

N° Ordre...../FS/UMBB/2018

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES**



Faculté des Sciences

**Thèse de Doctorat 3ème cycle LMD**

Présenté par

**BENNAI Kahina**

Filière : Biologie

Option : Ecologie des Systèmes Vectoriels

---

---

**Surveillance et contrôle des leishmanioses dans le nord de**  
**l'Algérie**

---

---

Devant le jury :

KEBBOUCHE-GANA	Salima	Professeur	UMBB	Président
BITAM	Idir	Professeur	ESSAIA	Directeur de thèse
PAROLA	Philippe	Professeur	Aix Marseille Univ	Co-directeur de thèse
ARAB	Karim	Professeur	UMBB	Examineur
CHAHBAR	Nora	MCA	UMBB	Examinatrice
LAFRI	Ismail	MCA	ISVBIda	Examineur

Année Universitaire : 2018/2019



N° Ordre...../FS/UMBB/2018

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES**



Faculté des Sciences

**Thèse de Doctorat 3ème cycle LMD**

Présenté par

**BENNAI Kahina**

Filière : Biologie

Option : Ecologie des Systèmes Vectoriels

---

---

**Surveillance et contrôle des leishmanioses dans le nord de**  
**l'Algérie**

---

---

Devant le jury :

KEBBOUCHE-GANA	Salima	Professeur	UMBB	Président
BITAM	Idir	Professeur	ESSAIA	Directeur de thèse
PAROLA	Philippe	Professeur	Aix Marseille Univ	Co-directeur de thèse
ARAB	Karim	Professeur	UMBB	Examineur
CHAHBAR	Nora	MCA	UMBB	Examinatrice
LAFRI	Ismail	MCA	ISVBlida	Examineur

Année Universitaire : 2018/2019

الحمد لله رب العالمين

---

---

## **Remerciements**

---

---

*Après ces quelques années de recherche, mes travaux touchent à leur fin et me voilà face au jour où je vais écrire les remerciements. Ce jour n'aurait jamais été arrivé sans le soutien et l'expertise des personnes et des organismes auxquels j'en prouve mon entière reconnaissance dans l'espoir de n'avoir oublié personne.....*

---

---

Mes remerciements et mes respects s'adressent à mes enseignants et membres du jury :

**Madame le Professeur Salima GANA** d'avoir accepté, pour la deuxième fois, de présider le jury de ma soutenance de thèse, j'espère pouvoir satisfaire votre faible pour les leishmanies.

**Monsieur le Professeur Karim ARAB**, merci d'avoir accepté de juger, encore une fois, mes travaux de thèse. Sans vos encouragements et vos conseils ce n'était probablement pas possible que je sois là Aujourd'hui.

**Madame le Docteur Nora CHAHBAR**, merci aussi d'avoir accepté de juger mon travail. Vos cours de parasitologie ont réveillés en moi le sens de curiosité pour ce monde, c'est le premier souvenir que je porte sur le mot « *Leishmanioses* ». Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

**Monsieur le Docteur Ismail LAFRI**, tous mes remerciements pour avoir accepté d'examiner mon travail, votre expérience dans le domaine d'entomologie et d'épidémiologie est d'une importance majeure pour l'évaluation de mes travaux de recherche. Je vous dois mon premier contact avec « *les phlébotomes* ». Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Idir BITAM**, pour la grande confiance dont il m'a fait part, à partir de mes premiers pas dans le monde de la recherche jusqu'à aujourd'hui. Je vous suis particulièrement reconnaissante pour les valeurs de responsabilité et d'autonomie que vous avez fait grandir en moi. Vos encouragements et votre appui pour certaines décisions m'ont permis de mener à bien mes travaux. J'espère avoir été à la hauteur de votre attente.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, **Monsieur le Professeur Philippe PAROLA**, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe à l'Unité de Recherche

VITROME (Vecteurs – Infections TROPicales et Méditerranéennes), Institut Hospitalo-Universitaire (IHU), Marseille, France. Votre patience, votre rigueur et vos grandes compétences et qualités pédagogiques m’ont été précieuses. Mon passage au sein de votre équipe restera pour moi une expérience de vie, tant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à **Monsieur le Professeur Didier RAOULT** pour m’avoir accepté au sein de l’Institut Hospitalo-Universitaire, Méditerranée Infection, afin de mener à bien les travaux de ma thèse. Vous m’avez offert l’opportunité d’approfondir mes connaissances scientifiques et de me former.

Mes remerciements et ma reconnaissance vont également à **Madame le Professeur Haiat ADJMI-HAMMOUDI** pour sa contribution à mon encadrement et de m’avoir accepté, dès mon Master, au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l’Hôpital Central de l’Armée HCA, afin de mener à bien mes travaux de recherche. Je vous dois mes premiers pas dans ma vie de chercheur ainsi que mon premier contact avec les « *Leishmanies* ». Vos conseils et encouragements m’ont permis de tracer mon chemin dans le monde de la recherche.

J’adresse mes vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à **Monsieur le Professeur Rémi CHARREL** pour m’avoir accepté et accueillie au sein de son Unité de Recherche d’Emergence des Pathologie Virales, Aix-Marseille Université, Marseille, France. Vos conseils, vos encouragements et votre disponibilité m’ont permis de réaliser une partie de mes travaux de thèse et d’acquérir des connaissances sur le monde des Virus.

Ces travaux n’auraient pas été possibles sans le soutien financier du **Ministère de l’Enseignement Supérieur et de de la Recherche Scientifique** qui m’a accordé bourse d’étude d’une durée de 13 mois au sein de l’Unité de Recherche VITROME (Vecteurs – Infections TROPicales et Méditerranéennes), Institut Hospitalo-Universitaire (IHU), Marseille, France, dans le cadre du Programme National Exceptionnel (PNE). Je vous suis entièrement reconnaissante.

Je n’oublierai pas d’exprimer mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance à vous **Monsieur Pierre CHENET**, Directeur d’Etablissement de la Raffinerie de sucre SPA GRD LABELLE de Ouled Moussa Boumerdes, pour votre soutien, assistance et encouragements qui m’ont été très précieux dans mes préparatifs de départ sur Marseille.

Mes remerciements vont aussi à **Monsieur Yves GICQUEL**, Consultant en Ingéniering Industriel à la Raffinerie de sucre SPA GRD LABELLE de Ouled Moussa Boumerdes, pour son aide, soutien et engagements pour faciliter mon installation et intégration en France.

Un remerciement très particulier à **Madame Ghislaine VOGUET**, membre au Centre Culturel Universitaire (CCU Alger), pour tous ses efforts et ses encouragements, pour son aide et sa patience infinie, pour la lecture, la critique et la correction de ce manuscrit depuis le premier mot jusqu'au point final. Merci d'avoir cru en moi.

Ces années de doctorat m'ont aussi donné la chance de rencontrer des gens extraordinaires et de développer de belles amitiés. J'adresse mes remerciements les plus sincères à :

Tous **les membres de l'équipe de Parasitologie-Mycologie à HCA**, en particulier : Dr Khaled ABDELOUAHED, Dr Salim BEKHOUCHE, Dr Khadidja AICI, Dr Djoumana MEKHNECHE, Dr Ahlem OULMI, Dr Faiza BOUNAAS, Mr Lamine LAZRI, Mlle Racha BOUBEKEUR.

Tous **les membres de l'équipe VITROME à Marseille**, en particulier : Dr Djamel TAHIR, Dr Amira NEBBAK, Dr Mustapha DAHMANI, Dr Doudou SOW, Dr Sirama NIARE, Fatalmoudou TANDINA, Adama Zan DIARRA, Dr Amadou Niang EL HADJ, Linda BENKACIMI, Yacine AMEGHROUS, Handi DAHMANA, Bisma OUARTI, Bisma ELHAMZAOU, Nhiem LEVIET et Maureen LAROCHE.

Tous **les membres de l'équipe de l'IHU à Marseille**, pour leur disponibilité, en particulier : Jean-Michel BERENGER, Anne-Marie GOTTRAU, Annick ABEILLE, Pascal WEBER, Valérie FILOSA et Alexia BATTISTINI.

Tous les membres de **l'équipe d'UMR Emergence des pathologies Virales**, en particulier Nazli AYHAN.

Tous **mes collègues doctorants (es) de la formation doctorale Ecologie des Systèmes Vectoriels**.

Et à mes chères amies : Faiza BOUDALI, Silia HAMMI et Nassima MANA , sans oublier mes très chères cousines Hanan BEKHTAOUI et Maya BEKHTAOUI.

*A ma Mère et A mon Père,  
Symboles d'efforts innombrables et d'amour sans fin.....*

*A mon chère Frère **Nadir**, sa Femme **Dhia** et le petit prince de la famille **BENNAI**, **Aksel***

*A ma Sœur et confidente **Nina** et mon chère petit frère **Fouad***

*A L'Homme et l'Amour de ma Vie, mon Fiancé **Farid IBSAIENE***

*A toute ma famille **BENNAI** et **BEKHTAOUI** et ma belle famille **IBSAIENE** et **LOUNIS***

*A mes chères amies **Louni meriem** et **Boudaa sonia** ainsi que leurs familles*

---

---

# Table des matières

---

---

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale 01

## Chapitre I. Revue bibliographique sur les leishmanioses

I.1. <i>Leishmania</i> et les leishmanioses	04
I.1.1. Les leishmanioses en chiffres	04
I.1.2. Les leishmanioses et leur histoire de découverte	06
I.1.3. Les protagonistes des leishmanioses	07
I.1.3.1. Le parasite : <i>Leishmania</i> (Kinetoplastida : Trypanosomatidae)	08
I.1.3.1.1. Taxonomie	08
I.1.3.1.2. Morphologie	09
I.1.3.1.3. Biologie	10
I.1.3.1.4. Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	11
I.1.3.1.5. Pathogénèse	12
I.1.3.1.6. Manifestations cliniques	13
I.1.3.2. Le vecteur : Phlébotome ( <i>Diptera</i> : <i>Psychodidae</i> : <i>Phlebotominae</i> )	16
I.1.3.2.1. Taxonomie	16
I.1.3.2.2. Morphologie de l'adulte	17
I.1.3.2.3. Bio-Écologie	21
I.1.3.2.4. Importance médicale et vétérinaire	23
I.1.3.3. Hôtes réservoirs	25
I.1.4. Diagnostic	27
I.1.4.1. Diagnostic parasitologique	28
I.1.4.1.1. Examen microscopique	28
I.1.4.1.2. Les cultures cellulaires	29
I.1.4.2. Diagnostic moléculaire	30
I.1.4.2.1. Détection de <i>Leishmania</i>	31

I.1.4.2.2. Identification de l'espèce de <i>Leishmania</i>	33
I.1.4.3. Diagnostic sérologique	34
I.1.4.3.1. ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> )	34
I.1.4.3.2. Western blot (WB) ou l'immunoempreinte	34
I.1.4.3.3. Les tests rapides	35
I.1.5. Traitement	35
I.1.6. Surveillance et contrôle	38
I.2. Les leishmanioses en Algérie	41
I.2.1. Leishmanioses à <i>L. infantum</i>	41
I.2.2. Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) a <i>L. major</i>	42
I.2.3. Leishmaniose cutanée anthroponotique a <i>L. killicki</i>	42
I.3. Les phlébotomes d'Algérie	43

## **Chapitre II. Contribution à l'amélioration du diagnostic de leishmaniose cutanée humaine en Algérie**

II.1. problématique et objectifs de l'étude	45
II.2. Matériels et méthodes	45
II.2.1. Déclaration d'éthique	45
II.2.2. Patients et échantillons	45
II.2.3. Souches de <i>Leishmania</i> spp	46
II.2.4. Examens parasitologiques	46
II.2.4.1. Examen microscopique ou examen direct (ED)	46
II.2.4.2. Culture	47
II.2.5. Analyses sérologiques	48
II.2.5.1. Immunofluorescence indirecte	48
II.2.5.2. Western Blot	48
II.2.6. Analyse moléculaire	49
II.2.6.1. Détection de l'ADN de <i>Leishmania</i> spp	49
II.2.6.1.1. L'extraction d'ADN génomique	49
II.2.6.1.2. L'amplification de l'ADN de <i>Leishmania</i> spp. par PCR	50
II.2.6.1.3. La révélation des produits de PCR	50
II.2.6.2. L'identification des espèces de <i>Leishmania</i> en cause par PCR-RFLP	50
II.2.7. analyses statistiques des données	51
II.3. Résultats	52

II.3.1. Résultats des données épidémiocliniques	52
II.3.2. Résultats des analyses biologiques	53
II.3.2.1. Résultats d'examen parasitologiques	53
II.3.2.2. Résultats des examens sérologiques	55
II.3.2.3. Résultats des analyses moléculaires	57
II.3.2.3.1. La détection de parasite <i>Leishmania</i> spp.	57
II.3.2.3.2. L'identification des espèces de <i>Leishmania</i> en cause par ITS1-RFLP	60
II.4. Discussion	65
II.5. conclusion et perspectives	70

### **Chapitre III. Contribution à la surveillance des phlébotomes dans un foyer hypoendémique de leishmanioses**

II.1. problématique et objectifs de l'étude	71
II.2. Matériels et méthodes	72
III.2.1. Déclaration d'éthique	72
III.2.2. Présentation de la zone d'étude	72
III.2.2.1. Choix de la zone d'étude	72
III.2.2.2. Caractéristiques de la zone d'étude	72
III.2.3. Capture et conservation des phlébotomes	73
III.2.4. Identification morphologique des phlébotomes	74
III.2.5. Surveillance moléculaire des phlébotomes	75
III.2.5.1. Extraction d'ADN	75
III.2.5.2. Amplification d'ADN de <i>Leishmania</i> spp. par qPCR chez les phlébotomes	76
III.2.5.3. Identification de la source du repas sanguin	77
III.2.5.4. Identification moléculaire des espèces de phlébotomes	77
III.2.6. Analyse statistique des données	78
III.3. Résultats	80
III.3.1. La composition de la faune de phlébotomes dans la province de Tipaza	80
III.3.2. Détection moléculaire de l'ADN de <i>Leishmania</i> chez les phlébotomes	83
III.3.3. Résultats de l'analyse du repas sanguin des phlébotomes par PCR-Séquençage	84
III.3.4. Identification moléculaire des phlébotomes infectés par <i>L. infantum</i>	86
III.4. Discussion	87
III.5. Conclusion et perspectives	93

## **Chapitre IV. Recherche d'éventuels pathogènes associés aux phlébotomes collectés au nord d'Algérie**

II.1. problématique et objectifs de l'étude	95
IV.2. Matériels et méthodes	96
IV.2.1. Recherche des phlébovirus	96
IV.2.1.1. Zone d'étude et capture des phlébotomes	96
IV.2.1.2. Détection moléculaire de phlébovirus	97
IV.2.1.2.1. Extraction d'ADN/ ARN à partir de phlébotomes	97
IV.2.1.2.2. Détection de virus par RT-qPCR	98
IV.2.1.2.3. Isolement du virus	98
IV.1.2. Recherche des bactéries chez les phlébotomes	99
IV.1.2.1. Echantillons	99
IV.1.2.2. Détection de bactéries	99
IV.3. Résultats	100
IV.3.1. Résultats de la recherche des phlébovirus	100
IV.3.2. Résultats de la recherche des bactéries	100
IV.4. Discussion	102
IV.5. Conclusion et perspectives	105
<b>Conclusion générale</b>	<b>106</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>109</b>
<b>Production scientifique</b>	

## ==== **Liste des abréviations** =====

**ADN k** : ADN kinétoplastique

**BET** : bromure d'éthidium

**CDC** : Centre Disease Control and prevention

**Ct** : Cycles threshold

**DALYs** : Disability Adjusted Life Years

**DAT** : Le test d'agglutination directe

**DSP** : Direction de santé publique

**ED** : Examen direct

**ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay

**EMEM** : Eagle Minimum Essential Medium

**IFI** : immunofluorescence indirecte

**INSP** : institut national de santé publique

**LAMP** : L'amplification isotherme à médiation en boucle

**LC** : Leishmaniose cutanée

**LCM** : Leishmaniose cutanéomuqueuse

**LCN** : Leishmaniose cutanée du Nord

**LCZ** : Leishmaniose cutanée zoonotique

**LH** : Leishmaniose humaine

**LV** : Leishmaniose viscérale

**MALDI-TOF MS** : matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

**MCM** : Culture micro-capillaire

**MLEE** : Electrophorèse enzymatique multi-locus

**MLMT** : Multilocus Microsatellite Typing

**MLST** : Multilocus Sequence Typing

**NNN** : Novy Mac-Neal Nicolle

**OC-PCR** : Oligochromatographie-PCR

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PFGE** : Pulsed Field Gel Electrophoresis

**qPCR** : PCR quantitative

**QT-NASBA** : L'amplification quantitative des séquences d'acides nucléiques

**RFLP** : Restriction Fragments Length Polymorphisms

**RT-qPCR** : Reverse Transcriptase quantitative PCR

**SEMPE** : Service Epidémiologie et Médecine Préventive de Sétif

**SFNV** : *Sandfly fever Naples virus*

**SFSV** : *Sandfly fever Sicilian Virus*

**TOSV** : Toscana virus

**WB** : Western blot

---

---

## Liste des figures

---

---

<b>Figure 1.</b> Répartition de la leishmaniose viscérale dans le monde en 2012	<b>05</b>
<b>Figure 2.</b> Répartition de la leishmaniose cutanée dans le monde en 2012	<b>05</b>
<b>Figure 3.</b> Répartition géographique des cas de leishmaniose cutanée et viscérale dans les pays d'Afrique du Nord.	<b>06</b>
<b>Figure 4.</b> Taxonomie de <i>Leishmania</i> .	<b>09</b>
<b>Figure 5.</b> Aspects morphologiques du parasite <i>Leishmania</i> spp. sous microscopie optique.	<b>12</b>
<b>Figure 6.</b> Cycle de vie de <i>Leishmania</i> spp..	<b>12</b>
<b>Figure 7.</b> Les différentes manifestations cliniques des leishmanioses humaines.	<b>16</b>
<b>Figure 8.</b> Morphologie générale de phlébotome adulte.	<b>18</b>
<b>Figure 9.</b> Anatomie générale de la tête d'un phlébotome (A) ; Thorax de phlébotome (B).	<b>19</b>
<b>Figure 10.</b> Anatomie de genitalia d'un phlébotome male (A) ; Anatomie de genitalia d'une femelle de phlébotome (B).	<b>20</b>
<b>Figure 11.</b> Le cycle de vie holométabole de phlébotome avec les différents stades de son développement.	<b>22</b>
<b>Figure 12.</b> Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes.	<b>23</b>
<b>Figure 13.</b> Cycles de transmission de leishmaniose. A gauche : exemple de cycle de leishmaniose selvatique et humaine (ex. foyers à <i>L. major</i> ) ; A droite : cycle de leishmaniose anthroponotique stricte (ex. foyers classiques à <i>L. tropica</i> ).	<b>26</b>
<b>Figure 14.</b> Cycle de transmission de leishmaniose domestique, humaine et selvatique (ex. foyers à <i>L. infantum</i> ).	<b>26</b>
<b>Figure 15.</b> Distribution des cas de LV humaine de 1998 à 2008.	<b>42</b>
<b>Figure 16.</b> Distribution des cas de LC en 2009.	<b>43</b>
<b>Figure 17.</b> Coloration de frottis cutanés pour l'examen microscopique par la coloration Giemsa et sa variante RAL555.	<b>47</b>
<b>Figure 18.</b> Prévalence de la LC dans la population étudiée.	<b>52</b>
<b>Figure 19.</b> Répartition des cas selon la région de séjour.	<b>52</b>
<b>Figure 20.</b> Répartition des cas selon la localisation des lésions.	<b>53</b>
<b>Figure 21.</b> Résultats d'examen microscopique des frottis cutanés.	<b>54</b>
<b>Figure 22.</b> Résultats de la culture.	<b>54</b>
<b>Figure 23.</b> Résultats de l'IFI.	<b>55</b>
<b>Figure 24.</b> Résultats de WB.	<b>56</b>

<b>Figure 25.</b> Résultats de la PCRk.	<b>58</b>
<b>Figure 26.</b> Résultats de la technique ITS1-RFLP.	<b>60</b>
<b>Figure 27.</b> Aspects de lésions des patients atteints de leishmaniose cutanée.	<b>61</b>
<b>Figure 28.</b> Prévalence des cas de LH dans la région de Tipaza, Nord d'Algérie entre 2001 et 2014.	<b>72</b>
<b>Figure 29.</b> Site de collecte des phlébotomes dans la région de Tipaza, Nord d'Algérie.	<b>73</b>
<b>Figure 30.</b> Les différentes étapes de piégeage des phlébotomes.	<b>74</b>
<b>Figure 31.</b> Les différentes étapes d'indentification morphologique des phlébotomes.	<b>75</b>
<b>Figure 32.</b> Collection mensuelle des phlébotomes par pièges lumineux CDC en 2015.	<b>80</b>
<b>Figure 33.</b> Les caractéristiques distinctives pour l'identification des phlébotomes capturés à Tipaza, dans le nord de l'Algérie.	<b>82</b>
<b>Figure 34.</b> Résultats de q PCR ciblant le gène 18 S de <i>Leishmania</i> spp. lancée sur les pools d'ADN de phlébotomes.	<b>84</b>
<b>Figure 35.</b> Résultats de q PCR ciblant le gène kinétoplastique de <i>L. infantum</i> lancée sur les pools d'ADN de phlébotomes.	<b>84</b>
<b>Figure 36.</b> Résultats de q PCR ciblant le gène kinétoplastique de <i>L. infantum</i> lancée sur les ADN de phlébotomes séparés.	<b>85</b>
<b>Figure 37.</b> Carte de l'Algérie montrant où les phlébotomes ont été piégés (Bougaa, Sétif).	<b>97</b>
<b>Figure 38.</b> Résultat négatif de qPCR spécifique pour <i>Rickettsia</i> spp. lancée sur les phlébotomes de Bourkika.	<b>100</b>
<b>Figure 39.</b> Résultat négatif de qPCR spécifique pour <i>Coxiella burnetii</i> lancée sur les phlébotomes de Bourkika.	<b>101</b>
<b>Figure 40.</b> Résultat de qPCRs spécifique pour <i>Anaplasma</i> spp. lancée sur les phlébotomes de Bourkika.	<b>101</b>

---

---

## Liste des tableaux

---

---

<b>Tableau 1.</b> Diagnostic différentiel de la leishmaniose.	<b>27</b>
<b>Tableau 2.</b> Médicaments utilisés pour traiter les différentes formes de leishmaniose.	<b>38</b>
<b>Tableau 3.</b> Liste des espèces de phlébotomes recensées en Algérie.	<b>44</b>
<b>Tableau 4.</b> Séquences d'amorces et conditions principales des méthodes de PCR utilisées.	<b>51</b>
<b>Tableau 5.</b> Évolution temporelle des lésions cutanées avant l'échantillonnage.	<b>53</b>
<b>Tableau 6.</b> Comparaison des deux examens parasitologiques.	<b>55</b>
<b>Tableau 7.</b> Comparaison des résultats de l'IFI avec les examens parasitologiques.	<b>56</b>
<b>Tableau 8.</b> Comparaison des résultats du WB avec les examens parasitologiques.	<b>57</b>
<b>Tableau 9.</b> Comparaison des résultats de la PCRk lancée sur les sérosités et sur du sang.	<b>58</b>
<b>Tableau 10.</b> Comparaison des résultats de la PCR avec les examens parasitologiques.	<b>59</b>
<b>Tableau 11.</b> Comparaison des résultats de la PCR avec les techniques sérologiques.	<b>59</b>
<b>Tableau 12.</b> Sensibilité et spécificité des différentes techniques du diagnostic effectuées.	<b>59</b>
<b>Tableau 13.</b> Distribution des espèces identifiées par PCR-ITS 1-RFLP selon la région de séjour.	<b>60</b>
<b>Tableau 14.</b> Récapitulatif des résultats des données épidémiologiques et des analyses biologiques des patients de LC.	<b>62</b>
<b>Tableau 15.</b> Séquences d'amorces et sondes ainsi que les conditions principales des PCRs utilisées.	<b>79</b>
<b>Tableau 16.</b> Les densités des espèces de phlébotomes par sites dans la région de Tipaza.	<b>81</b>
<b>Tableau 17.</b> Détection d'ADN de <i>Leishmania</i> dans les phlébotomes collectés à Bourkika.	<b>83</b>
<b>Tableau 18.</b> Préférence trophique des phlébotomes femelles gorgés collecté à Bourkika.	<b>86</b>
<b>Tableau 19.</b> Les amorces et sondes utilisées pour la RT-qPCR.	<b>98</b>
<b>Tableau 20.</b> Les amorces et sondes utilisées pour les qPCR dans cette étude.	<b>99</b>
<b>Tableau 21.</b> Résultats globaux de recherches de bactéries chez les phlébotomes de Bourkika.	<b>102</b>

---

---

## Résumé

---

---

Les leishmanioses, parasitoses transmises exclusivement par les phlébotomes, constituent un vrai problème de santé publique en Algérie. Le but de ce travail est la surveillance et le contrôle de ces maladies dans le Nord d'Algérie sous leurs différents aspects.

Dans un premier volet, nous avons contribué à l'amélioration du diagnostic de leishmaniose cutanée (LC), par introduction de techniques moléculaires. Quarante-neuf patients suspects de LC ont été diagnostiqués par techniques parasitologiques (examen direct, culture), sérologiques (IFI et WB) et moléculaires (PCR kinétoplastique et PCR-ITS1-RFLP). La PCRk a montré son apport flagrant dans le diagnostic de LC, avec un taux de positivité de 89.79 % et de sensibilité de 90 % plus élevés par rapport aux autres techniques réalisées. En outre, la PCR-ITS1-RFLP avait l'avantage d'identifier *L. major* et *L. infantum* chez 25 patients de LC. Nous suggérons l'utilisation de la PCRk et PCR-ITS1-RFLP pour le diagnostic et l'identification simultanée des espèces dans un contexte épidémiologique en Algérie.

Dans un second volet, nous avons contribué par une étude entomo-épidémiologique à l'étude de la faune de phlébotomes, leur taux d'infection par *Leishmania* spp. et la détermination de leur préférence trophique dans un foyer hypoendémique de leishmaniose humaine située à Tipaza, au nord d'Algérie, par outils moléculaires. Sept espèces de phlébotomes ont été inventoriées, appartenant au deux genre *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) longicuspis*, vecteurs de *L. infantum* au nord d'Algérie, étaient les plus abondantes dans notre collecte. Les espèces : *P. (L.) langeroni* ; *P. (L.) ariasi* ; *S. (S.) minuta* et *P. (P.) papatasi* sont peu représentées dans notre collecte. De plus, L'ADN de *L. infantum* a été détecté dans 3 parmi les 740 femelles de phlébotomes testées avec un taux d'infection de 0,33% chez *P. (L.) perniciosus* et de 2,56% chez *P. (L.) perfiliewi*. Enfin, l'analyse moléculaire du repas sanguin chez 88 spécimens a révélé que le sang humain (17%) était la deuxième source d'alimentation des phlébotomes du sous-genre *Larroussius* après les ruminants (74,11 %). Ces résultats surlignent les facteurs de risque de transmission de *L. infantum* dans la province de Tipaza.

En dernier volet, nous avons recherché les phlébovirus et les bactéries associés aux phlébotomes. Nos résultats révèlent l'absence de *Toscana virus* et *Sand Fly Sicilian Virus* chez les phlébotomes collectés à Bougaa (Sétif, Algérie) et rapportent pour la première en Algérie, la présence de l'ADN des *Anaplasmatataceae* chez les phlébotomes collectés à Bourkika, Tipaza.

**Mots clés :** *Anaplasmatataceae*, Bactéries, Contrôle, Diagnostic, *L. infantum*, Leishmanioses, outils moléculaires, *Phlebotomus*, phlébovirus, préférence trophique, Surveillance.

---

---

## Abstract

---

---

Leishmaniasis are vector born diseases transmitted exclusively by sandflies. In Algeria, these affections are endemic and represent a serious public health problem because of their high annual incidence and their spread across the country. The purpose of this work is the monitoring and the control of these diseases in the North of Algeria.

In the first part, we contributed to the improvement of the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL), using molecular tools. Forty-nine patients suspected of CL were diagnosed by parasitological (direct examination, culture), serological (IFI and WB) and molecular techniques (kinetoplastic PCR and PCR-ITS1-RFLP). PCRk has shown its high contribution in the diagnosis of CL, with a higher positivity rate of 89.79% and sensitivity of 90% compared to other techniques performed in this study. In addition, PCR-ITS1-RFLP had the advantage of identifying *L. major* and *L. infantum* from samples of 25 LC patients. We suggest the use of PCRk and PCR-ITS1-RFLP for the diagnosis and simultaneous identification of species in an epidemiological context in Algeria.

In the second part, we contributed by an entomo-epidemiological approach, using molecular tools, to the study of sandflies fauna, their *Leishmania* infection rate and the identification of their blood-feeding behavior in a hypoendemic focus of human leishmaniasis located in Tipaza province, northern of Algeria. Seven sandfly species belonging to both *Phlebotomus* and *Sergentomyia* genus have been recorded. *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi* and *P. (L.) longicuspis*, *L. infantum* vectors of in northern Algeria, were the most abundant in our collection. The species: *P. (L.) langeroni*; *P. (L.) ariasi*; *S. (S.) minuta* and *P. (P.) papatasi* are poorly represented in our collection. In addition, *L. infantum* DNA was detected from 3 of 740 sand flies females tested with an infection rate of 0.33% in *P. (L.) perniciosus* and 2.56% in *P. (L.) perfiliewi*. Finally, the molecular analysis of the blood meal from 88 specimens revealed that human blood (17%) was the second feeding source of sandflies of *Larroussius* subgenus after ruminants (74.11%). These results highlight the risk factors for *L. infantum* transmission in Tipaza province.

Finally, we investigated the presence of phleboviruses and bacteria associated with sandflies. Our results reveal the absence of *Toscana virus* and *Sand Fly Sicilian Virus* in sandflies collected from Bougaa locality (Sétif, Algeria) and report for the first time in Algeria, the presence of DNA of *Anaplasmatataceae* in sandflies collected in Bourkika, Tipaza.

**Key words :** *Anaplasmatataceae*, bacteria, control, diagnosis, feeding behavior, *L. infantum*, leishmaniasis, molecular tools, monitoring, *Phlebotomus*, phlebovirus.

## ملخص

إن داء الليشمانيات الذي تسببه الطفيليات المنقولة حصرياً عن طريق ذبابة الرمل يعتبر مشكلة حقيقية للصحة العامة في الجزائر. إن الغرض من هذا العمل هو مراقبة ومكافحة هذه الأمراض من جوانبها المختلفة في شمال الجزائر.

في المرحلة الأولى من هذا العمل، ساهمنا في تحسين تشخيص داء الليشمانيات الجلدي عن طريق استعمال التقنيات الجزيئية المتطورة. ولهذا قمنا بتشخيص تسعة وأربعين مريضاً مشتبهين بالإصابة بداء الليشمانيات الجلدي بواسطة التقنيات الطفيلية (الفحص المباشر والزراعة الخلوية)، المصلية (الفحص المناعي المشع الغير المباشر Western Blot, IFI) والجزيئية (PCR-ITS1-RFLP, PCRkinétoplastique).

وفقاً لنتائجنا، أثبتت التحاليل الجزيئية بواسطة PCRk موثوقيتها مقارنة بالتقنيات الأخرى التي تم اعتمادها في تشخيص المرض بمعدل إيجابية قدره 89.79% وبنسبة حساسية قدرها 90%. بالإضافة إلى ذلك لقد سمحت التحاليل الجزيئية بواسطة PCR-ITS1-RFLP بالتعرف على نوعين من جنس الليشمانيات *L. Infantum* و *L. major* المتسببة في المرض عند 25 حالة. وبالتالي نقترح استخدام هذه التقنيات الحديثة للتشخيص والتعرف في وقت واحد على الأنواع المتسببة في المرض في سياق وبائي في الجزائر.

في الجزء الثاني من العمل، أجرينا دراسة وبائية وحشرية بخصوص ذباب الرمل في منطقة "تيازة" شمال الجزائر، حيث يتواجد داء الليشمانيا بقلّة، وذلك بجرد أنواع ذباب الرمل المنتشرة في المنطقة وتحديد معدل حملها لطفيليات الليشمانيا وكذلك دراسة مصدر غداء الدم لهذه الحشرات الدموية حيث تم تسجيل وجود سبع 07 أنواع من ذباب الرمل في هذه المنطقة تنتمي لجنسين: *Sergentomyia*، *Phlébotomus*.

كانت الأنواع الأكثر انتشاراً ويعرف عنها أنها ناقلة لطفيلي من *P. longicuspis*، *P. perfiliewi*، *P. perniciosus* نوع *L. infantum*. بالإضافة إلى ذلك تم الكشف عن وجود الحمض النووي لهذا الأخير عند 03 ثلاثة من أصل 740 ذبابة رمل تم إختبارها بمعدل إصابة قدره 0.33% في *P. perniciosus* و 2.56% في *P. perfiliewi*. كما كشف تحليل غداء الدم لـ 88 ذبابة رمل أن 17% منها كان مصدر غداءها الدم البشري بينما 74.11% منها تغذت على دم المجترات. إن النتائج المتحصل عليها هنا تسلط الضوء على وجود عوامل خطر إنتشار داء الليشمانيا في هذه المنطقة.

و في دراسة أخيرة، قمنا بالبحث عن الفيروسات المنقولة عن طريق ذباب الرمل (*Phlébovirus*) وكذلك البيكتيريا التي يمكن أن تتواجد فيه، حيث كشفت النتائج عن غياب فيروس *Toscana virus* و *Sand Fly Sicilian Virus* في عينات ذباب الرمل التي جمعت في منطقة "بوقاعة" بولاية سطيف، شمال الجزائر.

كما كشفت نتائجنا لأول مرة في الجزائر عن وجود الحمض النووي لبيكتيريات من عائلة *Anaplasmataceae* في ذباب الرمل التي جمعت في منطقة "بورقية" بولاية تيازة، شمال الجزائر.

**الكلمات المفتاحية:** المراقبة، السيطرة، داء الليشمانيا، التشخيص، ذباب الرمل، *L. infantum*، مصدر غداء الدم، *Phlébovirus*، البيكتيريا، *Anaplasmataceae*، التقنيات الجزيئية.

---

---

# **Introduction générale**

---

---

Les maladies à transmission vectorielle telles que le paludisme, la dengue, le chikungunya et les leishmanioses, pour n'en citer que quelques-unes, représentent aujourd'hui à l'échelle de la planète un enjeu scientifique et social primordial. Ces maladies figurent parmi les plus importantes en santé humaine et animale, tant par la morbidité que par la mortalité qu'elles entraînent (Bley *et al.*, 2010).

Ainsi, la surveillance et le contrôle des maladies vectorielles constituent une priorité majeure. Cela passe par la compréhension des mécanismes de transmission de la maladie, qui sont généralement complexes, faisant intervenir une triade vectorielle constituée de trois acteurs biologiques : l'agent infectieux, son (ses) vecteur (s), son (ses) hôte (s) vertébré (s) qui peut représenter un réservoir (population, vertébrée ou invertébrée, assurant le maintien de l'agent infectieux dans la nature) (Tran *et al.*, 2005). Cette triade, et par interrelations entre ses trois acteurs, s'inscrit dans un environnement dont la prise en compte définit un système vectoriel (Robert, 2017).

Les leishmanioses, dûes au parasite unicellulaire *Leishmania* (*Kinetoplastida* : *Trypanosomatidae*) et transmis aux mammifères (dont l'homme) lors de la pique d'un phlébotome femelle (*Diptera* : *Psychodidae*), comptent parmi les maladies vectorielles classées prioritaires, après le paludisme, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Elles forment un complexe d'affections présentant des manifestations protéiformes, qui, si elles sont exprimées, vont de la forme cutanée, entraînant des cicatrices défigurantes associées à la stigmatisation sociale, à des formes d'infections disséminées potentiellement létales, si elles ne sont pas traitées (Pace, 2014).

Les évaluations antérieures ont estimé l'incidence mondiale des leishmanioses à environ 12 millions de personnes touchés avec deux millions de nouveaux cas par an et 350 millions de personnes exposées au risque d'en contracter. Le fardeau de ces affections est certainement plus grand dans les pays en voie de développement en raison de la sous déclaration flagrante. Seulement 32 pays déclarent systématiquement les cas de leishmanioses (WHO, 2010).

L'Algérie n'est pas épargnée des leishmanioses, où elles sont considérées comme les maladies parasitaires les plus importantes à impact sanitaire et socio-économique redoutable. Avec une incidence annuelle de leishmaniose cutanée (LC) plus importante que viscérale (LV), l'Algérie représente le pays le plus touché dans le bassin méditerranéen et compte parmi les dix pays les plus touchés au monde. Près de sept millions de personnes sont exposés au risque d'infection avec une moyenne de 14 752 cas de LC et 200 cas de LV par an (Eddaikra *et al.*, 2013 ; INSP, 2014).

Les études épidémiologiques antérieures ont permis d'identifier l'endémicité des leishmanioses en Algérie. Quatre formes y sévissent à l'état endémique. La forme viscérale due à *Leishmania infantum* MON-1 est endémique dans les régions montagneuses du Tell. La forme cutanée du nord due à *L. infantum* MON-24 est sporadique dans les foyers de leishmaniose viscérale. La leishmaniose cutanée zoonotique des régions steppiques est due à *L. major* et enfin la forme cutanée anthroponotique due à *L. killicki* appartenant au complexe *L. tropica* signalée récemment dans plusieurs parties du pays à savoir : Constantine, Annaba, Ghardaia et Tipaza (Mihoubi *et al*, 2008 ; Harrat *et al*, 2009 ; Eddaikra *et al*, 2013 ; Izri *et al*, 2014).

Cependant, ces dernières années, une extension géographique des leishmanioses en Algérie s'est bien établie. La leishmaniose cutanée zoonotique confinée exclusivement aux foyers steppiques et sahariens a envahi désormais le Tell, pendant que d'autres nouveaux foyers continuent à apparaître (Boudrissa *et al*, 2012). Cette propagation est expliquée par les modifications environnementales qui se répercutent sur le fonctionnement des foyers, leur dynamique, et leur extension territoriale. Ces modifications du milieu naturel peuvent être soit d'origine anthropique (urbanisation non planifiée), soit d'origine climatique (changement climatique). Ces deux facteurs sont d'ailleurs le plus souvent étroitement intriqués (Desjeux, 2004).

La nécessité continue d'actualiser ces données en étudiant les facteurs épidémiologiques, écologiques et entomologiques qui contribuent à l'émergence et la réémergence de ces maladies en Algérie est donc indispensable. De plus, l'introduction de techniques moléculaires innovantes et leur application sur les études de terrain permettront d'avoir une vue d'ensemble sur la dynamique de transmission des leishmanioses de manière précise, rapide et efficace, et par conséquent, l'établissement d'un programme de contrôle plus approprié.

Dans cette perspective, nous avons entrepris les travaux de notre recherche durant quatre ans consécutives afin de contribuer à la surveillance des leishmanioses dans le nord d'Algérie pour cerner la situation épidémiologique de ces affections sous ses différents aspects.

Les travaux effectués dans le cadre de notre thèse qui porte sur « La surveillance et le contrôle des leishmanioses dans le Nord d'Algérie » ont été organisés dans le présent manuscrit en quatre chapitres.

Le premier chapitre documente de façon explicite, au public comme aux spécialistes, les leishmanioses incluant leurs histoire, les espèces de parasite responsables et leurs vecteurs qui conditionnent leur répartition géographique dans le monde généralement et en Algérie particulièrement. Les méthodes de diagnostic, de traitement disponibles et de lutte seront également énumérées.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons une étude comparative en vue d'améliorer le diagnostic de leishmaniose cutanée humaine, par l'application de techniques moléculaires (PCR-RFLP), pour la détection rapide et l'identification précise des espèces du parasite responsables. L'évaluation de l'apport de ces techniques comparées aux techniques habituellement utilisées dans les services de santé en Algérie a été discutée.

Afin de contribuer à la compréhension et le contrôle de ces maladies vectorielles, nous présentons dans le troisième chapitre, l'application d'une approche entomologique pour définir la distribution des phlébotomes vecteurs, combinée à une approche épidémiologique pour évaluer leur taux d'infection par *Leishmania* ainsi que leur comportement alimentaire dans une région hypoendémique de leishmaniose humaine dans le nord du pays (Tipaza, Algérie). Les objectifs, les méthodes utilisées, les résultats, les limites ainsi que la complémentarité des deux approches sont discutés.

Dans un dernier chapitre, nous présentons notre recherche sur les éventuels agents pathogènes (bactéries et virus) qui peuvent être associés aux phlébotomes collectés dans deux régions du nord d'Algérie (Bourkika dans la wilaya de Tipaza et Bougaa dans la wilaya de Sétif) par l'utilisation de techniques moléculaires (qPCR, Reverse Transcriptase-PCR).

Des remarques conclusives viennent clôturer le présent manuscrit en ouvrant de nouvelles voies aux perspectives ainsi que d'autres pistes de recherche continue qui permettront de s'enfoncer dans la compréhension des leishmanioses ainsi que d'autres maladies à transmission vectorielles.



## **Chapitre I**

# **Revue bibliographique sur les leishmanioses**



## **I.1. *Leishmania* et les leishmanioses**

### **I.1.1. Les leishmanioses en chiffres**

La leishmaniose, dans toute ses formes, fait partie des maladies tropicales à transmission vectorielles négligées (Savoia, 2015). Ces affections sont qualifiées de "négligées" parce qu'elles persistent principalement dans les communautés marginalisées et pauvres (Kobets *et al.*, 2012). Bien que principalement concentrée dans les pays pauvres d'Asie du Sud-Est, d'Afrique de l'Est et d'Amérique latine, la leishmaniose est également endémique dans plusieurs pays méditerranéens, faisant de cette parasitose un problème major de santé publique pour les habitants et les voyageurs. Sur la base de la répartition géographique, la maladie est divisée en leishmaniose de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde (Pace, 2014).

La véritable charge de morbidité des leishmanioses reste toujours inconnue en raison du manque de déclaration, de l'absence de systèmes de surveillance épidémiologique ou de méthodes de diagnostic appropriées. La plupart des données d'incidence disponibles sont basées sur des estimations (WHO, 2010).

Dans le cadre des efforts menés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour mettre à jour la base de données empiriques sur les leishmanioses, les experts nationaux ont fourni des données sur les cas enregistrés au cours de cinq années (2007-2012). Globalement, 98 pays et 3 territoires sur 5 continents ont signalé une transmission endémique de la maladie (Alvar *et al.*, 2012). Le nombre de cas officiels est de plus de 58 000 cas de LV et 220 000 cas de LC par année. Cependant, seulement environ les deux tiers des pays ont communiqué des données sur l'incidence de la maladie durant la période d'étude et les données étaient plus rares pour les foyers en Afrique (Alvar *et al.*, 2012). La morbidité de toutes les formes de leishmaniose à tous les âges a récemment été estimée à 3 754 202 DALYs (*Distability Adjusted Life Years*) (Pace, 2014).

La Leishmaniose Viscérale (LV), la forme la plus grave de la maladie, létale si elle n'est pas traitée est endémique dans plus de 60 pays. Le nombre de cas est estimé à 0,2-0,4 million de personnes par ans dont plus de 90% en Inde (principalement dans l'Etat de Bihar), au Bangladesh, au Soudan, en Ethiopie et au Brésil. La mortalité qui en résulte est estimée à 10-20%, en particulier dans les zones pauvres. De plus, et depuis le début de la pandémie de VIH dans les années 1990, une augmentation des cas de coinfection *Leishmania*-VIH dans les zones endémiques a été observée comme une maladie opportuniste chez les personnes immunodéprimées (Fig. 1) (OMS, 2015).

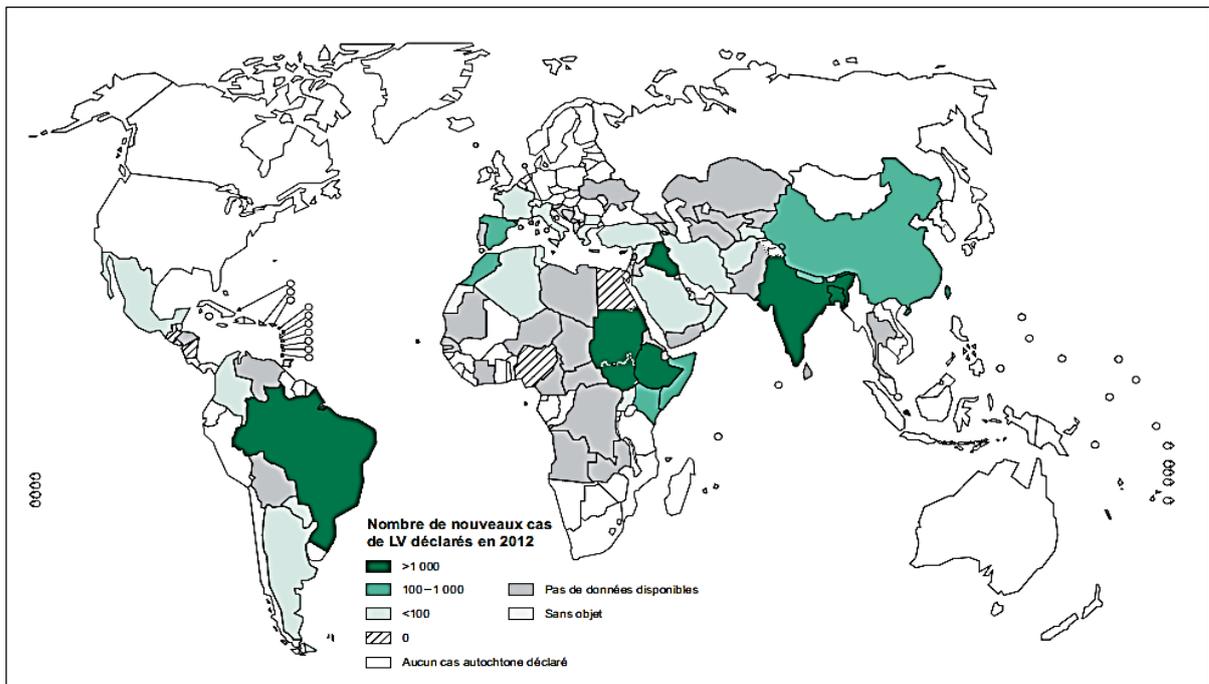


Figure 1. Répartition de la leishmaniose viscérale dans le monde en 2012 (OMS, 2015).

Quant à la leishmaniose cutanée (LC), maladie potentiellement grave et défigurante, elle est endémique dans plus de 70 pays. On estime que 1 million de cas surviennent principalement en Afghanistan, en Algérie, en Arabie saoudite, au Brésil, en Colombie, au Pakistan, au Pérou, en République arabe syrienne, en République islamique d’Iran et en Tunisie. Environ 35 000 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse surviennent chaque année principalement au Brésil, Pérou et Bolivie (Fig. 2) (OMS, 2015).

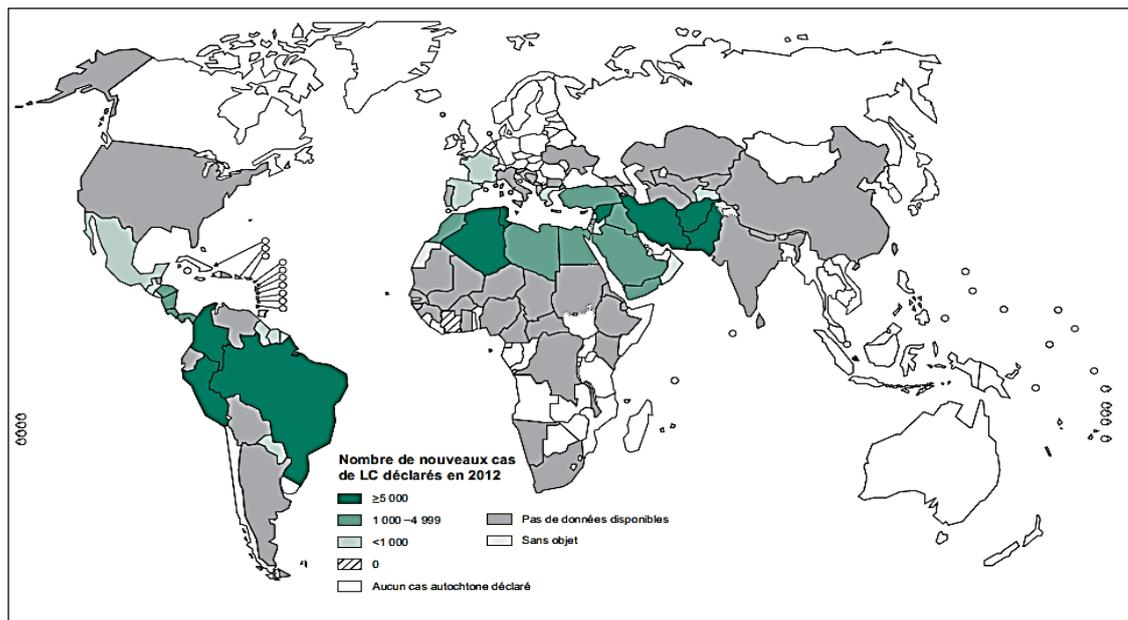


Figure 2. Répartition de la leishmaniose cutanée dans le monde en 2012 (OMS, 2015).

En Afrique du Nord, la maladie est très répandue en Algérie, au Maroc, en Tunisie et en Libye, avec émergence de nouveaux foyers endémiques et une augmentation conséquente de l'incidence depuis les années 1980. Le nombre de cas reste faible en Egypte (Fig. 3) (Aoun & Bouratbine, 2014).

Actuellement, l'Algérie est considérée par l'OMS comme l'un des pays les plus touchés au monde par la maladie, avec une prévalence plus élevée de LC que de LV, exposant au risque d'infection plus de sept millions personnes. L'incidence annuelle des cas de LC varie de 10 000 à 40 000 cas par an, concentrée principalement dans les foyers les plus actifs : Biskra, M'sila et Abadla. Cependant, une incidence moyenne de 200 et 150 cas de LV par an sont dispersés dans le Nord, notamment en Kabylie, foyers classiques de leishmaniose viscérale et canine (Eddaikra *et al*, 2013).

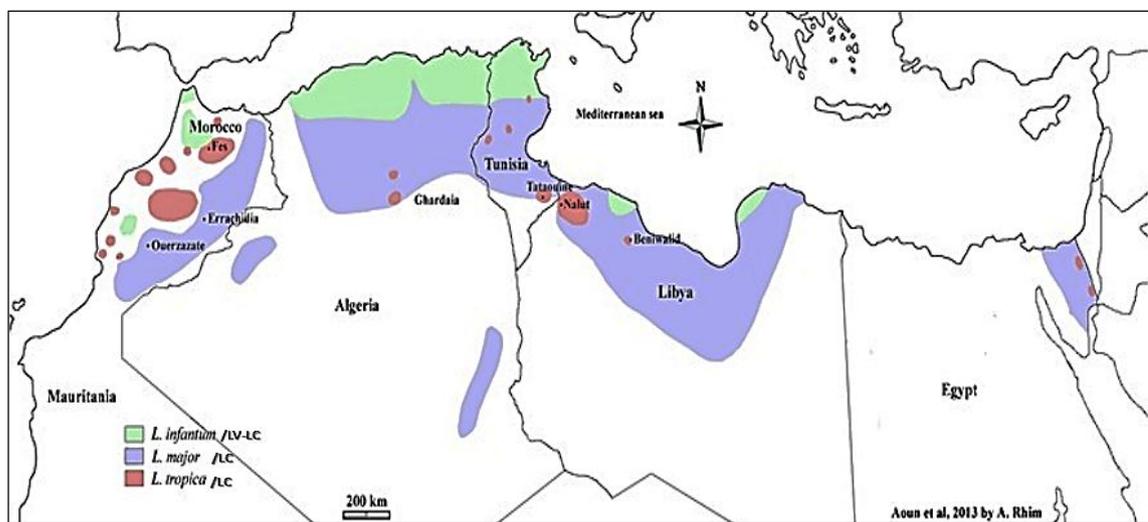


Figure 3. Répartition géographique des cas de leishmaniose cutanée et viscérale dans les pays d'Afrique du Nord (Aoun & Bouratbine, 2014).

### I.1.2. Les leishmanioses et leur histoire de découverte

Parmi les historiques de toutes les parasitoses, celui des leishmanioses est un de ceux qui remonte au plus loin et se trouve des plus fertiles en événements.

Il a été supposé que la leishmaniose pourrait avoir été établie il y a 50 millions d'années, pendant le Paléogène (Tuon *et al*, 2008). La preuve directe que des personnes ont souffert de cette maladie provient d'échantillons âgés de 4 000 ans : l'ADN de *L. donovani* a été détecté chez des momies égyptiennes provenant d'une tombe du Moyen Empire (Zink *et al*, 2006). La présence de *Leishmania* a également été détectée dans des lésions faciales sur d'anciens crânes du désert d'Atacama au Chili (Costa *et al*, 2009).

Les premières descriptions de ces pathologies remontent au X<sup>ème</sup> siècle. Le médecin arabe Al Boukhari, décrit des affections dermatologiques qui présentent des leishmanioses tégumentaires de l'ancien monde et Avicenne a fait le lien entre ces affections cutanées et la piqûre d'insecte (Manson-Bahr *et al*, 1996).

En 1882, la découverte de parasites à l'intérieur des macrophages d'une lésion cutanée a été faite par Mac-Naught, et par Cunningham en 1885 (Cox, 2002). En 1898, en Ouzbékistan, le médecin militaire Borovsky mentionna un protozoaire dans un prélèvement d'ulcère, sans toutefois déterminer son statut taxonomique. Ce même parasite fut étudié par Wright, chez un enfant vivant à Boston développant une lésion cutanée, en 1903 (Cox, 2002).

En 1901, Sir William Leishman observa des petites cellules de 2-3µm dans le foie d'un soldat atteint de kala azar. Il publia sa découverte en 1903. Il s'agissait des formes amastigotes de *Leishmania donovani*. La même année, Sir Charles Donovan envoya un extrait de foie d'un patient souffrant de fièvre et un grossissement du foie à Ronald Ross. Ce dernier réalisa qu'il s'agissait du même parasite que celui isolé par Leishman. Ross créa alors le genre *Leishmania* en son honneur. Ces parasites furent parfois appelés des corps de « Leishman-Donovan » (Hamilton & Bishop, 1959).

En 1908, Nicolle et Sicre réalisèrent la première culture du parasite, en comparant les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903. Ils conclurent : « la presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan et de celui de Wright n'est pas contestable ». (Jarry, 1999).

En 1912, les frères Sargent notifient le premier cas de leishmaniose canine à Alger (Théodoridès, 1997). Deux ans plus tard ils rapportent la présence de l'infection chez un chien et un chat vivant avec un enfant atteint de la leishmaniose viscérale (Théodoridès, 1997). En 1921, avec leurs collaborateurs, ils établissent le rôle des vecteurs phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyat de ces insectes sur des scarifications cutanées (Théodoridès, 1997). Et en 1946, Sarrouy *et al* rapportent le premier cas de Kala-azar infantile en Kabylie (Sarrouy *et al*, 1946).

D'après une publication de l'OMS en 1982, la caractérisation des souches de leishmanies est devenue courante à partir de 1970 et les premiers cas de coïnfections VIH-leishmanies sont signalés en 1985 (Jarry, 1999).

### **I.1.3. Les protagonistes des leishmanioses**

Les leishmanioses sont causées par des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* (*Kinetoplastida* : *Trypanosomatidae*) et transmises aux mammifères, y compris l'homme, par piqûre d'insecte phlébotome (*Diptera* : *Psychodidae*), communément appelé

«mouche de sable» (Nzelu *et al*, 2014). Les *Leishmania* ont un cycle de vie dimorphique, alternant entre les mammifères hôtes et les phlébotomes femelles hématophages qui les transmettent (Baum *et al*, 2014).

### **I.1.3.1. Le parasite : *Leishmania* (Kinetoplastida : Trypanosomatidae)**

#### **I.1.3.1.1. Taxonomie**

Le parasite du genre *Leishmania*, un eucaryote unicellulaire appartenant au sous-règne des protozoaires, fait partie de l'ordre *Kinetoplastida*, une des branches les plus anciennes des eucaryotes, et plus spécifiquement de la famille *Trypanosomatidae*, qui a émergé il y a environ 500 millions d'années (Sogin, 1991 ; Stevens *et al*, 1999 ). Environ 30 espèces de ce genre sont recensées, dont plus des deux tiers sont des pathogènes pour l'homme. Elles sont regroupées dans deux sous-genres selon leur développement autour du pylore de l'intestin de vecteur : le sous-genre *Leishmania* (Saf'janova, 1982) a un développement supra-pylorique et le sous-genre *Viannia* (Lainson, 1987) a un développement péri-pylorique.

Depuis la description du genre *Leishmania* par Ross en 1903, différentes classifications taxonomiques ont été proposées en s'appuyant sur divers critères extrinsèques tels que les données cliniques et épidémiologiques, la répartition géographique, les caractéristiques biologiques, le comportement du parasite dans le vecteur, le pouvoir pathogène expérimental, les caractères culturels et les critères immunologiques (Hide, 2004).

Des techniques biochimiques et moléculaires ont ensuite remplacé ces facteurs extrinsèques par des critères intrinsèques afin d'affiner la classification des leishmanies. L'électrophorèse iso-enzymatique reste la méthode de référence du typage de souches permettant de définir les zymodemes (ensemble des souches présentant le même profil enzymatique) ; mais il y a aussi des techniques moléculaires plus précises et innovantes dont la PCR-séquençage (*Polymerase Chain Reaction*), le RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*), la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) qui ont contribué à la classification de ces parasites. L'utilisation de ces techniques a donc conduit à la publication d'un schéma taxonomique général des *Leishmania* par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2010) (Fig. 4).

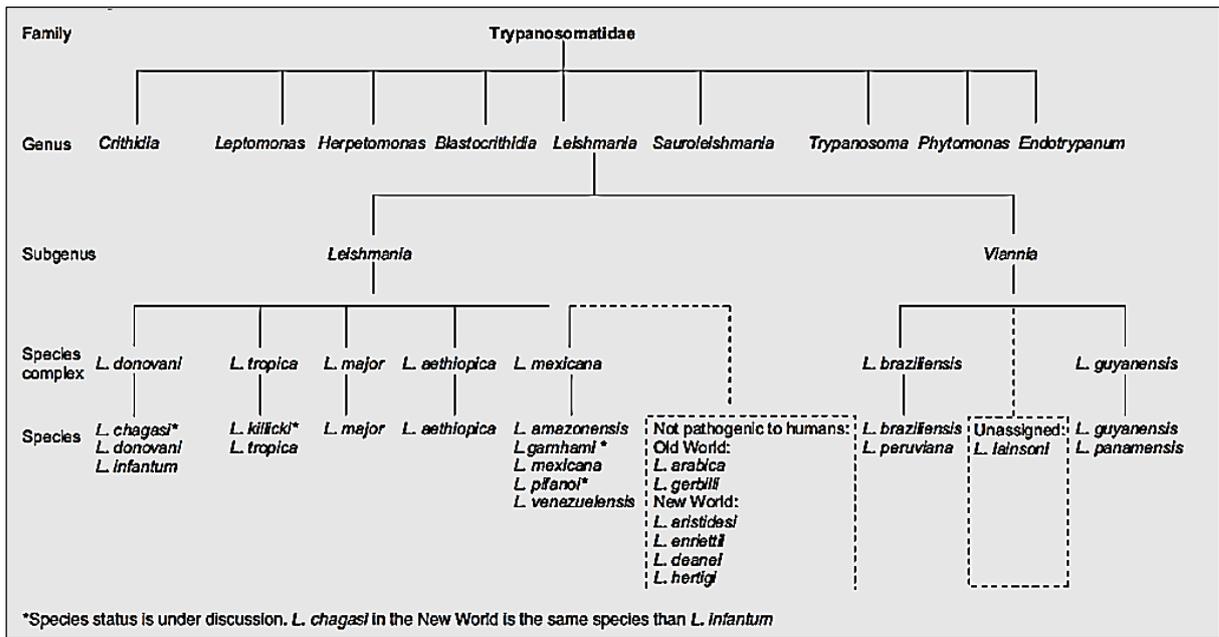


Figure 4. Taxonomie de *Leishmania* (WHO, 2010).

### I.1.3.1.2. Morphologie

Le parasite eucaryote unicellulaire *Leishmania* est pourvu d'un organe spécifique aux *Kinetoplastidae*, le kinétoplaste, situé en position antérieure. Il contient deux types de molécules d'ADN, les maxi-cercles et les mini-cercles. La composition cellulaire des leishmanies inclut des organites plus classiques tels que le noyau, le flagelle et sa poche flagellaire ou encore l'appareil de Golgi. Il présente au cours de son cycle évolutif deux stades successifs distincts : le stade amastigote et le stade promastigote (Schwenkenbecher *et al*, 2006).

**Le stade amastigote**, représente un petit corpuscule ovalaire ou arrondi de 2 à 6 µm de diamètre, présentant un noyau arrondi, un kinétoplaste, et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur. C'est le stade du parasite chez les mammifères, où les formes amastigotes multipliées sont localisées à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans les cellules du système phagocyte mononucléée (macrophages, monocytes, histiocytes), libérées ensuite par lyse de ces dernières (Fig. 5A) (Chabasse *et al*, 2007).

**Le stade promastigote**, se présente sous la forme d'un organisme allongé fusiforme et très mobile, d'environ 10 à 25 µm de longueur. Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste situé en position antérieure. Le flagelle libre est inséré sur le kinétoplaste par le blépharoblaste. C'est la forme que présente le parasite dans le tube digestif du phlébotome et en culture (Fig. 5B) (Estevez, 2009). Les promastigotes sont recouverts d'un glycocalyx alors que les amastigotes en sont presque complètement dépourvus. La molécule de surface la plus abondante est le lipophosphoglycan (LPG), sa structure varie d'une espèce de *Leishmania* à

l'autre. La deuxième molécule importante chez le promastigote est la glycoprotéine gp63. Il existe également d'autres protéines de surface du parasite telles : le phospholipide de glycosylinositol (GIPL), le complexe gp46/PSA-2, qui semblent tous, jouer un rôle dans la protection, la résistance du parasite à son hôte de même que dans sa pathogénicité et sa nutrition (Pimenta *et al*, 1991).

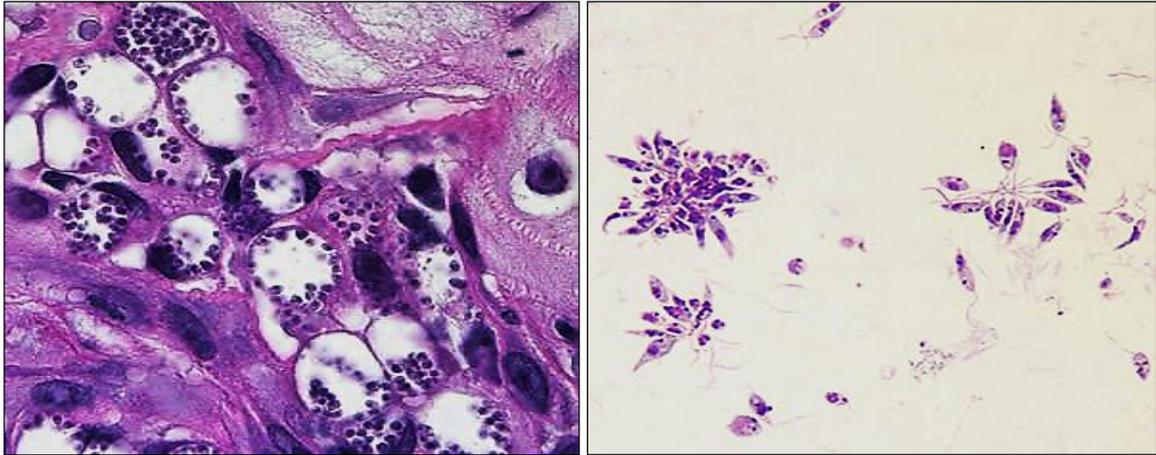


Figure 5. Aspects morphologiques du parasite *Leishmania* spp. sous microscopie optique. A gauche : Formes amastigotes à partir d'une biopsie provenant d'une lésion cutanée, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine ; A droite : Formes promastigotes dans la culture. ([www.cdc.gov/dpdx](http://www.cdc.gov/dpdx)).

#### I.1.3.1.3. Biologie

Les besoins énergétiques des amastigotes sont satisfaits par glycolyse. En cas de carence glucidique, les leishmanies exacerbent leur métabolisme protéique et deviennent protéolytiques. Elles effectuent un processus de néoglucogénèse à partir des acides aminés par transamination. L'équipement enzymatique glycolytique des leishmanies est très important et variable selon les espèces et les souches, d'où la notion de zymodemes, qui est très importante en taxonomie et en épidémiologie (Euzéby, 1994).

La morphologie de ces parasites, notamment celle de leur stade promastigote, et leur métabolisme, semblent être étroitement liée à leur biologie. Les paramètres environnementaux (température, pH, osmolarité du milieu, la pression en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>) et leurs variations ont été décrits comme influençant la forme parasitaire et les métabolismes du glucose et de certains acides aminés. Deux paramètres subissent de grandes variations au cours du cycle, à savoir le pH et la température. Lorsque les *Leishmania* passent de l'insecte vecteur à leurs hôtes mammaliens, elles subissent tout d'abord une augmentation de température d'environ 10°C puis, après internalisation par les macrophages, une chute du pH externe d'environ 2 unités. Ces paramètres semblent être plus particulièrement importants et pourraient commander la mise en route du programme de différenciation (Antoine *et al*, 1999).

Principalement, c'est par division binaire simple que se propagent les *Leishmania* durant les deux stades de leur vie (Euzeby, 1994).

Toutefois, Lanotte et Rioux en 1990 ont enregistré, par vidéo-cinématographie, un phénomène de cytogamie chez des promastigotes de *L.infantum* et *L.tropica*. La cytogamie commence par l'accolement des extrémités postérieures de deux promastigotes. La fusion cellulaire est marquée par la lyse des parois en contact, la fusion des cytoplasmes et la quasi disparition des flagelles. La cellule unique formée, est désignée par les auteurs sous l'appellation de zygomastigote (Lanotte & Rioux, 1990).

Plus récemment, des échanges génétiques rares ont été observés et semblent participer de façon significative à la structuration de population par l'apparition de nouveaux hybrides (Akopyants *et al*, 2009). Cette hypothèse a été ensuite étayée par DE MEEUS et ses collaborateurs en 2010 grâce à leurs travaux sur des souches américaines de *Leishmania* en montrant que pour les différentes espèces étudiées, le génome des leishmanies porte la signature d'une reproduction sexuée assez importante (au moins 60% dont 28% par autofécondation pour *L. guyanensis*) (Meeus, 2010).

#### **I.1.3.1.4. Cycle de vie de *Leishmania***

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie hétéroxène qui implique son passage de l'insecte vecteur à l'hôte mammifère (Fig. 6) (Rosal Rabes, 2010).

En tant que tel, le parasite développe de nouvelles adaptations pour survivre dans le vecteur (Kamhawi, 2006). La phase vectorielle du cycle commence lorsque les leishmanies sont ingérées au moment du repas sanguin des phlébotomes sous leurs forme amastigote (forme intracellulaire du système réticulo-histiocytaire du sang et de la peau des vertébrés). Rapidement se forme autour du repas sanguin une enveloppe chitineuse : la membrane péritrophique, à l'intérieur de laquelle au bout de 24 à 48 h les amastigotes se multiplient une ou deux fois, puis se différencient en petites cellules mobiles avec des flagelles courts «promastigotes procycliques». Ces dernières s'allongent pour former «les nectomonades», qui au bout de 3 à 4 jours, décomposent la matrice péritrophique pour atteindre la région thoracique du vecteur. Une fois-là, les nectomonades se différencient en «promastigotes leptomonades» en diminuant leurs tailles et en changeant la localisation de leurs flagelles, qui est suivie d'un second cycle de réplication. Ce processus produit une infection massive dans la partie antérieure de l'intestin moyen aboutissant à la différenciation de promastigotes métacycliques infectantes pour le vertébré, qui migrent enfin vers la partie antérieure du tube digestif pour atteindre la trompe, où elle sont prêtes à être inoculées à la faveur d'un nouveau repas sanguin (Hommel, 1999).

En entrant dans l'hôte, le parasite rencontre d'abord une réaction immunitaire après l'activation du système du complément à laquelle il peut échapper en inhibant la lyse médiée par le complément, qui se produit dans les phagolysosomes des macrophages. Cet effet protecteur lui est conféré par la protéase membranaire gp63, qui inhibe les attaques contre la membrane cellulaire parasitaire en adhérant aux composants du complément. Les parasites au stade promastigote se différencient en amastigotes. Enfin, lorsque la multiplication des parasites dépasse la capacité de rétention de la cellule phagocytaire, une lyse cellulaire se produit, libérant les parasites pour infecter de nouvelles cellules (Handman, 1999 ; Huber-Lang, 2006).

Selon certaines estimations conservatrices, un vecteur pourrait libérer entre 1 et 1 000 promastigotes métacycliques dans l'hôte pendant l'alimentation (Warburg et al, 1986 ; Rogers, 2004). Cependant, d'autres estimations basées sur des techniques de biologie moléculaire indiquent qu'un vecteur pourrait libérer jusqu'à 600 à 100 000 promastigotes métacycliques pendant une période d'alimentation et que ce nombre varie en fonction du temps d'alimentation (Kimblin *et al.*, 2008).

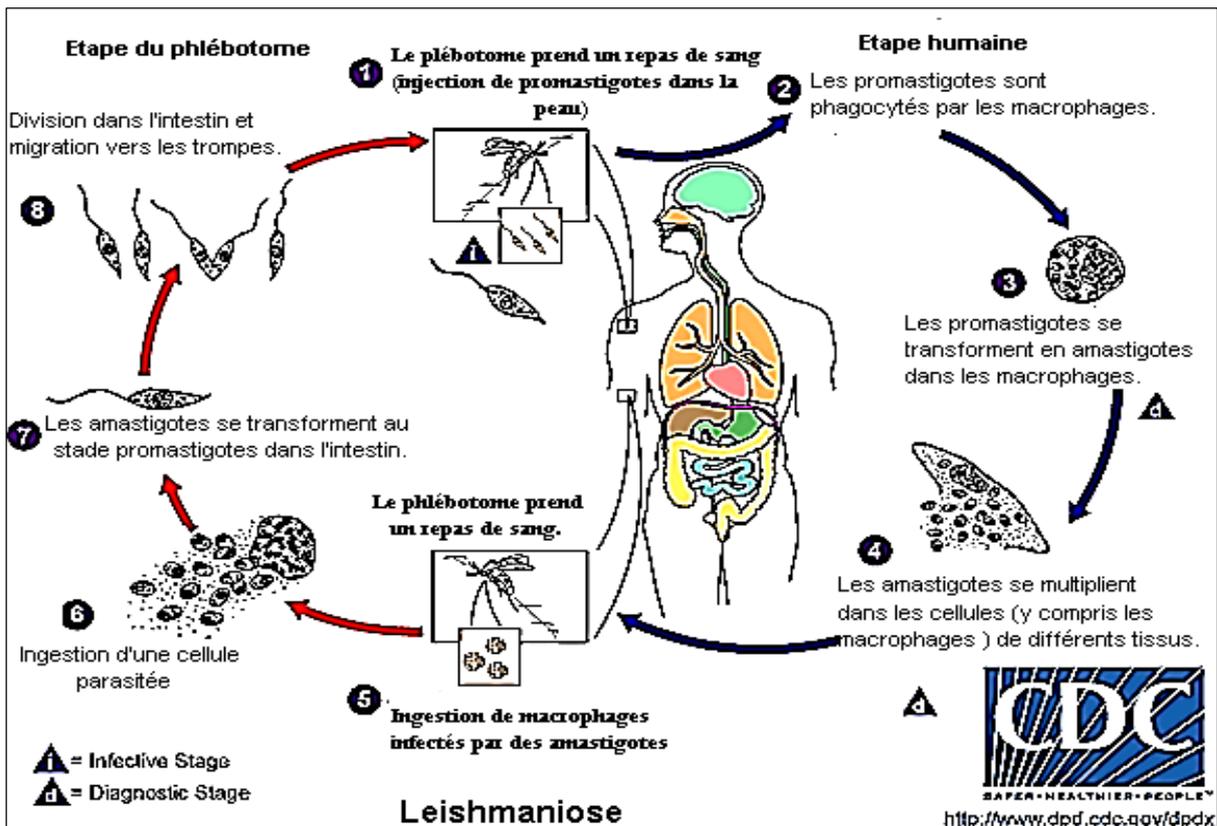


Figure 6. Cycle de vie de *Leishmania* spp ([www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

### I.1.3.1.5. Pathogénèse

Les diverses manifestations cliniques de *Leishmania* résultent de l'interaction entre l'espèce infectante et la réponse immunitaire de l'hôte (Pace, 2014). En bref, les modèles murins de LV

et LC ont montré que les cellules T auxiliaires CD4 jouent un rôle critique dans le contrôle de l'infection par une interaction avec des cellules présentatrices d'antigène exposées aux protozoaires de *Leishmania* qui entraîne la libération d'IFN-gamma (Alexander, 2012). L'IFN-gamma stimule les macrophages activés pour produire de l'oxyde nitrique entraînant la destruction intracellulaire des amastigotes de *Leishmania*, dont l'efficacité dépend de la quantité d'oxyde nitrique libérée et de l'amplitude des effets suppresseurs de l'IL-10 produite par les cellules régulatrices (Wei *et al*, 1995 ; Verma *et al*, 2010). Le parasitisme entraîne une baisse des capacités de production de ces dérivés oxygénés et nitrogénés, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des leishmanies à la digestion cellulaires (Briffod, 2011).

La capacité de l'hôte à construire une réponse immunitaire innée et adaptative efficace, une interaction complexe et incomplètement élucidée, est largement déterminée par des facteurs génétiques aussi bien que par des facteurs acquis. Les polymorphismes dans les gènes impliqués dans de telles interactions immunitaires peuvent jouer un rôle dans le pléomorphisme clinique démontré par la leishmaniose (Alexander, 2012 ; LeishGEN, 2013).

En outre, les conditions immunosuppresseives acquises peuvent moduler l'expression de la leishmaniose. En effet, les patients infectés par le VIH ont une susceptibilité accrue à la LV, même avec des espèces qui causent principalement la LC dont l'expression manque parfois de manifestations classiques et qui à son tour aggrave également l'immunosuppression chronique sous-jacente, et favorise la progression vers le SIDA (Okwor, 2013).

Bien que le mécanisme soit encore mal compris, les types de macrophages ciblés par les espèces de *Leishmania* qui causent les formes cutanées et viscérales diffèrent, possiblement en fonction de l'affinité préférentielle du parasite aux récepteurs spécifiques de la surface des macrophages (Engwerda *et al*, 2004 ; De Trez *et al*, 2009).

Certaines espèces comme *L. major* ne causent que la forme cutanée de la maladie, *L. donovani* entraîne une viscéralisation tandis que *L. infantum* peut provoquer les deux. Comme montré dans les modèles murins, cette variabilité est aussi probablement due aux différences génomiques acquises lors de l'évolution de *Leishmania*, rendant certaines espèces plus adaptées pour cibler la peau et d'autres pour envahir les organes viscéraux (Zhang, 2001).

#### **I.1.3.1.6. Manifestations cliniques**

Il est très important de parler de leishmanioses en pluriel, tant la diversité clinique, épidémiologique et immunologique de ces parasitoses est grande et déroutante pour les pathologistes et les épidémiologistes. Les manifestations protéiformes de la leishmaniose, si elles sont exprimées, peuvent varier des formes localisés sur la peau, qui entraînent des cicatrices défigurantes associées à une stigmatisation sociale ; à des infections disséminées, plus

sérieuses et potentiellement létales en absence de traitement (Pace, 2014 ; Depaquit & Léger, 2017).

**La leishmaniose viscérale (LV).** C'est la forme la plus grave de leishmaniose. Lors d'une infection initiale par des espèces viscérotropes de *Leishmania*, la maladie peut être asymptomatique ou bénigne suivie d'une résolution spontanée. Les facteurs prédisposant au déclenchement de la LV typique comprennent le jeune âge, la malnutrition, la pauvreté, l'immunodéficience et une forte charge leishmaniale. Un seul des 30 à 100 cas infectés développe une LV typique (Maltezou, 2010). Généralement le taux de morbidité due aux LV en Europe du Sud, en Afrique du Nord et en Asie occidentale et centrale est principalement élevé chez les enfants âgés de 1 à 4 ans. Cependant, avec l'augmentation du nombre des personnes immunodéprimées, l'incidence de LV chez l'adulte a augmenté (Desjeux & Alvar, 2003).

La progression de la maladie prend habituellement de 2 à 8 mois ou parfois plus longtemps, mais des cas aussi courts que 2 semaines après l'infection ont été rapportés (Maltezou, 2010 ; WHO, 2010). Le patient présente généralement de la fièvre, de la faiblesse, de l'anorexie, une perte de poids au cours des semaines aux mois suivant l'infection (Ashkan *et al*, 2008 ; Braga *et al*, 2013 ). La dissémination des parasites *Leishmania* induit l'accumulation de cellules phagocytaires mononucléaires dans les organes envahis et l'hyperplasie secondaire des cellules réticulo-endothéliales se manifestant cliniquement comme hépatosplénomégalie (habituellement prédominé par la splénomégalie) et une pâleur. Une lymphadénopathie et une détérioration progressive est aussi observée (Grech *et al*, 2000). Les enfants peuvent également présenter un retard de croissance. Les découvertes tardives comprennent aussi une épistaxis, une hémorragie gingivale, une distension abdominale, un œdème et une ascite (Maltezou, 2010).

Malgré un traitement approprié, une rechute peut survenir dans 6 à 12 mois plus tard. Une LV symptomatique non traitée évoluera vers une atrophie sévère, une maladie multi-organique, une diathèse hémorragique secondaire à une faible numération plaquettaire, des infections secondaires et plus souvent vers la mort dans les 2-3 ans (Collin *et al*, 2004).

Dans le contexte de la coïnfection par le VIH, la LV est généralement le résultat d'une rechute après des années de latence ou représente une infection nouvellement acquise. Les patients infectés par le VIH ont habituellement des charges parasitaires plus élevées et des symptômes atypiques (par exemple, gastro-intestinaux), en particulier avec un faible nombre de cellules CD4. Ce groupe de patients infectés par le VIH réagit mal au traitement et les taux de rechute sont élevés, quel que soit le traitement utilisé (Fig. 7 A) (Molina *et al*, 2007).

**La leishmaniose cutanée (LC).** Si elle est symptomatique, l'aspect et l'étendue des lésions cutanées à la suite d'une infection par *Leishmania* varient en fonction de l'espèce ainsi que des facteurs génétiques de l'hôte et de l'ampleur de l'activation immunitaire (Pace *et al*, 2014). la LC peut se manifester avec une ou plusieurs lésions cutanées sur les parties découvertes du corps (visage, les membres supérieurs et les membres inférieurs) dans les semaines ou les mois et parfois même les années qui suivent la piqûre du phlébotome (Herwald *et al*, 1993 ; Ahluwalia *et al*, 2004 ; Morizot *et al*, 2007).

La LC de l'ancien monde se caractérise habituellement par une lésion initiale sous forme d'une papule, qui évolue ensuite vers un nodule puis vers un ulcère au cours des 1-3 prochains mois. Ces ulcères sont généralement indolores et se développent lentement avec une base granulomateuse ou en croûte et des bords surélevés (Aara *et al*, 2013). Des lésions douloureuses peuvent survenir dans le contexte d'une surinfection bactérienne. Des manifestations peu fréquentes comprennent les formes lupoïdes, sporotrichoïdes, psoriasiformes, mycétomorphes et érysipéloïdes peuvent survenir (Maltezou, 2010). Occasionnellement, la LC du nouveau monde peut se manifester sous la forme d'une lymphadénopathie isolée ou progresser vers une LC disséminée qui est moins susceptible de guérir spontanément (Turetz *et al*, 2002 ; Paniz Mondolfi *et al*, 2013). Les lésions cutanées peuvent persister pendant des mois voire des années entraînant des cicatrices et des altérations permanentes de la pigmentation de la peau (Pace, 2014). (Fig. 7 B).

Malgré le fait que la LC n'est pas une maladie létale et que de nombreuses lésions (notamment dues aux espèces de l'Ancien Monde) guérissent spontanément au fil des mois, elle est souvent associée à une morbidité importante et peut affecter les activités quotidiennes et sociales (Pace, 2014).

**Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).** La propagation de la leishmaniose aux surfaces muqueuses du nez ou de la bouche peut provoquer la forme cutanéomuqueuse qui pourrait ne pas être détectée avant des années après la guérison des lésions cutanées initiales (Amato *et al*, 2009). La LCM survient dans 1 à 10% des cas de LC un à 5 ans après la cicatrisation. Les facteurs de risque de progression vers cette forme comprennent le sexe masculin, les lésions volumineuses ou multiples et les lésions au-dessus de la taille (Pérez-Ayala *et al*, 2009 ; Maltezou, 2010).

Les manifestations cliniques comprennent une congestion nasale chronique et des saignements, des ulcérations et des granulomes septaux. La LCM ne guérit pas elle-même et peut progresser et causer des complications permanentes ou potentiellement mortelles telles que la destruction ulcéreuse du nez, de la bouche, du pharynx et du larynx, la perforation du septum nasal et la défiguration faciale, entraînant une stigmatisation sociale. La LCM est

presque exclusivement concentré au Nouveau Monde et *L. braziliensis* est l'espèce la plus souvent impliquée (Fig. 7 C) (Fsadni *et al*, 2007 ; Guerra *et al*, 2011).



Figure 7. Les différentes manifestations cliniques des leishmanioses humaines : LV (A), LC (B) et LCM (C). (Dedet, 2009).

### I.1.3.2. Le vecteur : Phlébotome (*Diptera* : *Psychodidae* : *Phlebotominae*)

Les phlébotomes, communément appelés mouches de sable ou «phlebotomine sand flies», « sand flies » ou « sandflies» par les auteurs anglo-saxons forment un groupe monophylétique et très homogène de diptères hématophage considérés actuellement comme vecteurs exclusifs des leishmanioses. Il y a environ 230 ans, le premier phlébotome a été décrit d'Italie (Scopoli, 1783) et, aujourd'hui on en compte près de 1000 espèces et sous espèces dont environ 10% ont un rôle suspecté ou prouvé dans la transmission des leishmanioses principalement ainsi que d'autres pathogènes (Virus et bactéries) (Depaquit & Léger, 2017).

#### I.1.3.2.1. Taxonomie

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères. A l'heure actuelle, ils constituent la sous-famille des *Phlebotominae*, où ils se trouvent inclus avec trois autres sous-familles (*Bruchomyiinae*, *Trichomyiinae* et *psychodinae*) dans la famille des *Psychodidae* (Fairchild, 1955 ; Lewis *et al*, 1977 ; Duckhouse et Lewis, 1980).

Longtemps, la tentation d'adopter une classification minimaliste employant une nomenclature simplifiée accessible aux utilisateurs non systématiciens a prévalu. La classification des phlébotomes a toujours évolué différemment selon les continents (Abonnenc, 1972).

Dans l'ancien monde, une classification minimaliste qui repose essentiellement sur une vision biogéographique persiste. La création pour des espèces nouvelles aberrantes d'un genre

nouveau et de sous genres nouveaux, d'une part, et l'élévation de certaines sous genres au rang de genres a conduit au regroupement au sein de la sous famille de *Phlebotominae* cinq genres : *Phlebotomus* et *Sergentomyia* pour l'ancien monde et *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* pour le nouveau monde (Abonnenc & Leger, 1976 ; Locksley & Louis, 1992). Postérieurement, le nouveau genre *Chinius* est décrit (Leng, 1987).

En revanche, pour les phlébotomes américains deux classifications se côtoient. La première, inspirée de Young et Duncan, retient trois genres : *Warileya*, *Brumptomyia* et *Lutzomyia*, ce dernier comptant plus de 500 espèces incluant tous les vecteurs de pathogènes (Ready et al, 1980). La seconde, est basée sur des arguments phylogénétiques morphologiques (Galati, 2013).

Au cours des dernières années, de nombreuses publications ont été consacrées à la systématique moléculaire des phlébotomes, mais peu s'intéressent aux relations phylogénétiques existant entre les différents genres, préférant l'étude des espèces génétiquement proches et impliquées dans la transmission de leishmanies (Depaquit, 2014).

Sauf dans quelques travaux récents, toutes les espèces intéressant la santé humaine appartiennent au genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde. Les autres appartiennent à plusieurs genres. Parmi eux, le genre *Sergentomyia*, le plus important du point de vue du nombre d'espèces qu'il contient ainsi que la suspicion de l'implication de certaines espèces lui appartenant dans la transmission des leishmanies (*L. infantum* au Sénégal ; *L. martiniquensis* et *L. siamensis* en Thaïlande). Dans le nouveau monde, la diagnose générique des phlébotomes est très complexe, mais c'est essentiellement les espèces appartenant au genre *Lutzomyia* qui présentent un intérêt médical (Depaquit & Léger, 2017).

Actuellement, on estime qu'il y a 988 espèces et sous-espèces de phlébotomes valides de tous les continents sauf l'Antarctique, dont 29 fossiles, avec 512 taxons existants et 17 fossiles trouvés dans les Amériques (Bates *et al*, 2015).

#### **I.1.3.2.2. Morphologie de l'adulte**

Du fait de leur petite taille (2 à 5 mm), les phlébotomes sont peu connus du grand public en dehors des épisodes de pullulation intense durant lesquels ils peuvent constituer une nuisance sérieuse. Cependant, ils sont faciles à identifier du fait de leur morphologie générale : aspect bossu, couleur pâle, pattes très longues, pilosité développée, ailes lancéolées dressées au repos au-dessus du corps en forme V (à 45°). Leur vol heurté, par bonds successifs interrompus de brèves périodes de repos en changeant de direction, leur a valu leur nom grec de « *sknipes* » (« ivrognes »). La douleur ressentie à leur pique est intense (Depaquit et Léger, 2017).

Le corps de phlébotome adulte est constitué de trois principaux compartiments : tête, thorax et abdomen (Fig. 8).

La tête est formée en grande partie par une capsule chitineuse (épicrâne), limitée de chaque côté par un œil composé, elle porte deux antennes et le proboscis. Seules les femelles portent des mandibules dentelées (Fig. 9A) (Abonnenc, 1972).

Le thorax, convexe, est bien développé comme chez tous les Diptères. Il est constitué de trois segments à savoir le prothorax, le mésothorax et le métathorax. Notons que chacun porte une paire de pattes articulées, longues, fines et couvertes de soies. Le thorax porte aussi une paire d'ailes lancéolées, couvertes de longues soies et des balanciers qui assurent l'équilibration de l'insecte pendant le vol (Fig. 9B) (Abonnenc, 1972).

L'abdomen, cylindrique, est composé de 10 segments dont le premier est rattaché au thorax. Les 7 premiers, non modifiés, portent chacun une paire de stigmates respiratoires ; tandis que les trois derniers sont transformés pour constituer le genitalia (Abonnenc, 1972).

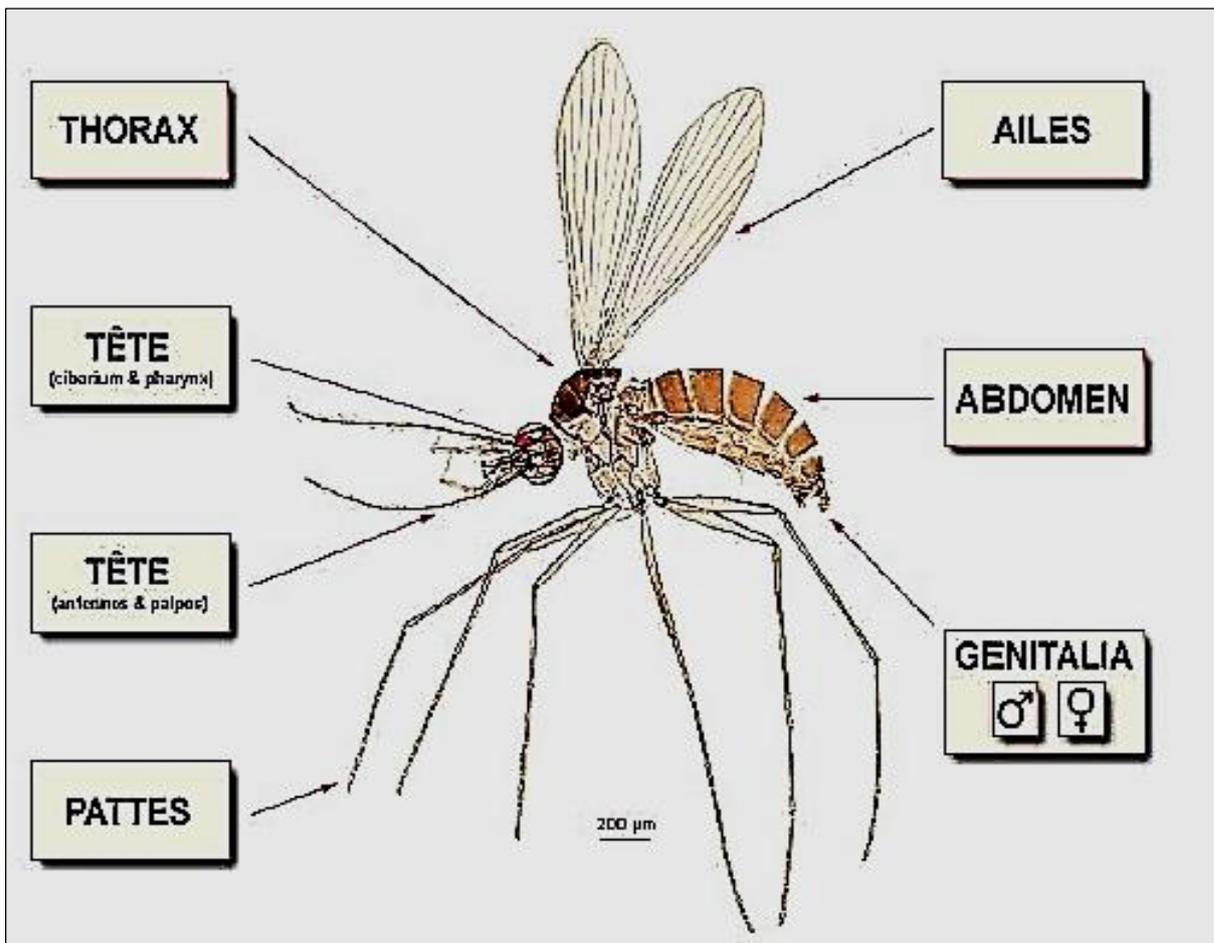


Figure 8. Morphologie générale de phlébotome adulte (Niang *et al*, 2000).

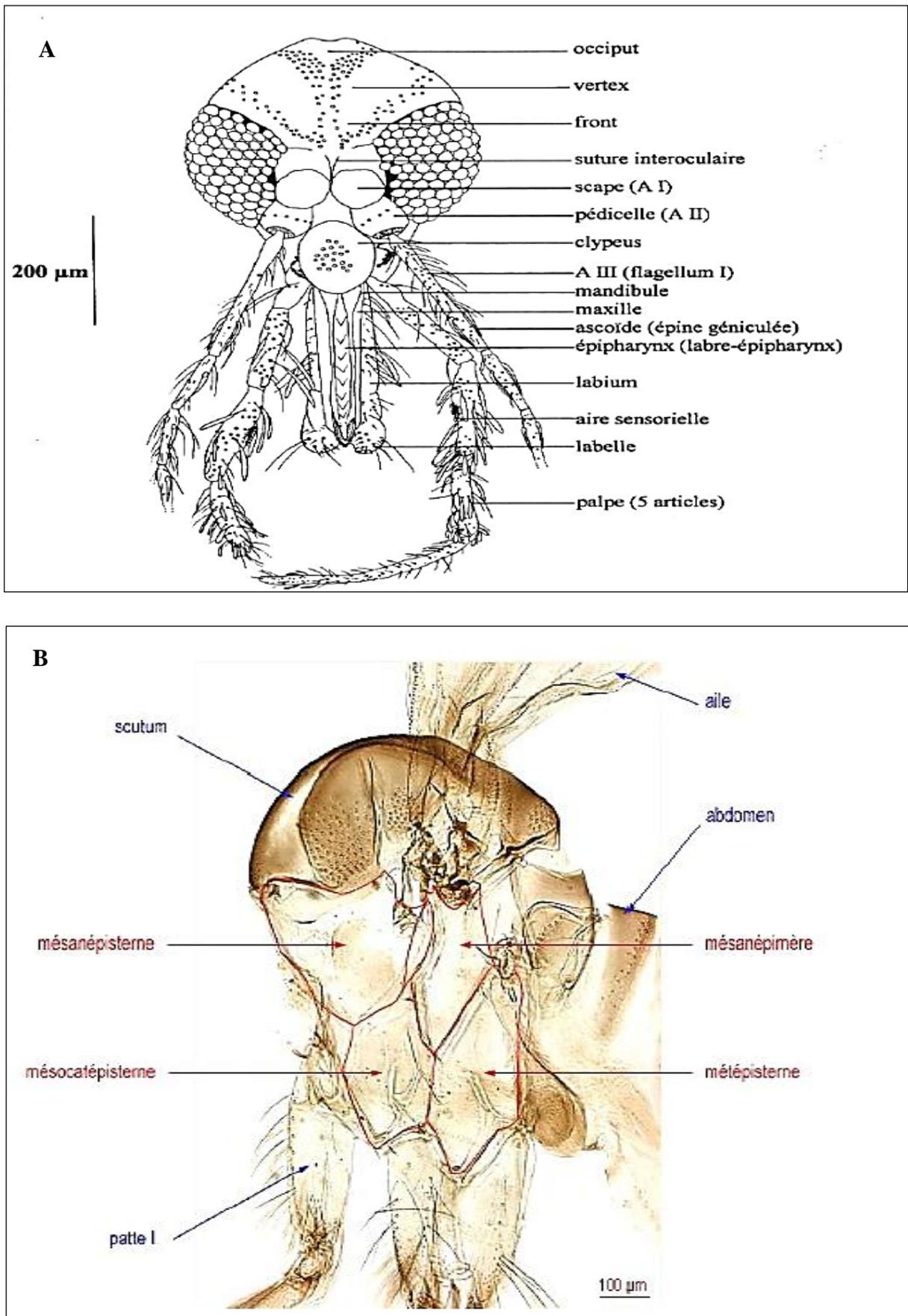


Figure 9. Anatomie générale de la tête d'un phlébotome (A) (Depaquit et Léger, 2017) ; Thorax de phlébotome (B) (Niang *et al*, 2000).

Chez le mâle, l'armature génitale, très développée, se compose de trois paires de prolongements : une paire de coxites sur lesquels s'articulent les styles, une paire de pièces médianes, une paire de prolongements ventraux appelés lobe latéraux (Fig. 10A) (Abonnenc, 1972).

Chez la femelle, les organes génitaux internes se composent de trois organes pairs : deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques. Chaque ovaire se continue par un court oviducte qui s'ouvre dans une chambre génitale qui est soutenue par une furca. Les spermathèques, formées chacune d'une capsule chitineuse de morphologie très variable, s'ouvrent aussi dans la chambre génitale et communiquent avec l'extérieur par des conduits plus au moins longs qui débouchent dans l'atrium génital (Fig. 10B) (Abonnenc, 1972).

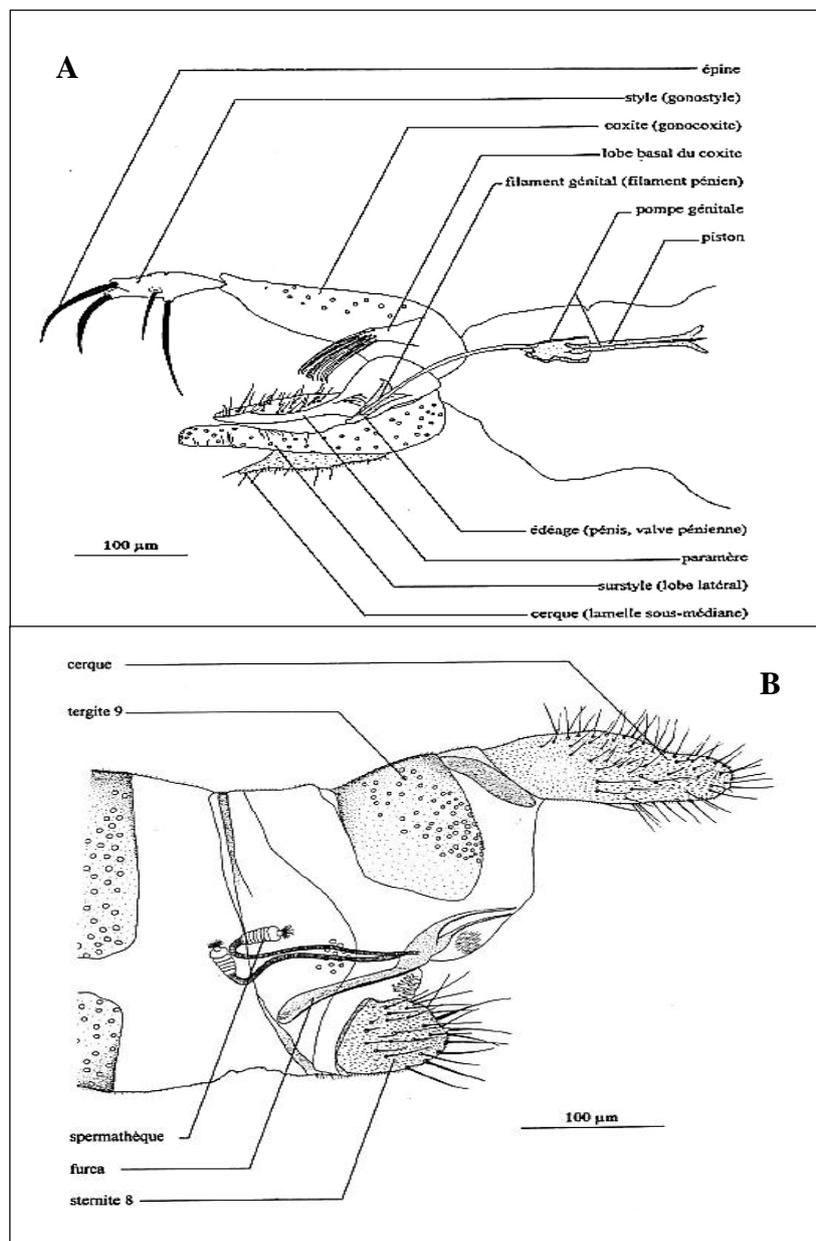


Figure 10. Anatomie de genitalia d'un phlébotome male (A) ; Anatomie de genitalia d'une femelle de phlébotome (B) (Depaquit et Léger, 2017).

L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle sont de morphologie très variable. De ce fait, ils sont les plus utilisés dans l'identification et la classification des espèces.

### **I.1.3.2.3. Bio-Ecologie**

Les phlébotomes sont des insectes à activité nocturne. Ils commencent à s'agiter au crépuscule à condition que la température soit suffisamment élevée (19-20°C) et qu'il n'y ait pas de vent (vitesse limite : 1m/sec.). Une température basse ou trop élevée constitue autant de facteurs limitant l'activité des phlébotomes (Killick-Kendrick, 1999 ; Wasserberg *et al*, 2003). Les phlébotomes sont très sensibles aux courants d'air, ils ne se déplacent que par temps absolument calmes, par des vols courts et silencieux avec des arrêts fréquents. Le vol s'effectue par des bonds rapides sur des parois verticales de bas en haut lorsqu'ils sont dérangés. Leur rayon maximum de déplacement est variable selon les espèces, soit à peu près un kilomètre (Depaquit et Léger, 2017).

Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, certaines sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons ou les abris d'animaux tandis que d'autre sont exophiles. Durant la journée, ils se cachent dans des endroits retirés, calmes, sombres et relativement humides (terriers, étables, clapiers, niches et même dans les maisons) (Léger et Depaquit, 2001). C'est dans ces gîtes de repos que sont déposés les œufs (80 à 100 œufs) qui, au bout de quelques jours, donnent naissance à des larves qui muent 3 fois (4 stades larvaires) avant de se transformer en nymphes fixées au substrat. Sept à dix jours plus tard, l'adulte émerge, complétant ainsi un cycle de vie holométabole (Fig. 11), qui dure généralement entre 35 à 60 jours en l'absence de phénomènes de diapause qui peuvent intervenir lorsque les conditions sont défavorables (période hivernale pour les phlébotomes des régions tempérées) (Dolmatova & Demina, 1971 ; Abonnenc, 1972).

La copulation intervient selon les espèces, juste avant ou aussitôt après le premier repas sanguin qui dure généralement de 30 secondes à 5 minutes. Seules les femelles sont hématophages. Elles puisent le sang dans une mare de sang et de lymphe obtenue par dilacération de la peau à l'aide des mâchoires et des mandibules, et maintenue liquide grâce à l'injection d'une salive anticoagulante dont la composition est très complexe (Depaquit et Léger, 2017).

Elles se nourrissent sur divers vertébrés homéothermes (cas de la majorité des *Phlebotomus* et de beaucoup de phlébotomes américains) ou poïkilotherme (cas de nombreux *Sergentomyia* de l'ancien monde). Si ces dernières sont exclusivement herpétophiles, elles ne jouent donc aucun rôle dans la transmission des leishmanioses. En ce qui concerne les espèces

mammalophiles, leurs spectres d'hôtes sont intéressants à connaître, car la plupart des leishmanioses se présentent comme des zoonoses, maladies commune à l'homme et aux animaux sauvages et domestiques. Leurs attraction pour l'être humain semble dépendre de la production de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) mais également de l'odeur (Pinto et al, 2001). Concernant les mâles, ils se nourrissent exclusivement de sucres végétaux et de jus sucré (Depaquit et Léger, 2017).

La durée de vie des adultes dépend de la température (plus celle-ci est basse, plus la durée de vie est élevée) et de l'humidité (plus l'hygrométrie est élevée, plus la durée de vie est élevée). En moyenne, les femelles vivent deux semaines à deux mois et prennent généralement plusieurs repas sanguins (ce qui est indispensable à la transmission des leishmanies) alors que les mâles ont une durée de vie plus brève (Depaquit et Léger, 2017).



Figure 11. Le cycle de vie holométabole de phlébotome avec les différents stades de son développement (Niang *et al*, 2000 ; Pesson *et al*, 2004). Oeuf (A) ; larve (B) ; nymphe (C) ; émergence de l'imago (D) ; phlébotome femelle gorgée (E) ; phlébotome mâle (F).

La distribution géographique des phlébotomes englobe tous les continents mais leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce. Ils sont présents dans toutes les régions intertropicales, et bien au-delà dans beaucoup de régions (Fig. 12). Ils ont su s'adapter à des climats très différents : méditerranéens, désertiques, tropicaux ou équatoriaux. Etant peu mobiles, ils sont généralement absents des îles purement volcaniques ou coralliennes isolées, à quelques exceptions près telles les Comores ou l'atoll d'Aldabra aux Seychelles (Depaquit et Léger, 2017).

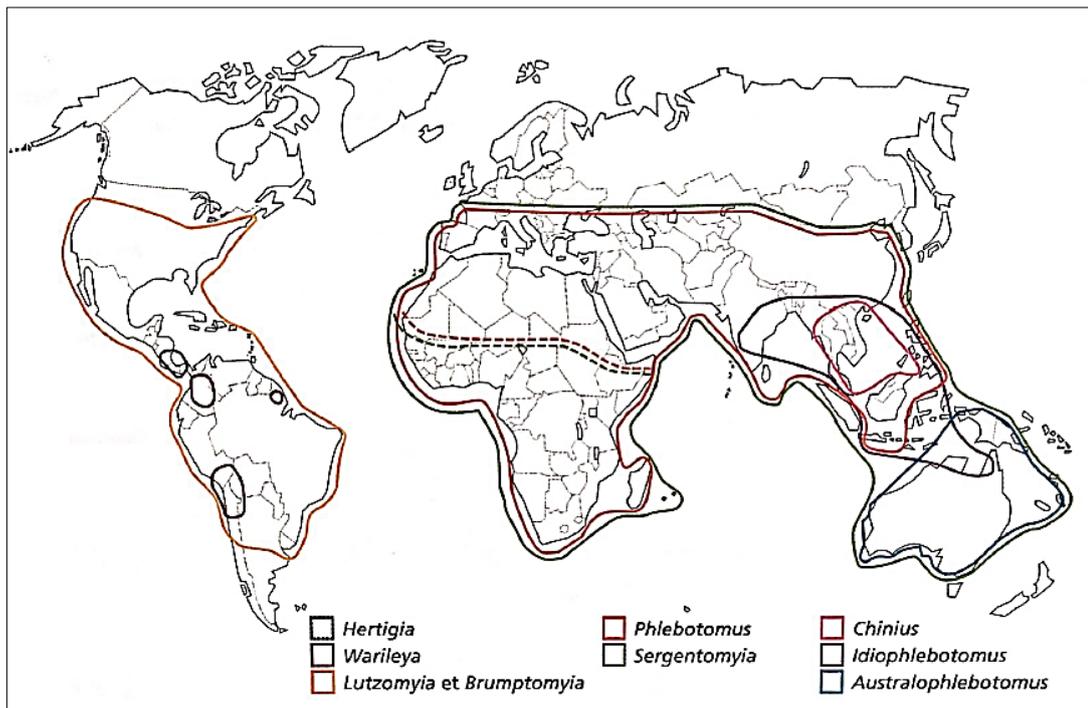


Figure 12. Distribution géographique des principaux genres de phlébotomes (Léger et Depaquit, 2017).

#### I.1.3.2.4. Importance médicale et vétérinaire

- **Le pouvoir pathogène propre.** La pique des phlébotomes est assez douloureuse puisque ils pratiquent une phlébotomie qui s'accompagne souvent d'une coupure de nerfs sensitifs. Lors des périodes de pullulations, elle peut être une véritable nuisance pour les populations locales. L'intensité des réactions observées (douleur, apparition de papules ou de tache hémorragique) varie selon l'espèce en cause et la sensibilité individuelle des victimes. Celles-ci peuvent se sensibiliser progressivement et présenter des réactions anaphylactiques plus ou moins violentes avec prurit, exanthème étendu, œdèmes, trouble généraux (fièvre, nausées, malaise, troubles du rythme cardiaque). C'est ce que l'on appelle en Palestine le « Harara ». Chez l'Homme, ce sont les parties découvertes du corps qui sont exposées aux piqûres (visage, cou, mains, pieds). Chez les autres mammifères, ce sont les zones les moins velues (museau, oreilles) (Neveu-Lemaire, 1938 ; Adler & Theodor, 1957 ; Abonnenc, 1972 ; Depaquit et Léger, 2017).
- **La transmission des maladies.** L'intérêt que suscitent les phlébotomes tient à leur implication – d'abord suspectée (Sergent & Sergent, 1905) puis prouvée à de nombreuses reprises – dans la transmission de maladies humaines et vétérinaires, au premier rang desquelles se trouvent les leishmanioses suivies des arboviroses et d'infections bactériennes (Depaquit et Léger, 2017). Le mâle, non hématoophage, est considéré depuis longtemps comme non vecteur de maladies. Cependant, il peut transmettre des agents parasitaires à

certaines plantes. En effet, un mâle de *P. langeroni* et une femelle de *Sergentomyia minuta* parroti ont été trouvés porteurs de cinq parasites des plantes à savoir *Brevipalpus phoenicis*, parasite des plantes du genre Citrus, Thea, Coffea auxquelles il cause plusieurs dégâts (Abonnenc, 1972).

**La compétence vectorielle à transmettre les leishmanies.** Il existe une spécificité relativement étroite – encore que non absolue – au niveau du couple leishmanie-phlébotome (Killick-Kendrick, 1990). Les phlébotomes vecteurs sont classés en deux groupes bien distincts : les vecteurs spécifiques, telles *P. papatasi* vecteur de *L. major* ou *P. sergenti* vecteur de *L. tropica*, chez lesquelles le développement d'une seule espèce leishmanienne est possible. Cette caractéristique est liée à la composition en lipophosphoglycanes de la membrane parasitaire (Depaquit & Léger, 2017). A titre d'exemple : Les ramifications de résidus galactose du LPG de *L. major* permettraient son attachement dans son vecteur naturel *P. papatasi* alors que *L. donovani* ne peut s'y fixer en raison de son LPG non ramifié (Pimenta *et al*, 1994). À l'inverse, *L. major* et *L. donovani* ne peuvent coloniser l'intestin moyen de *P. sergenti*, vecteur naturel de *L. tropica*. Le LPG de cette dernière contient beaucoup de glucose et d'arabinose (Kamhawi *et al*, 2000). A l'opposé, il existe des espèces dites permissives, telles *P. arabicus*, qui autorise le développement d'espèces de leishmanies qui ne leur sont pas attribuées, telles *L. tropica*. Dans ce cas, il s'agit d'un phénomène de capture parasitaire lié à une opportunité écologique et épidémiologique très ponctuelle (Depaquit & Léger, 2017).

**La transmission des arboviroses.** Les phlébotomes, connus pour transmettre les leishmanioses, ont un rôle important dans la transmission des arbovirus qui apparait croissant depuis quelques années. Ce rôle était probablement sous-évalué à cause du caractère peu pathogène de certains d'entre eux ainsi que la difficulté de les diagnostiquer. Dans la plupart des cas, il a été démontré que les phlébotomes s'infectent par repas sanguin à partir des vertébrés, ou par voie transovarienne, ce qui explique pourquoi ces virus peuvent être isolés aussi bien des insectes mâles et femelles. Les arbovirus transmis à l'homme par les phlébotomes appartiennent essentiellement à trois genres : *Phlebovirus*, *Orbivirus* et *Vesiculovirus* (Depaquit, 2010).

Le genre *Phlebovirus* renferme les virus, subdivisés en de nombreux sérotypes, responsable de syndrome méningés estivaux stériles appelés fièvre à phlébotomes, fièvre à papatasi ou fièvre de trois jours. Dans l'Ancien Monde, les principaux vecteurs sont les *Phlebotomus* des sous genres *Laroussius*, *Phlebotomus* et *Euphlebotmus*.

**La transmission de la bartonellose.** La bartonellose ou la maladie de Carrion est une affection due à une protéobactérie alpha : *Bartonella bacilliformis*. Elle s'exprime en deux formes cliniques différentes : la forme aiguë, appelée fièvre d'Oroya, une anémie hémolytique, fébrile, grave voire mortelle en absence de traitement ; et la forme chronique appelée verruga péruvienne, une éruption cutanée verruqueuse bénigne (Abonnenc, 1972).

La responsabilité en tant que vecteurs des deux espèces de phlébotomes, *Pi. verrucarum* au Pérou et *Pi. columbiana* en Colombie a été prouvée par l'isolement du germe et sa transmission expérimentale au singe Rhésus. Le rôle d'autres espèces appartenant au genre *Lutzomyia* a été suspecté au Pérou. Les modalités de développement chez les phlébotomes ne sont pas parfaitement connues (Depaquit & Léger, 2017).

### I.1.3.3. Hôtes réservoirs

Selon les conditions éco-épidémiologique, les leishmanioses peuvent se présenter principalement comme des maladies zoonotiques, suivant un cycle de transmission selvatique, où les mammifères sauvages jouent un rôle majeur dans la pérennité de l'infection (rongeurs, canidés, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles). L'homme n'est pas concerné sauf s'il fait intrusion dans ces foyers. Certaines sont anthroponotiques, strictement humaine tandis que d'autres sont anthropozoonotiques faisant intervenir, selon les complexes épidémiologiques, des réservoirs très variés (Lainson R *et al*, 2005).

La première catégorie est le cas de leishmaniose cutanée zoonotique due à *L.major* où l'homme s'infecte accidentellement à partir de rongeurs sauvages : Gerbilles, Mériones, *Psammomys*, et par l'intermédiaire de phlébotomes vecteur très anthropophile, *P. papatasi* (Fig. 14). Le parasite passe donc du rongeur à l'homme, ce qui explique l'habituelle localisation des foyers à la périphérie des villes, dans les villages et les endroits désertiques. Ce cycle se domestique dans ces parties du monde, mais il reste strictement selvatique dans de nombreux foyers américains (Depaquit & Léger, 2017).

Quant à la leishmaniose anthroponotique, c'est le cas de la leishmaniose cutanée due à *L.tropica*, avec *P. sergenti* comme vecteur, phlébotome fortement anthropophile et endophiles, très abondant dans les villes où l'affection est endémiques, notamment lors de l'arrivée de nouvelles populations humaines (Fig. 13). Dans ces foyers, la transmission à l'homme ne nécessite pas l'intervention d'un réservoir animal, à l'exception de certains foyers zoonotiques d'Afrique de l'Est ou du Proche-Orient dans lesquels les damans jouent un rôle de réservoir. Sinon, l'homme reste donc l'unique réservoir de parasite (Depaquit & Léger, 2017).

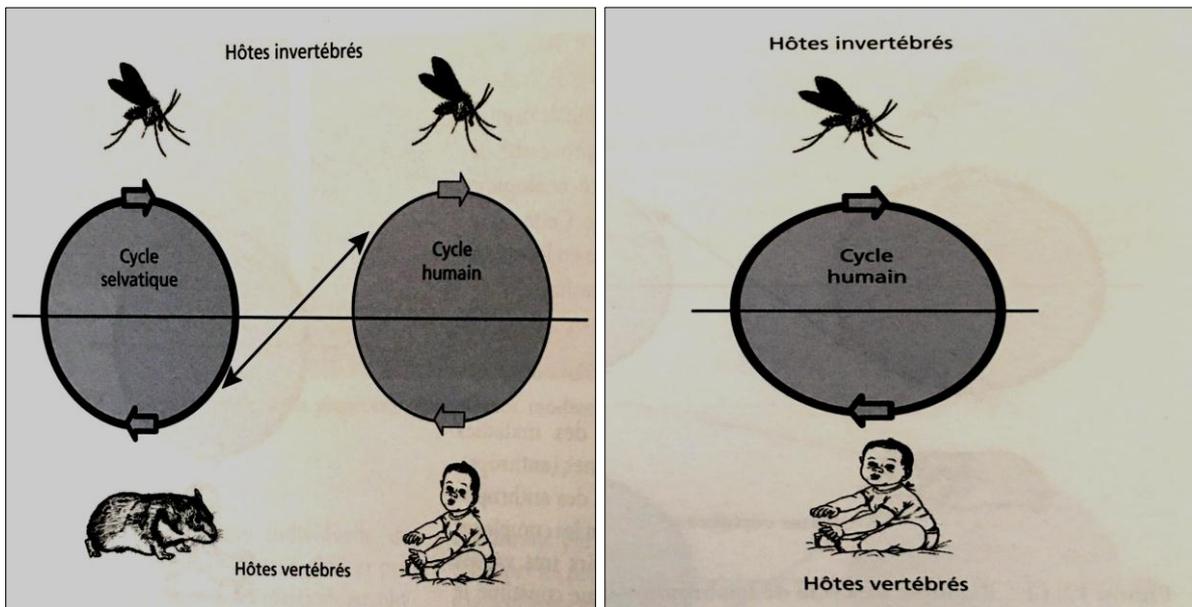


Figure 13. cycles de transmission de leishmaniose. A gauche : exemple de cycle de leishmaniose selvatique et humaine (ex. foyers à *L. major*) ; A droite : cycle de leishmaniose anthroponotique stricte (ex. foyers classiques à *L. tropica*). (Depaquit & Léger, 2017).

La leishmaniose à *L. infantum* reste l'exemple type de leishmaniose anthrozoonotique (Fig. 14). Il s'agit essentiellement d'une maladie canine (généralement chiens domestiques) transmissible à l'homme grâce à l'intervention de vecteurs polyhématoiphages tels ceux appartenant au sous-genre *Laroussius* de l'Ancien Monde et *Lu. longipalpis* du Nouveau Monde. D'autres réservoirs sauvages qui fonctionnent à bas bruit du cycle selvatique (Renard, Loup), peuvent être impliqués dans le maintien du parasite (Depaquit & Léger, 2017).

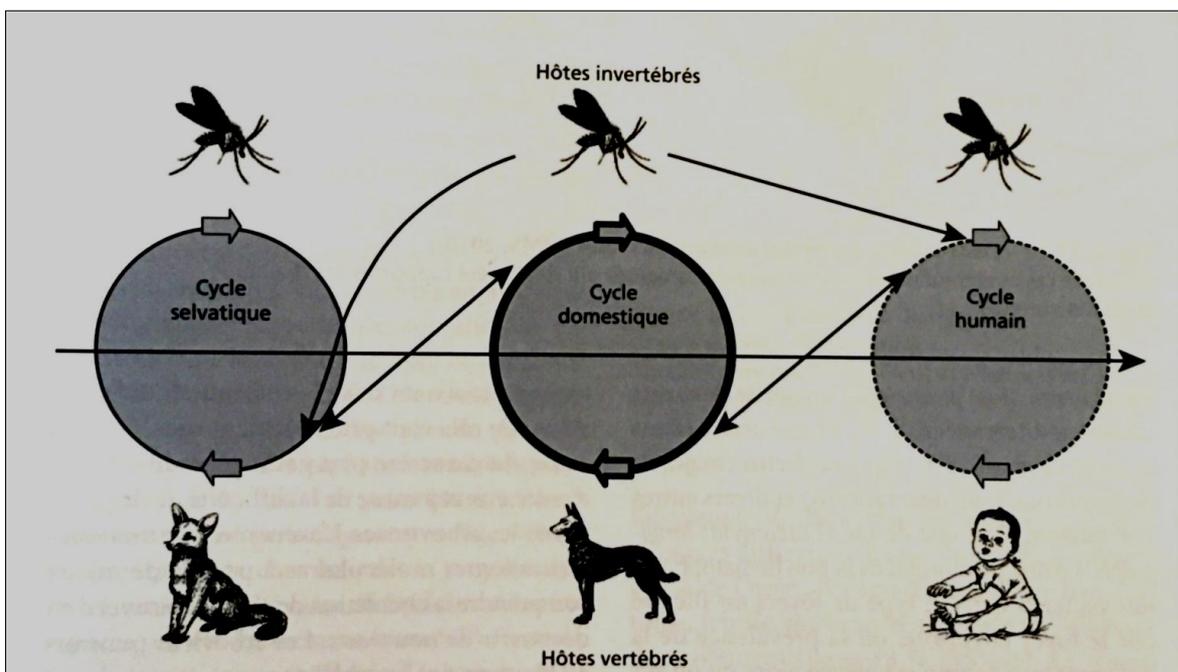


Figure 14. Cycle de transmission de leishmaniose domestique, humaine et selvatique (ex. foyers à *L. infantum*). (Depaquit & Léger, 2017).

### I.1.4. Diagnostic

Le large spectre clinique des leishmanioses rend difficile leur diagnostic. Cependant, un diagnostic différentiel de la leishmaniose est très important et peut varier selon la forme clinique et la zone d'acquisition de l'infection. D'autres maladies avec un spectre clinique similaire sont souvent présentes dans les zones d'endémicité et peuvent être confondues avec les leishmanioses (Reithinger & Dujardin, 2007).

Le diagnostic différentiel de la LV comprend des malignités hématologiques telles que la leucémie et la lymphohistiocytose hémophagocytaire, et des infections. Les infections peuvent varier d'infections virales secondaires à Cytomégalovirus (CMV), Virus Epstein-Barr (EBV) à d'autres qui sont plus pertinentes selon l'endémicité ou les antécédents de voyage, comme le typhus, la brucellose et l'histoplasmosse disséminée, ou la fonction immunitaire de l'enfant comme le VIH, la tuberculose disséminée et la toxoplasmose. Les lésions cutanées causées par la leishmaniose peuvent être confondues avec les piqures d'insectes infectées, les infections dermatophytiques, les infections mycobactériennes cutanées, l'impétigo, la lèpre, la sporotrichose (surtout s'il existe une lymphadénopathie locale) et chez les adultes avec les malignités cutanées (Tab. 1) (Markle & Markhoul, 2004 ; Pavli & Maltezou, 2010 ; Pace, 2014).

Tableau 1. Diagnostic différentiel de la leishmaniose.

<b>Leishmaniose viscérale</b>	<b>Leishmaniose cutanée</b>
La fièvre typhoïde	Tuberculose
Brucellose	Infection mycobactérienne non tuberculeuse
Endocardite bactérienne subaiguë	Ulcère de Buruli
Tuberculose miliaire	Lèpre
Mononucléose infectieuse	Syphilis
Paludisme	Pian
Syndrome de splénomégalie tropicale	Actinomyose
Histoplasmosse	Mycoses (histoplasmosse, coccidioïdomycose, blastomyose, rhinosporidiose)
Schistosomiase	Infection bactérienne
Trypanosomiase	Piqûres d'insectes infectées
Leucémie	Sarcoïdose
Lymphome	Cancer de la peau
Malnutrition	La granulomatose de Wegener
	Polypes nasaux
	Déviations septales

Comme pour toute maladie infectieuse, la propagation et la charge de l'agent pathogène pendant la leishmaniose constituent un paramètre majeur. De plus, il a été prouvé que la

caractérisation précise de l'espèce voire même de la souche de *Leishmania* en cause peut influencer directement la réponse thérapeutique chez l'hôte. Jusqu'à récemment, cette tâche était une complication importante pour les médecins et les chercheurs praticiens. Les méthodes optimales devraient être rapides, simples et de prix abordable. De plus, des techniques rapides, faciles à utiliser pour les tests pilotes pendant l'application sur le terrain en l'absence du laboratoire équipé sont également nécessaires. Les principales approches pour la détection des parasites comprennent les tests de microscopie, les cultures cellulaires, les techniques moléculaires basées sur l'ADN et l'immuno-détection (Rodriguez *et al*, 1994 ; Kobets *et al*, 2010).

#### **I.1.4.1. Diagnostic parasitologique**

Le diagnostic parasitologique reste « *The Gold-Standard* » du diagnostic de la leishmaniose en raison de sa grande spécificité. Cela est typiquement réalisé par la mise en évidence du parasite par examen microscopique et/ou culture cellulaire à partir de différents types d'échantillons (frottis de biopsie de lésion pour LC ; ponction de ganglions lymphatiques, moelle osseuse et rate pour LV) (Herwaldt, 1990).

##### **I.1.4.1.1. Examen microscopique**

La microscopie a été parmi les premières méthodes de détection et de quantification d'un large éventail de pathogènes, y compris les parasites *Leishmania*. Elle est efficace à la fois pour des études indépendantes et pour la validation des nouvelles méthodes (Kobets *et al*, 2012). Cette méthode reste probablement l'approche diagnostique standard au niveau de santé tertiaire, secondaire ou même primaire dans les zones d'endémicité, car des techniques plus sophistiquées sont actuellement coûteuses et rarement disponibles (Reithinger & Dujardin, 2007).

Ce type de méthodes permet de visualiser directement les formes amastigotes du parasite qui sont soit extracellulaires (formes libres), soit intracellulaires (contenues dans les monocytes, les macrophages et les neutrophiles). L'examen histologique des biopsies peut aussi fournir des informations sur la charge parasitaire, l'infiltration de différents types de cellules, la formation de granulomes et d'autres changements dans les tissus envahis par le parasite *Leishmania*, reflétant sa pathogénèse (Kobets *et al*, 2012).

La coloration par May Grünwald Giemsa (MGG) ou à L'hématoxyline et l'éosine (H&E) ainsi que divers marqueurs fluorescents sont largement utilisés pour les frottis tissulaires et les biopsies (Kobets *et al*, 2012). Des Kits commercialisés peuvent être aussi utiles pour une coloration rapide et efficace (ex : le Kit RAL555) (Famakan K, 2005). On y reconnaîtra le parasite par sa forme ovoïde avec un noyau de couleur pourpre et un kinétoplaste juxta nucléaire plus foncé (Murray *et al*, 2005).

Malgré la grande spécificité conférée à l'examen microscopique, sa sensibilité tend à être faible et très variable. Plusieurs facteurs peuvent influencer cette dernière: la quantification des parasites qui sont inégalement distribués dans les tissus ; la procédure d'échantillonnage et de réalisation des frottis colorés surtout à partir de ponction de la moelle osseuse, du ganglion lymphatique ou de la rate des patients, qui nécessite des procédures invasives et surtout qui exigent des compétences techniques du personnel (Spanakos *et al*, 2002). De plus, L'analyse microscopique d'un grand nombre d'échantillons prend généralement beaucoup de temps.

#### **I.1.4.1.2. Les cultures cellulaires**

Les cultures cellulaires comprennent l'isolement et la culture de *Leishmania* à partir de cellules et de tissus. Les parasites viables se multiplient et leur nombre est évalué après plusieurs jours d'incubation dans la solution nutritive. Ce groupe de méthodes combinées aux tests de microscopie, rendent plus sensible le diagnostic parasitologique. De plus, La culture en combinaison avec l'électrophorèse enzymatique multi-locus (MLEE) permet l'identification et la caractérisation des espèces, voire même des souches de parasite, ce qui est indispensable pour des fins thérapeutiques, éventuellement pour tester la sensibilité des souches isolées aux médicaments disponibles (Reithinger & Dujardin, 2007).

Classiquement, Les échantillons de différents types sontensemencés en culture sur milieu Novy Mac-Neal Nicolle (NNN). C'est un milieu diphasique avec une phase solide à base d'un culot de gélose salée avec 10% de sans de lapin défibriné et une phase liquide constitué de l'exsudat produit à partir de la gélose au sang ; c'est dans cette phase liquide que se développent les formes promastigotes. La nature et le volume de cette phase liquide peuvent être supplémentés (milieu RPMI, sérum de veau fœtal). D'autres milieux plus riches (milieu Schneider, milieu d'Evans) sont utilisés pour l'isolement de souches de *Leishmania*, réputées comme étant plus sensibles et difficile à cultiver (*L. braziliensis*) (Chouih *et al*, 2008).

L'incubation se fait à 24-27 °C. Des températures supérieures peuvent être inhibitrices, c'est la raison pour laquelle il est indispensable de disposer d'étuves réfrigérées, notamment dans les pays chauds. La vérification est faite une fois par semaine, et la culture n'est déclarée négative qu'à partir de la quatrième semaine après repiquage successifs sur un milieu frais. En cas de positivité, les formes promastigotes flagellées mobiles sont observées sous microscopie (Le Fichoux *et al*, 1999).

Une méthode de culture micro-capillaire (MCM) a été développée pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée. Contrairement à la méthode de culture traditionnelle, MCM est plus rapide, utilise un plus petit échantillon, et a une sensibilité plus élevée pour la détection des promastigotes. Dans les études comparatives, la période moyenne d'incubation nécessaire pour

détecter les promastigotes était beaucoup plus courte avec les micro-cultures que pour la culture conventionnelle et nécessitait 2 à 7 jours contre 2 à 30 jours. La haute sensibilité du MCM peut être expliquée par l'utilisation de tubes capillaires, qui concentrent le volume de l'échantillon et fournissent des conditions micro-aérophiles avec un taux de CO<sub>2</sub> élevé qui est favorable à la transformation des amastigotes en promastigotes (Allahverdiyev *et al*, 2004).

La méthode de mini-culture, dans laquelle les parasites sont cultivés à l'intérieur des tubes Eppendorf, a également montré de meilleurs résultats que les méthodes de culture conventionnelles (Boggild *et al*, 2008).

La détection de parasites viables est le principal avantage de la culture. Cependant, elle reste une technique très laborieuse, qui prend beaucoup de temps et exige d'être effectuées immédiatement après l'isolement des tissus. La culture nécessite aussi des conditions stériles ce qui peut la confronté aux problèmes de contamination diminuant ainsi sa sensibilité (Kobets *et al*, 2012).

#### **I.1.4.2. Diagnostic moléculaire**

Bien que différentes méthodes moléculaires aient été successivement évaluées pour le diagnostic des leishmanioses (ex : électrophorèse en champ pulsé et électrophorèse enzymatique multilocus), ce sont les techniques basées sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui constituent actuellement les principales approches de diagnostic moléculaire des chercheurs et des professionnels de la santé (Singh *et al*, 2005).

La PCR est considérée comme la technique la plus sensible et la plus spécifique parmi toutes les méthodes appliquées jusqu'à présent pour la détection et l'identification de l'agent causal. Son principe repose sur la détection puis la multiplication de différentes régions d'ADN ou d'ARN du parasite dans une variété d'échantillons expérimentaux ou cliniques en utilisant des amorces et des sondes qui se lient spécifiquement à la région d'intérêt. Son efficacité dépend de la cible choisie pour l'amplification (région cible : conservée ou variable), du nombre de copies cibles, de la technique d'extraction utilisée, de l'échantillon biologique testé et du protocole de PCR adapté ou développé (Cortes *et al*, 2004 ; Baneth *et al*, 2008).

Les techniques de ce type servent pour deux objectifs principaux : la détection et la mesure de la charge parasitaire dans les cellules et les tissus (détectent des parasitemies inférieures à un parasite par microlitre) et l'identification des espèces et des sous-espèces afin d'établir un diagnostic précis, ce qui est important dans le choix du bon traitement (Kobets *et al*, 2012).

#### **I.1.4.2.1. Détection de *Leishmania***

Il existe plusieurs variantes de PCR distinctes qu'on peut classer selon leurs approches comme : «*Mid-Tech*», «*High-Tech*» et «*Low-Tech*» (Reithinger & Dujardin, 2007).

##### **- La PCR conventionnelle :**

Les approches « *Mid-Tech* » sont probablement les plus utilisées et comprennent la PCR classique qui utilise un couple d'amorces ciblant une région spécifique de l'ADN leishmanien. Les amplicons sont résolus par électrophorèse puis visualisés après coloration au bromure d'éthidium sous UV. La technique est effectuée avec plusieurs équipements de laboratoire (un thermocycleur, un réservoir d'électrophorèse, un transilluminateur UV et une caméra) disponibles dans n'importe quel laboratoire de biologie moléculaire standard mais prend généralement beaucoup de temps (Singh *et al*, 2005 ; Reithinger & Dujardin, 2007).

La PCR nichée, qui est une modification de la PCR classique, est basée sur l'application de deux paires d'amorces et comprend deux tours. Un ensemble d'amorces internes supplémentaires, spécifique des séquences particulières des premiers amplicons, peut augmenter significativement la sensibilité de la technique. Pour différencier les espèces de *Leishmania*, la PCR du premier cycle utilisant des amorces universelles (pour les séquences conservées dans toutes les souches testées) devrait être suivie par la PCR du second cycle avec des amorces spécifiques qui amplifient les séquences uniques pour chaque souche testée (Noyes *et al*, 1998 ; Katakura *et al*, 1998).

##### **- La PCR en temps réel (RT-PCR) :**

Les approches « *high-tech* » comprennent la PCR en temps réel (ou PCR quantitative [qPCR]). Cette technique moléculaire qui a révolutionné le diagnostic des pathogènes est considérée comme la future méthode de référence pour le diagnostic moléculaire. Ces dernières années, des tests qPCR basés sur la chimie de SYBR Green ou sur l'hybridation avec des sondes fluorogènes (ex : TaqMan ; transfert d'énergie par résonance de fluorescence [FRET]) ont été développés et évalués pour la détection, la quantification et même la différenciation des espèces de *Leishmania spp.* dans divers échantillons cliniques présentant une sensibilité et une reproductibilité élevées (Nicolas *et al*, 2002 ; Schulz *et al*, 2003).

La qPCR est considérée comme un outil utile pour le diagnostic de *Leishmania*, la surveillance pendant le traitement, le développement de nouveaux médicaments, la comparaison de l'efficacité des médicaments ou des schémas prophylactiques, et pour des études épidémiologiques. En ce qui concerne le diagnostic de la leishmaniose, l'étude cinétique de la parasitémie chez les hôtes immunodéprimés, le diagnostic des rechutes et la quantification de la faible charge parasitaire chez les patients asymptomatiques sont aussi d'un grand intérêt.

Les applications mentionnées ci-dessus font de qPCR une alternative intéressante à la PCR conventionnelle dans le diagnostic de routine (Paiva-Cavalcanti *et al*, 2010).

Les produits de RT-PCR sont analysés pendant leur amplification (d'où PCR en temps réel). Dans ce cas, la réaction est effectuée dans un seul Mix contenant tous les réactifs en une seule étape (tout-en-un) et la détection de la fluorescence se fait dans un tube fermé, ce qui diminue le risque de contamination en laboratoire par les amplicons. La technique est rapide et très performante, mais les équipements sont relativement chers et les coûts de fonctionnement restent élevés (Reithinger & Dujardin, 2007).

- **Les approches moléculaires simplifiées (alternatives de la PCR) :**

Étant donné que la PCR est restreinte à des laboratoires bien équipés et qu'il y a un besoin de simplification, de standardisation et d'optimisation du test PCR (Deborggraeve *et al*, 2008). Les outils décrits ci-dessous peuvent constituer une bonne alternative pour le diagnostic rapide et simple ainsi que pour les études épidémiologiques de la leishmaniose dans les zones endémiques (Van der Meide *et al*, 2008). Ces approches qualifiées de « *low-tech* » se réfèrent à des méthodes PCR simplifiées pour une utilisation en laboratoire avec un équipement minimal. La simplification peut potentiellement être réalisée aux deux étapes principales du protocole PCR : amplification de la cible et détection des produits PCR (Reithinger & Dujardin, 2007).

- **L'amplification isotherme à médiation en boucle (LAMP)**, nouvelle méthode d'amplification de l'ADN sous isotherme, représente une voie prometteuse. Pour les deux étapes, elle ne nécessite qu'un simple bain-marie pour l'amplification. La détection des amplicons peut se faire visuellement en utilisant le colorant SYBR-green I qui devient vert en présence de produits amplifiés et reste orange en son absence. Le test a été développé principalement pour détecter *Trypanosoma spp*, *Plasmodium spp*, *Mycobacterium spp* et *Filaria spp*. Les résultats obtenus à partir de plusieurs études pour la détection de *Leishmania* sont encourageants. Cette méthode, beaucoup plus rapide que la PCR conventionnelle ou nichée, peut être appliquée dans des conditions de terrain et montre une haute spécificité et sensibilité (Takagi *et al*, 2009 ; Khan *et al*, 2012 ; Verma *et al*, 2013).

- **La simplification de la détection de *Leishmania* par PCR-ELISA.** C'est une méthode d'hybridation inverse basée sur la capture des amplicons de PCR par des sondes spécifiques immobilisées dans des puits de microtitrage ELISA et une visualisation colorimétrique. Dans une étude, la PCR-ELISA dans des échantillons de sang de patients de LV séronégatifs a été évaluée. elle présente une sensibilité et une spécificité plus élevées que la PCR conventionnelle (De Doncker *et al*, 2005). D'autres chercheurs ont également évalué l'utilisation de la technique

dans des échantillons sanguins de patients atteints de LV et co-infectés par le VIH où la PCR-ELISA a été jugée hautement sensibles (Martin-Sanchez *et al*, 2002).

- **L'oligochromatographie-PCR (OC-PCR)**, une méthode plus récente, représente une alternative plus prometteuse. Cette technique nécessite un cycleur PCR et un bain-marie, et les produits de PCR sont visualisés en 5 min sur une bandelette réactive par hybridation avec une sonde conjuguée à l'or. La PCR-OC s'est avérée très sensible pour le diagnostic de *Leishmania* sur des échantillons de sang de patients de LV (sensibilité 96,4% et spécificité 88,8%) (Basiye *et al*, 2010).

- **L'amplification quantitative des séquences d'acides nucléiques (QT-NASBA)** s'est avérée être un test très sensible et spécifique en microbiologie. Plusieurs tests QT-NASBA ont été développés pour la détection de *Leishmania* dont ils sont combinés à l'électrochimiluminescence (ECL) et à l'oligochromatographie (OC) pour la détection des produits de NASBA (Mugasa *et al*, 2010 ; Van der Meide *et al*, 2005). Ce test est basé sur l'amplification des séquences d'ARN ribosomique 18S simple brin (Schallig *et al*, 2002). Cette cible est très efficace pour le diagnostic de la leishmaniose car chaque parasite contient un grand nombre de copies du gène 18SrRNA et le cytoplasme est supposé contenir environ 104 copies d'ARNr (Van Eys *et al*, 1992). De plus, la cible est présente chez toutes les espèces de *Leishmania* et ne varie pas entre les différentes espèces, ce qui permet une sensibilité et une quantification élevées de toutes les espèces d'une manière similaire. Cependant, cette cible présente une forte similitude avec la séquence du gène de l'ARNr 18S des organismes *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Wallaceina* et *Leptomonas*, ce qui peut entraîner des résultats faussement positifs, en particulier chez les patients immunodéprimés (Deborggraeve *et al*, 2008). Le fait que la NASBA détecte l'ARN en fait un outil moléculaire d'une grande importance pour la mesure des parasites viables. En conséquence, son application rend possible l'évaluation de l'efficacité des traitements médicamenteux, la prédiction des résultats du traitement et le suivi de l'émergence de la pharmacorésistance (Schallig *et al*, 2002).

#### **I.1.4.2.2. Identification de l'espèce de *Leishmania***

Les outils disponibles pour l'identification des espèces et l'analyse phylogénétique comprennent principalement : le séquençage d'ADN, l'analyse RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), et les techniques nouvelles telles que MLST (*Multilocus Sequence Typing*) et le typage MLMT (*Multilocus Microsatellite Typing*). La technique MLST est considérée comme l'approche phylogénétique la plus puissante et sera une meilleure alternative à l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE), qui représente l'étalon-or pour l'identification des parasites *Leishmania* aux niveaux spécifique et sub-spécifiques ainsi pour

les études de la diversité génétique. Cependant, cette dernière présente plusieurs inconvénients, y compris la nécessité d'une culture de masse des parasites *Leishmania* et une grande quantité de protéines. Elle prend beaucoup de temps, est laborieuse, coûteuse et techniquement exigeante (Constantina *et al*, 2014).

#### **I.1.4.3. Diagnostic sérologique**

Plusieurs approches sérologiques sont couramment utilisées dans le diagnostic des leishmanioses. Elles sont basées sur la mise en évidence indirecte des parasite *Leishmania* par la détection des anticorps circulants suite à une réponse immunitaire humorale spécifique. Une large gamme de tests différents au point de vue de la sensibilité et la spécificité est disponible pour le diagnostic de la LV (Srivastava *et al*, 2011). Cependant, ces tests sont rarement utilisés pour le diagnostic de la LC car le nombre d'anticorps circulant contre les parasites causant la forme cutanée tend à être faible, ce qui peut influencer la sensibilité et la spécificité, en particulier dans les zones où les réactions croisées sont répandues (Reithinger & Dujardin, 2007).

##### **I.1.4.3.1. ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)**

Cette technique immunologique, largement utilisée dans le sérodiagnostic de la LV, est basée sur la détection chez l'hôte, soit d'antigènes de *Leishmania* par l'utilisation d'anticorps anti-*Leishmania* ou bien la détection des anticorps anti-*Leishmania* par l'antigène total de promastigotes lysés conjugués à une enzyme (phosphate ou peroxydase) (Ferrua *et al*, 2001 ; Lima *et al*, 2003). Cependant, la réaction immunologique croisée de *Leishmania* avec *Trypanosoma cruzi* pose un sérieux problème mais l'utilisation des anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre *Leishmania* pourraient résoudre ce problème (McMahon Pratt & Davide, 1981). En outre, la production et l'identification d'antigènes recombinants, plus précisément, l'antigène rK39 (protéine recombinante ressemble à une partie d'une protéine de 230 kDa de la famille des kinésines, codée par l'ADN kinétoplastique de *Leishmania*) montre des résultats prometteurs. La réactivité avec les autres trypanosomatides est négative et la présence de l'anticorps, anti-rK39, indique une infection active (Lima *et al*, 2010).

##### **I.1.4.3.2. Western blot (WB) ou l'immunoempreinte**

C'est une technique de choix en matière de sensibilité et de spécificité. Elle détecte des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques des différentes espèces de *Leishmania*. Elle s'est avérée plus adaptée au sérodiagnostic de la leishmaniose cutanée anthroponotique que le test ELISA. Elle est proposée non seulement comme méthode de confirmation, mais également pour le suivi sérologique des patients sous traitement (Kumar *et al*, 2002). La possibilité qu'elle

offre de détecter les infections asymptomatiques lui confère un intérêt épidémiologique certain (Marty *et al*, 2009).

#### **I.1.4.3.3. Les tests rapides**

Des tests immunologiques sont disponibles dans le commerce et deviennent de plus en plus des tests de référence pour un diagnostic rapide et non invasif. Ils ont une sensibilité et une spécificité élevées, ils sont faciles à utiliser et requièrent une expertise technologique minimale. Ils détectent la présence d'anticorps anti-*Leishmania* dans le sang, le sérum ou l'urine (Reithinger & Dujardin, 2007).

**Le test d'agglutination directe (DAT)** peut être effectué sur du sang ou du sérum, en mesurant le titre des complexes immuns. Le titre de seuil choisi pour définir un test positif est crucial pour une analyse correcte. En termes de rapidité, un test basé sur la jauge d'antigène recombinante K39 a été aussi utilisé avec succès sur le terrain ; deux gouttes de sang suivies de deux gouttes de tampon placées sur le tampon de la jauge sont incubées pendant environ 5 minutes. Le test est positif lorsque les deux bandes, une bande de contrôle et une bande de test, sont apparues dans les 5 minutes (Bern *et al*, 2000). Un test d'agglutination au latex (LAT) basé sur la détection d'un antigène leishmanien dans l'urine chez les patients atteints de LV s'est avéré aussi utile dans le suivi du traitement (Vilaplana *et al*, 2004).

**Le test cutané de Monténégro (MST ; Monténégro Skin Test)** pour le diagnostic LC est parfois utilisé en raison de sa simplicité d'utilisation, de sa grande sensibilité et de sa spécificité. Les principaux inconvénients du MST sont la nécessité d'installations de culture pour produire l'antigène MST ; l'impact des préparations d'antigènes différentes sur la sensibilité des tests et la non distinction entre les infections actives et antérieures. Le MST n'est pas utilisé pour le diagnostic LV, puisque les patients développent une forte immunité à médiation cellulaire spécifique de *Leishmania* seulement lorsqu'ils sont guéris (Bensoussan *et al*, 2006).

L'estimation de la présence d'antigènes de *Leishmania* et les taux d'anticorps anti-*Leishmania* circulants chez l'hôte ne reflètent pas la charge parasitaire réelle, car, la présence d'anticorps contre les parasites dépend fortement de la réponse individuelle et de l'état de santé général de l'hôte. En raison de ce fait, le diagnostic, obtenu avec des tests basés sur l'immunodétection, devrait être confirmé par d'autres méthodes.

#### **I.1.5. Traitement**

Un agent anti-leishmanien idéal devrait être efficace, sûr, facilement administré et abordable. En pratique, cependant, aucun agent de ce type n'est disponible. Le choix du traitement est influencé par la disponibilité de médicament particulier dans le pays affecté et les patients

doivent être orientés vers des centres spécialisés ayant de l'expérience (Pavli & Maltezos, 2010).

Les médicaments qui ont été développés pour traiter la leishmaniose peuvent être divisés en plusieurs groupes (Tab. 2). Les médicaments de première ligne sont dérivés de l'antimoine pentavalent (stibogluconate de sodium et de l'antimoniure de méglumine). Ils sont utilisés dans le traitement de toutes les formes cliniques de leishmaniose à la fois dans l'Ancien et dans le Nouveau Monde et ils constituaient le traitement standard de la LV depuis les années 1940 en raison de leur faible coût (Maltezos, 2009). L'expérience thérapeutique par les antimoniés depuis près de 70 ans a indiquée des taux d'efficacité de > 90-95% et de faibles taux de mortalité et de rechute. Cette efficacité, cependant, diffère significativement selon la forme clinique de la leishmaniose, les espèces de *Leishmania* et la région géographique. Les principaux inconvénients des antimoniés comprennent : la voie d'administration intramusculaire avec des calendriers prolongés (20 mg / kg pendant 21-30 jours) ; leur toxicité potentielle exprimée par des effets secondaires transitoires mais parfois mortels (ex : les arythmies cardiaques, l'augmentation des transaminases hépatiques sériques, la pancréatite et la pneumonie) ; ainsi que les taux croissants de résistance observés au cours des deux dernières décennies en Europe, en Asie et en Amérique du Sud (Croft *et al*, 2006 ; Maltezos, 2009). Cela a conduit à leurs remplacement par des médicaments alternatifs tels que l'amphotéricine B et ses dérivés liposomaux, et le pentamidine (Pace, 2014).

L'amphotéricine B a été introduite au début des années 1960. Le médicament induit la formation de pores aqueux dans la membrane parasitaire et possède une excellente activité leishmanicide. Les inconvénients de l'amphotéricine B sont : sa faible solubilité dans l'eau ; sa biodisponibilité médiocre et sa toxicité qui peut être grave occasionnellement. Ces effets toxiques de l'amphotéricine B ont été largement améliorés avec l'avènement des formulations lipidiques de ce médicament. De plus, suite à la tarification progressive des formulations lipidiques de l'amphotéricine B, celles-ci sont maintenant les mieux préférées en raison de la réduction drastique du séjour hospitalier et d'un profil de sécurité plus favorable (Sundar *et al*, 2006 ; Cruz *et al*, 2009).

La pentamidine est utilisée dans le traitement de la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse dans le Nouveau Monde. Une gamme de médicaments alternatifs comprenant la miltéfosine, la paromomycine, les azoles, l'azithromycine, l'allopurinol, la dapsone et la rifampicine ont été récemment introduits (Goto & Lindoso, 2010).

Les régimes combinés peuvent être préférés dans les zones de forte résistance et chez les individus infectés par le VIH. Pour la LC le traitement est habituellement offert pour les lésions multiples ou grandes ou potentiellement défigurantes qui ont peu de chance de guérir

spontanément. La thermothérapie, la cryothérapie, les injections intralésionnelles d'antimonioux ou l'application topique de crème paromomycine sont des options thérapeutiques alternatives dont l'efficacité varie entre les différentes espèces de *Leishmania* (Ameen, 2010).

Cependant, l'efficacité des substances diffère radicalement en fonction de la forme clinique de la leishmaniose, de l'espèce *Leishmania* et de la région géographique. Ainsi, il existe toujours un besoin continu de nouvelles substances chimiques avec un effet leishmanicide et pour des systèmes d'administration optimisés (Goto & Lindoso, 2010).

En Afrique du Nord, les composés antimoniaux pentavalents restent le traitement de première intention contre les formes à la fois cutanées et viscérales de la leishmaniose. Cependant, leur efficacité est actuellement menacée par l'émergence d'une résistance à l'antimoine (Eddaikra *et al*, 2013).

En Algérie, le protocole de traitement du LC recommandé par le ministère de la Santé est de 20 mg / kg / jour pendant 15 jours par injection intramusculaire en cas de lésions multiples ou si la lésion est localisée au visage. Pour les lésions simples, le ministère de la Santé recommande l'administration intradermique (intralésionnelle) de 1,5 à 2 ml de Glucantime deux fois par semaine pendant 4 semaines. Une thérapie alternative telle que l'utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol ou l'utilisation de la cryothérapie est également recommandée. Pour la LV, le schéma thérapeutique appliqué est celui recommandé par l'Organisation mondiale de la santé. Il consiste en une injection intramusculaire de 20 mg de Sb (V) / kg / jour pendant 28 jours. En cas d'absence de réponse, une perfusion intraveineuse d'amphotéricine B (Fungizone®) à la dose de 1 mg / kg / jour pendant 15 jours est utilisée (Eddaikra *et al*, 2013).

*L. major* et *L. infantum* résistants au Sb (V) ont été isolés chez des patients et des réservoirs (chiens) en Algérie (Belazzoug, 1986 ; Aït-Oudhia, 2012). Malgré le recours aux antimoniés, des taux d'échec élevés du traitement sont suspectés jusqu'à 66% en Algérie [Harrat, données non publiées]. L'émergence d'un échec de la thérapie antimoniale liée à une résistance prouvée du parasite met l'accent sur des facteurs sélectifs ainsi que sur le risque de transmission de la pharmacorésistance. La méconnaissance des facteurs favorisant la sélection des parasites résistants et la multiplicité des agents pouvant jouer un rôle dans l'activité antileishmaniale *in vivo* de l'antimoine contribuent à une surveillance insuffisante de la résistance à l'antimoine (Eddaikra *et al*, 2013).

Tableau 2. Médicaments utilisés pour traiter les différentes formes de leishmaniose (Pace., 2014).

Traitement	Mode d'action sur le parasite Leishmania	Voie d'administration	Effets indésirables	Avantages et inconvénients
<b>Antimoniens pentavalents :</b> - <b>Stibogluconate de sodium</b> - <b>Antimoniure de méglumine</b>	Inhibition de la glycolyse et de l'oxydation des acides gras. Inhibition dose dépendante de la formation d'ATP et de GTP.	Im/Iv: LV, LC, LMC. II: CL	Pancréatite Leucopénie Thrombocytopénie Arythmie cardiaque	Moins chers ; Induction de résistance.
<b>Amphotéricine B et formulations lipidiques</b>	Formation de pores dans la membrane cellulaire et inhibition de sa synthèse	Iv: LV, LC, LMC,	Fièvre, frissons, douleur osseuse, néphrotoxicité	Moins toxique ; Plus cher ; Efficacité variable.
<b>Paromomycin</b>	Interférence possible avec la synthèse de l'ARN et la perméabilité de la membrane	Im : LV, LC	Douleur, érythème, hépatotoxicité, cloques	Combinaison avec les antimoniaux très efficace pour LV en Inde.
<b>Allopurinol</b>	Interférence avec la synthèse des protéines	Orale: LV, LC	Eruption	Inefficace en monothérapie.
<b>Dérivés d'Azole:</b> - <b>Fluconazole</b> - <b>Ketoconazole</b> - <b>Itraconazole</b>	Inhibition de la 14a-lanostérol déméthylase nécessaire à la biosynthèse de l'ergostérol	Orale : LC	Hépatotoxicité	Efficacité incohérente entre les espèces.
<b>Analogues d'alkylphosphocoline:</b> <b>Miltefosine</b>	Altération de la synthèse de l'ancre glycosylphosphatidylinositol, du métabolisme des lipides de l'éther, de la transduction du signal et de l'acyl-coenzyme A acyl-transférase spécifique d'alkyle	Orale : LV, LC	Troubles gastro-intestinaux, toxicité hépatorénale, tératogénique: contre-indiquée pendant la grossesse	Emergence de résistance ; Taux de guérison élevés en combinaison avec la paromomycine ou après l'amphotéricine B liposomale.

Im : Intramusculaire ; Iv : Intraveineuse, II : Intralésionnelle.

### I.1.6. Surveillance et contrôle

Il y a rarement eu tentative systématique de contrôler la transmission des leishmanioses et encore plus rarement une évaluation efficace. Il n'y a donc pas de procédure standard pour le contrôle de toute forme de leishmaniose. La mesure de contrôle minimale recommandée par l'OMS pour toutes les formes de la maladie est la mise en place d'une stratégie de surveillance efficace pour la détection et le traitement des cas. Cela doit être accompagné d'un système

efficace de rapports et d'enregistrement. La lutte antivectorielle et, dans la mesure du possible, le contrôle des animaux réservoirs, constituent l'un des volets de la prophylaxie (WHO, 2010).

Étant une maladie de pauvreté, le manque d'investissement dans les vaccins contre la leishmaniose humaine a entravé leur développement et les vaccins candidats actuels sont encore à l'étude (Singh & Sundar, 2012).

Un bon vaccin doit induire un niveau d'immunité protecteur sur le site approprié et cette réponse immunitaire doit avoir une durée adéquate. Il doit aussi être tolérable à l'administration et adapté à la population de façon durable, car les différentes populations peuvent différer génétiquement dans leur réponse. Des progrès récents en immunologie révèlent des facteurs clés dans la protection contre de nombreuses maladies et facilitent la conception des vaccins. Cependant, et malgré les connaissances considérables sur la réponse immunitaire contre les parasites *Leishmania*, il n'existe actuellement aucun vaccin sûr et efficace contre la leishmaniose humaine (Kobets *et al*, 2012). Un essai d'inoculation de parasites virulents de *L. major* (Leishmanisation) a été tenté sur des personnes vivant dans des régions endémiques afin de les protéger contre la leishmaniose cutanée. Ce n'est pas un vaccin au sens conventionnel, même si les cultures étaient moins virulentes que les formes inoculées par le phlébotome. Cette pratique a été interrompue en raison de développement de lésions primaires sévères (Nadim *et al*, 1997).

D'autre part, la lutte antivectorielle est difficile, les biotopes larvaires de phlébotomes restent peu connus, innombrables et de petite taille. De ce fait, la lutte se focalise principalement contre les insectes adultes. Les phlébotomes sont très sensibles aux insecticides mais ces derniers peuvent induire une résistance acquise. Les pulvérisations intradomiciliaires et péri-domestiques d'insecticides rémanents ainsi que l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides ont donné de meilleurs résultats surtout dans les foyers de leishmaniose anthroponotique lorsque les vecteurs sont endophiles (Depaquit & Léger, 2017). Cependant, l'utilisation potentielle des moustiquaires pour lutter contre les phlébotomes en Afrique du Nord et de l'Ouest est compliquée par le fait qu'il fait trop chaud pendant l'été pour dormir sous les filets à mailles fines qui réduisent la ventilation (Ritmeijer *et al*, 2007).

Les mesures préventives pour la protection contre les piqûres de phlébotomes sont principalement d'éviter les activités de plein air du crépuscule à l'aube et d'appliquer du DEET (N, N-diéthyl-méta-toluamide) contenant des insectifuges sur la peau exposée et sur les vêtements. Les phlébotomes sont des insectes faibles et, par conséquent, leur mouvement peut être inhibé par les ventilateurs. Dormir dans des zones climatisées ou bien tamisées est donc conseillé. Les voyageurs dans les zones d'endémie doivent être informés de ces conseils cruciaux afin d'éviter la contraction de la maladie (Pavli & Maltezou, 2010).

Dans les pays restreints en ressources financières, la lutte antivectorielle par pulvérisation d'insecticides sur les maisons n'est pas durable en raison des contraintes logistiques et des coûts élevés. Dans cette perspective, toutes les stratégies de lutte antivectorielle devraient être réévaluées. Une collaboration renforcée entre pays est indispensable pour établir des sites de surveillance, cartographier les foyers et la prévalence de la maladie sur la base d'évaluations épidémiologiques, former le personnel technique, enquêter sur les échecs thérapeutiques et mettre en place des systèmes informatisés de collecte et d'analyse des données (Bates *et al*, 2015).

De même, le contrôle d'animaux réservoirs par la gestion de l'environnement est coûteux et difficile à mettre en œuvre. Dans les zones de transmission zoonotique canine, l'absence d'euthanasie des chiens infectés empêche l'élimination du réservoir de *Leishmania*. Les colliers imprégnés d'insecticide pour les chiens de compagnie peuvent donc les protéger contre l'acquisition de la leishmaniose. Un vaccin, Leishmune®, qui bloque la transmission de leishmaniose canine s'est montré efficace. Plus récemment un Vaccin CaniLeish® (Virbac, France) a été enregistré pour un usage vétérinaire dans l'Union Européenne pour la protection des chiens contre l'infection à *L. infantum*. Cependant, on ignore encore si ces vaccins auront un impact sur l'incidence de la leishmaniose humaine (Pace, 2014). En Tunisie, la destruction des terriers de rongeurs *Psammomys obesus*, réservoirs de *L. major*, par des labours profonds et la plantation d'arbres dans une zone de 2 à 3 kilomètres entourant les établissements humains a entraîné une réduction significative de l'incidence de la leishmaniose cutanée chez la population humaine (Kamhawi, 1993). Pareil en Algérie, et plus précisément à Msila, foyer historique de LC, la destruction des Chénopodiacées (plantes salées sur lesquelles se nourrit exclusivement le rongeur *Psammomys obesus*) s'est montrée efficace et a conduit à une réduction de 31 % du nombre de cas de LC, passant de 1 391 cas en 2003 à 965 cas en 2004 (Cherif *et al*, 2012).

## I.2. Les leishmanioses en Algérie

En Algérie, la leishmaniose humaine et canine est endémique et représente un sérieux problème de santé publique. Avec une prévalence de leishmaniose cutanée plus élevée que viscérale, l'Algérie est considérée comme le pays le plus touché en Afrique du Nord (Aoun & Bouratbine, 2014). Deux formes de leishmaniose (viscérale et cutanée) sévissent à l'état endémique dans le pays présentant des cycles de transmission anthropozoonotiques qui impliquent trois espèces de *Leishmania* et cinq espèces de phlébotomes avec les canidés et les rongeurs comme réservoirs principaux assurant la pérennité du parasite (Dedet *et al*, 1984).

### I.2.1. Leishmanioses à *L. infantum*

Dans le Nord du pays, deux formes de leishmaniose zoonotique distinctes dues à *L. infantum* coexistent.

La leishmaniose viscérale et canine, causée par *L. infantum* (zymodème MON-1) est transmise par *P. (L.) perniciosus* et probablement par *P. (L.) longicuspis* (Izri *et al*, 1990 ; Berdjane Brouk *et al*, 2012). Cette affection est connue en Algérie depuis 1910 chez les chiens et 1911 chez l'homme (Lemaire, 1911). Sa distribution géographique couvre toutes les régions humides et subhumides du nord du pays et montre ces dernières années une extension des anciens foyers historiques de la Kabylie (Tizi-Ouzou, Bejaïa) vers le centre (Blida, Chlef, Medea, Tipaza) et la partie nord-est de l'Algérie, avec des cas épars à l'Ouest (Oran, Tlemcen) (Adel *et al.*, 2014). D'autres cas continuent toujours à être signalés dans les régions semi-aride et aride (M'sila, Batna, Biskra) voire même à l'extrême sud du pays (Hoggar, Tassili N'Ajjer, Tamanrasset) (Benallal *et al*, 2013). Cette propagation est due à une combinaison de facteurs: les changements environnementaux ainsi que les facteurs liés à l'état immunitaire de l'hôte et à la résistance aux médicaments (Fig. 15).

La maladie affecte principalement les enfants de moins de 5 ans, la plupart d'entre eux appartenant à des familles pauvres résidant dans des zones rurales. Dans le cadre d'une étude épidémiologique rétrospective qui a été menée sur la LV humaine en Algérie, un total de 1562 cas a été notifié par l'Institut national de la santé publique entre 1998 et 2008, avec un taux d'incidence annuel moyen de 0,45 cas pour 100 000 habitants, dont 81,42% dans la tranche d'âge 0-4 ans (Adel *et al*, 2014).

Sur une aire géographique similaire à celle de la LV, la leishmaniose cutanée sporadique, causée par *L. infantum* (zymodème MON-24), transmise par *P. (L.) perfiliewi* est présente. Elle est moins fréquente, bénigne et présente toute l'année à l'état endémique dans le Nord du pays. Elle touche tout le littoral et le Tell algérien (Tizi-Ouzou, Bouira, Bord Menail, Tipaza, Blida et Alger) avec une incidence annuelle moyenne de 200 nouveaux cas chaque année (Barchiche *et al*, 2009).

Pour les deux formes de leishmaniose décrites plus haut, le chien est le principal réservoir de la maladie. Il constitue un maillon important dans la persistance et la transmission de la leishmaniose humaine à *L. infantum* qui résulte de la recrudescence de la leishmaniose canine. Les renards et les chacals peuvent aussi avoir un rôle dans la pérennité du parasite (Bessad *et al*, 2011 ; Eddaikra *et al*, 2013).

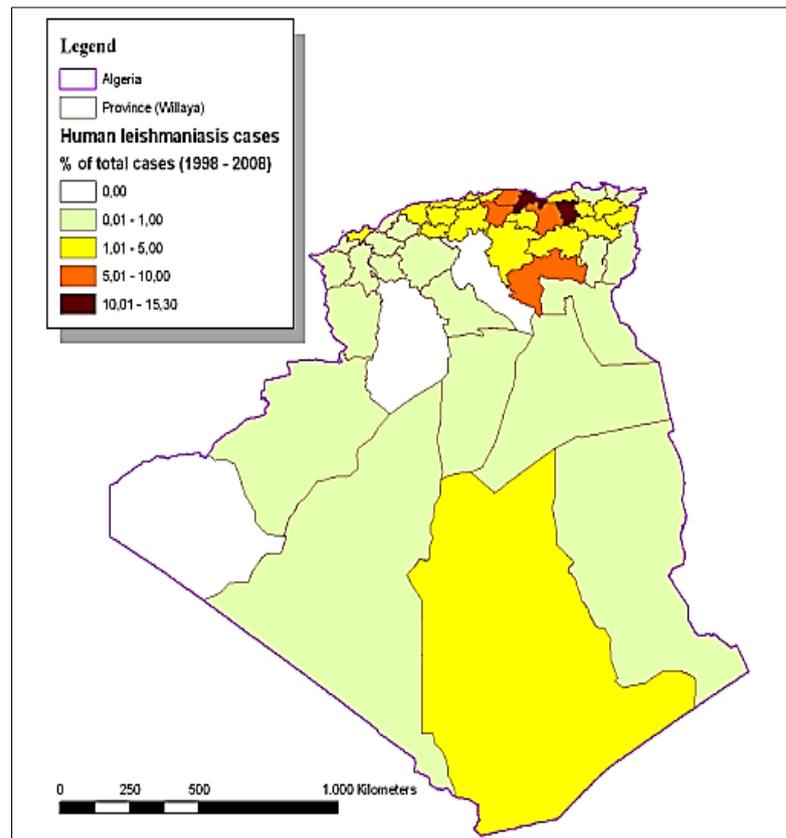


Figure 15. Distribution des cas de LV humaine de 1998 à 2008 (Adel *et al*, 2014)

### I.2.2. Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) a *L. major*

Longtemps cantonnée au Sahara et aux régions montagneuses (foyers historiques de Biskra, Msila et d'Abadla), la LCZ, connaît une dissémination des zones arides du sud vers les zones semi-arides de la partie nord du pays (Sidi Aissa, Batna, Barika et Laghouat) (Fig. 16). Elle est causée par *L. major* (zymodème MON-25 et le zymodème MON-269) et transmise à l'homme par *P. (P.) papatasi* avec les rongeurs sauvages (*Psammomys obesus*, *Meriones shawi*) comme principaux réservoirs de l'affection. Récemment, il a été suggéré que les hérissons ont un rôle épidémiologique potentiel en tant qu'hôtes réservoirs de *L. major* après avoir été trouvés naturellement infectés dans la région de Msila, foyer historique de leishmaniose cutanée. (Eddaikra *et al*, 2013 ; Tomás-Pérez *et al*, 2014).

La maladie affecte un nombre annuel variant de 13 749 en 2003 à 16 585 en 2011, ce qui fait une moyenne de 14 752 cas par an. La région de Biskra, Batna et Msila représentait plus de 88% du total des cas enregistrés dans le pays (INSP, 2014).

### I.2.3. Leishmaniose cutanée anthroponotique a *L. killicki*

Une forme cutanée urbaine due à *L. killicki* MON-301 (appartenant au complexe *L. tropica*) a été récemment signalée dans plusieurs régions d'Algérie (Ghardaia, Annaba, Tipaza) et est

généralement sympatrique avec la LCZ à *L. major*. Elle est transmise par *P. (P.) sergenti* avec *Masouretiera mzabi* (un rongeur proche du *Ctenodactylus gundii* qui a été trouvé naturellement infecté par *L. killicki* en Tunisie) comme réservoir suspect. L'incidence annuelle reste inconnue mais on estime qu'elle cause moins de 100 cas par an (Mansouri *et al*, 2011 ; Eddaikra *et al*, 2013 ; Izri *et al*, 2014).

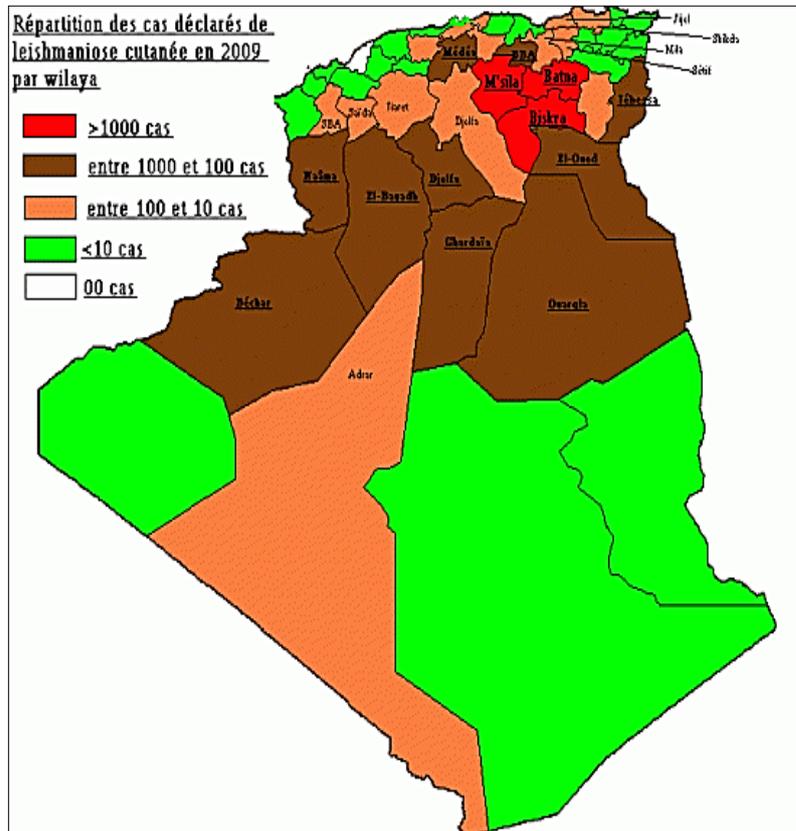


Figure 16. Distribution des cas de LC en 2009 (Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière)

### I.3. Les phlébotomes d'Algérie

Signalés pour la première fois en Algérie en 1912 par Foley et Leduc, les phlébotomes ont fait l'objet de très importants travaux menés à l'Institut Pasteur d'Algérie sous la direction de Parrot et des frères Sergent. Des découvertes capitales concernant tant leur systématique que leur pouvoir pathogène y ont été réalisées (Dedet *et al*, 1984). Aujourd'hui, on compte vingt-quatre espèces de phlébotomes en Algérie divisées en deux genres (14 appartenant au genre *Phlebotomus* et 10 au genre *Sergentomyia*) et sept sous-genres, dont cinq espèces sont des vecteurs prouvés ou suspectés de leishmaniose dans le pays (Tab. 3). Elles sont réparties sur tout le territoire national, de l'étage humide jusqu'à l'étage saharien. (Belazzoug, 1991 ; Berdjane Brouk *et al*, 2012).

Tableau 3. Liste des espèces de phlébotomes inventoriées en Algérie.

<b>Sous-famille <i>Phlebotominae</i></b>	
<b>Genre <i>Phlebotomus</i></b>	<b>Genre <i>Sergentomyia</i></b>
<i>Phlebotomus (phlebotomus) papatasi</i> (Scopoli, 1786)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> (Adler et Theodor, 1927)
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti</i> (Parrot, 1934)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i> (Parrot, 1921)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> (Parrot, 1917)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri</i> (Sinton, 1928)	<i>Sergentomyia (Sergentomyia) schwetzi</i> (Adler, Theodor et Parrot, 1929)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) Chabaudi</i> (Croset, Abonnenc et Rioux, 1970)	<i>Sergentomyia (Parrotomyia) africana</i> (Newstead, 1912)
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni</i> (Theodor et Mesghali, 1964)	<i>Sergentomyia (Parrotomyia) eremitis</i> (Parrot et de Jolinière, 1945)
<i>Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii</i> Grassi, 1908	<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i> (Parrot, 1933)
<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> (Tonnoir, 1921)	<i>Sergentomyia (Sintonius) clydei</i> (Sinton, 1928)
<i>Phlebotomus (Larroussius) chadlii</i> (Rioux, Juminer et Gibily 1966)	<i>Sergentomyia (Sintonius) christophersi</i> (Sinton, 1927)
<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> (Newstead, 1911)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) longicuspis</i> (Nitzulescu, 1911)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) langeroni</i> (Nitzulescu, 1930)	
<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i> (Parrot, 1930)	

---

---

## **Chapitre II**

# **Contribution à l'amélioration du diagnostic de leishmaniose cutanée en Algérie**

---

---

## **II.1. problématique et objectifs de l'étude**

La leishmaniose cutanée, comme décrite dans le premier chapitre, constituent un problème majeur de santé publique en Algérie, influençant ainsi le secteur socioéconomique du pays. Le diagnostic de LC peut être difficile, en particulier dans les zones endémiques où différentes espèces de *Leishmania* peuvent causer des lésions d'apparence très similaire, et où d'autres maladies de la peau avec des symptômes cliniques similaires se produisent.

La confirmation biologique du tableau clinique de la LC repose essentiellement sur le diagnostic parasitologique qui demeure l'étalon-or. Cependant, ces techniques ne sont pas assez sensibles malgré leur grande spécificité. Les techniques sérologiques présentent aussi un intérêt diagnostique mais ne différencient pas entre elles les infections actives et anciennes.

Ainsi, la diversité des espèces associées à la LC humaine et l'évolution de la situation éco-épidémiologique de la maladie en Algérie souligne la nécessité de développer une méthode simple, relativement moins coûteuse et gagne du temps permettant le diagnostic et la caractérisation des espèces de *Leishmania* par rapport aux autres techniques conventionnelles.

Dans ce cadre, les méthodes basées sur la PCR offrent une approche alternative de diagnostic pour la détection et l'identification des parasites *Leishmania* dans les échantillons cliniques.

L'objectif de notre étude se focalise donc sur la contribution à l'amélioration du diagnostic de la LC, par l'introduction des techniques moléculaires (PCR-RFLP) pour mettre en évidence l'ADN leishmanien et l'identification des espèces de *Leishmania* en cause dans des prélèvements dermiques. Une évaluation de l'apport de ces techniques (en termes de sensibilité/spécificité) dans le diagnostic a été réalisée, en les comparant aux autres techniques parasitologiques (examen microscopique, culture) et sérologiques (WB, IFI) utilisées habituellement dans le service sanitaire prospecté.

## **II.2. Matériels et méthodes**

### **II.2.1. Déclaration d'éthique**

Un consentement verbal a été obtenu auprès des patients du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale de l'Hôpital Central de l'Armée (HCA), Ain Naâdja, Alger, Algérie.

### **II.2.2. Patients et échantillons**

Parmi les patients consultant au service de dermatologie de l'hôpital, quarante-neuf présentant des lésions cutanées évocatrices de LC ont été adressés par le dermatologue au laboratoire pour

une confirmation biologique (examens parasitologiques, sérologiques et moléculaires). L'étude a été effectuée sur une période allant de janvier 2014 jusqu'au juin 2015.

Pour chaque patient, une fiche de renseignements a été tout d'abord remplie précisant les données épidémio-cliniques relatives au malade (âge, sexe, origine géographique, région de séjour, notion sur la pique d'insecte ; forme, siège, durée d'évolution et nombre de lésions).

Ensuite, différents prélèvements pour les analyses biologiques ont été réalisés, après avoir nettoyé les lésions cutanées à l'alcool.

- Des frottis cutanés destinés à l'examen microscopique ont été réalisés par grattage à la périphérie des lésions, sur des lames en verre à l'aide de vaccinostyles stériles.
- L'aspiration des sérosités à partir de la bordure des lésions cutanées actives a été réalisée à l'aide d'une seringue dans des conditions stériles : 1 ml de solution saline stérile a été injecté dans le nodule et l'aiguille a été tournée doucement plusieurs fois, puis aspirée. Le liquide récupéré est distribué sur des tubes contenant du milieu de culture et sur des tubes Eppendorf pour les tests PCR. Ces derniers sont conservés à -20 ° C jusqu'à l'analyse.
- Des prélèvements sanguins destinés aux techniques sérologiques (sur tube gélosé centrifugé à 2500 trs/min pour récupérer le sérum) et à l'étude moléculaire (sur tube EDTA) ont aussi été réalisés.

### **II.2.3. Souches de *Leishmania* spp.**

Des souches de *Leishmania* spp. isolées à partir des sérosités de malades précédemment diagnostiqués positivement de LC, ont été entretenues sur différents milieux de culture par repiquage hebdomadaire, afin de préparer de l'ADN leishmanien qui va nous servir comme témoin positif pour la technique moléculaire (PCR).

### **II.2.4. Examens parasitologiques**

Ces techniques reposent principalement sur la mise en évidence par examen microscopique de parasites *Leishmania* présents dans les prélèvements dermiques sous leur forme amastigote et par culture sous leur forme promastigote.

#### **II.2.4.1. Examen microscopique ou examen direct (ED)**

Les frottis cutanés, précédemment préparés sur des lames en verre, sont fixés avec du méthanol absolu pendant 5 min et laissés à sécher à l'air libre. Les lames sont ensuite colorées au Giemsa ou sa variante (Fig. 17).

- **La coloration au Giemsa.** Elle consiste à submerger les lames par la solution Giemsa diluée au 1/5<sup>ème</sup> dans du PBS, pendant 45min à une heure, à les rincer à l'eau courante puis à les sécher à l'air libre. C'est une coloration qui permet de visualiser en azur de méthylène les constituants cellulaires acides, et en éosine les structures cellulaires basiques.
- **La coloration par le kit commercialisé RAL555.** Elle consiste à plonger 5 fois les lames successivement et respectivement dans les trois flacons qui le constituent, à les rincer puis à les sécher. Le flacon FIX-RAL555 permet la fixation du frottis, l'EOSINE-RAL555 permet la coloration des organites acides et le BLEU-RAL555 permet la coloration des organites basiques.

Les lames colorées sont entièrement inspectées, par observation sous microscope optique, avec un objectif d'immersion de (G×100), pour la présence de formes amastigotes au moins deux fois avant de livrer le résultat final.

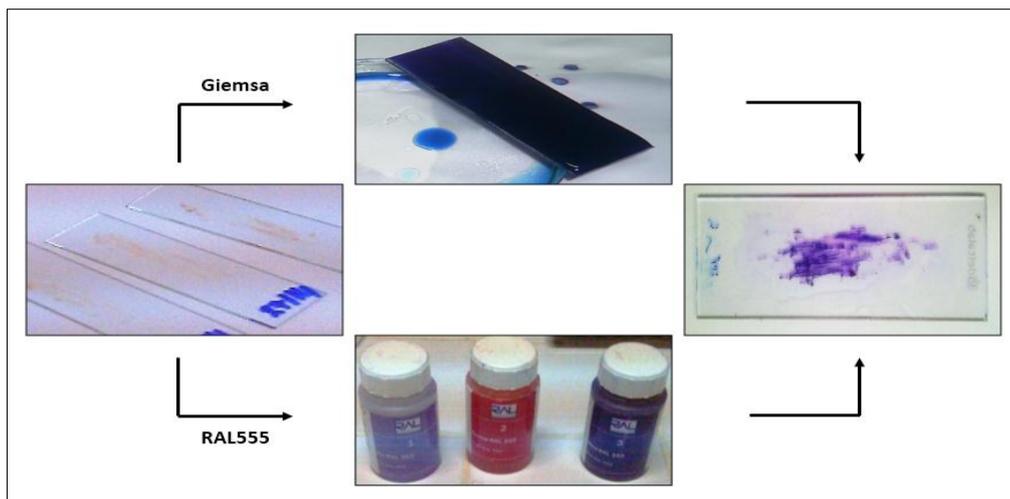


Figure 17. Coloration de frottis cutanés pour l'examen microscopique par la coloration Giemsa et sa variante RAL555 (photo personnelle).

#### II.2.4.2. Culture

Le liquide dermique (sérosités) aspiré à l'aide d'une seringue a été inoculé aseptiquement (au près d'un bec bensen) au tube contenant du milieu NNN (Novy Mac-Neal Nicolle), puis incubé dans une étuve à une température de 27°C. Le surnageant a été examiné pour la croissance des parasites par prise d'une goutte déposée entre lame et lamelle. L'observation des formes promastigotes mobiles est réalisée sous microscope optique avec un objectif de (G×40) tous les trois à cinq jours. Le surnagant est repiqué une fois par semaine pendant 4 à 6 semaines avant que la culture soit déclarée négative.

## II.2.5. Analyses sérologiques

La mise en évidence de la présence des anticorps anti-*Leishmania* a été effectuée par deux techniques dans notre étude: l'Immunofluorescence indirecte (IFI) et le Western Blot (WB).

### II.2.5.1. Immunofluorescence indirecte

Elle consiste à la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) par un marquage à fluorescence sous microscope en lumière UV.

Une série de dilutions de sérum à 1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup> et 1/60<sup>ème</sup> est réalisée en solution PBS pour chaque patient, puis 10 µl de chaque dilution sont mis en contact avec des promastigotes fixés sur les spots d'une lame porte-objet et incubés à 37°C pendant 30min dans une chambre humide.

Il faut prévoir un spot destiné au témoin conjugué pour chaque série de dilutions.

Les lames sont ensuite lavées en solution PBS-Tween (65 µl de Tween-80 en un litre de solution PBS) deux fois pendant 5 min avant d'être rincées dans un bain d'eau distillée. Après séchage, 10 µl de conjugué anti-immunoglobuline humaine (IgH) précédemment préparé (deux gouttes de Fluoline H et deux gouttes de Bleue d'Evans dans 5 ml de PBS) sont ajoutées sur chaque spot y compris le témoin, puis incubées, lavées et séchées comme précédemment décrit.

Enfin, deux gouttes de fluoprep sont déposées sur chaque lame et recouvertes d'une lamelle pour lecture sous microscope à fluorescence avec un objectif de (G×40). Tous les réactifs utilisés ainsi que le protocole pour la réalisation de la technique sont fournis dans le Kit IFI commercialisé.

Les résultats sont déclarés positifs lors de la présence de promastigotes fluorescents vert avec un seuil de positivité de 1/40<sup>ème</sup> et sont déclarés négatifs lors de la présence d'une fluorescence rouge.

### II.2.5.2. Western Blot

Les antigènes (obtenus par culture *in vitro* des promastigotes de *Leishmania*) sont fixés par électro-transfert sur la surface de bandelettes de nitrocellulose après avoir été séparés par électrophorèse sur un gel polyacrylamide. Ces bandelettes sont fournies prêtes à l'emploi (numérotées et prédécoupées) dans un kit commercialisé contenant les réactifs nécessaires pour cette technique.

L'incubation des bandelettes d'antigènes avec les sérums de patients forment le complexe Ag-Ac qui est révélé par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à la phosphatase alcaline suivant les instructions du fabricant détaillées dans le protocole fourni avec le kit.

Le résultat est déclaré positif lors de la présence des bandes de poids moléculaire de 14kD et de 16kD spécifiques des antigènes leishmaniens qui signifient la présence d'Ac anti-*Leishmania*. La comparaison du profil de l'immunoblot de chaque échantillon avec celui du

contrôle positif indiquant la position précise des deux bandes est indispensable pour la lecture des résultats.

## **II.2.6. Analyse moléculaire**

### **II.2.6.1. Détection de l'ADN de *Leishmania* spp.**

La détection et l'amplification de l'ADN de *Leishmania* spp. dans les prélèvements cutanés et sanguins a été effectuée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Cette technique permet d'amplifier, en un très grand nombre de copies, une séquence d'ADN parasitaire à partir d'une quantité initiale minimale en utilisant une paire d'amorces qui s'hybrident spécifiquement à la région du gène ciblé. Elle comporte 3 étapes principales: l'extraction d'ADN, l'amplification et la révélation.

Afin d'éviter les contaminations, ces différentes étapes ont été réalisées dans des salles séparées avec un matériel spécifique dédié à chaque étape et une décontamination des salles et des matériaux aux UV, ainsi qu'une désinfection des surfaces à l'eau de Javel a été effectuée selon les recommandations standards (Ayaz Najafov, 2008).

#### **II.2.6.1.1. L'extraction d'ADN génomique**

L'extraction de l'ADN génomique total a été effectuée à partir de chaque échantillon clinique, ainsi que des cultures positives qui vont servir de témoin positif pour la réaction PCR, en utilisant le kit d'extraction manuelle d'ADN génomique : QIAamp DNA Mini-Kit (Qiagen Hilden, Germany), et selon les recommandations du fabricant. L'ADN est ensuite conservé à -20 ° C jusqu'à l'analyse par PCR.

#### **II.2.6.1.2. L'amplification de l'ADN de *Leishmania* spp. par PCR**

Nous avons amplifié l'ADN de *Leishmania* spp. en utilisant deux paires d'amorces.

- La séquence de l'ADN qui est un fragment d'environ 120 paires de bases (pb) situé dans la région constante du mini-cercle de l'ADN kinétoplastique (ADNk) a été ciblé par une paire d'amorces 13A et 13B, comme décrit par Reale *et al*, 1999.
- Les ADN positifs par les amorces 13A et 13B ont été soumis à l'amplification en utilisant une paire d'amorces LITSR et L5.8S ciblant l'espace ribosomal intergénique qui sépare les deux gènes codants pour la sous-unité de l'ARNr et l'ARNr 5.8S (ITS1), comme décrit par Schönian *et al*, 2003.

Les PCRs ont été réalisées dans un volume de 50 µl contenant 40 µl le Mix réactionnel et 10µl d'ADN préalablement extrait à partir des prélèvements de patients. Chaque série d'amplification contenait des contrôles positifs (ADN extrait à partir de cultures de

promastigotes de *Leishmania* spp.) pour tester les conditions spécifiques des réactifs ainsi que des témoins négatifs (eau stérile exempte d'ADN) pour détecter toute contamination possible pendant la préparation du Mix. L'amplification a été réalisée dans un cycleur thermique à 96 puits (MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAD, USA).

### II.2.6.1.3. La révélation des produits de PCR

L'analyse des produits de PCR (amplicons) se fait après la fin de l'amplification, par électrophorèse sur gel d'agarose au bromure d'éthidium (BET) à 2%. L'observation de bandes d'ADN fluorescentes se fait grâce à l'absorption des UV par le BET qui s'intercale entre les bases nucléotides de l'ADN.

Un résultat de PCR est considéré comme positif quand une bande qui correspond à la taille attendue est visualisée par comparaison à un gradient de bandes de différents poids moléculaires: ~ 120 pb pour l'ADNk (*Leishmania* spp.) et ~ 300-350 pb pour l'ITS1 (*Leishmania* spp.).

### II.2.6.2. L'identification des espèces de *Leishmania* en cause par PCR-RFLP

L'analyse de la longueur de fragments de restriction résultant de la digestion enzymatique d'ADN (ou *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) est l'un des outils disponibles pour l'identification des espèces de *Leishmania*. La technique consiste en la digestion d'un fragment d'ADN de *Leishmania* préalablement amplifié par une enzyme endonucléase qui coupe au niveau des sites spécifiques.

Le produit de PCR ITS1 a été digéré avec l'enzyme HaeIII (Invitrogen, Royaume-Uni) à raison de 5 à 10 U (unité) d'enzyme dans un tampon de digestion à 37°C durant trois heures, selon les instructions du fabricant.

Les fragments de restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % coloré au bromure d'éthidium et visualisés sous UV. La digestion des produits ITS1 révèle trois bandes pour *L. infantum* (200, 100 et 50 pb), deux bandes pour *L. tropica* (220 et 50 pb) et deux pour *L. major* (220 et 127 pb).

Les concentrations de préparation de Mix réactionnel pour les PCR ainsi que les conditions de l'amplification d'ADN sont décrites dans le tableau 4.

Tableau 4. Séquences d'amorces et conditions principales des méthodes de PCR utilisées.

Nom des amorces	Séquence d'amorces (5'- 3')	Conditions d'amplification	Conditions de réaction PCR				
			MgCl <sub>2</sub> (mM)	dNTP (mM)	Amorces (μM)	Taq-poly U/μl	ADN μl
13A 13B	GTG GGG GAG GGG CGT TCT ATT TTC CAC CAA CCC CCA GTT	94 ° C pdt 5 min, 94 ° C pdt 1 min, 60 ° C pdt 1 min, 72 ° C pdt 1 min, 72 ° C pdt 10 min (30 cycles)	1.5	0.2	0.4	1.5	10
		94 ° C pdt 4 min, 94 ° C pdt 40 sec, 53 ° C pdt 30 sec, 72 ° C pdt 1 min, 72 ° C pdt 10 min (40 cycles)					
LITSR L5.8S	CTG GAT CAT TTT CCG ATG TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT	94 ° C pdt 4 min, 94 ° C pdt 40 sec, 53 ° C pdt 30 sec, 72 ° C pdt 1 min, 72 ° C pdt 10 min (40 cycles)	2	0.2	0.5	1.5	10

### II.2.7. analyses statistiques des données

Par convention, nous avons considéré les échantillons comme de vrais positifs lorsque des cultures ou des frottis de tissus colorés ou un test PCR sur sérosités sont positifs.

Afin de comparer entre elles les techniques de diagnostic utilisées dans cette étude de façon précise, nous avons calculé la valeur de Khi-Carré ( $\chi^2$ ) qui permet de démontrer l'indépendance ou la dépendance de ces dernières entre elles. Ces données ont été calculées à l'aide d'un logiciel statistique : OpenEpi (<http://www.openepi.com/>). La règle est la suivante.

- Si le Khi-carré calculé est inférieur au khi-carré théorique, il y a indépendance. L'hypothèse  $H_0$  disant que les deux paramètres étudiés sont incomparables est donc retenue.
- Si le Khi-carré calculé est supérieur au khi-carré théorique, il y a dépendance. L'hypothèse  $H_0$  est donc refusée.

Le risque d'erreur est de 5% ( $p < 0.05$ ) et le degré de liberté (ddl) calculé est de :  $(2-1) (2-1) = 1$ .

Pour connaître la fiabilité de chaque technique dans le diagnostic, le pourcentage de sensibilité et de spécificité de chacune d'entre elles a été déterminé.

**La sensibilité** est la probabilité que le test soit positif si la maladie est présente. Elle est donnée par la formule :  $VP / (VP + FN)$ .

**La spécificité** est la probabilité que le test soit négatif si la maladie est absente. Elle est donnée par la formule :  $VN / (VN + FP)$ .

- VP (vrai positif) représente le nombre de patients positifs avec la technique en question et avec au moins une autre technique.
- FP (faux positif) représente le nombre des patients positifs seulement avec la technique en question, tandis que les autres techniques sont négatives.
- FN (faux négatif) représente le nombre de patients négatifs avec la technique en question et positif avec au moins une autre technique.

- VN (vrai négatif) représente le nombre de patients négatifs avec la technique en question et avec toutes les autres techniques.

## II.3. Résultats

### II.3.1. Données épidémio-cliniques

Sur les 49 patients suspects de LC, et selon nos critères, 44 sont positifs aux examens biologiques avec un taux de positivité de 90% et une prédominance masculine de 90.91%, soit 40/44 présentant ainsi un sexe ratio de 10 (4 femmes /40 hommes) (Tab.14 et Fig. 18).

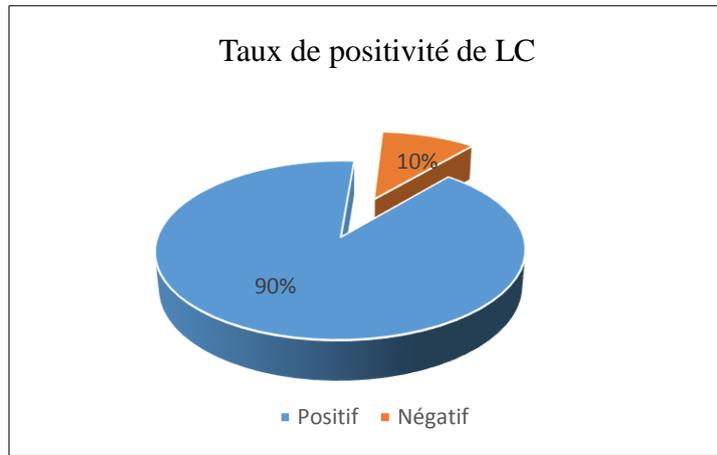


Figure 18. Prévalence de la LC chez les patients.

A partir des renseignements fournis par nos patients, nous avons constaté que la majorité des cas (59.18%, soit 29/49) ont fait un séjour dans la région de Biskra et la tranche d'âge la plus touchée est située entre 20 et 29 ans, elle regroupe à elle seule 75 % des cas positifs, soit 33/44 (Fig. 19).

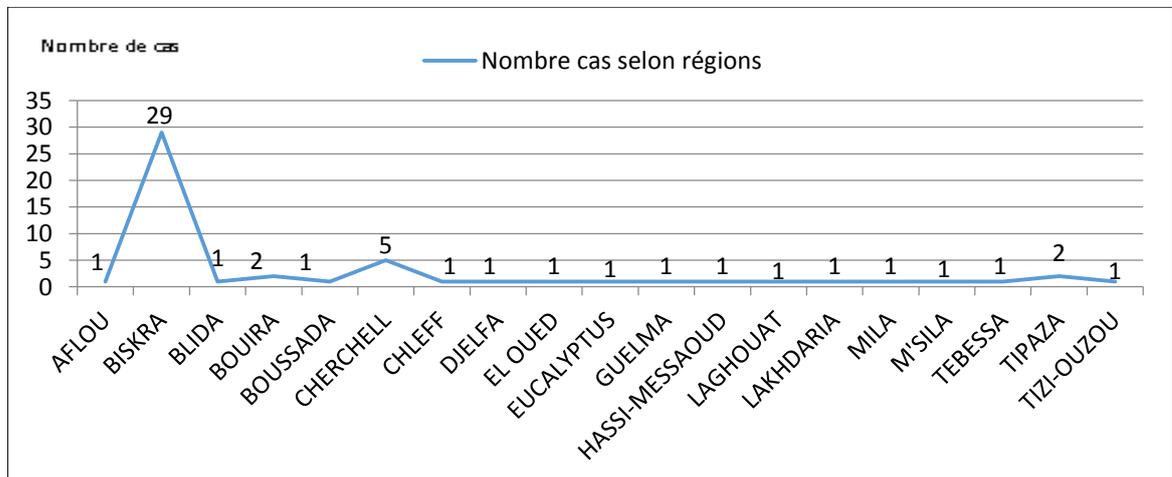


Figure 19. Répartition des cas selon la région de séjour.

Cliniquement, la plupart des lésions cutanées siégeaient sur les parties découvertes du corps : les membres inférieurs (48.9%), les membres supérieurs (28.5%) et le visage (16.3%) (Fig 20 et Fig. 27). Ces lésions étaient le plus souvent uniques (chez 28 patients, soit 57.14%) et parfois multiples : deux lésions (chez 12 patients, soit 24.49%) et 3 à 7 lésions (chez 9 patients, soit 18.37%), avec une durée d'évolution allant de moins d'un mois à 11 mois (Tab. 5).

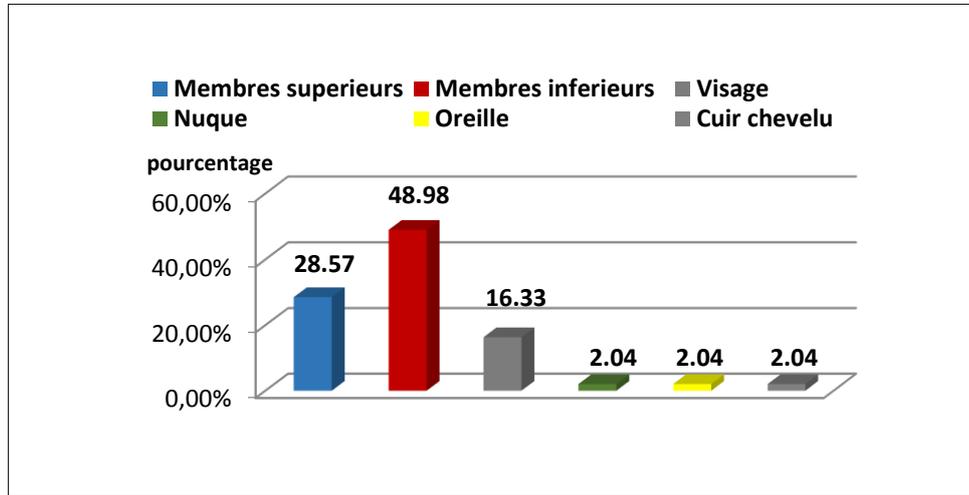


Figure 20. Répartition des cas selon la localisation des lésions.

Tableau 5. Évolution temporelle des lésions cutanées avant l'échantillonnage

Durée d'évolution des lésions (mois)	Nombre de patients
<1	12
1-2	11
2-3	5
3-4	8
>4	13
<b>Total</b>	<b>49</b>

## II.3.2. Analyses biologiques

### II.3.2.1. Examens parasitologiques

Les examens parasitologiques (examen direct et culture) ont été réalisés de façon systématique pour tous les patients suspects de LC.

Sur les 49 frottis examinés par microscopie, l'examen direct a été positif dans 42.86% des cas, soit 21/49, par la présence des formes amastigotes du parasite *Leishmania* dans leurs prélèvements dermiques (Fig. 21).

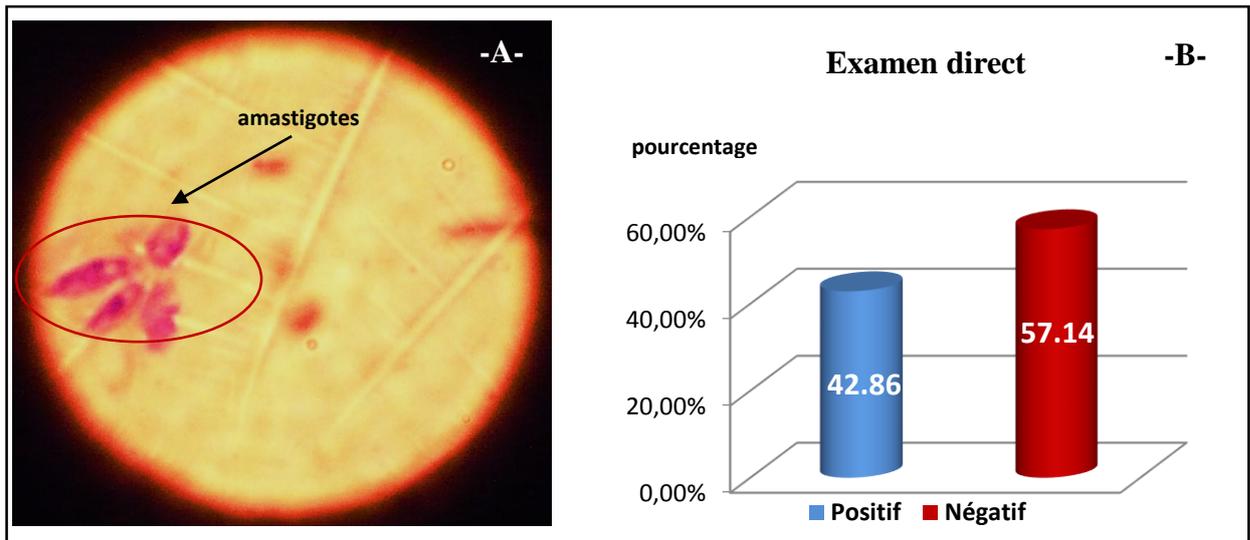


Figure 21. Résultats d'examen microscopique des frottis cutanés. A : Formes amastigotes de *Leishmania* colorées au Giemsa Gx100 (photo personnelle, 2015) ; B : taux de positivité de l'examen direct.

La culture sur milieu NNN à partir d'aspiration de sérosités sur les lésions cutanées s'est montrée positive dans 26.53% (13/49) des cas par l'observation des formes promastigotes mobiles sous microscope optique (Fig. 22).

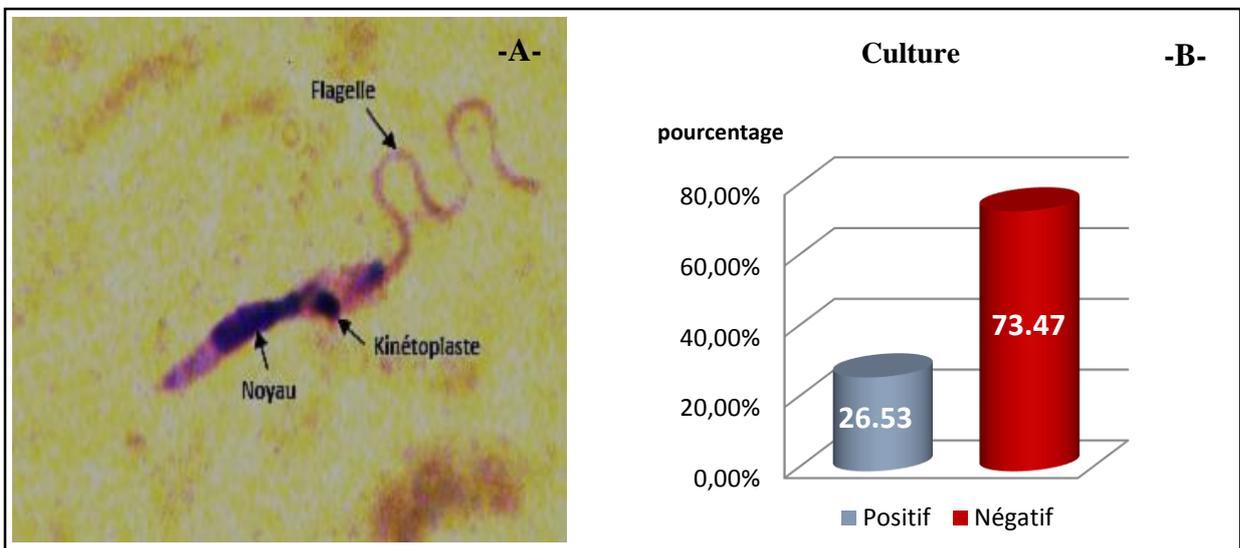


Figure 22. Résultats de la culture. A : Formes promastigotes de *Leishmania* colorées au Giemsa Gx100 cultivées sur milieu NNN (photo personnelle, 2015) ; B : taux de positivité de la culture.

Dans notre étude, l'examen direct (ED) a corrigé 11 cultures qui étaient faussement négatives, tandis que cette dernière a rendu positifs 3 cas initialement négatifs par ED (Tab. 6).

Tableau 6. Comparaison des deux examens parasitologiques

Examen direct Culture	Positif	Négatif	Total
	Positif	10	3
Négatif	11	25	36
Total	21	28	49

Ainsi, nous avons calculé la valeur  $\chi^2$  :  $\chi^2 = 8.385$  et nous l'avons comparée à la valeur de  $\chi^2$  théorique  $\chi^2_{5\%} = 3.841$ . Cela montre un taux de positivité comparable entre ces deux techniques avec un risque d'erreur de 5% ( $p < 0.05$ ) et un degré de liberté (ddl) = (2-1) (2-1) = 1, refusant donc l'hypothèse  $H_0$  disant que « le taux de positivité de l'ED et celui de la culture sont incomparables ».

### II.3.2.2. Examens sérologiques

Ils n'ont pas été réalisés systématiquement pour tous les patients suspects de LC. Nous n'avons réalisé l'IFI que pour 22 patients et le WB pour 17 patients, selon la disponibilité des Kits commercialisés au sein du laboratoire.

L'IFI est revenue positive dans 27.27% des cas analysés, soit 6/22, par observation des formes promastigotes fluorescents vert résultant de la formation du complexe Antigène-Anticorps indiquant la présence d'anti-*Leishmania* dans le sérum des patients (Fig. 23).

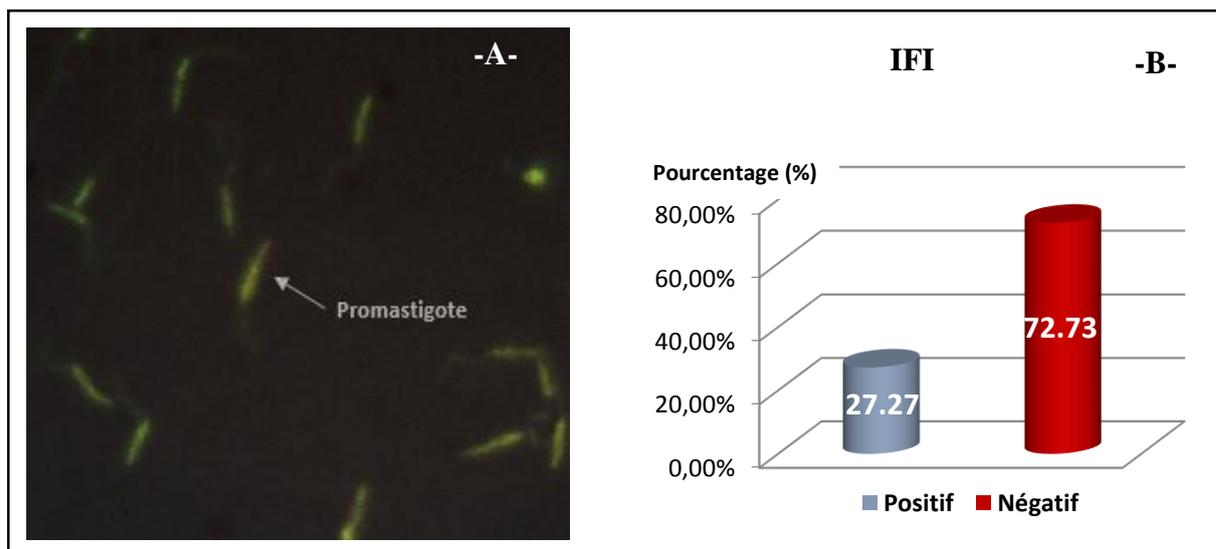


Figure 23. Résultats de l'IFI. A : Visualisation des formes promastigotes fluorescents sous microscope à fluorescence (photo personnelle, 2015). B : Taux de positivité de l'IFI.

Concernant les résultats du WB, ils se sont montrés positifs dans 70.59% des cas analysés, soit 12/17, par observation des deux bandes 14 kDa et/ou 16 kDa, spécifiques aux poids moléculaire des antigènes de *Leishmania* ce qui indique la présence d'anticorps anti-*Leishmania* dans le sérum de ces patients (Fig. 24).

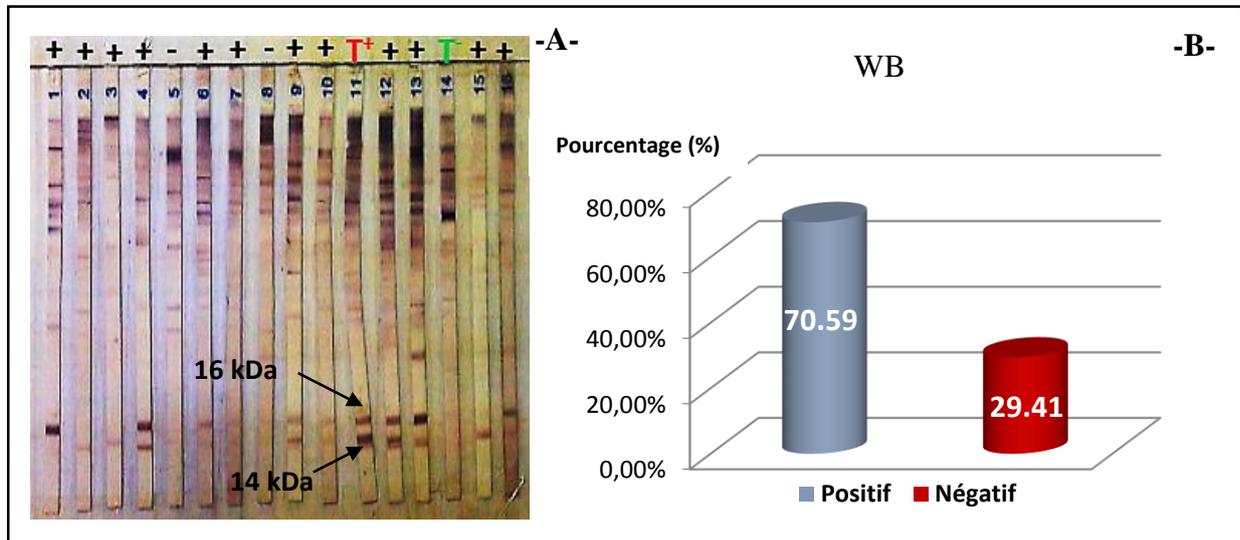


Figure 24. Résultats de WB. A : observation du profil de l'immunoblot avec présence de bandes 14kDa et 16 kDa spécifiques aux antigènes leishmaniens présents dans le sérum de malades. B : taux de positivité du WB.

Étant donné que l'effectif de patients sur lesquels nous avons réalisé l'IFI et le WB est inégal, nous n'avons pas pu établir le test de dépendance Khi-carré pour ces deux techniques, mais nous avons comparé chacune de ces techniques avec les examens parasitologiques.

L'IFI a corrigé 4 ED et 6 cultures initialement négatifs. Mais, l'ED a rendu positifs 4 cas négatifs en IFI, et la culture a corrigé 5 cas faussement négatifs en IFI (Tab. 7).

Les valeurs  $\chi^2$  : 0.152 et 2.426, calculées pour comparer l'IFI avec l'ED et avec la culture respectivement sont inférieures à celle de  $\chi^2_{5\%}$  théorique : 3.841, ce qui indique que le taux de positivité de cette technique est incomparable avec les examens parasitologiques.

Tableau 7. Comparaison des résultats de l'IFI avec les examens parasitologiques.

IFI	ED		Total	Culture		Total
	Positif	Négatif		Positif	Négatif	
Positif	2	4	6	0	6	6
Négatif	4	12	16	5	11	16
Total	6	16	22	5	17	22

Le WB a corrigé 7 ED et 8 cultures initialement négatifs. Par contre l'ED n'a corrigé aucun cas négatif en WB, tandis que la culture a corrigé 1 cas faussement négatif en WB (Tab. 8).

Les valeurs  $\chi^2$  : 2.951 et 0.302, calculées pour comparer le WB avec l'ED et avec la culture respectivement sont inférieures à celle de  $\chi^2_{5\%}$  théorique : 3.841, ce qui indique que le taux de positivité de cette technique est incomparable avec les examens parasitologiques.

Tableau 8. Comparaison des résultats du WB avec les examens parasitologiques.

WB	ED		Total	Culture		Total
	Positif	Négatif		Positif	Négatif	
Positif	5	7	12	4	8	12
Négatif	0	5	5	1	4	5
Total	5	12	17	5	12	17

### II.3.2.3. Résultats des analyses moléculaires

#### II.3.2.3.1. La détection de parasite *Leishmania* spp.

L'amplification de l'ADN leishmanien par PCR kinétoplastique (PCRk) été effectuée systématiquement pour tous les patients suspects de LC par à partir de sérosités et de sang total.

Dans cette étude, la PCRk utilisant les amorces 13A et 13B a révélé la présence de l'ADN de *Leishmania* spp. dans les prélèvements dermiques et/ ou sanguins de 89.79 % des cas, soit 44/49. Nous avons considéré une PCRk positive lors de l'apparition sur gel d'agarose de bandes fluorescentes d'un poids moléculaire de 120 pb qui correspond à la taille du fragment d'ADN kinétoplastique leishmanien amplifié (Fig. 25).

La PCRk lancée sur les sérosités a été positive dans 38 cas, corrigeant ainsi 13 cas initialement négatifs en PCRk lancée sur du sang total. Cette dernière est revenue positive dans 31 cas et a corrigé 6 cas faussement négatifs par PCRk lancée sur les sérosités (Tab. 9).

Le  $\chi^2$  : 0.464, calculé pour comparer entre ces deux paramètres s'est donné inférieur au  $\chi^2_{5\%}$  théorique : 3.841. Cela indique que le taux de positivité est incomparable entre ces deux méthodes

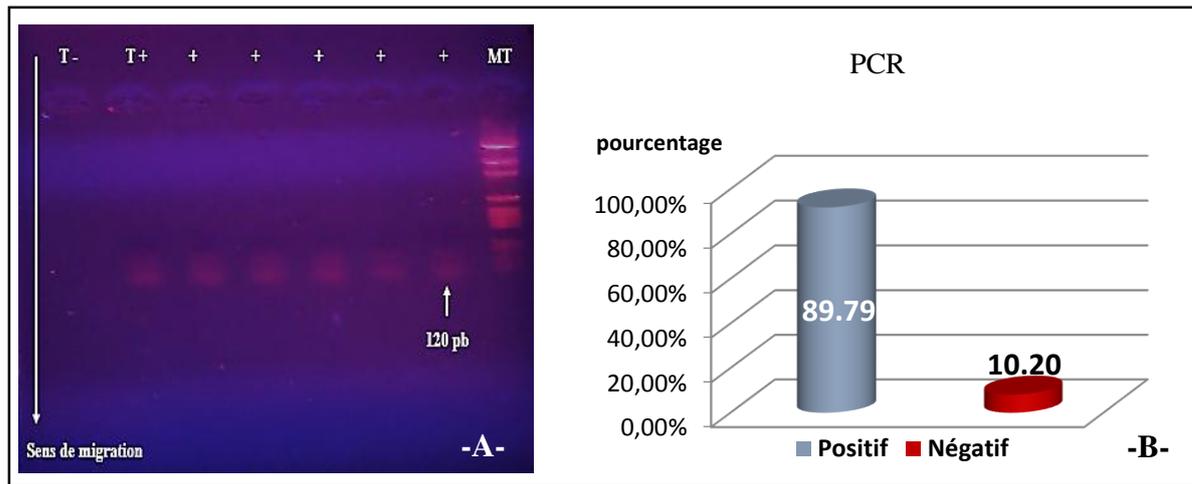


Figure 25. Résultats de la PCRk. A : électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR- 13A/13B (photo personnelle) : T- (témoin négatif), T+ (témoins positif), MT (marqueur de taille : 100 bp DNA Ladder; Invitrogen Life Technologies, Brazil) ; B : taux de positivité de la PCR.

Tableau 9. Comparaison des résultats de la PCRk lancée sur les sérosités et sur du sang.

PCR/sang \ PCR/sérosités	PCR/sang		Total
	Positif	Négatif	
Positif	25	13	38
Négatif	6	5	11
Total	31	18	49

Nous avons comparé les résultats de PCRk avec les techniques parasitologiques (l'examen direct et la culture) et sérologiques (l'IFI et le WB).

La PCR a corrigé 23 ED et 31 cultures initialement négatifs, tandis que ces derniers n'ont corrigé aucun cas faussement négatif.

La valeur de  $\chi^2$  : 4.176, calculée pour comparer la PCR avec l'ED est supérieure à celle de  $\chi^2_{25\%}$  théorique : 3.841, ce qui indique un taux de positivité comparable entre ces deux techniques. Cependant, la valeur de  $\chi^2$  : 2.011 calculée pour comparer la PCR avec la culture s'est donnée inférieure à celle de la valeur  $\chi^2_{25\%}$  théorique : 3.841, ce qui indique un taux de positivité incomparable entre ces deux techniques (Tab. 10).

La PCR a corrigé aussi 14 IFI et 4 WB initialement négatifs. Par contre, l'IFI n'a corrigé aucun cas faussement négatif en PCR. Concernant le WB, il a corrigé une seule PCR faussement négative.

Les de valeurs  $\chi^2$  : 0.825 et 0.026, calculées pour comparer la PCR avec l'IFI et le WB respectivement sont inférieures à celle de  $\chi^2_{25\%}$  théorique : 3.841, ce qui indique que le taux de

positivité de cette technique est incomparable entre la PCR et les techniques sérologiques (Tab. 11).

Tableau 10. Comparaison des résultats de la PCR avec les examens parasitologiques.

PCR <sub>k</sub>	ED		Total	Culture		Total
	Positif	Négatif		Positif	Négatif	
Positif	21	23	44	13	31	44
Négatif	0	5	5	0	5	5
Total	21	28	49	21	28	49

Tableau 11. Comparaison des résultats de la PCR avec les techniques sérologiques.

PCR <sub>k</sub>	IFI		Total	WB		Total
	Positif	Négatif		Positif	Négatif	
Positif	6	14	20	10	4	14
Négatif	0	2	2	2	1	3
Total	6	16	22	12	5	17

Enfin, nous avons calculé le pourcentage de sensibilité et la spécificité pour chacune des techniques utilisées dans le diagnostic de LC dans notre étude (Tab. 12). A travers les résultats présentés dans le tableau ci-dessous, nous constatons que le taux de sensibilité de la PCR (90%) est le plus élevé par rapport aux autres techniques en raison du faible nombre de cas de faux négatifs (FN). Quant au taux de la spécificité de la PCR, il est de l'ordre de 50%. Ce faible taux de spécificité par rapport aux autres techniques est dû au nombre élevé de faux positifs (FP).

Tableau 12. Sensibilité et spécificité des différentes techniques du diagnostic effectuées.

Technique	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
ED	40.64	100
Culture	31.77	100
IFI	25	100
WB	76.92	66.66
PCR	90	50

### II.3.2.3.2. L'identification des espèces de *Leishmania* en cause par ITS1-RFLP

La PCR-ITS1 a été effectuée seulement pour les ADNs extraits à partir de sérosités et présentant une PCRk positive. Sur les 38 prélèvements dermiques positifs en PCRk, nous avons réussi à amplifier l'ADN ribosomal (ITS1) de *Leishmania* spp. à partir de 65.78 %, soit 25 échantillons, en utilisant les amorces LITSR et L5.8S. Des bandes fluorescentes d'un poids moléculaire de 350 pb qui correspond à la taille du fragment d'ADN leishmanien amplifié ont été observées sur gel d'agarose à 2% sous UV (Fig. 26 A).

L'analyse de la digestion enzymatique des amplicons par ITS1-RFLP a révélé un profil de restriction pour tous les échantillons positifs en PCR-ITS1 (25/25).

Deux profils de restriction distincts ont été obtenus (Fig. 26 B), et ont permis l'identification de deux espèces de *Leishmania* spp. en cause : *L. major* dans 92% des échantillons, soit 23/25 et de *L. infantum* dans 8 % des échantillons, soit 2/25.

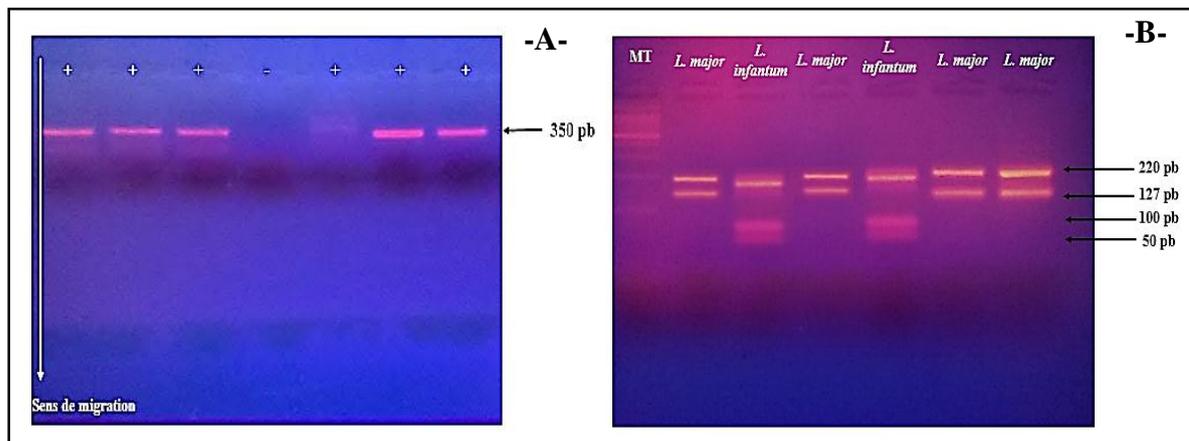


Figure 26. Résultats de la technique ITS1-RFLP (photos personnelles). A : Électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR-ITS1 ; B : Électrophorèse sur gel d'agarose à 3% des profils de polymorphisme des fragments de restriction par PCR-ITS1-RFLP. MT : marqueur de taille (100 bp DNA Ladder; Invitrogen Life Technologies, Brazil).

Selon la notion de la région de séjour des patients pour lesquels nous avons réussi à identifier l'espèce en cause, l'infection à *L. major* a été contractée dans la région de Biskra qui a regroupée 20 cas, M'sila, Djelfa et Guelma avec un cas chacune. Tandis que la LC à *L. infantum* a été identifiée chez deux patients qui ont séjournés à Tipaza (Tab. 13).

Tableau 13. Distribution des espèces identifiées par PCR-ITS1-RFLP selon la région de séjour.

		Origine de l'infection					Total
		Biskra	Guelma	M'sila/Biskra	Djelfa	Tipaza	
Espèces identifiées	<i>L. major</i>	20	1	1	1	0	23
	<i>L. infantum</i>	0	0	0	0	2	2
<b>Total</b>		20	1	1	1	2	25



Figure 27. Aspects de lésions des patients atteints de leishmaniose cutanée (Photos personnelles) ; Atteinte faciale (A, B et C), atteinte des membres supérieurs (D et E) et atteinte des membres inférieurs (F, G et H).

Tableau 14. Récapitulatif des résultats des données épidémiologique et des analyses biologiques des patients de LC.

Patients	Age (ans)	Sexe	Région	N. de lésions	Localisation	Evolution	ED	Culture	IFI	WB	PCRk / sérosité	PCRk / sang	PCR-ITS1	Espèce
1	22	M	Biskra	2	Jambe/main	45 jours	-	-	NF	+	-	-	-	NI
2	22	M	Biskra	2	Pied droit	45 jours	+	-	NF	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
3	22	M	Biskra	1	Visage	1 mois	+	-	NF	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
4	22	M	Biskra	1	Nuque	2 mois	+	+	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
5	20	M	Biskra	2	Main droite	3 mois	+	-	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
6	21	M	Biskra	1	Bras gauche	2 mois	+	-	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
7	21	M	Biskra	1	Pied	1 mois	+	-	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
8	24	M	Biskra	2	Main	15 jours	+	-	NF	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
9	23	M	Biskra	1	Jambe gauche	1 mois	+	+	NF	+	+	+	+	<i>L. major</i>
10	22	M	Biskra	1	Jambe gauche	1 mois	+	-	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
11	25	M	Biskra	1	Pied	1 mois	+	-	NF	+	+	+	+	<i>L. major</i>
12	21	M	Cherchell	4	Jambe D/G	21 jours	-	-	NF	-	-	-	-	NI
13	23	M	M'sila/Biskra	2	Jambe gauche	4mois	-	-	NF	+	+	+	+	<i>L. major</i>
14	21	M	Biskra	5	Jambe G/D	4 mois	-	-	NF	+	+	+	+	<i>L. major</i>
15	24	M	Tizi Ouzou	5	Visage	3 mois	-	-	NF	-	-	-	-	NI
16	42	M	Hassi Messoud	1	Nez	1 mois	-	+	NF	-	+	+	-	NI
17	20	M	Aflou	1	Jambe gauche	5 mois	-	-	NF	+	+	+	-	NI
18	51	F	Biskra	3	Multiple	3 mois	-	-	NF	+	+	+	+	<i>L. major</i>
19	22	M	Boussaâda	4	Pied gauche	3 mois	+	+	NF	NF	+	+	-	NI

<b>20</b>	25	M	Biskra	1	Main	2 mois	+	+	-	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
<b>21</b>	22	M	Biskra	1	Bras droit	9 jours	+	+	-	+	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>22</b>	23	M	Biskra	1	Jambe gauche	7 jours	+	-	-	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>23</b>	22	M	Laghouat	4	Bras droit	15 jours	-	+	-	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>24</b>	48	F	Biskra	1	visage	3 mois	-	-	-	NF	-	-	-	<b>NI</b>
<b>25</b>	27	M	Mila	2	Coude droit	20 jours	-	-	-	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>26</b>	22	M	Biskra	1	Coude droit	21 jours	+	+	-	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
<b>27</b>	22	M	Biskra	1	Mollet	10 jours	+	+	NF	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>28</b>	26	M	Biskra	1	Cheville gauche	15 jours	-	+	-	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>29</b>	25	M	Tbessa	1	Pied droit	3 mois	-	-	-	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>30</b>	45	M	Cherchell	1	Oreille gauche	3 mois	-	-	-	NF	-	+	-	<b>NI</b>
<b>31</b>	27	M	Biskra	4	Jambe gauche	3 mois	-	-	+	NF	-	+	-	<b>NI</b>
<b>32</b>	23	M	Guelma	1	Main droite	15 jours	+	+	NF	NF	+	+	+	<i>L. major</i>
<b>33</b>	23	M	Bouira	1	Jambe droite	6 mois	-	-	NF	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>34</b>	48	F	Tipaza/Cherchell	1	Joue gauche	5 mois	-	-	-	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
<b>35</b>	35	M	El oued	2	Cuire chevelu	20 jours	-	-	+	NF	-	+	-	<b>NI</b>
<b>36</b>	24	M	Biskra	2	Jambe droite	3 mois	-	-	-	NF	-	+	-	<b>NI</b>
<b>37</b>	22	M	Cherchell	2	Bras/ épaule	2 mois	+	+	NF	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
<b>38</b>	22	M	Biskra	2	Coude D/G	1 mois	-	-	+	-	+	+	-	<b>NI</b>
<b>39</b>	34	M	Bouira	1	Cheville gauche	5 mois	-	-	NF	-	+	+	-	<b>NI</b>
<b>40</b>	23	M	Cherchell/Biskra	1	Pied	7 jours	-	-	NF	NF	-	+	-	<b>NI</b>

<b>41</b>	32	M	Eucalyptus	1	Main	6 mois	-	-	NF	-	-	+	-	<b>NI</b>
<b>42</b>	37	M	Chleff	7	Pied G/D	2 mois	-	-	+	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>43</b>	28	M	Lakhdaria	2	Pied/ main	11 mois	-	-	-	NF	+	+	-	<b>NI</b>
<b>44</b>	31	M	Djelfa	4	Bras droit	1 mois	+	-	+	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>45</b>	30	M	Biskra	1	Pied	1 mois	+	-	+	NF	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>46</b>	28	F	Biskra	1	Joue	6 mois	-	-	-	NF	+	-	-	<b>NI</b>
<b>47</b>	61	F	Blida	1	Visage	9 mois	-	-	-	NF	+	-	-	<b>NI</b>
<b>48</b>	9 mois	M	Biskra	1	Joue gauche	40 jours	+	+	NF	+	+	-	+	<i>L. major</i>
<b>49</b>	22	M	Biskra	2	Pied gauche	6 mois	-	-	-	NF	-	-	-	<b>NI</b>
<b>Total=</b> <b>49</b>	/	/	/	/	/	/	21	13	6	11	38	32	25	<b>25</b>

M : masculin ; F : féminin ; N : Nombre ; G / D : Gauche et droite ; ED : Examen direct ; IFI : Immunofluorescence indirecte ; WB : Western Blot ; NF : Non fait ; NI : Non identifiée

## II.4. Discussion

La leishmaniose cutanée constitue un problème majeur de santé publique dans plusieurs pays. L'Algérie aussi n'est pas épargnée de la maladie. Avec 16 585 cas enregistrés en 2011 par l'Institut National de Santé Publique (INSP, 2014), l'Algérie fait partie des dix pays qui regroupent près de 75% de l'incidence mondiale de la leishmaniose cutanée (Alvar *et al*, 2012).

La LC touche les deux sexes et toutes les tranches d'âge. Cependant, notre étude fait apparaître que sur la totalité des patients positifs pour la LC, les hommes étaient dix fois plus touchés que les femmes avec un sexe ratio de 10 (40 hommes pour 4 femmes). Cela peut être expliqué par le fait que nos patients étaient tous des militaires professionnels dont le travail exige des déplacements dans des régions endémiques, des stages de performance avec des missions de ratissage et des embuscades nocturnes, ce qui les expose aux piqûres de phlébotomes. Cette constatation est en accord avec celle rapportée dans deux études similaires effectuées à un hôpital militaire au Maroc (Er-Rami *et al*, 2012 ; Djebbouri, 2013).

La LC présente généralement un caractère automnal avec des pics d'incidence entre octobre et janvier, ce qui correspond à la durée moyenne d'incubation du parasite qui prend généralement deux mois après la saison estivale où les piqûres de phlébotomes sont contractées (Izri *et al*, 2007 ; Zait *et al*, 2009). Cela est en concordance avec nos résultats, car nous avons constaté que les patients sont généralement orientés vers un diagnostic biologique 2 à 4 mois après la piqure d'insecte.

Dans notre étude, les lésions cutanées siégeaient généralement sur les parties découvertes du corps : membres inférieurs, supérieur et visage avec 48.97%, 28.57 % et 16.33 % des cas respectivement car dans la saison chaude les vêtements sont légers, amples et découverts, ce qui expose ces parties du corps aux piqûres de phlébotomes (Zait *et al*, 2009). La même observation a été faite par Er-Rami *et al*, 2012, qui rapportent une atteinte de 92% des membres inférieurs et/ou supérieurs et une atteinte faciale de 20%.

Le nombre, le délai d'apparition et le siège des lésions rapportés dans notre étude semblent à être classiques et similaires à de nombreuses études antérieures (Belazzoug *et al*, 1985 ; Abdelouahab *et al*, 2007 ; Dedet, 2009).

Le diagnostic présomptif basé sur les caractères cliniques et épidémiologiques est insuffisant pour justifier un traitement approprié car ces symptomatologies sont évoquées par plusieurs autres maladies de peau (Gomes *et al*, 2008 ; Talia *et al*, 2008 ).

Le diagnostic biologique des leishmanioses repose donc essentiellement sur les techniques parasitologiques ainsi que la détection des anticorps circulants. Les progrès actuels en biologie moléculaire proposent la détection d'ADN par PCR comme une alternative rapide et efficace

pour le diagnostic des leishmanioses ainsi que l'identification des espèces de *Leishmania* en cause (Marty, 2007).

Les méthodes parasitologiques (examen direct et culture), bien qu'elles présentent une grande spécificité qui atteint les 100%, comme cela est rapporté dans notre étude ainsi que dans d'autres similaires (Shahbazi *et al*, 2008 ; Troncarelli *et al*, 2009 ; Mouttaki *et al*, 2014), elles comportent aussi plusieurs limitations en ce qui concerne leur taux de positivité et de sensibilité (Mouttaki *et al*, 2014).

Dans notre étude, l'examen direct présente un taux de positivité de 42.86 %, proche de celui rapporté dans des études effectuées en Tunisie, Algérie et au Mali, qui varie entre 38.13 %, 42% et 65 % respectivement (Mihoubi *et al*, 2006 ; Neffati *et al*, 2009 ; Kone *et al*, 2011). Quant à sa sensibilité, elle est de l'ordre de 40.64 % dans notre étude, mais elle reste très variable selon les autres études, allant de 17 % à 83 % (Mouttaki *et al*, 2014).

Concernant la culture, elle a présenté un taux de positivité et de sensibilité de 26.53 % et 31.77 % respectivement, nos résultats sont similaires à ceux présentés dans plusieurs études rapportant une sensibilité allant de 27 % à 85 % (Aviles *et al*, 1999 ; Matsumoto *et al*, 1999 ; Chargui *et al*, 2005 ; Khademvatan *et al*, 2012 ; Mouttaki *et al*, 2014).

Cette faible performance des techniques parasitologiques pourrait être due à la charge parasitaire faible et à la distribution irrégulière des amastigotes dans les lésions. Le prélèvement cutané doit s'effectuer sur la lésion la plus récente dans le cas des lésions multiples. La charge parasitaire peut être aussi influencée par l'évolution des lésions car le nombre de parasites a tendance à diminuer dans le cas de leishmaniose cutanée chronique (Reithinger & Dujardin, 2007 ; Troncarelli *et al*, 2009). De plus, l'expertise technique du biologiste et la contamination microbiologique et fongique des milieux de culture ainsi que la difficulté d'isoler certaines espèces exigeantes de *Leishmania* (ex. *L. infantum*) peuvent également avoir un impact négatif sur la sensibilité (Aoun *et al*, 1999 ; Sahabazi *et al*, 2008 ; Ampuero J. *et al*, 2009).

Pour toutes ces raisons, la forte spécificité de l'ED et de la culture est d'une importance minime, en particulier dans les zones d'endémie (Mouttaki *et al*, 2014).

Les techniques sérologiques viennent généralement consolider les techniques parasitologiques.

L'IFI est considérée comme l'outil standard pour le diagnostic biologique de la leishmaniose viscérale. Elle est majoritairement non contributive dans le diagnostic des formes cutanées et cela se confirme dans notre étude par un taux de positivité et de sensibilité faible (27.27% et 25 % respectivement). Ces taux sont relativement comparables à ceux rapportés par Kone *et al* en 2007 avec 17% de positivité et de sensibilité. En ce qui concerne sa spécificité, elle est de

100% dans notre étude, semblable aux données de la littérature qui rapportent une spécificité de 99% et 100% (Marty *et al*, 2007 et Camargo *et al*, 2010).

La fiabilité de cette technique est limitée par plusieurs facteurs. Elle se caractérise par un titre élevé de réactions croisées responsables de faux positifs, ce qui engendre des difficultés d'interprétation des résultats (Marty P. *et al*, 2007 ; Rodrigues *et al*, 2002). De plus l'état de compétence immunitaire des patients (corticothérapie, immunodéprimé) et le stade précoce de la maladie influence le taux d'AC sécrétés (Zougaghi *et al*, 2009 et Ben Ghazi, 2010).

En plus de ces inconvénients, la nature de l'AG utilisé, la réalisation pratique de la technique et la lecture subjective des résultats influencent considérablement la sensibilité de cette technique (Ferroglia *et al*, 2007 ; Maia & Campino, 2008).

L'IFI est de plus en plus supplantée par les techniques sérologiques automatisées telles que l'ELISA et le WB dont la spécificité et la sensibilité sont beaucoup plus élevées (Marty *et al*, 2007).

Dans notre étude, le WB a montré un taux de positivité de 70.59%. Cette positivité est en accord avec celle rapportée par Kone A.K. *et al* en 2011 avec 92% (11/12). Sa sensibilité était de 76.92%, ce qui est comparable aux résultats de Ferroglia *et al* en 2007 avec 90.9% de sensibilité.

Par contre sa spécificité de 66.66%, rapportée dans notre étude, ne s'accorde pas avec celle retrouvée dans les études précédentes qui ont rapporté une spécificité de 99% et 100% respectivement (Marty *et al*, 2007 ; Ferroglia *et al*, 2007).

La faible spécificité du WB est expliquée par sa grande capacité de détecter des titres très bas d'AC, ce qui engendre parfois une interprétation difficile d'un résultat positif ne représentant pas nécessairement une infection active et peut être due seulement à une infection ancienne ou à un contact antérieur avec les leishmanies (AC résiduels), notamment dans les régions endémiques (Biglino *et al*, 2010).

La PCR (*Polymérase Chain Reaction*), l'outil moléculaire le plus sensible pour la détection directe et la caractérisation de différents agents pathogènes, a été introduite avec succès dans le diagnostic des leishmanioses (Yehia *et al*, 2011).

Une recherche empirique dans la base de données Pub-Med a révélé que depuis 1989, plus de 700 articles sur le diagnostic par PCR des leishmanioses ont été publiés, dans lesquels une multitude de gènes cibles, protocoles et applications sont décrits, incluant des PCR permettant d'identifier le parasite au niveau du genre, de l'espèce et voire même au niveau de souche, allant de technologies de pointe jusqu'aux approches de haute technologie (Reithinger & Dujardin, 2007).

Le choix des amorces est un élément déterminant pour la PCR. Il doit tenir compte de nombreux paramètres afin de permettre une hybridation spécifique (Vassias, 2012). Pour notre étude et selon les données de la littérature, les amorces 13A et 13B dérivées de séquences d'ADNk et les amorces LITSR et L5.8S ciblant l'espace intergénique 1 de l'ADNr (ITS1) semblaient convenir mieux dans notre contexte épidémiologique.

Ces paires d'amorces ont montré une grande efficacité dans plusieurs études antérieures. Une meilleure valeur de  $10^{-4}$  parasites par réaction PCR en utilisant les mêmes amorces sur une dilution en série de *Leishmania* qui a été réalisé par ensemencement des promastigotes à partir la couche leucocytaire a été trouvée par Lachaud *et al* en 2002. De plus, une capacité de ces amorces à détecter un équivalent de 0.1 promastigotes par PCR à partir de cultures de prélèvements dermiques a été démontrée plus récemment par Mouttaki *et al* en 2014.

Quant à la PCR ITS1, les amorces LITSR et L5.8S ont montré une capacité de détecter une quantité d'ADN leishmanien équivalente à 0,2 parasites par PCR en utilisant du papier filtre taché de sang périphérique mélangé à des promastigotes de culture dans une étude menée par Schönian *et al* en 2003.

Dans notre étude, les résultats de PCRk sont revenus positifs dans 89.79 % des cas, soit 44/49. Ces résultats sont relativement comparables à ceux trouvés par Bensoussan E. *et al.* en 2006 et Pourmohammadi B. *et al.* en 2010, où des taux de positivité de 93,6% et 90.2% ont été rapportés respectivement ciblant la même région d'ADNk de *Leishmania*.

La sensibilité de 90 % de la PCRk était la plus élevée par rapport à toutes les autres techniques de diagnostic effectuées dans notre étude. Elle est similaire à celles rapportées dans la littérature qui varie entre 91% et 100 % (Bensoussan *et al.*, 2006 ; Pourmohammadi *et al.*, 2010 ; Azmi *et al.*, 2011 ; Mouttaki *et al.*, 2014).

Cette grande sensibilité conférée à la PCRk en utilisant les amorces 13 A et 13 B peut être expliquée d'une part par le nombre élevé de copies de l'ADNk cible (environ 10 000 copies) et d'autre part, par la petite taille des produits de PCR (120 pb) qui peut être amplifiée plus efficacement que les plus grands. Ainsi, la variation des taux de sensibilité rapportés est liée à plusieurs paramètres : la nature du matériel biologique, la méthode d'extraction d'ADN qui peut affecter la qualité de l'ADN et le protocole de d'amplification (Anders *et al.*, 2002 ; Reithinger R. *et al.*, 2007 ; Maia & Campino, 2008).

Quant à la spécificité de la PCRk par les amorces 13A et K13B, elle est de l'ordre de 50% dans notre série. Cette spécificité relativement faible est comparable à celle rapportée par Rodrigues *et al.* en 2002 et Mouttaki *et al* en 2014 avec 66.3% et 71 % respectivement. Ce taux moyen de spécificité peut être expliqué par la grande capacité de la PCRk de détecter des quantités minimales de parasites dans les échantillons ce qui peut engendrer parfois le risque de

faux positifs (Bensoussan *et al*, 2006). Toutefois, il est possible que les échantillons ne soient pas de faux positifs, mais plutôt des positifs qui contiennent très peu de parasites dûs à un contact ultérieur avec les leishmanies à l'occasion de portage asymptomatique (Bensoussan *et al*, 2006).

Enfin, dans cette étude, la PCRk utilisant les amorces 13 A et 13 B, a confirmé par sa grande sensibilité la faiblesse de toutes les autres techniques classiques et sérologiques testées. Elle semble donc être un outil très précieux pour le diagnostic de la LC en Algérie. Cependant elle a pour inconvénient son incapacité à différencier les espèces de *Leishmania* en cause.

Dans le contexte de notre étude, l'identification des espèces est importante d'une part parce que les trois espèces responsables de la maladie en Algérie peuvent coexister dans les zones d'endémies, et d'autre part pour des fins thérapeutiques et épidémiologiques. Ce dernier point est important pour concevoir des stratégies de contrôle appropriées. La PCR ITS1 combinée à l'analyse des fragments de restriction enzymatique (ITS1-RFLP) possède l'avantage supplémentaire de pouvoir distinguer entre les espèces (Mouttaki *et al*, 2014).

Ainsi, la PCR-ITS1 a été positive dans 25 sur les 38 échantillons de sérosités précédemment positifs par PCRk. Le nombre de copies du gène de *Leishmania* amplifié peut probablement expliquer cette différence de positivité puisque ce critère a déjà été montré comme crucial pour de meilleurs résultats d'amplification, en particulier lorsque la quantité d'ADN est minime (Schonian *et al*, 2003).

L'analyse de l'ITS1-RFLP a généré des profils discriminants distincts pour la totalité des échantillons et a donc permis d'identifier *L. major* chez 23 patients qui ont séjourné dans les Wilayas de Biskra (20 cas), M'sila, Djelfa et Guelma (1 cas chacune) et *L. infantum* chez deux patients qui ont séjourné à Tipaza.

Ces résultats sont en concordance avec la distribution géographique de ces deux espèces en Algérie. Dans cette étude, les cas où l'identification de *L. major* a été effectuée provenaient des provinces du centre, Centre-Est et Nord-est de pays, confirmant ainsi la propagation de la forme de LC due à cette espèce dans le nord de l'Algérie, comme décrit précédemment par la technique MLEE (Boudrissa *et al*, 2012). Tandis que la LC à *L. infantum* connaît toujours une distribution sporadique au Nord du pays ce qui est en accord avec les résultats rapportés dans notre étude ainsi que dans une étude récente où cette espèce a été identifiée par amplification et séquençage du gène de la topoisomérase II à partir de lames de frottis cutanée colorées de Giemsa appartenant à des patients positifs pour la LC dans la région de Tipaza située au nord-centre de l'Algérie (Izri *et al*, 2014).

## II.5. conclusion et perspectives

Les analyses basées sur la PCR (PCRk, PCR-ITS1-RFLP) utilisées dans notre étude ont augmenté la sensibilité et la rapidité du diagnostic de leishmaniose cutanée ainsi que la caractérisation des espèces responsables par rapport aux techniques conventionnelles.

La PCRk utilisant les amorces 13A et 13B peut être recommandée dans des foyers bien connus et dans des présentations cliniques habituelles.

Dans le contexte épidémiologique algérien, nous avons montré que nous ne pouvons pas nous baser sur les données cliniques et éco-épidémiologiques pour l'identification des espèces de *Leishmania* en cause, surtout au gré des changements climatiques qui affectent probablement l'écologie et le comportement des vecteurs et des réservoirs, influençant ainsi la distribution géographique des espèces de *Leishmania* causant la maladie. Nous suggérons donc l'utilisation de l'analyse PCR-RFLP ITS1 pour le diagnostic et l'identification simultanée de l'espèce.

Cependant, en Algérie, ces techniques ne trouvent pas encore leur place dans le diagnostic des leishmanioses. Les protocoles de la PCR ont encore besoin de standardisation et d'optimisation.

En outre, les approches moléculaires restent coûteuses et nécessitent une expertise technologique, en particulier dans les zones endémique avec des sources financières limitées. Ainsi, en l'absence de la PCR, nous recommandons que l'examen microscopique et la culture soient utilisés ensemble pour le diagnostic de la LC ; les échantillons négatifs doivent être soumis à un diagnostic par PCR chaque fois que cela est possible, surtout lorsqu'ils sont associés à une présentation clinique évocatrice, ou à la possibilité d'infection par une espèce viscérotrope (ex. *L. infantum*), et lorsque d'autres pathologies cutanées sont exclues.

---

---

## **Chapitre III**

# **Contribution à la surveillance des phlébotomes dans un foyer hypoendémique de leishmanioses**

---

---

### III.1. problématique et objectifs de l'étude

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle. Le parasite *Leishmania* circule entre les mammifères (sauvages et domestiques) par l'intermédiaire de phlébotomes femelles. Les humains font partie de ce cycle en tant qu'hôtes accidentels lors de la recherche de l'insecte pour une source de repas sanguin (Pace, 2014).

En Algérie, les enquêtes antérieures ont permis d'identifier les cycles épidémiologiques responsables de ces affections. A ce jour, trois espèces de *Leishmania* et cinq espèces de phlébotomes sont impliquées dans le maintien de la maladie dans le pays, faisant intervenir les rongeur et les canidés comme réservoirs potentiels de l'infection (Eddaikra *et al*, 2013).

Cependant, au gré des changements climatiques, de l'urbanisation et des mauvaises conditions d'hygiène du milieu favorisant la pullulation des phlébotomes vecteurs, ces affections connaissent un bouleversement depuis une vingtaine d'années.

Les enquêtes entomo-épidémiologiques sont toujours cruciales pour mieux comprendre l'endémicité des foyers de leishmaniose et déterminer la relation entre pathogène-hôte-vecteur impliqués dans le cycle de transmission de la maladie (González *et al*, 2017).

De plus, l'identification de l'origine du repas sanguin des phlébotomes et l'évaluation de leur statut infectieux par le parasite *Leishmania* dans les zones endémiques est d'une grande importance. En effet, de telles études permettront de déterminer les réservoirs potentiels ainsi que les préférences trophiques des vecteurs (Alcover *et al*, 2012).

La nécessité d'actualiser ces données par des enquêtes épidémiologiques et entomologiques, ainsi que l'introduction d'outils moléculaires innovants permettront d'avoir une vue d'ensemble sur la dynamique de transmission des leishmanioses de manière précise, efficace et rapide, et par conséquent l'établissement d'un programme de contrôle plus approprié.

A cette fin, une enquête entomo-épidémiologique a été menée, par une étude sur le terrain, dans un nouveau foyer hypoendémique de LH à Tipaza, du nord de l'Algérie. Surtout que dans cette wilaya, des cas de LCH due à *L.killicki* et *L. infantum* ont été rapportés dans une étude récente menée par Izri *et al* en 2014. En outre, la LC due a *L. infantum* a été aussi rapportée dans la région dans notre première étude (voir chapitre II).

Cette étude avait pour objectifs : d'étudier la faune des espèces de phlébotomes, de déterminer leur taux d'infection par *Leishmania* et de préciser l'origine de leur repas sanguin pour pouvoir identifier les réservoirs potentiels et les préférences trophiques de ces insectes afin d'établir un programme de contrôle fiable contre la LH dans la région.

## III.2. Matériels et méthodes

### III.2.1. Déclaration d'éthique

Un consentement verbal a été obtenu auprès des propriétaires des zones privées ou résidentielles où la collecte des phlébotomes a été effectuée pour notre étude.

### III.2.2. Présentation de la zone d'étude

#### III.2.2.1. Choix de la zone d'étude

Notre enquête entomologique a été menée par une collecte de phlébotomes dans quatre localités périurbaines : Bourkika, Bouyerssane, Sidi Boufadhel et Hadjout, situées dans la province de Tipaza au nord de l'Algérie (36 ° 52 '00 "N, 6 ° 54' 00" E).

Le choix de la zone d'étude a été fait en se basant sur les données épidémiologiques sur la leishmaniose humaine fournies par la Direction de la Santé Publique (DSP) de la province de Tipaza en 2014 (Fig. 28).

Des cas de LH ont été enregistrés entre 2001 et 2014 par la DSP, avec 305 cas de LC et 32 cas de LV. Les sites de collecte ont été sélectionnés en fonction des informations fournies par la DSP de la Wilaya sur les adresses des patients.

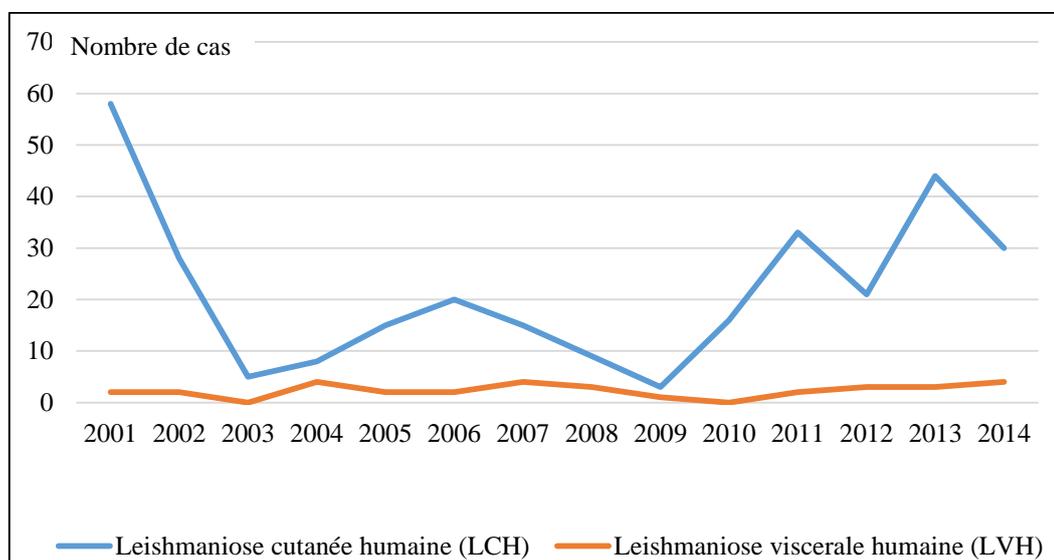


Figure 28. Nombre des cas de LH dans la région de Tipaza, Nord d'Algérie entre 2001 et 2014 (DSP., 2014).

#### III.2.2.2. Caractéristiques de la zone d'étude

La région de Tipaza comprend des montagnes, des collines et des plaines. Son climat est typiquement méditerranéen avec une pluviométrie annuelle de 600 mm, tandis que la température oscille entre 33 ° C en été et 5 ° C en hiver (Données de DSP Tipaza). Les caractéristiques du sol, adéquates pour l'agriculture traditionnelle, et les conditions de vie socio-

économiques des sites où la collecte a été effectuée, qui sont péri-urbaines à rurales, rendent la zone propice au développement des phlébotomes. La présence d'animaux péri-domestiques (chiens et rongeurs) qui sont les principaux réservoirs de *Leishmania* spp. est également notable (Fig. 29).

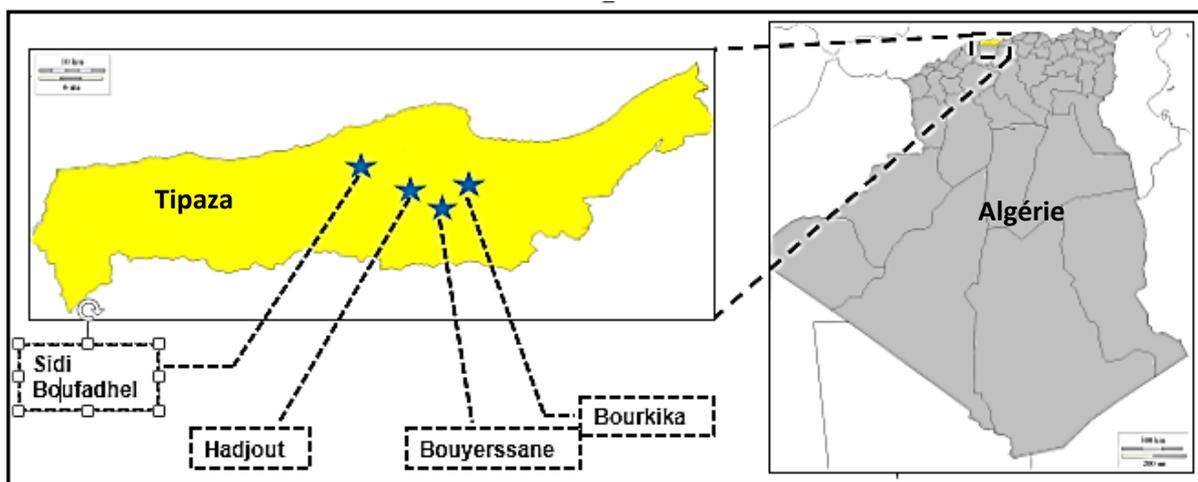


Figure 29. Site de collecte des phlébotomes dans la région de Tipaza, Nord d'Algérie.

### III.2.3. Capture et conservation des phlébotomes

Les phlébotomes ont été collectés dans chaque site, à l'aide de pièges lumineux CDC (*miniature light trap1*, John W. Hock Co., Gainesville, Floride, USA), deux fois par semaine, sur une période allant de juillet à octobre 2015, à l'intérieur et autour des habitations humaines et des abris des animaux.

Cette méthode est adaptée à la capture des espèces photophiles car les phlébotomes sont plus souvent attirés par les lumières de faible intensité ainsi que par les UV, ce qui est en accord avec leur activité crépusculaire et nocturne. Les pièges lumineux de type CDC donnent de bons résultats à condition de remplacer les cages de recueil par des paniers à mailles fines adaptées à la petite taille des phlébotomes.

Les pièges ont été installés avant le coucher du soleil et restent fonctionnels toute la nuit jusqu'au lendemain matin, la cage est détachée et soigneusement fermée en prenant soin d'éviter la fuite des insectes pièges. La partie supérieure est refermée et mise au congélateur pendant une vingtaine de minutes afin d'immobiliser les phlébotomes.

Immédiatement après la sortie du congélateur, la cage est ouverte et les phlébotomes sont recueillis à l'aide d'un pinceau. Le repérage des phlébotomes à l'intérieur de la cage est assez délicat, d'une part ceux-ci s'y trouvent mélangés à de nombreux autres insectes et d'autre part ils redeviennent actifs après quelques minutes à température ambiante ce qui impose de les remettre au congélateur.

Finalement, les mâles, les femelles gorgées et les femelles non gorgées ont été triés et transférés dans des flacons de 3 mL (environ 30 spécimens chacun) contenant de l'éthanol à 70% jusqu'à l'identification morphologique (Fig .30).



Figure 30. Les différentes étapes de piégeage des phlébotomes (Photos personnelles).

### **III.2.4. Identification morphologique des phlébotomes**

Un traitement préalable des spécimens est obligatoire avant de procéder à l'identification taxonomique des espèces (Fig. 31).

Les phlébotomes préalablement conservés dans des tubes contenant de l'alcool à 70% sont tout d'abord versés dans une coupelle de cristal munie d'un couvercle. Ensuite, tous les spécimens sont montés individuellement sur une lame en verre, et disséqués en séparant la tête et le troisième segment postérieur de l'abdomen du reste du corps, en utilisant des micro-aiguilles stériles. Ces parties du corps des phlébotomes constituent les éléments décisifs pour leur diagnose (les organes génitaux, dents du pharynx et cibarium). Le reste du corps a été conservé à -20 ° C pour une analyse moléculaire ultérieure (Lafri et al, 2015).

Les éléments disséqués sont éclaircis directement dans quelques gouttes de la solution de Marc-André entre lame et lamelle, par chauffage à la flamme d'un briquet pendant quelques secondes pour un montage rapide.

Les spécimens que nous avons souhaité conserver à long terme dans la collection du laboratoire ont été placés dans une solution de Marc-André pendant 15 min à 37°C, avant d'être

montés extemporanément entre lame et lamelle dans une goutte de gomme au chloral (Lafri et al, 2015).

Enfin, l'observation microscopique des éléments nécessaires pour l'identification des espèces de phlébotomes a été réalisée sous un stéréomicroscope (Microscope stéréoscopique Axio Zoom.V16, Allemagne).

L'identification taxonomique des espèces de phlébotomes a été réalisée sur la base des critères morphologiques des organes génitaux des mâles, des spermathèques des femelles et des critères des dents du pharynx et cibarium pour la différenciation entre les deux genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia*, comme décrits par Abonnenc *et al*, 1972 et Dedet *et al*, 1984.

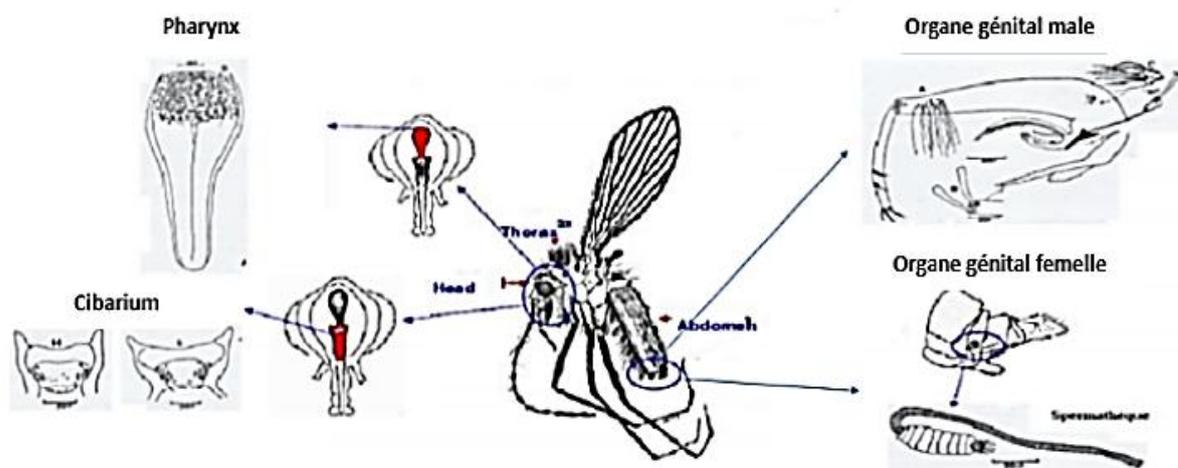


Figure 31. les différentes étapes d'identification morphologique des phlébotomes (Photos personnelles, 2016).

### **III.2.5. Surveillance moléculaire des phlébotomes**

#### **III.2.5.1. Extraction d'ADN**

L'ADN génomique total a été extrait individuellement à partir de la partie restante de chaque spécimen de phlébotome par digestion pendant une nuit à 56 ° C dans 180 µl de tampon de lyse G2 et 20 µl de protéinase K. L'ADN est ensuite élué dans 100 µl de tampon Tris EDTA. L'extraction a été réalisée avec l'automate : EZ1 (QIAGEN-BioRobot EZ1 ®, Tokyo, Japon), et en utilisant le kit EZ1 DNA Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du

fabricant. L'ADN a été stocké à -20 ° C dans des conditions stériles jusqu'à l'analyse moléculaire.

### **III.2.5.2. Amplification d'ADN de *Leishmania* spp. par qPCR chez les phlébotomes**

Pour cette enquête épidémiologique, nous avons mené par l'outil moléculaire une investigation de la présence de parasite *Leishmania* chez les phlébotomes collectés dans un seul site : Bourkika.

Nous nous sommes intéressé à évaluer le taux d'infection par *Leishmania* dans les phlébotomes collectés à Bourkika car quatre cas de leishmaniose viscérale ont été rapportés dans ce site en 2014. Dans la mesure du suivi des facteurs de risque pouvant favoriser la propagation de la maladie, nous avons choisi de prospecter l'état épidémiologique de l'infection dans la région.

Un nombre significatif de femelles de phlébotomes non gorgées (284 spécimens) et de femelles gorgées de sang (456 spécimens) a été sélectionné au hasard et soumis à l'analyse moléculaire par qPCR pour la détection de la présence d'ADN de *Leishmania* spp.

Les ADNs de ces phlébotomes ont été organisés dans 81 pools monospécifiques (environ neufs spécimens par pool ; 10 µl d'ADN de chaque spécimens), afin d'étudier la présence de *Leishmania* spp. par qPCR en utilisant des amorces et des sondes spécifiques au genre ciblant le gène 18S de l'ARNr de *Leishmania* comme décrit par Hamad *et al* en 2015.

Pour identifier les espèces de *Leishmania* à partir des pools positifs en qPCR-18S, une deuxième qPCR utilisant des amorces et des sondes spécifiques à l'espèce ciblant le gène kinetoplastique de *L. infantum* a été réalisée comme décrit par Mary *et al* en 2004.

Finalement, les ADN des phlébotomes groupés dans chaque pool positif ont été analysés individuellement pour déterminer le nombre d'échantillons positifs dans chaque pool et afin de confirmer les espèces parasites en utilisant les mêmes amorces et sondes citées précédemment.

Les réactions de qPCR ont été réalisées avec du Master mix (Taqyon Master Mix, Eurogentec, Liège, Belgique) dans des plaques de PCR à 96 puits selon les instructions du fabricant, puis analysées dans les thermocycleurs CFX96 Real-Time (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Chaque série d'amplification contenait des contrôles positifs pour tester les conditions spécifiques des réactifs (ADN extrait des promastigotes de *L. infantum*) et des témoins négatifs (eau exempte d'ADN) pour détecter toute contamination possible pendant la préparation du mélange. Les échantillons avec un seuil de cycle de positivité inférieur à 35 ont été considérés comme positifs.

### **III.2.5.3. Identification de la source du repas sanguin**

Afin d'identifier les sources du repas sanguin des phlébotomes collectés sur le terrain, une amplification par PCR standard et séquençage de l'ADN des vertébrés sur lesquels ils se sont gorgés a été réalisée. Des amorces ciblant le gène du cytochrome c oxydase I (COI) des vertébrés ont été utilisées comme décrit par Townzen *et al* en 2008.

L'ADN de 88 spécimens de femelles de phlébotomes totalement ou partiellement engorgées a été sélectionné au hasard à partir de l'ensemble des espèces morphologiquement identifiées : *P. perniciosus* (42 spécimens), *P. longicuspis* (28 spécimens), *P. perfiliewi* (17 spécimens) et *S. minuta* (1 spécimens).

La réaction de PCR a été réalisée dans le thermocycleur Peltier PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). Après amplification, les produits issus de la PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% pour visualisation des résultats.

Afin d'effectuer le séquençage par la méthode de Sanger, les produits de PCR ont été tout d'abord purifiés par filtration et aspiration en utilisant les plaques PCR NucleoFast 96 (Macherey Nagel EURL, Hoerdt, France) en suivant les instructions du fabricant.

Ensuite, les ADN purifiés ont été soumis à une réaction Big Dye en utilisant le kit BigDye Terminator de séquençage d'ADN (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City) selon les instructions du fabricant puis analysés à l'aide de séquenceur génétique Applied Biosystems ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific, France).

Enfin, Les électrophérogrammes obtenus ont été assemblés et édités en utilisant le logiciel ChromasPro (ChromasPro 1.7.1, Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australie) et comparés à ceux disponibles dans la base de données GenBank par NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **III.2.5.4. Identification moléculaire des espèces de phlébotomes**

Pour confirmer l'identification morphologique des espèces de phlébotomes femelles qui sont revenues positives pour l'ADN de *Leishmania*, une amplification par PCR standard et un séquençage de l'ADN ont été réalisés en utilisant des amorces ciblant le gène du cytochrome-b des phlébotomes, comme décrit par Depaquit *et al* en 2005. Les séquences obtenues ont été analysées comme mentionné ci-dessus et ensuite comparées avec les séquences de phlébotomes disponibles sur GenBank.

Les séquences d'amorces et de sondes ainsi que les conditions de réaction et les programmes utilisés dans notre investigation moléculaire sont détaillés dans le tableau 15.

### **III.2.6. Analyse statistique des données**

Une analyse statistique a été également effectuée afin d'estimer la prévalence (P) de l'infection parasitaire chez les femelles de phlébotomes testées dans cette étude. C'est-à-dire le rapport en pourcentage du nombre de femelles infectées (N) sur le nombre des femelles testées (H).

$$P (\%) = (N/H) \times 100$$

En outre, l'abondance de chaque espèce de phlébotomes par rapport au nombre total collecté a été également calculée.

Tableau 15. Séquences d'amorces et sondes et conditions principales des PCRs utilisées.

L'ADN cible	Nom des amorces	Séquence d'amorces (5'- 3') et sondes	Conditions d'amplification	Conditions de réaction PCR	Références
<b>Le gène 18S de l'ARNr de <i>Leishmania</i> spp.*</b>	Leish_F Leish_R Leish_S	ACAAGTGCTTTCCCATCG CCTAGAGGCCGTGAGTTG FAM- CGGTTCGGTGTGTGGCGCC-TAMRA	95°C pendant 15 minutes, 95°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 60 secondes, 60°C pendant 60 secondes, (40 Cycles)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix Roche : 10µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 3µl</li> <li>• Amorçe F : 0.5µl</li> <li>• Amorçe R : 0.5µl</li> <li>• Sonde S1 : 0.5 µl</li> <li>• Enzyme UDG : 0.5µl</li> </ul>	Hamad et al., 2015
<b>le gène kinetoplastic de <i>L. infantum</i>*</b>	Leishk_F Leishk_R Leishk_S	CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA FAM-TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC-TAMRA	95 ° C pendant 10 minutes, 95 ° C pendant 10 secondes, 54 ° C pendant 30 secondes, 72 ° C pendant 10 secondes (30 cycles)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix Roche : 10µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 3µl</li> <li>• Amorçe F : 0.5µl</li> <li>• Amorçe R : 0.5µl</li> <li>• Sonde S : 0.5 µl</li> <li>• Enzyme UDG : 0.5µl</li> </ul>	Mary et al., 2004
<b>le gène du cytochrome c oxydase I (COI) des vertébrés **</b>	vCOI_longF vCOI_longR	AAGAATCAGAATARGTGTTG AACCACAAAGACATTGGCAC	95° C pendant 15 minutes, 95° C pendant 1 minute, 40° C pendant 30 seconde, 72 °C pendant 1 minute, 72 °C pendant 5 minutes (39 cycles) <b>Conservation: 4°C à +∞</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix ATG : 25µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 18µl</li> <li>• Amorçe F : 1µl</li> <li>• Amorçe R : 1µl</li> </ul>	Townzen et al., 2008
<b>le gène du cytochrome-b des phlébotomes **</b>	Phleb_CytB-F Phleb_CytB-R	GGAGGAGTAATTGCHCTWGTHAT AGATATTTACCTKCWTCTTTRTGTTT	95° C pendant 15 minutes, 95° C pendant 1 minute, 45° C pendant 30 seconde, 72 °C pendant 1 minute, 72 °C pendant 5 minutes (39 cycles) <b>Conservation: 4 °C à +∞</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix ATG : 25µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 18µl</li> <li>• Amorçe F : 1µl</li> <li>• Amorçe R : 1µl</li> </ul>	Depaquit et al., 2005

\* : PCR quantitative (qPCR) ; \*\* : PCR standard ; **Mix Roche** : mélange réactionnel de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> et Taq-polymérase pour la qPCR ; **Mix ATG** : Ampli-Taq Gold, mélange réactionnel de dNTPs, MgCl<sub>2</sub> et Taq-polymérase\_HotStarTaq pour la PCR standard ; **H<sub>2</sub>O** : eau stérile exempte de DNase ; **Amorçe F** : sens (*Forward*) ; **Amorçe R** : anti-sens (*Reverse*), **S** : Sonde fluorescente (Probe).

### III.3. Résultats

#### III.3.1. La composition de la faune de phlébotomes dans la province de Tipaza

Les phlébotomes ont été présents dans les quatre sites prospectés. Un total de 4045 phlébotomes a été collecté entre Juillet et Octobre 2015, durant leur saison d'activité. Ils étaient plus abondants dans les deux sites de Bourkika et Bouyeghssane avec 1874 et 1406 spécimens respectivement.

La collecte des phlébotomes a présenté deux pics d'abondance en juillet avec 1267 spécimens, soit 31,32% et en septembre avec 1322, soit 32,68% (Fig. 32).

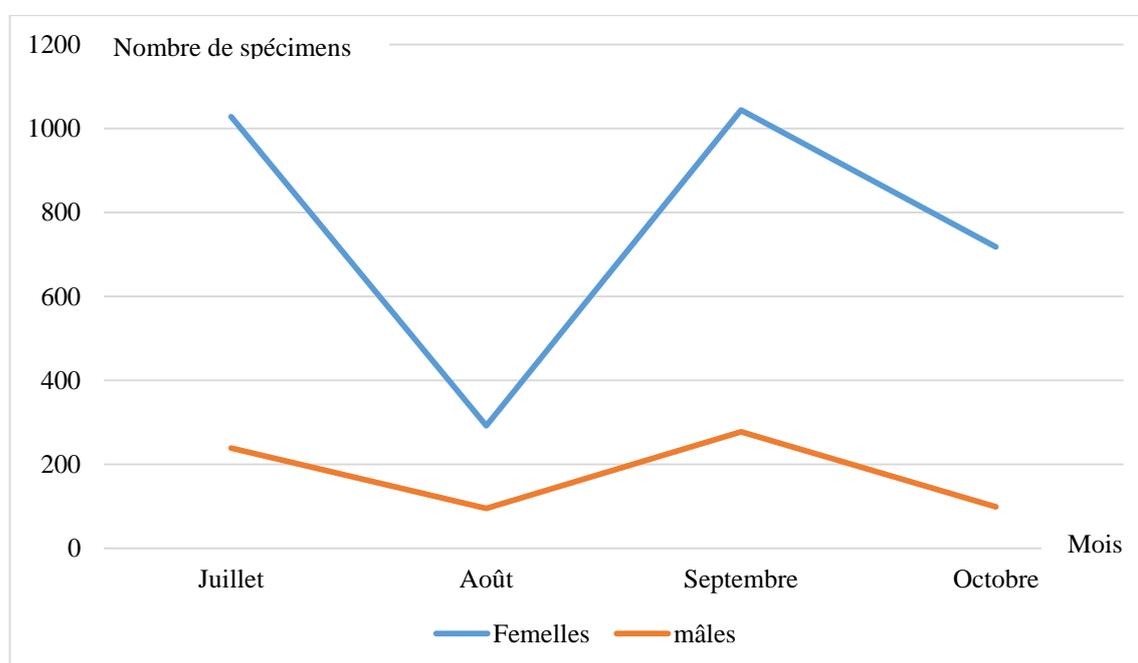


Figure 32. nombre de spécimens de phlébotomes collectés par mois par pièges lumineux CDC en 2015.

Au cours de notre enquête entomologique, nous avons réussi à identifier morphologiquement au niveau de l'espèce 3727 phlébotomes, soit 92,13%. La collecte était composée de femelles non gorgées avec 2306, soit 61,87% ; de femelles totalement ou partiellement gorgées de sang avec 716, soit 19,21% et de mâles avec 705, soit 18,91%. Une prédominance de femelles par rapport aux mâles a donc été notée avec une sexe-ratio de 0,23.

Selon les résultats de l'identification taxonomique, la faune de phlébotomes dans les sites prospectés était composée de sept espèces dont six appartenaient au genre *Phlebotomus* et une au genre *Sergentomyia* (Tab. 15 ; Fig. 33).

Au sein du genre *Phlebotomus*, cinq espèces appartenaient au sous-genre *Larrousius* représentées par *P. (L.) perniciosus* avec 1874 spécimens, soit 50,28% ; suivi de *P. (L.)*

*perfiliewi* avec 974 spécimens, soit 26,13% ; *P. (L.) longicuspis* avec 817 spécimens, soit 21,92% ; *P. (L.) langeroni* avec 12 spécimens, soit 0,32% et *P. (L.) ariasi* avec 2 spécimens, soit 0,05%.

Au sein du même genre, *Phlebotomus*, une seule espèce appartenant au sous-genre *Phlebotomus* a été présente : *P. (P.) papatasi* avec 16 spécimens, soit 0,42%.

Enfin, le genre *Sergentomyia* a été représenté dans notre collecte par une seule espèce, *Sergentomyia (S.) minuta*, avec 32 spécimens, soit 0,85%.

*P. (L.) perniciosus* était ubiquiste dans les quatre localités surveillées et était l'espèce prédominante dans les localités de Bourkika avec 1495 spécimens, soit 79,7% et de Sidi Boufadhel avec 62, soit 50%. Alors que *P. (L.) perfiliewi* était l'espèce la plus répandue à Bouyersane avec 764, soit 54,33% et El Hadjout avec 121, soit 37,46%.

Tableau 16. abondance des espèces de phlébotomes par sites dans la région de Tipaza

Espèces	Phlébotomes collectés par site dans la region de Tipaza, n										Pourcentage , n (%)
	Bourkika		Bouyersane		Hadjout		Sidi boufadhel		Total		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>P. (L.) perniciosus</i>	282	1213	54	176	6	81	13	49	355	1519	<b>1874 (50.28%)</b>
<i>P. (L.) longicuspis</i>	65	199	178	212	16	99	11	37	270	547	<b>817 (21.92%)</b>
<i>P. (L.) perfiliewi</i>	4	75	43	721	-	121	1	9	48	926	<b>974 (26.13%)</b>
<i>P. (L.) langeroni</i>	1	-	10	-	-	-	1	-	12	-	<b>12 (0.32%)</b>
<i>P. (L.) ariasi</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	-	<b>2 (0.05%)</b>
<i>P. (P.) papatasi</i>	4	9	1	1	-	-	-	1	5	11	<b>16 (0.42%)</b>
<i>S. (S.) minuta</i>	11	11	-	8	-	-	2	-	13	19	<b>32 (0.85 %)</b>
<b>Total</b>	<b>367</b>	<b>1507</b>	<b>288</b>	<b>1118</b>	<b>22</b>	<b>301</b>	<b>28</b>	<b>96</b>	<b>705</b>	<b>3022</b>	<b>3727</b>

M : Mâle ; F : Femelle ; n : nombre de phlébotomes.

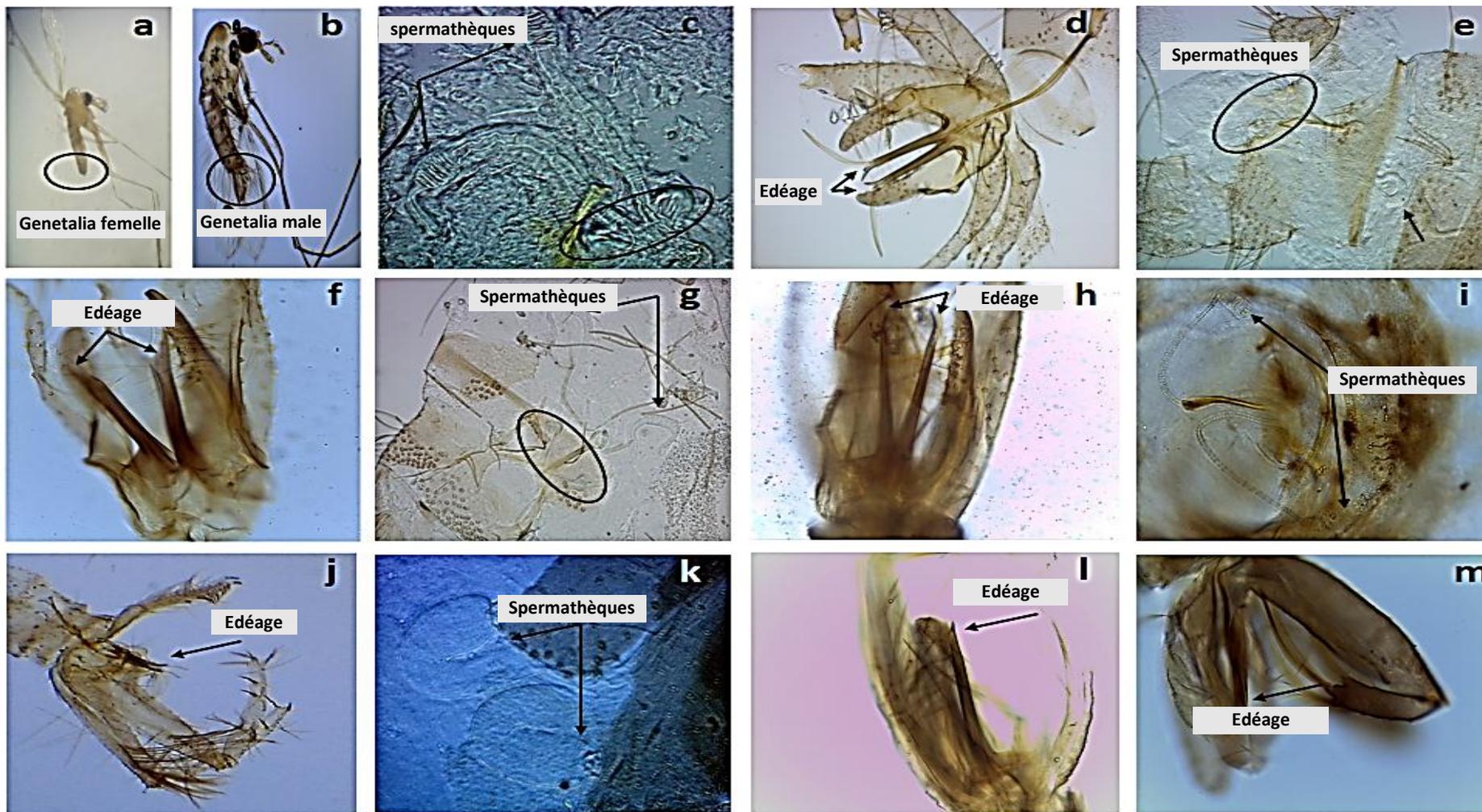


Figure 33. Les caractéristiques distinctives pour l'identification des phlébotomes capturés à Tipaza, dans le nord de l'Algérie (Photos personnelles prises avec Microscope stéréoscopique Axio Zoom.V16, Allemagne). Femelle et mâle *Phlebotomus* spp. (a et b) ; spermathèques femelles et organes génitaux mâles de : *P. (L.) perniciosus* (c et d), *P. (L.) perfiliewi* (e et f), *P. (L.) longicuspis* (g et h) et *P. (P.) papatasi* (i et j) ; spermathèques femelles de *S. (S.) minuta* (k) ; organes génitaux mâles de *P. (L.) langeroni* (l) et de *P. (L.) ariasi* (m).

### III.3.2. Détection moléculaire de l'ADN de *Leishmania* chez les phlébotomes

La détection de *Leishmania* spp. a été réalisée en utilisant des extraits d'ADN préparés à partir d'un total de 740 spécimens de phlébotomes femelles répartis en 81 pools monospécifiques comprenant un total de 600 *P. (L.) perniciosus* (190 non gorgées et 410 gorgées), 91 *P. (L.) longicuspis* (63 non gorgées et 28 gorgées), 39 *P. (L.) perfiliewi* (22 non gorgées et 17 gorgées), une femelle de *P. (P.) papatasi* non gorgée et enfin, neuf *S. (S.) minuta* (8 non gorgées et une gorgée) (Tab. 17).

L'ADN de *Leishmania* spp. a été détecté et amplifié par qPCR dans trois sur les 81 pools de phlébotomes femelles analysés, dont deux pools de *P. (L.) perniciosus* (un pool de femelles non gorgées de sang et un pool de femelles gorgées) et un pool de femelles de *P. (L.) perfiliewi* gorgées de sang (Fig. 34).

La présence de l'ADN de *Leishmania* spp. dans ces trois pools positifs a été confirmée par une seconde qPCR au niveau spécifique et qui nous a permis l'identification de *L. infantum* par présence des courbes positives indiquant la présence de son ADN dans ces pools (Fig. 35).

L'analyse individuelle des spécimens composant les pools positifs a révélé la présence de l'ADN de *L. infantum* dans un seul spécimen par pool (Fig. 36).

Ainsi, le taux d'infection de phlébotomes par *L. infantum* a été calculé comme suit : 0,33% pour *P. (L.) perniciosus* (2/600) et 2,56% pour *P. (L.) perfiliewi* (1/39).

Tableau 17. Détection d'ADN de *Leishmania* dans les phlébotomes collectés à Bourkika

Espèces de phlébotomes	Nombre de pool testé (nombre de spécimens)		Nombre de pools positifs (Ct qPCR 18S / qPCRk)		Nombre de positifs par espèce (Ct qPCRk)	
	FG	FNG	FG	FNG	FG	FNG
	<i>P. perniciosus</i>	45 (410)	20 (190)	1 (34.1 / 34.3)	1 (35.4 / 26.5)	1 (27.6)
<i>P. longicuspis</i>	3 (28)	7 (63)	/	/	/	/
<i>P. perfiliewi</i>	2 (22)	2 (17)	1 (34.12 / 32.7)	/	1 (26.2)	/
<i>P. papatasi</i>	1 (1)	/				
<i>S. minuta</i>	1 (1 FG et 8 FNG)		/		/	
<b>Total</b>	<b>81 (740)</b>		<b>3/81</b>		<b>3/740</b>	

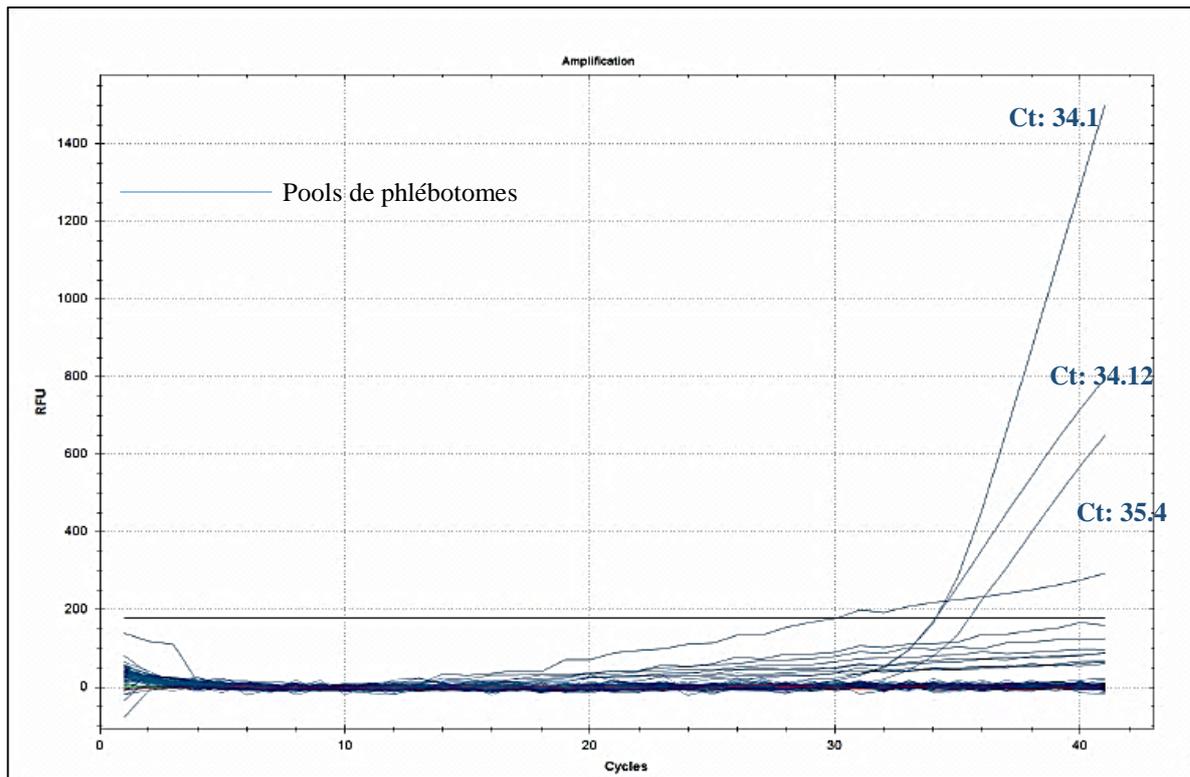


Figure 34. Résultats de q PCR ciblant le gène 18 S de *Leishmania* spp. lancée sur les pools d'ADN de phlébotomes. Ct : seuil de positivité de l'échantillon

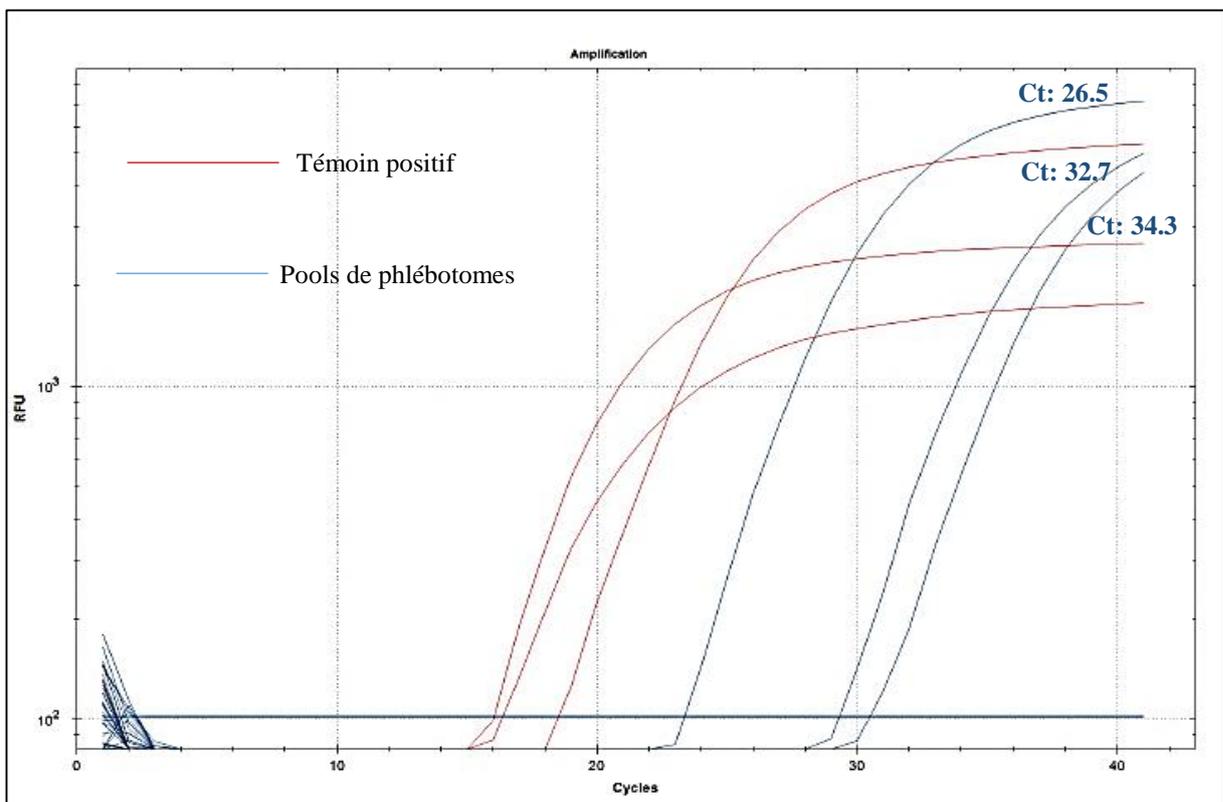


Figure 35. Résultats de q PCR ciblant le gène kinétoplastique de *L. infantum* lancée sur les pools d'ADN de phlébotomes. Ct : seuil de positivité de l'échantillon

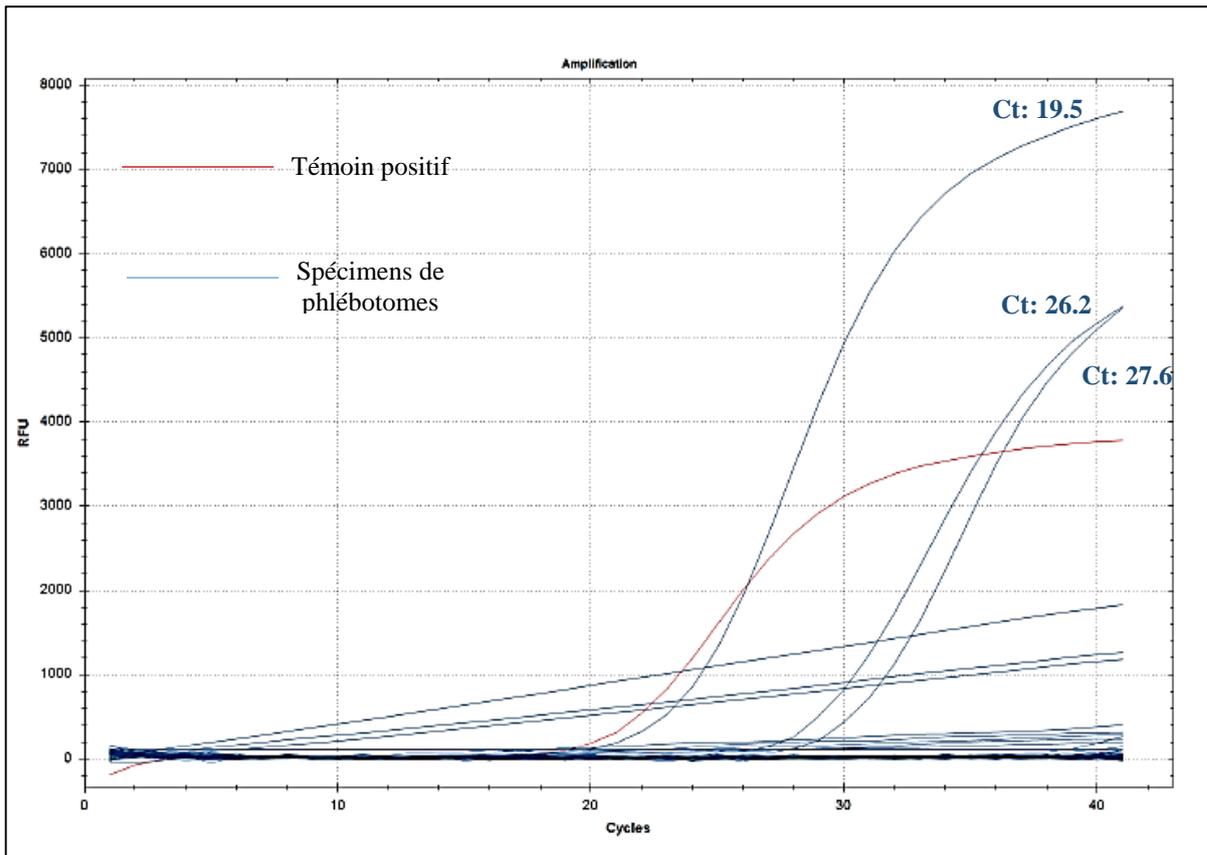


Figure 36. Résultats de q PCR ciblant le gène kinétoplastique de *L. infantum* lancée sur les ADN de phlébotomes séparés . Ct : seuil de positivité de l'échantillon

### III.3.3. Résultats de l'analyse du repas sanguin des phlébotomes par PCR-Séquençage

L'identification de l'origine du repas sanguin des phlébotomes femelles partiellement ou totalement gorgées de sang, par le séquençage du gène vCOI des vertébrés, a été réalisée avec succès, à partir de 97,7% spécimens soit 86/88 du nombre total analysé. L'identification a échoué pour 2,27% des spécimens de phlébotomes engorgés (Tab. 18).

Les résultats du séquençage ont révélé que 74,11% des spécimens appartenant au sous-genre *Larrousius* testés se nourrissaient principalement sur les petits ruminants.

L'ADN de sang du mouton a été identifié chez 36,50%, 15,87% et 15,87% des phlébotomes *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) longicuspis* et *P. (L.) perfiliewi* respectivement. Pendant que 20,63%, 7,93% et 3,17% des phlébotomes de ces dernières ont prouvé leur prise de sang sur des chèvres.

Fait intéressant, dans cette étude le sang humain présentait la deuxième source d'alimentation avec 16,47%, chez les espèces du sous-genre *Larrousius*, connues pour leur compétence vectorielle à *L. infantum*.

Parmi les trois spécimens de phlébotomes trouvés positifs pour *L. infantum*, deux femelles gorgées (1 *P. (L.) perniciosus*, 1 *P. (L.) perfiliewi*) ont pris leur repas de sang sur des humains.

Etonnamment, la seule femelle gorgée de *S. (S.) minuta* s'est également nourrie de sang humain. Cette espèce est connue pour être herpétophile (se nourrissant exclusivement sur les reptiles qui ont un sang-froid).

De plus, huit spécimens dont sept *P. (L.) longicuspis* et un *P. (L.) perfiliewi* se sont nourris sur des équidés (*Equus asinus*).

Tableau 18. Préférence trophique des phlébotomes femelles gorgés collectées à Bourkika

Hôte	Nom commun	Espèces de phlébotomes				Total n (%)
		<i>P. (L.) perniciosus</i>	<i>P. (L.) longicuspis</i>	<i>P. (L.) perfiliewi</i>	<i>S. (S.) minuta</i>	
<i>Homo sapiens</i>	Homme	4	6	4	1	15 (17,04)
<i>Ovis aries</i>	mouton	23	10	10	-	43 (48,86)
<i>Capra hircus</i>	chèvre	13	5	2	-	20 (22,72)
<i>Equus asinus</i>	âne	-	7	1	-	8 (9,09)
Non identifiée	-	2	-	-	-	2 (2,27)

### III.3.4. Identification moléculaire des phlébotomes infectés par *L. infantum*

L'identification moléculaire des trois phlébotomes infectés par *L. infantum* a été effectuée par amplification et séquençage du gène *Cytb* de l'ADN de phlébotomes.

Les résultats sont en concordance avec l'identification morphologique. Les séquences *cytb* obtenues à partir de deux *P. (L.) perniciosus* et d'un *P. (L.) perfiliewi* ont montré une similarité de 100% de leur identité avec les séquences déposées dans Genbank de *P. (L.) perniciosus* de Tunisie (nombre d'accession : [JN036742](#)) et de *P. (L.) perfiliewi* d'Italie (nombre d'accession : [JF766972](#)), respectivement.

### III.4. Discussion

Nous présentons à travers cette étude les résultats de notre enquête entomologique et épidémiologique sur la distribution des phlébotomes vecteurs, leur taux d'infection par *L. infantum* ainsi que leur préférence trophique dans la région péri-urbaine de Tipaza, située au Nord d'Algérie.

La leishmaniose humaine dans cette région est qualifiée d'hypoendémique. Cependant, des cas de leishmaniose cutanée dûe à *L. infantum* et pour la première fois dûe à *L. killicki* ont été rapportés dans la localité d'El Hadjout à Tipaza par l'étude menée par Izri *et al* en 2013. De plus, quatre cas de leishmaniose viscérale ont été signalés par le Direction de Santé Publique dans la localité de Bourkika à Tipaza en 2014 (DSP, 2014).

Dans le cadre de notre projet pour la surveillance de ces maladies, l'étude des facteurs de risque favorisant leur propagation ainsi que leur statut épidémiologique était notre préoccupation prioritaire.

Pour ce faire, des techniques entomologiques pour la collecte et l'identification morphologique des phlébotomes, combinées aux outils moléculaires (PCR, Séquençage) ont été utilisées pour l'étude épidémiologique.

Bien que l'Algérie soit considérée comme une zone endémique pour la leishmaniose humaine et canine, les techniques moléculaires ne sont pas souvent appliquées dans les enquêtes épidémiologiques sur le terrain. Ces outils pourraient être utilisés comme une approche puissante pour le contrôle de la leishmaniose dans les régions endémiques.

La collecte des phlébotomes dans les quatre sites (Bourkika, Bouyersrane, Sidi Boufadhel et El Hadjout) prospectés pendant toute la période de notre étude a permis la capture d'un total de 4045 spécimens, dont 3727 ont été morphologiquement identifiés.

Plus de femelles que de mâles ont été collectées. Contrairement aux données de laboratoire, qui ont établi que le sex-ratio des phlébotomes est de 1 à l'émergence (Dolmatova & Demina, 1971), notre étude de terrain a trouvé un sex-ratio de 0,23 (prédominance des femelles avec 81,08% de la collecte totale).

Sept des 24 espèces de phlébotomes déjà rapportés en Algérie (Dedet *et al.*, 1984 ; Berdjane-Brouk *et al.*, 2011) ont été enregistrées dans cette étude. Ils appartiennent aux deux genres : *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. Les espèces *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) longicuspis* étaient les plus abondantes, tandis que *S. (S.) minuta*, *P. (P.) papatasi*, *P. (L.) langeroni* et *P. (L.) ariasi* étaient peu représentées dans notre collecte.

La biodiversité et la coexistence sympatrique de ces espèces étaient communes dans les différents sites surveillés. Plusieurs facteurs associés à l'activité humaine (agriculture,

urbanisation des villages) et au changement climatique (réchauffement climatique) influencent la densité et l'abondance des phlébotomes, ainsi que les caractéristiques bioclimatiques et l'altitude de la zone qui affectent directement la faune et la flore (Baili Choumara *et al.*, 1971 ; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012 ; Boussaa *et al.*, 2016 ; González *et al.*, 2017).

*P. (L.) perniciosus* a été l'espèce prédominante avec 50,28% dans notre collecte, suivie de *P. (L.) perfiliewi* avec 26,13%. Dans les régions du bassin méditerranéen, y compris en Algérie, ces deux espèces sont considérées comme vecteurs potentiels de *L. infantum* (Harrat *et al.*, 1996).

*P. (L.) perniciosus* est fréquemment liée aux zones bioclimatiques humides et subhumides, mais elle est également présente dans les zones arides et semi-arides (Baum *et al.*, 2015 ; Cotteaux-Lautard *et al.*, 2016). Une étude entomologique menée dans la région de Larbaa Nath Irathen (LNI), province de Tizi Ouzou au nord de l'Algérie a rapporté l'abondance de cette espèce, dans des résultats similaires aux nôtres. Cette région est connue comme le foyer historique de LV humaine et canine due à *L. infantum* MON-1 en Algérie (Berdjane-Brouk *et al.*, 2011 ; Berdjane-Brouk *et al.*, 2012).

Quant à *P. (L.) perfiliewi*, elle représentait la deuxième espèce la plus collectée lors d'une étude menée en août 1989 dans un village situé à proximité de la région de LNI (Taourit-Aden, altitude 500 m) (Izri *et al.*, 1990), ce qui est similaire à nos résultats. Cette espèce a été incriminée comme vecteur de *L. infantum* dermatropique zymodème MON-24, d'abord en Italie puis en Algérie et en Tunisie (Izri *et al.*, 1993).

*P. (L.) longicuspis* représentait 15,83% des spécimens dans notre collecte. Cette espèce est particulièrement abondante dans les zones climatiques arides du Sahara et a été proposée comme vecteur potentiel de *L. infantum* responsable de cas de leishmaniose viscérale autochtone (VL) dans ces régions (Harrat *et al.*, 1996 ; Doury, 1996). Cependant, l'ADN de cette dernière a été détecté pour la première fois chez *P. (L.) longicuspis* dans la région de Kabylie (LNI) où la LV est endémique (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012).

Nos résultats s'alignent sur les études entomologiques menées dans le nord de l'Algérie, notamment à Larbaa Nath Irathen où *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) longicuspis* représentaient respectivement 46,92% et 43,45% et 7,37% de la collecte totale, et à Oum el Bouaghi où ces mêmes espèces présentaient respectivement 47,8%, 22,1% et 1,5% de la faune de phlébotomes collectée.

Parmi les espèces appartenant aux sous-genres de *Laroussius* collectées, *P. (L.) langeroni* et *P. (L.) ariasi* ont été trouvés à des taux très faibles. Seuls les mâles de ces espèces ont été enregistrés dans notre étude. A notre connaissance, et pour des raisons inconnues, seuls les

mâles de *P. (L.) langeroni* ont été collectés avec succès en Algérie (Dedet *et al*, 1984 ; Berdjane-Brouk *et al*, 2011). Cependant, des femelles de *P. (L.) ariasi* ont été enregistrées en Tunisie, au Maroc et en Algérie (Guerbouj *et al*, 2007 ; Berdjane-Brouk *et al*, 2011 ; Boussaa *et al*, 2016).

*P. (L.) ariasi* est associée à l'étage bioclimatique méditerranéen le plus frais et le plus humide (le supraméditerranéen), bien qu'elle ait également été trouvée dans les climats méditerranéens semi-arides (Kahime *et al*, 2014). Il est important de souligner que l'espèce *P. (L.) ariasi* est présente dans les pays du sud de l'Europe, notamment en Italie, en France, en Espagne et au Portugal, ainsi que dans les pays du sud de la Méditerranée. Cette espèce est considérée comme un vecteur de *L. infantum* au Maroc et en Espagne (Kahime *et al*, 2014 ; González *et al*, 2017).

En ce qui concerne *P. (L.) langeroni*, cette espèce a surtout été observée dans les zones semi-arides du bassin méditerranéen, mais elle est considérée comme rare (Dedet *et al*, 1984). Elle est connue pour être le vecteur de la LV en Egypte mais elle a ensuite été trouvée infectée par *L. infantum* en Tunisie (Guerbouj *et al*, 2007).

Le climat typiquement méditerranéen de la province de Tipaza est approprié pour la propagation des phlébotomes du sous-genre *Larrousius*. En effet, les études antérieures menées dans d'autres régions du nord de l'Algérie ont rapporté la même observation concernant l'abondance et la répartition des phlébotomes et la plupart des études corrélent leurs résultats aux caractéristiques de la zone et du climat (Dedet *et al*, 1984).

*S. (S.) minuta* appartenant au genre *Sergentomyia* et *P. (P.) papatasi* appartenant au sous-genre *Phlebotomus* ont été trouvés à bas niveau dans cette enquête. En Algérie, ces deux espèces sont principalement liées aux régions semi-arides, arides et sahariennes, où la leishmaniose cutanée zoonotique humaine est signalée. Ces deux espèces étaient dominantes lors d'une étude entomologique des phlébotomes à Ghardaïa, nord du Sahara algérien avec 32,6% et 30,9% de la collecte, respectivement (Boubidi *et al*, 2011).

En Algérie, *(P.) papatasi* est le seul vecteur confirmé de *L. major*, agent de la LCZ, ainsi que dans les pays voisins d'Afrique du Nord (Harrat *et al*, 1996 ; Aoun & Bouratbine, 2014).

À ce jour, les espèces du genre *Phlebotomus* sont reconnues comme les vecteurs exclusifs du parasite *Leishmania* dans l'ancien Monde. Cependant, quelques études ont récemment suggéré l'implication possible de certaines espèces du genre *Sergentomyia* dans la transmission de *Leishmania spp.* (Berdjane-Brouk *et al*, 2012 ; Nzelu *et al*, 2014 ; Parvizi *et al*, 2014). De plus, la détection de l'ADN de *L. major* chez les phlébotomes *Sergentomyia (S.) minuta* a été signalée dans les foyers de LC au Portugal (Campino *et al*, 2013). En Algérie, cette espèce n'a jamais été incriminée dans la transmission de LH.

Etant donné que l'abondance des vecteurs est l'un des principaux facteurs permettant de déterminer le taux potentiel de dissémination des pathogènes (Latrofa *et al*, 2011 ; Nzelu *et al*, 2014), la forte abondance des phlébotomes du genre *Phlebotomus* enregistrée dans notre étude peut représenter un facteur de risque favorisant la transmission ou même l'introduction d'espèces de *Leishmania* provenant d'autres régions endémiques. En effet, les études de prévalence d'infection par *Leishmania* chez les phlébotomes sont des indicateurs précieux pour mesurer l'intensité de la transmission du parasite dans une région donnée.

L'étude moléculaire de l'infection à *L. infantum* chez les phlébotomes de Bourkika a montré un taux d'infection de 0,4%, soit 3 sur les 740 spécimens testés. Généralement, dans les communautés épidémiques de leishmaniose, la prévalence de *Leishmania* chez le vecteur dépasse rarement les 2% de la population de phlébotomes femelles (Sant'Anna *et al*, 2012). De nombreux paramètres peuvent affecter cette prévalence, notamment le nombre et la disponibilité de mammifères réservoirs atteints de leishmaniose (Sant'Anna *et al*, 2012).

Selon les rapports précédents, un taux élevé d'infection à *Leishmania* a été observé chez les femelles gorgées de sang par rapport aux femelles non gorgées. Ces dernières comprennent probablement les adultes nouvellement émergées, qui devraient être exempts de parasites *Leishmania* avant de prendre leur repas de sang (Tiwary *et al*, 2013 ; Ajaoud *et al*, 2015). Dans notre étude, deux spécimens de phlébotomes positifs pour *Leishmania* ont été gorgés tandis que le troisième a été non gorgé de sang.

Dans notre étude, un faible taux d'infection des phlébotomes par espèces a été observé : 0,33% pour *P. (L.) perniciosus* et 2,56% pour *P. (L.) perfiliewi*. Ces deux espèces sont considérées comme les principaux vecteurs de *L. infantum* dans le nord de l'Algérie (Eddaikra *et al*, 2013). Une étude similaire dans la région de Kabylie, au Nord d'Algérie, a montré une prévalence de 0,2%, soit une femelle naturellement infectée par *L. infantum* viscérotrope zymodème MON-1 sur les 490 femelles de *P. (L.) perniciosus* disséquées (Izri *et al*, 1990).

Parallèlement, une sur 801 femelles de *P. (L.) perfiliewi* a été trouvée naturellement infectée par *L. infantum* dermatropique zymodème MON-24 dans la région de Ténès, au nord de l'Algérie (Izri *et al*, 1993). Cependant, une étude récente menée à Larbaa Nath Irathen, une autre région de Kabylie, a rapporté que les spécimens de *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) perniciosus* collectés étaient tous négatifs pour *Leishmania* spp. (Berdjane-Brouk *et al*, 2012).

En ce qui concerne les autres pays d'Afrique du Nord, le taux d'infection par *L. infantum* chez *P. perfiliewi* et *P. perniciosus* en Tunisie est de 0,12% et 0,16% respectivement (Barhoumi *et al*, 2016). *P. (L.) perniciosus* est abondante et elle est proposée comme vecteur de *L. infantum* dans certaines zones endémiques au Maroc (Kahime *et al*, 2014). Récemment, une étude

épidémiologique menée dans des zones périurbaines situées au nord-est du Maroc a révélé la présence d'ADN de *L. infantum* chez *P. (L.) longicuspis* et *P. (L.) perniciosus* avec des taux d'infection de 2,51% et 7,27% respectivement (Mhaidi *et al*, 2018).

Dans la partie nord de la Méditerranée, le taux global d'infection à *L. infantum* chez les phlébotomes signalés sur trois années d'investigation a été évalué à 3,65% chez *P. (L.) perniciosus* en Espagne (Gonzalez *et al*, 2017), tandis que dans un foyer de forte endémie de leishmaniose canine dans la province de Rome en Italie, le taux d'infection par *Leishmania* était beaucoup plus élevé chez les phlébotomes avec 47,2%. Une étude récente en Serbie, en Europe centrale, a montré l'émergence de cas de leishmaniose humaine et canine sporadiques qui été confirmée par une surveillance entomologique révélant la présence de *Leishmania* spp. chez les phlébotomes avec un taux d'infection de 4% (Vaselek *et al*, 2017).

Dans le nord de l'Algérie ainsi que dans la province de Tipaza, *L. infantum* provoque à la fois la LV et la LC du Nord. Selon les données de la direction de santé publique de Tipaza, 337 cas de leishmaniose humaine (305 LC, 32 LV) ont été enregistrés entre 2001 et 2014. En outre, une étude récente a rapporté une épidémie de LC due à l'infection par *L. infantum* et *L. killicki* dans cette région (Izri *et al*, 2014). Cette existence sympatrique de plusieurs espèces de *Leishmania* a également été signalée dans le nord-est de l'Algérie et le nord du Sahara (Harrat *et al*, 2009 ; Mansouri *et al*, 2012).

Nos résultats présentés dans cette étude soulignent le rôle de *P. (P.) perniciosus* et *P. (P.) perfiliewi* dans la propagation de *L. infantum* dans les sites surveillés en raison de leur forte abondance et de la détection du parasite chez ces deux espèces. D'autres études sont nécessaires pour étudier la présence de vecteurs de *L. killicki* et / ou toute autre existence sympatrique d'espèces de *Leishmania* dans la région de Tipaza ainsi que dans d'autres régions d'Algérie.

L'analyse du repas sanguin pour identifier son origine chez les arthropodes hématophages autres que les phlébotomes, ainsi que l'étude de leurs préférences d'hôtes est essentielle pour comprendre la dynamique des agents pathogènes à transmission vectorielle (Niare *et al*, 2016). Plusieurs méthodes sérologiques, telles que la précipitine antigène-anticorps et le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ont été utilisées, ainsi que de nombreuses autres techniques plus laborieuses. Cependant, ces méthodes traditionnelles manquent de sensibilité et prennent beaucoup de temps (Gomez *et al*, 1998 ; Rossi *et al*, 2008). Pour surmonter ces difficultés, des approches de biologie moléculaire ont été incorporées ces dernières années pour améliorer la spécificité de l'identification de l'origine de repas sanguin chez les insectes (Meece *et al*, 2005; Kent *et al*, 2009). Plus récemment, l'utilisation de nouvelles technologies telles que

MALDI-TOF MS s'est révélée utile pour étudier les arthropodes. sources de repas de sang (Niare *et al*, 2016).

Dans la présente étude, l'identification moléculaire de l'origine de repas sanguin n'a été effectuée que sur les phlébotomes collectés dans la région de Bourkika. Pour la première fois en Algérie, cette étude fournit des données moléculaires sur les sources de repas sanguin des phlébotomes dans un foyer de leishmaniose humaine.

Les résultats ont révélé quatre sources d'alimentation pour les phlébotomes dont le sang des petits ruminants était la plus commune chez les phlébotomes du sous-genre *Laroussius* à Bourkika, suivi du sang humain puis d'âne.

Les sources d'alimentation non identifiées chez 2 spécimens s'expliquent probablement par la faible quantité de sang de l'hôte ingérée par ces derniers, ou par le fait que le repas a été partiellement digéré avant que les spécimens soit capturés (Bongiorno *et al*, 2003 ; Cotteaux-Lautard *et al*, 2016).

La plupart des spécimens ont été collectés à l'intérieur d'écuries, d'enclos à moutons où des chiens de berger sont également présents, et aussi près des habitats humains. Cela explique pourquoi la majorité des espèces phlébotomes se nourrissent sur les animaux vivant dans ces abris et ne présentent pas nécessairement une préférence pour un hôte particulier sensible au parasite *Leishmania* (chiens domestiques) (Bongiorno *et al*, 2003 ; Cotteaux-Lautard *et al*, 2016).

La même observation a été rapportée dans une étude menée dans un foyer de forte endémie de leishmaniose canine en Italie, où un nombre significatif de *P. perniciosus* se nourrissait de sang aviaire et ovin ; cela est lié aux habitats où les spécimens étaient collectés (Rossi *et al.*, 2008). En revanche, une étude récente menée en Espagne a montré que *P. perniciosus* se nourrit de préférence sur des lapins et des lièvres, ces derniers semblant jouer un rôle de réservoir sauvage de leishmaniose dans la région (Gonzalez *et al*, 2017).

Etonnamment, le seul spécimen *S. (S.) minuta* analysé s'est nourrit de sang humain. Longtemps, on a pensé que les espèces de *Sergentomya* se nourrissaient exclusivement sur les animaux à sang froid (reptiles), ce qui excluait par conséquent leur rôle dans la transmission des espèces de *Leishmania* (Berdjane-Brouk *et al*, 2012 ; Cotteaux-Lautard *et al*, 2016). Nos résultats remettent en question cette donnée, d'autant plus que plusieurs études ont rapporté la détection de *Leishmania* spp. chez des espèces appartenant à ce genre (Berdjane-Brouk *et al*, 2012 ; Nzelu *et al*, 2014; Parvizi *et al*, 2014). En Algérie, le rôle de cette espèce dans la transmission de *Leishmania* n'a jamais été étudié mais ne peut être exclu et nécessite une exploration plus approfondie.

Fait intéressant, les deux femelles gorgées qui se sont avérées positives pour *L. infantum* dans notre étude se sont nourries de sang humains. Ce fait important suggère la possible transmission de *L. infantum* à l'homme dans cette zone.

Le taux élevé de phlébotomes se nourrissant sur les animaux non réservoirs de *Leishmania* (petits ruminants et ânes) observés dans cette étude peut expliquer leur faible prévalence d'infection à *Leishmania* spp. D'autre part, les informations obtenues sur les sources de sang pourraient expliquer la grande quantité de phlébotomes trouvée dans les abris représentant les sites de reproduction des phlébotomes, en raison de la matière organique abondante, écotype naturel habituellement occupé par les phlébotomes immatures (Felicangeli, 2004).

### **III.5. Conclusion et perspectives**

A travers la présente enquête épidémiologique combinant les approches entomologiques et moléculaires, nous avons pu contribuer à l'actualisation des données sur la distribution des phlébotomes capturés dans la région du Nord d'Algérie, Tipaza, une région hypoendémique de leishmaniose humaine.

Le statut infectieux de ces insectes par *Leishmania* a été également déterminé dans la localité de Bourkika à Tipaza, où des cas de leishmaniose viscérale ont été signalés. De plus, et pour la première fois en Algérie, nous avons pu fournir des données moléculaires sur l'origine de repas sanguin chez les phlébotomes femelles gorgées capturées dans la même localité.

Les résultats rapportés ici ont révélé la grande abondance des espèces de sous-genre *Phlebotomus* (*Larroussius*), y compris les principaux vecteurs de *L. infantum*, *P. (L.) perfiliewi* et *P. (L.) perniciosus* qui ont montré le taux de capture le plus élevé dans les quatre sites prospectés. Ces deux espèces ont été trouvées naturellement infectées par *L. infantum* dans la région de Bourkika mais à des faibles taux d'infection.

Les résultats de notre étude moléculaire sur la préférence trophique des phlébotomes capturés dans ce site ont révélé un comportement hématophage qui reposait principalement, mais pas exclusivement, sur les petits ruminants (animaux non réservoirs de *Leishmania*), ce qui explique leur taux faible d'infection par *Leishmania*.

En résumé, la présence de cas de leishmaniose humaine, la forte abondance d'espèces de *Phlebotomus* (*Larroussius*), la détection de l'ADN de *L. infantum* à partir de ses vecteurs naturels (*P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) perfiliewi*), en plus de l'alimentation des femelles positives pour *L. infantum* sur du sang humain, prouvent que les principaux éléments du cycle de transmission épidémiologique de *L. infantum* sont présents et indiquent les facteurs de risque d'une flambée de la maladie dans la province de Tipaza

Des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre l'état actuel de ces infections dans d'autres localités de la province de Tipaza ainsi que dans les autres régions endémiques du pays, en introduisant des techniques innovantes et rapides pour établir un programme de lutte approprié contre ces maladies.

---

---

## **Chapitre IV**

### **Recherche d'éventuels pathogènes associés aux phlébotomes collectés au nord d'Algérie**

---

---

## IV.1. Problématique et objectifs de l'étude

En plus de la transmission exclusive des Leishmanies, les phlébotomes sont des vecteurs de divers pathogènes, y compris les arbovirus et les bactéries (Fraïhi *et al*, 2017).

Les phlébotomes sont largement distribués dans tous le pourtour Méditerranéen, par conséquent les populations humaines dans cette zone sont exposées aux maladies transmises par ces insectes, y compris celles causées par les phlébovirus. Le Toscana virus (TOSV) est une cause importante de méningite aiguë aseptique dans la région méditerranéenne (Hemmersbach-Miller *et al*, 2004 ; Charrel *et al*, 2005). En outre, *Sandfly fever Sicilian Virus* (SFSV) et *Naples virus* (SFNV) provoquent aussi fréquemment des épidémies de maladies fébriles pendant l'été (Charrel *et al*, 2009).

En Algérie, il existe peu d'informations sur les phlébovirus circulants, sauf quelques données provenant des études de séroprévalence et de détection des séquences de phlébovirus dans la région de Kabylie qui ont permis de mettre en évidence la présence de SFSV et TOSV malgré la forte densité et la large distribution de phlébotomes dans le pays (Izri *et al*, 2008; Moureau *et al*, 2010 ; Alkan *et al*, 2015).

Dans le but de contribuer à enrichir les données sur les Phlébovirus en Algérie, nous avons mené une étude dans une région du nord de l'Algérie (Bougaa, Setif), en utilisant une approche combinant une campagne entomologique pour la capture de phlébotomes et des techniques moléculaires et de culture cellulaire pour la détection et l'isolement des virus.

D'autre part, et à l'exception de la bactérie *Bartonella bacilliformis*, agent responsable de la maladie de Carrion dans les régions des Andes (Pérou, Colombie, Equateur), transmise par les espèces du genre *Lutzomyia*, on sait peu de choses sur la circulation des bactéries pathogènes à intérêt médical humain et vétérinaire chez les phlébotomes.

Plusieurs études, dont le but est la caractérisation de la structure et de la fonction du microbiome associé aux phlébotomes, ont été menées pour *Phlebotomus papatasi*, *Ph. Argentipe*, *Ph. Sergenti*, *Ph. Kandelakii*, *Ph. Perfiliewi*, *Ph. Perfiliewi* et *Lutzomyia longipalpis* afin de mieux comprendre leur écologie, leur biologie et leur immunologie (Dillon *et al*, 1996 ; Volf *et al*, 2002 ; Hillesland *et al*, 2008 ; Gouveia *et al*, 2008 ; McCarthy *et al*, 2011 ; Guernaoui *et al*, 2011 ; Akhoundi *et al*, 2012 ; Sant'Anna *et al*, 2012 ; Mukhopadhyay *et al*, 2012 ; Maleki-Ravasan *et al*, 2014 ; Fraïhi *et al*, 2017). Cependant, Li *et al* ont signalé pour la première fois en 2016, par métagénomique ciblant le gène 16S universel des bactéries, la présence des bactéries intracellulaires des familles de *Rickettsiaceae*, et *Coxiellaceae* chez les phlébotomes.

De plus, des études récentes sur les moustiques ont permis pour la première fois la détection des bactéries d'*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Candidatus Neoehrlichia* et *Rickettsia* qui comprennent des espèces bien connues en tant que pathogènes zoonotiques, transmises principalement par les tiques, provoquant des maladies humaines et vétérinaires aussi graves telles que l'anaplasmose, l'ehrlichiose, les rickettsioses (Lindh *et al*, 2005 ; Guo *et al*, 2016). De plus, une étude expérimentale a signalé le potentiel de transmission de *R. felis* par les moustiques (Dieme *et al*, 2015).

En nous inspirant de toutes ces études antérieures, nous avons initié une recherche sur la présence de bactéries pathogènes, éventuellement associées aux insectes, tels que : *Rickettsia spp.*, *Coxiella burnetii* et les *Anaplasmatocae* chez les phlébotomes collectés à Bourkika, dans la province de Tipaza au nord d'Algérie (Chapitre III), en utilisant des qPCR ciblant des gènes spécifiques pour chacune.

## IV.2. Matériels et méthodes

### IV.2.1. Recherche des phlébovirus

#### IV.2.1.1. Zone d'étude et capture des phlébotomes

Des campagnes de piégeage des phlébotomes, utilisant les pièges lumineux de type CDC comme décrit précédemment (Chapitre. III), ont été menées en juin 2017 à Bougaa (36° 19' 57" nord, 5° 05' 19" est) à une altitude moyenne de 650 m. Cette région est située à 45 km au nord-ouest de la Wilaya de Sétif et à 80 km au sud de Béjaïa au Nord d'Algérie (Fig. 47).

Les sites de capture ont été choisis sur la base des données épidémiologiques communiquées par le Service Epidémiologie et Médecine Préventive de Sétif (SEMPE) sur la leishmaniose viscérale avec 684 cas de depuis 1995 jusqu'à 2004.

Bougaa est une région montagneuse dont les pentes sont très fortes et à climat typiquement méditerranéen. La population était de 30 987 habitants selon le recensement général de population et de logement de 2008. La végétation est composée de chênes, d'oliviers et de figuiers, tandis que les animaux domestiques (chats, chiens, chèvres, moutons, lapins et poulets) sont souvent présents à l'abri, soit dans les sous-sols ou à proximité des habitations humaines, ce qui constitue l'environnement adéquat pour le développement des phlébotomes.

Un total de 4363 phlébotomes ont été piégés. Aucune identification morphologique des espèces n'a été réalisée avant les tests viraux car il s'agit d'un processus long (> 1 minute par phlébotome). La justification de cette approche était de minimiser les manipulations d'insectes, ce qui augmente les chances de détection et d'isolement des virus. Les phlébotomes vivants ont

été donc regroupés dans 145 pools (jusqu'à 30 individus par pool) en fonction du lieu de piégeage et placés dans des tubes de 1,5 ml avant d'être directement transportés, dans de l'azote liquide, au laboratoire (UMR 190 "Emergence des Pathologies Virales", Aix-Marseille Université, Marseille, France.) où ils ont été cryoconservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la détection et l'isolement de virus.

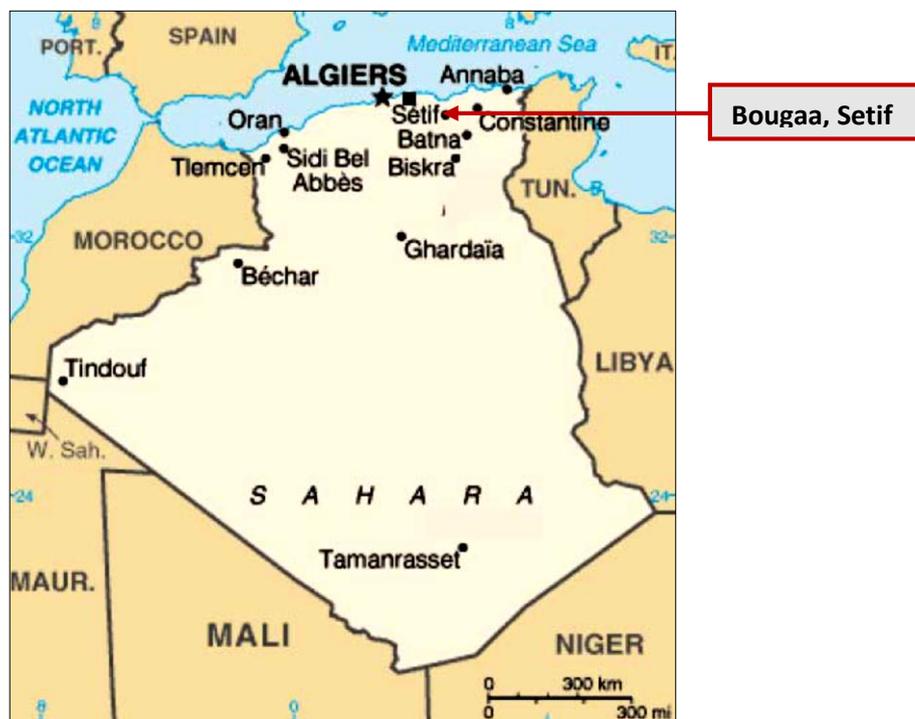


Figure 37. Site de capture des phlébotomes (Bougaia, Sétif).

#### IV.2.1.2. Détection moléculaire de phlébovirus

##### IV.2.1.2.1. Extraction d'ADN/ ARN à partir de phlébotomes

Les phlébotomes contenus dans chaque pool ont été broyés en présence de bille de tungstène (de 3 mm) dans 600  $\mu\text{l}$  de milieu de culture EMEM (*Eagle Minimum Essential Medium*), supplémenté avec 7% de sérum foetal bovin, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% de (200 mM) de L-glutamine. Les tubes sont ensuite automatiquement agités pendant 3 minutes à une fréquence de 25 Hz à l'aide de l'automate MM300 (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis centrifugés.

Une aliquote de 200  $\mu\text{l}$  a été utilisée pour l'extraction des acides nucléiques (ADN/ARN) avec le BioRobot EZ1-XL Advanced (QIACube), en utilisant le minikit d'extraction de virus (Qiagen), selon les intructions du fabricant. Les extraits sont élués dans 90  $\mu\text{l}$  puis conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

#### IV.2.1.2.2. Détection de virus par RT-qPCR

La détection de *Toscana Virus* (TOSV) et *Sand Fly Sicilian Virus* (SFSV) a été effectuée par *Reverse Transcriptase quantitative PCR* (RT-qPCR), en utilisant des amorces et des sondes ciblant le gène de la nucléoprotéine, comme décrit par (Weidmann *et al.*, 2008).

Les réactions PCR ont été réalisées avec le Kit RT-qPCR one step Invitrogen Universal 11781-200 qui contient le Mix (Express Qpcr SUPERMIX Universal) et l'enzyme (Express superscrip Mix for one-step qPCR). Les séquences d'amorces ainsi que les concentrations et les conditions de la réaction sont illustrés dans le tableau 19.

Tableau 19. Les amorces et sondes utilisées pour la RT-qPCR.

Virus ciblé	Nom d'amorces et sondes	Séquences d'amorces	Conditions de Mix	Conditions de RT-q PCR
TOSV	TOS F	GGGTGCATCATGGCTCTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix : 5 µl</li> <li>• Amorce F : 0.25µl</li> <li>• Amorce R : 0.25µl</li> <li>• Sonde S : 0.067 µl</li> <li>• Enzyme GoScript RT Mix : 1 µl</li> <li>• ADN/ARN extrait: 3.5 1 µl</li> </ul>	50° C pdt 5 min, 94° C pdt 1 min, 95° C pdt 3 sec, 60 °C pdt 30 sec, (39 cycles)
	TOS R	GCAGRGACACCATCACTCTGTC		
	TOS S	FAM-CAATGGCATCCATAGTGGTCCCAGA-TAMRA		
SFSV	SFSV-All-F	ATG GAS GAS TAC CAG AAR ATY GC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mix : 10 µl</li> <li>• Amorce F1 : 0.5µl</li> <li>• Amorce F2 : 0.5µl</li> <li>• Amorce F3 : 0.5µl</li> <li>• Amorce R1 : 0.5 µl</li> <li>• Amorce R2 : 0.5µl</li> <li>• Sonde S 1 : 0.13 µl</li> <li>• Sonde S 2 : 0.13 µl</li> <li>• Sonde S 3 : 0.13 µl</li> <li>• Enzyme GoScript RT Mix : 0.5 µl</li> <li>• H<sub>2</sub>O : 1.61 µl</li> </ul>	
	Corfou-Toros-F	ATG GAG GAC TAC CAG AAG ATC GC		
	Corfou-Toros-R	CTA GCA TCA AAA CCY TGG TAS GCA AA		
	SFSV-DAHV-R	CTG GCA TCA AAY CCY TGA TAS GCA AA		
	SFSV-DAHV-F	ATG GAC GAG TAC CAG AAA ATT GC		
	Corfou-Toros-P	TTC GGT GAG CAG GCT ATA GAT GA		
	SFSV-P1	TTT GGA GAA CAG GCC ATT GAT GAG		
	SFSV-P2	TTT GGA GAG CAG GCT ATT GAT GAG		

#### IV.2.1.2.3. Isolement du virus

Un volume de 50 µl de chaque pool de phlébotomes broyés a été inoculé dans un flacon de cellules Vero d'un volume de 12,5 cm<sup>2</sup> additioné au milieu de culture EMEM enrichi avec 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de [200 mM] L-glutamine, 1% de kanamycine et 3% amphotéricine B (Fungizone). Après incubation à température ambiante pendant 1 heure, 5 ml de EMEM frais contenant 5% de sérum fœtal bovin (FBS) ont été ajoutés. Les flacons ont été incubés à 37 ° C dans une atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5% et examinés quotidiennement pour observation d'effet cytopathique (ECP) comme décrit par (Alkan *et al.*, 2015).

## IV.2.2. Recherche des bactéries chez les phlébotomes

### IV.2.2.1. Echantillons

Les extraits d'ADN de phlébotomes collectés à Bourkika, Tipaza (voir Chapitre. III) ont été exploités pour la recherche des bactéries dans cette étude.

L'ADN d'un total de 740 spécimens de phlébotomes femelles comprenant : 600 *P. (L.) perniciosus* (190 non gorgées et 410 gorgées), 91 *P. (L.) longicuspis* (63 non gorgées et 28 gorgées), 39 *P. (L.) perfiliewi* (22 non gorgées et 17 gorgées), une femelle de *P. (P.) papatasi* non gorgée et enfin, neuf *S. (S.) minuta* (8 non gorgées et une gorgée) a été criblé pour la présence d'agents pathogènes bactériens éventuellement associés aux insectes.

### IV.2.2.2. Détection de bactéries

Des qPCRs, dans le but de rechercher les bactéries qui peuvent être hébergées par les phlébotomes, ont été effectuées en utilisant des amorces et sondes spécifiques précédemment rapportées dans la littérature, à savoir : *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., et *C. burnetii*. La qPCR *Anaplasma* spp. ciblant le gene 23S incluant toutes les espèces de la famille *Anaplasmatatacae*. Les amorces et sondes, ainsi que les conditions de qPCRs sont décrits dans le tableau 20.

Tableau 20. Les amorces et sondes utilisées pour les qPCR dans cette étude.

Nom d'amorces et sondes	Séquences d'amorces	Conditions de Mix	Conditions de q PCR	Référence
<i>Rickettsia</i> spp. <b>RKND03</b> <i>citrate synthase</i> ( <i>gltA</i> )	F_GTGAATGAAAGATTACACTATTTAT	Mix Roche : 10µl H <sub>2</sub> O : 3µl Amorce F : 0.5µl Amorce R : 0.5µl Sonde S1 : 0.5 µl Enzyme UDG : 0.5µl	50C° pdt 2 min 95° pdt 5 min 95C° pdt 5 sec 60C° pdt 30 sec (39 cycles)	(Rolain <i>et al.</i> , 2002)
	R_GTATCTTAGCAATCATTCTAATAGC			
	FAM-CTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTC-TAMRA			
<i>Coxiella burnetii</i> <b>IS1111</b>	F_CAAGAAACGTATCGCTGTGGC			
	R_CACAGAGCCACCGTATGAATC			
	FAM- CCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTG-TAMRA			(Mediannikov <i>et al.</i> , 2010)
<i>Coxiella burnetii</i> <b>IS30A</b>	F_CGCTGACCTACAGAAATATGTCC			
	R_GGGGTAAGTAAATAATACCTTCTGG			
	FAM-CATGAAGCGATTTATCAATACGTGTATGC-TAMRA			
<i>Anaplasma</i> spp. <b>TtAna</b> 23S ribosomal RNA	F_TGACAGCGTACCTTTTGCAT			(Dahmani <i>et al.</i> , 2015)
	R_TGGAGGACCGAACCTGTAC			
	FAM-GGATTAGACCCGAAACCAAG-TAMRA			

Les qPCRs ont été réalisés avec le Master mix (Eurogentec, Liège, Belgique) dans les thermocycleurs CFX96 Real-Time (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Nous avons inclus l'ADN extrait de cultures de bactéries cibles comme contrôle positif et l'eau stérile exempte

d'ADNase comme témoin négatif pour chaque série. Les échantillons ont été considérés comme positifs lorsque le seuil du cycle de positivité (Ct) est inférieur à 35 Ct.

### IV.3. Résultats

#### IV.3.1. Résultats de la recherche des phlébovirus

Sur les 145 pools de phlébotomes (environ 30 spécimens par pool) analysés pour la détection de *Toscana Virus* et *Sand Fly Sicilian Virus*, qui sont déjà rapportés en Algérie, aucun pool n'est revenu positif en RT-qPCR spécifique pour ces deux phlébovirus. La culture des Virus sur milieu EMEM n'a montré aucun effect cytopathique pour les 145 pools, ce qui indique l'absence de phlébovirus chez les phlébotomes collectés dans la région de Bougaa, Sétif, Nord d'Algérie. Ces résultats négatifs peuvent être expliqués par le faible nombre de phlébotomes testés par rapport au nombre habituellement analysé dans les investigations virales, car la recherche des virus est très sensible et délicate et demande un échantillonnage important.

#### IV.3.2. Résultats de la recherche des bactéries

Dans cette étude, l'ADN de *Rickettsia* spp. et de *Coxiella burnetii* n'a pas été détecté chez les 740 ADNs de phlébotomes analysés par qPCRs spécifiques (Fig. 38 ; 39). Cependant, une prévalence importante de l'ADN d'Anaplasmatacae a été enregistrée dans notre série avec 36.84 %, soit 270 spécimens positifs sur les 740 spécimens testés (Fig. 40)

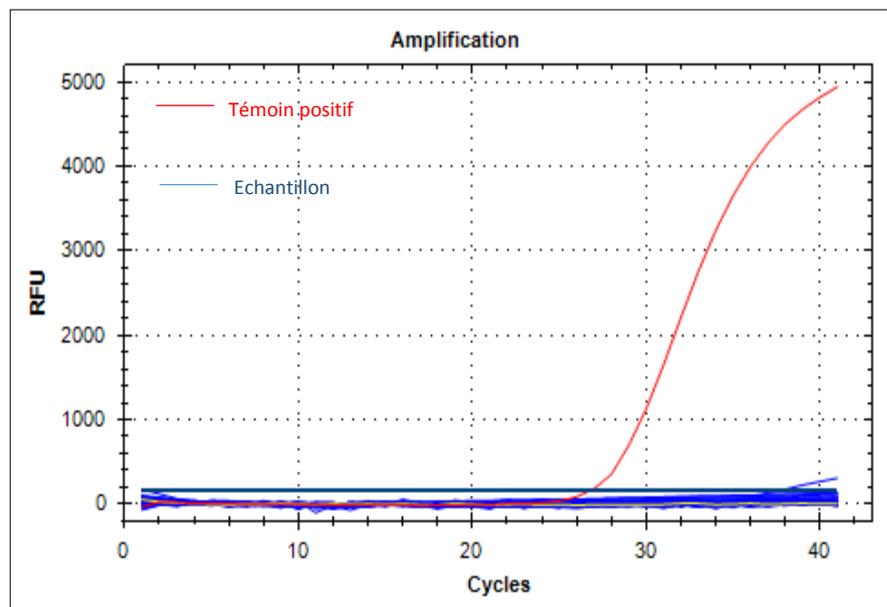


Figure 38. Résultat négatif de qPCR spécifique pour *Rickettsia* spp. lancée sur les phlébotomes de Bourkika.

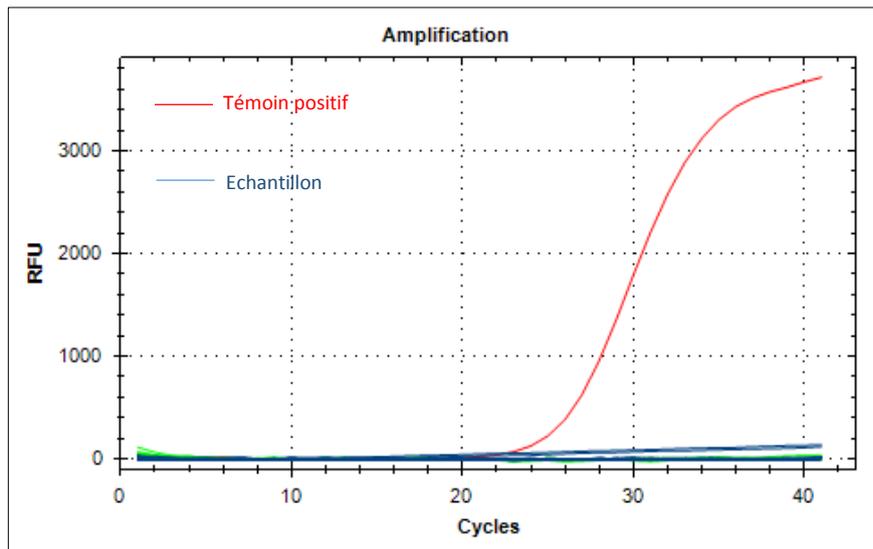


Figure 39. Résultat négatif de qPCR spécifique pour *Coxiella burnetii* lancée sur les phlébotomes de Bourkika.

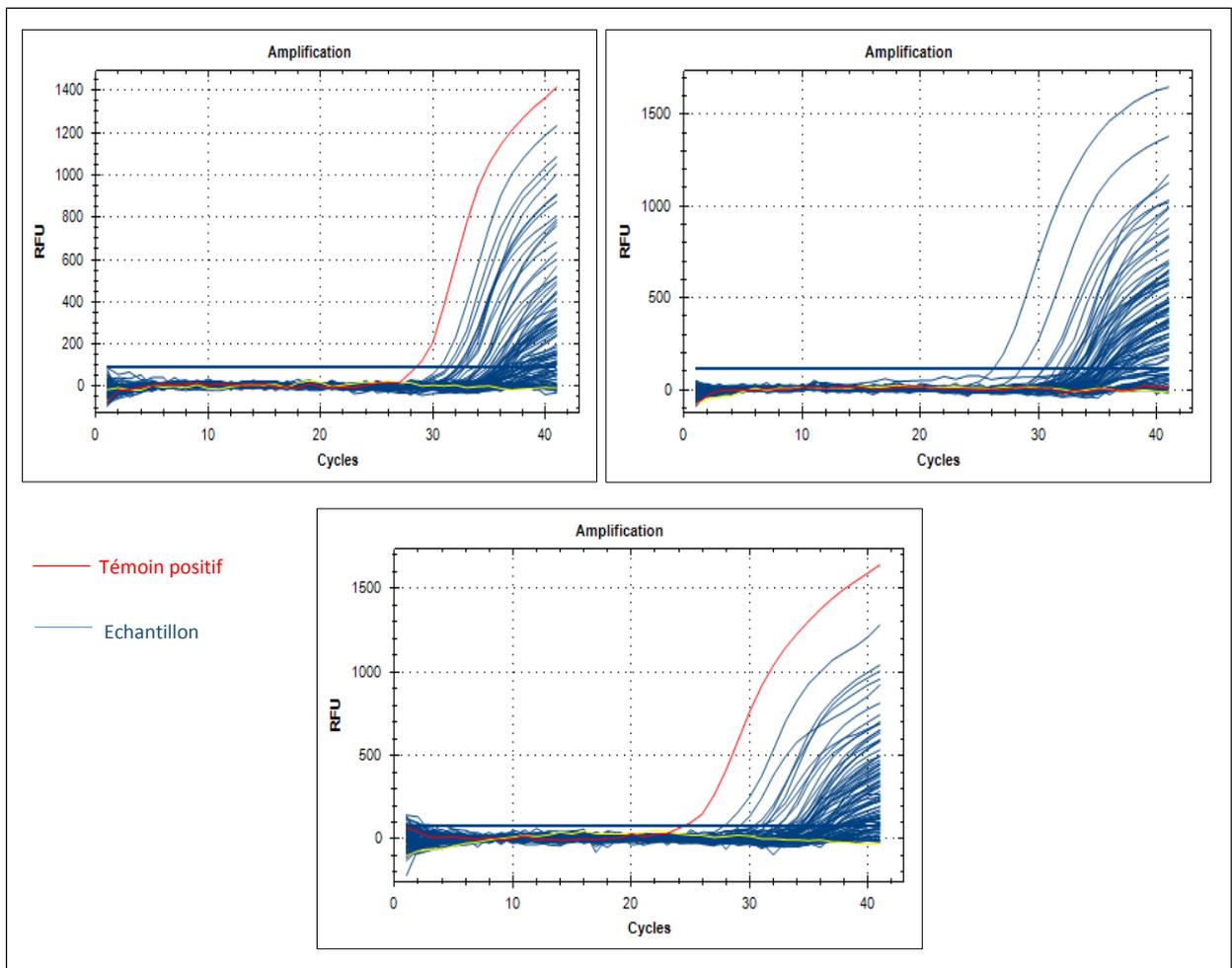


Figure 40. Résultat de qPCRs spécifique pour *Anaplasma* spp. lancée sur les phlébotomes de Bourkika.

L'ADN des *Anaplasmatocae* a été détecté dans quatre sur les cinq espèces de phlébotomes analysées ici. Les prévalences de ces bactéries par espèce de phlébotomes étaient : 37.16 % chez *P. perniciosus*, soit 223 sur 600 spécimens ; 34.09 % chez *P. longicuspis*, soit 30 sur 88 spécimens ; 35.89 % chez *P. perfiliewi*, soit 14 sur 39 spécimens ; et 33.33 % chez *S. minuta*, soit 3 sur 9 spécimens (Tab. 21).

Tableau 21. Résultats globaux de recherches de bactéries chez les phlébotomes de Bourkika.

Pathogènes bactériens	Prévalences des bactéries par espèces de phlébotomes (P %, n/N)										Total
	<i>P. perniciosus</i>		<i>P. longicuspis</i>		<i>P. perfiliewi</i>		<i>P. papatasi</i>		<i>S. minuta</i>		
	FG	FNG	FG	FNG	FG	FNG	FG	FNG	FG	FNG	
<i>Rickettsia</i> spp.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Coxiella burnetii</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Anaplasma</i> spp.	41.21 % (169/410)	28.42 % (54/190)	42.85 % (12/28)	28.57 % (18/63)	52.94 % (9/17)	22.72 % (5/22)	/	0/1	0/1	37.5 % (3/8)	36.48 % (270/740)
<b>Total</b>	37.16 % (223/600)		34.09 % (30/88)		35.89 % (14/39)		0/1		33.33. % (3/9)		36.48 % (270/740)

**P%** : Prévalence (**n** : nombre de spécimens infectés / **N** : nombre de spécimens testés) ; **FG** : Femelles gorgées ; **FNG** : Femelles non gorgées ; / : absence de pathogène.

#### IV.4. Discussion

Dans ce volet, nous présentons des résultats préliminaires sur la recherche des agents pathogènes (phlébovirus et bactéries), autre que *Leishmania*, associés aux phlébotomes collectés dans le nord d'Algérie.

Les phlébovirus (famille des *Bunyaviridae*, genre *Phlebovirus*), transmis par les phlébotomes, causent une maladie fébrile spontanément résolutive (fièvre à phlébotome) ou des infections neuroinvasives pendant l'été (Karabatsos, 1984).

Récemment, une attention particulière a été attirée sur *Toscana Virus* (appartenant à l'espèce de *Sand Fly Naples Virus SFNV*) dans les pays entourant la Méditerranée. Des études en Italie, Portugal, Espagne et France ont montré que ce virus est la première cause de méningite pendant la saison estivale (Ehrnst *et al*, 1985 ; Nicoletti *et al*, 1991 ; Charrelet *al*, 2005). De plus, *Sand Fly Sicilian Virus (SFSV)*. Un autre phlebovirus transmis par les phlébotomes, notamment par *Phlebotomus papatasi*, provoque une maladie fébrile qui s'appelle aussi Fièvre à phlébotome. Contrairement à l'infection par le virus Toscana, l'infection à SFSV n'est pas associée à des manifestations neurologiques (Karabatsos, 1984).

En Algérie, très peu d'études ont été menées dans ce contexte. Une étude sérologique exhaustive réalisée en 1976 n'a pas rapporté la présence d'anticorps neutralisants réactifs au SFNV dans les sérums humains des populations algériennes à Tamanrasset et à Djanet au sud d'Algérie (Tesh *et al*, 1976). Cependant, une étude récente, menée au Nord d'Algérie (région de Kabylie, Draa Ben Khedda), a permis l'isolement d'une souche de TOSV sur un total de près de 23 000 phlébotomes. Le génome complet a été séquencé et les études phylogénétiques ont indiqué qu'il était le plus étroitement apparenté à la souche TOSV de la Tunisie dans la lignée A. Cela a été consolidé par l'étude de séroprévalence de ce virus chez des personnes vivant dans la même région qui a montré un taux beaucoup plus élevé que celui observé en Europe du Sud avec 50% des 370 sérums prélevés possédant des anticorps neutralisants contre le TOSV. Cela montre clairement la présence de virus dans la région (Alkan *et al*, 2015).

Une autre étude, toujours en Kabylie, a permis la détection d'une séquence étroitement apparentée à celle de SFSV détectée chez *Phlebotomus ariasi*, ainsi que la présence immunoglobulines G contre SFSV dans trois sur 60 échantillons de sérum humain, ce qui suggère que SFSV est présent en Algérie (Izri *et al*, 2008).

Prises ensemble, ces découvertes récentes nous ont conduit à mener des investigations sur le terrain dans une autre région au Nord d'Algérie (Bougaa, Sétif), distincte de la kabylie, où les cas de leishmaniose viscérale sont enregistrés associés à une forte densité de phlébotomes.

Les analyses moléculaires ont révélé l'absence de TOSV et de SFSV dans les 4363 phlébotomes collectés dans cette localité. Cela peut être expliqué par le fait que ces deux phlébovirus sont réellement absents dans cette région, ou par le fait que le nombre testé était insuffisant pour leur mise en évidence. Car il a été démontré que le résultat des campagnes sur le terrain pour la détection de nouveaux virus est lié au nombre de phlébotomes piégés et testés : plus le nombre de phlébotomes est grand, plus les chances de trouver les virus sont grandes (Ayhan *et al*, 2017).

Les études de séroprévalence pour la recherche d'antigène contre les phlébovirus chez les patients présentant des fièvre pendant l'été sont aussi d'un grand intérêt pour aider les chercheurs à l'étape de conception des études de terrain visant la détection, l'isolement et la caractérisation des virus transmis par les phlébotomes (Tesh *et al*, 1976). Dans notre étude, aucune donnée sur la séroprévalence de ces virus n'a été rapportée de cette région.

Des études plus profondes sont nécessaires pour l'établissement d'une base de données sur la prévalence de ces virus en Algérie surtout dans les régions où les leishmanioses sont endémiques.

Concernant les bactéries, les phlébotomes du genre *Lutzomyia* sont les seuls connus pour leur pouvoir vecteur de *Bartonella bacilliformis*, agent de la maladie de Carrion dans le nouveau monde (Minnick *et al*, 2014).

Ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation de la structure et de la fonction du microbiome associé aux phlébotomes, ce qui est essentiel pour une compréhension globale de leur biologie et de leur écologie.

Dans notre étude, pour la première fois en Algérie, nous nous sommes intéressés à la recherche des bactéries à intérêt médical chez les phlébotomes, en utilisant la qPCR ciblant des gènes spécifiques de *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* et d'*Anaplasmatocae*. Ces bactéries sont généralement associées aux tiques qui les transmettent aux humains et aux animaux, leur causant ainsi des maladies potentiellement graves (Rar and Golovljova, 2011).

Nos résultats ont montré l'absence d'ADN de *Rickettsia* spp. et de *Coxiella burnetii* chez les phlébotomes dans notre série. Contrairement à ces résultats, une étude basée sur l'amplification du gène 16S de bactéries chez *Phlebotomus chinensis*, vecteur de leishmaniose viscérale en Chine, a montré la présence d'ADN de bactéries intracellulaires du genre *Rickettsia* pour la première fois chez les phlébotomes. Dans la même étude, l'ADN des *Coxiellaceae* a été mis en évidence (Li *et al*, 2016).

Fait intéressant, nos résultats rapportent, pour la première en Algérie, la présence de l'ADN des *Anaplasmatocae* chez les phlébotomes, avec une prévalence de 36.48%, soit 270 sur 740 spécimens de phlébotomes testés dans cette étude. Cette forte présence de bactéries appartenant à cette famille peut probablement expliquer le faible taux de parasite *Leishmania* détecté chez les phlébotomes dans cette série (Voir section résultats dans le chapitre III), car il a été prouvé que les microorganismes qui résident dans l'intestin des phlébotomes sont capables d'inhiber leur infection par *Leishmania* (Schlein *et al*, 1985 ; Sant'Anna *et al*, 2014).

La famille des *Anaplasmatocae* comprend essentiellement les genres d'*Anaplasma*, *Ehrlichia* et *Neorickettsia* et *Wolbachia*. Les espèces appartenant au genre *Anaplasma* sont transmises par les tiques, plusieurs d'entre elles sont des pathogènes émergents responsables d'infections chez l'homme et l'animal (Dahmani *et al*, 2015).

Parmi les membres de la famille *Anaplasmatocae*, les bactéries de *Wolbachia* spp. n'ont été associées aux espèces de phlébotomes que récemment (Zhou *et al*, 1998 ; Cui *et al*, 1999 ; Ono *et al*, 2001 ; Parvizi *et al*, 2003 ; Matsumoto *et al*, 2008). En 2016, Li et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de l'ADN de bactéries de ce genre chez les phlébotomes de Chine.

La présence d'*Anaplasmatocae* dans notre série représente probablement en grande partie l'ADN *Wolbachia* spp.. Cependant, la présence d'autres espèces appartenant aux autres genres

de la famille d'*Anaplasmataceae* n'est pas à exclure. L'amplification et le séquençage de fragments plus spécifiques aux bactéries au sein de cette famille est donc recommandée.

Ces résultats préliminaires ouvrent une piste de recherche plus profonde sur les bactéries appartenant à cette famille ainsi que d'autres associées aux phlébotomes en Algérie, notamment avec la détection de bactéries appartenant aux genre *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Candidatus Neoehrlichia* et *Rickettsia* chez les moustiques en chine (Guo et al, 2016).

## **IV.5. Conclusion et perspectives**

Les phlébotomes sont des insectes hématophages qui se nourrissent sur un large éventail de mammifères et cela se traduit par leur rôle dans la transmission de divers pathogènes tels que les parasites, les virus et les bactéries.

Dans cette étude nous avons investigué, par outils moléculaires, la présence des phlébovirus et de bactéries associées aux phlébotomes collectés au nord d'Algérie dans les localités de Bougaa et Bourkika respectivement.

Nos résultats révèlent l'absence de phlébovirus TOSV et SFSV chez les phlébotomes de Bougaa. Ces résultats sont préliminaires et nous incitent à élargir cette investigation en menant des recherches épidémiologiques (séroprévalence des virus chez la population occupant la région) et entomologiques dans cette régions ainsi que d'autres où des données sur la présence des leishmanioses sont disponibles qui constituent des éléments nécessaires pour la conception de ce genre d'études.

L'ADN d'*Anaplasmataceae* a été présent en forte prévalence chez les phlébotomes de Bourkika testés dans notre série. Ces résultats préliminaires renforcent notre volonté d'identifier et de caractériser les bactéries qui peuvent êtres hébergées par les phlébotomes d'Algérie. Ces résultats, dans l'attente de les compléter par le séquençage de parties spécifiques du génome des *Anaplasmataceae*, vont fournir pour la première fois des données sur la présence de bactéries chez les phlébotomes en Algérie.

---

---

## **Conclusion générale**

---

---

**L**a surveillance et le contrôle des maladies infectieuses circulant au sein du monde animal et des populations humaines sont les clés de réussite des programmes de lutte contre elles. C'est dans cette optique que nous avons mené de pair des recherches épidémiologiques et des études moléculaires sur les leishmanioses dans les régions du nord de l'Algérie.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de notre formation doctorale sur l'écologie des systèmes vectoriels et de notre sujet de thèse porte sur « la surveillance et le contrôle des leishmanioses dans le Nord d'Algérie ».

Les résultats acquis au cours de ces travaux nous ont fourni une connaissance préalable et approfondie des éléments de la triade de transmission des leishmanioses : une détection rapide et efficace, l'identification et l'enregistrement des cas humains ; l'étude profonde de la diversité et de l'écologie de la faune phlébotomienne ainsi que la relation intime entre cette dernière avec l'hôte et l'agent infectieux.

En premier lieu, nous avons mené une étude comparative sur les patients consultants à l'Hôpital Central de l'Armée (HCA, Alger, Algérie), qui nous a permis de démontrer l'apport des techniques moléculaires PCR et PCR-RFLP dans le diagnostic de leishmaniose cutanée par rapport aux autres techniques conventionnelles (parasitologiques et sérologiques) utilisées dans les services sanitaires en Algérie.

La grande sensibilité de la PCRk ciblant le gène kinétoplastique de *Leishmania* rapportée dans notre étude exprime sa performance dans la détection rapide et efficace de quantités minimales de parasites dans les prélèvements cutanés et sanguins. En outre, la PCR-ITS1-RFLP nous a permis d'identifier les espèces de *Leishmania* en cause, ce qui est indispensable pour un choix thérapeutique approprié et pour le suivi de l'évolution de la maladie, notamment, dans les deux cas où l'infection est due à l'espèce viscérotrope, *L. infantum*.

L'introduction, l'application et la standardisation de ces techniques aux secteurs sanitaires sur le territoire national, ainsi que l'établissement des collaborations entre les laboratoires performants qui possèdent ces technologies avec les services sanitaires dans les zones endémiques ou à risque est fortement recommandée afin d'estimer l'incidence réelle des leishmanioses en Algérie.

Les données épidémiologiques extraites de la première étude, où nous avons rapporté deux cas de leishmaniose cutanée due à *L. infantum* provenant de Tipaza, réunies avec les informations que nous avons collectées auprès de la DSP de Tipaza nous ont tracé le chemin

pour une deuxième étude de terrain sur les phlébotomes de cette région, dans le but d'identifier les facteurs de risque d'une flambée de ces parasitoses.

L'inventaire faunistique des espèces de phlébotomes collectées dans cette région a révélé leur forte abondance avec une présence majoritaire et sympatrique de trois espèces vectrices de *L. infantum* dans le nord d'Algérie : *P. (L.) perniciosus*, *P. (L.) longicuspis* et *P. (L.) perfiliewi*, appartenant au sous-genre *Laroussius*. En outre, l'investigation épidémiologique des phlébotomes nous a permis de détecter et d'identifier l'espèce de parasite circulant chez leur vecteur naturel. Nous avons détecté *L. infantum* viscerotrope chez *P. (L.) perniciosus*, et *L. infantum* dermatrope chez *P. (L.) perfiliewi*.

Pour la première fois en Algérie, nous avons des données moléculaires sur l'origine du repas sanguin des phlébotomes femelles gorgées collectées sur terrain. Ces résultats ont révélé un comportement hématophage qui repose principalement, mais pas exclusivement, sur les petits ruminants (animaux non réservoirs de *Leishmania*), ce qui nous a permis d'expliquer le faible taux d'infection des phlébotomes par *Leishmania*. Toutefois, nous ne pouvons pas ignorer l'intime relation de ces insectes avec les humains qui constituent leur deuxième source de sang dans nos résultats.

Cette étude a fourni des données inestimables sur l'épidémiologie des leishmanioses dans une région prétendant être hypoendémique, mais où tous les éléments nécessaires pour leur émergence fonctionnent à bas bruit. Des études ultérieures dans d'autres régions du pays sont sans doute à venir, avec pour perspective la création d'un comité de surveillance et de contrôle de ces affections ainsi que d'autres zoonoses qui aura pour mission d'actualiser les données épidémiologiques, de coordonner les actions de surveillance et d'unifier les méthodes de diagnostic, de traitement et de lutte contre les maladies à transmission vectorielle.

Dans la dernière ligne droite, nous avons ouvert une nouvelle piste de recherche de pathogènes autres que les leishmanies, qui peuvent être associés aux phlébotomes d'Algérie : les phlébovirus et les bactéries.

Les résultats obtenus nous ont révélé l'absence de *Toscana virus* et *Sand Fly Sicilian Virus* chez les phlébotomes collectés à Bougaa (Sétif, Algérie). Cela nous motive pour élargir l'étude par la collecte d'un nombre significatif de phlébotomes dans des régions à forte abondance en associant des données sur la séroprévalence chez les populations qui résident dans ces régions.

Quant à la recherche des bactéries, cela a été abordé pour la première fois chez les phlébotomes en Algérie. La détection moléculaire des *Anaplasmataceae* chez les phlébotomes va être une initiation à d'autres recherches plus profondes sur la caractérisation et la dynamique de ces bactéries au sein de ces insectes. Le séquençage des *Anaplasmataceae* détectées dans notre étude est notre prochaine étape.

Dans le domaine des interrelations entre les êtres vivants, les aspects de transmission par vecteur jouent un rôle important et occupent une place transversale reliant tous les grandes catégories des règne vivant (virus, bactéries protozoaires et métazoaires). Dans cette diversité, la nature démontre qu'elle est plus souvent plus imaginative que les concepts rigides élaborés par l'esprit humain dans un souci de classifier. De surcroît, cette diversité elle-même est changeante, la distribution des espèces vectrices varie, la structure génétique des agents infectieux se modifie, les comportements des hôtes changent. La recherche continue est le seul moyen pour surveiller, évaluer afin d'agir en harmonie avec ces changement.

---

---

## **Bibliographie**

---

---

- Aara N, Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Ghiya BC, Jakhar R, et al. Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89(1): 111-5.
- Abdelouabab A, Mesli M.F, Ahmed Fouatih Z. Les leishmanioses en Algérie : situation épidémiologique. *Bull Soc Pathol Exot*, 2007 ; 100(4) : 303-8.
- Abonnenc E, Leger N. Sur une classification rationnelle des diptères phlébotomidae. *Cahiers de l'ORSTOM, Série Entomologie Médicale et parasitologie* 1976 ; (14) : 69-78.
- Abonnenc E. Les phlébotomes de la region éthiopienne (Diptera: Psychodidae). *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasitol*, 1972; (14): 69-77.
- Adel A, Boughoufalah A, Saegerman C, De Deken R, Bouchene Z, Soukehal A, Berkvens D, Boelaert M. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Algeria: An Update. *PLOS ONE*, 2014 ; 9(6) : e99207.
- Adler S & Theodor O. Transmission of disease agents by phlebotomine sandflies. *Ann. Rev. Ent*, 1957; (2): 203.
- Ahluwalia S, Lawn SD, Kanagalingam J, Grant H, Lockwood DN. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travelers to Central and South America. *Br Med J*, 2004; 329:842–4.
- Ajaoud M, Es-Sette N, Charrel RN, Laamrani-Idrissi A, Nhammi H, Riyad M, et al. *Phlebotomus sergenti* in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Azilal Province (High Atlas, Morocco): Molecular Detection and Genotyping of *Leishmania tropica*, and Feeding Behavior. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015 ; 9: 1–17.
- Akhoundi, M. et al. Diversity of the bacterial and fungal microflora from the midgut and cuticle of phlebotomine sand flies collected in North-Western Iran. *PLoS One*, 2012.
- Akopyants, Natalia S Kimblin, Nicola Secundino, Nagila Patrick, Rachel Lawyer, Phillip Dobson, Deborah E Beverley, Stephen M and David, L. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 2009; 324(5924): 265–268.
- Alcover MM, Gramiccia M, Di Muccio T, Ballart C, Castillejo S, Picado A, et al. Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis. *Parasitol Res*, 2012 ; 111: 515–523.
- Alexander J, Brombacher F. T-helper 1/T-helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol*, 2012; 3:80.

- Alkan C, Allal-Ikhlef A. B, Alwassouf S, Baklouti A, Piorkowski G, De Lamballerie X, Izri A & Charrel R. N. Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria. *Clin Microbiol Infect*, 2015 ; 21: 1040.e1–1040.e9.
- Alkan C, Alwassouf S, Piorkowski G, Bichaud L, Tezcan S, Dincer E, Ergunay K, Ozbel Y, Alten B, de Lamballerie X, Charrel RN. Isolation, genetic characterization, and seroprevalence of Adana virus, a novel phlebovirus belonging to the Salehabad virus complex, in Turkey. *J Virol*, 2015 ; 89:4080–4091.
- Allahverdiyev A M, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu H R. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2004 ; 70(3) : 294-297.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 2012; 7(5).
- Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegao de Camargo R, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009; 23(9): 1026-34.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010 Oct; 35(7):699e705.
- Ampuero J, Pereira Rios A, Carranza-Tamayo C.O & Sierra Romero G.A. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem. Inst*, 2009 ; 104(7).
- Anders G, Eisenberger CL, Jonas F, Greenblatt CL. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002 ; 96:S87–S92.
- Antoine J.C., Lang T., Prina E., Courret N. & Hellio R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalize by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci*, 1999; 112: 2559-70.
- Aoun K & Bouratbine A. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa. *Parasite*, 2014; 21(14).
- Aoun K, Bouratbine A, Harrat Z, Guizani I, Mokni M, Bel Hadj Ali S, Ben Osman A, Belkaïd M, Dellagi K, Ismaïl RB. Données épidémiologiques et parasitologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien. *Bull Soc Pathol Exot*, 1999 ; 93(2) : 101–103.

- Ashkan MM, Rahim KM. Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran. *Trop Doct*, 2008; 38(3):186-8.
- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol*, 1999 ; 85(2):181–187.
- Ayaz Najafov GH. An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists. *Kindle Edition*, 2008.
- Ayhan A, Baklouti A, Prudhomme J, Walder G, Amaro F, Alten B, Moutailler S, Ergunay K, Charrel N and Huemer H. Practical Guidelines for Studies on Sandfly-Borne Phleboviruses : Part I: Important Points to Consider Ante Field Work. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 2017 ; 17 (1).
- Azmi K, Nasereddin A, Erekat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a ‘gold standard’ in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011 ; 71(2) :151–155.
- Baili Choumara H, Abonnenc E & Pastre J. Contribution à l'étude des Phlébotomes du Maroc, données faunistiques et écologiques. *Ent. méd Parasitol*, 1971 ; 4 : 431–460.
- Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal*, 2008; 175:14–5.
- Barchiche N A, Madiou M. Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. *Pathologie Biologie*, 2009 ; 57 : 65–70.
- Barhoumi W, Fares W, Cherni S, Derbali M, Dachraoui K, Chelbi I, et al. Changes of sand fly populations and *Leishmania infantum* infection rates in an irrigated village located in arid central Tunisia. *Int J Environ Res Public Health*, 2016 ; 13 : 1–10.
- Basiye FL, Mbuchi M, Magiri C, Kirigi G, Deborggraeve S, Schoone GJ, et al. Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-Test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Tropical Medicine & International Health TM IH*, 2010; 15: 806–10.
- Bates P A, Depaquit J, Galati E AB, Kamhawi S, Maroli M, McDowell M A, Picado Alb, Ready P D \*, Salomón O D, Shaw J J, Traub-Csekö Y M and Warburg A. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 2015; 8:131.
- Baum M, de Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz D do R, et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission

- area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Trop. Elsevier B.V*, 2015; 143: 8-12.
- Baum M, de Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz D do R, et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Trop. Elsevier B.V*, 2015 ; 143: 8–12.
- Belazzoug S, Ammar Khodja A, Belakaid M, Tabet-Derraz O. La leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, 1885 ; 78:615-22.
- Belazzoug S. The sand flies of Algeria. *Parassitologia*, 1991 ; 33 : 85-87.
- Ben Ghazi M. La leishmaniose viscérale de l'adulte (Etude de 18 observations en médecine interne). *Thèse doctorat en Médecine, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Algérie*, 2010 : p.92.
- Benallal K, Gassen B, Bouiba L, Depaquit J, Harrat Z. Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta Tropica*, 2013; 128: 518– 521.
- Bensoussan E, A Nasereddin, F Jonas, L F Schnur, and CL Jaffe. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol*, 2006; 44:1435–1439.
- Berdjane-Brouk Z, Charrel R.N, Bitam I, Hamrioui B & Izri A. Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 And *Phlebotomus (Larrousius) chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite*, 2011 ; 18 : 337-339.
- Berdjane-Brouk Z, Charrel RN, Hamrioui B, Izri A. First detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Parasitol Res*, 2012; 111: 419–422.
- Berdjane-Brouk Z, Koné AK, Djimdé AA, Charrel RN, Ravel C, Delaunay P, et al. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS One*, 2012 ; 7: 1–5.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2000; 63(3-4): 153-157.
- Biglino A.L, Bollal C, Concialdil E, Trisciuglio A, Romano A & Feroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J. Clin. Microbiol*, 2010 ; 48(1) : 131-136.
- Blanco VM, Cossio A, Martinez JD, Saravia NG. Clinical and epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis in Colombian children: considerations for local treatment. *Am J Trop Med Hyg*, 2013; 89(2): 359-64.

- Bley D. Les maladies à transmission vectorielle, pourquoi s'y intéresser ?. *Natures Sciences Sociétés*, 2010 ; 2 (18) : 101-102.
- Boggild A K, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A, Low D E. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2008; 79(6): 847-852.
- Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop*, 2003 ; 88: 109–116.
- Boubidi SC, Benallal K, Boudrissa A, Bouiba L, Bouchareb B, Garni R, et al. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes Infect. Elsevier Masson SAS*, 2011 ; 13: 691–696.
- Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi I, Benbetka S, et al. Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria. *Bull Soc Pathol Exot*, 2012 ; 105 : 30–35.
- Boussaa S, Kahime K, Samy AM, Salem A Ben, Boumezzough A. Species composition of sand flies and bionomics of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) in cutaneous leishmaniasis endemic foci, Morocco. *Parasit Vectors*, 2016 ; 9 : 60.
- Braga AS, Toledo Junior AC, Rabello A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2013; 46(1):55-59.
- Briffod C. Revue actuelle en matière de leishmaniose canine. *Thèse doctorat en vétérinaire, Université de Toulouse, France*, 2011.
- Camargo J.B, Langoni H, Troncarelli M.Z, Machado J.G, Lucéis S.B & Padovani C.R. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Trop. Dis*, 2010 ; 16(3).
- Campino L, Cortes S, Dionísio L, Neto L, Afonso MO, Maia C. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2013 ; 108 : 516–518.
- Chargui N, Bastien P, Kakkal K, Haoues N, Akrouf M.F, Masmoudi A, Zili J, Chaker E, Dhahri-Ben Othman A, Azaiez R, Crobu L, Mezhoud H & Babba H. Use full of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Trans RSoc Trop Med Hyg*, 2005 ; 99 (10): 762-768.
- Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sánchez-Seco MP, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis*, 2005 ; 11 : 1657–63.

- Cherif K, Boudrissa A, Hamdi Cherif M, Harrat Z. Un programme social pour la lutte physique contre la leishmaniose cutanée zoonotique dans la wilaya de M'Sila en Algérie. *Santé Publique*, 2012 ; 24 : 511-522.
- Chouih E, Amri F, Bouslimi N, Siala E, Selmi K, Zallagua N, Ben Abdallah R, Bouratbine A, Aoun K. Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses. *Pathologie Biologie*, 2008; 219–224.
- Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis*, 2004; 38(5): 612-9.
- Constantina N, Tsokana, Labrini V, Athanasiou, George Valiakos, Vassiliki Spyrou, Katerina Manolakou and Charalambos Billinis. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In David M. Claborn éd. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. In Tech*, 2014; 162-173.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2004; 98:12–7.
- Costa, M.A.; Matheson, C.; Iachetta, L.; Llagostera, A.; Appenzeller, O. Ancient leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile. *PLoS One*, 2009; 4(9) : e6983.
- Cotteaux-Lautard C, Leparco-goffart I, Berenger JM, Plumet S, Pages F. Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotominae) in a focus of Toscana virus (TOSV) in South of France. *Acta Trop. Elsevier B.V* , 2016 ; 153 : 64–69.
- Cox F. E. G. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15(4): 595-612.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19(1):111e26.
- Cruz AK, de Toledo JS, Falade M, Terraio MC, Kamchonwongpaisan S, Kyle DE, Uthaipibull C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.*: a review. *Curr. Drug Targets*, 2009; 10(3): 178-192.
- Cui, L., S. H. Chang, D. Strickman, and E. Rowton. Frequency of *Wolbachia* infection in laboratory and field sand fly (Diptera: Psychodidae) populations. *J. Am. Mosq. Control Assoc*, 1999 ; 15 : 571-572.
- Dahmani M, Davoust B, Benterki M.S, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma*

- phagocytophilum and Anaplasma platys in cattle from Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis*, 2015 ; 39 : 39–45.
- De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh-Karki B M, Decuypere S, Jacquet D, Le Ray D, Boelaert M, Koirala S, and Dujardin J C. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 2005; 99: 25–31.
- De Trez C, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Muraille E. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog*, 2009; 5(6):e1000494.
- Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008; 198:1565–72.
- Dedet J.-P. Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. *EMC Elsevier Masson SAS, Paris, Maladies infectieuses*, 2009 ; 8-506-A10.p.14.
- Dedet J-P, Addadi K, Belazzoug S. Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. Cah. ORSTOM. Sér. Ent. Méd. Parasitol, 1984; XXII (22): 99-127.
- Depaquit J & Léger N. Les phlébotomes (*Diptera : Psychodidae : Phlebotominae*). In : Duvallat G, Fontenille D & Robert V (Ed.), 2017, Entomologie Médicale et Vétérinaire : 295-320.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: A review. *Euro Surveill*, 2010; 15(10): 19507.
- Depaquit J, Naucke TJ, Schmitt C, Ferté H, Léger N. A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. *Parasitol Res*, 2005 ; 95: 113–116.
- Depaquit J. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infect. Genet. Evol*, 2014; (28): 744-756.
- Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*, 2003; 97(Suppl.1):3-15.
- Desjeux P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2004 ; 27(5) : 305-318.
- Dieme, C. et al. Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015 ; 112 : 8088–8093.
- Dillon, R. et al. The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, 1996 ; 90 : 669–673.

- Djebbouri Y. Profil épidémiologique, thérapeutique et évolutif de la leishmaniose cutanée (à propos de 52 cas) ; expérience du service de dermatologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail-Meknès. *Thèse de Doctorat en médecine*, 2013.
- Dolmatova A.V., Demina N.A., 1971. Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. *Cah. ORSTOM Documentation tech.* No. 55, p. 289.
- Doury P. A propos de l'épidémiologie des Leishmanioses en Algérie. *BullSocPatholExot*, 1996 ; 89(30) : 1.
- Duckhouse D, Lewis D. Family Psychodidae. In: Crosskey RW. (Ed.), Catalogue of the Diptera of the Afrotropical region. *British Museum (Natural History), London*, 1980; 93-105.
- Eddaikra N, Aït-Oudhia K, Oury B, Harrat Z and Sereno D. Retrospective and ongoing researches on *Leishmania* antimony resistance in Algeria. *Microbial pathogens and strategies for combating them : science, technology and education*, 2013 ; 678-689.
- Ehrnst A, Peters CJ, Niklasson B, Svedmyr A, Holmgren B. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *Lancet*, 1985 ; 1(8439) : 1212-3.
- Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2004; 20(11):524-30.
- Er-Rami M, Benjelloun S, Lahlou H, Khalloufi A, El Kartouti A, Zeroual A, Jakar A & El Haouri M. La leishmaniose cutanée à l'hôpital militaire Moulay Ismaïl de Meknès (Maroc) : à propos de 49 cas diagnostiqués entre 2005 et 2011. *Pathol Biol (Paris)*, 2012 ; p.5.
- Estevez Y. Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure activité. *Thèse doctorat en Innovation Pharmaceutique*, Université de Toulouse, France, 2009.
- Euzeby J. Leishmanioses : histoire naturelle. *Médecine et armées*, 1994 ; 22(1) :11-14.
- Fairchild G. The relationships and classification of the phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am*, 1955; (48): 182-196.
- Famkan K. La leishmaniose cutanée chez les patients reçus à l'unité biologie du cnam de janvier 2002 à octobre 2004. *Thèse pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie*, 2005. Université de Bamako, Mali.
- Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 2004.
- Felipe Francisco Tuon, Vicente Amato Neto & Valdir Sabbaga Amato. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008; 54:158-166.

- Ferroglio E, Centaro E, Mignone W & Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet. Parasitol*, 2007 ; 144:162-166.
- Ferrua B, Le Fichoux Y, Suffia I, Rousseau D, Roptin C, Kubar J. Quantitation of *Leishmania infantum* in tissues of infected BALB/c mouse by sandwich ELISA. *J. Immunoassay Immunochem*, 2001; 22(2): 165-181.
- Fraihy W, Fares W, Perrin P, Dorkeld F, Sereno D, Barhoumi W, et al. An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017 ; 11(3).
- Fsadni C, Fsadni P, Piscopo T, Mallia Azzopardi C. Laryngeal leishmaniasis in Malta. *J Infect*, 2007; 54(2): 61-3.
- Galati E. 2013. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila. Bioecologia e Identificação de phlebotominae. Vol. I. Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.
- Gomes A.H.S, Armelin M.I, Menon S.Z & Pereira-Chiocola V.L. *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 2008 ; 119 (3) : 319–324.
- Gomez B, Sanchez E, Feliciangeli MD. Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA. *J Am Mosq Control Assoc*, 1998 ; 14 : 28–32.
- Gonzalez E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors*, 2017 ; 1–14.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*, 2010; 8(4): 419-433.
- Gouveia, C. et al. Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop. Entomol*, 2008 ; 37 : 597–601.
- Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Maltesean 18 year paediatric, population based study. *Arch Dis Child*, 2000; 82(5): 381-5.
- Guerbouj S, Chemkhi J, Kaabi B, Rahali A, Ismail R Ben, Guizani I. Natural infection of *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2007 ; 101: 372–377.

- Guernaoui, S. et al. Bacterial flora as indicated by PCR-temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) of 16S rDNA gene fragments from isolated guts of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Vector Ecol*, 2011.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011; 5(3): e980.
- Guo, W.-P. et al. Extensive genetic diversity of Rickettsiales bacteria in multiple mosquito species. *Sci. Rep*, 2016.
- Hamad I, Forestier CL, Peeters M, Delaporte E, Raoult D, Bittar F. Wild gorillas as a potential reservoir of *Leishmania major*. *J Infect Dis*, 2015 ; 211 : 267–273.
- Hamilton Bailey and W. J. Bishop. Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis: Sir William Boog Leishman, 1865-1926 & CHARLES DONOVAN, 1863-1951. *Brit. J. vener. Dis.* 1959; 35: 8-9.
- Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*, 1999; 44:1-39.
- Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F, Benikhlef R, Selt B, Dedet JP, et al. Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 ; 103 : 716–720.
- Harrat Z, Pratlong F, Belazzoug S, Dereure J, Deniau M, Rioux JA, et al. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996 ; 90: 625–629.
- Herwald BL, Stokes SL, Juranek DD. American cutaneous leishmaniasis in U.S. travelers. *Ann Intern Med*, 1993; 118: 779–84.
- Herwaldt B L. Leishmaniasis. *Lancet*, 1999; 354:1191–1199.
- HIDE M. Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania donovani*, agent de la leishmaniose viscérale : Etude comparatives des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique. *Thèse Doctorat en Parasitologie, Université de Montpellier II, France*, 2004.
- Hillesland, H. et al. Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2008 ; 79 : 881–886.
- Hommel Marcel. Visceral leishmaniasis: Biology of the parasite. *Journal of Infection*, 1999; 39(2): 101-111.
- Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*, 2006; 12:682-7.

- Institut National de Santé Publique. Situation épidémiologique de l'année 2014. *Relevé Epidémiologiques Mens*, 2014 ; 25: 9.
- Izri A & Belazzoug S. Diagnostic de laboratoire de leishmanioses rencontrée en Algérie. *Revue francophone des laboratoires*, 2007 ; n° 396 : 3-5.
- Izri A, Bendjaballah A, Andriantsoanirina V. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerg Infect*, 2014 ; 20: 502–504.
- Izri A, Temmam S, Moureau G, Hamrioui B, de Lamballerie X and Charrel N. Sandfly Fever Sicilian Virus, Algeria. *Emerging Infectious Diseases*, 2008 ; 14(5) : 795-797.
- Izri M, Belazzoug S, Boudjebla Y, Dereure J, Pratlong S, et al. *Leishmania infantum* MON-1 isolated from *Phlebotomus perniciosus*, in Kabylia (Algeria). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1990 ; 65: 151–152.
- Izri M.A. & Belazzoug S. *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993.
- Jarry D.M. Historique des leishmanioses et leurs complexes pathogènes, in DEDET J-P, « Les leishmanioses », *Edition Ellipses, Paris*, 1999 ; 253 : 13-20.
- Kahime K, Boussaa S, Bounoua L, Fouad O, Messouli M, Boumezzough A. Leishmaniasis in Morocco: Diseases and vectors. *Asian Pacific J Trop Dis*, 2014 ; 4: S530–S534.
- Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E et Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan mediated midgut attachment. *Parasitology*, 2000; 121: 25-33.
- Kamhawi S. Environmental manipulation in the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis focus. *Archives. d'Institut. Pasteur. Tunis*, 1993; 70: 383- 390.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 2006; 22:439-45.
- Karabatsos N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. *San Antonio (TX): American Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 1985.
- Katakura K, Kawazu S, Naya T, Nagakura K, Ito M, Aikawa M; Qu J Q, Guan L R, Zuo X P, Chai J J, Chang K P, Matsumoto Y. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *J. Clin. Microbiol*, 1998; 36(8): 2173-2177.
- Kent RJ. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol Ecol Resour*. 2009;9: 4–18.
- Khademvatan S, Saki J, Maraghi S. Comparison of traditional methods and PCR for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in South-West of Iran. *Zahedan J Res Med Sci*, 2012 ; 14(8):1–5.

- Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & Vectors*, 2012 ; 5: 280.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol*, 1990; (4) : 1-24.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol*, 1999; (17): 279–289.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(10):125-30.
- Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania* parasite detection and quantification using PCRELISA. *Nat. Protoc*, 2010; 5(6): 1074-1080.
- Kobets T, Grekov I and Lipoldová M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19(10): 1443-1474.
- Kone A.K, Delaunay P, Djimé A.A, Thera M.A, Giudice P.D, Coulibaly D, Traoré K, Goita S.M, Abathina A, Izri A, Marty P & Doumbo O.K. Épidémiologie clinique et parasitologique de la leishmaniose cutanée dans cinq villages du Pays Dogon, Mali. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 2011 : p.8.
- Kumar P, Pai K, Tripathi K, Pandey HP, Sundar S. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002; 9: 1119-23.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 2002 ; 40(1) : 210–215.
- Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005; 100: 811-827.
- Lainson. R & J. J. Shaw. Evolution, classification and géographique distribution. The leishmaniasis in Biology and medicine. W. Peters and R. Killick Kendrick, Academic press, London, 1987. Vol 1: 1-120.
- Lanotte, G & Rioux, J A. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* [Kinetoplastida : Trypanosomatidae]. *C. R. Acad. Sc. Paris, Ser. III*, 1990 ; 310 : 285-288.

- Latrofa MS, Dantas-Torres F, Weigl S, Tarallo VD, Parisi A, Traversa D, et al. Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy. *Acta Trop. Elsevier B.V*, 2011 ; 119 : 91–98.
- Le Fichoux Y, Marty P & Kubar J. Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet JP éd. Les leishmanioses. Paris : Ellipses, 1999 : 21-39.
- Léger N, Depaquit J. Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Rev. Fr. labo*, 2001; (338): 41-48.
- LeishGEN Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Fakiola M, Strange A, Cordell HJ, Miller EN, Pirinen M, Su Z, et al. Common variants in the HLA-DRB1-HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. *Nat Genet*, 2013; 45(2):208-13.
- Lemaire X. Premiers cas de leishmaniose en Algérie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1911 ; 4: 554–563.
- Leng Y J. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou province, south west china, and description and discussion of a primitive new genus: *Chinius*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, 1987; (81): 311-317.
- Lewis D, Young D, Fairchild G, Minter D. Proposals for a stable classification of the phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol*, 1977; (2): 319-332.
- Li, K. et al. Diversity of bacteriome associated with *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) sand flies in two wild populations from China. *Sci. Rep.* 6, 36406; doi: 10.1038/srep36406 (2016).
- Lima VM, Fattori KR, Michelin Ade F, da Silveira Neto L, Vasconcelos Rde O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol*, 2010; 173(3-4): 330-333.
- Lima VM, Goncalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MC, Feitosa MM. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 2003; 36(4): 485-489.
- Lindh, J. M., Terenius, O. & Faye, I. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol*, 2005 ; 71 : 7217–7223.
- Locksley R M. & Louis J A. Immunology of leishmaniasis. *Current opinion in immunology*, 1992; (4): 413-418.
- M'hatef A, Halfaya Z, Saidi N , Kharchi N. La leishmaniose viscerale dans la Wilaya de Sétif. Approche epidemiologique et economique de la maladie. *Résumés-IXème-journée-*

- nationale sur les leishmanioses. Société Algérienne de Parasitologie et Mycologie Médicale SAPMM.*
- Maia C & Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 2008 ; 158 : 274-287.
- Maleki-Ravasan, N. et al. Aerobic Microbial community of insectary population of *Phlebotomus papatasi*. *J. Arthropod. Borne. Dis*, 2014, 8 ; 69–81.
- Maltezou HC. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Maltezou HC. Leishmaniasis. In: Maltezou HC, Gikas A, editors. *Tropical and emerging infectious diseases. Kerala, India: Research Signpost*, 2010: 163–185.
- Maltezou HC. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. *Recent Pat Anti-infect Drug Discov*, 2008; 3:192–8.
- Manson-Bahr & P. E. C. Old World leishmaniasis. In F. E. G. Cox (ed.), “The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases”. *The Wellcome Trust, London, United Kingdom*. 1996: 206–217.
- Mansouri R, Pratlong F, Bachi F, Hamrioui B, Dedet J. The first isoenzymatic characterization of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous Leishmaniasis in the area of Annaba (Eastern Algeria). *Open Conf Proc J*, 2012; 3: 6–11.
- Markle MH, Markhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Pharm Physician*, 2004; 69:1455–60.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichau L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*, 2013 ; 27 : 123–47.
- Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macías J, De La Rosa R, et al. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2002;96:669–77.
- Marty P, Delaunay P, Fissore C. & Lefichoux Y. La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum* mise au point – intérêts des tests de diagnostic rapide: it-leish et id-pagia leishmaniasis. *MedTrop*, 2007 ; 67 : 79-85.
- Marty P, Pomares-Estran C, Hasseine L, Delaunay P, Haas H & Rosenthal E. Actualités sur les leishmanioses en France. *Archives de pédiatrie*, 2009; 16 (S2) : 96-100.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol*, 2004 ; 42 : 5249–5255.

- Matsumoto K, Izri A, Dumon H, Raoult D and Parola P. First Detection of *Wolbachia* spp., Including a New Genotype, in Sand Flies Collected in Marseille, France. *Vector-Borne Diseases, Surveillance, Prevention*, 2008 ; 45(3) : 466-469.
- Matsumoto T, Hashiguchi Y, Gomez EA, Calvopina MH, Nonaka S, Saya H, Mimori T. Comparison of PCR results using scrape/exudate, syringesucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999 ; 93(6) : 606–607.
- McCarthy, C., Diambra, L. & Rivera Pomar, R. Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 2011.
- McMahon Pratt D & David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*, 1981; 291(5816): 581-583.
- Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez J.F, Sokhna C, Trape J.F, Raoult D. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 2010 ; 4 : 1–8.
- Meece JK, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson TA, Christensen JE, Reed KD, et al. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *J Med Entomol*. 2005;42: 657–67. doi:10.1093/jmedent/42.4.657.
- Mhaidi I, El Kacem S, Ait Kbaich M, El Hamouchi A, Sarih M, Akarid K, et al. Molecular identification of *Leishmania infection* in the most relevant sand fly species and in patient skin samples from a cutaneous leishmaniasis focus, in Morocco. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018 : 12(3).
- Mihoubi I, Stéphane Picot S, Hafirassou N, De Monbrison F. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008 ; 102, 1157—1159.
- Mihoubi I. Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Med Trop*, 2006 ; 66 : 39-44.
- Minnick MF, Anderson BE, Lima A, Battisti JM, Lawyer PG, et al. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014 ; 8(7).
- Molina I, Falco V, Crespo M, Riera C, Ribera E, Curran A, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*, 2007; 60: 837–42.

- Morizot G, Delgiudice P, Caumes E, Laffitte E, Marty P, Dupuy A, et al. Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? *Am J Trop Med Hyg*, 2007; 76:48–52.
- Moureau G, Bichaud L, Salez N, Ninove L, Hamrioui B, Belazzoug S, et al. Molecular and serological evidence for the presence of novel phleboviruses in sandflies from Northern Algeria. *Open Virol J* 2010 ; 4 : 15–21.
- Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J & Riyad M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasites & Vectors*, 2014 ; 7:420.
- Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Basiye FL, Saad AA, El Safi S, et al. Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2010; 3:13.
- Mukhopadhyay, J. et al. Naturally occurring culturable aerobic gut flora of adult *Phlebotomus papatasi*, vector of *Leishmania major* in the Old World. *PLoS One*, 2012.
- Murray H W, Berman J D, Davies C R, Saravia N G. Advances in Leishmaniasis. *The lance*, 2005; 366 (29): 11.
- Nadim, A.J.; Javadian E.; Mohebbali, M. The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health J*, 1997; 3(2): 284-289.
- Neffati A, Kallel K, Anene S, Kaouch E, Belhadj S, Ennigrou S, Chaker E. Choix des amorces : élément déterminant dans le diagnostic moléculaire de la leishmaniose cutanée. *Pathologie Biologie*, 2009 ; 59 (2011) : e119–e123.
- Neveu-Lemaire M., 1938. Sous-famille: Phlebotominae. *Traité d'entomologie médicale et vétérinaire. Edition Vigot- Frrères, Editeurs, Paris.* 1050-1075.
- Niang A-A., Geoffroy B., Angel G., Trouillet J., Killik-Kendrick R., Hervy J-P., Brunhes J., 2000. Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest. *Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD edition.*
- Niare S, Berenger J-M, Dieme C, Doumbo O, Raoult D, Parola P, et al. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. *Malar J. BioMed Central*, 2016 ; 15 : 87.
- Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 2002; 51:295–9.

- Nicoletti L, Verani P, Caciolli S, Ciufolini MG, Renzi A, Bartolozzi D, et al. Central nervous system involvement during infection by Phlebovirus toscana of residents in natural foci in central Italy (1977–1988). *Am J Trop Med Hyg*, 1991 ; 45 : 429–34.
- Noyes H A, Reyburn H, Bailey J W, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol*, 1998; 36(10): 2877-2881.
- Nzulu CO, Kato H, Puplampu N, Desewu K, Odoom S, Wilson MD, et al. First Detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* Species in *Sergentomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from an Outbreak Area of Cutaneous Leishmaniasis in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014 ; 8(2).
- Okwor I, Uzonna JE. The immunology of leishmania/HIV coinfection. *Immunol Res*, 2013; 56(1):163-71.
- Ono, M., H. R. Braig, L. E. Munstermann, C. Ferro, and S. L. O'Neill. *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 2001 ; 38: 237-241.
- Organisation Mondiale de la Santé. Investir pour réduire l'impact mondial des Maladies Tropicales Négligées. *Troisième rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées*, 2015 : 118-126.
- Pace D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 2014 ; 69: 10-18.
- Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva C, Gomes Y. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania infantum*) infection: a minireview. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 2010; 16:537–42.
- Paniz Mondolfi AE, Duffey GB, Horton LE, Tirado M, Reyes Jaimes O, Perez-Alvarez A, et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 2013; 52(4): 446-55.
- Parvizi, P. and Amirkhani A. Mitochondrial DNA characterization of *Sergentomyia* sintoni populations and finding mammalian *Leishmania* . *Iran J Vet Res*, 2014 ; 9: 22.
- Parvizi, P., M. Benlarbi, and P. D. Ready. Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sand fly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, *Iran. Med. Vet. Entomol*, 2003 ; 17 : 351-362.
- Paul A Bates, Jérôme Depaquit, Eunice AB Galati, Shaden Kamhawi, Michele Maroli, Mary Ann McDowell, Albert Picado, Paul D Ready, O Daniel Salomón, Jeffrey J Shaw, Yara M Traub-Csekö and Alon Warburg. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 2015; 8: 131.

- Pavli A. & Maltezou H C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010; (14): e1032–e1039.
- Pérez-Ayala A, Norman F, Perez-Molina JA, Herrero JM, Monge B, Lopez-Velez R. Imported leishmaniasis, a heterogeneous group of diseases. *J Travel Med*, 2009; 16: 395–401.
- Pimenta P, Elviram B, Saraiva and David L. Sacks. The Comparative Fine Structure and Surface Glycoconjugate Expression of Three Life Stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, 1991; 72: 191-204.
- Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, Turco SJ et Sacks DL. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1994; 91: 9155-9156.
- Pinto M.C, Campbell-Lendrum D.H, Lozovei A.L, Teodoro U et Davies C.R. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med.Vet. Entomol*, 2001; 15: 132-139.
- Pourmohammadi B, Motazedian M.H, Hatam G.R, Kalantari M, Habibi P & Sarkari B. Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Parasitol*, 2010 ; 5(4) : 1–8.
- Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and “ Candidatus Neoehrlichia” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol*, 2011 ; 11 : 1842–1861.
- Ready PD, Fraiha H, Lainson R, Shaw JJ. Psychodopygus as a genus: reasons for a flexible classification of the phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol*, 1980; (17): 75-88.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol*, 1999 ; 37(9) : 2931–2935.
- Reithinger R & Dujardin J C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; p. 21–25.
- Ritmeijer K, Davies C, van Zorge R, Wang SJ, Schorscher J, Dong’udu SI and Davidson RN. Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Trop. Med. Int. Health*, 2007; 12: 404- 414.

- Rodrigues G.H.E, Brito F.E.M, Mendonça G.M. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J. clin. Microbiol*, 2002 ; 40: 3572-3576.
- Rodriguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom B R, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol*, 1994; 32(9): 2246-2252.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004; 430:463-467.
- Rolain J.M, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2002 ; 46, 2747–2751.
- Rosal Rabes Td, Baquero-Artigao F, García Miguel MJ. Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Atención Primaria*, 2010 ; 12:263-71.
- Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop*. 2008 ; 105 : 158–165.
- Sant’Anna M. et al. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit. Vectors*, 2014 ; 7(329).
- Sant’Anna MR V, Darby AC, Brazil RP, Montoya-Lerma J, Dillon VM, Bates PA, et al. Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One*, 2012 ; 7 : 1–10.
- Sarrouy C.H., Combe P, Claude R. Un cas de kala-azar infantile traité par la diamidine. *Algérie Médical*, 1946 ; 447-448.
- Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 2015 ; 9(6) :588-596.
- Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health TM IH*, 2002; 7: 641–51.
- Schlein Y, Polacheck I & Yuval B. Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology*, 1985 ; 90(1) : 57–66 (1985).

- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003 ; 47(1) : 349–358.
- Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41:1529–35.
- Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, et al. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol*, 2006; 36: 237-246.
- Sergent E & Sergent E. Bouton d’Orient et phlébotomes. *Comptes Rendus de la société de Biologie*, 1905; 57: 673.
- Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Et Al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res*, 2008 ; 103(5):1159-62.
- Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 2012; 30(26): 3834-42.
- Singh S, Dey A, and Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Exp. Rev. Mol. Diagn*, 2005; 5: 251–265.
- Sogin, M.L. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genêt Dev*, 1991; 1(4): 457-63.
- Spanakos G, Patsoula E, Kremastinou T, Saroglou G, Vakalis N. Development of a PCR-based method for diagnosis of *Leishmania* in blood samples. *Mol. Cell. Probes*, 2002; 16(6): 415-420.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S & Sundar S. Diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011; 105(1): 1–6.
- Stevens, J.R. and W. Gibson. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*, 1999; 15(11): 432-7.
- Sundar S, Mehta H, Chhabra A, Singh V, Chauhan V, Desjeux P, Rai M. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis*, 2006; 42(5): 608-613.
- Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram ARMS, Hashighuchi Y, et al. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2009; 81: 578–82.

- Talia S, Machado De Assis, Rachel Basque, Sasques Caligirone, Gustavo Adolfo Sierra Romeo & Rabello A. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Oxford Journals Medicine Transactions RSTMH*, 2008 ; 103 (12) : 1269-1272.
- Tesh RB, Saidi S, Gajdamovic SJ, Rodhain F, Vesenjask-Hirjan J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bull World Health Organ* 1976 ; 54 : 663–74.
- Théodoridès, J. Note historique sur la découverte de la transmission de la leishmaniose cutanée par les phlébotomes. *Histoire*, 1997 ; 1(1863) : 16-17.
- Thierry De Meeûs. Fonctionnement des foyers de leishmanioses tel que révélé par analyses génétiques. *UMR 177 IRD-CIRAD, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES)*, 2010 :1-10.
- Tiwary P, Kumar D, Mishra M, Singh RP, Rai M, Sundar S. Seasonal Variation in the Prevalence of Sand Flies Infected with *Leishmania donovani*. *PLoS One*, 2013 ; 8 : 1–8.
- Tomás-Pérez M, Khaldi M, Riera C, Mozo-León D, Ribas A, Hide M, Barech G, Benyettoub M, Seghiri K, Doudoub S, Fisa R. First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Tropica*, 2014 ; 135 : 44–49.
- Townzen JS, Brower a. VZ, Judd DD. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Med Vet Entomol*, 2008 ; 22: 386–393.
- Tran A, Biteau-Coroller F, Guis H et Roger F. Modélisation des maladies vectorielles. *Epidémiol. et santé anim*, 2005 ; 47 : 35-51.
- Troncarelli M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 2009 ; 164 (2-4) : 118-123.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, 2002; 186(12): 1829-34.
- Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, realtime reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 73–8.
- Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, de Vries HJC, Ozbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and

- quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43: 5560–6.
- Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992; 51: 133–42.
- Vaselek S, Ayhan N, Oguz G, Erisoz Kasap O, Savić S, Di Muccio T, et al. Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): first detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908. *Parasites & Vectors*, 2017 ; 10 : 444.
- Vassias I. Principe de l'amplification en chaine polymérase. *EMC Biologie Médicale*, 2012 ; 7(1) : 1-5.
- Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loopmediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013; 75: 390–5.
- Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, and Ramesh V, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One*, 2010; 5(4): e10107.
- Vilaplana C, Blanco S, Dominguez J, Gimenez M, Ausina V, C TU, Munoz C. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J. Clin. Microbiol*, 2004; 42(4): 1853-1854.
- Volf, P., Kiewegova, A. & Nemeč, A. Bacterial colonisation in the gut of *Phlebotomus duboseqi* (Diptera: Psychodidae): transtadial passage and the role of female diet. *Folia Parasitol. (Praha)*, 2002 ; 49 : 73–77.
- Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*, 1986; 35: 926-930.
- Wasserberg G., Yarom I., Warburg A. Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts. *Med. Vet. Ent*, 2003; (17): 452–456.
- Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 1995; 375(6530):408-11.
- Weidmann M, Sanchez-Seco M.P, A. Sall A, Ogo Ly P, Thiongane Y, M. Lô M, Schley H, Hufert F T. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *Journal of Clinical Virology*, 2008 ; 41 (2) :138–142.

- World Health Organization (WHO). First WHO report on neglected tropical diseases. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*, 2010.
- World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva. *WHO technical report series*, March 2010; 949: 22–26.
- Yehia L, Adib-Houreh M, Raslan W.F, Kibbi A.G, Loya A, Firooz A, Satti M, El-Sabban M & Khalifeh I. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. *J Cutan Pathol*, 2012 ; 39(3) : 347-55.
- Zait H & Hamrioui B. Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009 ; n° 412 : 33-39.
- Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol*, 2001; 39(4): 935-48.
- Zhou W, F Rousset and O'Neil. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc. Biol. Sci*, 1998 ; 265: 509-515.
- Zink, A.R.; Spigelman, M.; Schraut, B.; Greenblatt, C.L.; Nerlich, A.G.; Donoghue, H.D. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg. Infect. Dis*, 2006; 12(10): 1616-1617.
- Zougaghi L, Admou B, Sora N, Amine M, Tassi N, Kachach M, Aajly L, Hajji A, Fajali N, *et al*. Profils western-blot et stades cliniques chez les patients séropositifs au VIH au Maroc. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009 ; 416 : 19-22.

---

---

# **Production scientifique**

---

---

---

---

**Article I**

---

---

**Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria**

**Auteurs:** Kahina Bennai, Djamel Tahir, Ismail Lafri, Amina Bendjaballah-Laliam, Idir Bitam & Philippe Parola.

*PLOS Neglected Tropical Diseases*

*IF: 3.834*

---

---

**Article II**

---

---

**Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Algeria : About 49 cases**

K. Bennai, M. Louni, K. Abdelouahed, I. Bitam & H. Adjmi-Hammoudi.

*A soumettre dans Parasites & Vectors*

*IF: 3.035*

## ==== **Communications orales et affichées** ====

### *Orales*

**1. Etude de la faune phlébotomienne collectée par piège CDC dans une zone urbaine (Tipaza, Algérie).** Présentée Au 2<sup>ème</sup> Séminaire national de la médecine en milieu saharien, le 06 avril 2016 à Tamanrasset, Algérie.

**Auteurs :** K. Bennai, K. Abdelouahed, S. Bekhouche, I. Lafri, I. Bitam & H. Adjmi.

**2. Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de leishmaniose cutanée : A propos de 49 cas diagnostiqués à l'Hopital Central de l'Armée.** Présentée Au 2<sup>ème</sup> Séminaire national de la médecine en milieu saharien, le 06 avril 2016 à Tamanrasset, Algérie.

**Auteurs :** K. Bennai, M. Louni, L. Lazri, K. Abdelouahed, S. bekhouché & H. Adjmi.

**3. Enquête entomologique sur les phlébotomes de la région de Tipaza.** Présentée à la XX<sup>ème</sup> journée nationale de Parasitologie-Mycologie, le 19 mai 2016 à la faculté de médecine d'Alger « Ziania ».

**Auteurs :** K. Bennai, K. abdelouahed, S. Bekhouche, I. Lafri, H. Adjmi-Hammoudi.

### *Affichées*

**1. Contribution de la technique moléculaire *Polymerase Chain Reaction* (PCR) au diagnostic de la leishmaniose cutanée : A propos de 49 cas diagnostiqués à l'Hopital Central de l'Armée.** Présentée à la première édition du Congrès Annuel sur les Sciences & Technologies Appliquées « CASTA'16 », le 19 septembre 2016 à Boumerdes.

**Auteurs :** K. Bennai, M. Louni, I. Bitam, K. Abdelouahed & H. Adjmi-Hammoudi.

---

---

## Résumé

---

---

Les leishmanioses, parasitoses transmises exclusivement par les phlébotomes, constituent un vrai problème de santé publique en Algérie. Le but de ce travail est la surveillance et le contrôle de ces maladies dans le Nord d'Algérie, par : la contribution à l'amélioration du diagnostic de ces affections, le contrôle de leurs vecteurs ainsi que la recherche d'éventuels agents pathogènes associés aux phlébotomes en utilisant les outils de biologie moléculaire. Ainsi, nous démontrons l'apport flagrant de la PCRk et PCR-ITS-RFLP dans le diagnostic et l'identification simultanée des espèces de *Leishmania* spp. dans un contexte épidémiologique en Algérie. De plus, nous surlignons les facteurs de risque d'une flambée de la maladie dans la région de Tipaza par la forte abondance d'espèces de phlébotomes vecteurs de *L. infantum* dans la région, la présence de l'ADN *L. infantum* chez *P. (L.) perniciosus* et *P. (L.) perfiliewi* en plus de leur alimentation sur du sang humain. Enfin, nous rapportons dans cette étude la présence de l'ADN des *Anaplasmatocae*, pour la première fois en Algérie, chez les phlébotomes collectés à Tipaza. Tandis que *Toscana virus* et *Sand Fly Sicilian Virus* étaient absents chez les phlébotomes collectés à Bougaa, Sétif au nord d'Algérie.

**Mots clés :** surveillance, contrôle, leishmanioses, diagnostic, phlébotomes, *L. infantum*, *Toscana virus*, *Sand Fly Sicilian Virus*, *Anaplasmatocae*, outils moléculaires, Nord d'Algérie.

---

---

## Abstract

---

---

Leishmaniasis are vector borne diseases transmitted exclusively by sandflies. These affections represent a real public health problem in Algeria. The aim of this work is the monitoring and control of these diseases in the Northern Algeria, by contribution to the improvement of the diagnosis of these diseases, vector control as well as searching for any associated pathogens to sandflies using molecular tools. Thus, we demonstrate the high contribution of PCRk and PCR-ITS-RFLP in the diagnosis and simultaneous identification of *Leishmania* species. in an epidemiological context in Algeria. In addition, we highlight the risk factors for an outbreak of the disease in Tipaza province through the high abundance of *L. infantum* sand fly vector species of in the area and the detection of *L. infantum* DNA in *P. (L.) perniciosus* and *P. (L.) perfiliewi* in addition to their feeding on human blood. Finally, we report in this study the presence of *Anaplasmatocae* DNA, for the first time in Algeria, in sandflies collected in Tipaza, while *Toscana virus* and *Sand Fly Sicilian Virus* were absent in sandflies collected at Bougaa, Setif in northern Algeria.

**Key words:** surveillance, control, leishmaniasis, diagnosis, sandflies, *L. infantum*, *Toscana virus*, *Sand Fly Sicilian Virus*, *Anaplasmatocae*, molecular tools, northern Algeria.