymes pour un

maximum de 15 enzymes ont été attribué des numéros de zymodème (Exemple : MON-1) [185,384].

La MLEE fait appel à deux techniques: l'électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques et l'isoélectrofocalisation (IEF) [51].

Les enzymes utilisés sont: malate déshydrogénase; enzyme malique; isocitrate déshydrogénase; 6-phosphogluconate déshydrogénase; glucose-6-phosphate déshydrogénase; glutamate déshydrogénase; NADH diaphorase; purine nucléoside phosphorylase; purine nucleoside phosphorylase; glutamate-oxaloacétate transaminase; glutamate-oxaloacétate transaminase; phosphoglucomutase; fumarate hydratase; mannose phosphate isomérase; glucose phosphate isomérase [51,385].

Cependant, cette technique présente beaucoup d'inconvénients; elle a besoin de culture en masse des parasites *Leishmania* parasites avec une grande quantité de protéines, elle est longue, laborieuse, coûteuse et techniquement exigeante [384,386].

5.2.2. Multilocus sequence typing (MLST)

Il s'agit d'examiner les séquences nucléotidiques de plusieurs locus codant des gènes de ménage (housekeeping genes) ou des fragments de gènes de ménage (judicieusement choisis au départ) [387,388].

Elle est basée sur la comparaison de séquences partielles de 700 pb habituellement d'un site définie des gènes de ménage. Comme la MLEE, les allèles sont comparés s'ils sont identiques ou non, dans ce cas-là, la détermination du nombre de polymorphisme de loci aura lieu.

MLST permet aussi de déterminer le co-dominant SNP (single nucleotide polymorphisms) et peut être utilisé pour l'étude des populations et l'analyse phylogénétique. En variante, les données peuvent être analysées comme des séquences [351,353,384].

MLST est susceptible de devenir la technique standard pour la taxonomie et l'identification des *Leishmania* grace au polymorphisme entre les souches de *Leishmania sp.* [384,389].

5.2.3. Multilocus microsatellite typing (MLMT)

Les microsatellites (SSR : Simple Sequence Repeats) sont des répétitions en tandem de motifs d'ADN composées de 1 à 6 pb (qui présentent des variations de longueur allélique) omniprésentes dans tous les génomes procaryotes et eucaryotes. Ils permettent le développement de marqueurs hautement polymorphes (variation basée sur le nombre de répétitions), multi-alléliques et codominants (distinction des homozygotes et hétérozygotes) [351,390,391].

La présence de motifs microsatellites est expliquée par l'effet mutationnel de la réplication de l'ADN qui entraîne un dérapage de l'ADN polymérase (slippage) et des crossing-over inégaux ayant pour conséquence une variation du nombre de répétition des motifs [392]. Ce type de marqueur est d'une grande utilité pour la cartographie génétique chez de nombreuses espèces.

Ils ont une grande importance à cause de la rapidité de mutations à leur niveau, par conséquent, 10 à 20 marqueurs indépendants doivent être analysés pour chaque souche leishmanienne [351].

Le génome leishmanien est relativement riche en séquences microsatellites. Ces Marqueurs ont été utilisés avec succès pour la caractérisation et la détection de la variation génétique pour quelques souches appartenant au Genre *Leishmania* : *L. donovani*/ *L. infantum* complexe [391,393–395], *L. major* [396,397], *L. tropica* [398] et pour les espèces du sous-genre *L. (Viannia)* [399,400].

5.3.Le séquençage

Il est basé sur l'analyse de la composition de la séquence nucléotidique. Le principe diffère selon la technique utilisée : Méthode de Sanger, de Maxam-Gilbert, Séquençage par hybridation (utilisation de puces à ADN), méthode Shotgun, Séquençage haut débit (NGS: *next-generation sequencing*) [401].

Le séquençage du génome entier des *Leishmania* donne un aperçu de la structure de la population ainsi que les mécanismes de résistance aux médicaments [170].

MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre est composé de la description du matériel utilisé, la région d'étude, des différentes techniques d'étude (méthodes de diagnostic parasitologique et immunologique, méthodes de diagnostic et d'identification des espèces de *Leishmania*) et enfin, l'analyse des données obtenus. La démarche générale suivie lors de ce travail est résumée dans la Figure 16 ci-dessous :

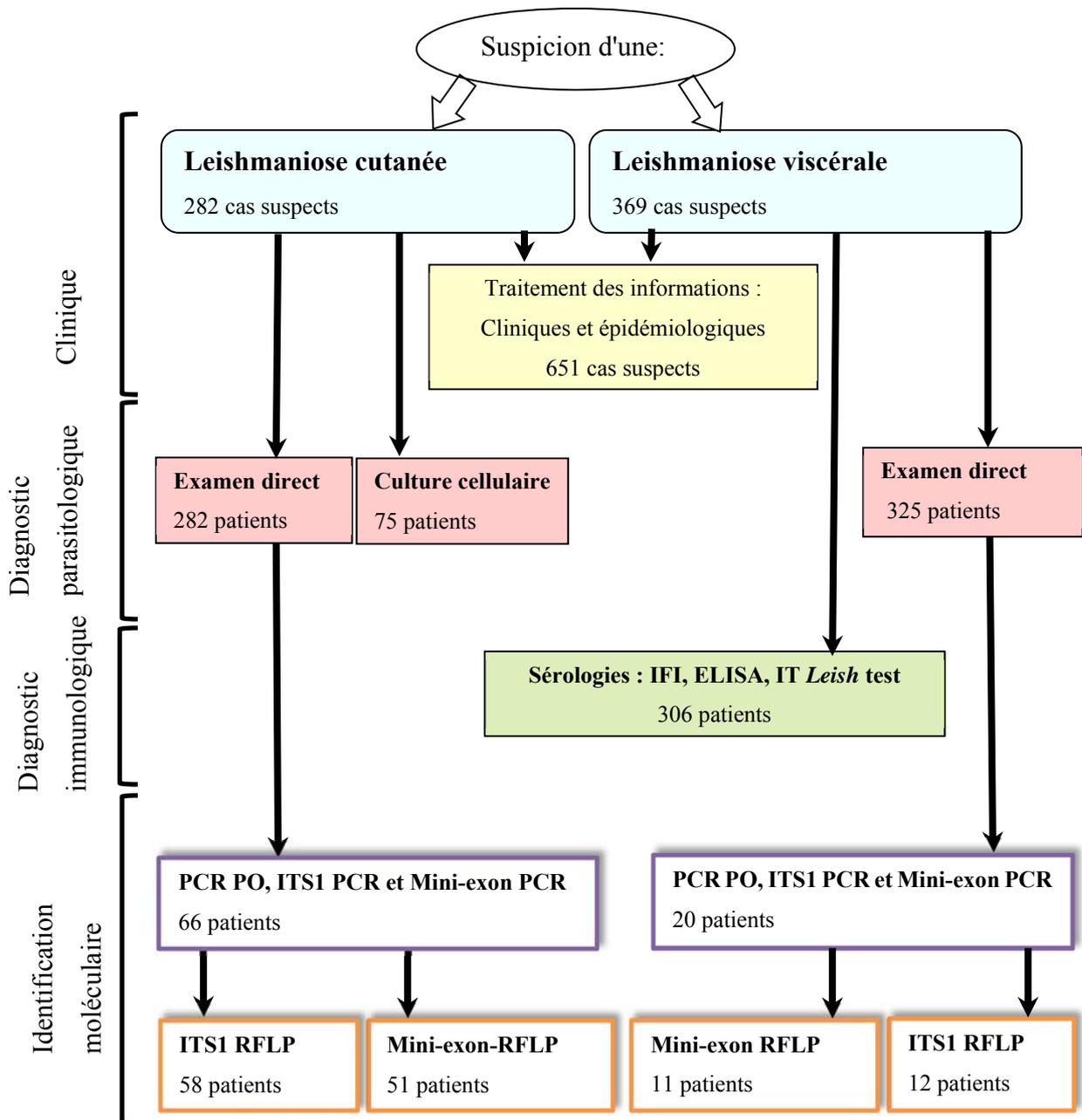


Figure 16. Protocole de l'étude.

I. Matériel biologique

1. Prélèvements

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur 3 ans (du 2 Janvier 2011 au 31 Décembre 2013). 651 cas suspects de leishmaniose ont été recensés pendant cette période : 282 cas suspects de leishmaniose cutanée et 369 cas suspects de leishmaniose viscérale (Figure 16). Les prélèvements des patients reçus au niveau du laboratoire de Parasitologie/Mycologie (CHU d'Annaba) sont de différentes natures:

- ✓ Prélèvements des sérosités cutanées des patients suspects d'avoir une LC
- ✓ Ponctions de moelle osseuse (PMO) des patients suspects d'avoir une LV
- ✓ Sang veineux périphérique sur tubes secs pour une sérologie leishmanienne.

2. La zone d'étude

La région incluse dans l'étude est très vaste. Elle inclut les prélèvements reçus de différents origines géographiques. On compte au total 14 wilayas représentées dans la Figure 17.

3. ADN de souches de référence

Les ADN parasitaires de références utilisés au cours de ce travail sont issus d'isolats appartenant aux espèces de l'ancien monde avec des origines géographiques différentes. Les 26 souches de *Leishmania* (Tableau 7) utilisées dans ce travail sont distribuées comme suit: 12 souches appartenant à l'espèce *L. infantum*, 7 souches de l'espèce *L. major*, 7 souches de l'espèce *L. tropica*. Les isolats, des espèces, des zymodèmes, des formes cliniques et des origines géographiques sont décrits dans le tableau 7.

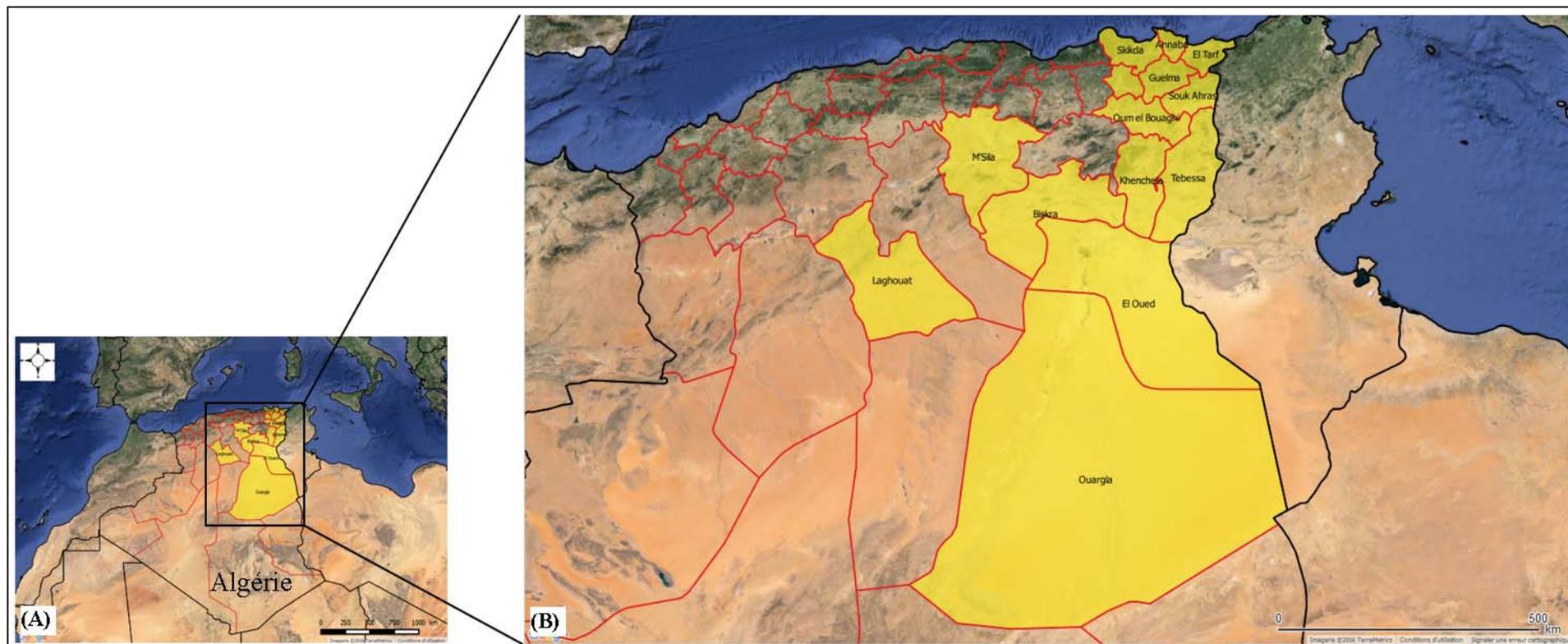


Figure 17. Région incluse dans l'étude.

(A) : Carte de l'Algérie; (B) : région de l'étude.

Tableau 7. Caractéristiques de souches utilisées dans ce travail.

Notation	Code international ¹	Espèce ²	Zymodème ³	Pathologie	Origine géographique
LV10	MHOM/TN/93/LV10	<i>L. infantum</i>	MON-80	LV	Tunisie
LV49	MHOM/TN/94/LV49	<i>L. infantum</i>	MON-24	LV	Tunisie
LV50	MHOM/TN/94/LV50	<i>L. infantum</i>	MON-1	LV	Tunisie
KA412	MHOM/TN/87/KA412	<i>L. infantum</i>	MON-1	LV	Tunisie
KA413	MHOM/TN/87/KA413	<i>L. infantum</i>	MON-1	LV	Tunisie
Drepl4	MHOM/TN/96/Drepl4	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	Tunisie
Drep05	MHOM/TN/96/Drep05	<i>L. infantum</i>	MON-1	LC	Tunisie
Drep5	MHOM/TN/96/Drep5	<i>L. infantum</i>	MON-1	LC	Tunisie
Drepl1	MHOM/TN/96/Drepl1	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	Tunisie
Drepl3	MHOM/TN/96/Drepl3	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	Tunisie
Drepl4	MHOM/TN/96/Drepl4	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	Tunisie
Drepl5	MHOM/TN/96/Drepl5	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	Tunisie
L3171*	MHOM/IL/80/Friedlin	<i>L. major</i>	MON-103	LC	Israël
IL24	MHOM/IL/83/IL24	<i>L. major</i>	MON-66	LC	Israël
IL32	MHOM/IL/83/IL32	<i>L. major</i>	MON-68	LC	Israël
Ronll4	MPSA/TN/87/Ronll4	<i>L. major</i>	MON-25	LC	Tunisie
FMH	MHOM/TN/90/FMH	<i>L. major</i>	-	LC	Tunisie
SDTBM	SAL/IN/73/STDBM	<i>L. major</i>	LON-6	LC	Tunisie
Bag9*	MHOM/IQ/76/Bog9	<i>L. tropica</i>	MON-53	LC	Iraq
Bag17	MHOM/IQ/76/BAG17	<i>L. tropica</i>	LON-24	LC	Iraq
LA28	MHOM/GR/00/LA28	<i>L. tropica</i>	LON-16	LC	Iraq
L75	MHOM/IQ/65/L75	<i>L. tropica</i>	MON-6	LC	Iraq
Gabai 159	MHOM/IL/00/Gabai159	<i>L. tropica</i>	LON-9	LC	Israël
Rachnan	MHOM/IL/78/Rachnana	<i>L. tropica</i>	MON-60	LC	Israël
AM	MHOM/TN/06/AJM	<i>L. tropica</i>	-	LC	Tunisie
LEM3171*	MHOM/IL/80/Friedlin	<i>L. major</i>	MON-103	LC	Israël

LC : Leishmaniose cutanée; LV : Leishmaniose viscérale

¹ L'hôte/le pays/l'année de l'isolement/le code du laboratoire

² Espèce définie par électrophorèse des isoenzymes

³ Zymodème

* souches de références OMS.

La culture *in vitro* des parasites et l'extraction de l'ADN a été réalisée selon différents protocoles.

4. Les amorces

Pour atteindre les objectifs de ce travail nous avons choisis plusieurs couples d'amorces : Ainsi, pour vérifier la qualité de l'ADN extrait, le couple d'amorces POF et POR (Tableau 8) ont été utilisé pour amplifier un gène des mammifères : « acidic ribosomal phosphoprotein fragment, PO gene » [402].

Egalement, pour étudier la région ITS1 (Internal Transcribed Sequences) au niveau des gènes de l'ARNr, le couple d'amorces LITSR et L5,8S (Tableau 8) ont été utilisés pour amplifier cette région [289,291,403].

Et enfin, pour cibler le gène mini-exon (Spliced Leader RNA) nous avons utilisés un couple d'amorces Fme/Rme (Tableau 8) décrit précédemment [404].

Tableau 8. Caractéristiques de chaque couple d'amorces utilisées.

Gène	Amorces	Séquences (5'→3')	Paire de bases (pb)	Tm (°C)	Tm PCR (°C)	Taille de l'amplicon (pb)*	Reference
PO	POF (F)	TCATTGTGGGACAGACA	17	50	53	470	[402]
	POR (R)	GGAGAAGGGGAGATGTT	18	56			
ITS1	LITSR (F)	CTGGATCATTTCGGATG	18	52	54	300-350	[289,291,403]
	L5,8S (R)	TGATACCACTTATCGCACTT	20	56			
Mini-exon	Fme (F)	TATTGGTATGCGAACTTCCG	21	60	62	400-450	[404]
	Rme (R)	ACAGAACTGATACTTATATAGCG	24	64			

(F) = forward amorce; (R) = reverse amorce; pb = paire de base; Tm= melting temperature; °C = degré Celsius

* La taille de l'amplicon diffère selon les différents espèces de *Leishmania*.

5. Les enzymes de restriction

Afin d'identifier les espèces étudiés, nous avons utilisé deux enzymes de restriction spécifiques aux produits amplifiés :

Les produits d'amplification de la séquence ITS1 ont été digérés par l'enzyme de restriction *HaeIII*, tandis que l'enzyme *EaeI* a été utilisé pour la digestion des produits d'amplification des gènes mini-exon (Tableau 9).

Tableau 9. Les enzymes de restriction et les conditions de réaction utilisées en RFLP.

Gène cible	Enzyme de restriction	Sources	Site de restriction	Conditions de restriction	References
ITS1	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'-GG_CC-3'	1 heure à 37°C	[291,403]
Mini-exon	<i>EaeI</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	5'-Py_GGCCPu-3'	1 heure à 37°C	[295,404]

Selon la taille de l'amplicon, les espèces de *Leishmania* de l'ancien monde peuvent être différenciées par RFLPs (Tableau 10).

Tableau 10. Taille de l'amplicon obtenu après digestion par les enzymes de restriction (RFLP).

Espèce	Pathologie	Taille de l'amplicon (pb)/ Références	
		ITS1 RFLP [405]	Mini exon RFLP [404]
<i>L. infantum</i>	LV et LC	190, 76 et 62	328 et 108
<i>L. major</i>	LC	200 et 120	125, 119, 92, 70 et 21
<i>L. tropica</i>	LC	190 et 64	227 et 178

II. Matériel de laboratoire

Le principal matériel de laboratoire utilisé lors de ce travail est représenté dans le tableau 11 ci-après.

III. Logiciels

1. QGIS 2.10.1-Pisa

Nous avons utilisé QGIS avec l'extension « Open Layers Plugin » suivant le chemin d'accès: Internet \Open Layers Plugin\Google maps\Google satellite.

QGIS est un outil GIS (Geographic Information System) dans la communauté du logiciel libre et open-source (the free and open-source software community : FOSS).

Il fonctionne sur Linux, Unix, Mac OSX, Windows et Android et supporte de nombreux vecteurs, raster et formats et fonctionnalités de base de données. Il est téléchargeable à partir de son site officiel : <https://www.qgis.org/en/site/forusers/download.html>.

2. Legend SVG

QGIS ne crée pas une légende appropriée pour les cartes avec des graphiques circulaires ou des cercles de taille variable. Pour cela, nous avons utilisé un programme pour produire des légendes dans le format SVG (Scalable Vector Format). Dans le QGIS Compositeur, le résultat peut être ajouté à la carte comme une image. Si nécessaire, la légende peut d'abord être modifiée avec un SVG-éditeur comme Inkscape.

Les cercles proportionnels de la légende ont été réalisés avec « Legend SVG 2011-2012: Create SVG-legend for pie charts».

Legend SVG est aussi téléchargeable à partir du site : <http://www.qgis.nl/2012/02/03/legenda-maken-met-legendsvg/?lang=en>.

Tableau 11. Les plus importants matériels de laboratoire utilisé lors de ce travail.

Pièces utilisées	Appareillage	Réactifs/ Produits chimiques	Milieux de culture/ Autres
-Salle de prélèvements	-Agitateur magnétique, agitateur vortex	-Agarose en poudre	-Antibiotiques (pénicilline, streptomycine)
-Pièce de parasitologie	-Thermocycler	-Anti-immunoglobuline marquée	-Bacto agar « A »
-Pièce de culture cellulaire des <i>Leishmania</i>	-Autoclave	à la Fluorescéine	-Filtres Millipore 0.22µ
-Pièce de Biologie Moléculaire	-Balance de précision	-Bleu de bromophénol	-RPMI 1640
-Pièce Post PCR	-Bain marie	-Bleu d'Evans	-Sang et sérum de lapin
-Chambre froide	-Becc Bunsen	-Chloroforme	-Sérum de vœu fœtal (SVF)
	-Centrifugeuse de paillasse	-Citrate de Sodium	-Tubes (à fond conique avec bouchons stériles, eppendorf stériles à 1.5µl et 2 µl, eppendorf pour PCR, de cryoconservation, Tubes secs
	-Cryoconservateur	-Bromure d'éthidium (BET)	-Vaccinostyles
	-Cuves d'électrophorèse horizontale	-Diméthylsulfozazide (DMSO)	
	-Etuve d'incubation à 37°C et à 24°C	-Eau oxygénée	
	-Fluorimètre QUBIT	-EDTA	
	-Générateurs de tension pour électrophorèse	-Ethanol	
	-Hottes à flux laminaire, hotte chimique et hotte à flux	-Giemsa	
	-Lecteur de microplaque ELISA avec filtre de mesure à 450 nm et filtre de référence à 620 nm.	-Méthanol	
	-Micropipettes de 5µl, 20µl, 50µl, 100µl, 1000µl réglables.	-MgCl ₂	
	-Microscopes (à fluorescence, optique et inversé)	-NaCl	
	-pH mètre de paillasse	-Phénol	
	-pipettes multicanaux de 100ul.	-Protéinase K	
	-Pipetus	-SDS	
	-Plaque chauffante	- Tris- Acétate-EDTA (TAE)	
	-Poupinel	-Tampon de l'enzyme	
	-Réfrigérateurs à +4°C, -20°C et -80°C	-TMAC	
		-Tris-HCl	

3. GIMP 2.8 ou Inkscape-0.91-1

Nous avons utilisé ces deux logiciels pour le traitement d'images selon les cas. Ils sont avec licence en libre accès

GIMP : (*GNU Image Manipulation Program*) est un éditeur d'image multi-plateforme, diffusé sous la licence GPLv3 comme un logiciel gratuit et libre. Il en existe des versions pour la plupart des systèmes d'exploitation dont GNU/Linux, OS X, et Microsoft Windows. Il est téléchargeable directement à partir du site officiel: <https://www.gimp.org/>.

Inkscape : est un logiciel libre de dessin vectoriel sous licence GNU GPL. Il gère des fichiers conformes avec les standards XML, SVG et CSS du W3C.

Il s'agit d'un logiciel multiplateforme, disponible notamment sous Windows, Mac OS X, GNU/Linux et FreeBSD.

Il a des fonctionnalités assez similaires au logiciel propriétaire Adobe Illustrator.

Il est téléchargeable directement à partir du site : <https://inkscape.org/fr/download/>.

Remarque : L'utilisation de GIMP est préférable lorsqu'on travaille sous windows, tandis que Inkscape sous LINUX.

4. XLSTAT

La version utilisée est : XLSTAT 2015.4.01.22368 (32bit), version d'évaluation (30 jours). Il est téléchargeable à partir du site : www.xlstat.com/fr/.

XLSTAT est le logiciel d'analyse de données et de statistiques pour Microsoft Excel® le plus complet et le plus utilisé.

XLSTAT fonctionne avec toutes les versions d'Excel, depuis la version 97 jusqu'à la version 2016 sous l'environnement Windows ou Mac OS.

5. NetLogo 5.3.1

NetLogo est un langage de programmation et un environnement de modélisation pour le développement de système multi-agents. Il est utilisé pour modéliser des phénomènes liés.

De même, il est particulièrement adapté pour la modélisation de systèmes complexes sur un parcours de temps. De nombreux modèles (biologie, physique, chimie, ...) y sont présents et l'utilisateur a la possibilité d'y en ajouter ou d'en modifier [406].

Il peut être téléchargé à partir du site : <https://ccl.northwestern.edu/netlogo/>.

IV. Méthodes

1. Recrutement de malades

L'orientation des patients au laboratoire de Parasitologie/Mycologie de l'hôpital Ibn Sina CHU d'Annaba se fait généralement par un spécialiste (dermatologue, pédiatre, infectiologue,...) selon le tableau clinique :

- ✓ En présence d'un tableau clinique typique: confirmation d'une suspicion de leishmaniose cutanée ou viscérale
- ✓ En absence d'un tableau clinique typique: un diagnostic éliminatif d'une leishmaniose: orientation du diagnostic vers d'autres pathologies (essentiellement les leucémies en cas d'une suspicion d'une LV).
- ✓ En cas d'une maladie opportuniste: pour exploiter la co-infection (essentiellement co-infection leishmaniose viscérale-VIH)

Les renseignements cliniques et épidémiologiques des patients sont enregistrés dès la réception du prélèvement dans la fiche de renseignements (Annexe I et II) correspondante à :

- ✓ Fiche de renseignements de la leishmaniose cutanée
- ✓ Fiche de renseignements de la leishmaniose viscérale
- ✓ Fiche de renseignements de la sérologie leishmanienne

Le diagnostic biologique à notre niveau se fait après étude des fiches de renseignements de chaque malade. Il est basé sur les techniques suivantes:

2. Etude parasitologique des prélèvements

2.1. Prélèvements cutanés

Ces prélèvements sont effectués au sein du laboratoire de Parasitologie/ Mycologie CHU d'Annaba.

Dans le cas de suspicion d'une LC et après avoir bien désinfecté la lésion avec de l'eau oxygénée et enlever la croûte si elle a eu lieu, le prélèvement se fait au niveau de la périphérie de la lésion à l'aide de vaccinostyle stérile pour avoir le maximum de sérosités cutanées (Photo 4).

Des fois il y a écoulements de sang de la lésion qui peut diluer le prélèvement, il doit être enlevé avant tout prélèvement.

Il faut aussi faire le prélèvement en dehors de la zone purulente dans le cas des lésions surinfectées.

Ces prélèvements ont été étalés sur lames, colorés au MGG et archivés pour une éventuelle étude moléculaire. Des fois, et selon les cas, une mise en culture du parasite a eu lieu.

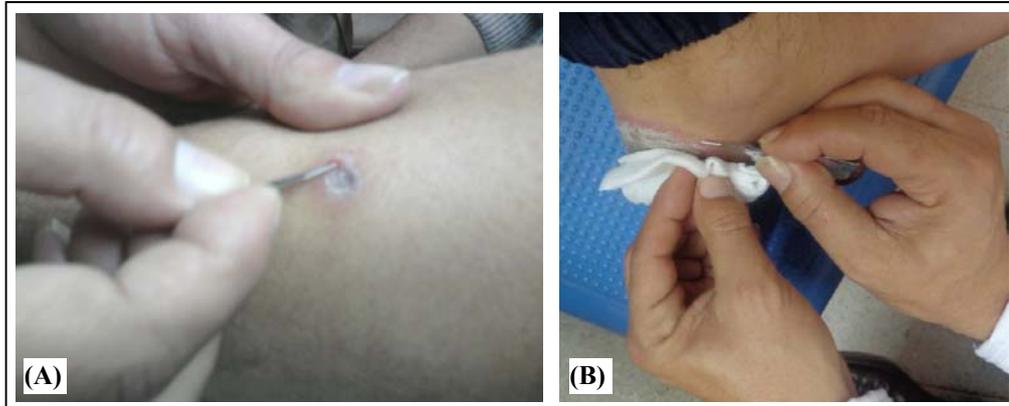


Photo 4. Prélèvements à partir de lésions suspectes de leishmaniose cutanée.

(A) Prélèvement à partir de lésion au niveau du bras; (B) Prélèvements à partir de lésion au niveau du pied.

2.2. Prélèvements de moelle osseuse

Dans le cas de suspicion d'une LV, souvent le prélèvement est une PMO étalée sur lames, colorées au MGG et archivées pour une exploration moléculaire. Et/ou du sang total prélevé dans un tube sec pour une sérologie.

La ponction de moelle osseuse est effectuée par un médecin hématologue sous anesthésie périphérique. Elle est réalisée soit au niveau sternal ou iliaque.

Elle est ensuite étalée sur des lames et envoyée au laboratoire pour étude parasitologique.

Les frottis sont colorés au MGG et observés en immersion à la recherche des formes amastigotes du parasite. Souvent, la recherche est longue et très difficile à cause des moelles osseuses diluées ou la faible charge parasitaire existante.

2.3. Examen direct

Les sérosités prélevées sont étalées sur des lames propres. La coloration au MGG se fait dans deux étapes: la première est la fixation des frottis au méthanol absolu pendant 2 à 3 minutes, ensuite la coloration au Giemsa dilué à 1/10 avec de l'eau de robinet pendant 30 minutes. Après avoir rincé les lames avec de l'eau du robinet (pour enlever l'excès du colorant) et les faire sécher à l'air libre. L'observation microscopique se fait à l'immersion (GX100) à la recherche des formes amastigotes de *Leishmania sp.*

2.4. La mise en culture du parasite

Est une technique d'isolement du parasite sur différents milieux de culture (NNN, SLAP,...). Pour cette étude, nous avons choisis de procéder à la mise en culture du parasite sur milieu diphasique : NNN. Pour cela, différents étapes sont nécessaires :

2.4.1. La ponction cardiaque du lapin

Ce prélèvement permet de prélever la dose maximum de sang de lapin (Photo 6). Avant d'effectuer ce prélèvement, il faut :

- Utiliser pour la ponction cardiaque du lapin: La G 14, Seringue à 50 cc glycinée.
- Autoclaver tous le matériel, réactifs, tubes, géloses...
- La paillasse : nettoyer juste avant l'utilisation.



Photo 5. Ponction cardiaque du lapin.

On commence par maintenir et étendre le lapin sur son côté droit. Localiser le coeur, insérer l'aiguille et ensuite enfoncer le tube vacutainer (Photo 5).

Exsanguiner le lapin jusqu'à la mort (saigner à blanc l'animal).

2.4.2. La préparation du milieu de culture NNN

- Pour 200 ml de la gélose du milieu NNN mettre dans un flacon 1.2g de NaCl, ajouter 200 ml d'eau distillé, ensuite 2g de la gélose NNN en poudre. Mélanger le tout et autoclaver le milieu à 121°C/1 Bar pendant 20 minutes
- Mettre dans des tubes à vis stériles: 7cc de la gélose préalablement préparer avec 1 cc de sang de lapin additionné de citrate à 5% et d'antibiotique. Veiller à ce que la gélose aura une température de 45°C approximativement pour ne pas cuire le sang (su elle est trop élevée) et ne pas se solidifier et former des bules d'air (si elle est moins de 45°C).
- Mettre les tubes préparés à une température de +4°C pour que l'exuda se forme.

2.4.3. La mise en culture (isolement du parasite) :

L'isolement des parasites en culture sur milieu NNN a eu lieu au laboratoire de Parasitologie/Mycologie, CHU d'Annaba.

Le prélèvement se fait à l'aide d'une seringue stérile contenant de l'eau physiologique stérile pour aspirer les sérosités en périphérie de la lésion (Photo 6).



Photo 6. Prélèvement pour la mise en culture du parasite.

Le contenu de la seringue est ensuite versé stérilement dans un tube préparé préalablement contenant le milieu de culture de base bi-phasique des leishmanies : l'NNN (milieu de Novy Mc Neal et Nicolle).

La lecture a lieu à partir du septième jour (figure 18). Elle se fait à partir d'une goutte de la partie liquide du milieu enlevée stérilement et mise entre lame et lamelle pour la recherche des formes promastigotes de *Leishmania sp.* par microscope optique (objectif : X40).

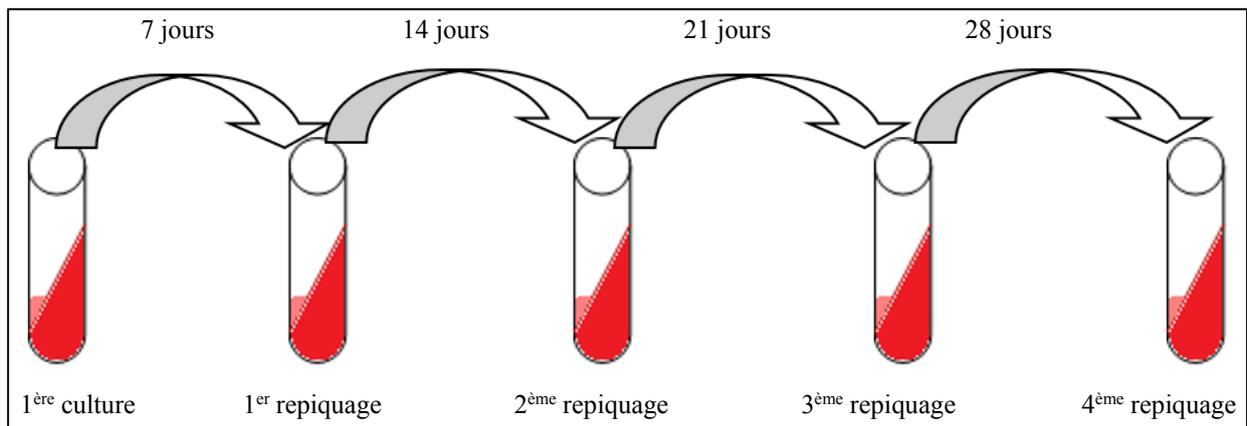


Figure 18. Schéma de lecture des cultures parasitaires.

Pour 1 tube : 4 lectures (ou 1 mois) ensuite à jeter; pour 1 prélèvement : 4 repiquages

La coloration au MGG peut se faire aussi à partir de ces lames pour visualiser les formes promastigotes de *Leishmania sp.* Cette coloration se fait de la même façon décrite avant (pour les amastigotes), la différence est dans le temps de coloration au Giemsa qui est de 25 minutes. Les manipulations qui suivent l'isolement s'effectuent sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination. Les souches de *Leishmania*, conservées vivantes dans l'azote liquide, sont décongelées et mises en culture, sous leur forme promastigote, dans des flacons (couramment appelés : flasks) contenant du RPMI 20% à 22°C en conditions stériles.

2.5. Culture en masse des souches

Une culture en masse des parasites repose sur le même principe de la culture cellulaire sur milieu RPMI 1640. Elle est effectuée afin d'avoir une énorme quantité parasitaire nécessaire pour d'autres techniques comme l'immuno-chromatographie des iso-enzymes, la MLMT (multilocus microsatellite typing) ou tout simplement pour les utiliser comme réserve de témoins positive des différents PCRs, et c'est le cas dans cette étude. Elle nécessite un suivi rigoureux de plusieurs étapes :

2.5.1. Décongélation de la souche

Avant de mettre les parasites en culture, il faut réaliser la décongélation des souches conservés préalablement dans de l'azote liquide. La plus simple méthode est effectuée comme suit :

- Choisir la souche à décongeler à partir de la liste des emplacements exacts des souches du stock
- La faire sortir rapidement et la mettre dans un bac de glace
- Mettre le tube eppendorf de cryoconservation directement dans un bain marie préchauffé à 37°C pendant 2 à 3 minutes.
- Sous la hotte à flux laminaire, mettre tout le contenu du tube de conservation dans un flask contenant 2 ml du milieu de culture (Tableau 12).

Tableau 12. Composants du milieu de culture utilisé pour la culture en masse.

Composant	Quantité
RPMI 1640 pur (contenant : L. Glutamine 300mg/ml)	85%
Sérum de vœux fœtal (SVF)	10%
Antibiotique (pénicilline/ streptomycine)	5%

- Au même temps, effectuer une observation microscopique pour savoir l'état de la souche après la décongélation (mobilité, viabilité, richesse, éventuelle contamination)
- Homogénéiser délicatement avec le pipetous équipé de pipette graduée de 2 ml afin de disperser le milieu de congélation dans le milieu de culture
- Mettre le flask en incubation à 22°C

En générale, une culture cellulaire de *Leishmania* deviendra positive au bout de 2 à 3 jours après la première mise en culture dans un nouveau milieu. Elle est caractérisée par un virage de coloration du rose au jaune (culture vieille) due au changement du pH du milieu. Pour chaque culture positive, 3 procédures sont effectués :

2.5.2. Maintenir la viabilité de la souche

En cas de besoin, il est impératif de maintenir la souche en culture avec une série de passages selon le protocole :

- Enlever le milieu de culture
- Ajouter le tampon (10 ml) pour enlever les résidus de l'ancien milieu
- Enlever le tampon
- Ajouter la trypsine pour dissocier les cellules (les leishmanies) l'une de l'autre
- Incubation des cellules à 22°C pendant 2 à 4 minutes
- Mettre un nouveau milieu de culture
- Enlever le tout du flask et les mettre dans des tubes coniques de 50 ml stériles
- Centrifuger à 1800 rpm//25°C/4 minutes
- Mettre un nouveau milieu et bien homogénéiser le milieu avec le pipet us équipé de pipette graduée de 20 ml
- Mettre le tout dans un nouveau flask et incuber à 22°C

2.5.3. La conservation de la souche

Mettre dans chaque tube eppendorf de cryoconservation (tube à vis thermorésistant) 0,5 ml de la culture avec 0,5 ml de la solution de conservation (Tableau 13) et mettre le tube rapidement dans un bac de glace et le transmettre dans l'immédiat à la chambre froide afin le plonger dans de l'azote liquide pour une très longue conservation du stock parasitaire. S'assurer de bien noter l'emplacement de la souche au sein des cylindres de conservation.

Tableau 13. Composants du milieu de conservation.

Composant	Quantité
RPMI 1640 pur	60%
Sérum de vœux foetal (SVF)	35%
DMSO	5%

2.5.4. Culot parasitaire pour extraction d'ADN

- Mettre la culture dans des tubes coniques de 50 ml et la centrifuger à 3000rpm/10minutes/+4°C.
- Enlever le surnageant
- Ajouter 5 ml du dPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) et centrifuger à 3000rpm/10minutes/+4°C.

- Enlever le surnageant
- Garder le culot à -20°C jusqu'à utilisation
- Procéder à l'extraction d'ADN à partir du culot parasitaire par la méthode standard du Phénol/Chloroforme décrite après (voir : page N° 71).

3. Etude sérologique des prélèvements

Le sang périphérique est prélevé sur tubes secs qui sont suffisants pour les tests sérologiques qui suivront.

Pour la recherche des anticorps anti-*Leishmania sp.* 3 techniques de sérodiagnostic ont été utilisées: l'immunofluorescence indirecte (IFI), l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et l'*IT-Leish*[®] test.

3.1. La technique de l'immunofluorescence indirecte (IFI)

Principe : Une technique quantitative permet de détecter la présence des anticorps anti-*Leishmania sp.* dans le sérum du patient. Ces anticorps sont visualisés grâce à la fluorescence émise après leur fixation sur les promastigotes figurés sur la lame de l'IFI.

La mise en évidence de l'antigène figuré est réalisée avec une série de dilutions. La révélation du complexe Ag-Ac correspondant se fait par addition d'une anti-immunoglobuline marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine. Le seuil de positivité est de 1/80.

Les lames de l'IFI sont préparées à partir des promastigotes en culture (selon le protocole ci-dessous). Les promastigotes choisis sont ceux responsables de la forme viscérale, spécifiquement les MON-1 et selon le protocole de la préparation de lames à spots :

- Isoler la suspension parasitaire à partir de culture positive d'une souche leishmanienne viscérotrope
- Filtrer la suspension à travers la gaze pour éliminer les débris de gélose du milieu de culture (NNN: Neal Novyl Nicolle, SLC: sérum de lapin coagulé...)
- Centrifuger à 2500 rpm/10 minutes
- Jeter le surnageant
- Laver le culot avec de l'eau physiologique (0.3%) et centrifuger à 2500 rpm/10 minutes. A répéter trois fois
- Ajouter un peu d'eau physiologique sur le dernier culot et homogénéiser.
- Comptage des leishmanies par cellule de malassez afin d'obtenir 2×10^6 cellules/ml, ou bien 20 promastigotes/champ (objectif x40).
- Répartir la suspension sur les spots à raison de 10µl/spot

- Sécher à l'étuve (37°C/30 minutes)
- Conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

Protocole de l'IFI:

- Faire sortir les lames du congélateur (-20°C) et les sécher pendant 10 mn.
- Faire sortir les sérums des patients et les sérums témoins positifs et négatifs du congélateur (-20°C).
- Effectuer des dilutions des sérums de malades dans un tampon PBS pH 7,2 (Annexe V) dans des tubes secs au 1/20, 1/40 et 1/80. En cas de positivité, les dilutions sont poursuivies (1/160, 1/320 et 1/640).
- Déposer une goutte de chaque dilution par spot et on incube en chambre humide à 37°C pendant 30 mn.
- Effectuer deux lavages en tampon phosphate de 5 mn chacun.
- Ajouter une goutte par spot d'anti- immunoglobuline marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine diluée au 1/30 dans du PBS pH 7,2 et incuber en chambre humide à 37°C pendant 30 mn.
- Effectuer deux lavages en tampon phosphate de 5 mn chacun.
- La contre coloration est réalisée par le bleu d'Evans au 1/10 000 avec incubation pendant 30 mn à 37°C.
- Réaliser encore deux derniers lavages en tampon phosphate de 5 mn chacun.
- Faire le montage avec de la glycérine.
- Recouvrir avec une lamelle et faire la lecture au microscope à ultra-violet.
- Une réaction est positive lorsqu'on voit une couleur verte fluorescente autour de toute la forme promastigote y compris le flagelle. Une fluorescence limitée au noyau correspond soit à une réaction croisée soit à un portage asymptomatique.
- Lorsque la réaction est négative, la leishmanie est rouge.

3.2. La technique ELISA

Principe : Le test ELISA se base sur la réaction des anticorps du sérum à tester avec les antigènes adsorbés sur la phase solide de polystyrène pour former un complexe antigène – anticorps. Les immunoglobulines en excès sont éliminées lors d'une étape de lavage. Le conjugué enzymatique s'associe spécifiquement aux complexes antigènes-anticorps formés. Une deuxième étape de lavage élimine le conjugué en excès. Ensuite, l'ajout du substrat (solution de TMB) donne une coloration bleue qui vire au jaune après ajout d'une solution

d'arrêt : c'est une réaction colorimétrique révélée par une courbe après lecture avec lecteur de microplaque ELISA.

Réactifs et composants du coffret ELISA: La technique utilisée est VIRCELL T1000 *Leishmania* IgG+IgM (single Test ELISA Kit). La plaque comporte 96 têtes.

La date de validité des kits doit être contrôlée avant toute mise en œuvre.

La température de stockage des kits est de : +2 à +8 °C.

Dans les coffrets, les réactifs sont prêts à l'emploi et doivent être utilisés selon les instructions du fournisseur.

Le coffret contient :

- VIRCELL *LEISHMANIA* PLATE : microplaque de 96 puits sécables sensibilisés avec l'antigène soluble du *Leishmania infantum*.
- VIRCELL SERUM DILUENT : 25 ml de diluant des sérums coloré en bleu contenant un tampon phosphate additionné de stabilisant protéique et de Proclin. Prêt à l'emploi.
- VIRCELL IgG+IgM POSITIVE CONTROI : 500 µl de sérum de contrôle positif additionné de Proclin.
- VIRCELL IgG+IgM CUT OFF CONTROI : 500 µl de sérum Seuil additionné de Proclin.
- VIRCELL IgG+IgM NEGATIVE CONTROI : 500 µl de sérum de contrôle négatif additionné de Proclin.
- VIRCELL IgG+IgM CONJUGALE : 15 ml de conjugué: immunoglobuline anti-humaine conjugué à la peroxydase dans une solution tampon additionnée de Proclin. Prêt à l'emploi, (solution rouge).
- VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION : 15 ml de solution substrat : tétraméthylbenzidine (TMB), Prêt à l'emploi.
- VIRCELL STOP REAGENT : 15 ml solution d'arrêt: acide sulfurique 0.5 M.
- VIRCELL WASH BUFFER : 50 ml de solution de lavage concentrée 20x contenant un tampon phosphate additionné de Tween et de Proclin.

Matériel nécessaire non fourni :

- Micropipettes de 5 µl et de 100 µl.
- Pipettes mullicanaux de 100 µl.
- Laveur de microplaque ELISA.
- Etuve ou bain-marie thermostaté.
- Lecteur de microplaque ELISA avec filtre de mesure à 450 nm et filtre de référence à 620 nm.

- Eau distillée.

Protocole:

- Avant toute utilisation, mettre les réactifs à une température ambiante environ une heure avant l'utilisation tout en laissant la microplaque dans son enveloppe.

-Bien agiter les réactifs

-Faire sortir la microplaque de l'enveloppe avec le nombre exacte des cupules à utiliser:

Le nombre de cupules à utiliser=nombre d'échantillons à tester+ 4 cupules pour les contrôles+ 2 cupules pour les sérums seuil+ 1 cupule pour le sérum de contrôle négatif+ 1

Cupule pour le sérum de contrôle positif.

-Déposer 100 µl de diluant de sérum dans tous les puits.

-Déposer par ordre: 5 µl de chaque échantillon, 5 µl de contrôle positif, 5 µl de sérum seuil et 5 µl de contrôle négatif.

-Couvrir la microplaque avec un film et incuber à 37°C/45 minutes.

-Enlever le film, éliminer le contenu de tous les puits et laver 5 fois avec 0,3 ml de solution de lavage par puits. Eliminer tout le liquide de lavage.

-Ajouter immédiatement 100 µl de conjugué dans chaque puits.

-Couvrir la microplaque avec un film et incuber à 37°C/30 minutes.

-Enlever le film, éliminer le liquide de tous les puits et laver 5 fois avec 0,3 ml de solution de lavage par puits. Eliminer tout le liquide de lavage.

-Ajouter immédiatement 100 µl de substrat (TMB) dans chaque puits.

-Recouvrir avec un film et incuber à température ambiante pendant 20 minutes à l'abri de la lumière (chambre noire).

-Enlever le film et arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans tous les puits.

-Effectuer la lecture avec le lecteur de microplaque dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.

Interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats par le calcul de la moyenne des DO (Densité Optique) des sérums seuil (Tableau 14).

Titre en index = (DO échantillon / DO moyenne du sérum seuil) x 10.

Tableau 14. Interprétation des résultats de lecture des DO.

Interprétation	Titre en index
Positif	>11
Négatif	< 9
Douteux	9-11

3.3. L'immunochromatographie pour la détection de l'antigène recombinant : rK39

Principe : C'est une technique qualitative appliquée à la recherche de l'antigène recombinant rK39. C'est une technique très rapide et pratique, elle permet d'avoir un résultat à partir du sang total ou sérum en 20 minutes uniquement.

Protocole : Le kit utilisé est celui de Bio-Rad IT LEISH 710124 selon un protocole simple et rapide (Figure 19) :

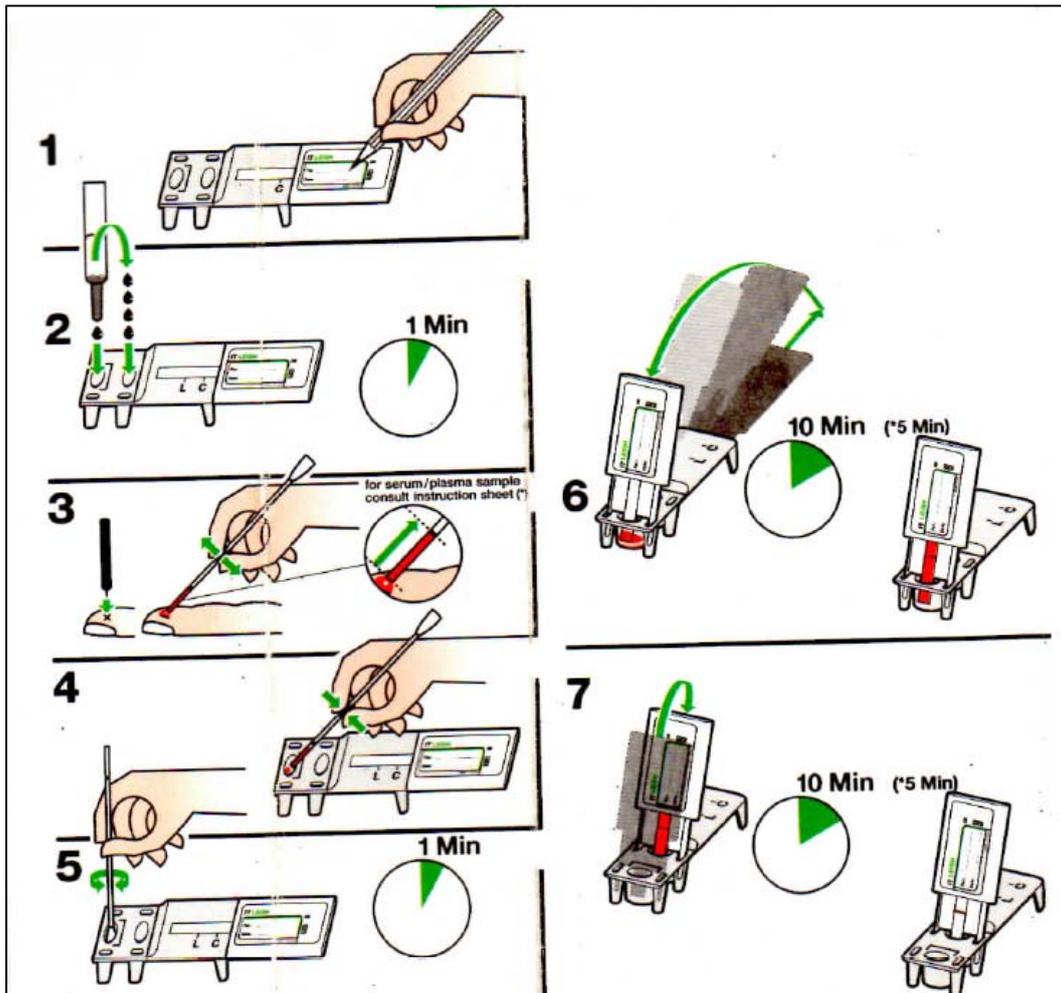


Figure 19. Protocol de l'utilisation de l'IT-Leish[®] test.

L'interprétation des résultats se fait selon la figure ci-après :

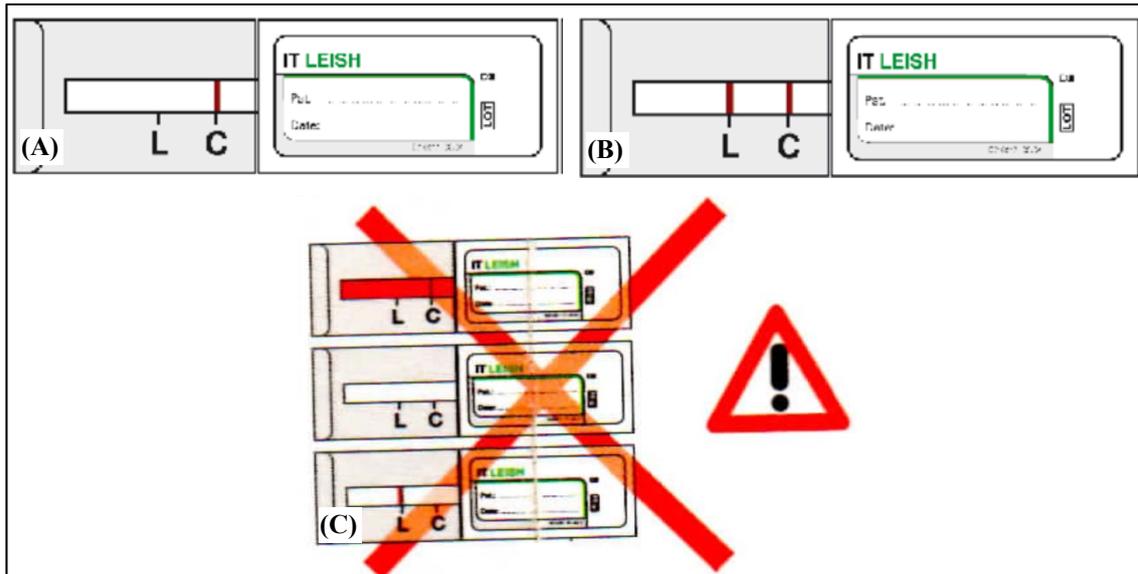


Figure 20. L'interprétation des résultats de l'IT-Leish[®] test.

(A) test négatif; (B) test positif; (C) test invalide

4. Etude Moléculaire des prélèvements

4.1. Extraction d'ADN parasitaire par phénol/chloroforme

Principe : Cette méthode utilise la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminants comme les protéines et les lipides) entre deux phases non-miscibles. Le procédé classique est l'extraction par le couple : phénol-chloroforme.

- L'EDTA est un agent chélateur des cations (Ca^{++} et Mg^{++}) qui sont des cofacteurs d'ADNase donc il inhibe l'action de cette enzyme sur l'ADN;
- Le NaCl crée une pression osmotique et favorise la précipitation;
- Le SDS est un détergent, il permet la désorganisation de la double couche des phospholipides membranaires des cellules pour libérer les acides nucléiques;
- La protéinase K est une protéase permettant la dissociation des protéines.
- Le phénol est un excellent agent dénaturant des protéines, il permet de séparer efficacement les protéines et les acides nucléiques. Il est ensuite éliminé par le chloroforme (non-miscible avec l'eau).
- La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation. La phase aqueuse contient alors les acides nucléiques qui peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique ou par l'alcool isopropylique.

Protocole : On a essayé de minimiser le nombre de lavages pour ne pas perdre l'ADN qui est dès le départ en faible quantités dans les lames (augmenter le rendement de l'extraction).

L'ADN génomique des parasites, colorés au Giemsa et fixés sur des lames, est extrait par la méthode du Phénol/chloroforme selon les étapes suivantes :

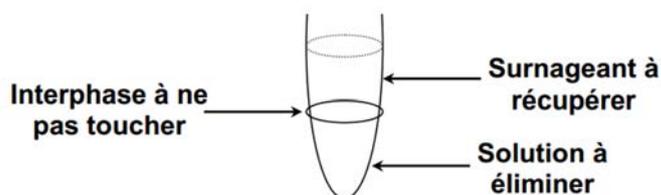
1. **Décollement des parasites de la surface de la lame** : en utilisant 250 μ l de la solution de lyse :
 - Tris-HCl pH= 7,4 : 50mM
 - EDTA : 10 mM
 - NaCl : 50 mM

Ce décollement se fait à l'aide d'un scalpel stérile à usage unique en frottant dans tous le sens la surface de la lame (sans risque de dégrader l'ADN) pendant quelques minutes (jusqu'au décollement total des parasites). Récupérer le tout dans un tube eppendorf.

2. **Dégrader les protéines membranaires et cytoplasmiques** : par ajout de :
 - Protéinase K: 2,5 μ l (10 mg/ml)
 - SDS: 10 μ l (10%)

Homogénéiser la solution. On a un volume total de 250 μ l dans chaque tube eppendorf.

3. **Incubation** : dans un bain marie toute la nuit à 55°C
4. **Ajouter le phénol/chloroforme** : 1volume/1volume (phénol: 125 μ l, chloroforme: 125 μ l) et centrifuger à 12000 rpm/15 min, ce qui permet la séparation des deux phases (organique et aqueuse).
5. **Transvaser le surnageant** : dans un tube eppendorf sans toucher l'interphase.



6. **Ajout de l'éthanol absolu froid (100%)** : 600 μ l, pour précipiter l'ADN.
7. **Incubation à -20°C** : pendant 2 à 3 heures.
8. **Centrifugation** : à 12000 rpm/10 min (pour récupérer le culot d'ADN).
9. **Lavage à l'éthanol froid (70%)** : mettre 1ml pour enlever l'excès de sels.
10. **Centrifugation** : à 12000rpm/10min.
11. **Re-suspendre le culot** : dans de l'eau distillée stérile (20 μ l). On laisse le culot d'ADN se réhydrater pendant 2 à 3 heures.
12. **Conserver l'ADN** : à +4°C.

4.2. Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN

4.2.1. Contrôle quantitatif de l'ADN

Mesure de la DO à 260 nm : pour savoir la concentration de l'ADN de nos échantillons, on mesure la densité optique (DO) à : 260nm (longueur d'onde = 260nm).

Sachant que la DO = 1 correspond à 50 µg d'ADN/ml.

Mesure de la DO à 280nm : la mesure de l'absorption à 280nm est pour évaluer la présence des protéines.

Protocole de la mesure de la DO :

On réalise habituellement la lecture de densité optique (DO) à l'aide du spectrophotomètre Nano Drop® ND-1000 (Labtech International). Pour cela, il suffit de mettre une goutte de la suspension d'ADN dans l'endroit spécifié sur l'appareil et lire la DO.

Pour ce travail, la DO a été mesurée pour chacun des tubes à l'aide du fluorimètre QUBIT selon le protocole ci-après [407] :

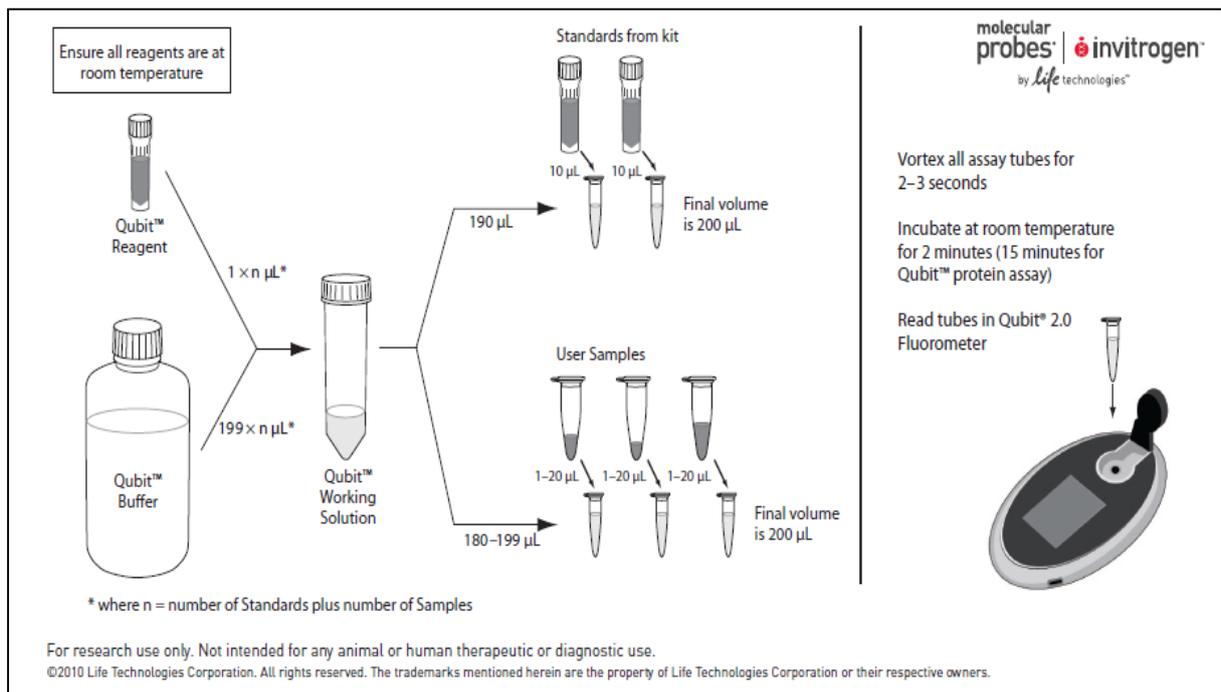


Figure 21. Protocole de dosage de la densité optique pour quantifier l'ADN dans les échantillons [407].

4.2.2. Contrôle qualitatif de l'ADN

Electrophorèse sur gel d'agarose : pour évaluer l'état de dégradation de l'ADN, on fait une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% dans un tampon TAE 1X (EDTA pH8 0,5mM, Tris acétate pH 7,8) (Annexe VI). On observe :

- Obtention de smear : indique un état dégradé de l'ADN.

- Une bande nette de forte intensité: indique un état non-dégradé de l'ADN.

Evaluation de la qualité par le rapport de la pureté :

- Premier rapport de pureté=DO260nm/DO280nm. Il est compris entre 1,8 et 2. Si on obtient :
 - ✓ Un rapport inférieur à 1,8 : l'ADN est contaminé par les protéines.
 - ✓ Un rapport supérieur à 2 : l'ADN est contaminé par les sels.
- Deuxième rapport de pureté= DO260nm/DO230nm. Il est compris entre 2 et 2,2. Au-delà de ces valeurs, l'ADN est contaminée par des détergents (alcool, phénol,...).

4.3. Outils bioinformatiques

4.3.1. BLAST

Blast est utilisé pour exécuter des comparaisons de séquences rapides et des recherches de similarité montrant des relations fonctionnelles ou évolutives entre les séquences triés à partir de plusieurs bases de données et peut nous aider à identifier les membres d'une même famille de gènes. Les séquences utilisées sont relatives aux espèces de *Leishmania*.

4.3.2. PCR électronique (e-PCR)

La PCR électronique (e-PCR) est une méthode de calcul basée sur l'algorithme BLAST. Elle est développée essentiellement pour déterminer si une « Séquence Tagged Sites » (STS) qui se situe dans une séquence génomique donnée. Elle permet également la validation de la spécificité des amorces PCR et pour prédire les résultats de la PCR [408].

Le choix des amorces utilisés « primer design » peut se faire directement à partir du site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>

4.3.3. Agent set model

Il s'agit de la construction d'un modèle d'ensemble d'agents qui simule la propagation de l'infection à *Leishmania sp.* dans notre région d'étude tout en tenant compte des espèces parasitaires, du vecteur et du réservoirs de la leishmaniose en Algérie (Voir : Chapitre 1).

Ce modèle a été réalisé par le langage de programmation : « NetLogo » qui est un environnement de modélisation pour le développement de système multi-agents [409,410]. Il permet la simulation et la visualisation et la compréhension des comportements d'un modèle [406].

4.4. Amplification de l'ADN par PCRs

Principe : Cette technique permet d'obtenir à partir de traces d'ADN, un nombre important de copies d'une séquence choisie d'ADN (jusqu'à un million). C'est une méthode basée sur le principe d'amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence connue d'ADN.

Il est nécessaire d'avoir des informations sur les séquences étudiées de l'ADN cible. Ces informations vont servir pour élaborer deux oligonucléotides d'environ 15 à 25 paires de bases : les amorces. Ils doivent s'hybrider spécifiquement aux deux extrémités de la séquence à amplifier de telle sorte que chaque oligonucléotide se fixant à l'un des deux brins (Figure 22).

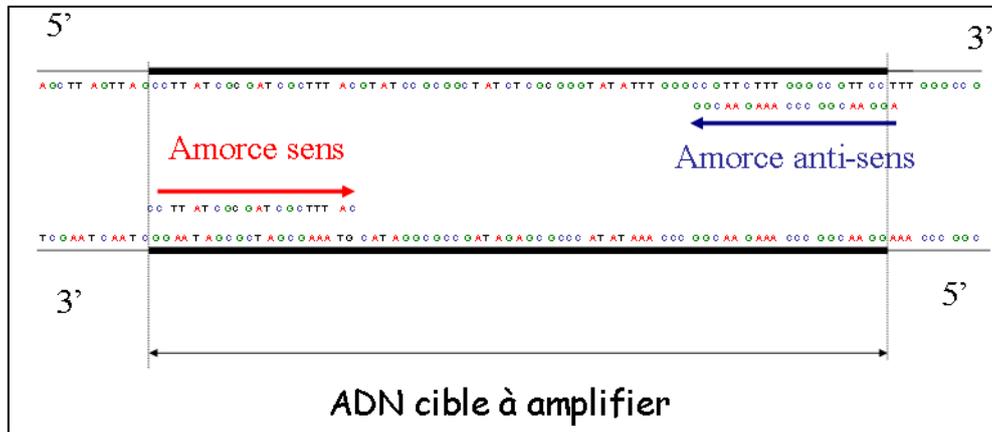


Figure 22. Position des amorces sur les séquences cibles.

Cette technique a connu un essor considérable grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, ce qui va éviter de rajouter d'enzyme à chaque cycle de PCR. Cette enzyme est la Taq polymérase qui fonctionne correctement avec une concentration en $MgCl_2$ entre 2 et 3 mM, au-delà elle produit davantage des mésappariements.

Protocole : On a utilisé 3 cibles :

4.4.1. PCR PO (acidic ribosomal phosphoprotein fragment, PO)

La PCR PO permet d'amplifier l'ADN des mammifères [402]. Les produits amplifiés sont analysés sur un gel d'agarose à 1,5% en présence d'un marqueur de taille 100 pb (Vivantis-Malaisie).

On utilise les amorces POF et POR selon les concentrations suivantes :

Tableau 15. Mélange réactionnel de la PCR PO.

Réactifs	Concentration finale	Le MIX (1X)
H ₂ O		17 µl
Tampon de l'enzyme (10X)	1X	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,2Mm	0,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5Mm	0,75 µl
POF (10 pM)	0,6 pMol	1,5 µl
POR (10 pM)	0,6 pMol	1,5 µl
Taq polymérase (5U/µl)	1,25 Unités	0,25 µl
ADN génomique (1ng)	20 ng	1 µl
Total		25 µl/Réaction

Les conditions de la PCR PO figurent dans le tableau 16.

Tableau 16. Programme de la PCR PO

	T°/temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C/5min	1
Dénaturation	94°C/30sec	35
Hybridation	51°C/30sec	
Elongation	72°C/1min	
Elongation finale	72°C/10min	1

°C = degré Celsius, sec = seconde, min = minute.

4.4.2. PCR-ITS1

On utilise les amorces LITSR et L5,8S pour amplifier les régions ITS1 des ARNr (Tableau 17).

Les réactions PCR sont réalisées avec l'enzyme Taq polymérase (Platenium, Invitrogen France). Le volume final de la réaction est de 25 µl. Les composants des réactions PCR ont été ajoutés aux concentrations finales suivantes : le tampon de la Taq IX, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0,2mM, les amorces sens et anti-sens 0,5µM, la Taq polymérase 2 Unités par réaction et de l'ADN génomique à 20 ng par réaction. Le volume est ajusté à 25 µl par l'ajout de l'H₂O.

Tableau 17. Mélange réactionnel de la PCR ITS1

Réactifs	Concentration finale	Le MIX (1X)
H ₂ O		17,35 µl
Tampon de l'enzyme (10X)	1X	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,2Mm	0,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5Mm	0,75 µl
LITSR (10 pM)	0,5pMol	1,25 µl
L5,8S (10 pM)	0,5pMol	1,25 µl
Taq polymérase (5U/µl)	2 Unités	0,4 µl
ADN génomique (1ng)	20 ng	1 µl
Total		25 µl/Réaction

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

- l'étape de dénaturation, est réalisée à 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

- L'étape d'hybridation des amorces se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 70°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/matrice est réalisé.
- L'étape de l'extension se fait à 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées (Tableau 18).

Tableau 18. Programme de la PCR ITS1.

	T°/temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C/2 min	1
Dénaturation	95°C/20 sec	
Hybridation	53°C/30 sec	35
Elongation	72°C/1 min	
Elongation finale	72°C/6 min	1

°C = degré Celsius, sec = seconde, min = minute.

Les températures de dénaturation et d'extension sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces. Elle est inférieure de 2°C à 5°C que la température de l'amorce qui est la température de demi-dénaturation (T_m ou melting temperature).

4.4.3. PCR-mini-exon

On utilise un couple d'amorces : Fme et Rme permettant d'amplifier les régions mini-exon (Tableau 19). Ces PCRs sont réalisées avec l'enzyme Taq polymérase (Platenium).

Le volume final de la réaction est de 25µL Les composants des réactions PCR ont été ajoutés aux concentrations suivantes : le tampon I X, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,2mM, DMSO 12%, les amorces sens et anti-sens 0,5 pmol/u.1, la Taq polymérase 1 Unité par réaction et de l'ADN génomique 20 ng par réaction. Le volume est ajusté à 25 µl/Réaction par l'ajout de l'H₂O également.

Tableau 19. Mélange réactionnel de la PCR mini-exon.

Réactifs	Concentration finale	Le MIX (1 X)
H ₂ O		12,5 µl
Tampon de l'enzyme 10X)	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75 µl
dNTP (10 mM)	0,2mM	0,5 µl
DMSO	12%	3 µl
TMAC	50 mM	1,25 µl
Fme (10 pM)	0,5pMol	1,25 µl
Rme (10 pM)	0,5pMol	1,25 µl
Taq polymerase (5U/µl)	1 Unité	0,2 µl
ADN génomique (1ng)	20 ng	1 µl
Total		25 µl/Réaction

Nous avons ajouté un additif qui est le tenraméthylammonium chloride (TMAC) avec une concentration finale de 50 mM. Le TMAC permet l'amélioration de la stabilité thermique des régions riche en AT au cours de l'amplification par PCR [411].

Les conditions finales de la PCR mini exon sont illustrées dans le tableau 20.

Tableau 20. Programme final de la PCR mini-exon.

	T°/temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C/5 min	1
Dénaturation	94°C/30 sec	
Hybridation	54°C/30 sec	30
Elongation	72°C/45 sec	
Elongation finale	72°C/8 min	1

°C = degré Celsius, sec = seconde, min = minute.

4.5. PCR RFLP

Principe : La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes des fragments digérés par des enzymes de restriction.

D'un point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce. Les polymorphismes de restriction s'appuient sur des propriétés particulières des enzymes de restriction. Celles-ci coupent indifféremment les ADN codant et non-codant en reconnaissant les sites de restriction spécifiques qui peuvent être présents en plus ou moins grand nombre.

La petite taille des sites de restriction, et leur grand nombre dans un génome, les rendent particulièrement sensibles à tout changement de séquence nucléotidique : mutations par délétion, insertion, translocation chromosomique ...

Les enzymes de restriction sont donc des endonucléases capables de couper l'ADN double brin à des sites spécifiques de 4 à 6 paires de bases (parfois plus). Les séquences reconnues comportent 4 à 10 nucléotides et sont le plus souvent palindromiques. Les enzymes de restriction sont isolées le plus souvent de bactéries.

4.5.1. ITS1 PCR RFLP par l'enzyme *Hae III*

Après avoir amplifié par PCR la région ITS1 de nos isolats de *Leishmania sp.*, on procède à la digestion par enzyme de restriction de ces produits amplifiés par l'enzyme *Hae III* selon le protocole :

1. Fixer le bain marie à 37°C.
2. Préparer le MIX de la digestion (Tableau 21) :

Tableau 21. Composants de la RFLP ITS1.

Réactifs	Concentration finale	Le MIX (1X)
H ₂ O		3 µl
Tampon (10X)	(1X)	5 µl
Enzyme (10U/µl)	(20U/µl)	2 µl
AND		40 µl
Total		50 µl/Réaction

3. Incubation des tubes de la digestion pour toute la nuit à 37°C afin d'assurer une meilleure digestion des produits PCR.
4. Préparation de gel d'agarose à 3% avec du TAE (1X) et le BET à raison de 2,5 µl/50ml.
5. Mettre le colorant de la migration dans chaque tube RFLP (1 µl avec 5 µl de produit).
6. Faire le dépôt des produits selon l'ordre suivant:

Marqueur de taille (MT=100pb), témoins positifs (*L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*), les échantillons, marqueur de taille (MT = 50 pb).

7. Mettre un grand voltage pour que les produits rentrent dans le gel (environ 95V pendant 5 minutes à 10 minutes), ensuite régler le voltage entre 50V et 60V (optimum : 55V). Le temps de migration est au moins 5 heures.
8. Révélation des bandes de migration par UV et photographier le gel.

4.5.2. Mini-exon PCR RFLP par l'enzyme *Eae I*

Du même pour l'RFLP mini exon, après avoir amplifié par PCR la région mini exon des isolats de *Leishmania sp.*, les produits amplifiés subissent la digestion par enzyme de restriction Hae I selon le protocole suivant:

1. Fixer le bain marie à 37°C.
2. Préparer le MIX de la digestion (Tableau 22) :

Tableau 22. Composants de la RFLP mini-exon.

Réactifs	Concentration finale	Le MIX (1X)
H ₂ O		3 µl
Tampon (10X)	(1X)	5 µl
Enzyme (10U/µl)	(20U/µl)	2 µl
AND		40 µl
Total		50 µl/Réaction

3. Incubation des tubes de la digestion pour toute la nuit à 37°C afin d'assurer une meilleure digestion des produits PCR.
4. Préparation de gel d'agarose à 3% avec du TAE (1X) et le BET à raison de 2,5 µl/50ml.
5. Mettre le colorant de la migration dans chaque tube RFLP (1 µl avec 5 µl de produit).
6. Faire le dépôt des produits selon l'ordre suivant:

Marqueur de taille (MT=100 pb), témoins positifs (*L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*), les échantillons, marqueur de taille (MT = 50 pb).

7. Mettre un grand voltage pour que les produits rentrent dans le gel (environ 95V pendant 5 minutes à 10 minutes), ensuite régler le voltage entre 50V et 60V (optimum : 55V).
8. Révélation des bandes de migration par UV et photographier le gel.

4.6. Révélation des produits amplifiés et digérés

L'ADN, après extraction cellulaire et amplification par PCR, peut être analysé sur gel d'électrophorèse. L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des fragments d'ADN selon leur poids moléculaire par migration sur gel dut à la charge négative de l'ADN. Cette migration dépend de la taille des fragments d'ADN, du % du gel utilisé et du voltage appliqué (Tableau 23).

Tableau 23. Relation entre la taille de fragment d'ADN à révéler et le pourcentage du gel d'agarose à utiliser.

Taille du fragment d'ADN (kb)	% du gel d'agarose à utiliser
5 à 60	0,3
1 à 20	0,6
0,8 à 10	0,7
0,5 à 7	0,9
0,4 à 6	1,2
0,2 à 3	1,5
0,1 à 2	2

Principe : Le contrôle des produits PCR se base sur le principe de la séparation et l'identification des fragments d'ADN amplifié des éventuels fragments non spécifiques en fonction de leur taille et leur purification des restes des réactifs d'amplification dans un champ électrique homogène. Les ADN sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées négativement, la charge relative de l'ADN étant constante. De ce fait, l'ADN peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration 1X, soit dans du TAE ou dans du TBE.

Les échantillons sont mélangés à un colorant :

- ✓ Le bleu de charge (le bleu de bromophénol) : de masse moléculaire faible par rapport au fragment d'ADN pour marquer le fond de migration et de les suivre au cours de l'électrophorèse.
- ✓ Tampon de charge ADN vert: le tampon est coloré par un colorant vert le green.

On additionne aussi au gel le BET, réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice. Cette molécule naturellement non fluorescente présente une fluorescence orange lorsqu'elle est intercalée entre les bases nucléiques et après excitation aux longueurs d'ondes ultraviolettes.

Après migration, on place le gel au-dessus d'un éclairage ultraviolet qui servira à exciter les molécules de BET fixées aux molécules d'ADN, lesquelles vont émettre une lumière rougeâtre visible et photographiable, permettant de visualiser la position des fragments d'ADN sur le gel.

Préparation du gel d'agarose pour la migration

Le contrôle a été réalisé par électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose à 1,5% pour les produits de la PCR et un gel de 3% pour les produits de la digestion par les enzymes de restriction, colorés par le BET.

Pour préparer le gel d'agarose dans la cuve à 1,5% : On ajoute 0,9 g d'agarose à 60 ml de tampon TAE 1 X (Tris- Acétate-EDTA). Le mélange est porté à ébullition. Après refroidissement, on additionne le BET (0,5 µg/ml). Après refroidissement, le gel polymérisé est recouvert de TAE 1X.

On dépose 5 µl des échantillons et le marqueur de taille, les témoins positifs et le témoin négatif avec une goutte de bleu de bromophénol de 1µl pour chaque échantillon selon l'ordre de dépôt prédéfini. [412].

RESULTATS

La présentation de nos résultats se fera en premier lieu selon les données épidémiologiques des cas reçus de la leishmaniose (cutanée et viscérale) avec les résultats des techniques de diagnostic parasitologique et immunologique obtenus, ensuite une description des échantillons utilisés dans l'étude moléculaire et à la fin, les résultats de l'identification des espèces en cause.

Ces résultats seront présentés du point de vue épidémiologique, clinique et biologique.

Afin de faciliter la compréhension des résultats, nous avons représenté nos résultats sous forme de tableaux suivis par des graphes explicatifs.

I. Résultats et interprétations du diagnostic biologique des leishmanioses

1. L'examen direct

L'observation des formes amastigotes après coloration au MGG se réalise avec un grossissement x100 (Photo 7-(A)). Toutefois, si le prélèvement est très riche en amastigotes, ils peuvent être visualisés avec le grossissement x40 (Photo 7-(B)).

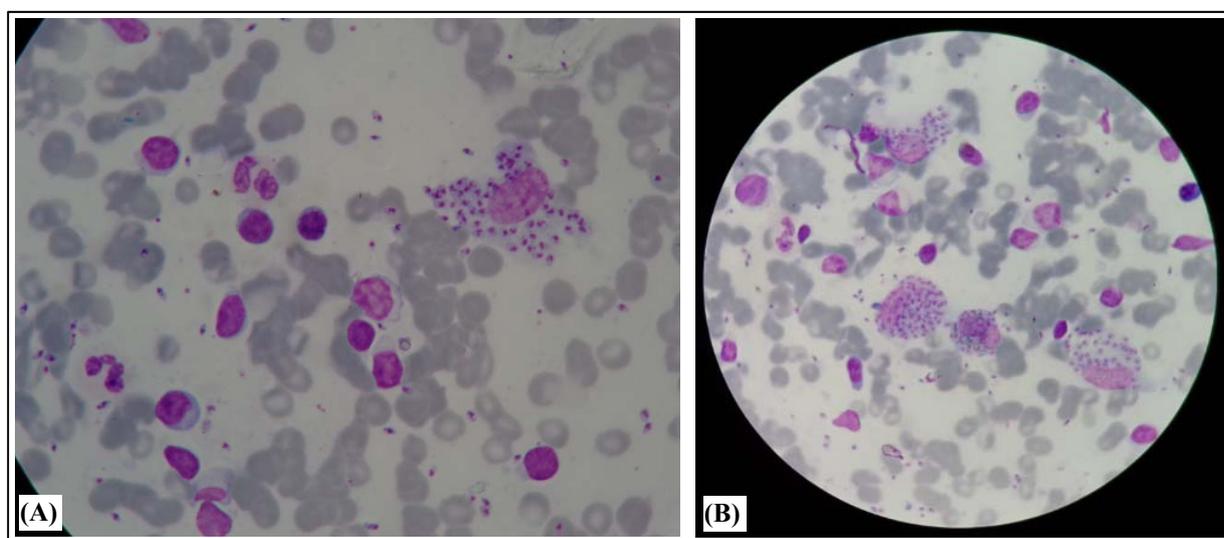


Photo 7. Formes amastigotes observées au microscope optique après coloration au MGG.

(A) Grossissement : x100; (B) Grossissement : x40.

La coloration montre un élément arrondi avec un cytoplasme violacé, un volumineux noyau violet, un kinétoplaste et absence du flagelle.

Le corps de *Leishmania* est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve dans les macrophages. Ce sont de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2 à 6 μm de diamètre, immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentent en microscopie

optique après coloration panoptique de routine (MGG) deux inclusions pourpres juxtaposées caractéristiques: le noyau, arrondi, et le kinétoplaste en bâtonnet plus sombre à la base de la poche flagellaire.

Cette technique permet la mise en évidence du parasite. Elle est facile à réaliser (ne nécessite qu'une simple coloration) mais l'interprétation du résultat dépend du lecteur de la lame. La durée de la lecture des lames de chaque patient peut varier entre quelques minutes si la PMO est riche de parasites jusqu'à une semaine pour prononcer un résultat négatif ou si la PMO est pauvre en parasites.

2. Culture cellulaire des leishmanies

Elle est peu utilisée dans le diagnostic (laborieuse, couteuse et le grand risque de contamination) mais c'est la technique de base dans la recherche scientifique.

Toutefois, il y a une nécessité d'une autre technique de diagnostic dans le cas d'une suspicion de leishmaniose cutanée avec l'examen direct :

- Pour confirmer le résultat de l'examen direct dépendant du lecteur qui doit être expérimenté.
- L'utilisation de la sérologie n'est pas fiable pour la LC.
- Le laboratoire dans les zones d'endémie n'est pas équipé pour une identification moléculaire.

L'un des intérêts de ce modèle biologique est que le manipulateur peut mimer le cycle biologique des *Leishmania* au laboratoire.

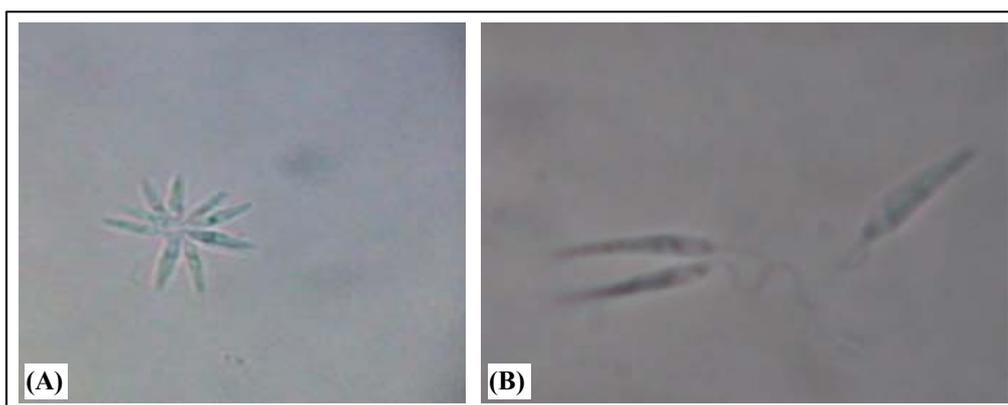


Photo 8. Formes promastigotes observées à l'état frais au microscope optique (X 40).

(A) Promastigotes en forme de rosasses; (B) Promastigotes libres

L'observation à l'état frais montre un élément avec un cytoplasme transparent, un volumineux noyau gris, un kinétoplaste et un flagelle propre. Cette observation nous permet de visualiser le mouvement du parasite et la formation des rosasses (Photo 8).

La culture cellulaire des leishmanies peut être poursuivie afin d'obtenir un nombre assez élevé du parasite, on parle ainsi de la culture en masse des leishmanies (Photo 9). Cela s'effectue dans des flasks contenant le milieu de culture cellulaire composé essentiellement de RPMI 1640 (Tableau 12). L'observation du parasite s'effectue par microscope inversé (Grossissement x40) (Photo 9).

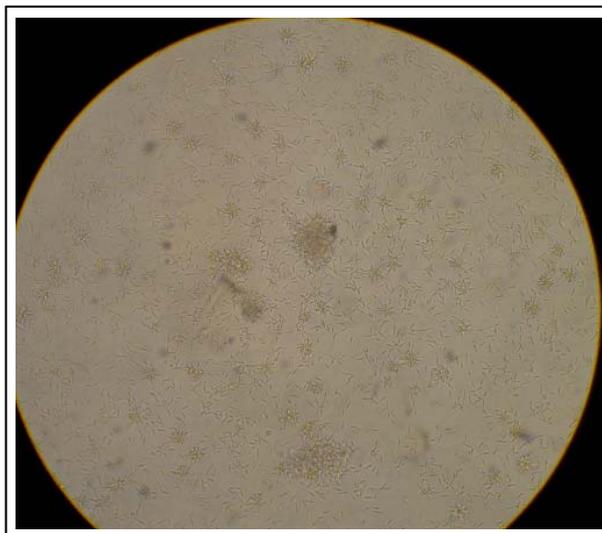


Photo 9. Culture en masse d'une souche de *Leishmania sp.* (X 40).

3. L'immunofluorescence indirecte

Il y a différents seuil de positivité. Pour la technique appliquée dans notre laboratoire, elle est de 1/80. Un résultat positif se traduit par l'observation de promastigotes fluorescents comme montre la photo 10 :

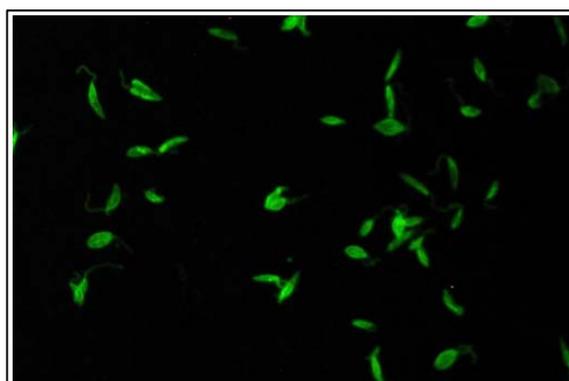


Photo 10. Observation de corps de *Leishmania sp.* fluorescents par IFI.

Une fluorescence limitée au noyau correspond soit à une réaction croisée soit à un porteur asymptomatique.

Lorsque la réaction est négative, la leishmanie est rouge.

4. L'ELISA

L'ELISA est une réaction colorimétrique (Photo 11) : L'ajout du substrat (TMB) donne une coloration bleue qui vire directement au jaune après l'ajout de la solution d'arrêt.

Les résultats peuvent être observés à l'œil nu avant la validation des résultats par lecture de la DO. La lecture se fait à l'œil nu, après dilutions successives, le titre étant l'inverse de la plus forte dilution ayant donné un résultat encore positif, soit au spectrophotomètre (absorbance à 450 nm), par la mesure d'une densité optique sur une seule dilution [96,343].

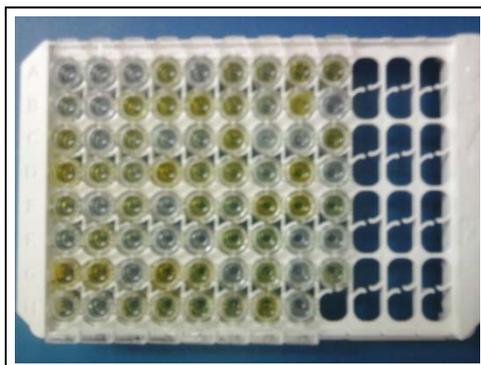


Photo 11. Plaque d'ELISA.

5. IT *Leish* test

L'IT *Leish*[®] est un test rapide et facile à réaliser. Un résultat positif est représenté par la photo 12.



Photo 12. Plaque de l'IT-*Leish*[®] test.

II. La leishmaniose cutanée

Cette étude concerne les patients suspects de leishmaniose cutanée et orientés par un dermatologue ou un généraliste au laboratoire de parasitologie/Mycologie, Hôpital « Ibn Sina » CHU Annaba pour la confirmation du diagnostic clinique.

Les résultats ont été organisés selon les données épidémiologiques, la clinique des patients, enfin la technique parasitologique et/ou immunologique utilisée pour confirmer le diagnostic de la LC.

1. Données épidémiologiques des patients

La période d'étude s'étend sur 3 ans : de Janvier 2011 jusqu'à Décembre 2013. Nous avons reçu 282 patients suspects d'avoir une leishmaniose cutanée au laboratoire. Le diagnostic a été confirmé pour 85 patients soit un pourcentage total de 30,14% (Tableau 24).

Tableau 24. Représentation des prélèvements cutanés positifs en fonction du résultat obtenu.

Patients	Effectif	%
Atteints (LC positive)	85	30,14
Indemnes (LC négative)	197	69,86
Total	282	100

Ces résultats globaux ont été répartis en fonction de l'année et représentés dans le tableau suivant :

Tableau 25. Représentation des prélèvements cutanés étudiés selon l'année.

Patients	Année			Total	%
	2011	2012	2013		
Atteints (LC positive)	19	27	39	85	30,14
Indemnes (LC négative)	78	71	48	197	69,86
Total	97	98	87	282	100
%	34,40	34,75	30,85	100	

Durant les trois années, on note que le nombre de patients susceptibles d'avoir une LC est presque identique. Cependant, le nombre des cas confirmés positifs était croissant.

Nous avons aussi réparti les prélèvements positifs par mois (Tableau 26) et par saison (Tableau 27).

Tableau 26. Représentation générale des prélèvements cutanés positifs durant la période d'étude (mois).

Mois	Effectif	%
Janvier	14	16,47
Février	2	2,35
Mars	15	17,65
Avril	12	14,12
Mai	2	2,35
Juin	6	7,06
Juillet	5	5,88
Aout	5	5,88
Septembre	2	2,35
Octobre	3	3,53
Novembre	17	20,00
Décembre	2	2,35
Total	85	100

On remarque que les prélèvements positifs sont enregistrés durant toute l'année. Le nombre maximum des cas était enregistré durant le mois de Novembre (20,00%).

Concernant la saison, les cas de la LC sont plus dominants en Hiver avec 31 cas (36,47%) et sont moins abondants en Eté avec 12 cas uniquement (14,12%) (Tableau 27).

Tableau 27. Représentation générale des prélèvements cutanés durant la période d'étude (saisons).

Saison	Effectif	%
Hiver	31	36,47
Printemps	20	23,53
Eté	12	14,12
Automne	22	25,88
Total	85	100

Afin de voir les tranches d'âges à risque, nous avons divisé nos patients positifs en tranches d'âges (Tableau 28).

Tableau 28. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon l'âge.

Tranche d'âge/ans	Effectif	%
[0,5[9	10,59
[5,10[10	11,76
[10,15[6	7,06
[15,20[14	16,47
[20,25[3	3,53
[25,30[9	10,59
[30,35[9	10,59
[35,40[5	5,88
[40,45[4	4,71
[45,50[4	4,71
[50,55[5	5,88
[55,60[2	2,35
[60,65[4	4,71
[65,70[0	0,00
=70	1	1,18
Total	85	100

On remarque que toutes les tranches d'âge sont touchées (entre 0 et 70 ans). Les tranches d'âge allant de 15 à 20 ans sont les plus touchées avec un pourcentage de 16,47%.

En raison de voir le sexe le plus susceptible d'avoir une LC, nous avons classé nos patients positifs selon leurs sexe (Tableau 29).

Tableau 29. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon le sexe.

Sexe	Effectif	%
Masculin	47	55,29
Féminin	38	44,71
Total	85	100

Le sexe masculin est le plus touché par la maladie que le sexe féminin avec un pourcentage de 55,29%. Le sexe ratio est égal à 1,24.

Le lieu de contamination est un caractère très important dans les études épidémiologiques. Il permet surtout de détecter des nouveaux foyers et étudier la situation actuelle des foyers connus. Les cas positifs proviennent de 14 wilayas avec 2 cas qui ont été contaminés hors l'Algérie (Tableau 30).

Nos patients ont été contaminés dans leur wilaya d'origine. Cependant, deux cas résidents à Annaba ont déclaré qu'ils ont été contaminés hors l'Algérie, l'une à Tunis (Tunisie) et l'autre à Aleb (Syrie).

Les cas positifs proviennent principalement de la wilaya d'Annaba avec 25 cas (29,41%) suivi de Souk Ahras et Guelma avec un pourcentage de 18,82% et 17,65% respectivement.

Tableau 30. Répartition des prélèvements cutanés positifs selon le lieu de contamination.

Wilaya	Année			Total	%
	2011	2012	2013		
Annaba	13	7	5	25	29,41
Guelma	1	2	12	15	17,65
Souk Ahras	1	6	9	16	18,82
Skikda	0	2	0	2	2,35
Biskra	0	1	7	8	9,41
El oued	0	1	0	1	1,18
Tebessa	0	2	0	2	2,35
Constantine	1	1	0	2	2,35
Taref	1	0	3	4	4,71
Khenchela	0	3	0	3	3,53
Oum El Bouaghi	0	1	0	1	1,18
M'Sila	1	0	0	1	1,18
Laghouat	1	1	0	2	2,35
Ouergla	0	0	1	1	1,18
Tunisie (Tunis)	0	0	1	1	1,18
Syrie (Aleb)	0	0	1	1	1,18
Total	19	27	39	85	100

2. Clinique des patients

Cette section est réservée à quelques signes cliniques habituels observés lors de l'infection avec une LC (Photo 13).

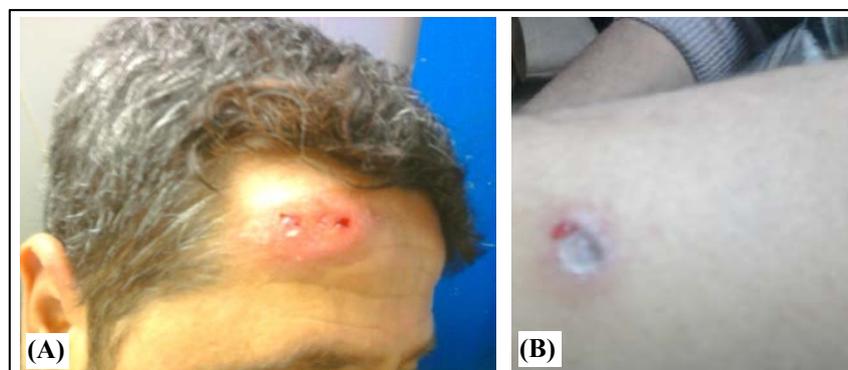


Photo 13. Lésions cutanées dues au parasite *Leishmania sp.*

(A) Lésion cutanée au niveau du front, (B) Lésion cutanée au niveau du bras gauche.

Au début, nous avons classé nos patients avec le nombre de lésions observées chez chaque patient (Tableau 31).

Tableau 31. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon le nombre de lésions.

Nombre de lésions	Effectif	%
1	71	83,53
2	3	3,53
3	5	5,88
4	2	2,35
5	1	1,18
6	2	2,35
>17	1	1,18
Total	85	100

Le nombre des patients avec une seule lésion est prédominant avec un effectif de 71 cas, soit 83,53%. Le reste des patients présentent des lésions multiples allant jusqu'à 17 lésions.

Les lésions sont localisées soit au visage, aux membres supérieurs ou membres inférieurs. Il faut noter que les patients avec plus d'une lésion ont la possibilité d'avoir différentes localisations de lésions sur leurs corps (Tableau 32).

Tableau 32. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la localisation de la lésion.

Localisation	Effectif	%
Visage/cou	39	45,88
Membres supérieurs (bras, mains et coudes)	17	20,00
Membres inférieurs (pieds et jambes)	12	14,12
Visage + Membres supérieurs	4	4,71
Membres: supérieurs + inférieurs	11	12,94
Autres localisations	2	2,35
Total	85	100

Le nombre prédominant des cas a des lésions au niveau du visage/cou avec 39 cas (45,88%) suivi par ceux qui présentent des lésions aux membres supérieurs soit 17 cas (20,00%).

Tenant compte de la nature de la lésion, elle peut être croûteuse, sèche, nodulaire,... (Tableau 33).

Tableau 33. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la nature de la lésion.

Nature de lésions	Effectif	%
Croûteuse	23	27,06
Sèche Squameuse	13	15,29
Nodulaire	12	14,12
Infectée	10	11,76
Ulcérée	10	11,76
Ulcérée/ Croûteuse	10	11,76
Inflammatoire	6	7,06
Creuse	1	1,18
Total	85	100

L'aspect clinique des lésions est très variable. Les lésions croûteuses sont les plus rencontrées avec un pourcentage de 27,06% suivi des lésions squameuses (15,29%) puis les lésions nodulaires (14,12%).

Dix lésions (11,76%) ont été très infectées ce qui ne permet pas la mise en évidence du parasite *via* culture cellulaire.

Chaque lésion diffère par la durée d'évolution qui peut être courte de moins d'un mois, comme elle peut être très longue (voir plus de 3 ans) (Tableau 34).

Le nombre prédominant est celui des patients avec une année d'évolution avant toute demande de diagnostic avec 15 cas (17,65%).

Selon la notion de la présence de piqûre par le phlébotome, les patients sont classés en 3 groupes (Tableau 35).

Selon ces résultats, seulement 34 patients (40,00%) ont mentionnés qu'ils se rappellent d'avoir été piqué par un insecte à l'emplacement de la lésion.

Tableau 34. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon l'évolution de la lésion.

Durée d'évolution	Effectif	%
>1 mois	2	2,35
1 mois	4	4,71
1,5 mois	2	2,35
2 mois	11	12,94
3 mois	7	8,24
4 mois	10	11,76
5 mois	2	2,35
6 mois	11	12,94
7 mois	8	9,41
8 mois	3	3,53
9 mois	1	1,18
10 mois	2	2,35
11 mois	0	0,00
12 mois	15	17,65
1,5 ans	4	4,71
2 ans	1	1,18
3 ans	2	2,35
Total	85	100

Tableau 35. Représentation des prélèvements cutanés positifs selon la notion de présence de piqûre.

Présence de piqûre	Effectif	%
Oui	34	40,00
Non	26	30,59
Inconnu	25	29,41
Total	85	100

3. Diagnostic biologique

Parmi le total des patients reçus et qui sont susceptibles d'avoir une LC et selon la disponibilité du milieu de culture, nous avons effectué sur 75 d'eux deux techniques de diagnostic parasitologique : l'examen direct et la culture cellulaire des parasites *Leishmania*. Les deux techniques combinées ensemble ont permis le diagnostic de la LC chez 57 patients, voir 76% (Tableau 36).

Tableau 36. Représentation des résultats obtenus lors du diagnostic de la leishmaniose cutanée.

Patients	Effectif	%
Atteints (LC positive)	57	76
Indemnes (LC négative)	18	24
Total	75	100

Chaque une des deux techniques a permis seule de détecter la LC chez 44 patients soit 58,67% (Tableau 37) malgré le pourcentage des cultures contaminées (25,33%).

Tableau 37. Les résultats obtenus selon la technique de diagnostic (Examen direct et culture parasitaire).

Résultat	Examen direct			Culture (NNN)			
	Positif	Négatif	Total	Positive	Négative	Contaminée	Total
Effectif	44	31	75	44	12	19	75
%	58,67	41,33	100	58,67	16	25,33	100

Les deux techniques ont donné le même pourcentage de positivité, alors que certains cas (26 cas voir 34,66%) n'ont pu être diagnostiqués que par l'une des deux comme le montre le tableau comparatif ci-après (Tableau 38).

Tableau 38. Comparaison des résultats obtenus selon la technique utilisée (Examen direct *versus* culture).

Résultat	Examen direct	
	Positif	Négatif
Culture (NNN)	Positive	31/75
	%	41,33
	Négative / Contaminée	13/75
	%	17,33

III. La leishmaniose viscérale

Cette étude concerne les patients suspects d'avoir une leishmaniose viscérale dont les prélèvements sont envoyés au laboratoire de parasitologie/Mycologie, Hôpital « Ibn Sina » CHU d'Annaba pour la confirmation du diagnostic clinique.

Les résultats ont été organisés selon les données épidémiologiques, cliniques des patients et enfin les techniques utilisées pour confirmer le diagnostic de la LV.

1. Données épidémiologiques des patients

La période d'étude est de 3 ans allant de Janvier 2011 à Décembre 2013. Nous avons reçu les prélèvements de 369 patients suspects d'avoir une LV au laboratoire. Le diagnostic a été confirmé pour 35 patients soit un pourcentage total de 9,49% des patients reçus.

Les résultats globaux ont été représentés dans le tableau suivant :

Tableau 39. Les résultats globaux des cas de LV diagnostiqués.

Patients	Effectif	%
Atteints (LV positive)	35	9,49
Indemnes (LV négative)	334	90,51
Total	369	100

Les patients reçus sont divisés selon leurs status immunitaire en deux catégories : les immunodéprimés (due à la co-infection au VIH) et les immunocompétents (Tableau 40).

Tableau 40. Nature des cas de LV diagnostiqués.

Patients	LV infantile	Co-infection VIH-LV	Total	%
Atteints (LV positive)	30	5	35	9,49
Indemnes (LV négative)	275	59	334	90,51
Total	305	64	369	100

La LV infantile est prédominante avec l'enregistrement de 30 cas. Malgré les rares cas signalés de la co-infection VIH/LV en Algérie, nous avons pu enregistrer 5 cas.

Il faut noter que tous les cas de la LV infantile sont considérés comme des patients immunocompétents et tous les cas de la co-infection VIH/LV est une LV de l'adulte à l'exception d'un seul cas qui représente une LV infantile avec une co-infection au VIH.

Concernant la LVI, nous avons enregistré une augmentation du nombre de patients atteints durant l'année 2013 avec 14 cas avec l'augmentation du nombre des cas suspectés (Tableau 41).

Tableau 41. Les résultats globaux des cas de LV infantile diagnostiqués.

Patients	Année			Total	%
	2011	2012	2013		
Atteints (LV positive)	9	7	14	30	9,84
Indemnes (LV négative)	82	68	125	275	90,16
Total	91	75	139	305	100

Quand à la co-infection LV/VIH, elle a été enregistrée uniquement en 2012 avec 5 cas (7,81%) (Tableau 42).

Tableau 42. Les résultats globaux des cas de co-infection LV-VIH diagnostiqués.

Patients	Année			Total	%
	2011	2012	2013		
Atteints (LV positive)	0	5	0	5	7,81
Indemnes (LV négative)	19	20	20	59	92,19
Total	19	25	20	64	100%

La LVI a été enregistrée presque durant l'année mais avec une augmentation du nombre des cas durant le mois de Juin (20,00%) et Février (17,14%) pour la LV infantile et durant le mois d'Avril (11,43%) pour la co-infection VIH/LV (Tableau 43).

Tableau 43. Représentation générale des prélèvements de LV durant la période d'étude (mois).

LV	Mois	Effectif	%
LV infantile	Janvier	0	0
	Février	6	17,14
	Mars	3	8,57
	Avril	2	5,71
	Mai	3	8,57
	Juin	7	20
	Juillet	1	2,86
	Aout	2	5,71
	Septembre	2	5,71
	Octobre	0	0
	Novembre	3	8,57
	Décembre	1	2,86
Co-infection VIH-LV	Février	1	2.86
	Avril	4	11.43
Total		35	100

Selon la saison, le Printemps est la saison où il y a un pic de cas de LV : la LVI avec 34,28% et la co-infection VIH-LV avec 11.43% (Tableau 44).

Concernant les tranches d'âges touchés par la LVI, c'est les nourissons entre [2,3[ans avec un pourcentage de 31,43%.

Les patients co-infectés VIH/VL sont des adultes avec l'âge qui varie entre [25,32[ans à l'exception d'un seul cas qui est un enfant avec 6 ans d'âge (Tableau 45).

Tableau 44. Représentation générale des prélèvements de LV durant la période d'étude (saisons).

LV	Saison	Effectif	%
LV infantile	Hiver	9	25,71
	Printemps	12	34,28
	Eté	5	14,29
	Automne	4	11,43
Co-infection LV VIH-	Hiver	1	2,86
	Printemps	4	11,43
Total		35	100

Tableau 45. Répartition des prélèvements de LV positifs selon l'âge.

	Tranche d'âge/ans	Effectif	%
LV infantile	[0,1[1	2,86
	[1,2[9	25,71
	[2,3[11	31,43
	[3,4[7	20,00
	[4,5[1	2,86
	[5,6[0	0,00
	[6,7[1	2,86
Co-infection VIH-LV	=6	1	2,86
	[25,30[2	5,71
	[30,32[2	5,71
Total		35	100

Selon le sexe, la LV infantile touche plus le sexe Féminin avec un pourcentage de 51,43% (Tableau 46). Le sexe ratio est de 0,67.

Tableau 46. Répartition des prélèvements de LV selon le sexe.

Sexe	Effectif	%
Masculin	12	34,29
Féminin	18	51,43
Inconnu (patients VIH+)	5	14,29
Total	35	100

La répartition des cas en fonction du lieu de contamination est représentée dans le tableau ci-après.

Tableau 47. Répartition des prélèvements de LV positifs selon le lieu de contamination.

Wilaya	Effectif	%
Annaba	2	5,71
Guelma	4	11,43
Souk Ahras	10	28,57
Tébessa	7	20,00
Biskra	1	2,86
Inconnu	11	31,43
Total	35	100

La plupart des patients infectés par la LV sont d'origine de Souk Ahras avec 28,57% des cas suivi de Tébessa avec 20,00% des cas (Tableau 47).

2. Clinique des patients

Les signes cliniques sont typiques dans le cas de la LV infantile (Photo 14).



Photo 14. Forme clinique de la leishmaniose viscérale.

Les signes cliniques majeurs durant une LV infantile pour nos patients sont par ordre décroissant : la splénomégalie (73,33%), la fièvre (56,67%), l'hépatomégalie (50,00%) et la pâleur cutanéomuqueuse (23,33%), respectivement (Tableau 48).

Tableau 48. Représentation des cas de la LVI selon les signes cliniques.

Clinique	Fièvre		SPM		HPM		PCM	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Effectif	17	13	22	8	15	15	7	23
%	56,67	43,33	73,33	26,67	50,00	50,00	23,33	76,67

SPM = Splénomégalie; HPM = Hépatomégalie; PCM = Pâleur cutanéomuqueuse.

L'hémogramme a pu nous renseigner que nos patients présentent : une pancytopenie (46,67%), anémie (26,67%), bicytopenie (20,00%) ou thrombopénie (6,67%) respectivement (Tableau 49). Danc, aucun FNS de l'ensemble de nos patients n'est normal.

Tableau 49. Représentation des cas de la LVI selon l'hémogramme.

FNS	Anémie	Bicytopénie	Thrombopénie	Pancytopénie
Effectif	8	6	2	14
%	26,67	20,00	6,67	46,67

FNS = Formule Numération Sanguine.

3. Diagnostic biologique

Le diagnostic de la LV a été posé soit par l'examen microscopique d'une PMO et/ou une sérologie leishmanienne. Parmi nos 369 patients, 325 ont subi une PMO à la recherche du corps de *Leishmania*, et 306 ont bénéficié d'une sérologie par IFI, ELISA ou IT *Leish* test.

Le tableau 50 montre le nombre de cas diagnostiqués de la LV par chaque technique séparément.

Tableau 50. Distribution des cas de la LV selon la technique de diagnostic utilisée.

Technique utilisée	LVI	Co-infection VIH/LV	Total	%
Examen direct	26	1	27	77,14
IFI	21	4	25	71,43
ELISA	2	0	2	5,71
IT <i>Leish</i> test (rK39)	2	0	2	5,71
Total	30	5	35	100

L'examen direct a permis de poser le diagnostic pour 27 patients (77,14%), alors que l'IFI a pu diagnostiquer 25 patients (71,43%). On note que la plupart des cas de la co-infection VIH/LV ont été diagnostiqués par l'IFI.

Le seuil d'anticorps en IFI (de 1/40^{ème} jusqu'à 1/320^{ème}) varie du seuil de positivité de la technique (1/80^{ème}) (Tableau 51).

Tableau 51. Représentation des résultats obtenus par IFI des cas de la LV positifs.

IFI (seuil)	LVI	%	Co-infection VIH/LV	%
Negative*	3	10	0	0
Negative* (1/40)	4	13,33	1	3,33
Positive (1/80)	10	33,33	4	13,33
Positive (1/160)	2	6,67	0	0
Positive (1/320)	6	20	0	0
Total	25	83,33	5	16,67

* Des sérologies négatives par IFI qui viennent de patients avec une LVI confirmée avec d'autres techniques. (Examen direct, ELISA ou IT *Leish* test).

La technique de l'IFI était la méthode immunologique la plus exploitée. Toutefois, elle n'a pas pu détecter la présence de l'Ag anti *Leishmania* chez 8 patients soit 26,66% des cas.

Enfin, la comparaison des résultats de l'examen direct de la PMO avec la sérologie appliqués tous les deux sur une série de 25 patients atteints de la LV a permis de trouver 9 cas (voir 36,00%) qui n'ont pu être diagnostiqués que par l'une des deux techniques (Tableau 52). Ceci souligne l'intérêt de l'application de ces deux techniques à la fois pour un diagnostic correct de la LV.

Tableau 52. Comparaison de l'examen direct avec la sérologie.

Resultats		Examen direct	
		Positif	Négatif
Sérologie	Positif	16	4
	(%)	64%	16%
	Négatif	5	0
	(%)	20%	0%

IV. Identification des espèces *Leishmania*

Notre étude a été focalisée sur l'identification et la caractérisation des espèces *Leishmania* chez des patients atteints de la leishmaniose et qui sont de différentes origines géographiques de l'Algérie (Nord-Est Algérien surtout). Cette identification a été réalisée au moyen de techniques moléculaires incluant la PCR et la digestion du produit amplifié (PCR-RFLP). La première partie a concerné l'amplification et la digestion de la séquence inter-génique non codante ITS1 des gènes ARNr (voir : chapitre II 8- arrangement des gènes), alors que la deuxième partie a l'amplification des gènes mini-exon (voir : chapitre II 8- arrangement des gènes) suivie par la digestion par des enzymes de restriction. Plusieurs réactions PCRs ont été réalisées et ont été suivies par une digestion enzymatique sur des parasites entretenus en culture *in vitro* et qui ont été typés comme appartenant au complexes : *L.major*, *L. tropica*, et *L. infantum* (voir : Tableau 7).

L'extraction de l'ADN parasitaire a été effectuée par la méthode puissante du phénol/chloroforme. Pour chaque prélèvement testé, la mesure moyenne a été calculée.

1. Evaluation de la qualité de l'ADN par la PCR PO

Avant toute PCR, une PCR PO est nécessaire. Elle a pour but de vérifier l'absence de tous inhibiteurs dans les ADNs extraits qui pourrait bloquer les PCR spécifiques des parasites

Leishmania. Elle permet d'amplifier l'ADN des mammifères [402,413]. Les produits amplifiés ont une taille de 470 pb.

Le résultat d'amplification est représenté par la photo 15. On note que le témoin négatif est exempt de toute amplification. D'autre part, le témoin positif (CO24) et les ADNs testés présentent une amplification à la taille attendue (470 pb). D'après le profil obtenu, on note l'absence de toute inhibition qui pourrait bloquer l'éventuelle amplification de l'ADN parasite.

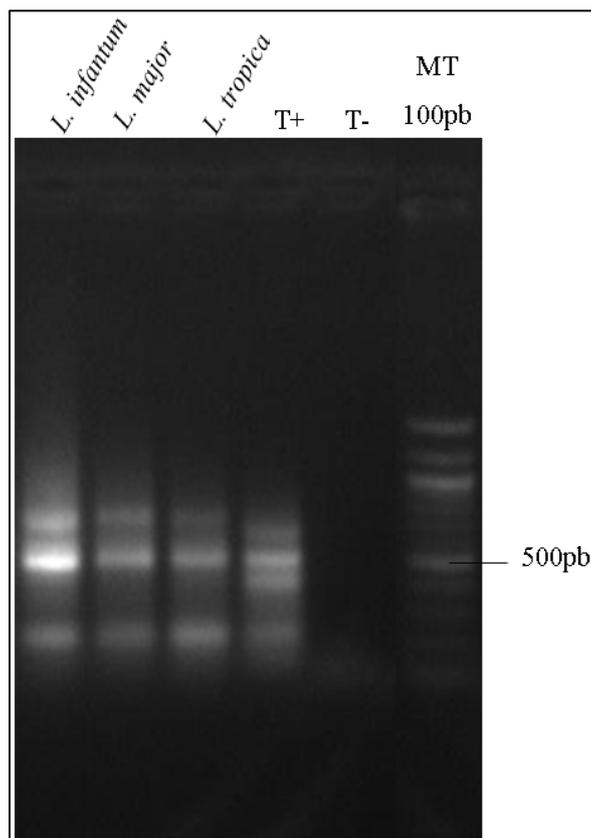


Photo 15. Profils des produits PCR PO chez les espèces de la leishmaniose de l'Ancien Monde.

L. tropica : Bag9; *L. major* : Ron 114; *L. infantum* : LV50; T+ : contrôle positif ADN humain (CO24); T- : témoin négatif.

2. Identification des espèces *Leishmania* par PCR-RFLP ciblant la région ITS1 des gènes ARNr

2.1. Validation de la PCR ITS1 pour détection des parasites *Leishmania* en culture

La région ITS1 qui sépare les deux gènes ssu ARNr et 5.8S ARNr varie selon l'espèce de *Leishmania* par la taille mais aussi la séquence nucléotidique [291]. Cette région une fois amplifiée par un couple d'amorces spécifique permet de révéler la présence du parasite

Leishmania dans un échantillon donné si le produit PCR obtenue possède une taille approximative entre 300-350 pb. Nous avons ainsi appliqué cette PCR sur des ADN extraits de promastigotes en culture des 3 espèces de *Leishmania* de l'Ancien Monde : *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*. Nous avons obtenu des bandes amplifiées correspondant à la taille attendu dont l'intensité est convenable. Chaque PCR effectuée a intégré un témoin négatif constitué par le mélange réactionnel exempt d'ADN afin de s'assurer de l'absence de toute contamination par un ADN étranger qui pourrait fausser les résultats. La qualité des produits amplifiés a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose et la taille de la bande amplifiée est d'environ 320 pb (Photo 16).

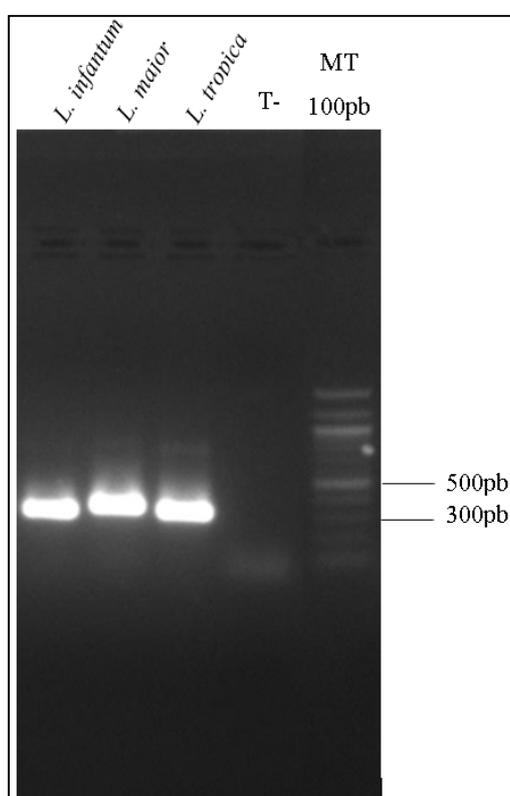


Photo 16. Profils des produits PCR ITS1 chez les espèces de la leishmaniose de l'Ancien Monde.

L. tropica : Bag9; *L. major* : L3171; *L. infantum* : D5; T-: témoin négatif.

2.2. Identification des espèces de leishmanies en culture par PCR-RFLP ITS1

Après avoir amplifié par PCR la région ITS1 de plusieurs isolats de *Leishmania sp.* de l'Ancien Monde, les produits amplifiés ont été digérés par l'enzyme de restriction *HaeIII*. Les produits de digestion ont été ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette étape de digestion enzymatique utilisant l'enzyme *HaeIII*. a été appliquée en premier lieu sur

les produits PCR ITS1 à partir de l'ADN extrait d'isolats de différentes espèces qui ont été entretenues en culture *in vitro*. Les résultats sont représentés dans la photo 17.

Des profils discriminatifs entre les espèces de leishmanies de l'Ancien Monde ont été trouvés.

En effet, un profil spécifique de l'espèce *L. major* composé de 2 fragments de tailles respectives 220 pb et 140 pb a été trouvé. Alors que le profil de l'espèce *L. tropica* a des tailles de 200 pb et 60 pb. Le profil de digestion de l'espèce *L. infantum* a été trouvé avec des tailles de 200 pb, 80 pb et 60 pb (Photo 17).

Il faut noter que cette PCR-RFLP ITS ne peut discriminer entre les espèces du complexe *L. donovani*.

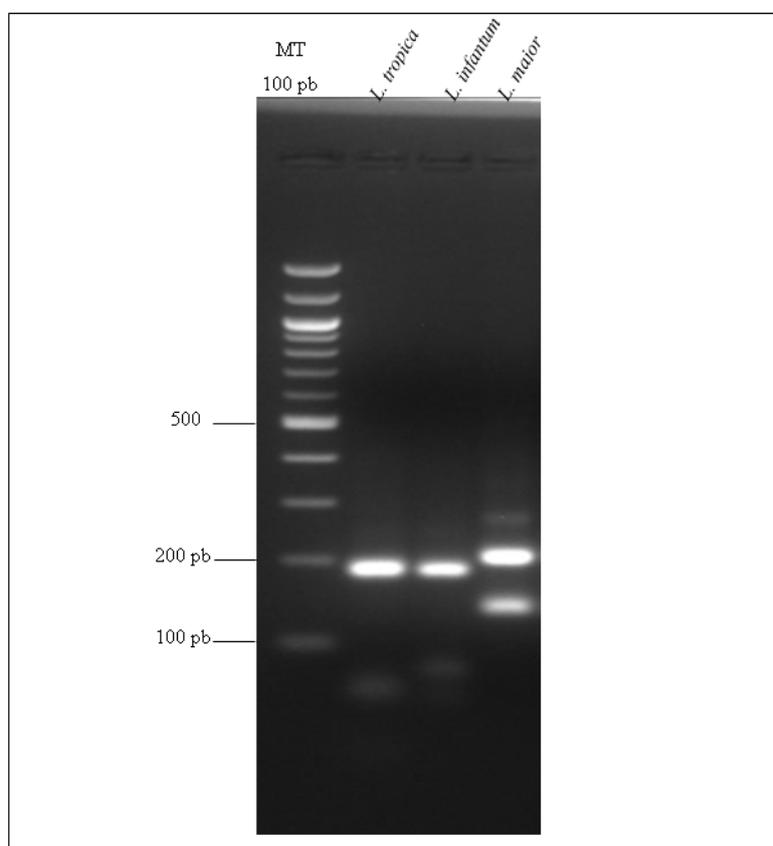


Photo 17. Profils de restriction des différentes espèces de leishmanies par PCR-RFLP ITS1.

L. infantum : D5; *L. tropica* : Rachnan; *L. major* : SDTBM.

3. Identification des espèces de *Leishmania* par PCR-RFLP du gène mini-exon.

Nous nous sommes intéressés dans cette partie du travail à l'exploitation des gènes mini-exon par PCR-RFLP afin de détecter le parasite *Leishmania* chez nos patients. Notre choix a

porté sur ces gènes en raison de leur forte répétitivité au sein du génome de *Leishmania*. La PCR ciblant les gènes mini-exon a été appliquée sur l'ADN de plusieurs échantillons représentatifs des espèces de l'Ancien Monde. L'ADN de lames archivées a été ensuite utilisé comme cible pour amplifier les gènes mini-exon et déterminer l'espèce du parasite *Leishmania* par PCR-RFLP.

3.1. Amplification d'isolats *Leishmania* de l'Ancien Monde par PCR mini-exon

En ciblant les gènes mini-exon par les amorces Fme et Rme, cette PCR devrait donner un produit de taille entre 400 pb et 450 pb [295].

Nous avons effectué une amplification des souches représentant différentes espèces de l'Ancien Monde. Le profil des produits amplifiés nous a permis d'observer les bandes attendues avec une différence de taille entre les différentes espèces. Pour l'espèce *L. infantum* nous avons obtenu une bande de taille 435 pb, pour *L. major* la taille de la bande amplifiée est de 427 pb, alors qu'elle est de 403 pb pour *L. tropica* (Photo 18). Par ailleurs, il faut noter ici que les différences de tailles notées pour les différents isolats, sont difficiles à observer sur gel d'agarose. Un gel polyacrylamide serait, en effet, plus approprié.

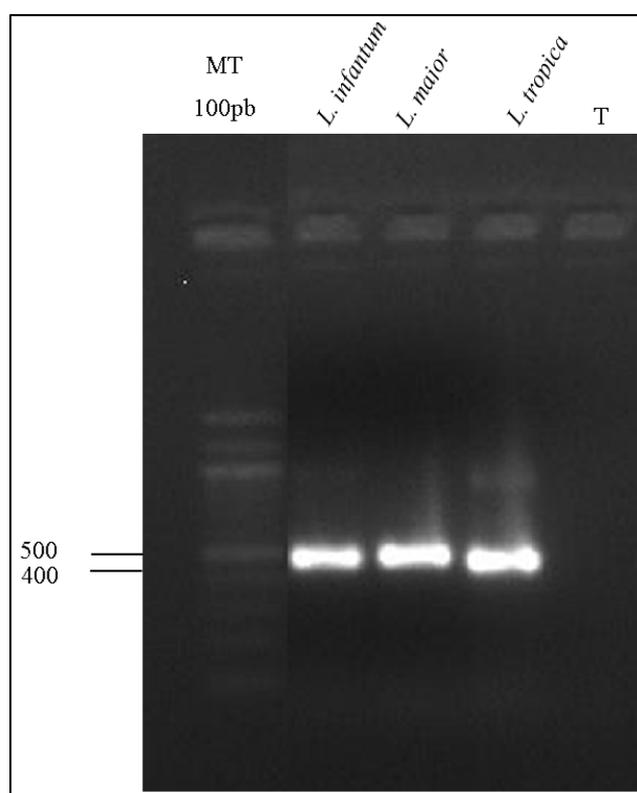


Photo 18. Résultat de l'amplification par PCR mini-exon de différents isolats de l'Ancien Monde.

M : marqueur de taille 100pb; *L. infantum* : LV50; *L. major* : IL24; *L. tropica* : LA28; T- : témoin négatif.

3.2. Identification des espèces *Leishmania* par la PCR-RFLP du gène mini-exon

Etant donné que les différences de tailles des produits PCR mini-exon constatées entre les complexes d'espèces *Leishmania* ne sont pas faciles à observer sur gel d'agarose et vu la difficulté et la lourdeur de manipulation des gels polyacrylamide, il est plus approprié de faire des digestions des produits PCR (PCR-RFLP) afin de pouvoir discriminer entre les espèces.

Ainsi, plusieurs enzymes de restriction ont été testés lors de travaux précédents et il a été montré que la digestion avec l'enzyme *EaeI* donne les profils les plus informatifs, qui permettent la discrimination à l'échelle spécifique de l'espèce *Leishmania* [295].

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestion montrent que *L. major* donne 5 bandes de tailles 125, 119, 92, 70 et 21 pb (Photo 19). Cependant, il est difficile de visualiser ces fragments sur la figure étant donné que leur taille est très petite. Ainsi, il serait préférable de faire migrer ces produits sur un gel polyacrylamide ou sur un gel d'agarose avec une concentration plus élevée, afin de mieux séparer les bandes.

Le fragment amplifié de *L. tropica* donne un profil à 3 bandes de tailles 403, 227 et 178 pb. Deux fragments de taille 330 et 108 pb en plus du fragment non coupé qui fait 435 pb sont obtenus pour *L. infantum* (Photo 19).

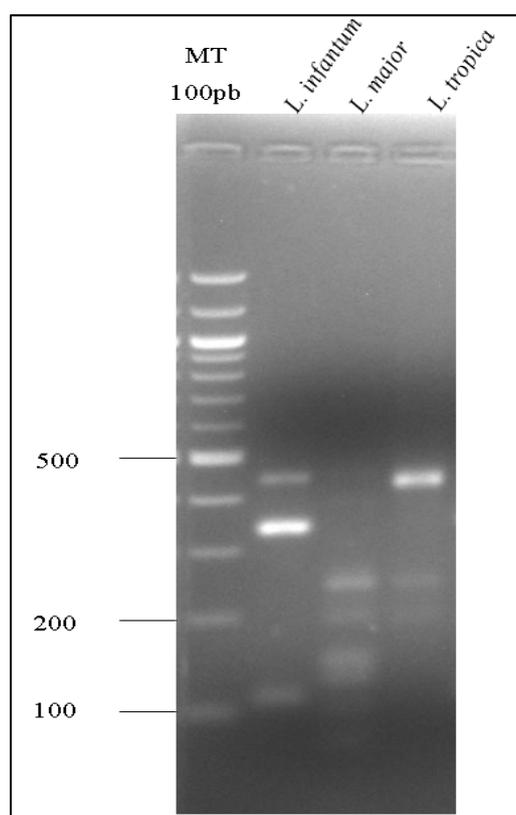


Photo 19. Profils de restriction des souches de culture par PCR-RFLP mini-exon.

M: marqueur de taille 100pb; *L. infantum* : LV50; *L. tropica* : Rachnan ; *L. major* : L3171.

4. Description des échantillons utilisés dans l'étude moléculaire

Afin d'atteindre les objectifs de ce travail, nous avons choisis d'effectuer l'étude moléculaire directement sur des lames archivées de LC et LV. Les lames représentent un outil puissant qui permet d'étudier non seulement des échantillons très anciens mais aussi elles ne nécessitent pas des conditions particulières de conservation ni de transport aux laboratoires spécialisés [33,414].

Pour réaliser une identification moléculaire de l'agent responsable de la leishmaniose dans notre région d'étude, 86 cas confirmés de la leishmaniose par examen direct de moelle osseuse (pour la LV) ou de sérosités cutanées (pour la LC) étalés sur lames et colorés au MGG ont été inclus dont : 66 cas de LC (76,74%) et 20 cas de LV (23,26%) (Tableau 53).

Tableau 53. Description des échantillons utilisés selon la nature du prélèvement.

Clinique	Effectif	%
LC	66	76,74
LV	20	23,26
Total	86	100

Comme nous avons déjà remarqué, le nombre des cas de LC est plus important de celui des LV. Cela est due au fait que la LC est plus fréquente que la LV dans le monde en générale et en Algérie en particulier [19].

Cette étude a été réalisée sur des échantillons reçus sur une période de 3 ans (Tableau 54). L'année 2013 représente l'année la plus exploitée avec un pourcentage de 40,70% suivi de l'année 2011 (31,40%). L'année 2012 compte le nombre le plus minime de cas avec un pourcentage total de 27,91%.

Tableau 54. Description des échantillons utilisés selon l'année du prélèvement.

Année	Clinique		Total	%
	LC	LV		
2011	19	8	27	31,40%
2012	18	6	24	27,91%
2013	29	6	35	40,70%
Total	66	20	86	100%

Il faut aussi noter que pour toutes les années, le nombre des cas de LC utilisés est toujours supérieur de celui de la LV.

Cette étude concerne les cas confirmés de leishmaniose dont leur origine géographique est le Nord-Est Algérien (Figure 17). Douze wilayas sont concernées : la moitié des cas sont de Souk Ahras et Annaba (28,68% et 27,94% respectivement) (Tableau 55).

Tableau 55. La distribution géographique des échantillons utilisés.

Origine géographique	Clinique			%
	LC	LV	Total	
Annaba	22	2	24	27,91
Guelma	12	4	16	18,60
Souk Ahras	14	8	22	25,58
Tebessa	2	5	7	8,14
Biskra	6	1	7	8,14
Constantine	1	0	1	1,16
El Taref	2	0	2	2,33
Khanchela	3	0	3	3,49
Laghouat	2	0	2	2,33
Skikda	1	0	1	1,16
M'sila	1	0	1	1,16
Total	66	20	86	100%

La richesse des lames en parasites (corps de *Leishmania sp.*) a été aussi investiguée (Tableau 56). Les lames les moins riches (lames +) sont les plus fréquentes (47,67%) et ainsi les plus utilisées dans cette étude.

Tableau 56. Description des échantillons utilisés selon la richesse de la lame en parasites.

Richesse en parasites	Clinique		Total	%
	LC	LV		
Lame +	28	13	41	47,67%
Lame ++	11	2	13	15,12%
Lame +++	27	5	32	37,21%
Total	66	20	86	100,00%

Lame +++: 1 parasite ou plus/1 à 10 champs; Lame ++: 1 à 10 parasites/10 à 100 champs; Lame +: 1 à 10 parasites/100 à 1000 champs.

5. Evaluation des PCRs et PCR RFLPs appliqués sur des lames archivés

5.1. Evaluation des ADNs extraits par la PCR PO

Nous avons procédé à l'application de la PCR PO sur tous les ADNs extraits des lames archivés avant toute PCR afin de s'assurer de l'absence de toute inhibition possible (Photo 20). Ainsi, cette PCR a été appliquée pour les échantillons d'ADN provenant de tous nos 86 patients (66 échantillons de la LC et 20 échantillons de la LV). La photo ci-après est un exemple du résultat obtenu : ici, 4 échantillons sont négatifs.

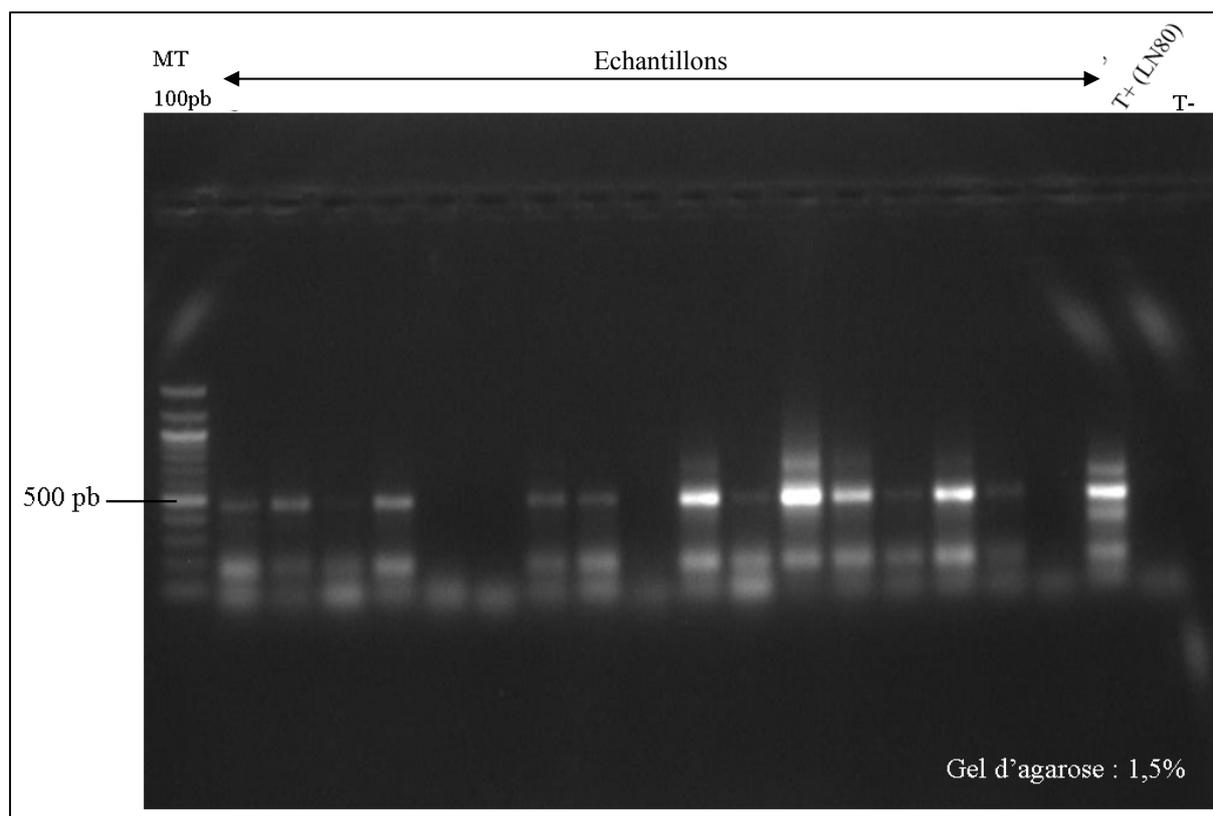


Photo 20. Résultats de la PCR PO sur de l'ADN de lames archivées.

MT : marqueur de taille (100 pb); T+ : contrôle positif ADN canin (LN80); T-: témoin négatif.

5.2. Evaluation de la PCR ITS1 sur des ADN parasites extraits de lames de patients

5.2.1. PCR ITS1

En fait, une amplification par PCR de la région ITS1 (Photo 21) a été réalisée pour 66 patients atteints de la LC et 20 patients atteints de la LV (Annexe VII). Les 86 patients recrutés au CHU d'Annaba ont été diagnostiqués par examen direct à la recherche de corps de *Leishmania sp.*

Ainsi, au moins une lame contenant les parasites étalés est disponible pour chaque patient. A partir de ces lames, l'ADN des parasites a été extrait par la méthode du Phénol/Chloroforme. Afin d'améliorer les signaux faibles et essayer d'avoir un signal positif pour les isolats qui n'ont pas pu être amplifié, une deuxième ou troisième amplification a été effectuée en utilisant comme cible l'ADN extrait à partir d'autres lames du même patient (en cas de disponibilité). Tous les échantillons avec de résultats négatifs ont été amplifiés par la 2^{ème} et éventuellement la 3^{ème} PCR.

Sur les 86 échantillons, 79 (91,86%) isolats ont donné un résultat positif, alors que les 7 (8,14%) autres n'ont pas donné un signal (résultat négatif) (Tableau 62). Cette difficulté

d'amplification est probablement due à la présence d'inhibiteurs qui ont persisté pendant les étapes d'extraction d'ADN ou tout simplement à l'état de l'ADN qui est dégradé.

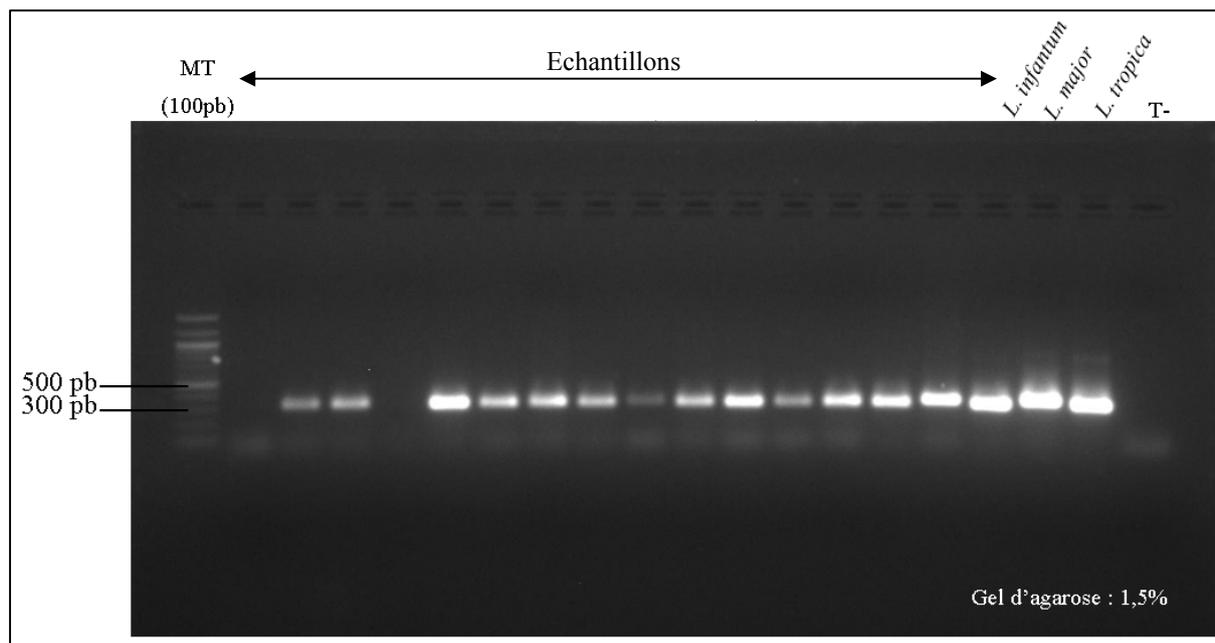


Photo 21. Résultats de la PCR ITS1 sur de l'ADN de lames archivées.

MT : marqueur de taille (100 pb), Souches de références : *L. infantum*: LV50, *L. major*: Ron114, *L. tropica* : Bag 9.

5.2.2. Identification des espèces de *Leishmania* à partir des patients par PCR-RFLP ITS1

Afin d'identifier l'espèce du parasite en question, les produits PCR ITS1 qui ont été trouvés positifs ont été digérés par l'enzyme de restriction *HaeIII*. Des échantillons représentant les souches de références de l'Ancien Monde ont été inclus afin de faciliter l'identification des espèces par comparaison du profil de digestion avec celles-ci.

L'électrophorèse des produits de digestion (Photo 22) a montré des profils de restrictions différents : 19 échantillons montrent un profil de restriction concordant avec celui de la souche de référence *L. major*, alors que 36 échantillons de LC et 12 échantillons de LV montrent un profil de restriction comme celui du complexe *L. donovani* identique avec le profil de l'espèce *L. infantum*. Uniquement 1 échantillon a présenté un profil identique à l'espèce *L. tropica*. Deux échantillons de LC se sont révélés faiblement positifs en PCR, c'est pourquoi nous avons eu des difficultés à visualiser leur profil de restriction ce qui nous donne un résultat non-interprétable.

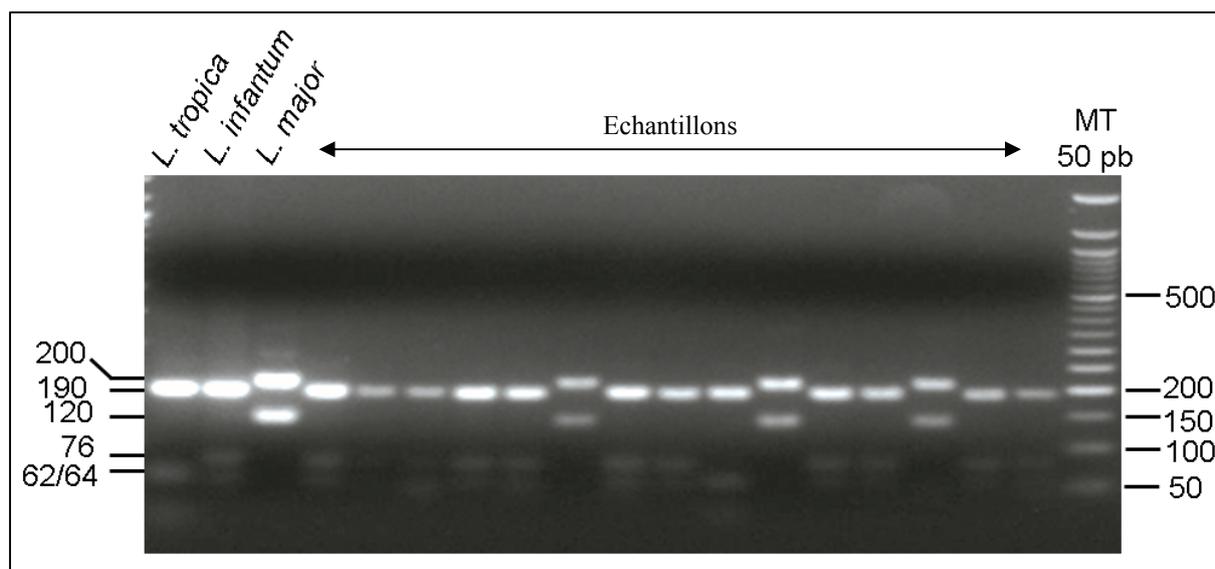


Photo 22. Résultat de la PCR-RFLP après la digestion avec l'enzyme de restriction *HaeIII*.

M : marqueur de taille 100pb; *L. infantum* : LV50; *L. major* : Ron114; *L. tropica* : Bag 9.

5.3. Evaluation de la PCR mini-exon sur les échantillons prélevés de patients

5.3.1. PCR mini-exon

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressées à la détection et l'identification du parasite *Leishmania* chez des patients atteints de la leishmaniose, par la PCR mini-exon. Pour ce faire, nous avons appliqué la PCR mini-exon (Photo 23) pour détecter la présence du parasite et ensuite en digérant le produit amplifié par l'enzyme de restriction *EaeI* pour déterminer avec précision l'espèce responsable.

Ainsi, les ADNs extrait de lames archivés précieuses correspondant à des patients atteints de leishmaniose ont été utilisés pour une amplification utilisant les amorces spécifiques du gène mini-exon. Dans le cas où aucune amplification n'est obtenue, une deuxième ou une troisième amplification utilisant un autre extrait d'ADN parasitaire provenant du même patient a été réalisée. Ceci a été fait dans le but d'augmenter les chances d'obtenir une amplification et contourner les problèmes d'inhibitions.

Sur les 86 échantillons prélevés de patients, 62 échantillons (72,09%) ont été trouvés positifs après amplification (Tableau 62).

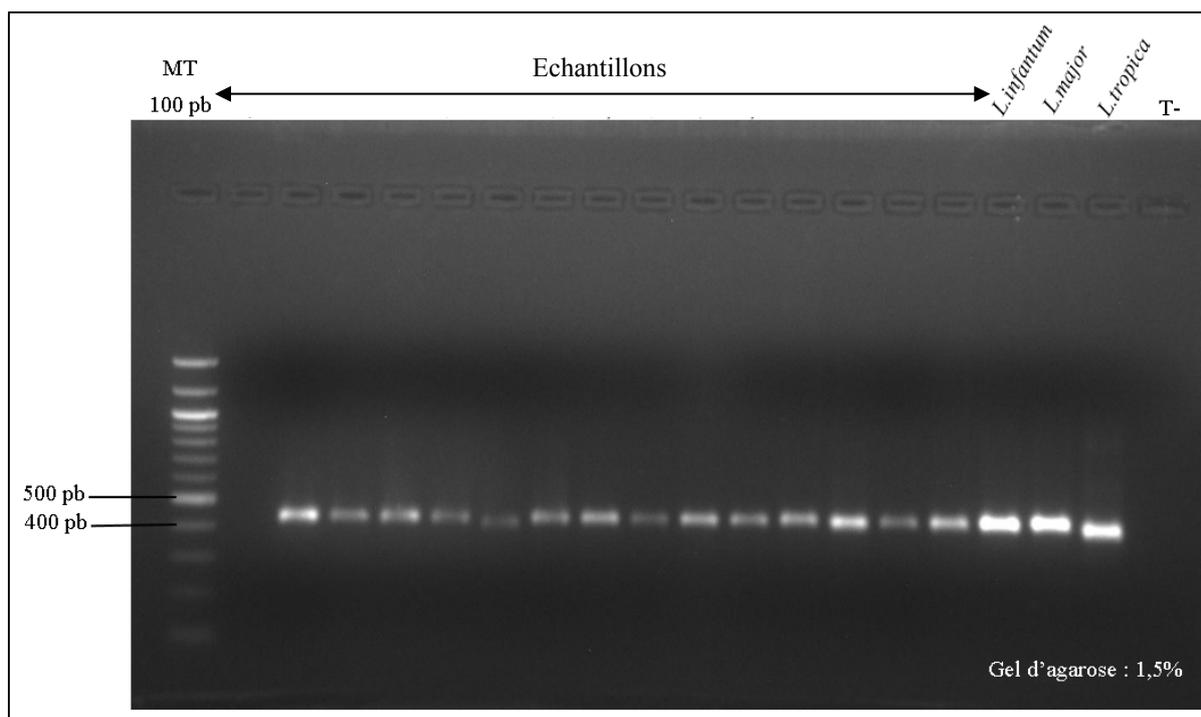


Photo 23. Résultats de la PCR mini-exon sur de l'ADN de lames archivées.

MT : marqueur de taille (100 pb), Souches de références : *L. infantum*: LV50, *L. major*: Ron114, *L. tropica* : Bag 9.

5.3.2. Identification des espèces *Leishmania* prélevés des patients par PCR-RFLP mini-exon

Pour pouvoir identifier les espèces *Leishmania* à partir des lames archivées provenant de patients atteints de leishmaniose, les produits PCR qui ont montré des signaux positifs ont été digérés avec l'enzyme de restriction *EaeI*. De plus, pour pouvoir comparer les profils et identifier l'espèce, différents isolats de cultures correspondants aux espèces de références de l'Ancien Monde ont été ajoutés à chaque expérience.

Concernant les échantillons de la LC, l'électrophorèse des produits de digestion a montré que 33 échantillons correspondent à l'espèce *L. infantum*, alors que 14 échantillons sont du *L. major*. Alors qu'un seul échantillon a montré un profil de restriction comme celui de l'espèce *L. tropica*. La visualisation du profil de digestion de 3 échantillons s'est avérée impossible (Tableau 66).

Pour les patients de la LV, les échantillons positifs en PCR ont aussi subi une digestion enzymatique avec l'enzyme *EaeI*, de même que les souches de références, afin de pouvoir identifier l'espèce en question. Le résultat de digestion a montré que les échantillons possèdent un profil de digestion comme celui de l'espèce *L. infantum* (Photo 24).

Ces résultats sont retrouvés en concordance avec ceux obtenus par PCR-RFLP ITS1, réalisée dans la partie précédente de ce travail.

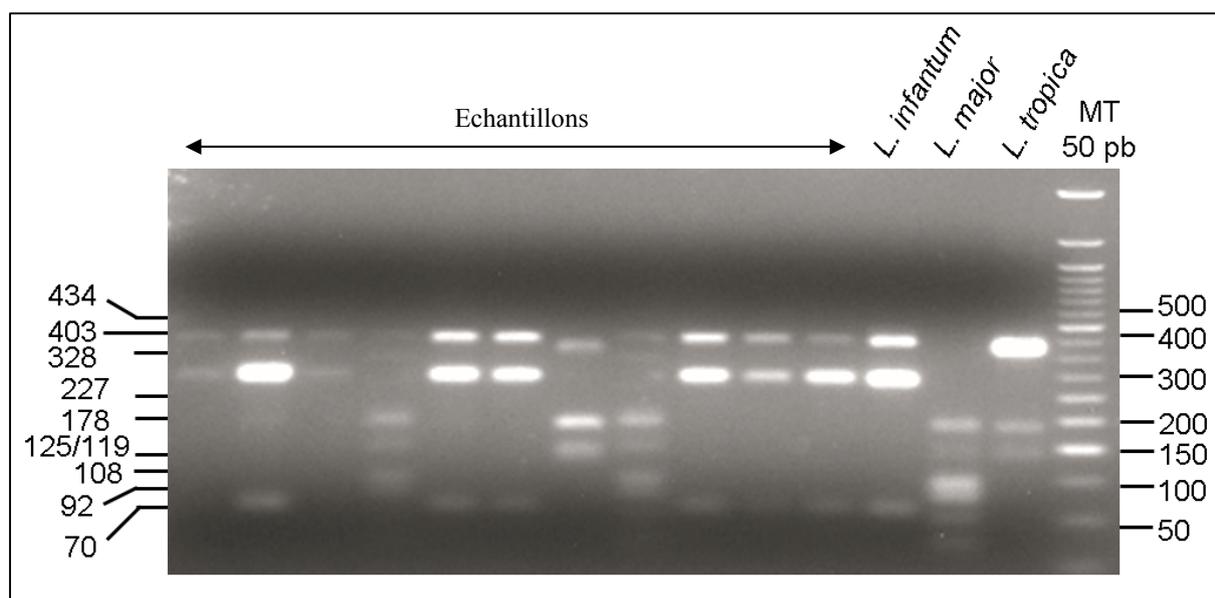


Photo 24. Résultats de la PCR mini-exon RFLP *Eael* sur de l'ADN de lames archivées.

MT : marqueur de taille 100 pb et 50pb, Souches de références : *L. infantum*: LV50, *L. major*: Ron114, *L. tropica* : Bag 9.

6. Résultats des PCRs et PCR RFLPs appliqués sur des lames archivés

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons représenter les résultats détaillés des PCRs/RFLPs appliqués.

6.1. Résultats obtenus selon la concentration initiale de l'ADN extrait

La concentration initiale d'ADN extrait obtenu à partir de chaque échantillon après est divisée en 3 groupes : une grande concentration ($>20\text{ng}/\mu\text{l}$ ramenée à $=20\text{ng}/\mu\text{l}$), une concentration moyenne (entre $0,16\text{ng}/\mu\text{l}$ et $20\text{ng}/\mu\text{l}$) et l'obtention des traces d'ADN ($<0,1\text{ng}/\mu\text{l}$) (Tableau 57).

Tableau 57. La concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames archivées.

Concentration d'AND	Effectif		Total	%
	LC	LV		
$<0,1\text{ng}/\mu\text{l}$	7	2	9	10,47%
$[0,16\text{ng}/\mu\text{l}-20\text{ng}/\mu\text{l}[$	41	10	51	59,30%
$=20\text{ng}/\mu\text{l}$	18	8	26	30,23%
Total	66	20	86	100%

Presque la moitié des ADN obtenus (59,30%) avec une concentration moyenne et uniquement 10,47% des échantillons avec des traces d'ADN.

Afin de tester l'effet de la concentration d'ADN sur l'amplification, nous comparons ces concentrations avec le nombre des PCRs positives pour les prélèvements de la LC (Tableau 58) ensuite de la LV (Tableau 59).

Tableau 58. Résultats des PCRs selon la concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames de LC archivées.

PCR	Résultats*	Concentration d'AND			Total	%
		<0,1ng/μl	[0,16ng/μl-20ng/μl[=20ng/μl		
PCR ITS1	PCR +	4	36	18	58	87,88%
	PCR -	3	5	0	8	12,12%
PCR Mini- exon	PCR +	3	31	17	51	77,27%
	PCR -	4	10	1	15	22,73%
Total		7	41	18	66	100%

*Résultats : PCR+: PCR positive; PCR-: PCR negative (pas d'amplification).

Malgré la faible concentration d'ADN (<0,1ng/μl), nous avons pu amplifier 4 échantillons avec la PCR ITS1 et 3 échantillons avec la PCR Mini- exon. Par contre, on trouve un seul échantillon non-amplifié par la PCR Mini- exon au dépit de sa forte concentration d'ADN.

Contrairement aux prélèvements de la LC, nous n'avons pu obtenir une amplification avec les échantillons qui ont des traces d'ADN (<0,1ng/μl) (Tableau 59).

Tableau 59. Résultats des PCRs selon la concentration initiale d'ADN extrait à partir des lames de LV.

PCR	Résultats*	Concentration d'AND			Total	%
		<0,1ng/μl	[0,16ng/μl-20ng/μl[=20ng/μl		
PCR ITS1	PCR +	0	7	5	12	60%
	PCR -	2	3	3	8	40%
PCR Mini- exon	PCR +	0	6	5	11	55%
	PCR -	2	4	3	9	45%
Total		2	10	8	20	100%

*Résultats : PCR+: PCR positive; PCR-: PCR négative (pas d'amplification).

6.2. Résultats obtenus selon la richesse des lames en parasites

La richesse des lames en parasites (les leishmanies) est un critère très important qui peut influencer les résultats des PCRs. Pour cela, nous allons comparer la richesse avec les PCRs obtenus pour les échantillons de la LC (Tableau 60) et de la LV (Tableau 61).

Tableau 60. Résultats des PCRs selon la richesse des lames de LC en parasites.

PCR	Résultats*	Positivité des lames**			Total	%
		(+)	(++)	(+++)		
PCR ITS1	PCR +	21	11	26	58	87,88%
	PCR -	7	0	1	8	12,12%
PCR Mini- exon	PCR +	14	11	26	51	77,27%
	PCR -	14	0	1	15	22,73%
Total		28	11	27	66	100%

*Résultats: PCR+: PCR positive; PCR-: PCR negative (pas d'amplification).

**La positivité des lames en amastigotes: (+): pauvre: 1 à 10 parasites dans 100 à 1000 champs; (++): abondante: 1 à 10 parasites dans 10 à 100 champs; (+++): très abondante: plus d'un parasite dans 1 à 10 champs.

Les deux PCRs étaient en parfaite concordance pour les échantillons très riches (+++) et riches (++) en parasites avec l'amplification de 26 échantillons pour la première et 11 échantillons pour la deuxième.

Concernant les échantillons de la LV, les deux PCRs étaient aussi en concordance except pour un seul échantillon (très riche en parasites) qui était positif par PCR ITS1 et négatif par PCR Mini- exon.

Tableau 61. Résultats des PCRs selon la richesse des lames de LV en parasites.

PCR	Résultats*	Positivité des lames**			Total	%
		(+)	(++)	(+++)		
PCR ITS1	PCR +	5	2	5	12	60%
	PCR -	8	0	0	8	40%
PCR Mini- exon	PCR +	5	2	4	11	55%
	PCR -	8	0	1	9	45%
Total		13	2	5	20	100%

*Results: PCR+: PCR positive; PCR-: PCR negative (pas d'amplification).

**La positivité des lames en amastigotes: (+): pauvre: 1 à 10 parasites dans 100 à 1000 champs; (++): abondante: 1 à 10 parasites dans 10 à 100 champs; (+++): très abondante: plus d'un parasite dans 1 à 10 champs.

6.3. Résultats comparés des PCRs

Au total, chaque une des trois PCRs a donné le taux de positivité exprimé dans le tableau 62.

La PCR PO a donné un pourcentage de positivité très élevé avec 91,86%, tandis que la PCR ITS1 était positive 70 fois (81,40%) et enfin, la PCR Mini-exon positive 62 fois avec 72,09%.

Tableau 62. Résultats globaux des PCRs.

PCR		LC+LV	%	LC	%	LV	%
PO	Positive	79	91,86	60	90,91	19	95,00
	Negative	7	8,14	6	9,09	1	5,00
ITS1	Positive	70	81,40	58	87,88	12	60,00
	Negative	16	18,60	8	12,12	8	40,00
Mini-exon	Positive	62	72,09	51	77,27	11	55,00
	Negative	24	27,91	15	22,73	9	45,00
Total		86	100	66	100,00	100	100,00

Dans le tableau ci-dessous, nous comparons les résultats de la PO PCR avec les autres PCRs.

Tableau 63. Comparaison des résultats de la PO PCR (acidic ribosomal phosphoprotein fragment, PO) avec les autres PCRs.

PCR PO*		LC + LV		LC		LV	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
		79/86	7/86	60/66	6/66	19/20	1/20
		(91,86%)	(8,14%)	(90,91%)	(9,09%)	(95,00%)	(5,00%)
PCR ITS1	Positive	64/70	6/70	53/58	5/58	11/12	1/12
	Negative	15/16	1/16	7/8	1/8	8/8	0/8
PCR Mini-exon	Positive	59/62	3/62	48/51	3/51	11/11	0/11
	Negative	20/24	4/24	12/15	3/15	8/9	1/9

*PCR PO : Cible un gène de la phosphoprotéine mitochondriale chez les mammifères (acidic ribosomal phosphoprotein fragment, PO); LC : leishmaniose cutanée; LV : leishmaniose viscérale.

Le nombre des PCRs ciblant le gène des mammifères PO positives est prédominant que ce soit avec les échantillons de la LC (90,91%) ou la LV (95,00%) ce qui nous renseigne sur la bonne qualité de nos extraits.

On remarque aussi l'existence d'amplifications avec les PCRs des gènes ITS1 et les gènes Mini-exon des échantillons négatifs avec la PCR PO : au total, 6 échantillons avec la

PCR ITS1 et 3 échantillons avec la PCR Mini-exon. Le seul cas exceptionnel est celui de la PCR Mini-exon où on n'a pas pu amplifier le cas négatif selon la PCR PO.

Les résultats comparés des deux PCRs des gènes ITS1 et Mini-exon sont représentés dans le tableau 64.

Tableau 64. Résultats des PCR-ITS1 *versus* PCR-Mini-exon.

		LC		LV		LC+LV	
PCR-Mini-exon		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
PCR-ITS1	Positive	51	7	12	1	63	8
	Negative	0	8	0	8	0	16

On observe que les deux PCRs ont revenu positives chez 63 échantillons : 51 de la LC et 12 de la LV.

On remarque aussi que la PCR ITS1 a pu détecter la présence de l'ADN parasitaire dans 8 échantillons de la LC+LV que la PCR-Mini-exon était négative.

6.4. Résultats obtenus des PCRs selon l'ancienneté des lames archivées

Pour savoir l'impact de l'ancienneté des prélèvements biologiques (lames archivés) sur les résultats des PCRs, nous avons classé nos résultats selon l'année du prélèvement. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-après (Tableau 65).

Tableau 65. Représentation des résultats des PCRs selon l'ancienneté des lames archivées.

	PCRs	Année			Total
		2011	2012	2013	
LC + LV	ITS1	21/27	15/24	34/35	70/86
	%	(77,78)	(62,50)	(97,14)	(81,40)
	Mini-exon	18/27	11/24	33/35	62/86
	%	(66,67)	(45,83)	(94,28)	(72,09)
LC	ITS1	16/19	13/18	29/29	58/66
	%	(84,21)	(72,22)	(100,00)	(87,88)
	Mini-exon	13/19	9/18	29/29	51/66
	%	(68,42)	(50,00)	(100,00)	(77,27)
LV	ITS1	5/8	2/6	5/6	12/20
	%	(62,50)	(33,33)	(83,33)	(60,00)
	Mini-exon	5/8	2/6	4/6	11/20
	%	(62,50)	(33,33)	(66,67)	(55,00)

LC: leishmaniose cutanée; LV: leishmaniose viscérale.

On remarque que les résultats d'amplification de l'ADN parasite étaient meilleurs pour les lames fraîches (datant de l'année 2013), que ce soit pour les échantillons de la LC ou la LV.

6.5. Résultats comparés des RFLPs obtenus

On va aussi comparer les résultats des digestions des produits amplifiés (Tableau 66) avec les espèces obtenus (Tableau 67) : seuls les PCRs positifs sont inclus.

Tableau 66. Résultats comparés des RFLPs selon les PCRs positives.

RFLPs	LV+LC			LV			LC		
	RFLPs	PCRs	%	RFLPs	PCRs	%	RFLPs	PCRs	%
	positives	positives		positives	positives		positives	positives	
ITS1 RFLP	68	70	97,14%	12	12	100%	56	58	96,55%
RFLP Mini-exon	59	62	95,16%	11	11	100%	48	51	94,12%

Au total, la RFLP ITS1 était positive 68 fois (97,14%), alors que la RFLP Mini-exon 59 fois (95,16%). Tous les échantillons de la LV ont pu donner un profil de digestion interprétable.

Tableau 67. Résultats comparés des espèces identifiées.

	Leishmaniose viscérale		Leishmaniose cutanée			
	<i>L. infantum</i>	Total	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	Total*
ITS1 RFLP	12	12	36	19	1	58
%	100,00%		62,07%	32,76%	1,72%	
RFLP mini-exon	11	11	33	14	1	51
%	100,00%		64,71%	27,45%	1,96%	

* Le total des RFLPs effectués et non-pas le total des espèces identifiées.

Concernant les échantillons de la LV, la seule espèce trouvée responsable de cette pathologie était *L. infantum*, alors que pour les cas de la LC, trois espèces le sont responsables (avec un ordre décroissant) : *L. infantum* chez 36 cas (62,07%), *L. major* chez 19 cas (32,76%) et enfin *L. tropica* chez un seul cas (1,72%).

Afin de mieux visualiser et comprendre les résultats combinés des deux tableaux 66 et 67 sont représentés par la figure 23 ci-après.

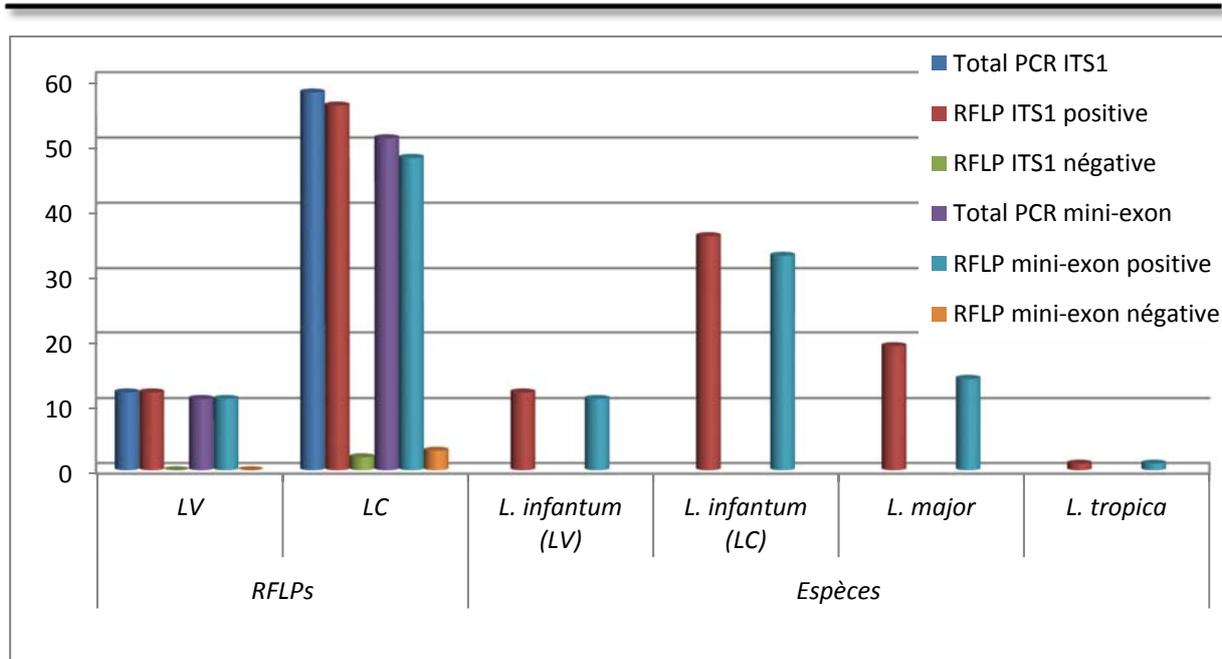


Figure 23. Résultats comparées des RFLPs selon les PCRs positives et les espèces identifiées.

Nous avons aussi comparé les résultats de la RFLP ITS1 *versus* la RFLPs Mini exon (Tableau 68).

Tableau 68. Résultats comparés des RFLPs.

		Outils d'identification			Total
		RFLP ITS1+ RFLP Mini exon*	RFLP ITS1	RFLP Mini exon	
LC	<i>L. infantum</i>	33	3	0	36
	<i>L. major</i>	14	5	0	19
	<i>L. tropica</i>	1	0	0	1
LV	<i>L. infantum</i>	11	1	0	12

LC : leishmaniose cutanée; LV : leishmaniose viscerale.

* Les résultats obtenus par les deux outils correspondent dans tous les cas.

Les résultats d'identification des espèces de *Leishmania* avec les deux RFLPs étaient en concordance pour tous les échantillons. Néanmoins, la RFLP ITS1 a pu identifier plus d'échantillons (9 échantillons) que la RFLP Mini exon.

La distribution géographique des espèces identifiées est représentée dans le tableau 69 ci-après.

Tableau 69. Distribution géographique des espèces identifiées responsables de la leishmaniose.

Origine géographique	LV	LC			Total
	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	
Annaba	2	10	7	1	20
Guelma	2	11	0	0	13
S/Ahras	5	10	1	0	16
Tebessa	2	2	0	0	4
Biskra	1	0	6	0	7
Constantine	0	0	1	0	1
El Taref	0	1	0	0	1
Khanchela	0	0	2	0	2
Laghouat	0	0	2	0	2
Skikda	0	1	0	0	1
M'sila	0	1	0	0	1
Total	12	36	19	1	68

Les cas de la LV à *L. infantum* ont été trouvés dans 5 wilayas (Figure 24), S/Ahras englobe le plus nombre des cas (5 cas). Quand aux cas de la LC à *L. infantum*, Guelma regroupe le nombre le plus élevé (11 cas). La LC à *L. major* a été trouvée surtout à Annaba avec 7 cas et la LC à *L. tropica* aussi à Annaba avec un seul cas (Figure 25).

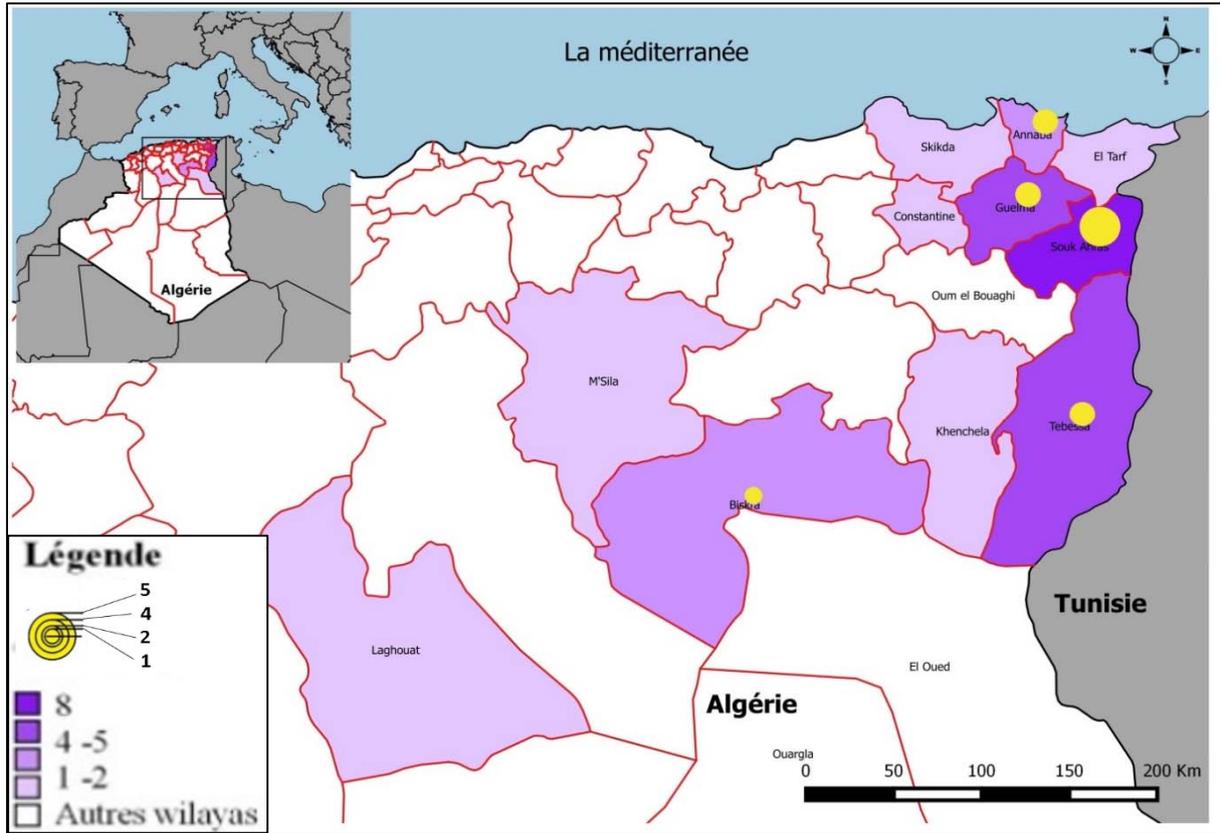


Figure 24. Distribution des espèces identifiées de la LV selon l'origine géographique.

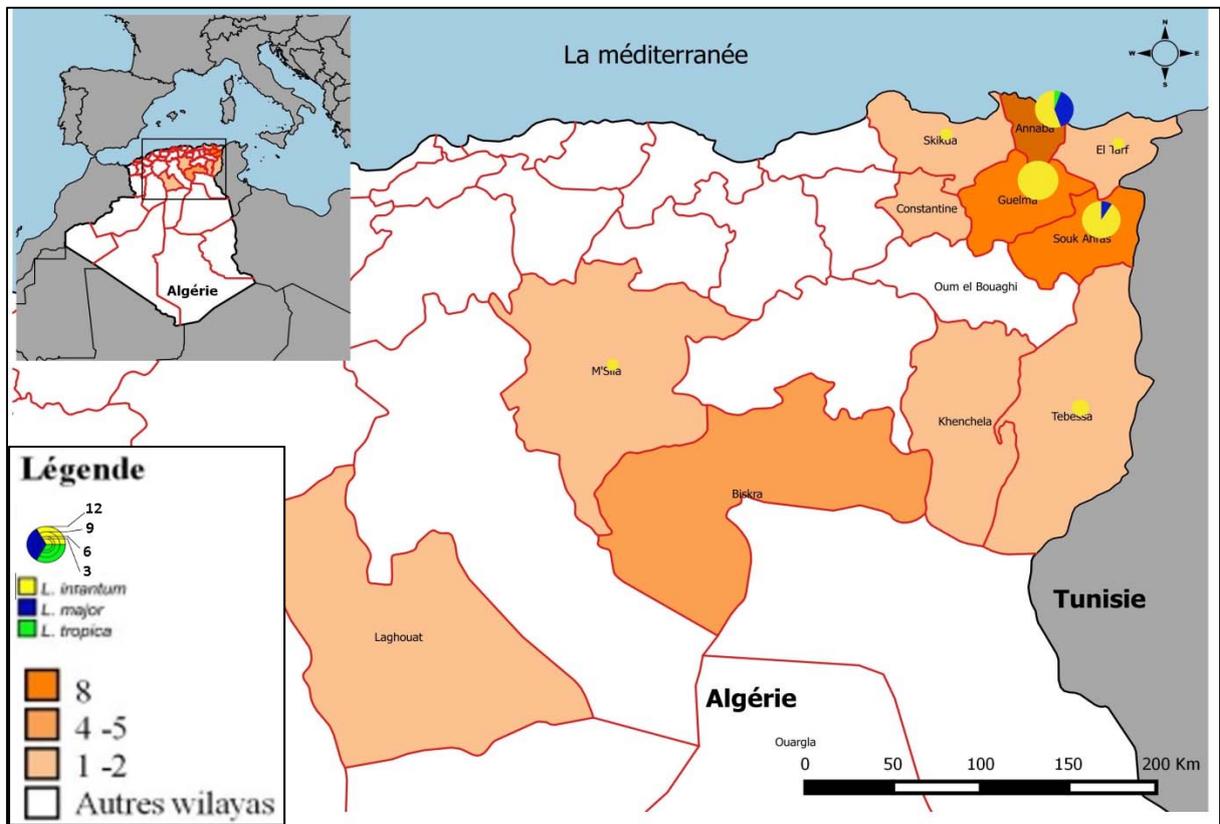


Figure 25. Distribution des espèces identifiées de la LC selon l'origine géographique.

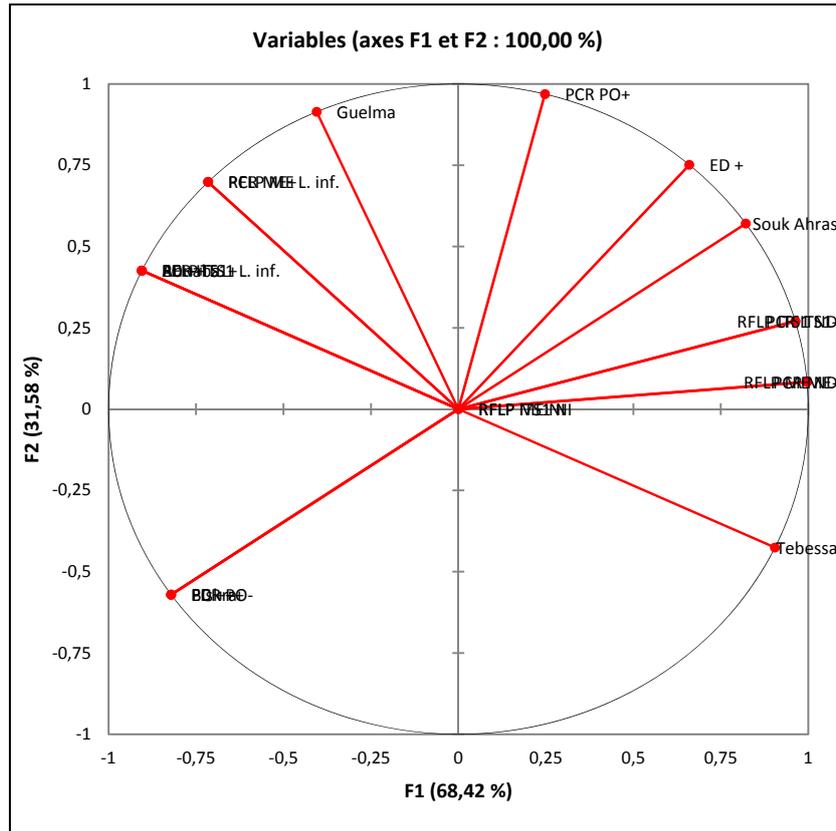


Figure 27. ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose viscérale.

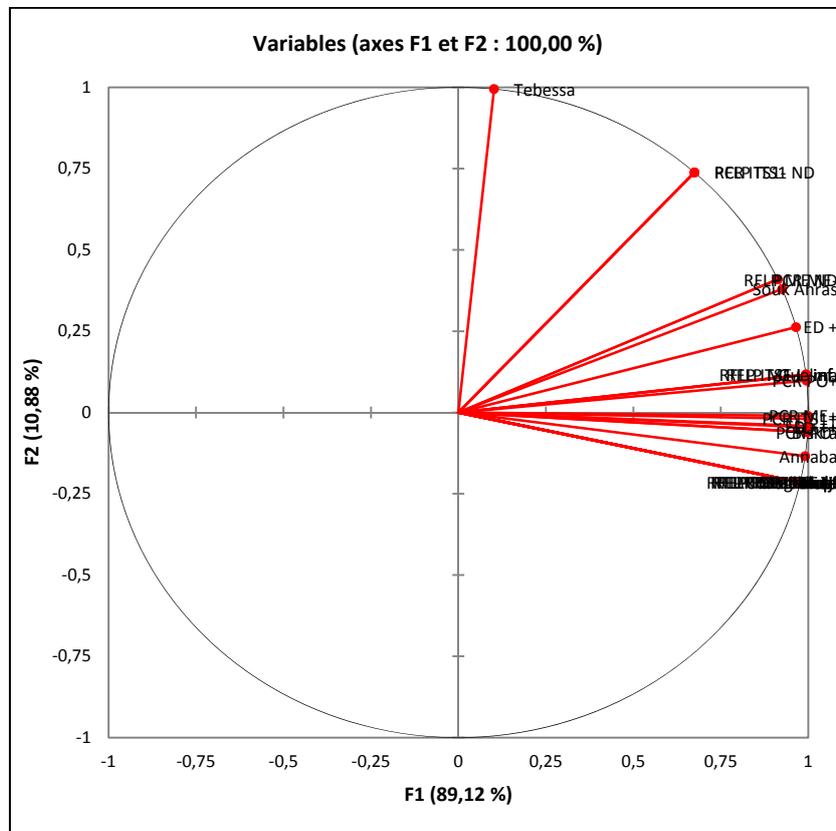


Figure 28. ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose.

7.1. Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la LC

Concernant les résultats de la LC, (Figure 66) :

Les variables suivants sont en parfaite corrélation :

- La PCR ITS1 et la PCR Mini-exon.
- L'ITS1 RFLP et la Mini-exon RFLP qui ont identifiés *L. major*.
- L'ITS1 RFLP et la Mini-exon RFLP qui ont identifiés *L. tropica*.

Les variables suivants sont corrélés positivement :

- La PCR PO positive avec les deux autres PCRs.
- L'examen direct ED+++ avec les autres PCRs et RFLPs.
- L'ITS1 RFLP et la Mini-exon RFLP qui ont identifiés *L. infantum*.
- L'ED+ avec les PCRs (ITS1 et Mini-exon) négatives avec les RFLPs non-déterminés avec les RFLPS non-identifiés.
- Les RFLPs qui ont identifiés *L. infantum* et *L. major* sont plus corrélées avec les cas enregistrés à Guelma.

Les variables suivants sont négativement corrélés :

- L'ITS1 RFLP et la Mini-exon RFLP qui ont identifiés *L. tropica* avec les résultats des PCRs et l'ED+++.

Les variables suivants sont indépendants :

- Les RFLPs qui ont identifiés *L. tropica* sont indépendants avec les cas enregistrés à Annaba, Constantine et M'Sila.

7.2. Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la LV

Quand aux résultats de la LV, (Figure 67) :

Les variables suivants sont en parfaite corrélation :

- La PCR Mini exon et la RFLP Mini exon non déterminés.
- La PCR ITS1 et la RFLP ITS1 non déterminés.
- La PCR ITS1 et la RFLP ITS1 positives.
- La PCR Mini exon et la RFLP Mini exon positives.
- L'ED++ avec la PCR ITS1 positive.
- La RFLP qui a identifié *L. infantum* est corrélée parfaitement avec les cas appartenants à Annaba.

Les variables suivants sont liés positivement :

- L'ED+ avec la PCR PO +
- La RFLF mini exon qui à identifié *L. infantum* avec les cas enregistrés à Guelma.

7.3. Interprétation de l'ACP appliquée sur les résultats de la leishmaniose

Et enfin, sans tenir compte des formes cliniques, nous avons les résultats suivants (Figure 68) :

Les variables suivants sont en corrélation parfaite :

- Les RFLPs qui ont identifié *L. infantum* entre eux et avec les cas appartenants à Guelma
- RFLPs ITS1 qui ont identifié *L. major* et les RFLPs Mini exon qui ont identifiés *L. major*.
- RFLPs ITS1 qui ont identifié *L. tropica* et les RFLPs Mini exon qui ont identifiés *L. tropica*.
- RFLP ITS1 non-identifiée avec la RFLP Mini-exon non-identifiée.
- RFLP Mini-exon non-déterminée avec la PCR Mini-exon négative.
- RFLP ITS1 non-déterminée avec la PCR ITS1 négative.

Les variables suivants sont liés positivement :

- La PCR PO- avec l'ED ++ et l'ED+++.
- La PCR ITS1+ avec la PCR Mini-exon+ avec l'ED ++ et l'ED+++.

V. Construction d'un modèle du cycle de transmission et infection à *Leishmania sp.*

La propagation d'une épidémie dans une population dépendant de paramètres extrêmement nombreux (la clinique, déplacement des individus, espèces responsables/souches). En effet, la modélisation permette de prévoir les conséquences de la propagation de l'épidémie pour la population.

Nous présentant une approche qui divise la population en classes épidémiologiques : les personnes susceptibles d'être infectés (sains), ceux qui sont infectieux, et ceux qui guérissent ou meurent qui interagissent avec les autres acteurs du cycle de transmission : vecteurs et réservoirs (un système multi-agents). Cette approche peut être utilisée pour modéliser le cycle de transmission de *Leishmania sp.* en Algérie.

1. Données initiales

Les données initiales utilisées pour construire le programme sont représentés dans le tableau 70 ci-après.

Tableau 70. Caractéristiques des agents utilisés dans le modèle NetLogo.

Agents	Nature (Rôle dans le cycle de vie de <i>Leishmania</i>)	Clinique	Nominations des agents ("Turtles")		Gris	Couleur/clinique/ <i>Leishmania</i> sp.				Forme	Âge de chaque agent	Durée de vie ("Lifespan")
			Pluriel	Singulier		Sain	LV	LC	Bleu			
							<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>				
Personnes	Hôte	LV, LC	"Persons"	"Person"		Rouge	Jaune	Vert	Bleu	"person"	au hasard	500
<i>Phlebotomus longicuspis</i>	Vecteur	LV, LC	"P.longicuspises"	"P.longicuspis"		Rouge	Jaune	/	/	"Phlebotomus"		100
<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	Vecteur	LV, LC	"P.perfiliewies"	"P.perfiliewi"		Rouge	Jaune	/	/	"Phlebotomus"		100
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Vecteur	LV, LC	"P.perniciosuses"	"P.perniciosus"		Rouge	Jaune	/	/	"Phlebotomus"		100
Chiens	Réservoir	LV, LC	"dogs"	"dog"		Rouge	Jaune	/	/	"dog"		300
<i>Canis aureus</i>	Réservoir	LV	"canises"	"canis"		Rouge	/	/	/	"canis"		300
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Vecteur	LC	"P.papatases"	"P.papatasi"		/	/	Vert	/	"Phlebotomus"		100
<i>Meriones shawi</i>	Réservoir	LC	"Merioneses"	"Meriones"		/	/	Vert	/	"Meriones"		200
<i>Psammomys obesus</i>	Réservoir	LC	"Psammomyses"	"Psammomys"		/	/	Vert	/	"Psammomys"		200
<i>Phlebotomus sergenti</i>	Vecteur	LC	"P.sergenties"	"P.sergenti"		/	/	/	Bleu	"Phlebotomus"		100
<i>Ctenodactylus gundi</i>	Réservoir	LC	"ctenodactyluses"	"ctenodactylus"		/	/	/	Bleu	"Ctenodactylus"		200

2. Le programme

Le modèle obtenu (voir le code du programme : Annexe VIII) a été construit par le logiciel NetLogo (voir section III-5 du Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus lors de l'identification des espèces des *Leishmania sp.* représentés ci-avant (voir la section : Resultats IV- Identification des espèces *Leishmania*) ont été prises en compte pour le développement de ce modèle. Les autres données nécessaires ont été complétés à l'aide d'une revue de littérature (pour les espèces de vecteurs et réservoirs trouvés en Algérie, voir le Chapitre I).

Au début, (Figure 29), nous mettons l'état initial de l'infection de tel sorte que :

- La leishmaniose viscérale est due à *L. infantum* et transmise par espèces des vecteurs : *P. longicuspis*, *P. perfiliewi* et *P. perniciosus*. Le réservoir est : le chien et *Canis aureus*.
- La leishmaniose cutanée est due à : *L. infantum*, transmise par le vecteur : *P. longicuspis*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*. Le réservoir est le chien. *L. major*, le vecteur est : *P. papatasi*. Le réservoir : *Meriones shawi* et *Psammomys obesus*. *L. killicki*, son vecteur est : *P. sergenti*. Son réservoir: *Ctenodactylus gundi*.

Nous ne tenons pas compte les zymodèmes de chaque espèce ou la co-infection de *Leishmania sp.* en une seule personne.

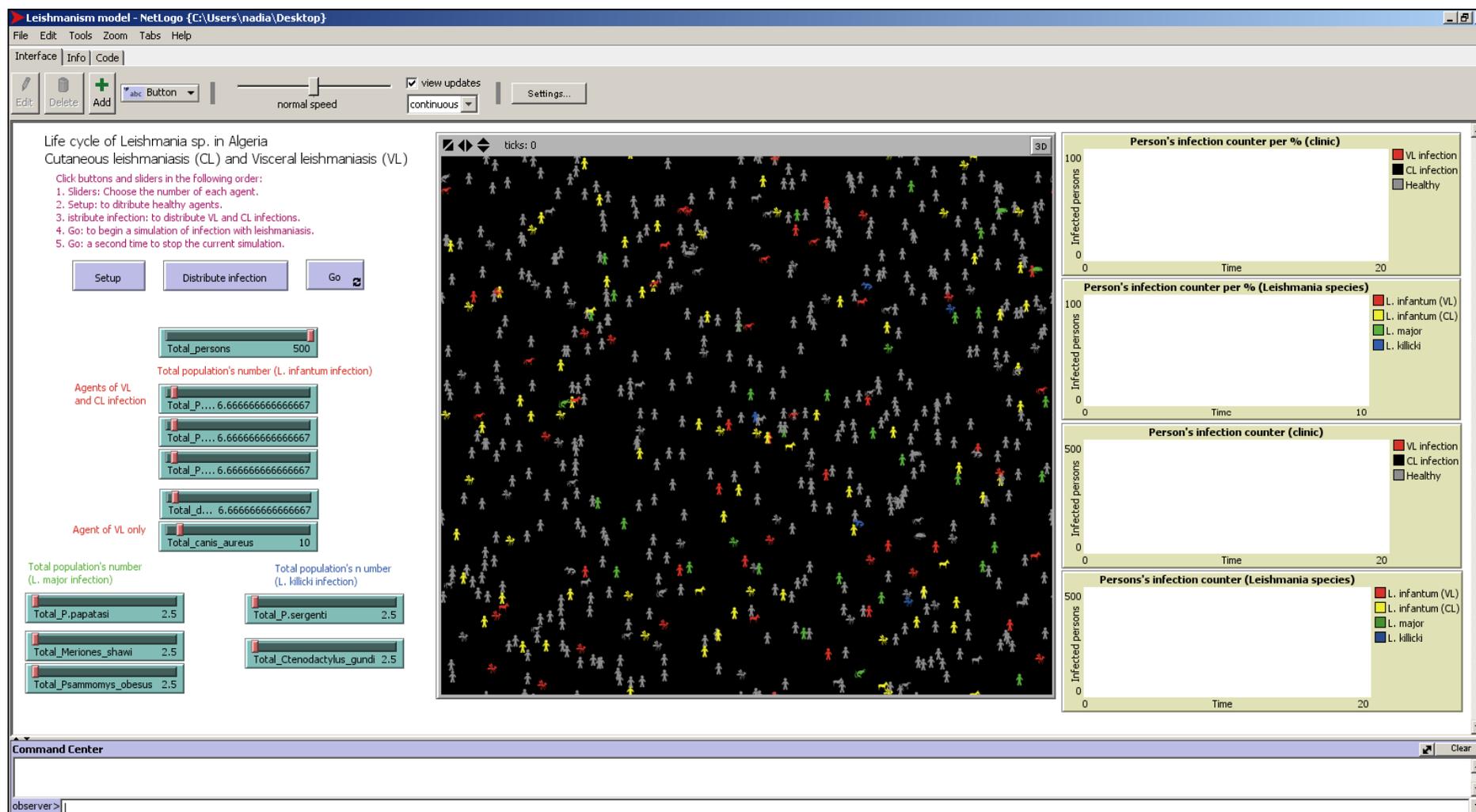


Figure 29. Interface du programme « NetLogo » quand il est initialisé

Au fil du temps "ticks", le programme dessine les graphes de l'infectivité demandés (Figure 30).

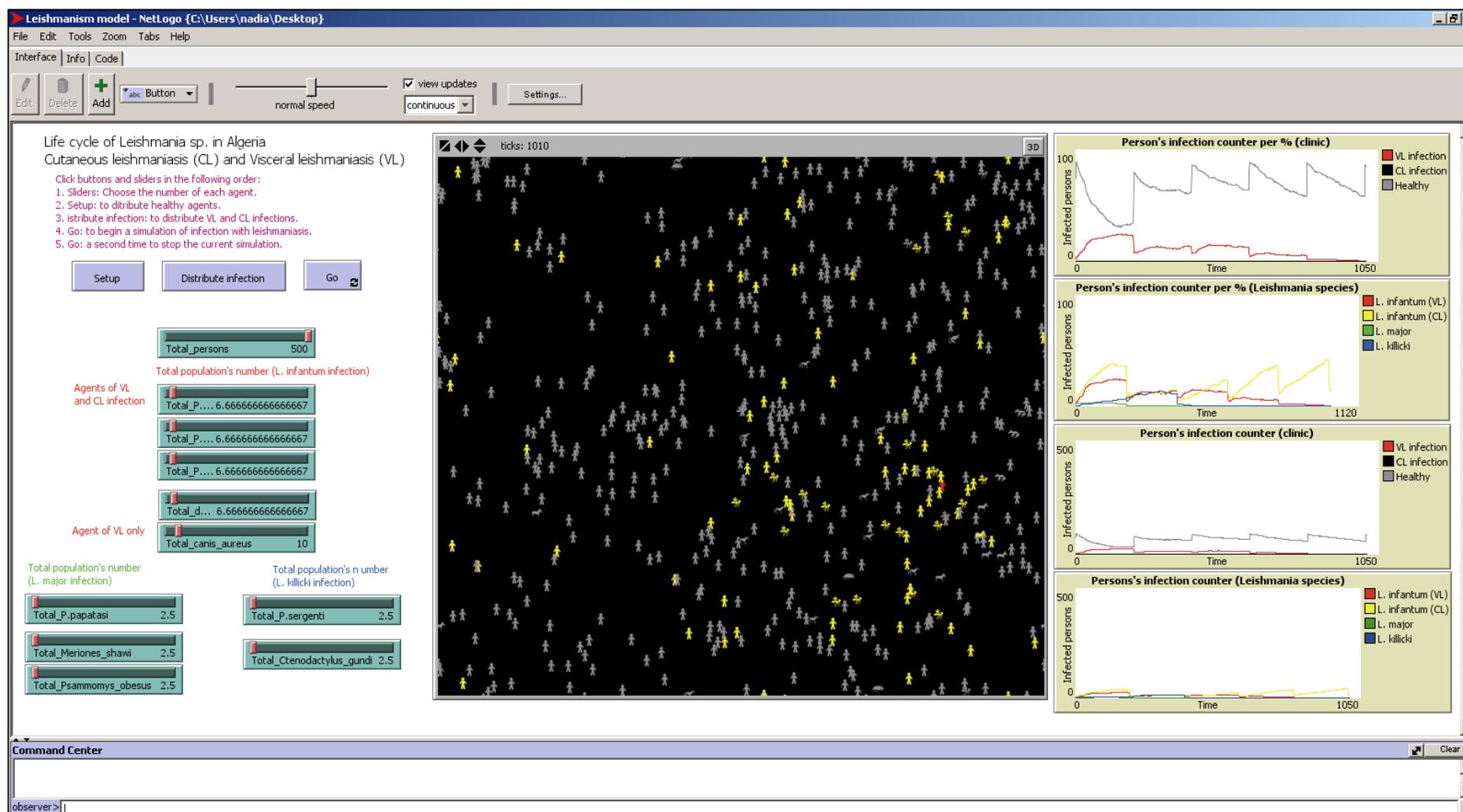


Figure 30. Interface du programme « NetLogo » quand il est terminée (Après 1000 Tiques de temps).

DISCUSSION

Les leishmanioses sont très répandues dans le monde. Elles évoluent, cependant, dans des écosystèmes différents et entraînent des atteintes cliniques dont l'évolution peut être différente selon l'espèce du parasite en question, d'où l'intérêt de la mise en place d'un diagnostic précis du parasite et de son espèce qui a aussi des retombées importantes pour les études épidémiologiques et cliniques [19,185].

Le diagnostic biologique repose essentiellement sur la mise en évidence du parasite à l'examen direct, son isolement en culture *in vitro* ou par les méthodes sérologiques. Cependant, les chercheurs depuis plusieurs années, se sont orientés vers les outils de biologie moléculaire [90,415]. Malgré leurs intérêts, les méthodes de diagnostic parasitologique/immunologique ne permettent pas d'identifier l'espèce. C'est l'analyse isoenzymatique qui représente la méthode standard de référence qui est pratiquée pour l'identification et la classification des espèces de leishmanies. Cette technique s'avère, cependant, lourde à pratiquer et nécessite un équipement spécialisé [351]. Elle se pratique par ailleurs, sur des leishmanies issues de la culture *in vitro* posant ainsi le problème des cultures négatives et des contaminations par d'autres microorganismes, qui peuvent engendrer des difficultés de diagnostic.

L'objectif de notre travail a consisté à l'étude approfondie de la situation épidémiologique des formes cliniques de la leishmaniose humaine dans notre région (Nord-Est Algérie). Cette étude trouve son intérêt du fait que la leishmaniose cutanée est en extension à partir des foyers anciens et devient de plus en plus fréquente au Nord coexistant avec la forme viscérale ce qui soulève des questions sur la situation épidémiologique actuelle.

Afin d'atteindre cet objectif, différentes démarches ont été suivies, commençant par les arguments cliniques, parasitologiques (examen direct, culture *in vitro*) et immunologiques qui permettent de détecter la présence ou non du parasite chez les patients suspectés.

Ensuite, nous nous sommes dirigés vers la mise en place d'outils PCR-RFLP permettant le diagnostic de la leishmaniose et l'identification de l'espèce à partir de lames archivées de patients de différentes origines géographiques.

Classiquement, le diagnostic parasitologique de certitude repose sur la visualisation du parasite sur un prélèvement de moelle osseuse (réalisé à partir du sternum chez l'adulte ou de la crête iliaque chez l'enfant) coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG). Le prélèvement de sang périphérique, après leucocytocentrifugation, peut permettre le diagnostic de certitude avec

toutefois une sensibilité plus grande chez le malade immunodéprimé [416]. Au microscope, les parasites se présentent sous forme amastigote en position typiquement intramacrophagique mais plus souvent extracellulaire [417]. Leur petite taille (2 à 5 μm) et l'appariement d'un noyau rond ou ovalaire, pourpre et d'un kinétoplaste punctiforme ou bacilli- forme, pourpre plus foncé, est typique [42].

Concernant le choix des techniques de diagnostic immunologique des leishmanioses, il est très variable, mais chaque technique présente des inconvénients avec ses avantages. Par exemple, l'hémagglutination indirecte, l'électrosynérèse et l'immunoélectrophorèse ne sont presque plus employées du fait de leur sensibilité diminuée [305]. Il existe également des bandelettes de détection rapide qui utilisent des réactions d'agglutination directe, mais qui sont peu fiables [327]. Finalement, la technique de choix reste le western blot du fait de sa grande sensibilité et spécificité. Mais vu son coût élevé, elle représente un test de confirmation réservé à des laboratoires spécialisés [42,323,344].

La technique de référence est l'immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur promastigotes de culture, mais elle est de plus en plus remplacée par les tests ELISA dont la spécificité et la sensibilité varient beaucoup selon les antigènes utilisés. Le western blot est très sensible et très spécifique, permettant de différencier les sujets malades et les porteurs asymptomatiques. C'est un test de confirmation réservé à des laboratoires spécialisés [42].

Dans notre étude prospective portant sur trois années (2011-2013), 651 cas suspects de leishmaniose ont été examinés, dont 120 se révélaient positifs, avec 85 cas de LC (Tableau 24) et 35 cas de LV (Tableau 39), ce qui concorde avec presque toutes les études où la LC constitue la forme la plus rencontrée en Algérie [19,418].

Nous exposerons en un premier temps nos résultats du diagnostic parasitologique de la leishmaniose cutanée accompagné d'une confrontation avec les données de la littérature.

La LC est enregistrée au cours de l'année avec une augmentation du nombre de cas d'une année à l'autre. Les cas de la LC sont plus fréquents en hiver (36,47%), en particulier en mois de Novembre (20,00%). cela est lié probablement au cycle de vie du phlébotome.

Selon une étude, la variation saisonnière était plus élevée en hiver (35,2%) et au printemps (36,6%) [419]. Par contre dans une autre étude, les auteurs n'ont observé aucune saison de prédilection, selon eux, la LC est vue toute l'année avec une moyenne de 17,75 cas par mois, et un discret pic de recensement en Mars, Avril et Juillet [420].

La LC touche toutes tranches d'âge mais elle est un peu plus observée chez les adolescents de 15 à 20 ans (16,47%).

Ceci est en désaccord avec l'étude faite par Fendri *et al*, où la classe modale se situe entre 20 et 30 ans avec 67 cas [18].

Néanmoins, chez certains auteurs, on remarque que les enfants étaient les plus atteints comme c'est le cas dans le travail de Zait *et al* qui a montré que la tranche d'âge de 0 à 10 ans était la plus touchée avec 143 cas soit 37 % [421].

La LC est plus observée chez les patients de sexe masculin (55,29%, sex-ratio = 1,24), ce qui ne concorde pas avec une étude où le sex-ratio était de 0,95 [421].

Le plus nombre des cas a été observé à Annaba avec 29,41% ce qui est tout à fait normal, puisque c'est la Wilaya où siège le laboratoire. Toutefois, ça n'empêche pas d'observer l'existence de la LC dans 13 autres wilayas.

La clinique était aussi variable : le nombre de lésions retrouvé chez nos patients allant d'une seule à plus de 17 lésions, dont la seule lésion représente la majorité des cas (83,53%). Des études précédentes ont décrit que la majorité de patients présentent une seule lésion dans 52 % des patients [421] ou dans 186 cas dans une autre étude [420].

Les lésions uniques, siégeant à face et de durée d'évolution de plus d'un an sont celles de la LCS, alors que les lésions de la LCZ sont multiples, siégeant à la face et aux membres avec une durée d'évolution de 3 à 5 mois [422].

Le siège des lésions de notre série se voit surtout au niveau du visage/cou (45,88%). Cette observation concorde avec d'autres études faites par Zait *et al*. qui ont trouvé que le visage était le siège de prédilection dans leur séries de malades à un pourcentage de 52.5%.

Selon sa nature, la lésion croûteuse est la plus dominante avec 27,06%,

L'évolution des lésions, variait entre moins d'un mois (2,35%) à plus de 3 ans (2,35%). Ces observations peuvent être expliquées par l'aspect douloureux des lésions alarmant par conséquent les patients du premier groupe, par contre, le caractère indolent des patients retarde la consultation ou bien, la suspicion clinique de leishmaniose n'a pas été évoquée pour le second groupe.

Et enfin la présence de notion de piqure à seulement 40% des cas malgré la piqure douloureuse du phlébotome.

Selon la littérature, l'examen direct après coloration au MGG est l'examen le plus adapté pour le diagnostic de la leishmaniose en zone d'endémie [145,423].

Par ailleurs, d'autres chercheurs soutiennent l'idée que l'examen parasitologique seul n'est pas toujours concluant chez les patients présentant un diagnostic clinique de LC [424]. Par contre, sa combinaison avec la culture, par exemple, augmenterait la sensibilité du diagnostic à plus de 85% [299,425,426].

Une évaluation prospective de l'apport des cultures de leishmanies sur milieu diphasique NNN dans le diagnostic des leishmanioses a été réalisée sur les données de 75 cultures provenant de cas de LC recrutés consécutivement au niveau du Laboratoire de Parasitologie Mycologie CHU d'Annaba. La sensibilité globale au cours de la LC a été de 76%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par d'autres études similaires [22].

Malgré les inconvénients que comporte la culture *in vitro* des *Leishmania*, notamment le risque de surinfections bactérienne ou mycosique [427,428], elle nous a permis de mettre en évidence le parasite dans 58,67% de même que l'examen direct des sérosités cutanées.

Cependant, il faut noter qu'il y a de nombreux cas qui ont été diagnostiqués par une seule technique (n = 26). Ces résultats sont contradictoires aux autres résultats qui trouvent que le nombre des cas positifs uniquement à l'examen direct est nettement plus élevé que celui obtenus uniquement de la culture [22].

Donc, la pratique systématique de la culture en parallèle avec l'incontournable examen direct est fortement recommandée.

Nous présenterons dans un deuxième temps nos résultats du diagnostic parasitologique de la leishmaniose viscérale comparés avec des études antérieures.

Le pourcentage des cas de la leishmaniose viscérale apparaît faible (9,49%), mais en comparant ce résultat avec l'incidence de la LV déclaré dans toute l'Algérie (111 cas/an) [19], on voit que c'est un bon pourcentage. Il faut noter aussi l'existence des cas de la Co-infection LV/VIH au sein de la région d'étude (7,81%) malgré la rareté de la LV de l'adulte et la co-infection LV/VIH.

La LV a été enregistré durant les 3 années de l'étude (du 2011 à 2013) à l'exception des cas de la co-infection VL/VIH qui ont été reçus uniquement durant l'année 2012. Le mois de Juin et le mois d'avril comptent le nombre des cas le plus élevé pour la LV infantile et la co-infection LV/VIH respectivement. Donc, en terme de variation saisonnière, nous avons observé que le nombre des malades était maximal au Printemps que ce soit pour les cas de la LVI avec 34,28% ou les cas de la co-infection VIH/LV avec 11,34% du pourcentage total des cas enregistrés.

Cela est due peut être raison des conditions climatiques [429] et la transmission saisonnière de *L. infantum* de Mai à Octobre [430,431].

Les nourrissons sont les plus touchés par la LV (entre 1 et 4 ans soit 77,14% des cas) et les jeunes par la co-infection LV/VIH (entre 25 et 32 ans soit 11,42% des cas) ce qui est en relation avec la dégradation de l'état général et immunitaire de ces patients.

Dans une étude, 84% des cas sont âgés de 6 mois à 4 ans [422].

Contrairement à la LC, le sexe féminin est le plus touché par la LVI avec un sex-ratio de 0,67.

Ces résultats sont contradictoires à des précédentes études où une prédominance masculine a été rapportée [37,422].

Et enfin, le foyer de Souk Ahras offre le plus grand nombre de cas de LV (28,57%).

En Algérie, la LV sévit dans les régions du Nord, le foyer le plus connu étant celui de la Grande Kabylie coexistant avec la leishmaniose canine [11,102,113,419,430,432].

L'enfant peut avoir une infection complètement asymptomatique ou une maladie oligo-symptomatique [59]. La splénomégalie et la pancytopenie étaient présentes dans la plupart des cas positifs (73,33% et 46,67% respectivement) (Tableau 48 et 49).

Ces résultats sont discordants avec d'autres études [37,430]. Dans d'autres études, les cas atteints de la LVI présentent une splénomégalie et une fièvre dans 100% et 90% des cas respectivement [433]. D'autres auteurs trouvent aussi la splénomégalie dans 94% des cas avec une fièvre dans 100% des cas [37].

La méthode couramment utilisée pour diagnostiquer la LV est la recherche des parasites dans l'aspiration splénique ou de moelle osseuse. La présence du parasite dans les ganglions lymphatiques, la biopsie du foie ou les échantillons aspirés ou la couche leucocytaire du sang périphérique peut également être démontrée [23,434].

Quant à la présente étude, le diagnostic de la LV a été essentiellement basé sur l'examen microscopique de la moelle osseuse pour les patients susceptibles d'avoir une LV et sur la sérologie pour les patients touchés par l'infection chronique au VIH étant donné que la ponction de la moelle osseuse est déconseillée voir dangereuse pour eux.

Par contre la combinaison de l'examen direct avec la culture cellulaire des *Leishmania* afin d'étudier la sensibilité du diagnostic a été écartée. Cette dernière comporte un gros risque de contaminations puisqu'elle se base sur la moelle osseuse ou la couche leucocytaire (LCC) pour

effectuer la culture [22]. Il serait donc, intéressant, voir indispensable, de compléter cet examen microscopique par un diagnostic immunologique.

L'examen microscopique de la moelle osseuse s'est avéré positif dans 77,14% et l'IFI dans 71,43% des cas. Cependant, certains cas (n = 9 cas) n'ont pu être diagnostiqués que par la combinaison de l'examen direct de la moelle osseuse avec une technique sérologique.

Selon certains auteurs, l'IFI est plus sensible que le myélogramme dans 91,3% *versus* 87,9% des cas, respectivement [37]. D'autres ont obtenu un pourcentage de positivité de l'IFI de 89% [433].

Enfin, l'IFI a montré qu'elle est une technique très adaptée en matière de diagnostic de la LV, elle nous a révélé des résultats forts intéressants dans notre étude. En effet, elle nous a permis de poser un diagnostic positif chez 71,43% du total des cas positifs. Pour de nombreux auteurs, l'IFI reste la technique de référence pour la sérologie leishmanienne [37,305,423]. Néanmoins, l'association de l'IFI avec un autre test immunologique sera un avantage.

Donc, le diagnostic parasitologique reste la technique « gold standard » pour le diagnostic de la leishmaniose en raison de sa haute spécificité [435] mais il est obligatoire d'examiner les lames pour une durée plus longue et par un grand nombre de champs de microscope.

Ces résultats montrent que l'association des méthodes séro-immunologiques avec l'examen direct de la leishmaniose viscérale permet d'améliorer le diagnostic de la LV.

Le diagnostic moléculaire est basé sur la détection et l'analyse des acides nucléiques du parasite dans le sang, la moelle osseuse [42] ou même le sérum [436]. Il complète les approches parasitologiques et sérologiques dans la cadre du diagnostic initial. Il est particulièrement utile pour le suivi post-thérapeutique et pour l'étude des sujets porteurs asymptomatiques du parasite [42].

Concernant le choix des cibles des PCRs, aucune étude en Algérie n'a étudié les espèces *Leishmania* par le biais des gènes ITS1 ni des gènes Mini-exon. Au Maghreb, uniquement les gènes ITS1 ont été utilisés en Tunisie [437,438] et au Maroc [439–441]. Au monde, la PCR ITS1 est plus exploitée. Uniquement quelques études ont été trouvées sur la PCR Mini-exon [367].

Afin de mettre en place d'outils PCR-RFLP permettant le diagnostic de la leishmaniose et l'identification de l'espèce leishmanien, la mise au point de PCRs suivis de digestion avec des

enzymes de restriction (PCR-RFLP) a été effectuée sur de l'ADN extrait à partir d'isolats de culture et par la suite sur les prélèvements de leishmaniose cutanée et viscérale étalés sur des lames porte-objet archivés. Au début, la qualité d'ADN a été mesurée grâce à la PCR PO. Ensuite, une deuxième PCR ciblant la région non transcrite des gènes ARNr (ITS1), suivie d'une digestion par l'enzyme *HaeIII* a été validée. Aussi, une troisième PCR, ciblant les gènes codant pour les mini-exons, suivis par une digestion par *EaeI*, a été mise au point puis validée.

L'avantage de l'outil PCR ITS1-RFLP et PCR Mini-exon-RFLP est l'utilisation d'une seule enzyme de restriction qui donne des profils capable de différencier entre toutes les espèces *Leishmania* de l'ancien Monde. D'autres travaux ont montré par ailleurs, la présence de variations intra-spécifiques dans la région ITS1 alors qu'aucune variation n'est observée dans la région ITS2 [291,442].

Plusieurs cibles ont été précédemment étudiées par la technique PCR-RFLP, la majorité d'entre elles cible des gènes présents en plusieurs copies chez *Leishmania*. On peut citer : **(i)** Les gènes kinétoplastiques tel que l'ADN des minicercles [443–445] **(ii)** Les gènes nucléaires telles que les séquences codant pour la sous-unité de l'ARNr (SSU rRNA) [285,446,447], les régions ITS [442,448,449] et les séquences du gène mini-exon [404,450] **(iii)** Les séquences répétitives chez les leishmanies telles que les microsatellites [359].

En Algérie, la PCR-RFLP a été réalisées pour l'étude du polymorphisme des espèces de *Leishmania* ciblant les gènes *gp63* et *cpb* [451].

Concernant les méthodes d'extractions de l'ADN total, plusieurs méthodes ont été utilisées auparavant, comme la méthode du phénol/chloroforme [286,445,447,452], les kits commercialisés [414,453], ainsi que la lyse par des températures élevées [33,454]. Au cours de notre travail, nous avons choisi d'utiliser la méthode puissante du phénol/chloroforme car elle donne des très bons résultats, peu couteuse et faisable au niveau du laboratoire (disponibilité du matériel approprié).

L'extraction d'ADN à partir des lames en utilisant un tampon de lyse et purification au phénol-chloroforme a été utilisée avec succès par plusieurs auteurs [288,452,455–457]. Elle permet d'obtenir une très bonne qualité de l'ADN. Cependant, le phénol et le chloroforme sont très toxiques et leur utilisation nécessite une infrastructure appropriée (hotte chimique adaptée, élimination des déchets ...). D'autre auteurs ont par ailleurs montré que l'ADN extrait par simple chauffage était très approprié pour l'amplification, sans le recours à d'autres méthodes d'extraction plus astreignantes comme l'extraction au phénol/chloroforme ou par des méthodes

couteuses comme les kits d'extraction commercialisés [458]. Cependant, le chauffage donne un ADN avec une faible qualité par rapport aux deux méthodes précédentes.

La richesse de la lame en amastigotes est aussi un facteur qui devrait être pris en compte lors de l'extraction de l'ADN et de la réalisation des PCRs. En effet, certains auteurs ont recherché une corrélation entre la richesse des lames et la détection d'ADN de *Leishmania* et ont montré que le résultat de la PCR ne paraît pas être influencé par la richesse en amastigotes [452]. Par contre, d'autres auteurs ont trouvé que le pourcentage de PCRs positives serait liée à l'abondance des parasites au sein de la lame [455]. Dans les autres études, la richesse des lames n'a pas été évaluée [33,288,456,459]. Dans la présente étude, nous avons aussi étudié ce facteur et nous avons trouvé que la richesse des lames en parasite influence les résultats des PCRs (Tableau 60 et 61).

La quantité de l'ADN obtenu peut influencer les résultats de la PCR. Cependant, on a pu obtenir des amplifications par les deux PCRs même avec de très petites quantités d'ADN extraits de lames voir $<0,1\text{ng}/\mu\text{l}$ (Tableau 58 et 59).

Il faut noter aussi que même avec une mauvaise qualité de l'ADN confirmée avec une PCR PO négative, nous avons pu obtenir des PCR ITS1 et PCR Mini-exon positives (Tableau 62).

Concernant les résultats comparés des PCRs, la PCR ITS1 était plus pertinente (87,88%) par rapport à la PCR mini-exon (77,27%). Ceci pourrait être expliqué par la taille du produit d'amplification par la PCR ITS1 est plus petite que celle obtenue par la PCR mini-exon ce qui serait en faveur de l'obtention de produits d'amplification même si l'échantillon d'ADN n'est pas d'une grande qualité.

En ce qui concerne l'identification moléculaire des parasites, différentes techniques basées sur les PCRs ont été auparavant utilisées pour caractériser les parasites *Leishmania* isolés à partir des lames archivées. Les cibles les plus utilisées sont : l'ITS [288,455,456] et les régions conservées des mini cercles des ADNs kinétoplastiques [458]. La PCR ITS1-RFLP est connue pour sa valeur taxonomique largement validée dans la littérature. Par ailleurs, les gènes répétés mini-exon ont été aussi validés dans la littérature comme étant un bonne cible de discrimination entre les espèces *Leishmania* de l'Ancien Monde et aussi du Nouveau monde. Dans ce travail, les PCR-RFLP ciblant les gènes ITS1 et mini-exon ont été validées en utilisant de l'ADN de plusieurs échantillons représentatifs des espèces de l'Ancien Monde. Nous avons ainsi prouvé la capacité de ces outils à être appliqués sur de petites quantités d'ADN extraits de lames.

Des lames archivées provenant de patients atteints de leishmaniose cutanée et viscérale ont été utilisées pour identifier l'espèce leishmanien en question. Ce travail a porté sur 86 lames réalisées lors de l'examen direct de patients (66 lames de LC et 20 lames de LV). Les ADN correspondants aux lames de patients ont été extraits par la méthode du Phénol/chloroforme.

Sur les 86 ADNs de lames archivés, nous avons obtenu au total 70 et 62 résultats positifs par la PCR ITS1 et la PCR mini-exon respectivement (Tableau 62). La digestion par PCR-RFLP (ITS1 et mini-exon) a montré des profils de restrictions semblables à ceux des isolats de référence, ce qui a permis une identification de l'espèce en question. Pour certains échantillons, nous n'avons pas pu identifier l'espèce *Leishmania* étant donné que l'intensité de la bande issue de la PCR était faible, ce qui a engendré un profil RFLP presque non visible. Concernant les autres échantillons, où les produits PCR étaient de bonne intensité, que ce soit en PCR ITS1 ou mini-exon, les profils de restriction ont permis de faire l'identification précise de l'espèce causale.

Tous les résultats de l'identification des deux PCRs sont en concordance. Douze échantillons de la LV ont été confirmés qu'ils contiennent *L. infantum*, alors que 36 échantillons de la LC contiennent aussi *L. infantum* et 19 autres échantillons sont correspondants à l'espèce *L. major*, et enfin, un seul échantillon porte l'espèce *L. tropica* (Tableau 67).

La distribution géographique de ces espèces montre que *L. infantum* responsable de la LV est localisée surtout à Souk Ahras suivi de Annaba, Guelma et Tebessa. Aussi *L. infantum* responsable de la LC se trouve surtout à Guelma, Annaba et Souk Ahras. Tandis-que *L. major* est localisée à Annaba et Biskra. Le seul cas de *L. tropica* siège à Annaba (Tableau 69).

Cette étude a montré que la majorité des souches identifiées à partir de nos prélèvements cutanés appartient au complexe *L. infantum* avec une co-existence avec d'autres espèces responsables de la LC et la LV.

Ces résultats sont en concordance avec d'autres études qui ont trouvés que *L. infantum* est responsable de la LV, LC et la leishmaniose canine [106,107,460–462]. Tandis que la leishmaniose cutanée-zoonotique (LCZ) à *L. major* [94,101,106,111] et la leishmaniose cutanée chronique à *L. tropica* [95,463,464]. Il faut noter que la plupart de ces études se sont basés sur la MLEE.

Le complexe pathogène leishmanien (parasite, vecteur, réservoir) évolue dans une aire géographique définie par des paramètres biologiques. L'équilibre entre ces paramètres et les hôtes assure la permanence du cycle épidémiologique de la parasitose en question.

Donc, l'émergence ou la réémergence des leishmanioses est directement liée à la présence de l'ensemble de ces facteurs de risque.

Adossée aux données biologiques, la modélisation mathématique permet d'intégrer ces connaissances dans une construction dynamique et quantitative, et de proposer à terme une aide à la réflexion et à la prédiction. C'est pourquoi nous proposons le développement d'un modèle exploratoire multi-agents du cycle de transmission de la leishmaniose.

En Algérie, les leishmanioses présentent tout un ensemble de syndromes du fait de la variété des parasites et chacun d'entre eux est lié à un vecteur et à un réservoir spécifique.

Le modèle NetLogo permet l'étude du comportement des systèmes complexes au fil du temps et de l'espace [465]. Nous avons mis en place notre modèle sur cette idée.

Les graphes obtenus montrent que la population subit des rechutes d'infection à *Leishmania* successives suivies des périodes de guérisons très rapides. Selon l'espèce de *Leishmania* responsable de l'infection, on remarque que *L. infantum* responsable de la LC reste l'espèce dominante, suivi de *L. infantum* responsable de la LV ensuite *L. major* et enfin *L. killicki* (Figure 30).

Ces résultats sont en accord avec nos résultats obtenus de la distribution des espèces de *Leishmania* dans notre région sauf pour *L. major*. Le nombre élevé des cas de *L. major* signalés dans la partie de l'étude moléculaire des échantillons est due peut être à l'infestation du Nord de l'Algérie par la *L. major* provenant des foyers classiques du Sud du pays [466].

Ces résultats suggèrent que *L. infantum* responsable de la LC continuera à s'accroître au profit des autres espèces (Figure 30).

Ce modèle pourrait être amélioré en prenant en compte d'autres éléments tel que les facteurs environnementales [467].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La leishmaniose demeure une maladie endémique en Algérie, caractérisée par ses panoplies de manifestations cliniques et son extension à des nouveaux foyers. Un diagnostic précis est alors requis pour un meilleur traitement et prise en charge de la maladie.

Notre étude souligne la complexité de la mise en évidence de la leishmaniose. Le diagnostic est difficile car les formes cliniques sont parfois atypiques.

La LC touche différentes tranches de la population. Les effets pathogéniques de l'infection à la LV se potentialisent chez les enfants à jeune âge (LVI) et les adultes immunodéprimés par le VIH, majorant la morbidité/mortalité, avec une moindre efficacité des traitements.

Le diagnostic clinique est confirmé par des outils parasitologiques ou immunologiques ou bien la mise en évidence d'ADN de *Leishmania* par PCR dans les sérosités cutanées et les moelles osseuses (MO).

Deux PCRs à partir des échantillons étalés sur lames ont été appliquée avec succès et qui ont permis la confirmation du diagnostic de la leishmaniose et l'identification des différentes espèces de *Leishmania* dans la zone de l'étude qui est considérée comme étant une zone d'endémie.

Pour toute forme de leishmaniose, un diagnostic précoce et un bon suivi thérapeutique est nécessaire pour augmenter les chances de guérison. La prévention reste difficile dans les zones à risque en période d'activité des moustiques.

Quant à la LC, non seulement elle est causée par 3 espèces de *Leishmania* co-existants dans la même région, mais aussi la LC due à *L. infantum* qui n'est plus sporadique au sein des foyers classiques de la LV (région d'Alger et la grande Kabylie) [114].

Au terme de cette étude, les outils PCR-RFLP que nous avons utilisés ce sont révélés sensibles et spécifiques. Leur application nous a permis d'identifier les espèces *Leishmania* en utilisant de petites quantités d'ADN prélevées à partir des lames de patients.

Ainsi, il serait intéressant de poursuivre ce travail en effectuant un séquençage des produits amplifiés, puisque ce dernier va permettre non seulement l'identification de l'espèce grâce aux séquences spécifiques mais aussi de détecter tout polymorphisme potentiel entre

isolats. En addition, une étude du polymorphisme des souches de *Leishmania* isolés par culture cellulaire à l'aide de l'outil MLST est envisageable.

Enfin, une étude minutieuse approfondie des auteurs du cycle de transmission des leishmanies s'avère nécessaire dans le but de l'établissement d'un plan sur la stratégie de lutte contre ce parasite en Algérie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dedet, J. P., Carne, B., Desbois, N., Bourdoiseau, G., Lachaud, L., *et al.* (2013). Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *La Presse Médicale*, 42(11), 1469-1481.
2. Spanakos, G., Piperaki, E. T., Menounos, P. G., Tegos, N., Flemetakis, A., *et al.* (2008). Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1), 46-53.
3. Molyneux, D. H., Ashford, R. W. (1983). *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*. London, UK; Taylor & Francis Ltd.
4. de Souza, W. (Ed.). (2010). *Structures and organelles in pathogenic protists* (Vol. 17). Springer Science & Business Media.
5. World Health Organization. (1993). La Leishmaniose. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/121275/1/em_rc40_7_fr.pdf
6. Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis 1. *Annual reviews in microbiology*, 55(1), 453-483.
7. Filippi, C., Malherbe, L., Julia, V., Glaichenhaus, N. (2001). L'immunité contre les leishmanies. *médecine/sciences*, 17(11), 1120-1128.
8. Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of Infection*, 69, S10-S18.
9. Olivier, M., Gregory, D. J., Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 293-305.
10. Silva, E. S. D., Pacheco, R. S., Gontijo, C. M. F., Carvalho, I. R., & Brazil, R. P. (2002). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(3), 145-149.
11. Kimutai, A., Ngure, P., Tonui, W., Gicheru, M., Nyamwamu, L. (2009). Leishmaniasis in Northern and Western Africa: a review. *African Journal of Infectious Diseases*, 3(1), 14-25.
12. Riyad, M., Chiheb, S., Soussi-Abdallaoui, M. (2013). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Morocco: still a topical question/Leishmaniose cutanée due à *Leishmania major* au Maroc: une question encore d'actualité. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 19(5), 495.
13. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., *et al.* (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet infectious diseases*, 2(8), 494-501.

14. Gay, E., Guegan, H., Ameline, M., Gangneux, J. P. (2015). Les leishmanioses humaines: parasitoses importées et autochtones. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015(477), 61-65.
15. Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J., Lopez-Velez, R. (2014). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(8), e3021.
16. Hamel, H. (1860). *Étude comparée des boutons d'Alep et de Biskra*. V. Rozier.
17. Lemaire, X. (1911). Premiers cas de leishmaniose en Algérie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 4, 554-563.
18. Fendri, A. H., Beldjoudi, W., Ahraou, S., & Djaballah, M. (2012). Les leishmanioses diagnostiquées au CHU Benbadis de Constantine (Algérie): bilan de cinq années (2006–2010). *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 105(1), 46-48.
19. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., *et al.* (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.
20. Bachi, F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'infectiologue*, 21(1), 9-15.
21. Ricciardi, A., Ndao, M. (2015). Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On?. *Journal of biomolecular screening*, 20(1), 6-21.
22. Chouih, E., Amri, F., Bouslimi, N., Siala, E., Selmi, K., *et al.* (2009). Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses. *Pathologie Biologie*, 57(3), 219-224.
23. Sundar, S., Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(5), 951-958.
24. Elmahallawy, E. K., Martinez, A. S., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., *et al.* (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(08), 961-972.
25. Ahmed, S. B. H., Kaabi, B., Chelbi, I., Cherni, S., Derbali, M., *et al.* (2011). Colonization of *Phlebotomus papatasi* changes the effect of pre-immunization with saliva from lack of protection towards protection against experimental challenge with *Leishmania major* and saliva. *Parasites & vectors*, 4(1), 126.
26. Makala, L. H., Baban, B. (2014). Novel Therapeutic Approaches to Leishmania Infection. In *Leishmaniasis—Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech.
27. Delamare, J. (2006). *Dictionnaire abrégé des termes de médecine*. Maloine.

28. Burke, B., Lewis, C. E. (Eds.). (2002). The macrophage. Oxford University Press, Oxford UK.
29. Wilson, M. E., Jeronimo, S. M., Pearson, R. D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial pathogenesis*, 38(4), 147-160.
30. OMS. WHO web site [Internet]. [cited 28 May 2016]. Available : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
31. OMS. (2005). Stratégie OMS de coopération avec les pays République algérienne démocratique et populaire 2002 - 2005.
32. Martin-Sanchez, J., Pineda, J. A., Morillas-Marquez, F., Garcia-Garcia, J. A., Acedo, C., et al. (2004). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(5), 545-548.
33. Volpini, A. C., Marques, M. J., Lopes dos Santos, S., Machado-Coelho, G. L., Mayrink, W., et al. (2006). *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical microbiology and infection*, 12(8), 815-818.
34. Vouldoukis, I., Rougier, S., Dugas, B., Pino, P., Mazier, D., et al. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary parasitology*, 135(2), 137-146.
35. Ministério da Saúde (BR)^ dSecretaria de Vigilância em Saúde. (2007). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.
36. Sharma, U., Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47, 412-423.
37. Idrissi, M. L., El Ouardi, M., Atmani, S., Elarqam, L., Bouharrou, A. et al. (2007). La leishmaniose viscérale infantile: à propos de 209 cas. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 20(3), 136-141.
38. Mazelet, L. (2004). La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen français. *Mémoire de Maîtrise en Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France. 31p.*
39. Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., Votypka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, 34(11), 1221-1227.

40. Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., *et al.* (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary parasitology*, 155(3), 198-203.
41. Carreira, J. C. A., Magalhães, M. A. F., da Silva, A. V. M. (2014). The geospatial approach on eco-epidemiological studies of leishmaniasis. In *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech. 125–145.
42. Rosenthal, E., Marty, P. (2009). Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *La Revue de médecine interne*, 30, S24-S28.
43. Faucher, B., Piarroux, R. (2011). Visceral leishmaniasis: an update. *La Revue de médecine interne*, 32(9), 544-551.
44. Laffitte, M. C. (2016). Caractérisation des mécanismes de réarrangements géniques chez le parasite *Leishmania* résistant aux drogues (Doctoral dissertation, Université Laval).
45. Pearson, R. D., Jeronimo, S. M., De Sousa, A. (2001). Leishmaniasis, pp: 287-331. In: Gillespie S, Pearson R (eds), Principles and Practice of Parasitology. 2001, John Wiley & Sons, New York.
46. Rhajaoui, M. (2011). Les leishmanioses humaines au Maroc: une diversité nosogéographique. *Pathologie Biologie*, 59(4), 226-229.
47. World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. In Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis.. World Health Organization.
48. Biezunski, N. (2013). Co-infection leishmaniose viscerale -infection VIH : A propos de cinq cas suivis dans le Service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Toulouse, 2007 –2013. (Thèse de doctorat. Université Toulouse III).
49. Sergent, E., Et, P. I., Donatien, A., Beguet, M. (1926). Transmission expérimentale du bouton d'Orient (clou de Biskra) à l'homme par *Phlebotomus papatasi* (Scop.). *Arch Inst Pasteur*, 40, 411-430.
50. Killick-Kendrick, R. (2013). The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903–1942. *Bull Soc Pathol Exot*, 106(2), 131-7.
51. Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65(3), 111-125.
52. Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M., *et al.* (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, 222(1), 107-117.

53. Dumon, P. H., Piarroux, R. (1995). Identification of leishmaniasis: current clinical and epidemiological tools. *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial*, 55(2), 123.
54. Schönian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends in parasitology*, 26(10), 466-469.
55. Dedet, J. P. (2001). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encycl Med Chir Mal Infect*.
56. Hide, M. (2004). Variabilité pathogénique du complexe "*Leishmania (Leishmania) donovani*", agent de la leishmaniose viscérale: Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
57. Dickson D. Despommier, Robert W. Gwadz, Peter J. Hotez, C. A. Knirsch. (2005). Parasitic Diseases. 5th ed. New York: Apple Trees Productions.
58. ANOFEL. (2014). Leishmanioses. Université Médicale Virtuelle Francophone, editor.
59. Rashid, A. M. (2014). Diagnosis of Leishmaniasis in Children. In Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. InTech.
60. Manuel terrestre de l'OIE. (2008). Leishmaniose, Chapitre 2.1.8. 263-274.
61. Codonho, B. S., Costa, S. D. S., Peloso, E. D. F., Joazeiro, P. P., Gadelha, F. R. *et al.* (2016). HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(7), 460-468.
62. Dupé, A. (2013). Étude des éléments régulateurs "*cis*" et "*trans*" impliqués dans la stabilité du transcrit de l'amastine au stade intracellulaire chez "*Leishmania*" (Doctoral dissertation, Université Laval).
63. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., *et al.* (2013). The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003594.
64. Bates, P. A. (1995). The lipophosphoglycan-associated molecules of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 11(9), 317-318.
65. Pimenta, P. F., Saraiva, E. M., Sacks, D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental parasitology*, 72(2), 191-204.
66. McConville, M. J., Schnur, L. F., Jaffe, C., Schneider, P. (1995). Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter-and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*, 310(3), 807-818.

67. Dermine, J. F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A., Desjardins, M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cellular microbiology*, 2(2), 115-126.
68. Mélissa, E. K. (2014). Rôle de l'ADN dans l'activation du TLR9 lors de l'infection par *Leishmania major*: Propriétés des séquences génomiques (Doctoral dissertation, Institut Pasteur).
69. Guha-Niyogi, A., Sullivan, D. R., Turco, S. J. (2001). Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*, 11(4), 45R-59R.
70. Yao, C., Donelson, J. E., Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and biochemical parasitology*, 132(1), 1-16.
71. Dujardin, J. C., Victoir, K., De Doncker, S., Guerbouj, S., Arévalo, *et al.* (2002). Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S81-S86.
72. Ramamoorthy, R., Swihart, K. G., McCoy, J. J., Wilson, M. E., Donelson, J. E. (1995). Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12133-12139.
73. Ilg, T. (2000). Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 16(11), 489-497.
74. Peters, C., Stierhof, Y. D., Ilg, N. T. (1997). Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infection and immunity*, 65(2), 783-786.
75. Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and molecular pathology*, 72(2), 132-141.
76. Hallé, M., Gomez, M. A., Stuiblé, M., Shimizu, H., McMaster, W. R., *et al.* (2009). The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6893-6908.
77. Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, 4(1), 1-24.
78. Dokhan, M. R., Kenawy, M. A., Doha, S. A., El-Hosary, S. S., Shaibi, T., *et al.* (2016). Entomological studies of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in relation to cutaneous leishmaniasis transmission in Al Rabta, North West of Libya. *Acta tropica*, 154, 95-101.

79. Krenn, H. W., Aspöck, H. (2012). Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod structure & development*, 41(2), 101-118.
80. Health Protection Agency, National Travel Health Network and Centre. (2007). Leishmaniasis.
81. Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27(2), 123-147.
82. Ayari, C., Othman, S. B., Chemkhi, J., Tabbabi, A., Fisa, R., *et al.* (2016). First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Sintonius) clydei* (Sinton, 1928, *Psychodidae: Phlebotominae*), from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 241-248.
83. Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, 17(3), 279-289.
84. Boussaa, S., Boumezzough, A. (2014). Identification et caractérisation des gîtes larvaires de phlébotomes (*Diptera : Psychodidae*) à Marrakech (Maroc). *Faunistic Entomology*, 67, 93-101.
85. El-Hossary, S. (2006). Morphological characteristics for sand fly taxonomy. *Research and Training Center on Vector of Diseases, Ain Shams University, Cairo, Egypt*, 1-25.
86. Maroli M. Cycle biologique du phlébotome [Internet]. [cited 13 May 2017]. Available: <http://www.gruppoleishmania.org/fr/cycle-biologique-du-phlébotome>
87. Léger, N., Depaquit, J. (2001). Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Francaise des Laboratoires*, 2001(338), 41-48.
88. Molina, R., Gradoni, L., Alvar, J. (2003). HIV and the transmission of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(sup1), 29-45.
89. Cruz, I., Morales, M. A., Noguer, I., Rodriguez, A., Alvar, J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet*, 359(9312), 1124-1125.
90. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., *et al.* (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews*, 21(2), 334-359.
91. Izri, M. A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pratlong, S., *et al.* (1990). *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie). *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 65(3), 150-150.
92. Benallal, K., Gassen, B., Bouiba, L., Depaquit, J., Harrat, Z. (2013). Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta tropica*, 128(3), 518-521.

93. Izri, M. A., Belazzoug, S. (1993). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 399.
94. Izri, M. A., Belazzoug, S., Pratlong, F., Rioux, J. A. (1992). Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Biskra. Completion of an epidemiological saga. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67(1), 31-32.
95. Boubidi, S., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., et al. (2011). *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaia, south Algeria. *Microbes and Infection*, 13(7), 691-696.
96. Alam, M. S., Ghosh, D., Khan, M. G. M., Islam, M. F., Mondal, D., et al. (2011). Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC veterinary research*, 7(1), 27.
97. Dereure, J., Pratlong, F., Dedet, J. P. (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. In *Canine Leishmaniasis: an update. Barcelona: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum* (pp. 18-25).
98. Ben Ismail, R., Ben Rachid, M. S., Gradoni, L., Gramiccia, M., Helal, H., et al. (1987). La leishmaniose cutanée zoonotique en Tunisie. Etude du réservoir dans le foyer de Douara. *Ann Soc Belg Med Trop*, 67, 335-343.
99. Pinto, M. C., Campbell-Lendrum, D. H., Lozovei, A. L., Teodoro, U., Davies, C. R. (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and veterinary entomology*, 15(2), 132-139.
100. Forget, G. (2004). Étude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée (Doctoral dissertation, Université Laval).
101. Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., et al. (2009). Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 14(9), 1071-1085.
102. Dedet, J. P., Addadi, K., Lannuzel, B. (1977). Épidémiologie des leishmanioses en Algérie: 7-La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 70(3), 250-265.
103. Belazzoug, S. (1987). La leishmaniose canine en Algérie. *Maghreb Veterinaire*, 3, 11-13.
104. Ait-Oudhia, K., Lami, P., Lesceu, S., Harrat, Z., Hamrioui, B., et al. (2009). Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 103(8), 679-692.

105. Aït-Oudhia, K., Harrat, Z., Benikhlef, R., Dedet, J. P., Pratlong, F. (2011). Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta tropica*, 118(2), 80-86.
106. Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., (1996). *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 625-629.
107. Benikhlef, R., Harrat, Z., Toudjine, M., Djerbouh, A., Bendali-Braham, S., et al. (2003). Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial*, 64(4), 381-383.
108. Benikhlef, R., Aoun, K., Bedoui, K., Harrat, Z., Bouratbine, A. (2009). Premières identifications de *Leishmania infantum* MON-80 chez le chien en Algérie et en Tunisie. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160(10), 464-466.
109. Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., et al. (2012). *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 105(1), 5-7.
110. Belazzoug, S. (1983). Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie). Infestation naturelle de *Psammomys obesus* (rongeur, gerbillide). *Bulletin de la Societe Pathologie Exotique et de ses filiales*. 76, 146-149.
111. Belazzoug, S. (1983). Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 876.
112. Belazzoug, S. (1986). Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeur, Gerbillidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 79(5), 630-633.
113. Chaara, D., Haouas, N., Dedet, J. P., Babba, H., Pratlong, F. (2014). Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta tropica*, 132, 80-93.
114. Aoun, K., Bouratbine, A. (2014). Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, 21, 14.
115. Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murray, A., McMaster, W. R. (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and biochemical parasitology*, 152(1), 35-46.
116. Kumar, R., Engwerda, C. (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, 3(3), e13.

117. Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., *et al.* (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection*, 50(1), 53-60.
118. Carré, N., Collot, M., Guillard, P., Horellou, M., Gangneux, J. P. (2010). La leishmaniose viscérale. *Journal de Pharmacie Clinique*, 29(3), 121-148.
119. Rouani, S. (2009). La leishmaniose viscérale infantile a taza: etude prospective (à l'hôpital Ibn Baja) (Doctoral dissertation).
120. Basiye, F. L., Mbuchi, M., Magiri, C., Kirigi, G., Deborggraeve, S., *et al.* (2010). Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Tropical Medicine & International Health*, 15(7), 806-810.
121. Chang, K. P., Reed, S. G., McGwire, B. S., Soong, L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta tropica*, 85(3), 375-390.
122. Santarém, N., Cordeiro da Silva, A. (2007). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz: Formatex*. 839-846.
123. Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, 6, 147-154.
124. [13]OMS. No Title [Internet]. Available: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/fr/>
125. WHO. Leishmaniasis [Internet]. 2012. Available: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
126. Gelanew, T., Hurissa, Z., Diro, E., Kassahun, A., Kuhls, K., *et al.* (2011). Disseminated cutaneous leishmaniasis resembling post-kala-azar dermal leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in three patients co-infected with visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in Ethiopia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(6), 906-912.
127. Dedet, J. P. (1999). Les leishmanioses. In *Les leishmanioses*. Ellipses. 253.
128. Aoun, K., Kooli, C., Bouratbine, A., Romdhane, N. B., Kaaroud, H., *et al.* (2002). Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose viscérale de l'adulte en Tunisie. *Médecine et maladies infectieuses*, 32(7), 387-392.
129. IPA. No Title [Internet]. [cited 22 Feb 2011]. Available: <http://www.pasteur.dz/site/sante-publique>

130. Roberts, L. S., Janovy, J., Schmidt, G.D. Gerald, D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology (Roberts, L. S., and Janovy, J., Jr., eds). 7th Ed, pp 61–88, McGraw-Hill, New York 3. 2000;5th: 347–410.
131. Del Giudice, P. (2009). Ulcérations chroniques. *Images en dermatologie*, 2(1), 10-11.
132. Lainson, R., Shaw, J. J. (2005). New world leishmaniasis. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*.
133. Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*, 30(12), 1269-1281.
134. David, C., Dimier-David, L., Vargas, F., Torrez, M., Dedet, J. P. (1993). Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 7-9.
135. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., *et al.* (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature reviews microbiology*, 5(11), 873-882.
136. Zhang, W. W., Matlashewski, G. (2010). Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection. *Molecular microbiology*, 77(2), 505-517.
137. Desjeux, P., Alvar, J., Gradoni, L., Gramiccia, M., Medrano, F. J., *et al.* (1996). Epidemiological analysis of 692 retrospective cases of Leishmania/HIV coinfections. *WHO/LEISH*, 39, 1-11.
138. Dedet, J. P., Lambert, M., Pratlong, F. (1995). Leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 24(22), 1036-1040.
139. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., *et al.* (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews*, 21(2), 334-359.
140. Anema, A., Ritmeijer, K. (2005). Treating HIV/AIDS and leishmaniasis coinfection in Ethiopia. *Canadian Medical Association Journal*, 172(11), 1434-1435.
141. Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., *et al.* (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), 581-596.
142. Durand, I., Beylot-Barry, M., Weill, F. X., Doutre, M. S., Beylot, C. (1998). Leishmaniose cutanée diffuse révélatrice d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* (Vol. 125, No. 4, pp. 268-270). Masson.

143. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., *et al.* (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(3), e0004349.
144. Harrat, Z., Hamrioui, B., Belkaïd, M., Tabet-Derraz, O. (1995). Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 88(4), 180.
145. Mihoubi, I., Monbrison, F. D., Romeuf, N., Moulahem, T., Picot, S. (2006). Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algerie). *Médecine tropicale*, 66(1), 39-43.
146. Harrat, Z., Berrouane, Y., Abdesslam, S. B., Belkaid, M., Tabet-Derraz, O. (1992). La leishmaniose viscerale em Algerie evolution de la leishmaniose viscerale dans le Foyer de Grande Kabyle. *Arch Inst Pasteur Algérie*, 58, 255-72.
147. Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., *et al.* (1999). Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 341(24), 1795-1800.
148. Chungu, C. N., Owate, J., Pamba, H. O., Donno, L. (1990). Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), 221-225.
149. Thakur, C. P., Olliaro, P., Gothoskar, S., Bhowmick, S., Choudhury, B. K., *et al.* (1992). Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (= paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(6), 615-616.
150. Sundar, S., Kumar, P., Makharia, M., Goyal, A., Rogers, M., *et al.* (1998). Atovaquone Alone or with Fluconazole as Oral Therapy. *Clinical infectious diseases*, 27, 215-216.
151. Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F. S., Carvalho, E. M., Pedral-Sampaio, D., *et al.* (1990). Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *New England Journal of Medicine*, 322(1), 16-21.
152. Falcoff, E., Taranto, N. J., Remondegui, C. E., Dedet, J. P., Canini, L. M., *et al.* (1994). Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon- γ and pentavalent antimonial compounds. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 95-97.
153. Arevalo, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T. C., Najjar, E., *et al.* (2001). Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1847-1851.

154. Elnaiem, D. A., Elnahas, A. M., Aboud, M. A. (1999). Protective efficacy of lambda-cyhalothrin-impregnated bednets against *Phlebotomus orientalis*, the vector of visceral leishmaniasis in Sudan. *Medical and veterinary entomology*, 13(3), 310-314.
155. Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'Orazi, A., Gradoni, L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and veterinary entomology*, 15(4), 358-363.
156. Halbig, P., Hodjati, M. H., Mazloumi-Gavgani, A. S., Mohite, H., Davies, C. R. (2000). Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Medical and veterinary entomology*, 14(2), 223-226.
157. Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, 290(5495), 1351-1354.
158. Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., *et al.* (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22), 7845-7850.
159. Bastien, P., Lachaud, L. (2016). Leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. *EMC Maladies infectieuses*. 13, 1-14.
160. Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Jauffret, Y., Dedet, J. P., *et al.* (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic acids research*, 24(9), 1688-1694.
161. Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S., Papadopoulou, B. (2003). Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *médecine/sciences*, 19(10), 900-909.
162. Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., *et al.* (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome research*, 21(12), 2129-2142.
163. Brotherton, M. C. (2013). Études protéomiques chez le parasite protozoaire *Leishmania* (Doctoral dissertation, Université Laval).
164. Myler, P. J., Stuart, K. D. (2000). Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Current opinion in microbiology*, 3(4), 412-416.
165. Myler, P. J., Sisk, E., McDonagh, P. D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., *et al.* (2000). Gene Action and Cellular Function in Parasitic Protozoa. *Biochemical Society Transactions*, 28(part 5), 527-531.

166. Tosato, V., Ciarloni, L., Ivens, A. C., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., *et al.* (2001). Secondary DNA structure analysis of the coding strand switch regions of five *Leishmania major* Friedlin chromosomes. *Current genetics*, 40(3), 186-194.
167. Kebe, N. M. (2012). Etude du protéasome "ancestral" HsIVU de *Leishmania major* (Doctoral dissertation, Montpellier 1).
168. Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-442.
169. Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, 39(7), 839-847.
170. Downing, T., Imamura, H., Decuypere, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., *et al.* (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome research*, 21(12), 2143-2156.
171. Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J. F., Légaré, D., *et al.* (2012). Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic acids research*, 40(3), 1131-1147.
172. Raymond, F. (2011). Bio-informatique pour la génomique et le diagnostic des maladies infectieuses (Doctoral dissertation, Université Laval).
173. Dujardin, J. C. (2009). Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution?. *Infection, genetics and evolution*, 9(2), 290-297.
174. Smith, D. F., Peacock, C. S., Cruz, A. K. (2007). Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International journal for parasitology*, 37(11), 1173-1186.
175. Zhang, W. W., Matlashewski, G. (2001). Characterization of the A2–A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Molecular microbiology*, 39(4), 935-948.
176. Zhang, W. W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., *et al.* (2003). Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35508-35515.
177. Rochette, A. (2008). Étude globale des gènes différemment exprimés entre les différents stades de vie et espèces du parasite *Leishmania* à l'aide d'approches génomiques (Doctoral dissertation, Université de Laval).

-
178. Hertz-Fowler, C., Peacock, C. S., Wood, V., Aslett, M., Kerhornou, A., *et al.* (2004). GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic acids research*, 32(suppl 1), D339-D343.
179. Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., *et al.* (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1), D457-D462.
180. Wong, A. K. C. (1995). Molecular genetics of the parasitic protozoan *Leishmania*. *Biochemistry and cell biology*, 73(5-6), 235-240.
181. Sterkers, Y., Lachaud, L., Crobu, L., Bastien, P. (2011). FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cellular microbiology*, 13(2), 274-283.
182. Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Molecular microbiology*, 86(1), 15-23.
183. Kazemi, B. (2011). Genomic organization of *leishmania* species. *Iranian journal of parasitology*, 6(3), 1-18.
184. Mannaert, A., Downing, T., Imamura, H., Dujardin, J. C. (2012). Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends in parasitology*, 28(9), 370-376.
185. Bañuls, A. L., Hide, M., Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*, 64, 451-458.
186. Dujardin, J. C., Henriksson, J., Victoir, K., Brisse, S., Gamboa, D., *et al.* (2000). Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the "one gene" evolutionary hypotheses?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4), 527-534.
187. Rochette, A., Raymond, F., Ubeda, J. M., Smith, M., Messier, N., *et al.* (2008). Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC genomics*, 9(1), 255.
188. Bard, E. (1989). Molecular biology of *Leishmania*. *Biochemistry and Cell Biology*, 67(9), 516-524.
189. Ullu, E., Tschudi, C. (1991). *Trans* splicing in trypanosomes requires methylation of the 5'end of the spliced leader RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(22), 10074-10078.
190. Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO journal*, 21(8), 1881-1888.

191. Campbell, D. A., Thomas, S., Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes and infection*, 5(13), 1231-1240.
192. Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., *et al.* (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular cell*, 11(5), 1291-1299.
193. McDonagh, P. D., Myler, P. J., Stuart, K. (2000). The unusual gene organization of *Leishmania major* chromosome 1 may reflect novel transcription processes. *Nucleic acids research*, 28(14), 2800-2803.
194. Myler, P. J., Audleman, L., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., *et al.* (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2902-2906.
195. Worthey, E. A., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Aggarwal, G., Cawthra, J., *et al.* (2003). *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic acids research*, 31(14), 4201-4210.
196. Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H., *et al.* (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: *cis*-splicing of pre-mRNA. *RNA*, 6(2), 163-169.
197. Miller, S. I., Landfear, S. M., Wirth, D. F. (1986). Cloning and characterization of a *Leishmania* gene encoding a RNA spliced leader sequence. *Nucleic acids research*, 14(18), 7341-7360.
198. LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L., Beverley, S. M. (1993). Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & development*, 7(6), 996-1007.
199. Milhausen, M., Nelson, R. G., Sather, S., Selkirk, M., Agabian, N. (1984). Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs?. *Cell*, 38(3), 721-729.
200. Bangs, J. D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., Boothroyd, J. C. (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805-9815.
201. Mair, G., Ullu, E., Tschudi, C. (2000). Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28994-28999.
202. Zeiner, G. M., Sturm, N. R., Campbell, D. A. (2003). The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38269-38275.

-
203. De Lafaille, M. C., Laban, A., Wirth, D. F. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5'DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2703-2707.
204. Huang, J., Van der Ploeg, L. H. (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3'splice acceptor site. *The EMBO journal*, 10(12), 3877.
205. Borst, P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 701-732.
206. Matthews, K. R., Tschudi, C., Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & development*, 8(4), 491-501.
207. Smith, M., Blanchette, M., Papadopoulou, B. (2008). Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC bioinformatics*, 9(1), 158.
208. Wang, Z., Kiledjian, M. (2000). The poly (A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6334-6341.
209. Bernstein, P., Ross, J. (1989). Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends in biochemical sciences*, 14(9), 373-377.
210. Jackson, R. J., Standart, N. (1990). Do the poly (A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?. *Cell*, 62(1), 15-24.
211. Lamontagne, J., Papadopoulou, B. (1999). Developmental Regulation of Spliced Leader RNA Gene in *Leishmania donovani* Amastigotes Is Mediated by Specific Polyadenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6602-6609.
212. Camier, S., Séraphin, B. (2007). Détruisez ce message (ARN) après l'avoir lu!. *médecine/sciences*, 23(10), 850-856.
213. Clayton, C., Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology*, 156(2), 93-101.
214. Haile, S., Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology*, 10(6), 569-577.
215. Yatime, L. (2005). *Rôle du facteur d'initiation e/aIF2 dans le démarrage de la traduction chez les Eucaryotes et chez les archées* (Doctoral dissertation, Ecole Polytechnique X).
216. Ohlmann, T., Derrington, E., López-Lastra, M., Deffaud, C., Bouchardon, A., & Darlix, J. L. (2000). L'initiation de la synthèse des protéines chez les eucaryotes.

-
217. Dhaliya, R., Reis, C. R., Freire, E. R., Rocha, P. O., Katz, R., *et al.* (2005). Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and biochemical parasitology*, 140(1), 23-41.
218. Yoffe, Y., Zuberek, J., Lerer, A., Lewdorowicz, M., Stepinski, J., *et al.* (2006). Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryotic cell*, 5(12), 1969-1979.
219. Stanton, J. D., Mensa-Wilmot, K. (2006). AUG-proximal nucleotides regulate protein synthesis in *Leishmania tropica*. *Molecular microbiology*, 61(3), 691-703.
220. Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P. J., Olafson, R. W., Zilberstein, D. (2008). Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*, 8(9), 1843-1850.
221. Chow, C., Cloutier, S., Dumas, C., Chou, M. N., Papadopoulou, B. (2011). Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. *Cellular microbiology*, 13(7), 1059-1077.
222. Allocco, J. J., Donald, R., Zhong, T., Lee, A., Tang, Y. S., *et al.* (2006). Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of *Leishmania major* promastigotes in vitro. *International journal for parasitology*, 36(12), 1249-1259.
223. Banerjee, S., Sen, A., Das, P., Saha, P. (2006). *Leishmania donovani* cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS microbiology letters*, 256(1), 75-82.
224. Kuhn, D., Wiese, M. (2005). LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. *Molecular microbiology*, 56(5), 1169-1182.
225. Genestra, M., Cysne-Finkelstein, L., Leon, L. (2004). Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell biochemistry and function*, 22(5), 315-320.
226. Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D., Wiese, M. (2005). LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Molecular microbiology*, 55(5), 1606-1615.
227. Erdmann, M., Scholz, A., Melzer, I. M., Schmetz, C., Wiese, M. (2006). Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. *Molecular biology of the cell*, 17(4), 2035-2045.
228. Wiese, M., Wang, Q., Görcke, I. (2003). Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*. *International journal for parasitology*, 33(14), 1577-1587.

-
229. Mischerikow, N., Heck, A. J. (2011). Targeted large-scale analysis of protein acetylation. *Proteomics*, 11(4), 571-589.
230. Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A., Myler, P. J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC genomics*, 10(1), 152.
231. Blanchard, S. (2004). Ingénierie de glycoside hydrolases pour la glycosylation des protéines recombinantes (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
232. Denny, P. W., Gokool, S., Russell, D. G., Field, M. C., Smith, D. F. (2000). Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11017-11025.
233. Mills, E., Price, H. P., Johner, A., Emerson, J. E., Smith, D. F. (2007). Kinetoplastid PPEF phosphatases: dual acylated proteins expressed in the endomembrane system of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, 152(1), 22-34.
234. Vercoutter-Edouart, A. S., Peyrat, J. P., Lemoinen, J., Hondemarck, H. (2001). Analyse protéomique: pourquoi-comment?. *Bulletin du cancer*, 88(7), 663-670.
235. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
236. Góngora, R., Acestor, N., Quadroni, M., Fasel, N., Saravia, N. G., et al. (2003). Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica*, 23(2), 153-160.
237. Walker, J., Vasquez, J. J., Gomez, M. A., Drummel-Smith, J., Burchmore, R., et al. (2006). Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(1), 64-73.
238. Paape, D., Barrios-Llerena, M. E., Le Bihan, T., Mackay, L., Aebischer, T. (2010). Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, 169(2), 108-114.
239. Lescuyer, P., Chevallet, M., Rabilloud, T. (2004). L'analyse protéomique: concepts, réalités et perspectives en thérapeutique. *médecine/sciences*, 20(5), 587-592.
240. Glish, G. L., Burinsky, D. J. (2008). Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(2), 161-172.
241. Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., et al. (2016). Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(1), e0004351.

-
242. Mouri, O., Morizot, G., Van der Auwera, G., Ravel, C., Passet, M., *et al.* (2014). Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(6), e2841.
243. Culha, G., Akyar, I., Zeyrek, F. Y., Kurt, Ö., Gündüz, C., *et al.* (2014). Leishmaniasis in Turkey: determination of *Leishmania* species by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Iranian journal of parasitology*, 9(2), 239.
244. Li, L., Li, J., Jin, H., Shang, L., Li, B., *et al.* (2012). Detection of *Leishmania donovani* infection using magnetic beads-based serum peptide profiling by MALDI-TOF MS in mice model. *Parasitology research*, 110(3), 1287-1290.
245. Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., *et al.* (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), 551-557.
246. Foucher, A. L., Späth, G. F., Pemberton, I. K. (2010). Probing the dynamic nature of signalling pathways by IMAC and SELDI-tof MS. *Archives of physiology and biochemistry*, 116(4-5), 163-173.
247. Ndao, M., Rainczuk, A., Rioux, M. C., Spithill, T. W., Ward, B. J. (2010). Is SELDI-TOF a valid tool for diagnostic biomarkers?. *Trends in parasitology*, 26(12), 561-567.
248. Pawar, H., Sahasrabudhe, N. A., Renuse, S., Keerthikumar, S., Sharma, J., *et al.* (2012). A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen—*Leishmania donovani*. *Proteomics*, 12(6), 832-844.
249. Hem, S., Gherardini, P. F., Hourdel, V., Morales, M. A., Watanabe, R., *et al.* (2010). Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics*, 10(21), 3868-3883.
250. Nirujogi, R. S., Pawar, H., Renuse, S., Kumar, P., Chavan, S., *et al.* (2014). Moving from unsequenced to sequenced genome: reanalysis of the proteome of *Leishmania donovani*. *Journal of proteomics*, 97, 48-61.
251. Ramirez, C., Puerta, C., Requena, J. M. (2011). Evidence of RNA editing in *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Parasitology research*, 108(3), 731-739.
252. Schneider, A. (2001). Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *International journal for parasitology*, 31(13), 1403-1415.
253. Lukeš, J., Hashimi, H., Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*, 48(5), 277-299.

-
254. Kabb, A. L., Opegard, L. M., McKenzie, B. A., Connell, G. J. (2001). A mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplastid editing. *Nucleic acids research*, 29(12), 2575-2580.
255. Gott, J. M. (2003). Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10583-10584.
256. Charest, H., Matlashewski, G. (1994). Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Molecular and cellular biology*, 14(5), 2975-2984.
257. Joshi, M., Dwyer, D. M., Nakhasi, H. L. (1993). Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, 58(2), 345-354.
258. Levick, M. P., Blackwell, J. M., Connor, V., Coulson, R. M., Miles, A., *et al.* (1996). An expressed sequence tag analysis of a full-length, spliced-leader cDNA library from *Leishmania major* promastigotes. *Molecular and biochemical parasitology*, 76(1-2), 345-348.
259. Lamontagne, J. (1998). Identification d'une copie du mini-exon différenciellement polyadénylé au stade amastigote du parasite protozoaire *Leishmania donovani* (Doctoral dissertation, Université de Laval).
260. Wu, Y., El Fakhry, Y., Sereno, D., Tamar, S., Papadopoulou, B. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Molecular and biochemical parasitology*, 110(2), 345-357.
261. Mcconville, M. J., Blackwell, J. M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15170-15179.
262. Ramamoorthy, R., Donelson, J. E., Paetz, K. E., Maybodi, M., Roberts, S. C., *et al.* (1992). Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1888-1895.
263. Voth, B. R., Kelly, B. L., Joshi, P. B., Ivens, A. C., McMaster, W. R. (1998). Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Molecular and biochemical parasitology*, 93(1), 31-41.
264. Burchmore, R. J., Landfear, S. M. (1998). Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 29118-29126.

265. Umasankar, P. K., Jayakumar, P. C., Shouche, Y. S., Patole, M. S. (2005). Molecular characterization of the hexokinase gene from *Leishmania major*. *Journal of Parasitology*, 91(6), 1504-1509.
266. Pabón, M. A., Cáceres, A. J., Gualdrón, M., Quiñones, W., Avilán, L., *et al.* (2007). Purification and characterization of hexokinase from *Leishmania mexicana*. *Parasitology research*, 100(4), 803-810.
267. Quiñones, W., Peña, P., Domingo-Sananes, M., Cáceres, A., Michels, P. A., *et al.* (2007). *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental parasitology*, 116(3), 241-251.
268. McKean, P. G., Denny, P. W., Knuepfer, E., Keen, J. K., Smith, D. F. (2001). Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cellular Microbiology*, 3(8), 511-523.
269. Mottram, J. C., Coombs, G. H., Alexander, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current opinion in microbiology*, 7(4), 375-381.
270. Barr, S. D., Gedamu, L. (2001). Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi* Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 34279-34287.
271. Rougeron, V., De Meeûs, T., Ouraga, S. K., Hide, M., Bañuls, A. L. (2010). “Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog*, 6(8), e1001004.
272. Schönian, G., El Fari, M., Lewin, S., Schweynoch, C., Presber, W. (2001). Molecular epidemiology and population genetics in *Leishmania*. *Medical microbiology and immunology*, 190(1), 61-63.
273. Bañuls, A. L., Hide, M., Tibayrenc, M. (2002). Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(Supplement 1), S9-S13.
274. Banuls, A. L., Guerrini, F., Pont, F. L., Barrera, C., Espinel, I., *et al.* (1997). Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(5), 408-411.
275. Dujardin, J. C., Bañuls, A. L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., DeDoncker, S., *et al.* (1995). Putative *Leishmania* hybrids in the eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, 59(4), 293-307.
276. Kreutzer, R. D., Yemma, J. J., Grogl, M., Tesh, R. B., Martin, T. I. (1994). Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (*Kinetoplastida*:

- Trypanosomatidae*). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 51(3), 301-307.
277. Gibson, W., Stevens, J. (1999). Genetic exchange in the *Trypanosomatidae*. *Advances in parasitology*, 43, 1-46.
278. Victoir, K., Dujardin, J. C. (2002). How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in parasitology*, 18(2), 81-85.
279. Vale, A. M., Fujiwara, R. T., da Silva Neto, A. F., Miret, J. A., Alvarez, D. C. C., *et al.* (2009). Identification of Highly Specific and Cross-Reactive Antigens of *Leishmania* Species by Antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* Naturally Infected Dogs. *Zoonoses and public health*, 56(1), 41-48.
280. Inga, R., De Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., *et al.* (1998). Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 92(2), 219-228.
281. Kebede, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Le Ray, D., Dujardin, J. C. (1999). Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Viannia*. *International journal for parasitology*, 29(4), 549-557.
282. Dujardin, J. C., Doncker, S. D., Victoir, K., Ray, D. L., Hamers, R., *et al.* (1994). Size polymorphism of chromosomes bearing gp63 genes in *Leishmania* of the braziliensis complex: indication of a rearrangement of the gp63 genes in *L. braziliensis* and *L. peruviana*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 88(4), 445-448.
283. Neffati, A., Kallel, K., Anene, S., Kaouech, E., Belhadj, S., *et al.* (2011). Choix des amorces: élément déterminant dans le diagnostic moléculaire de la leishmaniose cutanée. *Pathologie Biologie*, 59(6), e119-e123.
284. Van Eys Guillaume, J. J. M., Schoone, G. J., Kroon, N. C., Ebeling, S. B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and biochemical parasitology*, 51(1), 133-142.
285. Schönián, G., Kuhls, K., Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, 138(04), 405-425.
286. de Lima, A. C. S., Zampieri, R. A., Tomokane, T. Y., Laurenti, M. D., Silveira, F. T., *et al.* (2011). *Leishmania sp.* identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitology research*, 108(6), 1525-1531.

287. Weiss, J. B. (1995). DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 113-130.
288. Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., *et al.* (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(1), 349-358.
289. Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 44(4), 1435-1439.
290. Kuhls, K., Mauricio, I. L., Pratlong, F., Presber, W., Schönian, G. (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*, 7(11), 1224-1234.
291. El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. A., Oskam, L., *et al.* (2001). *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Experimental parasitology*, 97(1), 35-44.
292. Roelfsema, J. H., Nozari, N., Herremans, T., Kortbeek, L. M., Pinelli, E. (2011). Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Experimental parasitology*, 127(1), 36-41.
293. Almeida, M. E., Steurer, F. J., Koru, O., Herwaldt, B. L., Pieniazek, N. J., *et al.* (2011). Identification of *Leishmania spp.* by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Journal of clinical microbiology*, 49: 3143-3149.
294. Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., Michaeli, S. (2003). *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 830-840.
295. Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H. P., Felger, I. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 46(2), 115-124.
296. Le Fichoux, Y., Mary, C., Marty, P., Kubar, J. (1999). Diagnostic des leishmanioses. *Dedet JP (ed.). Les leishmanioses. Paris: Ellipses*, 191-203.
297. Al-Jurayyan, N. A., Al-Nasser, M. N., Al-Fawaz, I. M., Al Ayed, I. H., Al Herbish, A. S., *et al.* (1995). The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *Journal of tropical pediatrics*, 41(3), 143-148.
298. Raoult D. (2013). Manuel de prélèvement. Assistance Publique Hôpitaux de Marseille.V3, 1-27.
299. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561-1577.

-
300. del Giudice, P., Marty, P., Lacour, J. P., Perrin, C., Pratlong, F., *et al.* (1998). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Case reports and literature review. *Archives of dermatology*, 134(2), 193-198.
301. Mobarak, H. A. (2008). Isolation and cultivation of cutaneous *Leishmania* parasite by using different cultures media (Doctoral dissertation, University of kufa).
302. Cunha, J., Carrillo, E., Sánchez, C., Cruz, I., Moreno, J., *et al.* (2013). Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV-patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 6(1), 122.
303. Sharief, A. H., Khalil, E. A. G., Omer, S. A., Abdalla, H. S. (2008). Innovative serum-free medium for *in vitro* cultivation of promastigote forms of *Leishmania* species. *Parasitology international*, 57(2), 138-142.
304. Muniaraj, M., Gupta, A. K., Narayan, S., Kumar, S., Sinha, P. K., *et al.* (2005). Removal of bacterial and yeast contamination from *Leishmania* promastigote cultures, by agar plating. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(6), 617-621.
305. Izri, A., Belazzoug, S. (2007). Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. *Revue francophone des laboratoires*, 2007(396), 3-10.
306. Soliman, M. F. (2006). The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta tropica*, 97(2), 146-150.
307. Wéry, M. (1995). Protozoologie Médical, De Boeck, Bruxelles, Belgium, 273.
308. Manuel terrestre de l'OIE. (2005). Leishmaniose. 446-456.
309. Martinkovic, F., Marinculic, A. (2006). Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitology research*, 98(4), 378-380.
310. El Alami, S. (2009). 85 années de LEISHMANIOSE AU MAROC (Doctoral dissertation, Université Mohamed V. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat).
311. Boelaert, M., Rijal, S., Regmi, S., Singh, R., Karki, B., *et al.* (2004). A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(1), 72-77.
312. Iqbal, J., Hira, P. R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., *et al.* (2002). Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 475-479.
313. Badaró, R., Reed, S. G., Carvalho, E. M. (1983). Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different

- morphological forms of two *Leishmania* species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(3), 480-484.
314. Ryan, J. R., Smithyman, A. M., Rajasekariah, G. H., Hochberg, L., Stiteler, J. M., *et al.* (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 1037-1043.
315. Rajasekariah, G. H. R., Ryan, J. R., Hillier, S. R., Lisa, P. Y., Stiteler, J. M., *et al.* (2001). Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *Journal of immunological methods*, 252(1), 105-119.
316. Palatnik-de-Sousa, C. B., Gomes, E. M., Paraguai-de-Souza, E., Palatnik, M., Luz, K., *et al.* (1995). *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(4), 390-393.
317. Sousa, C. B., Gomes, E. M., Souza, E. P. D., Santos, W. R. D., Macedo, S. R. D., *et al.* (1996). The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*: a new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(2), 153-163.
318. Burns, J. M., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., *et al.* (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 775-779.
319. Badaro, R., Benson, D., Eulalio, M. C., Freire, M., Cunha, S., *et al.* (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of infectious diseases*, 173(3), 758-761.
320. Brito, M. E. F., Mendonça, M. G., Gomes, Y. M., Jardim, M. L., Abath, F. G. (2000). Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(2), 318-321.
321. Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B. C., Saha, B., Pramanik, N., *et al.* (2004). Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infection and immunity*, 72(2), 863-870.
322. Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S., Quilici, M. (1992). Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 47(6), 764-771.

-
323. Santos-Gomes, G., Gomes-Pereira, S., Campino, L., Araújo, M. D. A., Abranches, P. (2000). Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-*Leishmania sp.*-coinfected patients. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 175-178.
324. Cota, G. F., De Sousa, M. R., Demarqui, F. N., Rabello, A. (2012). The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1665.
325. Oskam, L., Nieuwenhuijs, J. L., Hailu, A. (1999). Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(3), 275-277.
326. Fakhar, M., Motazedian, M. H., Hatam, G. R., Asgari, Q., Monabati, A., *et al.* (2012). Comparative performance of direct agglutination test, indirect immunofluorescent antibody test, polymerase chain reaction and bone marrow aspiration method for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *African Journal of Microbiology Research*, 6(28), 5777-5781.
327. Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., Boelaert, M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*, 333(7571), 723.
328. Boelaert, M., El Safi, S., Mousa, H., Mbatia, J., Gurubacharya, V. L., *et al.* (1999). Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, 4(1), 31-37.
329. Schoone, G. J., Hailu, A., Kroon, C. C. M., Nieuwenhuys, J. L., Schallig, H. D. F. H., *et al.* (2001). A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4), 400-401.
330. Sundar, S., Reed, S. G., Singh, V. P., Kumar, P. C., Murray, H. W. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *The Lancet*, 351(9102), 563-565.
331. Sundar, S., Pai, K., Sahu, M., Kumar, V., Murray, H. W. (2002). Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(1), 19-23.
332. Carvalho, S. F. G., Lemos, E. M., Corey, R., Dietze, R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(3), 321-324.

-
333. Jelinek, T., Eichenlaub, S., Löscher, T. (1999). Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18(9), 669-670.
334. Molinet, F. J. L., Ampuero, J. S., Costa, R. D., Noronha, E. F., Romero, G. A. S. (2013). Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect (r) in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 293-296.
335. Sarkari, B., Chance, M., Hommel, M. (2002). Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta tropica*, 82(3), 339-348.
336. Attar, Z. J., Chance, M. L., el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., *et al.* (2001). Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta tropica*, 78(1), 11-16.
337. Rijal, S., Boelaert, M., Regmi, S., Karki, B. M. S., Jacquet, D., *et al.* (2004). Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Tropical Medicine & International Health*, 9(6), 724-729.
338. Molai, S., Mohebali, M., Akhondi, B., Zarei, Z. (2006). Evaluation of latex agglutination test (KATEX®) for the detection of urinary antigens in human visceral leishmaniasis. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*, 4(1), 1-8.
339. Riera, C., Fisa, R., Lopez, P., Ribera, E., Carrió, J., *et al.* (2004). Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(12), 899-904.
340. Sundar, S., Agrawal, S., Pai, K., Chance, M., Hommel, M. (2005). Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(2), 269-271.
341. Hmrioui, B., Belkaid, M., Belazzoug, M. (1988). Livre de Guide pratique du laboratoire de parasitologie (Tome 2), diagnostic immunologique.
342. Belazzoug, S., Bendali-Braham, S., Lakehal, Z., Abdennebi, H. (1986). L'hémagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de la leishmaniose viscérale: comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 55, 107-112.
343. Kamoun, P., Fréjaville, J. P., Bach, J. F., Alcindor, L. G. (2002). Guide des examens de laboratoire. Flammarion médecine-sciences.

-
344. Hassani, M. A., Lahlou, H., Alami, M., Baba, A. F., el Youssfi, G., *et al.* (2011). Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile: À propos de 31 cas diagnostiqués sur 10 mois au laboratoire d'hématologie du CHU Hassan II de Fès (Maroc). *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(429), 55-60.
345. Mouloua, A. K. (2014). Étude éco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie (Doctoral dissertation, Université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou).
346. Boelaert, M., El Safi, S., Jacquet, D., de Muynck, A., Van Der Stuyft, P., *et al.* (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(1), 129-134.
347. Dereure, J., Lanotte, G., Pratlong, F., Gouvernet, J., Majhour, J., *et al.* (1998). Leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: intérêt et réalisation du test au latex. *Applications en éco-épidémiologie*. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 91(4), 300-305.
348. Moumni, H. (2014). Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen (Doctoral dissertation, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen).
349. Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(1), 1-6.
350. Montenegro, J. (1926). Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*, 13(2), 187-194.
351. Schönian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Cañavate, C., Boelaert, M., *et al.* (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in parasitology*, 24(3), 135-142.
352. Schulz, A., Mellenthin, K., Schönian, G., Fleischer, B., Drosten, C. (2003). Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1529-1535.
353. Guerbouj, S., Mkada-Driss, I., Guizani, I. (2014). Molecular tools for understanding eco-epidemiology, diversity and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *David Claborn (Ed.), Leishmaniasis: Trends in epidemiology, diagnosis and treatment*.
354. Mauricio, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R., Miles, M. A. (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology*, 122(04), 393-403.
355. Victoir, K., Banuls, A. L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., *et al.* (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology-Cambridge*, 117, 1-14.

356. Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., *et al.* (2001). Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?. *Parasitology*, *122*(01), 25-35.
357. Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., *et al.* (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, *137*(08), 1159-1168.
358. Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(2), 238-245.
359. Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., *et al.* (2004). Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of clinical microbiology*, *42*(5), 2294-2297.
360. da Silva, L. A., de Sousa, C. D. S., da Graça, G. C., Porrozzi, R., Cupolillo, E. (2010). Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(1), 77-83.
361. Oshaghi, M. A., Ravasan, N. M., Hide, M., Javadian, E. A., Rassi, Y., *et al.* (2009). Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Experimental parasitology*, *122*(1), 61-65.
362. Denise, H., McNeil, K., Brooks, D. R., Alexander, J., Coombs, G. H., *et al.* (2003). Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infection and immunity*, *71*(6), 3190-3195.
363. Hide, M., Banuls, A. L. (2006). Species-specific PCR assay for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Acta Tropica*, *100*(3), 241-245.
364. Tingey, S. V., del Tufo, J. P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant physiology*, *101*(2), 349.
365. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, *18*(22), 6531-6535.
366. Saraiva, L., Andrade Filho, J. D., Silva, S. D. O., Andrade, A. S. R. D., Melo, M. N. (2010). The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(8), 1033-1039.
367. Paiva, B. R., Secundino, N. F. C., Nascimento, J. C., Pimenta, P. F. P., Galati, E. A. B., *et al.* (2006). Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured

- phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta tropica*, 99(2), 252-259.
368. Aransay, A. M., Scoulica, E., Tselentis, Y. (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 1933-1938.
369. Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M. P., Xeridat, B., Schleinitz, N., *et al.* (2006). Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(5), 858-863.
370. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
371. Ajmone-Marsan, P., Vecchiotti-Antaldi, G., Bertoni, G., Valentini, A., Cassandro, M., *et al.* (1997). AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal genetics*, 28(6), 418-426.
372. Restrepo, C. M., De La Guardia, C., Sousa, O. E., Calzada, J. E., Fernández, P. L., *et al.* (2013). AFLP polymorphisms allow high resolution genetic analysis of American Tegumentary Leishmaniasis agents circulating in Panama and other members of the *Leishmania* genus. *PloS one*, 8(9), e73177.
373. Restrepo, C. M., Lao, E. P., De La Guardia, C., Sousa, O. E., Calzada, J. E., *et al.* (2012). Use of AFLP to study the genetic variability of *Leishmania sp.* *The FASEB Journal*, 26(1 Supplement), 981-1.
374. Kumar, A., Boggula, V. R., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A. K., *et al.* (2010). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing *Leishmania* species of visceral and cutaneous forms. *Acta tropica*, 113(2), 202-206.
375. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., *et al.* (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
376. Notomi, T. (2007). Loop-mediated isothermal amplification. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 65(5), 957-961.
377. Mori, Y., Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, 15(2), 62-69.
378. Takagi, H., Itoh, M., Islam, M. Z., Razzaque, A., Ekram, A. S *et al.* (2009). Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-

- mediated isothermal amplification. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(4), 578-582.
379. Khan, M. G. M., Bhaskar, K. R. H., Salam, M. A., Akther, T., Pluschke, G., *et al.* (2012). Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & vectors*, 5(1), 280.
380. Verma, S., Avishek, K., Sharma, V., Negi, N. S., Ramesh, V., *et al.* (2013). Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(4), 390-395.
381. Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4), 228-232.
382. Belhadj, S., Pratlong, F., Hammami, M., Kallel, K., Dedet, J. P., *et al.* (2003). Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta tropica*, 85(1), 83-86.
383. Pratlong, F., Rioux, J. A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., *et al.* (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of clinical microbiology*, 42(9), 4077-4082.
384. Tsokana, C. N., Athanasiou, L. V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., *et al.* (2014). Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis. In *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech.
385. Kreutzer, R. D., Christensen, H. A. (1980). Characterization of *Leishmania spp.* by isozyme electrophoresis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 29(2), 199-208.
386. Rotureau, B., Ravel, C., Couppié, P., Pratlong, F., Nacher, M., *et al.* (2006). Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 44(2), 459-467.
387. Jolley, K. A., Chan, M. S., Maiden, M. C. (2004). mlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics*, 5(1), 86.
388. Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., *et al.* (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones

- within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
389. Mauricio, I. L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., *et al.* (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International journal for parasitology*, 36(7), 757-769.
390. Ellegren, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in genetics*, 16(12), 551-558.
391. Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schönian, G. (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Journal of clinical microbiology*, 44(2), 495-503.
392. Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435-445.
393. Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Kemp, S. J., Noyes, H. A. (2002). Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(3), 265-270.
394. Alam, M. Z., Nakao, R., Sakurai, T., Kato, H., Qu, J. Q., *et al.* (2014). Genetic diversity of *Leishmania donovani/infantum* complex in China through microsatellite analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 112-119.
395. Bulle, B., Millon, L., Bart, J. M., Gállego, M., Gambarelli, F., *et al.* (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3391-3397.
396. Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Kemp, S. J., Noyes, H. A. (2002). Polymorphic microsatellite repeats are not conserved between *Leishmania donovani* and *Leishmania major*. *Molecular Ecology Resources*, 2(2), 104-106.
397. Al-Jawabreh, A., Diezmann, S., Müller, M., Wirth, T., Schnur, L. F., *et al.* (2008). Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 183.
398. Schwenkenbecher, J. M., Wirth, T., Schnur, L. F., Jaffe, C. L., Schallig, H., *et al.* (2006). Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International journal for parasitology*, 36(2), 237-246.
399. Russell, R., Iribar, M. P., Lambson, B., Brewster, S., Blackwell, J. M., *et al.* (1999). Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103(1), 71-77.

-
400. Oddone, R., Schweynoch, C., Schönian, G., De Sousa, C. D. S., Cupolillo, E., *et al.* (2009). Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2818-2825.
401. Bisht, S. S., Panda, A. K. (2014). DNA Sequencing: Methods and Applications. In *Advances in Biotechnology* (pp. 11-23). Springer India, 11-23.
402. Ashford, D. A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., *et al.* (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53(3), 251-255.
403. Dávila, A. M. R., Momen, H. (2000). Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94(6), 651-654.
404. Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C. L., Beck, H. P., *et al.* (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 3147-3153.
405. Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Hajjarian, H., Rezaei, S., Mamishi, S. (2008). Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in Giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iran J Public Health*, 37(1), 54-60.
406. Kornhauser, D., Rand, W., Wilensky, U. (2007). Visualization tools for agent-based modeling in NetLogo. *Proceedings of Agent2007*, 15-17.
407. Invitrogen. Qubit Assays [Internet]. (2010). Available: http://www.ebc.uu.se/digitalAssets/120/120362_qubitquickrefcard.pdf
408. Rotmistrovsky, K., Jang, W., Schuler, G. D. (2004). A web server for performing electronic PCR. *Nucleic acids research*, 32(suppl 2), W108-W112.
409. Wilensky, U. (1999). NetLogo. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.
410. Tisue, S., Wilensky, U. (2004, May). Netlogo: A simple environment for modeling complexity. In *International conference on complex systems*, 21, 16-21.
411. Oyola, S. O., Otto, T. D., Gu, Y., Maslen, G., Manske, M., *et al.* (2012). Optimizing Illumina next-generation sequencing library preparation for extremely AT-biased genomes. *BMC genomics*, 13(1), 1.
412. Delpech, M. (1999). Les techniques de biologie moléculaire dans les laboratoires d'analyses médicales en 1999, point et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 14(1), 7-15.

413. Guerbouj, S., Djilani, F., Bettaieb, J., Lambson, B., Diouani, M. F., *et al.* (2014). Evaluation of a gp63-PCR Based Assay as a Molecular Diagnosis Tool in Canine Leishmaniasis in Tunisia. *PloS one*, 9(8), e105419.
414. Brustoloni, Y. M., Lima, R. B., Cunha, R. V. D., Dorval, M. E., Oshiro, E. T., *et al.* (2007). Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), 497-500.
415. Akkafa, F., Dilmeç, F., Alpua, Z. (2008). Identification of Leishmania parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitology research*, 103(3), 583.
416. Cabié, A., Matheron, S., Lepretre, A., Bouchaud, O., Deluol, A. M., *et al.* (1992). Leishmaniose viscérale au cours de l'infection par le VIH: une infection opportuniste à part entière. *La Presse Médicale*, 21(35), 1658-1662.
417. Schnur, L. F., Greenblatt, C. L. (1995). *Leishmania*. *Parasitic protozoa*, 10, 1-160.
418. Izri, M. A., Belazzoug, S., Pratlong, F., Rioux, J. A. (1992). Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Biskra. Completion of an epidemiological saga. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67(1), 31-32.
419. Zait, H., Ferhani, Y., Achir, I., & Hamrioui, B. (2012). Étude de 71 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009. *Médecine et maladies infectieuses*, 42(3), 119-125.
420. Achour, Barchiche N., Madiou, M. (2009). Outbreak of cutaneous leishmaniasis: about 213 cases in the province of Tizi-Ouzou. *Pathologie-biologie*, 57(1), 65-70.
421. Zait, H., Hamrioui, B. (2009). Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue francophone des laboratoires*, 2009(412), 33-39.
422. Belazzoug, S., Ammar-Khodja, A., Belkaid, M., Tabet-Derraz, O. (1985). La leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Bulletin de la société de Pathologie Exotique*, 78(5), 615-622.
423. Marty, P., Del Giudice, P., Desjeux, P. (2002). Leishmanioses: aspects épidémiologique, clinique et biologique. *Feuillets de biologie*, 43(245), 31-39.
424. Faber, W. R., Oskam, L., van Gool, T., Kroong, N. C., Knegt-Junk, K. J., *et al.* (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(1), 70-74.
425. Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., Hatz, C. (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 158-166.

-
426. Ramírez, J. R., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J. F., Berberich, C., *et al.* (2000). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 38(10), 3768-3773.
427. Pirmez, C., da Silva Trajano, V., Neto, M. P. O., Da-Cruz, A. M., Gonçalves-da-Costa, S. C., *et al.* (1999). Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1819-1823.
428. Estevez, Y. (2009). *Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
429. Boussaa, S., Guernaoui, S., Pesson, B., & Boumezzough, A. (2005). Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (*Diptera: Psychodidae*) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta tropica*, 95(2), 86-91.
430. Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., *et al.* (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PloS one*, 9(6), e99207.
431. Harrat, Z., Addadi, K., Belkaïd, M., Tabet-Derraz, O. (1992). La leishmaniose viscérale en Algérie: recensement des cas de leishmaniose viscérale (période 1985-1990). Commentaires. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 85(4), 296-301.
432. Aoun, K., Ben Abda, I., Habboul, Z., Lemrani, M., Harrat, Z., *et al.* (2013). Visceral leishmaniasis in North african countries. *PUIJ*, 6(1), 35-38.
433. Minodier, P., Garnier, J. M. (2000). La leishmaniose viscérale infantile en Provence. *Archives de pédiatrie*, 7, S572-S577.
434. Ho, E. A., Soong, T. H., Li, Y. (1948). Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(5), 629-636.
435. Herwaldt, B. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.
436. Fissore, C., Delaunay, P., Ferrua, B., Rosenthal, E., Del Giudice, P., *et al.* (2004). Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 5332-5333.
437. Bousslimi, N., Aoun, K., Ben-Abda, I., Ben-Alaya-Bouafif, N., Raouane, M., *et al.* (2010). Epidemiologic and clinical features of cutaneous leishmaniasis in southeastern Tunisia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(5), 1034-1039.
438. Jaouadi, K., Haouas, N., Chaara, D., Gorcii, M., Chargui, N., *et al.* (2011). First detection of *Leishmania killicki* (*Kinetoplastida, Trypanosomatidae*) in *Ctenodactylus gundi* (*Rodentia, Ctenodactylidae*), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & vectors*, 4(1), 159.
439. Bennouna, A., Lalami, A. E. O., Hmamouch, A., Koraichi, S. I. S., Bekhti, K. (2015). *Leishmania infantum* et *Leishmania major*: deux souches de Leishmaniose

- cutanée identifiées par PCR et isolées respectivement de Taounate (Nord Maroc) et d'Errachidia (Sud Maroc), *Numéros*, 12(4).
440. Hakkour, M., Sebti, F., El Mansouri, B., Hajli, A., Sadak, A., *et al.* (2016). Diagnostic microscopique de la leishmaniose cutanée et viscérale au Maroc: contrôle/confirmation et validation par PCR entre 2002 et 2014. *Afrique SCIENCE*, 12(5), 271-278.
441. Rhajaoui, M., Sebti, F., Fellah, H., Alam, M. Z., Nasereddin, A., *et al.* (2012). Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco. *Parasite*, 19(1), 81-84.
442. El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579.
443. de Oliveira, C. I., Báfica, A., Oliveira, F., Favali, C. B., Correa, T., *et al.* (2003). Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction—Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*, 37(11), e149-e153.
444. Medeiros, A. C. R., Rodrigues, S. S., Roselino, A. M. F. (2002). Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research*, 35(4), 421-424.
445. Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., *et al.* (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 210-215.
446. Lemrani, M., Hamdi, S., Laamrani, A., Hassar, M. (2009). PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(02), 115-122.
447. Uliana, S. R. B., Affonso, M. H. T., Camargo, E. P., Floeter-Winter, L. M. (1991). *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Experimental parasitology*, 72(2), 157-163.
448. Parvizi, P., Mauricio, I., Aransay, A. M., Miles, M. A., Ready, P. D. (2005). First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta tropica*, 93(1), 75-83.
449. Schönian, G., Schnur, L., El Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., *et al.* (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 217-224.
450. Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian, N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1989-1995.

-
451. Seridi, N., Belkaid, M., Quispe-Tintaya, W., Zidane, C., Dujardin, J. C. (2008). Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(6), 556-563.
452. Al-Jawabreh, A., Schoenian, G., Hamarsheh, O., Presber, W. (2006). Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta tropica*, 99(1), 55-61.
453. Pandey, K., Pandey, B. D., Mallik, A. K., Kaneko, O., Uemura, H., *et al.* (2010). Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. *Parasitology research*, 107(3), 727-730.
454. Córdoba Lanús, E., Piñero, J. E., González, A. C., Valladares, B., Lizarralde de Grosso, M., *et al.* (2005). Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 187-192.
455. Kazemi-Rad, E., Mohebbali, M., Hajjaran, H., Rezaei, S., Mamishi, S. (2008). Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in Giemsa-stained slides by PCR-RFLP. *Iran J Public Health*, 37(1), 54-60.
456. Rhajaoui, M., Nasereddin, A., Fellah, H., Azmi, K., Amarir, F., *et al.* (2007). New clinicoepidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis, Morocco. *Emerging infectious diseases*, 13(9), 1358.
457. Motazedian, H., Karamian, M., Noyes, H. A., Ardehali, S. (2002). DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(1), 31-34.
458. Volpini, A. C., Marques, M. J., Lopes dos Santos, S., Machado-Coelho, G. L., Mayrink, W., *et al.* (2006). *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical microbiology and infection*, 12(8), 815-818.
459. Mahdy, M. A., Al-Mekhlafi, H. M., Al-Mekhlafi, A. M., Lim, Y. A., Shuaib, N. O. B., *et al.* (2010). Molecular characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen. *PloS one*, 5(9), e12879.
460. Benikhlef, R., Pratlong, F., Harrat, Z., Seridi, N., Bendali-Braham, S., *et al.* (2001). Leishmaniose viscérale infantile causée par *Leishmania infantum* zymodème MON-24 en Algérie. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 94(1), 14-16.
461. Aït-Oudhia, K., Harrat, Z., Benikhlef, R., Dedet, J. P., Pratlong, F. (2011). Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of

- the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta tropica*, 118(2), 80-86.
462. Belazzoug, S., Lanotte, G., Maazoun, R., Pratlong, F., Rioux, J. A. (1984). A new enzymatic variant of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent of cutaneous leishmaniasis in northern Algeria. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 60(1), 1-3.
463. Mansouri, R., Pratlong, F., Bachi, F., Hamrioui, B., Dedet, J. P. (2012). The first isoenzymatic characterizations of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the Area of Annaba (Eastern Algeria). In *Open Conf. Proc. J* (Vol. 3, pp. 6-11).
464. Harrat, Z., Boubidi, S.C., Pratlong, F., Benikhlef, R., Selt, B., *et al.* (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 716-720.
465. Rogers, C., Nguy, K. N. T., Amajor, O. A., Seaquist, T., Crawford, B., *et al.* (2010). Daily behavior of *Trypanosoma cruzi* hosts and vectors in Texas: an agent-based modeling approach in NetLogo. Mathematics Department Technical Report 2010-18, University of Texas at Arlington, 2010.
466. Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., *et al.* (2012). Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)*, 105(1), 30-35.
467. Desjeux, P. (2002). Urbanization of the leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In R. Killick-Kendrick (Ed.), *Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum, Spain, Sevilla* (pp. 49-55).

Résumé

Deux formes de leishmaniose coexistent en Algérie : la leishmaniose cutanée (LC) et la leishmaniose viscérale (LV) à *L. infantum*. Cette dernière est la forme mortelle qui s'étend sur toute la partie Nord du pays. La LC est présente sous deux formes cliniques distinctes : la forme cutanée sporadique du Nord à *L. infantum* et la forme cutanée zoonotique à *L. major*. Suite à la réémergence de la leishmaniose dans le monde entier et en Algérie également, cette étude portant sur le diagnostic des leishmanioses cutanée et viscérale au sein du C.H.U d'Annaba, ainsi que l'identification moléculaire de l'agent causale au sein de l'IPT. Les résultats généraux obtenus montrent une augmentation du nombre de cas de LC par rapport à celui du LV avec une variabilité géographique et épidémiologique.

Au total, 282 sérosités cutanées, 325 échantillons de moelle osseuse et 306 sérums qui ont été analysés en microscopie, par culture cellulaire, en sérologie et en PCRs/PCR-RFLPs. Les résultats obtenus montrent que le nombre de patients positifs est de 85 (30,14%) et 35 (9,49%) pour la LC et la LV respectivement. Par ailleurs, trois PCRs et par la suite deux RFLPs ont été réalisées sur des lames archivées faites de 66 prélèvements cutanés et 20 autres de moelle osseuse. La PCR ITS1 était la technique la plus sensible que selon plusieurs critères comme la nature de l'échantillon ou son ancienneté. Ces techniques ont permis d'identifier 56 souches à partir des lésions cutanées : 19 *L. major*, 36 *L. infantum* et une seule souche appartenants à l'espèce *L. tropica*. Quant aux échantillons de moelle osseuse, ils nous ont permis de mettre en évidence la présence unique de l'espèce *L. infantum* chez 12 patients atteints de LV.

Mots-clés : Leishmaniose cutanée – Leishmaniose viscérale – Epidémiologie – Diagnostic – PCR/PCR-RFLP – Nord-Est Algérien.

Abstract

Two forms of leishmaniasis coexist in Algeria: cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL) due to *L. infantum*. The last one is lethal form which extends over the whole Northern part of the country. The CL is observed in two clinical forms: the sporadic cutaneous form of the North due to *L. infantum* and the zoonotic cutaneous form due to *L. major*. Taking into account the re-emergence of leishmaniasis worldwide as well in Algeria, this study on the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis was carried out in “University Hospital of Annaba” and the molecular identification of the parasite in the “IPT”. Global results shows increasing numbers of cases of CL compared to VL cases with geographical and epidemiological variability.

A total of 282 cutaneous samples, 325 bone marrow aspirations and 306 serums were analyzed with microscopy observation, cell culture, serology and PCRs/PCR-RFLPs. Results shows 85 (30.14%) and 35 (9.49%) positive cases for LC and LV, respectively.

In addition, three PCRs followed by two RFLPs were carried out on archived slides made of: 66 cutaneous samples and 20 bone marrow aspiration. PCR-ITS1 found to be the sensible PCR according to several criteria such as the nature of the sample or its oldness. These techniques allowed to identify 56 strains from cutaneous lesions: 19 *L. major*, 36 *L. infantum* and a single strain belongs to the species *L. tropica*. As for bone marrow aspiration samples, they allows us to highlight the unique presence of *L. infantum* in 12 patients infected with VL.

Key words: Cutaneous leishmaniasis – Visceral leishmaniasis - Epidemiology - diagnosis-PCR/PCR-RFLP – North-Eastern Algeria.

الملخص

يتواجد شكلين من داء الليشمانيات في الجزائر: داء الليشمانيا الجلدي (CL) وداء الليشمانيات الحشوي (VL) المسبب من طرف *L. infantum*. هذا الأخير هو الشكل القاتل الذي يمتد عبر الجزء الشمالي من البلاد. يتواجد CL في شكلين سريريين مختلفين: الشكل الجلدي المتفرق للشمال المسبب من طرف *L. infantum* والشكل الجلدي الحيواني المسبب من طرف *L. major*. بعد عودة ظهور داء الليشمانيات في جميع أنحاء العالم، وكذلك في الجزائر، فإن هذه الدراسة تعالج موضوع تشخيص داء الليشمانيات الجلدي والحشوي في مستشفى جامعة عنابة وتحديد الجزيئي للطفيلي في معهد IPT. تظهر النتائج الإجمالية زيادة في عدد حالات CL مقارنة بحالات VL مع التباين الجغرافي و الوبائي.

وقد تم تحليل ما مجموعه 282 سائل مصلي جلدي، 325 عينة نخاع عظم و 306 مصلا بواسطة المجهر، زراعة الخلايا، تحليل الأمصال وبواسطة PCR/PCR-RFLP. وتظهر النتائج أن عدد المرضى الإيجابيون هو 85 (30.14%) و 35 (9.49%) بالنسبة ل CL و VL على التوالي. وبالإضافة إلى ذلك، تم إجراء ثلاثة PCR متنوعة باثنين من RFLP أجريت على شرائح مجهرية من الأرشيف مصنوعة من 66 عينة جلدية و 20 عينة أخرى لنخاع العظام. كانت ITS1 PCR التقنية الأكثر حساسية على الإطلاق وفقا لعدة معايير كطبيعة العينة أو قدمها. وقد حددت هذه التقنيات 56 سلالة انطلاقا من الجروح الجلدية: 19 مسببة من طرف *L. major*، 36 مسببة من طرف *L. infantum* و واحدة تنتمي إلى سلالة *L. tropica*. أما بالنسبة لعينات نخاع العظام، فقد سمحوا لنا بتسليط الضوء على الوجود الوحيد لنوع *L. infantum* في 12 مريض ب VL.

الكلمات المفتاحية: داء الليشمانيات الجلدي - داء الليشمانيات الحشوي - علم الأوبئة - التشخيص - PCR / PCR-RFLP - شمال شرق الجزائر.