

TABLE DES MATIERES

Résumé

Liste des abréviations et acronymes

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les leishmanioses.....	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Agent étiologique.....	5
1.2.1. Position systématique.....	5
1.2.2. Caractères morphologiques.....	6
1.2.3. Caractères moléculaires.....	7
1.2.3.1. ADN nucléaire.....	7
1.2.3.2. ADN kinétoplastique.....	7
1.2.4. Nutrition.....	8
1.2.5. Cycle biologique.....	8
1.2.5.1. Evolution du parasite chez l'hôte invertébré.....	9
1.2.5.2. Evolution du parasite chez l'hôte vertébré.....	10
1.2.5.2.1. Inoculation du parasite et adhésion.....	10
1.2.5.2.2. Phagocytose et survie des <i>Leishmania</i>	12
1.3. Vecteur.....	13
1.3.1. Position systématique des phlébotomes selon Dolmatova et Demina (1971).....	14
1.3.2. Morphologie.....	14
1.3.2.1. Tête.....	15
1.3.2.2. Thorax.....	16
1.3.2.3. Abdomen.....	16
1.3.3. Biologie.....	17
1.3.4. Accouplement.....	19
1.3.5. Régime alimentaire.....	20
1.3.6. Composition de la salive.....	20
1.3.7. Habitat et activité.....	20
1.3.8. Fréquence saisonnière.....	22
1.4. Réservoirs.....	22
1.5. Situation épidémiologique.....	24
2. Leishmaniose et immunité adaptative.....	26
3. Diagnostic de la leishmaniose viscérale.....	28
3.1. Diagnostic non spécifique.....	28
3.1.1. Aspect clinique.....	28
3.1.2. Anomalies hématologiques.....	29
3.1.3. Syndrome inflammatoire.....	29

3.1.4. Dysprotidémie (ou dysproteinémie).....	29
3.1.5. Anomalies hépatiques et rénales.....	29
3.2. Diagnostic spécifique.....	30
3.2.1. Méthodes directes.....	30
3.2.1.1. Examen microscopique direct.....	30
3.2.1.2. Examen direct après culture.....	30
3.2.1.3. Mise en évidence des leishmanies à partir du vecteur.....	30
3.2.2. Méthodes indirectes (Méthodes sérologiques).....	31
4. Identification des <i>Leishmania</i>	31
4.1. Analyse biochimique des isoenzymes (zymodèmes).....	31
4.2. PCR séquençage.....	32
4.3. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	32
5. Co-infection <i>Leishmania</i> /VIH.....	33
6. Prévention et lutte contre la leishmaniose viscérale.....	34

CHAPITRE II POPULATION ET METHODES

1. Hypothèse et objectifs du travail.....	35
1.1. Hypothèse de travail.....	35
1.2. Objectifs de l'étude.....	35
2. Population étudiée.....	35
3. Méthodologie.....	36
3.1. Types d'étude.....	36
3.2. Plan de travail.....	37
3.2.1. Prélèvements et préparation des échantillons étudiés.....	37
3.2.1.1. Ponction de moelle osseuse.....	37
3.2.1.2. Confection de frottis de moelle osseuse.....	37
3.2.1.3. Préparation de la poudre de moelle osseuse.....	38
3.2.1.4. Prélèvement sanguin.....	38
3.2.2. Diagnostic.....	38
3.2.2.1. Examen parasitologique direct.....	39
3.2.2.2. Examens sérologiques.....	39
3.2.2.2.1. Test de diagnostic rapide par immunochromatographie.....	39
3.2.2.2.2. Immunofluorescence indirecte.....	40
3.2.2.2.3. Western blot.....	42
3.2.3. Evaluation des performances du TDR.....	43
3.2.3.1. Immunochromatographie.....	43
3.2.3.2. ELISA.....	43
3.2.4. Etude moléculaire et phylogénétique.....	45
3.2.4.1. Extraction de l'ADN total.....	46
3.2.4.1.1. Extraction de l'ADN total à partir des sérums.....	46
3.2.4.1.2. Extraction de l'ADN total à partir de la poudre de moelle osseuse.....	46
3.2.4.2. PCR en temps réel.....	47
3.2.4.3. PCR standard.....	51
3.2.4.4. Identification génomique du parasite.....	54

3.2.5. Etude entomologique.....	58
3.2.5.1. Région d'origine des phlébotomes.....	58
3.2.5.2. Technique de piégeage des phlébotomes.....	59
3.2.5.3. Traitement et diagnostic des phlébotomes.....	59
3.2.5.4. Détection du parasite par PCR en temps réel.....	60
3.2.6. Recueil des données et méthodologie statistique.....	60
3.2.7. Tests d'évaluation des performances des techniques utilisées.....	61

CHAPITRE III RESULTATS

1. Diagnostic de la leishmaniose viscérale.....	63
1.1. Diagnostic spécifique.....	63
1.1.1. Myélogramme.....	63
1.1.2. Test de diagnostic rapide par immunochromatographie.....	63
1.1.3. Confirmation diagnostic de la LV.....	64
1.1.4. Evaluation des performances du TDR.....	65
1.1.4.1. Immunochromatographie.....	65
1.1.4.2. ELISA.....	65
1.1.5. Diagnostic moléculaire.....	66
1.2. Délai de diagnostic.....	68
1.3. Diagnostic aspécifique.....	68
1.3.1. Données cliniques.....	68
1.3.2. Données biologiques.....	70
1.3.2.1. Hémogramme.....	70
1.3.2.2. Syndrome inflammatoire.....	71
1.3.3. Syndrome d'activation macrophagique.....	71
2. Profil épidémiologique des cas de LV recensés.....	72
2.1. Répartition des cas selon le lieu de résidence.....	72
2.2. Répartition des cas selon l'âge et le sexe.....	73
2.3. Répartition des cas selon le groupe sanguin.....	75
2.4. Répartition des cas selon le niveau socio-économique.....	76
2.5. Répartition saisonnière des cas.....	77
2.6. Répartition annuelle des cas.....	77
2.7. Répartition des cas selon le motif d'hospitalisation.....	78
2.8. Données thérapeutiques et évolutives.....	79
3. Détection et identification du parasite.....	81
4. Résultats entomologiques.....	83
4.1. Identification des phlébotomes capturés.....	83
4.1.1. <i>Phlebotomus perniciosus</i>	84
4.1.2. <i>Phlebotomus longicuspis</i>	86
4.1.3. <i>Phlebotomus perfiliewi</i>	88
4.1.4. <i>Phlebotomus papatasi</i>	88
4.1.5. <i>Sergentomyia minuta</i>	90
4.2. Abondance relative des espèces identifiées.....	91
4.3. Résultat de la recherche de leishmanies à partir du vecteur.....	93

CHAPITRE IV DISCUSSION

Discussion.....	94
-----------------	----

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives.....	106
---------------------------------	-----

Références bibliographiques.....	108
----------------------------------	-----

Annexes

Résumé

La leishmaniose viscérale est une affection causée par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, parasite du système réticulo-endothélial et transmis aux mammifères par la piquûre d'un insecte vecteur, le phlébotome femelle. Elle est mortelle dans presque tous les cas si elle n'est pas diagnostiquée et prise en charge précocement.

En Algérie, l'agent incriminé est *Leishmania infantum* zymodème MON-1, ayant comme réservoir le chien et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus*.

Des progrès ont été réalisés dans le diagnostic et la prise en charge de cette parasitose dans la région centre de l'Algérie. Par contre, dans l'Ouest algérien, le diagnostic repose encore dans la majorité des cas sur la mise en évidence du parasite à l'examen direct. De plus, aucune étude à ce jour n'a été consacrée à la situation épidémiologique de la maladie dans cette région.

Ce travail avait pour objectifs :

- de proposer, pour un diagnostic précoce de la leishmaniose viscérale infantile, l'utilisation de l'immunochromatographie comme test alternatif à l'examen direct et de la PCR en temps réel à partir du sérum, un prélèvement non invasif;
- d'apporter des éléments de connaissance sur la situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest algérien en déterminant le profil épidémiologique, clinique et biologique des cas recensés et en identifiant l'espèce de *Leishmania* en cause par PCR-séquençage et des espèces de phlébotomes vectrices.

Deux types d'étude ont été réalisés, une étude descriptive à recueil rétrospectif et une autre transversale avec niche prospective. La première, allant de janvier 2007 à septembre 2010, a inclus 37 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués dans le service des maladies infectieuses pédiatriques de l'EHS pédiatrie d'Oran. La seconde, menée dans ce même service, d'octobre 2010 à décembre 2017, a porté sur 69 cas de suspicion de cette pathologie.

A l'issue de ces deux études, 82 cas de leishmaniose viscérale ont été enregistrés. L'âge moyen des malades était de $22,9 \pm 22,7$ mois avec une légère prédominance féminine. 36,6% des cas sont originaires de la wilaya de Relizane.

Les signes biocliniques évocateurs de la LV étaient dominés par la triade (fièvre-pâleur-splénomégalie) dans 62,2% des cas et l'anémie dans 100% des cas.

L'immunochromatographie a permis le diagnostic de la maladie chez 17 cas; la sensibilité de la PCR en temps réel réalisée à partir de la moelle osseuse et du sérum était respectivement de 86,5% et de 92,3%.

Ces résultats suggèrent l'intérêt de l'utilisation de ce test sérologique et de la PCR en temps réel à partir du sérum dans le diagnostic de cette parasitose.

La présence de *P.perniciosus* avec une abondance relative de 55,1% et le parasite identifié avec 74% de similitude avec *L.infantum* et les signes biocliniques et épidémiologiques observés chez les patients constituent les principales caractéristiques de la leishmaniose viscérale méditerranéenne.

Mots clés : Leishmaniose viscérale infantile, moelle osseuse, sérum, Immunochromatographie, PCR en temps réel, PCR standard, PCR-séquençage, *Leishmania infantum*, *Phlebotomus perniciosus*, Ouest algérien.

Abstract

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease caused by a flagellate protozoa belonging to the genus *Leishmania*, parasite of the reticulo-endothelial system and transmitted to mammals by the bite of a vector insect, the female sandfly. It is fatal in almost all cases if it is not diagnosed and managed early.

In Algeria, the offending agent is *Leishmania infantum* zymodeme MON-1, whose reservoir is the dog and the main vector is *Phlebotomus perniciosus*.

Progress were made in the diagnosis and management of this parasitosis in the center region of Algeria. In western Algeria, the diagnosis is still based in most cases on the detection of the parasite by the direct examination. Moreover, no study has been devoted to date in this region, to the epidemiological situation of the disease.

This work's objectives were:

- to propose, for an early diagnosis of infantile visceral leishmaniasis, the use of immunochromatography as an alternative test to the direct examination and the real-time PCR from the serum, a non-invasive sampling;
- to provide elements of knowledge on the epidemiological situation of the infantile visceral leishmaniasis in western Algeria by determining the epidemiological, clinical and biological profile of the identified cases and identifying the species of *Leishmania* in question by PCR-sequencing and species of vector sandflies.

Two types of study were conducted, a descriptive study with retrospective collection and another transversal with prospective niche. The first, from January 2007 to September 2010, included 37 cases of visceral leishmaniasis diagnosed in the Pediatric Infectious Diseases Department of Oran EHS. The second, conducted in the same department, from October 2010 to December 2017, focused on 69 cases suspected with this pathology.

At the end of these two studies, 82 cases of visceral leishmaniasis were recorded. The age average of patients was 22.9 ± 22.7 months with a slight feminine predominance. 36.6% of the cases are originated from Relizane.

The bioclinical signs suggestive of LV were dominated by the triad (fever-pallor splenomegaly) in 62.2% of cases and anemia in 100% of cases.

Immunochromatography allowed the diagnosis of the disease in 17 cases; the sensitivity of real-time PCR performed from bone marrow and serum was respectively 86.5% and 92.3%.

These results suggest the advantage of using this serological test and the real time-PCR from the serum in the diagnosis of this parasitosis.

The presence of *P.perniciosus* with a relative abundance of 55.1% and the identified parasite with 74% similarity with *L. infantum*, added to the bioclinical and epidemiological signs observed in patients constitute the main characteristics of Mediterranean visceral leishmaniasis.

Key words: Infantile visceral leishmaniasis, bone marrow, serum, immunochromatography, real-time PCR, standard PCR, sequencing-PCR, *Leishmania infantum*, *Phlebotomus perniciosus*, western Algeria.

ملخص

داء ليشمانيا الأحشاء مرض يسببه طفيلي وحيد الخلية وذو سوط والذي ينتمي إلى جنس *Leishmania*. وهو طفيلي الجهاز الشبكي البطاني، وينتقل إلى الثدييات عن طريق لدغة حشرة ناقله، هي أنثى ذبابة الرمل. إنه قاتل في جميع الحالات تقريباً إذا لم يتم تشخيصه والتكفل به في وقت مبكر. فإن العامل المسبب للمرض في الجزائر هو *Leishmania infantum* zymodeme MON-1، حيث تكون الكلاب خزان له وتكون الذبابة *Phlebotomus perniciosus* هي الناقل الأساسي. تم إحراز تقدم في تشخيص وإدارة هذا المرض الطفيلي في وسط الجزائر بينما في الغرب الجزائري، لا يزال التشخيص في أغلب الحالات قائماً على كشف الطفيلي بالفحص المباشر. وزيادة على ذلك، لم تدرس حتى الآن، أية دراسة للحالة الوبائية للمرض على مستوى هذه المنطقة. وعليه فإن دراستنا تتوخى الأهداف التالية:

- اقتراح استعمال تقنية مقايضة الاستشراب المناعي immunochromatographie و تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي PCR en temps réel للمصل، وهي طريقة غير غازية (غير مضرّة) لأخذ العينات من أجل التشخيص المبكر لداء ليشمانيا الأحشاء لدى الأطفال، كبديل للاختبار المباشر. - تقديم معلومات عن الوضع الوبائي لداء ليشمانيا الأحشاء لدى الأطفال في غرب الجزائر من خلال تحديد الملامح الوبائية والسرييرية والبيولوجية للحالات المؤكدة وتحديد نوع الليشمانيا المسبب للمرض بواسطة التسلسل (PCR-séquençage) وكذلك تحديد أنواع الذباب الناقل. لقد نفذت دراستان، دراسة وصفية مع جمع بأثر رجعي و الثانية شاملة مع صيغة تطلعية. أجريت الدراسة الأولى من يناير 2007 إلى سبتمبر 2010، وشملت 37 حالة من داء ليشمانيا الأحشاء تم تشخيصها في قسم الأمراض المعدية للأطفال في المؤسسة الاستشفائية المتخصصة في طب الأطفال بوهران. أما الدراسة الثانية التي أجريت في نفس القسم، من أكتوبر 2010 إلى ديسمبر 2017، لقد شملت 69 حالة مشتبهة.

في نهاية هاتين الدراستين، تم تسجيل 82 حالة من داء ليشمانيا الأحشاء. وكان متوسط عمر المرضى 22.9 ± 22.7 شهراً مع هيمنة بسيطة للإناث. 36.6 % من الحالات تنحدر من ولاية غليزان. كانت العلامات السرييرية والبيولوجية الموحية بداء الليشمانيا متمثلة في أغلبية الحالات بالثالوث (حمى، شحوب و تضخم الطحال) في 62.2 % من الحالات وفقر الدم في 100 % من الحالات. ساهمت تقنية مقايضة الاستشراب المناعي (immunochromatographie) في تشخيص 17 حالة. وكانت حساسية تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (PCR en temps réel) للنخاع العظمي والمصل على التوالي 86.5 % و 92.3 %. تشير هذه النتائج إلى فائدة استخدام هذا الاختبار السريولوجي (المصلي) وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (PCR en temps réel) المنجزة من المصل في تشخيص هذا المرض الطفيلي. وجود *P. perniciosus* بنسبة 55.1 % والطفيلي المحدد بنسبة تشابه ب 74 % مع *L. infantum* والعلامات السرييرية والبيولوجية التي لوحظت عند المرضى هي السمات الرئيسية لداء الليشمانيا الحشوي المتوسطي.

إن وجود *P. perniciosus* مع وفرة نسبية من 55.1 % وتحديد تشابه الطفيلي بنسبة 74 % مع *L. infantum* والعلامات السرييرية والبيولوجية و الحالة الوبائية الملاحظة عند المرضى تشكل الخصائص الرئيسية لداء ليشمانيا الأحشاء للبحر الأبيض المتوسط.

الكلمات المفتاحية :

داء ليشمانيا الأحشاء للأطفال، نخاع العظام، مصل الدم، مقايضة الاستشراب المناعي، تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي، PCR standard، تفاعل البلمرة المتسلسل PCR-séquençage، *Leishmania infantum*، *Phlebotomus perniciosus*، غرب الجزائر.

Abréviations et acronymes

ADN	Acide DésoxyriboNucléique	LT	Lymphocyte T
ADNk	ADN kinétoplastique	LV	Leishmaniose Viscérale
Ag-Ac	Antigène-Anticorps	LVI	Leishmaniose Viscérale Infantile
AR	Abondance Relative	MBP	Mannose Binding Protein
ARN	Acide ribonucléique	ME	Microscope Electronique
ATG	AmpliTaq Gold	MFR	Mannose Fructose Receptor
BL	Bicouche Lipidique	MGG	May Grünwald-Giemsa
CD	Cluster de Différenciation	MO	Microscope Optique
CMH II	Complexe Majeur d'Histo Compatibilité de classe II	Moy	Moyemme
CR1	Complement receptor type 1	NK	Natural Killer
CR3	Complement receptor type 3	NNN	Novy-Mac. Neal-Nicolle
CRP-R	C-Reactive Protein Receptor	OMS	Organisation mondiale de la santé
Cytb	Cytochrome b	P.	<i>Phlebotomus</i>
C3bi	C3b inactif	PBS	Phosphate Buffered Saline
ddNTP	didéoxyriucleotides triphosphates	PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTP	déoxyribinucleotides Triphosphates	PS	PhosphatidylSerine
EHS	Etablissement Hospitalier Spécialisé	PSG	Promastigote Secretory Gel
EHU	Etablissement Hospitalier Universitaire	RFLP	restriction fragment length polymorphism
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Rh	Rhésus
EMLA	Eutectic Mixture of Local Anaesthetic	S.	<i>Sergentomyia</i>
ET	Ecart-type	SAM	Syndrome d'activation macrophagique
fPPG	ProtéoPhosphoGlycan Filamenteux	SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise
FR	Fibronectine Receptor	HSPMG	Hépto-splénomégalie
G/C	Guanine/ Cytosine	TBE	Tris-Borate-EDTA
GIPL	Glycol-Iinositol-PhosphoLipides	TDR	Test de Diagnostic Rapide
GPI	Glyco-Inositol-Phosphate	TGF-β	Transforming Growth Factor beta
gp63	Glucoprotéine 63 KDa	Th	T helper
IFI	ImmunoFluorescence Indirecte	TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
IgG	Immunoglobuline G	UV	UltraViolet
IHU	Institut Hospitalo-Universitaire	VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
IL	InterLeukine	VS	Vitesse de Sédimentation
INF-γ	Interferon gamma	WB	Western Blot
INSP	Institut National de Santé Publique	WHO	World Health Organization
IPA	Intitut Pasteur d'Alger		
ITS	Internal Transcribed Spacer		
J	Jour		
L.	<i>Leishmania</i>		
LC	Leishmaniose cutanée		
LCZ	Leishmaniose cutanée Zoonotique		
LPG	LipoPhosphoGlycans		

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Plan de distribution des échantillons.....	45
Tableau II	Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR en temps réel.....	50
Tableau III	Amorces et sonde utilisées.....	50
Tableau IV	Plan de plaque.....	50
Tableau V	Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR standard.....	52
Tableau VI	Séquences des amorces utilisées.....	52
Tableau VII	Programmation du thermocycleur.....	53
Tableau VIII	Composition du gel en SyberSafe.....	53
Tableau IX	Liste des réactifs du BigDye avec leurs volumes.....	56
Tableau X	Programme du thermocycleur pour la réaction de BigDye.....	57
Tableau XI	Identification des malades selon le résultat du test utilisé.....	61
Tableau XII	Interprétation du résultat du Coefficient Q de Yule.....	62
Tableau XIII	Interprétation des différents résultats du Kappa de Cohen.....	62
Tableau XIV	Résultats du myélogramme et du TDR.....	65
Tableau XV	Résultats du TDR et du test ELISA.....	66
Tableau XVI	Résultats de la PCR en temps réel et du myélogramme.....	67
Tableau XVII	Résultats de la PCR en temps réel et du TDR.....	67
Tableau XVIII	Résultats de la PCR en temps réel et de l'ELISA.....	67
Tableau XIX	Performances des techniques utilisées.....	68
Tableau XX	Evaluation de la concordance entre les tests.....	68
Tableau XXI	Répartition par sexe des cas de LV selon le mois de début de symptômes.....	69
Tableau XXII	Répartition des cas de LV selon d'autres signes cliniques, biologiques et comorbidités associés.....	70
Tableau XXIII	Résultats des paramètres biologiques chez les cas LVI-SAM.....	72
Tableau XXIV	Répartition des cas de LV selon l'âge et le sexe.....	74
Tableau XXV	Motif d'hospitalisation des cas de LV.....	79
Tableau XXVI	Nombre de soies médianes du coxite de <i>P. longicuspis</i> et de <i>P. perniciosus</i>	88
Tableau XXVII	Abondance relative par sexe des espèces de phlébotomes capturés.....	92
Tableau XXVIII	Performances du TDR selon la littérature.....	98
Tableau XXIX	Fréquence des principaux signes cliniques de la LV selon quelques études.....	99

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Taxonomie des <i>Leishmania</i>	6
Figure 2	Formes amastigotes de <i>Leishmania infantum</i> , intracellulaires et extracellulaires.....	7
Figure 3	Formes promastigotes de <i>Leishmania</i>	7
Figure 4	ADN kinétoplastique de <i>Leishmania</i>	8
Figure 5	Cycle réplcatif des formes promastigotes.....	10
Figure 6	Antigènes de surface de <i>Leishmania</i>	11
Figure 7	Interactions entre le macrophage et la forme promastigote métacyclique via leurs molécules de surface.....	11
Figure 8	Cycle de développement des <i>Leishmania</i>	13
Figure 9	Morphologie générale du phlébotome adulte.....	15
Figure 10	Morphologie de la tête d'une femelle <i>Phlebotomus papatasi</i>	15
Figure 11	Aile de phlébotome.....	16
Figure 12	Appareils génitaux, mâle et femelle de <i>P. sergenti</i>	17
Figure 13	Phlébotome femelle gorgée.....	17
Figure 14	Œufs de phlébotome.....	18
Figure 15	Larve et nymphe de phlébotome.....	18
Figure 16	Emergence du phlébotome.....	18
Figure 17	Cycle de vie des phlébotomes.....	19
Figure 18	Accouplement de <i>Phlebotomus perniciosus</i>	20
Figure 19	Chien leishmanien.....	23
Figure 20	Réservoirs de la leishmaniose cutanée zoonotique.....	23
Figure 21	Répartition géographique des leishmanioses, viscérale et dermique post kala-azar (A) et cutanée et muco-cutanée (B).....	25
Figure 22	Répartition géographique des deux espèces de <i>Leishmania</i> et principaux foyers de la leishmaniose viscérale dans le monde.....	26
Figure 23	Réponse immunitaire de l'hôte.....	28
Figure 24	Répartition géographique des différents zymodèmes de <i>L. infantum</i> et de <i>L. major</i> d'Algérie.....	32
Figure 25	Répartition mondiale des cas de co-infections <i>Leishmania</i> / VIH.....	34
Figure 26	Répartition des cas suspects de LV selon la wilaya de provenance.....	36
Figure 27	Confection des frottis de moelle osseuse.....	37
Figure 28	Grattage d'un frottis coloré de moelle osseuse.....	38
Figure 29	Conservation de la poudre de moelle osseuse.....	38
Figure 30	Bandelette d'immunochromatographie.....	40
Figure 31	Bandelette portant le numéro du sérum ajouté.....	40
Figure 32	Principe général de l'immunofluorescence indirecte.....	41
Figure 33	<i>Leishmania</i> WB IgG (Échantillon négatif et positif).....	42
Figure 34	Principe du test ELISA.....	44
Figure 35	Cartouches des réactifs.....	47
Figure 36	Emplacement des cartouches et des tubes dans l'automate EZ1.....	47

Figure 37	Modèle graphique de la PCR en temps réel.....	48
Figure 38	Principe de la PCR en temps réel.....	48
Figure 39	Deux types de nucléotides triphosphates.....	55
Figure 40	Séquençage d'ADN.....	56
Figure 41	Localisation de la région d'origine des phlébotomes (Commune de Yellel, Wilaya de Relizane).....	58
Figure 42	Capture et conservation des phlébotomes.....	59
Figure 43	Formes amastigotes intracellulaires de <i>Leishmania</i>	63
Figure 44	Formes amastigotes extracellulaires de <i>Leishmania</i>	63
Figure 45	Profil du résultat positif par immunochromatographie.....	64
Figure 46	Recherche d'anticorps anti- <i>Leishmania</i> positive par IFI.....	64
Figure 47	Profil des résultats du WBI.....	64
Figure 48	Diagramme en boîtes de la densité optique selon le sexe des cas de LV.....	66
Figure 49	Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir des sérums.....	67
Figure 50	Répartition des cas de LV selon les signes cliniques évocateurs de la maladie.....	69
Figure 51	Anomalies de l'hémogramme des cas de LV.....	71
Figure 52	Répartition des cas de LV selon la wilaya de provenance.....	72
Figure 53	Répartition des cas de LV selon l'étage bioclimatique.....	73
Figure 54	Distribution des cas de LV selon l'âge et le sexe.....	74
Figure 55	Pyramide des âges des cas de LV selon le sexe.....	75
Figure 56	Répartition des cas de LV selon le groupe sanguin.....	76
Figure 57	Répartition des cas de LV selon les conditions socio-économiques des parents.....	76
Figure 58	Répartition saisonnière des cas de LV.....	77
Figure 59	Répartition annuelle des cas de LV.....	78
Figure 60	Répartition des cas de LV en fonction du dérivé sanguin utilisé.....	80
Figure 61	Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir de la poudre de moelle osseuse.....	81
Figure 62	Résultat de l'amplification de la région ITS1 (500pb) de <i>Leishmania</i> par la PCR standard.....	82
Figure 63	Résultat de l'amplification de la région ITS2 (400pb) de <i>Leishmania</i> par la PCR standard.....	82
Figure 64	Résultat de l'amplification du gène cytb (800pb) de <i>Leishmania</i> par la PCR standard.....	82
Figure 65	Arbre phylogénétique basé sur la méthode Maximum Likelihood avec 500 réplifications de bootstraps comparant les régions ITS1, ITS2 et le gène Cytb du parasite des cas de LV avec ceux des espèces référencées dans le Genbank.....	83
Figure 66	Phlébotome adulte mâle.....	84
Figure 67	Phlébotome adulte femelle.....	84
Figure 68	Génitalia mâle de <i>P. perniciosus</i>	85
Figure 69	Fourreau pénien de <i>P. perniciosus</i>	85
Figure 70	Soies médianes du coxite de <i>P. perniciosus</i>	86
Figure 71	Spermathèque de <i>P. perniciosus</i>	86
Figure 72	Soies du coxite et extrémité de la valve pénienne de <i>P. longicuspis</i>	87
Figure 73	Effectif de <i>P. perniciosus</i> et de <i>P. longicuspis</i> en fonction du nombre de soies médianes des coxites.....	87
Figure 74	Valve pénienne de <i>P. perfiliewi</i>	88
Figure 75	Génitalia mâle de <i>P. papatasi</i>	89

Figure 76	Valves péniennes de <i>P. papatasi</i>	89
Figure 77	Spermathèques de <i>P. papatasi</i>	90
Figure 78	Génitalia mâle de <i>S. minuta</i>	90
Figure 79	Spermathèque de <i>S. minuta</i>	91
Figure 80	Tête de <i>S. minuta</i>	91
Figure 81	Cibarium de <i>S. minuta</i>	91
Figure 82	Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir des phlébotomes femelles.....	93

INTRODUCTION

Introduction

Les maladies à transmission vectorielle constituent un problème de santé publique dans le monde entier avec un impact important sur le bien-être et la survie de la population humaine. Les individus résidant en zones tropicales et intertropicales sont les plus touchés en raison de la présence de vecteurs de nombreux agents pathogènes, de nature parasitaire, virale ou bactérienne.

Ces maladies sont représentées principalement par le paludisme, la trypanosomose américaine (ou maladie de Chagas), les leishmanioses, la filariose lymphatique, l'onchocercose, le chikungunya, la maladie à virus Zika, la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise et la dengue. Elles représentent environ 17 % de la charge mondiale (OMS, 2017) et font des millions de morts chaque année sous ces latitudes où vivent les populations les plus pauvres de la planète. Leur incidence risque d'augmenter dans un futur proche suite aux changements écologiques et climatiques qui peuvent favoriser le contact homme/vecteurs/ pathogènes (Gould *et* Higgs, 2009). De plus, l'augmentation des voyages et du commerce international a transformé le monde en une vaste plateforme d'échanges où les vecteurs et les agents infectieux circulent aussi librement que les individus (Tatem *et al.*, 2006). En conséquence, l'émergence des maladies transmises par les arthropodes hématophages risque d'augmenter dans les pays de l'hémisphère Nord, déjà touchés par des maladies vectorielles endémiques (Chastel, 2009).

Les leishmanioses, maladies tropicales négligées, constituent un groupe de maladies parasitaires extrêmement hétérogènes qui touchent aussi bien l'homme que l'animal. Elles sont dues à la multiplication dans les phagocytes du système réticulo-histocytaire d'un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, transmis par un insecte vecteur, le phlébotome femelle appartenant aux genres *Phlebotomus* (Ancien Monde) et *Lutzomyia* (Nouveau Monde). La distribution de ces insectes est très vaste et s'étend sur les cinq continents avec plus de 900 espèces répertoriées à travers le monde dont 70 impliquées dans la transmission des leishmanioses (Ready, 2013).

Chez l'homme, ces maladies représentent un éventail clinique allant d'une simple lésion cutanée localisée à guérison spontanée aux formes, cutanéomuqueuse très mutilante et viscérale mortelle en l'absence de traitement. Elles représentent un sujet préoccupant à l'échelle mondiale compte tenu de l'apparition de 1,5 à 2 millions de nouveaux cas chaque année (Desjeux, 1996).

Comme d'autres pays du bassin méditerranéen et du Maghreb, l'Algérie est fortement concernée par les leishmanioses. Quatre formes cliniques, à déclaration obligatoire, y sont présentes, la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée sporadique du Nord, la

leishmaniose cutanée zoonotique du Sud et la dernière forme signalée à Constantine (Mihoubi *et al.*, 2008) et à Ghardaïa (Harrat *et al.*, 2009) où elle est due respectivement à *L. tropica* et à *L. killicki*. Elles font intervenir des vecteurs et des hôtes réservoirs différents.

Actuellement sur les 24 espèces de phlébotomes répertoriées en Algérie, 5 sont incriminées dans la transmission des leishmanioses, il s'agit de *Phlebotomus perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. perfiliewi*, *P. papatasi* et *P. Sergenti* (Boubidi *et al.*, 2011).

La leishmaniose viscérale (Kala-azar) qui se répartit sur toute la partie nord du pays à l'étage bioclimatique humide et sub-humide, touche le plus souvent des enfants vivant en zone rurale (Izri et Belazzoug, 2007). Un retard de consultation ou de diagnostic de la maladie s'accompagne souvent de complications graves voire au décès du patient. Un diagnostic précoce conditionne en grande partie le pronostic.

Cette affection, même dans sa forme typique (fièvre, pâleur et splénomégalie), pose toutefois de nombreux défis car ses manifestations cliniques peuvent être confondues avec celles d'autres pathologies. L'examen direct de la moelle osseuse représente le moyen de référence et de première intention pour un diagnostic de certitude.

Malheureusement cet examen n'est pas toujours fructueux, sa sensibilité dépend d'une bonne manipulation du prélèvement et d'un microscopiste expérimenté. La culture du parasite peut améliorer la sensibilité diagnostique, mais sa contamination par des bactéries ou des espèces de levures peuvent l'affecter en inhibant la prolifération du parasite (Sundar et Rai, 2002).

La recherche des traces d'anticorps anti-*Leishmania* par les différentes techniques sérologiques qui ne cessent de se développer s'avèrent indispensable. Aussi, les méthodes génomiques en plein essor, permettent la détection du parasite et son identification. La PCR en temps réel à partir du sérum, prélèvement non invasif, constitue une alternative aux investigations agressives (biopsies, prélèvement de moelle osseuse...) et un apport dans l'établissement d'un diagnostic de certitude.

L'absence d'une alternative à l'examen direct comme technique de diagnostic de la leishmaniose viscérale infantile dans les structures sanitaires de l'Ouest algérien, peut avoir des conséquences sérieuses suite à une prise en charge thérapeutique tardive. Des enquêtes entomologiques visant à estimer le risque spatial en matière de leishmaniose viscérale sont absentes dans cette région. Il en est de même pour la connaissance de la situation épidémiologique de cette infection, à l'exception de l'étude rétrospective ayant porté sur 14 enfants, réalisée par Moziane *et al.* (1983). La sous-estimation, par la population, des facteurs de risques de la maladie par faute de campagnes de sensibilisation peut être à l'origine de son émergence.

Le premier chapitre de ce travail a été consacré à une revue bibliographique qui synthétise l'essentiel des connaissances acquises sur les leishmanioses et plus particulièrement sur la leishmaniose viscérale.

Le deuxième chapitre détaille la partie expérimentale et le troisième expose les résultats qui sont discutés et confrontés à ceux de la littérature dans le quatrième chapitre.

Enfin, le travail s'achève par quelques perspectives après une conclusion qui reprend l'essentiel des résultats.

CHAPITRE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les leishmanioses

1.1. Historique

La leishmaniose cutanée est une des maladies parasitaires les plus anciennes; les premiers écrits dans l'Ancien Monde datent de la plus haute antiquité, comme ceux transcrits sur des objets du septième siècle avant J-C, appartenant à Ashurbanipal, roi d'Assyrie (ancienne région du nord de l'Irak). Elle fut décrite au dixième siècle par des médecins arabes sous l'appellation de blessure de "Balkh" du nom d'une ville du nord de l'Afghanistan. Puis et à travers l'histoire, elle a reçu les noms des différentes régions du monde où elle fut découverte (Cox, 2002).

La première description des formes cutanées et cutanéomuqueuses du Nouveau Monde est celle de missionnaires religieux espagnols, faite au seizième siècle à partir de la manifestation de la maladie andine (Bolivie, Colombie, Équateur et Pérou) (Cox, 2002).

L'agent causal fut mis en évidence pour la première fois en 1885 par David Cunningham dans une lésion cutanée puis en 1898 par Peter Borovsky. Ce dernier décrivit le parasite comme un protozoaire, son travail publié ne fut pas reconnu à l'échelle mondiale (Cox, 2002).

La leishmaniose viscérale s'est probablement manifestée beaucoup plus tard car il n'en est pas fait mention avant les années 1823 alors que d'autres maladies causant le même degré de sévérité étaient déjà suffisamment documentées (Cox, 2002).

En 1824, une maladie causant fièvre et cachexie et résistant à la quinine fut observée au Bengale (Cox, 2002). Une maladie semblable survenue en Inde fut relatée sous le nom de kala-azar (fièvre noire), car provoquant un noircissement de la peau des patients, puis de fièvre de Dum-Dum en raison de son apparition pour la première fois dans cette région (située près de Calcutta). Durant l'époque où cette maladie n'était pas encore connue, les signes cliniques d'anémies et de splénomégalies étaient attribués à une combinaison d'ankylostomiase, de bérubéri (carence profonde en vitamine B1) et de malaria.

William Boog Leishman(1900) et Charles Donovan(1903) furent les premiers à découvrir indépendamment le parasite dans des frottis de rate de patients atteints de kala-azar. Donovan se rendit compte que la forme cutanée (bouton d'Orient) était due à ce même pathogène. En 1903, Ronald Ross donna à ce dernier le nom définitif de *L. donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée «corps de Leishman» (Euzéby, 1984).

En 1904, Rogers décrivit des formes flagellées à partir d'une culture in vitro de sang citraté (Dana, 1972). La même année, la leishmaniose viscérale fut décrite en Tunisie par Cathoire puis en 1907 par Nicolle en Egypte et en Grèce et en 1911 par Lemaire en Algérie et par

Carlos Chagas en Amérique. Ce dernier découvrit dans la forêt amazonienne brésilienne des enfants présentant des splénomégalies et fut amené à penser qu'il était en présence de " kala-azar. L'agent étiologique fut nommé *L. chagasi*. En 1913, Migone rapporta la présence de la leishmaniose viscérale dans le continent américain (Akhoundi *et al.*, 2016).

En 1908, Charles Nicolle considéra le parasite, présent dans les pays du bassin méditerranéen et où il touche particulièrement les enfants, comme différent de *L. donovani* et lui donna le nom de *L. infantum* (Nozais *et al.*, 1996). Il démontra au cours de cette même année, l'innocuité de *L. infantum* au chien et rapporta avec Comte la première observation en Tunisie de la leishmaniose générale chez cet animal (Nelson et Guillermo-Couto, 2003). C'est en 1913 que Pringault signala la présence de la leishmaniose canine en Europe en observant un cas à Marseille (Euzeby, 1994).

La relation entre le phlébotome comme vecteur et la maladie fut établie à l'Institut Pasteur d'Algérie, expérimentalement et sur leurs propres personnes, par les frères Edmond et Etienne Sergent et leurs collaborateurs. Des broyats de spécimens de *P. papatasi* furent appliqués sur des scarifications cutanées et deux mois plus tard, l'un d'entre-eux présenta une lésion caractéristique de "clou de Biskra" avec présence de nombreuses formes amastigotes de *Leishmania*. Ces auteurs rapportèrent ainsi en 1921 les preuves de la transmission vectorielle de la leishmaniose cutanée (Théodoridès, 1997). La transmission par piqûre fut confirmée pour le kala-azar par Knowles *et al.* (1924), pour la leishmaniose canine par Parrot *et al.* (1930) et pour la leishmaniose cutanée par Adler et Ber (1941).

1.2. Agent étiologique

1.2.1. Position systématique

Les leishmanioses sont dues à un protozoaire du genre *Leishmania* dont la position systématique est la suivante, selon la classification de Levine *et al.* (1980):

- Règne : Protista (Haeckel, 1866)
- Sous-Règne : Protozoa (Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848)
- Embranchement : Sarcomastigophora (Honigberg et Balamuth, 1963)
- Sous- Embranchement : Mastigophora (Diesing, 1866)
- Classe : Zoomastigophora (Calkins, 1909)
- Ordre : Kinetoplastida (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976)
- Sous-Ordre : Trypanosomatina (Kent, 1880)
- Famille : Trypanosomatidae (Doflein, 1901 emend. Grobben, 1905)
- Genre : *Leishmania* (Ross, 1903)

Ce genre est subdivisé en deux sous genres, *Leishmania* qui se développe principalement dans le mésentéron de l'insecte vecteur, le phlébotome femelle et *Viannia* qui colonise le proctodeum avant de se retrouver dans le mésentéron (Kamhawi, 2006). Les espèces de ces deux sous genres sont présentées dans la figure suivante.

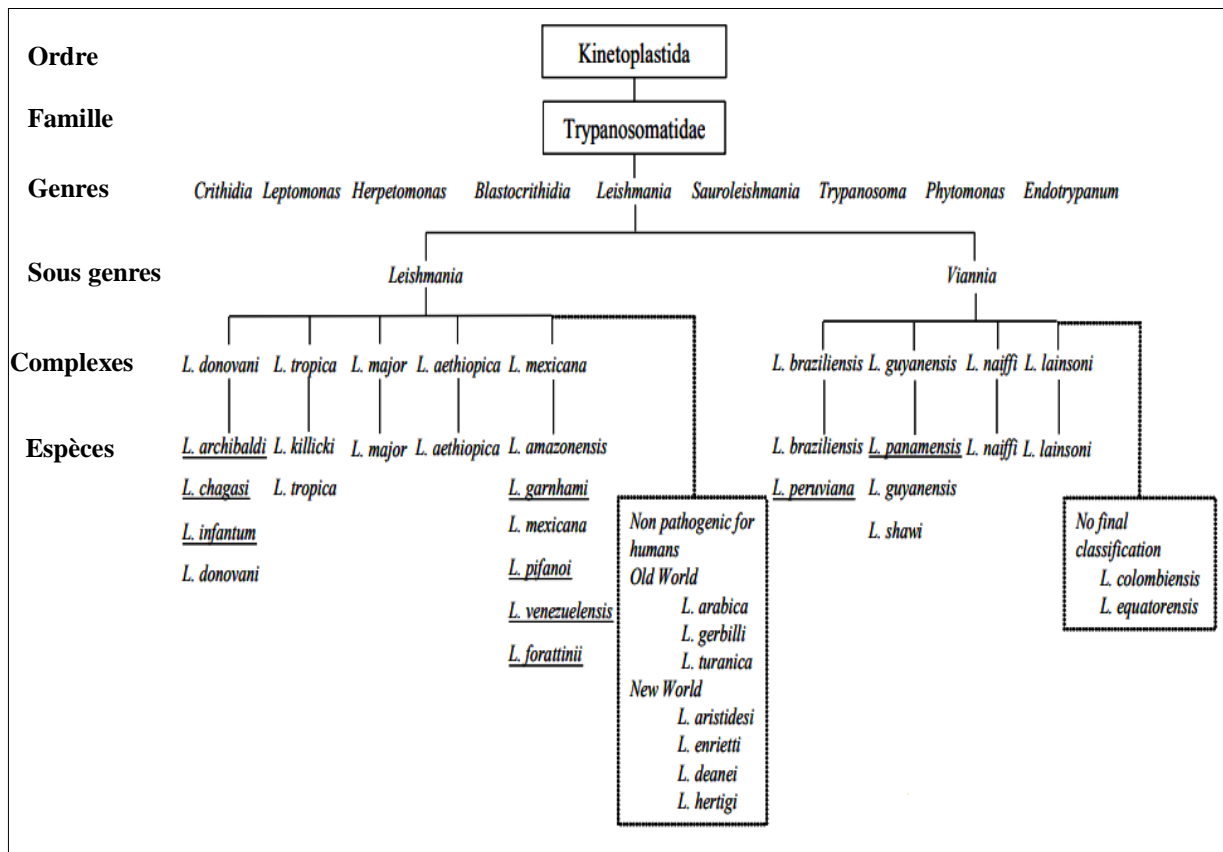


Figure 1: Taxonomie des *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007)

Ces espèces regroupées en complexe, sont responsables de différentes formes cliniques de leishmaniose.

1.2.2. Caractères morphologiques

Les parasites ou leishmanies présentent au cours de leur cycle biologique deux formes distinctes :

- forme amastigote: cellule ovoïde mesurant 2 à 6 μm , avec un gros noyau, un kinétoplaste, avec ou sans un appareil flagellaire rudimentaire (Figure 2).
- forme promastigote: cellule allongée et fusiforme, mesurant 8 à 24 μm de long sur 4 à 5 μm de large et munie d'un long flagelle pour le déplacement. Le kinétoplaste est situé à la base du flagelle qui mesure 10 à 15 μm (Figure 3).

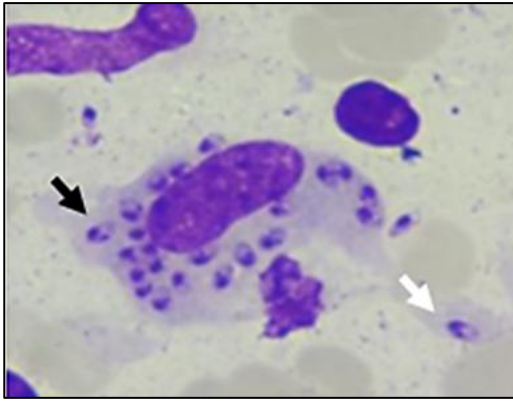


Figure 2 : Formes amastigotes de *Leishmania infantum*, intracellulaires (flèche noire) et extracellulaire (flèche blanche) (MO : 1000x) (Moumeni, 2015)



Figure 3: Formes promastigotes de *Leishmania* (MO: 1000x) (Gupta et Nishi, 2011)

1.2.3. Caractères moléculaires

1.2.3.1. ADN nucléaire

Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. Il a débuté avec la souche *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin.

Le génome de *Leishmania* varie de 29Mb pour *L. amazonensis* à 33 Mb pour *L. major*, *L. infantum* et *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007; Real, 2013). Il est organisé en un nombre variable de chromosomes : 34 pour *L. amazonensis* et *L. mexicana*, 35 pour *L. braziliensis* et 36 pour *L. major*, *L. donovani* et *L. infantum* (Real, 2013). Malgré la variabilité pathogénique des différentes espèces et la différence dans leur tropisme tissulaire, leur génome est remarquablement similaire, montrant un haut degré de conservation dans l'architecture et le contenu génique (Peacock *et al.*, 2007; Real, 2013). L'ADN, dépourvu d'introns, se découpe en grandes unités polycistroniques (Myler *et al.*, 2000). Il est très riche en G/C puisqu'il est de 60% en moyenne contre 40% d'A/T et contient assez peu de séquences répétées (Ouelette *et al.*, 2003).

1.2.3.2. ADN kinétoplastique

Cet ADN (ADNk) constitue 10 à 20 % de l'ADN total (Simpson *et al.*, 1987) ; il représente l'ADN mitochondrial des Trypanosomatidae. C'est un réseau complexe de deux types d'ADN circulaires enchaînés les uns aux autres, environ 20 à 50 maxi-cercles, codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques et 5000 à 10 000 mini-cercles impliqués dans les phénomènes «d'editing» (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN (Kabb *et al.*, 2001; Gott, 2003) (Figure 4).



Figure 4: ADN kinétoplastique de *Leishmania* (ME) (Bañuls *et al.*, 2007)

1.2.4. Nutrition

La nutrition s'effectue par pinocytose, à travers la membrane plasmique de la poche flagellaire. Les microvésicules fusionnent avec les lysosomes permettant la digestion des macromolécules ingérées (Henry, 1993).

Les parasites absorbent et métabolisent le glucose et d'autres sucres tout au long de leur cycle de vie (Rainey et MacKenzie, 1991; Burchmore et Hart, 1995). Les promastigotes sont capables de puiser du sucre de l'environnement extracellulaire lorsqu'il est disponible (Burchmore et Landfear, 1998) ou alors de le synthétiser via la gluconéogenèse (Simon *et al.*, 1978; Rodríguez-Contreras et Landfear, 2006).

A l'inverse, les formes amastigotes effectuent activement la gluconéogenèse même en présence de sucre dans le milieu (Rodríguez-Contreras et Landfear, 2006), condition par laquelle la gluconéogenèse est régulée à la baisse de sucre dans les cellules de mammifères (Nelson et Cox, 2005). Il a été démontré que *L. mexicana* est capable d'utiliser du glycérol, de l'aspartate et de l'alanine pour synthétiser le glucide mannogène de stockage (Rodríguez-Contreras et Landfear, 2006), précédemment appelé β -mannane (Ralton *et al.*, 2003).

1.2.5. Cycle biologique

Le cycle biologique est dixène, nécessitant deux hôtes :

- un hôte invertébré: hôte vecteur: phlébotome femelle: hébergeant les formes promastigotes
- un hôte vertébré: homme ou autres mammifères : hébergeant les formes amastigotes

1.2.5.1. Evolution du parasite chez l'hôte invertébré

Les formes amastigotes, présentes dans les macrophages du vertébré infecté, sont prélevées lors du repas sanguin du phlébotome. Une fois dans le mésentéron, les macrophages sont digérés mais les parasites résistent à la digestion en se protégeant derrière un réseau de chitine, appelé matrice péritrophique. Ce réseau est contenu dans une poche de protéines et glycoprotéines produites par l'insecte (Schlein, 1993). Les amastigotes se différencient en promastigotes procycliques qui se multiplient activement (Walters *et al.*, 1993) (Figure 5). A ce stade, les parasites ont une forme ovoïde et un flagelle court ce qui les rend faiblement mobiles. Deux jours après l'infection, les procycliques deviennent plus allongés et plus mobiles et sont alors dits promastigotes nectomonades (Gossage *et al.*, 2003) (Figure 5). Ces formes, non-prolifératives et très mobiles, sécrètent de la chitinase pour la dégradation de la chitine composant la matrice péritrophique (Schlein *et al.*, 1991). Les parasites migrent ensuite jusqu'à la partie antérieure du mésentéron avant de s'attacher aux cellules épithéliales de la paroi intestinale. L'adhérence des parasites est fondamentale, elle leur évite d'être évacués avec les déchets du repas sanguin (Bates, 2007). Ce mécanisme se fait principalement par l'intermédiaire des LPG, glycoprotéines majeures à la surface des promastigotes, qui se lient aux lectines présentes sur la surface intestinale de l'insecte (Kamhawi *et al.*, 2004).

Sept jours après le repas sanguin, les nectomonades adoptent la forme leptomonade (Figure 5) et se répliquent à nouveau, entamant la métacyclogenèse qui donne lieu à la formation des promastigotes métacycliques, formes infectieuses pour l'hôte vertébré (Sacks, 1989; Bates, 1994) (Figure 5). Durant ce processus, la membrane du corps cellulaire des parasites s'épaissit par dédoublement des LPG à leur surface, diminuant ainsi leur adhérence aux lectines de la paroi intestinale et leur permettant de migrer vers la valve stomodéale (jonction entre l'intestin moyen et l'intestin antérieur). Ils sécrètent à ce niveau un gel appelé PSG qui est composé de fPPG (Rogers *et al.*, 2002). L'accumulation des parasites et du PSG causent une obstruction provoquant l'ouverture de la valve stomodéale et obligeant l'insecte à régurgiter les parasites lors du prochain repas sanguin.

Une autre forme du parasite appelée haptomonade (Figure 5) a été rapportée mais son origine et sa fonction ne sont pas totalement élucidées. Il s'agit d'une forme élargie, non-motile et qui semble faciliter la génération et le maintien du PSG (Bates, 1994).

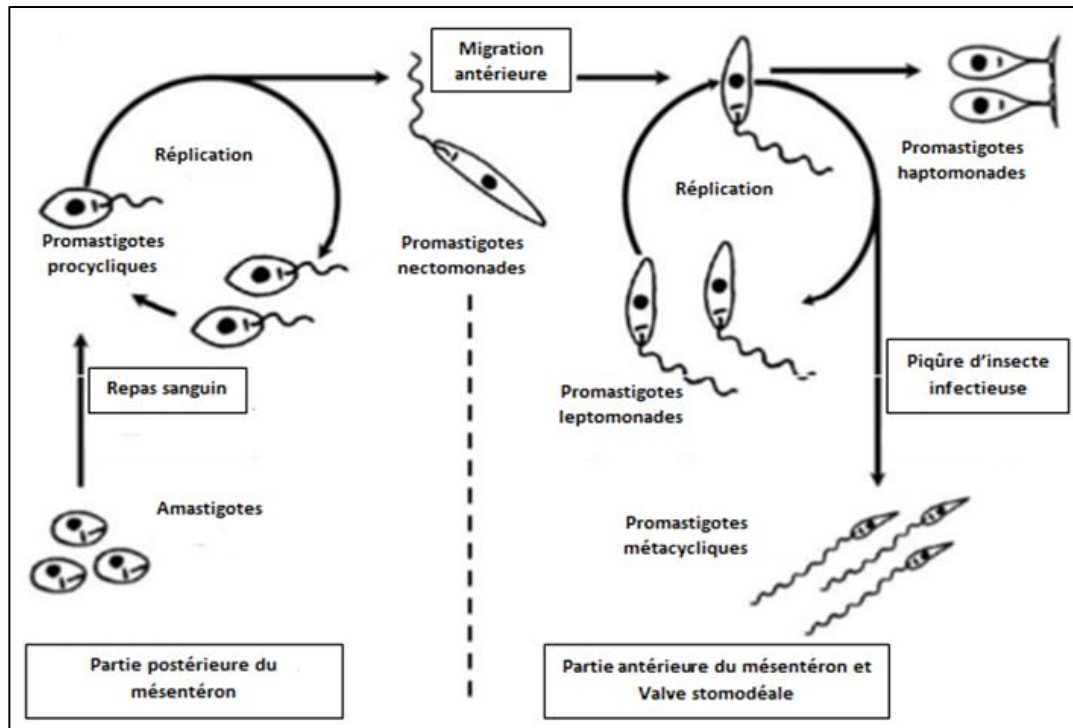


Figure 5 : Cycle réplcatif des formes promastigotes (Bates, 2007)

1.2.5.2. Evolution du parasite chez l'hôte vertébré

1.2.5.2.1. Inoculation du parasite et adhésion

En prenant son repas sanguin, le phlébotome infecté injecte avec la salive les formes promastigotes métacycliques dans le derme de l'hôte vertébré. Leur développement étant intracellulaire, les parasites doivent échapper à la lyse par le complément puis adhérer au macrophage où ils pourront se multiplier. Cette adhésion repose sur la reconnaissance de molécules de liaison, présentes sur la surface externe du parasite, par des récepteurs localisés sur la membrane des macrophages (Dedet, 2001a).

La résistance des promastigotes métacycliques à la lyse par le complément s'explique par l'élongation de la chaîne de LPG présente en abondance à leur surface (Sacks *et al.*, 1995) et par leur rôle important dans le relargage du complexe C5-b9 du complément (Puentes *et al.*, 1990). La gp63, autre molécule de surface, est également impliquée dans la résistance du parasite à la lyse médiée par le complément. Elle agit notamment par la conversion du C3b en une forme inactive C3bi qui permet l'opsonisation du parasite et sa phagocytose (Brittingham *et al.*, 1995) (Figure 6).

Les molécules de surface du parasite sont également essentielles pour sa fixation au macrophage. In vivo, en présence de complément, les promastigotes métacycliques sont généralement opsonisés par le C3b et le C3bi qui se fixent respectivement sur les CR1 et 3 du

macrophage. Le LPG et la gp63 peuvent se lier au C3b et C3bi (et donc au CR1 et 3) mais il semble que ce soit le CR3 qui permet l'interaction la plus ferme entre le macrophage et le parasite. Le LPG peut également se lier à la protéine C réactive (un produit précoce de l'inflammation) et se fixer ainsi au récepteur de cette protéine pour être phagocyté (Culley *et al.*, 1996). Il semble que sa phagocytose via ce récepteur n'entraîne pas la réponse immunitaire (TNF α , IL-10, IL-12) observée habituellement lors de l'internalisation d'autres types de particules via le même récepteur (Bodman-Smith *et al.*, 2002). Le GIPL, autre molécule de surface du parasite, semble permettre aussi l'attachement au macrophage puisqu'un anticorps anti-GIPL bloque l'internalisation du parasite (Suzuki *et al.*, 2002) (Figure 7).

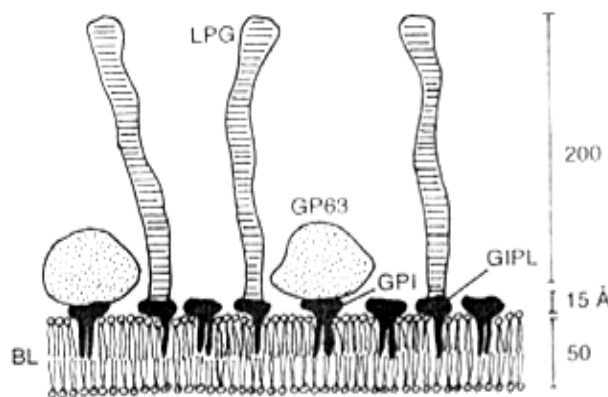


Figure 6 : Antigènes de surface de *Leishmania* (Cassier *et al.*, 1998)

BL : bicouche lipidique ; GP63 : glycoprotéine de 63 kDa ; GPI : glyco-inositol-phosphate, GIPL : glycol-inositol-phospholipides, LPG : lipophosphoglycane.

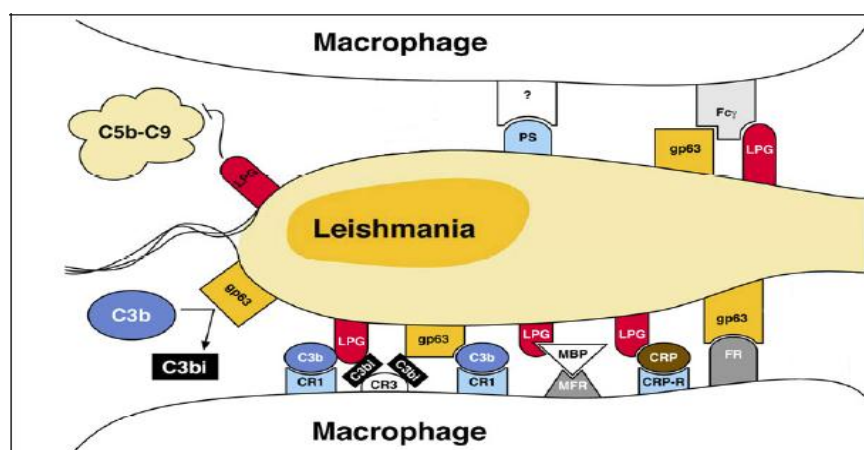


Figure 7: Interactions entre le macrophage et la forme promastigote métacyclique via leurs molécules de surface (Bogdan et Rillinghoff, 1998)

PS: Phosphatidylserine, MBP: mannose binding protein, MFR: mannose fructose receptor, CRP: C-reactive protein, CRP-R: C-reactive protein receptor, FR: fibronectine receptor.

1.2.5.2.2. Phagocytose et survie des *Leishmania*

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à migrer au niveau du site d'inoculation, constituant les cellules hôtes initiales où les formes promastigotes métacycliques survivent sans se répliquer. Ces formes prolongent la durée de vie des neutrophiles (habituellement courte) en les empêchant d'entrer en apoptose (Aga *et al.*, 2002; Laufs *et al.*, 2002). Cette prolongation correspond au temps nécessaire pour le recrutement des macrophages au site d'infection (Sunderkötter *et al.*, 1993). Ces derniers vont alors phagocyter les neutrophiles infectés, induisant la sécrétion de TGF- β (molécule anti-inflammatoire) et inhibant la sécrétion de plusieurs molécules pro-inflammatoires dans le but d'inactiver le système immunitaire (Cunningham, 2002).

Aussi, les métacycliques peuvent être phagocytés directement par les macrophages via le récepteur CR3.

D'une manière générale, après avoir été internalisées par la cellule, les particules sont retrouvées dans un compartiment membranaire précoce. Le processus de maturation que celui-ci subit dépend de la nature inerte ou virulente de la particule qu'il contient. Lorsque la particule est un pathogène, cas des leishmanies, le compartiment membranaire précoce est le siège d'une compétition entre l'hôte et le pathogène. Les pathogènes utilisent en effet des stratégies variées afin d'éviter ou de retarder la maturation, délétère pour eux, de la vacuole parasitophore en phagolysosome et de favoriser l'élaboration d'une niche de survie ou de multiplication (Méresse *et al.*, 2000).

Les formes promastigotes perdent alors la longueur du flagelle et se transforment en formes amastigotes dans les vacuoles parasitophores où elles se multiplient. Cette étape de différenciation permet aux parasites de s'adapter à la diminution du pH et à l'augmentation de la température (Zilberstein et Shapira, 1994).

Ces formes déclenchent une réaction oxydative moindre et sont sept à dix fois plus résistantes aux radicaux oxygénés que les formes promastigotes (Pearson *et al.*, 1983).

Les macrophages lysés, libèrent de nombreux amastigotes qui, à leur tour, infectent d'autres macrophages (Figure 8).

L'infestation s'étend dans le système réticulo-endothélial (rate, foie et moelle osseuse) dans le cas de la leishmaniose viscérale et dans les cellules lymphoïdes de la peau dans le cas de la leishmaniose cutanée (Cassier *et al.*, 1998).

Les deux formes de leishmanie se multiplient par division binaire longitudinale qui commence par un dédoublement du corps basal (partie du kinétoplaste) et la formation d'un second flagelle (Grassé, 1961). Elle se termine par une division simultanée du kinétoplaste et

du noyau (Simpson et Braly, 1970). La cytodièrese est généralement amorcée au niveau du pôle antérieur.

Suspectée depuis le siècle dernier (Plimmer et Bradford, 1899), la reproduction sexuée a été surtout décrite chez les trypanosomes (Chagas, 1927; Fairbairn et Culwick, 1949). Les divers travaux effectués dans ce domaine n'ont fourni que des hypothèses quant à la réalité et aux modalités de ce mode de reproduction. La reproduction parasexuée comporterait une recombinaison du matériel héréditaire au cours d'une fusion cellulaire, sans que survienne une méiose comme c'est le cas lors de la reproduction sexuée (Lanotte et Rioux, 1990).

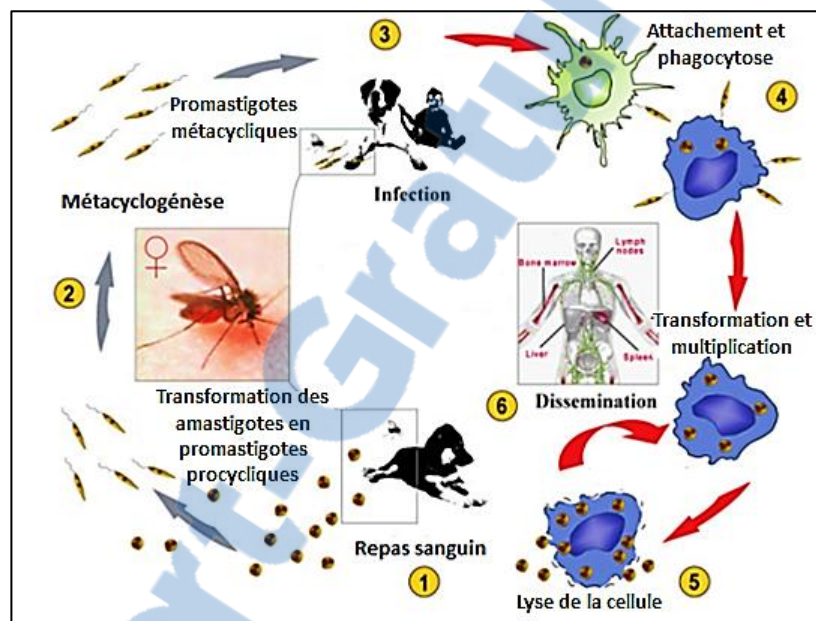


Figure 8 : Cycle de développement des *Leishmania* (Nieto *et al.*, 2011)

1.3. Vecteur

Les phlébotomes sont les seuls vecteurs connus des leishmanioses ; ils ont suscité dans tous les pays où ces maladies existent un grand intérêt de la part de la communauté scientifique.

Signalés pour la première fois en Algérie par Foley et Leduc (1912), ces insectes ont fait l'objet d'importants travaux à l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction de Parrot et des frères Sergent. Ces travaux ont permis de définir leur statut taxonomique et de démontrer leur pouvoir pathogène (Dedet *et al.*, 1984).

Parrot *et al.* (1930) identifiaient *P. perniciosus* comme espèce vectrice de la LV et observèrent, en 1931, son infestation naturelle par des promastigotes de *Leishmania*.

L. infantum zymodème MON-1, agent étiologique de cette forme de leishmaniose a été isolé de *P. perniciosus* (Izri *et al.*, 1990) et de *P. longicuspis* (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012).

1.3.1. Position systématique des phlébotomes selon Dolmatova et Demina (1971)

- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Sous-Embranchement : Hexapoda
- Classe : Insecta
- Sous-Classe : Pterygota
- Super-Ordre : Endopterygota
- Ordre : Diptera
- Famille : Psychodidae
- Sous-Famille : Phlebotominae
- Genres: *Phlebotomus* (Loew, 1845)
Sergentomyia (Frañça et Parrot, 1920)

Selon Lewis *et al.* (1977), la sous-famille des Phlebotominae comprend cinq genres, les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* dans l'Ancien Monde et les genres *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* dans le Nouveau Monde.

La distribution de ces insectes est très vaste et s'étend sur les cinq continents avec plus de 900 espèces répertoriées à travers le monde dont 70 impliquées dans la transmission des leishmanioses (Ready, 2013). En Algérie, 24 espèces ont été inventoriées (Dedet *et al.*, 1984; Belazzoug, 1991; Bounamous *et al.*, 2008; Berdjane-Brouk *et al.*, 2011) et réparties sur deux genres, *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (Belazzoug, 1991). Parmi ces espèces, cinq sont identifiées jusqu'à présent comme vectrices de *Leishmania* (Belazzoug, 1991; Boubidi *et al.*, 2011) (Annexe 1).

1.3.2. Morphologie

L'adulte est de couleur claire, en général jaune paille à brune, mesure 2 à 3 mm de long. Le corps couvert de soies, porte des ailes lancéolées, dressées en « V » avec des nervures disposées en lignes presque parallèles. Relevées au repos, les ailes forment avec le corps un angle de 45° (Izri *et al.*, 2006). La tête forme un angle de 90° avec l'axe du thorax. Les pattes sont longues et grêles, les postérieures étant les plus longues (Figure 9).

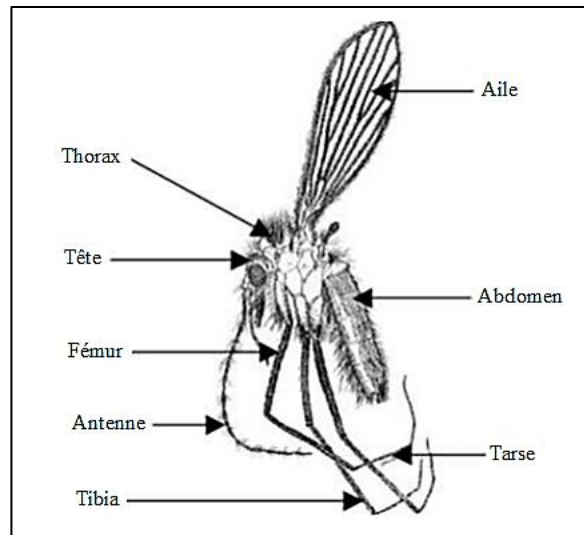


Figure 9 : Morphologie générale du phlébotome adulte (Rodhain et Perez, 1985)

1.3.2.1. Tête

Elle est formée en grande partie par une capsule chitineuse (épicrâne), limitée de chaque côté par un œil composé; elle porte les antennes et le proboscis. Les deux antennes qui s'insèrent à la région frontale sont formées chacune de 16 segments, deux basaux, pas plus longs que larges et 14 beaucoup plus minces, constituant le flagellum.

Le proboscis comprend 6 pièces enfermées dans le labium qui forme la gaine : le labre-épipharynx, l'hypopharynx, deux mandibules et deux mâchoires ou maxilles à la base desquelles se détachent les palpes maxillaires (Figure 10). Les mandibules sont absentes chez le mâle (Abonnenc, 1972).

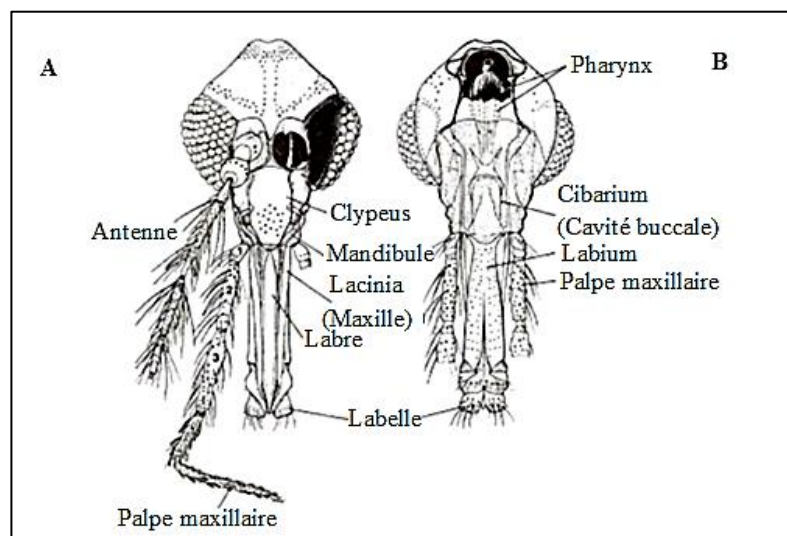


Figure 10 : Morphologie de la tête d'une femelle *Phlebotomus papatasi* (Lane et Crosskey, 1993)

- A. vue dorsale
B. vue ventrale



1.3.2.2. Thorax

Comme chez tous les diptères, le thorax est bien développé et constitué de trois segments, prothorax, mésothorax et métathorax, sur lesquels sont fixées ventralement trois paires de pattes relativement longues. Les balanciers ou haltères et les ailes sont insérés dorso-latéralement, ces dernières présentent sept nervures longitudinales et deux transversales de la base d'insertion (Abonnenc, 1972) (Figure 11).

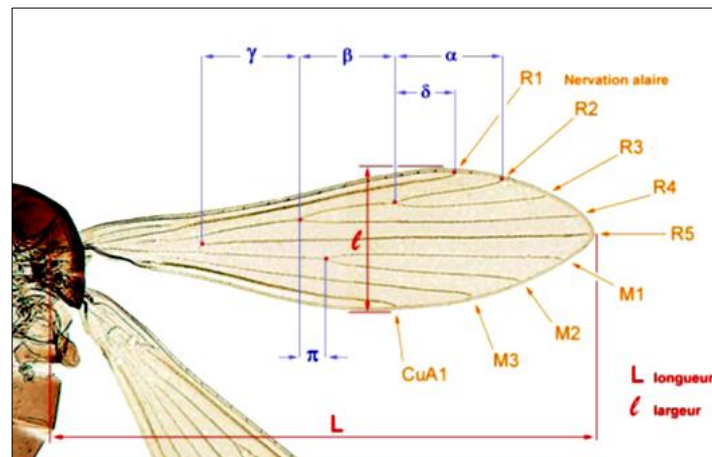


Figure 11: Aile de phlébotome (Brunhes *et al.*, 2000)

1.3.2.3. Abdomen

L'abdomen est cylindrique, constitué de 10 segments, le premier étant soudé au thorax. Les 7 premiers portent chacun une paire de stigmates respiratoires; les trois derniers sont transformés pour constituer le génitalia.

Chez le mâle, le génitalia, développé, se compose de trois paires de prolongements (Figure 12A):

- Une paire de coxites (9^{ème} sternite) sur laquelle s'articulent les styles.
- une paire de pièces médianes ou paramères,
- une paire de pièces dorsales ou lobes latéraux (9^{ème} tergite). A la partie interne de ces pièces sont soudés deux appendices et des lamelles sous médianes entre lesquelles s'ouvre l'anus.

Les paramères donnent passage à deux filaments péniers protégés chacun par un fourreau pénien, la gaine de pénis. Les filaments, faisant suite à la pompe génitale, sont des organes internes; ils prennent naissance dans les segments postérieurs de l'abdomen.

Chez la femelle, les organes génitaux sont constitués de structures externes, correspondant aux cerques et aux 8^{ème}, 9^{ème} et 10^{ème} tergites, et de structures internes, les spermathèques. Ces dernières, de morphologie peu variable d'une espèce à l'autre de phlébotome, sont au nombre

de deux et communiquent avec l'extérieur par des conduits plus ou moins longs (Abonnenc, 1972) (Figure 12B).

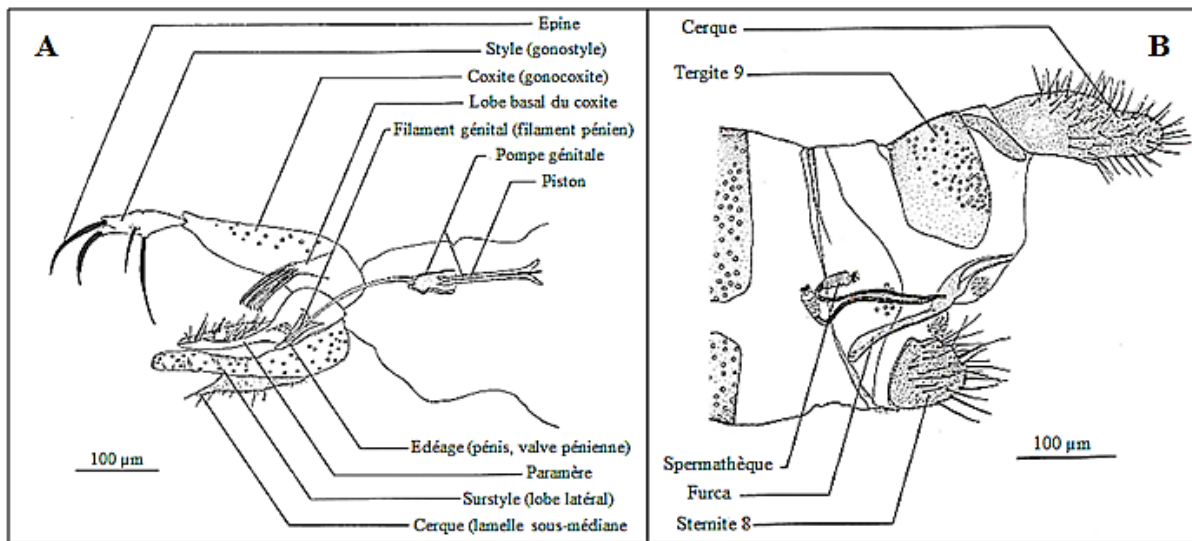


Figure 12: Appareils génitaux, mâle (A) et femelle (B) de *P. sergenti* (Leger et Depaquit, 2001)

1.3.3. Biologie

La longévité des phlébotomes est de l'ordre de quelques mois; un cycle gonotrophique complet dure environ 6 semaines. La femelle ne prend qu'un seul repas sanguin par cycle (Figure 13) et après 6 jours au moins, elle pond entre 80 et 100 œufs qu'elle dépose dans un gîte humide, sombre et sablonneux. Les œufs de forme ellipsoïde, mesurant 0,3 mm à 0,4 mm de long et 0,09 à 0,15 mm de large, sont de couleur blanc-jaunâtre au moment de leur émission puis pigmentent rapidement en brun au contact de l'air (Figure 14A et B).



Figure 13: Phlébotome femelle gorgée (Maroli *et al.*, 2012)

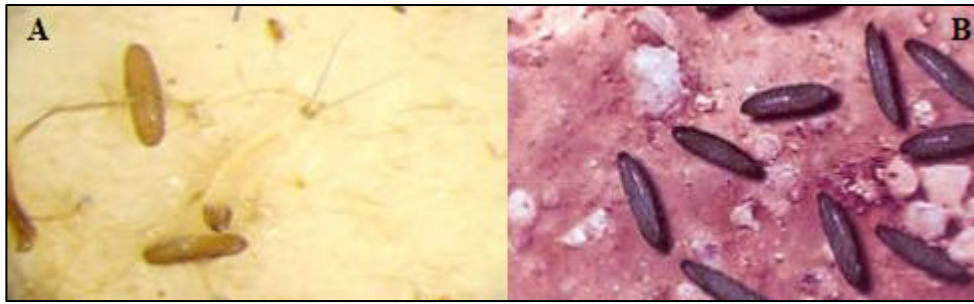
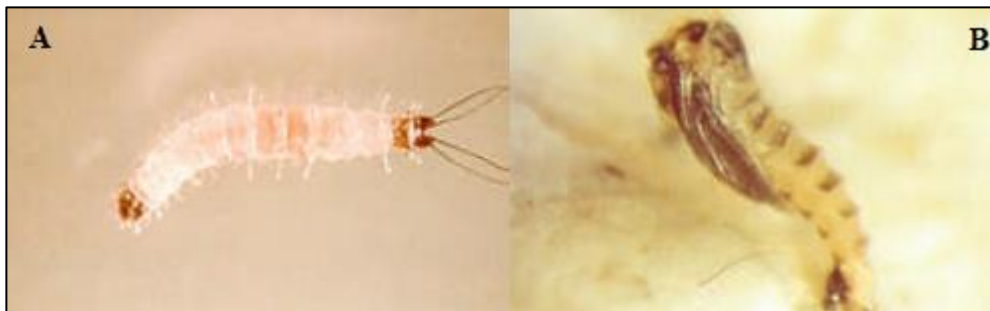


Figure 14. Œufs de phlébotome

A. A l'émission (Bousaa, 2008)

B. Au contact de l'air (Harrat *et al.*, 2006)

En 4 à 17 jours, chaque œuf donne naissance à une larve terricole, vermiforme, longue de 0,5 mm à 4 mm, avec l'extrémité caudale qui se termine généralement par 2 paires de longues soies (Figure 15A). Cette larve se nourrit de débris végétaux, subit quatre mues avant de donner une nymphe de couleur blanc-jaunâtre mesurant 3mm de longueur (Figure 15B) et d'où émerge le phlébotome adulte (Figure 16). Depuis l'œuf jusqu'au stade imaginal, le développement dure 20 à 90 jours selon les conditions climatiques (Irzi *et al.*, 2006) (Figure 17).

Figure 15 : Larve (A) et nymphe (B) de phlébotome (Harrat *et al.*, 2006)Figure 16 : Emergence du phlébotome (Niang *et al.*, 2000)

Les adultes apparaissent au printemps et sont présents durant toute la période estivale, jusqu'à l'automne. Mais cette longévité varie d'un endroit à un autre, en fonction des conditions climatiques (Bussiéras et Chermette, 1992; Killick-Kendrick, 1990).

La pérennité de l'espèce est assurée par les larves hibernantes du stade IV (Abonnec, 1972).

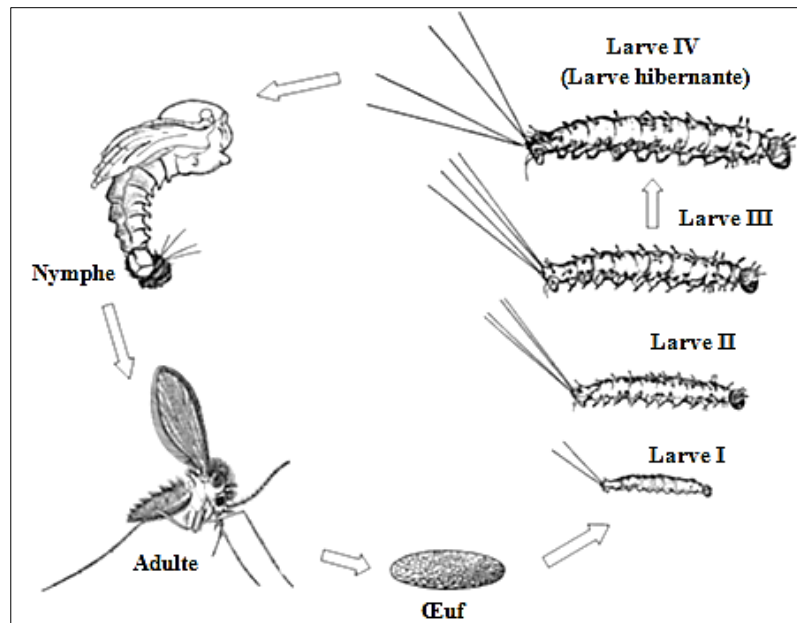


Figure 17 : Cycle de vie des ph l botomes (Lawyer et Perkins, 2004)

1.3.4. Accouplement

L'accouplement peut se produire avant ou après le repas de sang. Il est fréquent la nuit mais assez rare dans la journée; dure 2 à 4 minutes, parfois plus longtemps, Rossi (1926) signale une durée de 25 minutes chez *P. perniciosus* (Abonnenc, 1972) (Figure 18). L'agressivité des femelles fécondées est plus grande que celle des autres femelles (Dolmatova et Demina, 1965).

La parade nuptiale, qui précède l'accouplement, consiste en de brusques soubresauts de l'abdomen et de mouvements oscillatoires du mâle tandis que la femelle reste immobile à sa proximité (Abonnenc, 1972).



Figure 18 : Accouplement de *Phlebotomus perniciosus* (Maroli *et al.*, 2012)

1.3.5. Régime alimentaire

Les phlébotomes se nourrissent de sucs floraux et fruitiers ainsi que de miellat de pucerons. Ils peuvent également percer le parenchyme des feuilles et aspirer la sève (Moulinier, 2003); il a été montré que le fructose est le principal sucre recherché (Leger et Depaquit, 1999).

Les femelles sont de plus hématophages. Lorsqu'elles se posent sur un hôte, elles repèrent à l'aide de leurs labelles un endroit favorable pour piquer. Elles peuvent tester plusieurs zones, voire même s'envoler plusieurs fois avant de revenir vers cet hôte (Lane et Crosskey, 1993). Se nourrissant par telmophagie, elles ancrent leurs maxilles dans l'épiderme grâce aux denticules puis dilacèrent la peau et sectionnent les capillaires sanguins et lymphatiques grâce à un mouvement de ciseaux des mandibules. Il se forme ainsi un lac hémolympatique dans lequel elles injectent leur salive par le biais de l'hypopharynx. Le sang est aspiré dans le canal formé par l'accolement du labre-épipharynx et des mandibules jusque dans le cibarium, avant d'être directement dirigé dans l'intestin. Il faut 30 secondes à 5 minutes pour que l'estomac d'une femelle, qui pèse à jeun 0,35 à 0,5mg, soit rempli.

1.3.6. Composition de la salive

La salive des phlébotomes femelles comporte un ensemble de substances dont la première fonction est d'éviter le phénomène d'hémostase au point de pique. Certains composants ont des propriétés anticoagulantes et vasodilatatrices pouvant être très importantes (Kamhawi, 2000). Ces sécrétions sont produites par deux glandes salivaires situées dans le thorax du phlébotome. Elles se déversent ensuite dans des conduits salivaires qui se réunissent en un seul canal excréteur s'ouvrant dans le canal hypopharyngien (Kamhawi, 2000).

1.3.7. Habitat et activité

Les lieux où vit une population de phlébotomes, soit à l'état larvaire et nymphal, soit à l'état adulte, peuvent être très divers. Ils comprennent le gîte de l'hôte vertébré sur lequel les

femelles doivent se nourrir, le refuge où elles trouveront le repos et la tranquillité nécessaires au développement de leurs œufs et le milieu où les conditions sont favorables à la ponte et au développement des larves.

Pour manifester leur activité, les adultes doivent quitter, dès leur émergence, le lieu obscur humide et tempéré dans lequel ils ont trouvé à l'état larvaire et nymphal un milieu nutritif idéal et une protection efficace contre les influences météorologiques défavorables.

Les femelles fécondées s'éloignent de leur lieu d'émergence à la recherche de l'hôte vertébré pour la prise du repas sanguin nécessaire à la maturation des œufs (Abonnenc, 1972).

Les espèces anthropophiles se dirigent vers les habitations humaines mais peuvent s'arrêter au cours de leur trajet quand se présente un hôte occasionnel vivant à proximité de l'homme (chien, chat, poule, etc.).

Une fois repues, les femelles peuvent rester sur place si les conditions sont favorables ou effectuer un autre déplacement en quête d'un autre gîte de repos. Ce gîte ne sera que temporaire, elles seront en quête d'un nouveau milieu où s'effectuera la ponte.

L'habitat des phlébotomes est ainsi conditionné par de nombreux facteurs qui peuvent les amener à se déplacer sur des distances plus ou moins longues.

Dans les pays où sévit une saison sèche très longue et rigoureuse (régions tropicales arides et désertiques) avec des points d'eau peu fréquents et souvent très éloignés les uns des autres, les phlébotomes sont plus rares et ne peuvent s'éloigner bien loin de leur lieu de naissance. Ils habitent alors des refuges bien définis d'où ils ne sortent qu'aux heures fraîches de la nuit, pour manifester leur activité. Les terriers de petits rongeurs, les creux d'arbres et les anfractuosités des murs jouent un grand rôle dans leur conservation (Dedet, 1999; Feliciangeli, 2004). Ces lieux offrent une température relativement constante, une proximité avec de la matière en décomposition et une protection contre la dessiccation. Le dessèchement du substrat et les rayons directs du soleil leur sont néfastes (Dolmatova et Demina, 1971).

Dans les pays de climat équatorial, où la saison des pluies s'étend sur une grande partie de l'année, les phlébotomes sont en général plus nombreux et rencontrés plus fréquemment. Ils trouvent, dans un degré d'humidité élevé et constant, sous des températures variant peu, un milieu favorable à leur activité. L'abondance des matières organiques en décomposition et la diversité des abris (pouvant servir de gîtes de reproduction) leur offrent les meilleures conditions pour un développement accéléré (Abonnenc, 1972).

1.3.8. Fréquence saisonnière

Les phlébotomes sont actifs toute l'année dans les pays tropicaux alors que dans les régions tempérées, ils sont en pause hivernale malgré une activité méditerranéenne démontrée récemment (Naucke *et al.*, 2008). Cependant, leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition, peuvent varier selon l'altitude, la saison et l'espèce considérée.

1.4. Réservoirs

Les *Leishmania* ont comme réservoirs naturels des mammifères domestiques ou sauvages (carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés et primates), chez lesquels ils colonisent les cellules du système des phagocytes mononucléés. Dans certains contextes épidémiologiques, l'homme est l'unique réservoir du parasite (Dereure, 1999). Plusieurs foyers sont distingués en fonction de l'hôte : primaires, secondaires et tertiaires.

Dans les foyers primaires, la maladie atteint essentiellement des animaux sauvages (rongeurs, canidés) et les cas humains apparaissent sporadiquement avec localement des poussées épidémiques.

Dans les foyers secondaires, la maladie touche des animaux qui vivent à proximité de l'homme puis passe chez ce dernier sur un mode endémique.

Dans les foyers tertiaires, la maladie est exclusivement humaine et évolue sur un mode endémique avec des poussées épidémiques.

Le chien est considéré comme le principal réservoir de *L. infantum* dans le bassin méditerranéen et au Moyen Orient et de *L. chagasi* en Amérique du Sud. Le chat et les équidés sont des réservoirs accidentels (Costa Durão *et al.*, 1994; Passos *et al.*, 1996).

Le chien héberge les leishmanies dans le derme, même en l'absence de lésions cutanées, il constitue ainsi le véritable réservoir de la LV (Bussiéras et Chermette, 1992) (Figure 19).

Chez l'homme par contre, les parasites ne sont en général jamais trouvés à ce niveau, excepté chez les immunodéficients.



Figure 19 : Chien leishmanien (Nadau, 2005)

En Algérie, le rôle de réservoir du chien est connu depuis les travaux des frères Sargent en 1910. Plus tard, Dedet *et al.* (1977) ont diagnostiqué la leishmaniose chez 11,4 % des chiens de la Grande Kabylie. Ce rôle de réservoir n'a été retenu que par déduction et ce sont les travaux de Belazzoug (1984; 1985 et 1987) qui l'ont confirmé en faisant la corrélation entre foyers de leishmaniose canine et foyers de LV humaine.

Cet animal est également le réservoir de la LC sporadique du nord. La LCZ a comme réservoir deux rongeurs sauvages gerbillidés, *Psammomys obesus* (Figure 20A) et *Meriones shawi* (Figure 20B). Le premier a été découvert naturellement infecté par *L. major* au niveau du foyer de M'Sila (Belazzoug, 1983); le second, au niveau du foyer de Ksar Chellala (Belazzoug, 1986).



Figure 20 : Réservoirs de la leishmaniose cutanée zoonotique

A. *Psammomys obesus* (rat du sable)⁽¹⁾

B. *Meriones shawi* (rat du champ)⁽²⁾

⁽¹⁾ <http://www.worldlifeexpectancy.com/mammal-life-expectancy-fat-sand-rat> (consulté le 09/07/18)

⁽²⁾ <https://www.biolib.cz/en/image/id97965/> (consulté le 16/07/18)

1.5. Situation épidémiologique

Les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays des régions tempérées d'Afrique, du Sud de l'Europe, d'Asie et d'Amérique, il s'agit de 16 pays industrialisés, de 59 en voie de développement et de 13 les moins développés (Desjeux *et al.*, 2001) (Figure 21).

Plus récemment, les leishmanies ont été isolées de kangourous rouges en Australie, ce qui suppose leur circulation dans cette région (Hide, 2004).

Le nombre de personnes infectées à l'échelle mondiale par les différentes espèces de *Leishmania* est estimé à 12 millions avec une incidence d'environ 1 à 1,5 million de cas par an pour la LC et de 300 000 à 500 000 pour la LV (WHO, 2010).

La LV se répartit sur tous les continents, à l'exception de l'Océanie (Faucher et Piarroux, 2011) ; 200 millions de personnes sont exposées au risque de contamination (Desjeux, 2004) et 70 000 en meurent chaque année (WHO, 2010).

Ces chiffres sont probablement en deçà de la réalité car dans beaucoup de pays, la maladie n'est pas soumise à déclaration obligatoire (OMS, 2006; 2007).

Il existe six foyers de LV au niveau mondial (Dedet, 2001b) (Figure 22):

- Indien
- Centre asiatique (Népal et Bangladesh)
- Chinois
- Est-africain (Éthiopie, Soudan)
- Bassin méditerranéen (France, Italie, Espagne, Portugal, Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Égypte et Turquie) où l'incidence annuelle est de 1200 à 2000 cas (Gangneux *et al.*, 2015).
- Nord-est brésilien.

Plus de 90% des cas de LV proviennent du Bangladesh, de l'Inde, du Soudan et du Brésil (Murray *et al.*, 2005; Janvier *et al.*, 2008).

Les deux espèces incriminées dans l'apparition de la maladie sont *L. donovani* et *L. infantum*. La première espèce, responsable d'épidémies au Soudan, en Ethiopie, en Inde, au Népal et au Bangladesh, est anthroponotique, ayant l'homme comme seul réservoir. La seconde, décrite en Chine, au Pakistan, en Amérique latine et dans le bassin méditerranéen, est zoonotique, avec comme réservoir le chien (Marty, 2010).

La situation géographique particulière de l'Algérie avec l'existence de plusieurs étages bioclimatiques, allant du climat méditerranéen au nord, au climat saharien au sud, en passant par de vastes zones semi arides et arides (Stewart, 1974) et sa forte population rurale, font de ce pays un terrain favorable à l'existence des deux formes de leishmaniose, la LC et la LV.

La LC sévit sous deux entités épidémiologiques distinctes, la LC sporadique du nord limitée au nord du pays (Harrat *et al.*, 1995) et la LCZ largement répartie au centre et au sud. La fin des années 1990 a été marquée par une recrudescence alarmante de cette forme de leishmaniose. De 2000 à 2004, 45 363 cas ont été notifiés par l'INSP et un chiffre record est atteint en 2005 avec une incidence nationale de 78,5 pour 100 000 habitants (Zait et Hamrioui, 2009).

La LV s'étend sur toute la partie nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humides et subhumides (Bachi, 2006). De nombreux cas sont survenus dans les régions semi-arides et arides connues comme étant des foyers de LCZ. En effet, 21 cas de LV ont été signalés à Biskra par Belazzoug *et al.* (1986) et d'autres dans le Hoggar et le Tassili par Belkaid et Harrat (1997). Depuis la découverte du premier cas en Kabylie par Lemaire (1911), le nombre de personnes atteintes n'a cessé d'augmenter. Entre 1911 et 1933, 18 cas sont rapportés par Lasnet (1934) et 497 entre 1965 et 1974, par Addadi et Dedet (1976). La décennie 1975-1984 a été marquée par l'enregistrement de 721 cas (Belazzoug *et al.*, 1985). Le record a été atteint entre 1985 et 1990 avec 1121 cas (Harrat *et al.*, 1992).

L'incidence annuelle est alors passée de 0,36 cas pour 100 000 habitants (Belazzoug *et al.*, 1985) à 0,73 cas pour 100 000 habitants (Harrat *et al.*, 1992). Entre 1995 et 2003, 1654 cas ont été déclarés à l'INSP. Ces valeurs ne reflètent probablement pas la réalité, de nombreux cas sont sous-déclarés ou échappent au diagnostic en raison de l'insuffisance des infrastructures sanitaires dans les zones rurales.

Dans l'ouest algérien, la documentation sur la LV humaine est quasiment inexistante, seule la leishmaniose canine a été signalée et pour la première fois dans la région de Tlemcen faisant de cette dernière un territoire potentiel pour l'émergence de la maladie chez l'Homme (Belazzoug, 1987).

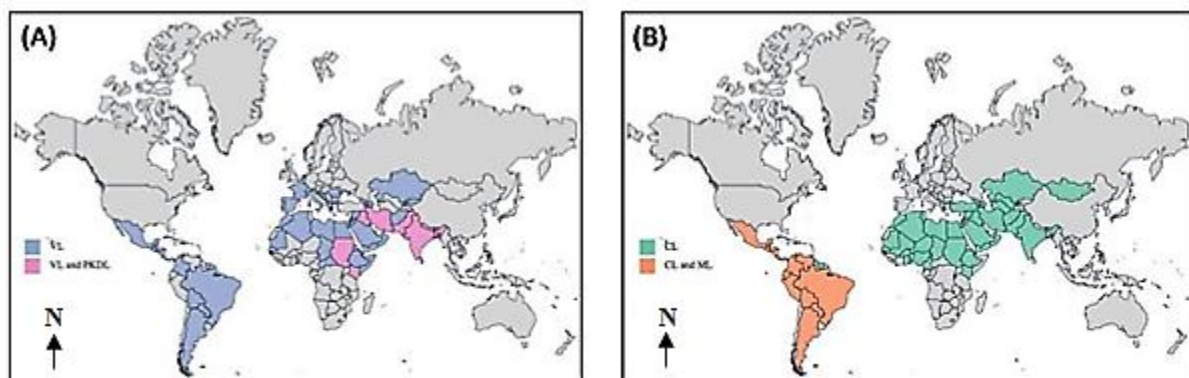


Figure 21 : Répartition géographique des leishmanioses, viscérale et dermique post kala-azar (A) et cutanée et muco-cutanée (B) (Alvar *et al.*, 2012).

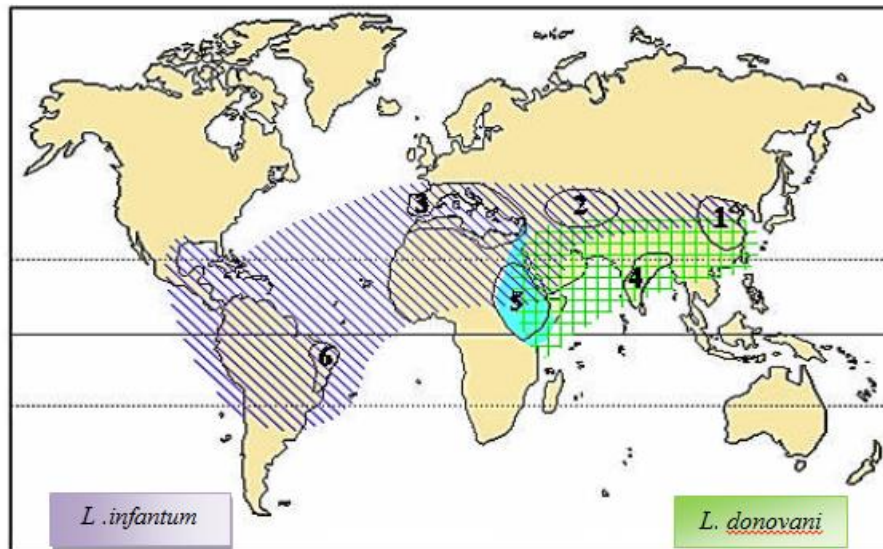


Figure 22 : Répartition géographique des deux espèces de *Leishmania* et principaux foyers de la leishmaniose viscérale dans le monde (Desjeux et Dedet, 2005).

1-Foyer chinois	2-Foyer centre-Asiatique	3-Foyer méditerranéen
4-Foyer indien	5-Foyer est-Africain	6-Foyer nord-est brésilien

2. Leishmaniose et immunité adaptative

Le parasitisme implique une adaptation étroite du parasite à son hôte. Cette adaptation aboutit à l'établissement d'un équilibre où les mécanismes de l'immunité protectrice sont contournés par divers moyens de survie par lesquels les parasites échappent aux conséquences de la réponse immunitaire qu'ils induisent (Bach, 1986).

Chez le vertébré, les leishmanies sont des endoparasites des phagocytes mononucléés, plus précisément des macrophages dont le rôle principal est la destruction des pathogènes. Il s'agit ainsi d'une adaptation du parasite aux conditions du milieu.

L'inoculation de leishmanies aboutit à la mise en jeu de mécanismes complexes combinant immunité naturelle (Voir évolution du parasite chez l'hôte vertébré) et immunité acquise (immunité spécifique avec mémoire). Ces mécanismes font intervenir des interactions entre plusieurs types cellulaires. Une grande partie de ces interactions est liée aux médiateurs de communications intercellulaires que sont les cytokines/chimiokines. Celles-ci interviennent à la fois dans les mécanismes de la résistance naturelle, de la guérison, mais aussi dans le développement de la forme viscérale de la maladie.

Afin de développer une réponse spécifique qui est essentielle dans la défense anti-leishmanienne, le pathogène doit être présenté aux LT naïfs. Ce sont surtout les cellules dendritiques qui semblent responsables de la présentation d'antigène aux LT. Cependant, les

macrophages doivent être capables aussi d'exprimer les antigènes via le CMH II pour être reconnus par les LT activés et devenir davantage microbicides.

La présentation des antigènes permet l'élaboration de l'IL-12, qui active les cellules tueuses NK et les macrophages. Les NK sécrètent l'IFN- γ qui conduit à la mort des *Leishmania* (Figure 23).

Les cellules dendritiques qui sont à l'origine immatures, capturent les parasites grâce à des récepteurs puis les fragmentent à l'aide de leur équipement enzymatique en peptides immunogènes qu'elles chargent sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II. Elles deviennent ainsi des cellules matures et commencent à être détectées dans le ganglion qui draine le chancre de l'inoculation 24 heures après l'infection. Elles se trouvent à proximité des LT, les conditions sont ainsi réunies pour que ces derniers soient activés et prolifèrent. L'expansion des LT dans le ganglion est maximale trois jours après l'infection, puis ils apparaissent dans la circulation sanguine, la rate et le foie.

Les LT Helper comprennent deux sous-populations, les LT Helper de type 1 et les LT Helper de type 2 qui sont identiques morphologiquement mais se différencient par leur fonction et les cytokines qu'ils sécrètent (Rhalem *et al.*, 1999).

La réponse Th1 ou Th2 est orientée au moment de la présentation de l'antigène. La résistance à l'infection dépend de l'orientation de la réponse immunitaire vers la sous-population de type 1. Celle-ci, qui doit être puissante, passe par la production de cytokines telles que l'IFN γ , l'IL-2, l'IL-12 et le TNF α . L'IFN γ va activer en synergie avec le TNF α , les mécanismes leishmanicides du macrophage. A l'inverse, la réaction Th2 productrice d'anticorps, n'est pas protectrice, des taux élevés d'IgG sont observés au cours de leishmanioses chroniques n'ayant pas tendance à la guérison. Elle favorise plutôt la pathogénie des leishmanies par la production d'IL-4 (Trinchieri., 1995), d'IL-10 et de TGF- β (Carrera *et al.*, 1996) qui sont de puissants suppresseurs de la fonction macrophagique et de la production des cytokines par les cellules Th1 (Bogdan et Nathan, 1993). Ainsi, la voie Th2 est à l'origine de la persistance d'une population parasitaire (Euzeby, 2008) (Figure 23).

Les personnes, ayant fait une leishmaniose cutanée ou viscérale ou une infection asymptomatique, développent classiquement une mémoire immunitaire spécifique du parasite et résisteront à la réinfection. Cette immunité est dirigée par les LT, les anticorps ne jouent aucun rôle protecteur (Louzir et Dellagi, 1999). Le degré de la protection conférée est fonction du nombre de cellules T CD4 intervenant.

Par ailleurs, des études ont montré le rôle de la salive du phlébotome dans l'immunité. L'action de celle-ci est liée à plusieurs substances pharmacologiques qu'elle contient et qui

perturbent l'hémostase et la réponse immune de l'hôte. Il s'agit de molécules aux propriétés anticoagulantes, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immunosuppressives. Ce processus augmente la probabilité de survie du parasite (Andrade *et al.*, 2007).

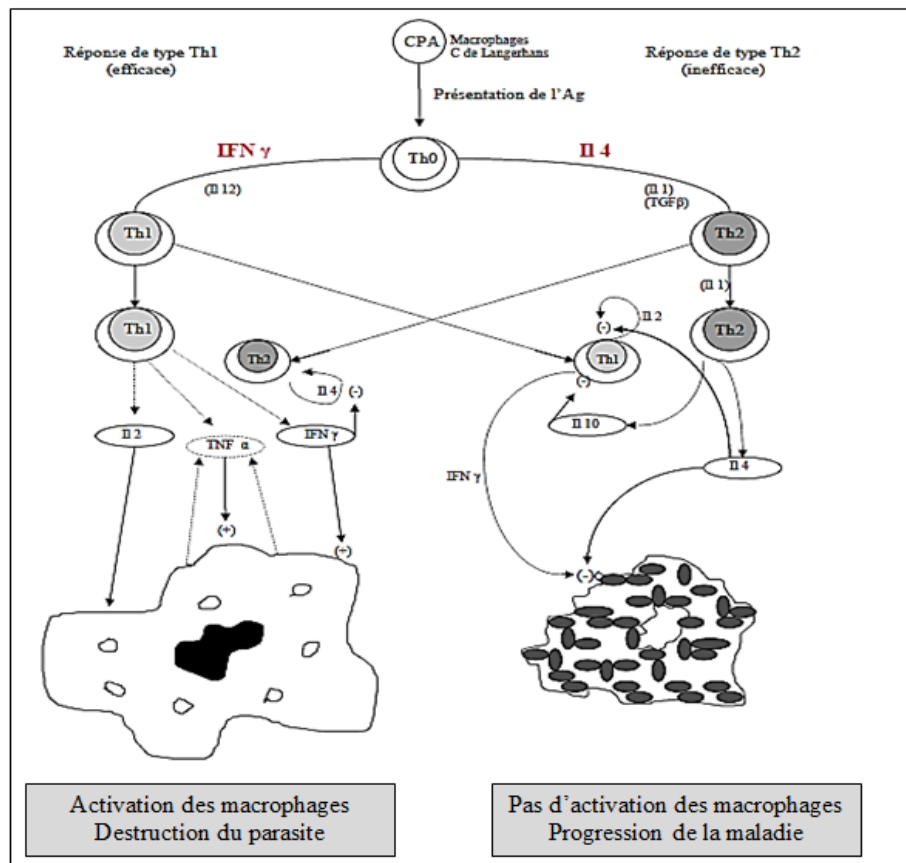


Figure 23 : Réponse immunitaire de l'hôte (Locksley et Louis, 1992)

3. Diagnostic de la leishmaniose viscérale

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite ou de son acide désoxyribonucléique (ADN) et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, les anticorps circulants (Le Fichoux *et al.*, 1999).

La méthode diagnostique de choix est celle qui présente le meilleur compromis entre la sensibilité, la spécificité et le coût (Boelaert *et al.*, 1999).

3.1. Diagnostic non spécifique

3.1.1. Aspect clinique

La phase de contamination qui passe souvent inaperçue est suivie par une phase d'incubation asymptomatique d'une durée d'environ 3 à 6 mois avec des extrêmes de 40 heures à plusieurs années (Carré *et al.*, 2010).

Après une incubation silencieuse, le début est le plus souvent progressif, l'enfant dort mal, pâlit, maigrit et présente des accès fébriles.

A la phase d'état, le tableau clinique est caractérisé par une triade symptomatique qui associe:

- Une fièvre élevée, anarchique, qualifiée de fièvre «folle», rebelle aux antipyrétiques, antipaludéens et antibiotiques. Elle est le signe le plus précoce et le plus courant.
- Une pâleur cutanéomuqueuse: pâleur «cireuse» témoin de l'anémie.
- Une splénomégalie énorme, ferme, mobile et indolore et de progression très rapide, peut dépasser l'ombilic et atteindre la fosse iliaque droite (type IV). Elle est considérée comme étant la plus grosse rate infantile qui déforme l'abdomen. Une hépatomégalie et des adénopathies peuvent survenir.

3.1.2. Anomalies hématologiques

Généralement, une anémie de type normochrome est mise en évidence. Le taux d'hémoglobine est de 10-11 g/l au début, passe à 4 g/l dans les formes graves. L'anémie, principalement due à l'hypersplénisme, est peu régénérative (taux de réticulocytes normal ou légèrement augmenté). Une leucopénie apparaît ensuite (leucocytes < 4 g/l) avec neutropénie marquée, d'où le risque de complications infectieuses notamment à germes opportunistes. Enfin, la thrombopénie est fréquente mais plus tardive (plaquettes entre 100 et 150 g/l) et peut être à l'origine de formes hémorragiques si elle est inférieure à 50 g/l (Carré *et al.*, 2010).

3.1.3. Syndrome inflammatoire

Ce syndrome correspond à une réaction de l'hôte vis-à-vis du parasite. Il est marqué par une forte augmentation de la VS de 80-100 mm à la première heure (Carré *et al.*, 2010).

3.1.4. Dysprotidémie (ou dysprotéinémie)

Le taux normal de protéides totaux sanguins est de 65-80 g/l ; lors d'une LV, il passe à 100 g/l. Cette hyperprotéinémie correspond à une hypergammaglobulinémie polyclonale à IgG surtout (IgG jusqu'à 20 g/l), mais l'augmentation sur les IgM est possible. Une hypoalbuminémie est également retrouvée (Carré *et al.*, 2010).

3.1.5. Anomalies hépatiques et rénales

La fonction hépatique est souvent conservée. Cependant, des formes ictériques de leishmanioses viscérales peuvent apparaître avec une cytolyse détectée par une augmentation des transaminases.

Il y a aussi un risque d'atteinte rénale due à des dépôts de complexes immuns, caractérisée par une légère protéinurie, se compliquant parfois d'un syndrome néphrotique tardif (Carré *et al.*, 2010).

3.2. Diagnostic spécifique

3.2.1. Méthodes directes

3.2.1.1. Examen microscopique direct

Consiste à mettre en évidence le parasite dans des frottis de moelle osseuse colorés au MGG. Le succès du test est observé dans 50 % des cas (Samake, 2006). Les parasites sont observés sous forme amastigote, en général intracellulaires à l'intérieur de monocytes ou extracellulaires car les cellules sont souvent éclatées (Dedet, 2009). Ils apparaissent comme des cellules ovoïdes ou ellipsoïdes de taille variable (2 à 6 µm), avec un cytoplasme bleu pâle, un noyau arrondi de couleur rouge pourpre et un kinétoplaste en forme de bâtonnet de couleur violette (Figure 2).

Réalisé par un opérateur expérimenté, la microscopie représente le meilleur examen pour le diagnostic (Del Giudice *et al.*, 1998).

3.2.1.2. Examen direct après culture

Cet examen a pour but de révéler la présence du parasite sous sa forme promastigote. Le prélèvement peut être ensemencé dans un milieu diphasique à base de sang de lapin (milieu NNN), dans lequel se développent les formes promastigotes flagellées et mobiles (Dedet, 2009) (Figure 3).

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI qui donnent d'excellents résultats. Pour les isolats de *L. infantum*, le milieu de sérum de lapin, facile à préparer, donne de bons résultats (Belkaid *et al.*, 1996). Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques, pénicilline streptomycine ou pénicilline-gentamycine et exceptionnellement d'antifongiques, la 5-fluorocytosine (Bachi, 2001). L'incubation se fait à 24-26 °C. La culture est lente et nécessite cinq repiquages à une semaine d'intervalle avant de conclure à une négativité.

3.2.1.3. Mise en évidence des leishmanies à partir du vecteur

Les formes promastigotes peuvent être détectées, après dissection du phlébotome femelle, par examen microscopique des organes susceptibles de les héberger (Annexe 2).

3.2.2. Méthodes indirectes (Méthodes sérologiques)

De nombreuses réactions immunologiques sont utilisées dans le diagnostic de la LV (Annexe 3). Les plus courantes, à l'heure actuelle, sont les réactions d'hémagglutination indirecte, d'IFI, d'ELISA, d'agglutination indirecte, de test au Latex, d'immunochromatographie et du WB (Dedet, 2001a).

4. Identification des *Leishmania*

4.1. Analyse biochimique des isoenzymes (zymodèmes)

Cette analyse (détaillée en annexe 4) repose sur la caractérisation iso-enzymatique par électrophorèse en gel épais d'amidon, utilisant 15 systèmes enzymatiques (Rioux *et al.*, 1990). Malgré son ancienneté, elle reste une technique de référence reconnue par l'OMS.

En Algérie, les espèces responsables des deux formes cliniques de leishmanioses appartiennent à deux espèces distinctes : *L. infantum* et *L. major* (Harrat *et al.*, 1996).

L. infantum zymodème MON-1 est l'agent le plus fréquemment isolé de cas de LV humaine et canine et *L. infantum* zymodèmes MON-24 et MON-80 de cas de LC du nord. Dans des cas plus rares, *L. infantum* zymodème MON-24 est responsable de la LV infantile.

L. major MON-25 est à l'origine de la LC des régions arides et présahariennes (Figure 24).

L. infantum a également été identifié dans d'autres pays parmi lesquels, la Tunisie pour les zymodèmes MON-1, MON-24, MON-80 (Aoun *et al.*, 2001), la France pour les zymodèmes MON-1, MON-80 (Marty *et al.*, 1994), MON-11, MON-29, MON-34, MON-108 (Basset *et al.*, 2004) et l'Espagne pour les zymodèmes MON-1 et MON-80 (Portus *et al.*, 1989).

Les zymodèmes MON-1 et MON-80 sont responsables de la LV et de la LC en Italie et au Vénézuëla (Gramiccia *et al.*, 1992).

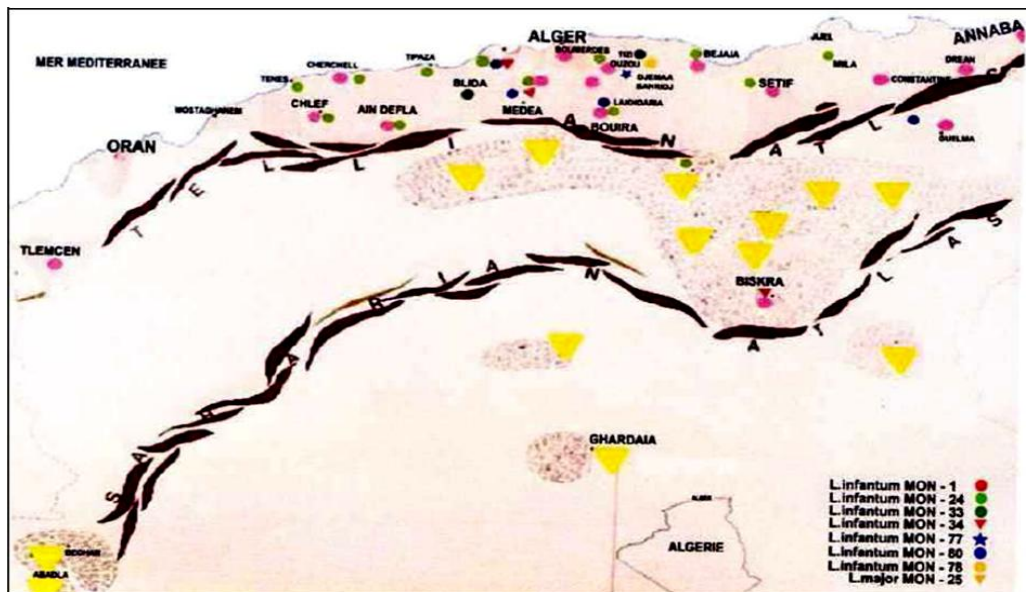


Figure 24 : Répartition géographique des différents zymodèmes de *L. infantum* et de *L. major* d'Algérie (Harrat *et al.*, 1996)

4.2. PCR séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

L'intérêt de cette approche, utilisée pour la première fois par Croan *et al.* (1997), est d'utiliser des amorces « universelles », valables pour toutes les espèces du genre *Leishmania*. Elle fait appel aux techniques d'amplification génétique et de séquençage basées sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique de la région étudiée, permettant de distinguer spécifiquement ces espèces (voir matériel et méthodes).

4.3. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

A partir de 1988, la spectrométrie de masse (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) a connu un essor considérable dans le domaine de la biologie et tente d'émerger pour l'identification des microorganismes en s'appliquant aux bactéries et aux champignons unicellulaires (Qian *et al.*, 2008) et filamenteux. Les applications de cette technique sont très vastes et concernent principalement l'identification de peptides ou de protéines, l'analyse de leur séquence en acides aminés ou encore la mise en évidence de modifications post-traductionnelles (Carbonnelle et Nassif, 2012). L'efficacité de cette technique a été prouvée récemment dans l'identification «rapide» des espèces de leishmanies par Mouri *et al.* (2014) (Annexe 4).

5. Co-infection *Leishmania* /VIH

La pandémie du VIH représente un des principaux obstacles au contrôle de la leishmaniose viscérale. La co-infection LV/VIH est décrite dans au moins 35 pays du monde (Figure 25).

Les perturbations immunologiques induites par les deux infections sont similaires (Alvar *et al.*, 1997), ce qui potentialise leurs effets si elles surviennent de façon concomitante. En effet, leur présence et leur réplication dans le même type de cellule peuvent avoir d'importantes implications dans leur expression et leur extension au sein de l'organisme.

Il est maintenant connu que l'infection au VIH accroît le risque de contracter la leishmaniose, et multiplie par 100 à 1000 celui de contracter la LV dans les zones d'endémicité (Desjeux, 1999). Aussi, les personnes infectées par ce virus et immunodéprimées développeront une leishmaniose sévère et dans sa forme viscérale suite à des piqûres infectantes de phlébotomes. De même, les sujets atteints de leishmaniose deviennent plus susceptibles à l'infection par le VIH. La LV contribue à détériorer l'état général du patient en entraînant une immunodépression indépendante du VIH (Albrecht *et al.*, 1996; Alvar *et al.*, 1997).

En conséquence de cette sévère immunodépression (moins de 200 CD4+/ml), le sujet développe rapidement le SIDA, avec les maladies opportunistes qui lui sont associées. Par ailleurs, Bethe *et al.* (1999) ont montré chez 23 patients, que le niveau de la charge virale influence l'évolution du traitement antiparasitaire et qu'une LV active est associée à une réplication du virus *in vivo*.

Le SIDA et la LV sont donc pris dans un cercle vicieux de renforcement mutuel, la LV accélère la flambée de l'épidémie de SIDA et diminue l'espérance de vie des patients VIH+, tandis que le VIH éperonne la dissémination des *Leishmania* (Desjeux, 1999). Le produit de cette interaction provoque une déficience cumulative de la réponse immunitaire, accroissant de façon exponentielle la sévérité des deux infections et leurs conséquences. Cette interaction entre la forme viscérale de la leishmaniose et le VIH devient rapidement mortelle.

Sur les 1700 premiers cas notifiés par l'OMS dans 33 pays du monde jusqu'en 1998, 835 provenaient de l'Espagne, 229 de l'Italie, 259 de France et 117 du Portugal.

La majorité des cas dans les Amériques sont signalées au Brésil, où l'incidence est passée de 0,8 cas pour 100 000 habitants en 1986 à 10,5 pour 100 000 en 1996.

En Afrique, le nombre de cas déclarés donne une estimation modeste et serait supérieur si une surveillance active sur l'ensemble du territoire est exercée. L'Ethiopie a un système de dépistage bien organisé, de prise en charge et de notification des infections. Le Maroc dispose d'un centre de surveillance; c'est le cas aussi du Kenya et du Soudan depuis 1998 (WHO, 2000).

En Algérie et selon Harrat *et al.* (1995), une première mention de co-infection LV/VIH a été rapportée en 1987 par Ammar-Khodja. En 1999, sur 426 cas de SIDA notifiés, 3%, dont la majorité était originaire de la Kabylie, avaient développé une leishmaniose viscérale (Alem *et al.*, 1999). Au terme d'une étude rétrospective sur 9 ans (1991-1999) et prospective sur 11 ans (2000-2010), incluant des patients adultes de cette région et à VIH positif, 64 cas de LV ont été enregistrés (8 et 56 respectivement). La maladie était concomitante à l'infection virale chez 18 d'entre-eux (4/8 et 14/56) (Achour *et al.*, 2017).

Le nombre de cas enregistrés serait en dessous de la réalité contrairement aux pays du sud de l'Europe ; un dépistage plus large permettrait le diagnostic de plusieurs autres cas. Harrat *et al.* (1995) ont estimé que 1500 personnes sont concernées par le VIH dans notre pays. En décembre 2014, ce chiffre est passé à 9103 cas⁽³⁾.

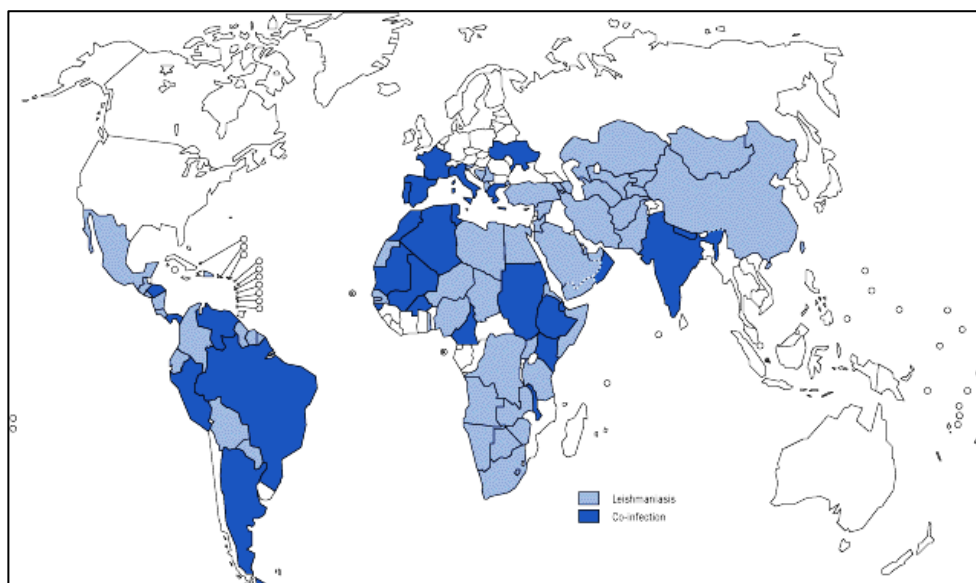


Figure 25 : Répartition mondiale des cas de co-infections *Leishmania* / VIH (Ferrandiz, 2013)

6. Prévention et lutte contre la leishmaniose viscérale

La prévention est un élément clé dans la lutte contre cette affection, en y luttant plus efficacement on réduit à la fois la morbidité et la mortalité. Elle comprend 3 grands axes :

- la lutte contre le phlébotome,
- la lutte contre les réservoirs du parasite,
- la prophylaxie humaine, avec le dépistage et le traitement des personnes malades et la sécurité transfusionnelle.

Ces différentes mesures sont détaillées en annexes 5 et 6.

(³) http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/DZA_narrative_report_2015.pdf (consulté le 01/08/2018)

CHAPITRE II

POPULATION ET METHODES

1. Hypothèse et objectifs du travail

1.1. Hypothèse de travail

Après recherche bibliographique et synthèse des informations obtenues, ce travail a permis d'orienter la recherche sur les axes suivants :

- Introduire des techniques de diagnostic rapide et performantes à partir de prélèvements non invasifs contribuerait à la mise en route rapide du traitement spécifique et à l'amélioration du pronostic de la maladie.
- Connaitre le profil épidémiologique de l'exposition à la leishmaniose viscérale de la population infantile permettrait de mieux cerner les facteurs à l'origine de l'émergence de la maladie.
- Sensibiliser les parents de la gravité des signes cliniques contribuerait à la réduction du délai d'hospitalisation (durée entre l'apparition des signes cliniques et l'hospitalisation) et par conséquent à une prise en charge précoce des malades.
- Identifier les espèces de phlébotomes et détecter celles vectrices permettraient d'estimer le risque spatial en matière de leishmaniose viscérale.

1.2. Objectifs de l'étude

Les objectifs assignés à cette recherche sont :

▪ Objectifs principaux :

- Evaluer les performances de l'immunochromatographie comme test de diagnostic rapide de la maladie après diagnostic établi par des examens directs et sérologiques.
- Proposer une approche diagnostique par PCR en temps réel à partir du sérum, prélèvement non invasif.
- Etablir le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest algérien.

▪ Objectifs secondaires :

- Identifier par PCR-séquençage l'espèce responsable de la maladie dans l'Ouest algérien.
- Identifier la faune phlébotomienne présente dans la wilaya la plus touchée par la maladie et les espèces hébergeant les leishmanies.

2. Population étudiée

Il s'agit d'enfants des deux sexes et qui, présentant les signes cliniques et biologiques en faveur d'une leishmaniose viscérale, fréquentent l'EHS pédiatrie d'Oran et à vocation régionale (Annexe 7).

Leur prise en charge thérapeutique consiste en deux cures nécessitant chacune leur hospitalisation pendant quinze jours.

Ils étaient âgés de moins de quinze ans et provenaient de onze wilayas de l'Ouest algérien (Figure 26).

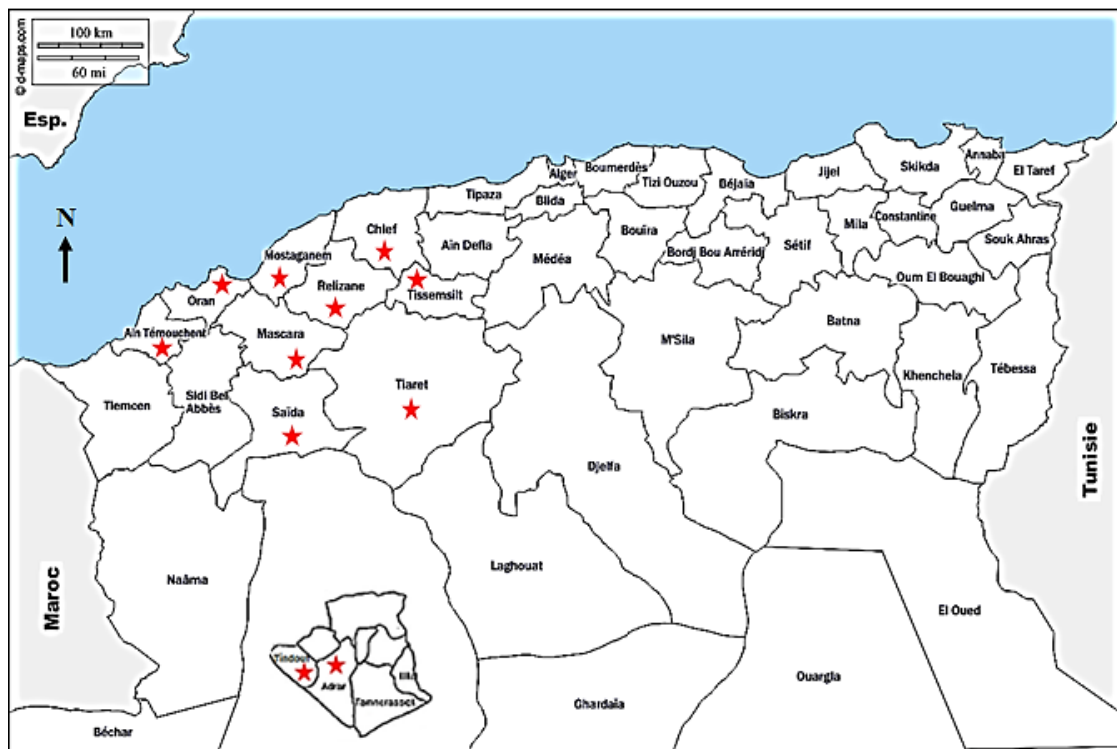


Figure 26 : Répartition des cas suspects de LV selon la wilaya de provenance ⁽⁴⁾

★ Wilaya de provenance des cas suspects de LV

3. Méthodologie

3.1. Types d'étude

Le travail de recherche est structuré selon deux types d'étude :

- Etude descriptive à recueil rétrospectif
- Etude transversale avec niche à suivi prospectif

L'étude rétrospective a porté sur les cas de LV notifiés dans les dossiers du service des maladies infectieuses de cet établissement, pendant la période de janvier 2007 à septembre 2010. L'étude transversale, menée d'octobre 2010 à décembre 2017, a concerné 69 enfants admis dans ce même service pour suspicion d'atteinte par cette pathologie.

⁽⁴⁾ https://d-maps.com/m/africa/algeria/algerienord_fr/algerienord_fr13.gif (consultée et modifiée le 21/07/2018)

3.2. Plan de travail

3.2.1. Prélèvements et préparation des échantillons étudiés

3.2.1.1. Ponction de moelle osseuse

Un prélèvement de moelle osseuse a été pratiqué pour tous les cas suspects (n=69) inclus dans la deuxième étude. Après un jeûne de cinq heures et une fois pesé, l'enfant est emmené au service de réanimation pour la réalisation de la ponction de la moelle osseuse, pratiquée sous anesthésie générale avec l'emploi d'un anesthésiant périphérique, Ketamile à 50 mg/ml. Ce geste est réalisé par un médecin assisté par un réanimateur et une infirmière. Un trocart de ponction est enfoncé dans la crête iliaque et une seringue de 20 ml est ajustée. L'aspiration doit être lente et s'arrêter juste au moment où le suc médullaire est aperçu afin d'éviter l'hémodilution, le liquide aspiré est toujours un mélange de moelle et de sang.

Une pression doit être exercée sur le point de ponction avec des compresses stériles jusqu'à élimination d'un risque hémorragique pour apposer ensuite un pansement.

Pour les enfants hospitalisés avant l'année 2013, la ponction était précédée d'une anesthésie locale à base de Lidocaïne et de Prilocaine sous forme de patch (EMLA patch 5%), posé une heure avant la ponction.

3.2.1.2. Confection de frottis de moelle osseuse

Des frottis ont été confectionnés à partir des soixante-neuf prélèvements de moelle osseuse. Chaque prélèvement est étalé en un frottis mince sur des lames comme un frottis sanguin (Figure 27).

Les lames sont identifiées (Nom et prénom du patient), séchées à l'air et conservées à température ambiante.

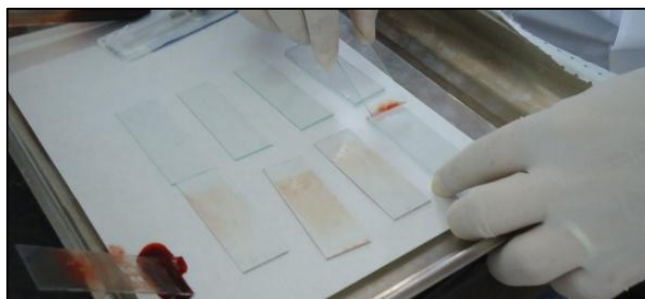


Figure 27: Confection des frottis de moelle osseuse (Photo originale)

3.2.1.3. Préparation de la poudre de moelle osseuse

Quarante-sept lames de moelle osseuse colorées au MGG (selon la méthode décrite ci-après) ont été grattées à l'aide d'une lame de bistouri stérile à raison d'un bistouri par lame (Figure 28) :

- douze lames récupérées à partir des dossiers des patients retenus dans la première étude
- vingt-cinq lames préparées lors de la deuxième étude
- dix lames contrôles : de huit cas de leucémie, un cas de paludisme et un cas de pathologie non diagnostiquée.

La poudre de moelle de chaque patient est placée dans un tube eppendorf stérile préalablement codé et conservée à température ambiante (Figure 29).

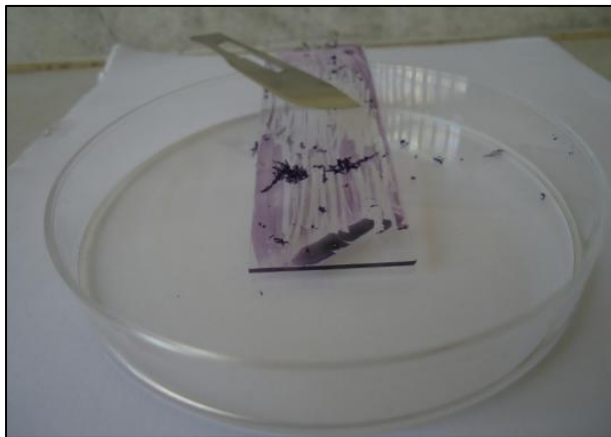


Figure 28 : Grattage d'un frottis coloré de moelle osseuse (Photo originale)



Figure 29 : Conservation de la poudre de moelle osseuse (Photo originale)

3.2.1.4. Prélèvement sanguin

Un prélèvement sanguin sur tube sec a été réalisé pour l'ensemble des malades inclus dans la deuxième étude. Le sang est débarrassé de sa fibrine et centrifugé à 3000 tours/mn pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est aliquoté dans deux tubes eppendorf et conservé au réfrigérateur entre 2 et 8 °C pendant 72 heures ou à -20°C si le test prévu n'est pas effectué dans ce délai.

3.2.2. Diagnostic

Le diagnostic de la LV chez les cas suspects a été posé à partir d'un examen direct et de tests sérologiques, réalisés respectivement au laboratoire de Parasitologie (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Oran 1) et dans le service de bactériologie de l'EHU d'Oran.

3.2.2.1. Examen parasitologique direct

Cet examen permet, en cas de positivité, de poser le diagnostic avec certitude. Il consiste en la recherche de corps de Leishman sur les frottis de moelle osseuse après coloration au MGG.

- Principe :

La coloration repose sur l'action complémentaire de deux colorants et sur l'affinité des éléments cellulaires pour des colorants acides ou basiques.

Le MAY-GRÜNWALD fixe le frottis par le méthanol et colore les éléments acidophiles et les granulations spécifiques des leucocytes, le GIEMSA sur-colore les noyaux.

- Procédure :

- recouvrir le frottis sec par du MAY-GRÜNWALD pur et laisser agir pendant une minute
- ajouter autant d'eau tamponnée pH7 et laisser agir pendant une à trois mn
- rejeter le MAY-GRÜNWALD-solution tampon et recouvrir de GIEMSA au 1/10^{ème} et laisser agir pendant 20 à 30 mn
- éliminer le colorant par un jet d'eau
- égoutter et laisser sécher
- observer au microscope optique au grossissement à immersion.

3.2.2.2. Examens sérologiques

Ces examens indirects permettent de détecter des anticorps anti-*Leishmania* dans le sérum des malades. Selon la littérature, ils doivent être réservés aux cas suspects quand une autre méthode diagnostique (examen direct, culture) ne peut être réalisée ou que les résultats du myélogramme soient négatifs.

3.2.2.2.1. Test de diagnostic rapide par immunochromatographie

Les sérums des patients pour lesquels l'examen microscopique direct s'est révélé négatif ont été analysés par le TDR.

- Principe :

C'est un test, basé sur la réaction antigène-anticorps sur bandelette. Le sérum à tester est déposé sur la partie absorbante de cette bandelette, une membrane de nitrocellulose sensibilisée par une protéine antigénique (rk39 dans le cas de la leishmaniose) dans la zone de la ligne de test.

Si les anticorps spécifiques sont présents dans le sérum, la liaison Ag-Ac se traduira par l'apparition sur la bandelette d'un trait rouge dans la zone de la ligne de test (Figure30).

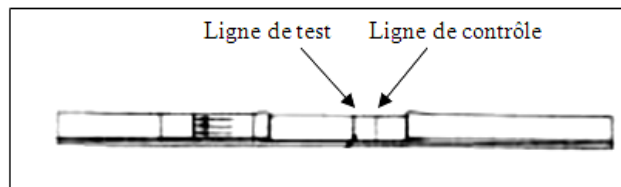
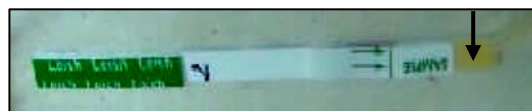


Figure 30: Bandelette d'immunochromatographie

• Procédure:

- laisser à température ambiante les sérums des malades et le coffret de test rapide leishmaniose viscérale contenant les pochettes de bandelettes et le flacon de la solution tampon
- retirer les bandelettes de test de leurs pochettes
- numéroter les sérums, les bandelettes et des tubes à hémolyse
- mettre 150 µl (2 à 3 gouttes) de la solution tampon dans le tube à hémolyse
- ajouter, à l'aide d'une micropipette, 20 µl de sérum à la bandelette de test dans la zone sous la flèche (Figure 31)
- placer la bandelette dans le tube à hémolyse
- lire le résultat dans les 10 minutes qui suivent.

Figure 31: Bandelette portant le numéro du sérum ajouté
(Photo originale)

3.2.2.2.2. Immunofluorescence indirecte

Cette technique a été utilisée pour confirmer la positivité des résultats par TDR afin d'éliminer les cas douteux dus à une éventuelle réaction croisée, mais n'a pu concerner que quelques sérums.

• Principe :

L'IFI est une technique basée sur la réaction Ag-Ac révélée par l'adjonction d'un conjugué (anti-immunoglobuline humaine marquée à l'isothionate de fluorescéine) sous la lumière UV.

Le principe du protocole employé est le suivant (Figure 32):

- des antigènes correspondant aux formes promastigotes sont fixés sur une lame à spots
- les Ig humaines anti-*L. infantum* se fixent aux Ag
- les éléments non fixés sont éliminés par lavage
- des Ig de chèvre anti-Ig humaines marquées à la fluorescéine révèlent cette fixation;
- la lecture de la réaction se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence.

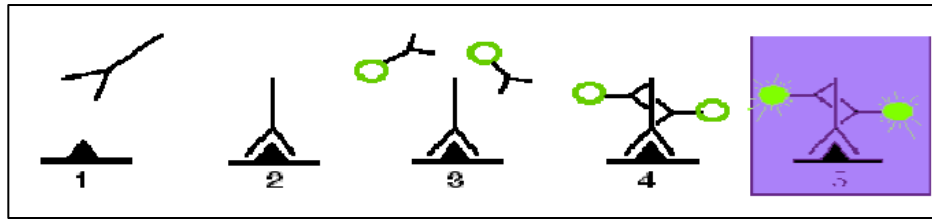


Figure32 : Principe général de l'immunofluorescence indirecte (Vallee, 2004)

• Procédure :

- décongeler les lames à spots sensibilisées par l'Ag figuré
- sécher à 37°C dans une étuve
- fixer les lames dans un bac d'acétone à -20°C pendant 10 mn
- sécher les lames à 37°C
- réaliser une dilution à 1/2 pour les sérums témoins et les sérums à tester (100µl de sérum dans 1900µl de PBS)
- réaliser une série de dilution à 1/2 pour les sérums à tester uniquement. Le titre seuil de positivité fixé à l'IPA est de 1/80
- déposer 10 µl de chaque dilution dans un spot
- incuber à 37°C dans une chambre humide pendant 30 mn
- rincer au PBS puis laisser au contact pendant 10 mn
- sécher à 37°C
- diluer 10 µl de conjugué dans 300 µl de PBS
- déposer 10 µl de conjugué dilué dans chaque spot;
- incuber à 37°C dans une chambre humide pendant 30 mn
- rincer au PBS puis laisser au contact pendant 10 mn
- sécher à 37°C dans l'étuve
- déposer une goutte de bleu d'EVANS
- incuber à 37°C dans une chambre humide pendant 15 à 20 mn
- rincer au PBS puis laisser au contact pendant 10 mn
- sécher à 37°C
- ajouter une goutte de glycérine et recouvrir d'une lamelle
- lire au microscope à fluorescence au Gx40

Les lames sensibilisées, le colorant, le PBS et le conjugué ont été fournis gracieusement par Z. Harrat, Chef de l'Unité Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations et directeur général de l'IPA, Alger.

3.2.2.2.3. Western blot

Les sérums négatifs en IFI et ceux non analysés par cette technique ont été soumis à une recherche d'anticorps anti-*Leishmania* par western blot selon le principe suivant :

- les Ac anti-*Leishmania* présents dans le sérum se fixent sur l'Ag leishmanien
- l'anti-IgG humaine couplé à la phosphatase alcaline, se fixe sur l'IgG humaine
- le complexe réagit avec le substrat et donne un produit coloré qui est mis en évidence sur les bandelettes sous la forme de bandes transversales violettes (Figure 33)

Les bandelettes sont fournies dans une pochette (R1) ; elles sont numérotées et prédécoupées mais attachées par leur extrémité supérieure à la souche. Elles ont été sensibilisées par électro-transfert d'antigènes de *L. infantum* séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Tous les réactifs du coffret doivent être conservés entre 2 et 8°C. Une fois dilué, le tampon de lavage, conservé entre 2 et 8°C, est stable pendant 2 mois.

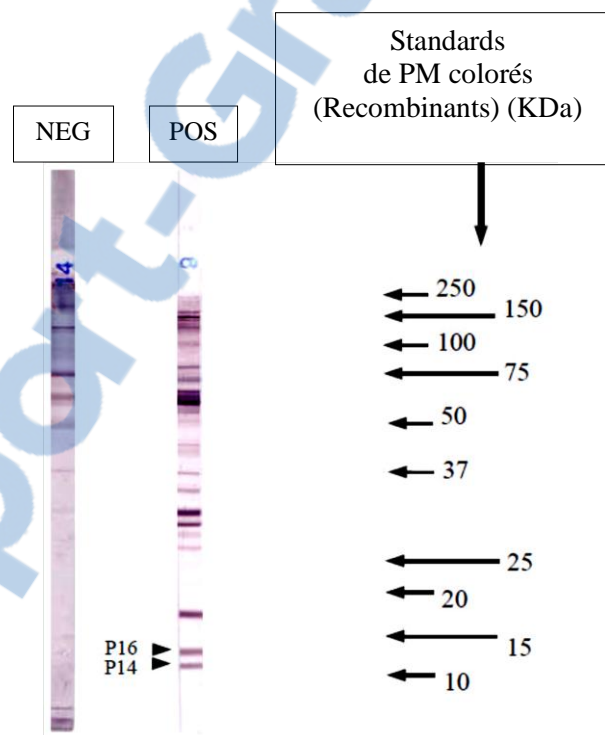


Figure33 : *Leishmania* WB IgG (Échantillon négatif et positif)

LDBIO DIAGNOSTICS NF EN ISO 13485 (2001)

POS : Résultat positif
NEG : Résultat négatif

Interprétation :

La présence sur la bandelette de la bande antigénique 14kDa et/ou 16kDa permet d'interpréter le test comme positif et de conclure à la présence d'anticorps IgG anti-*Leishmania* dans l'échantillon testé

- Procédure:

- distribuer 1,2ml de diluant échantillons (**R2**) dans une cuve d'incubation. Agiter doucement la cuve
- placer une bandelette numérotée **R1**, face vers le haut, dans la cuve. Attendre 1mn puis agiter doucement la cuve pour immerger la bandelette
- distribuer 25µl de sérum et agiter doucement la cuve
- incuber la bandelette pendant 90 mn sur un agitateur tridimensionnel
- laver 3 fois avec le tampon de lavage dilué au 1/10 (**R3**)
- distribuer 1,2ml de conjugué anti-IgG humaine (**R4**), agiter doucement la cuve
- incuber 60 mn sur l'agitateur tridimensionnel
- laver 3 fois avec le tampon de lavage dilué au 1/10
- distribuer 1,2 ml de substrat (**R6**) et agiter doucement la cuve
- incuber 20 à 60 mn sur l'agitateur tridimensionnel
- arrêter la réaction par 2 lavages à l'eau distillée
- transférer la bandelette sur un papier filtre. Laisser sécher à l'air pendant 15 mn
- comparer le profil de l'immunoblot de l'échantillon avec la reproduction scanner d'immunoblots provenant de sérums positif et négatif
- procéder de la même manière pour le contrôle positif (**R5**)

Les différents réactifs sont présentés en annexe 8.

3.2.3. Evaluation des performances du TDR

3.2.3.1. Immunochromatographie

Des échantillons sériques de différents sujets ont été testés par TDR:

- échantillons de patients à myélogramme positif
- échantillons de patients présentant d'autres pathologies [tuberculose (1), paludisme (1), toxoplasmose (10), brucellose (2), hépatite B (4), leishmaniose cutanée (1), sida (4) et polyarthrites rhumatoïdes (4)] (n=27)
- échantillons témoins négatifs (sujets indemnes de leishmaniose viscérale, vivant en dehors des zones endémiques) (n=10). La confirmation de la négativité de ces échantillons a été contrôlée par western blot.

3.2.3.2. ELISA

Les sérums de tous les cas de leishmaniose viscérale confirmés par les tests précédents, des sérums contrôles [cas de toxoplasmose à IgG (5), paludisme (1) et hépatite B (3)] et des

sérums témoins négatifs (n=5), ont été testés par ELISA, une technique largement utilisée en sérologie.

•Principe :

Technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée au conjuguée (Figure 34).

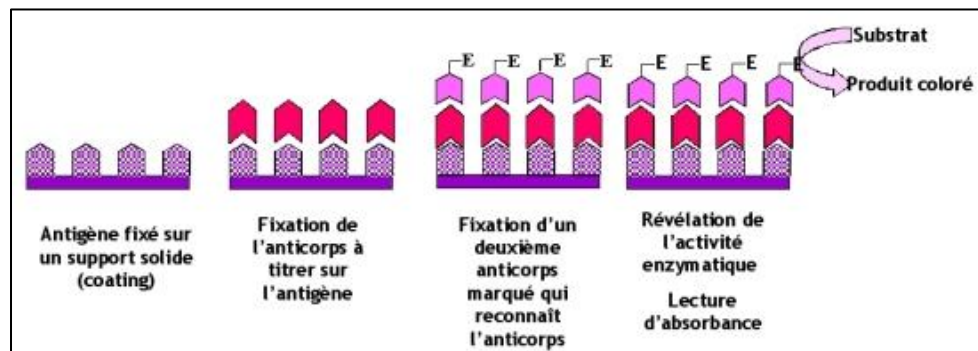


Figure 34 : Principe du test ELISA ⁽⁵⁾

• Procédure :

- préparer un plan de distribution (plan de plaque) des échantillons. Le nombre de cupules de la microplaque nécessaires correspond au nombre d'échantillons à tester plus le nombre de contrôles (négatif, cut-off 2x, positif) (Tableau I)
- amener tous les réactifs, échantillons, contrôles et barrettes sensibilisées à température ambiante (20 à 25°C)
- diluer 10 µl de chaque échantillon préalablement homogénéisé dans 1000 µl de tampon diluant en changeant l'embout de la micropipette après chaque dilution
- bien mélanger à l'aide d'un agitateur vortex
- déposer 100 µl de chacun des contrôles dans les cupules A1 à D1 suivis ensuite par le dépôt de chaque échantillon dilué dans les cupules suivantes
- recouvrir la microplaque par un feuillet adhésif fournis dans le kit et l'incuber pendant 60 mn (± 5 mn) à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- diluer 30 ml de la solution de lavage dans 570 ml d'eau distillée stérile (1+19)
- programmer le laveur [introduire le nombre de cycles (3x) et le nombre de cupules (63 cupules)]
- décontaminer le laveur par son amorçage par de l'eau distillée suivie par la dilution de la solution de lavage

⁽⁵⁾ http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2010_Lille_Goffard_Virologie/co/elisa_ac_jpg.html (consulté le 11/07/2018)

- introduire la microplaque dans le laveur et lancer le programme décrit ci-dessus
- retirer la microplaque du laveur, la retourner en tapotant les barrettes sur du papier essuie-tout avant de passer à l'étape suivante
- distribuer 100 µl de conjugué Protéine A dans chaque cupule. Sceller ensuite la microplaque d'un nouveau feuillet adhésif et l'incuber pendant 30 min à température ambiante
- introduire la microplaque dans le laveur et lancer le programme décrit précédemment
- distribuer 100 µl de substrat dans chaque cupule à l'abri de la lumière
- incuber la microplaque à température ambiante (+20 à +25°C) pendant exactement 15 mn à l'abri de la lumière
- arrêter la réaction par l'ajout de 100 µl de la solution d'arrêt (Stop), eau distillée dans notre protocole
- effectuer la mesure de l'absorbance au lecteur ELISA BIO-TEK (ELx50) à la longueur d'onde de 450 nm et la longueur d'onde différentielle de 650 nm dans les 30 minutes

Les différents réactifs sont présentés en annexe 8.

Tableau I : Plan de distribution des échantillons

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	5	13	Te	29	37	45	14				
B	Cut-off	6	Te	Te	30	Te	46	Te				
C	Cut-off	7	15	23	31	39	47	Te				
D	CP	8	16	24	32	40	48	21				
E	1	Te	17	25	33	41	Te	4				
F	2	10	18	26	34	42	Te	35				
G	3	11	19	27	Te	43	51	Te				
H	Te	12	20	Te	36	44	Te					

CN : Contrôle négatif ; CP : Contrôle positif ; Cut-off : Seuil de positivité ; Te : Sérums témoins (Sérums de cas avec toxoplasmose, paludisme et hépatites B) et sérums témoins négatifs.

3.2.4. Etude moléculaire et phylogénétique

Cette étude a été menée à l'IHU Méditerranée, la Timone (Marseille) en vue de montrer l'intérêt de la PCR à partir du sérum, prélèvement non invasif, dans le diagnostic de la LV et d'identifier la ou les espèces responsables de la maladie chez les patients atteints, à partir de la poudre de moelle osseuse.

3.2.4.1. Extraction de l'ADN total

L'ADN est obtenu par l'utilisation d'un kit Qiagen EZ1 (QIAamp DNA Tissue Kit, Qiagen, Germany). Ce kit offre une procédure entièrement automatisée pour la purification des acides nucléiques provenant de différents types d'échantillons (sérum, plasma, liquide céphalorachidien, urine, sang total, fèces, échantillons respiratoires et écouvillons secs). Il utilise la technologie des particules magnétiques pour l'isolation et la purification des acides nucléiques à partir de ces échantillons à l'aide de l'automate EZ1BioRobot de QIAGEN.

L'extraction de l'ADN comporte 4 étapes: lyse, fixation, lavage et élution.

3.2.4.1.1. Extraction de l'ADN total à partir des sérums

L'extraction a concerné des sérums positifs confirmés et 10 sérums contrôles (9 de patients avec d'autres pathologies : toxoplasmose à IgG (5), hépatite B (3), paludisme (1) et un de contrôle négatif).

L'extraction s'est déroulée comme suit :

- homogénéiser les cartouches de réactifs avant de les introduire dans les rails du support (Figure 35)
- déposer 200 µl de chaque échantillon de sérum dans un tube à fond plat fournis dans le kit d'extraction. Chaque tube est identifié et placé dans la 4^{ème} rangée de l'automate EZ1 après son ouverture
- placer les tips et tips-holder dans la 2^{ème} rangée et les tubes coniques identifiés (à élution) et ouverts dans la 1^{ère} rangée de l'automate (Figure 36).

3.2.4.1.2. Extraction de l'ADN total à partir de la poudre de moelle osseuse

L'extraction a concerné la totalité des échantillons de moelle osseuse grattée (n=47).

Un prétraitement par 20µl de protéinase K, 200µl de tampon Buffer et une incubation à sec à 56°C pendant 2 heures était indispensable. Le mélange est centrifugé à 8000 tr/min pendant 5 secondes et 200 µl du surnageant sont déposés dans les tubes à fond plat.

L'extraction dure 17 minutes. Le tampon ainsi que la protéinase K vont permettre la destruction de la structure de l'ADN afin d'éliminer les protéines et de libérer les acides nucléiques. Quand cette étape est terminée, les acides nucléiques sont capturés par les particules magnétiques qui sont lavées à plusieurs reprises. L'éluat se détache des billes, capturées par un système d'aimantation.

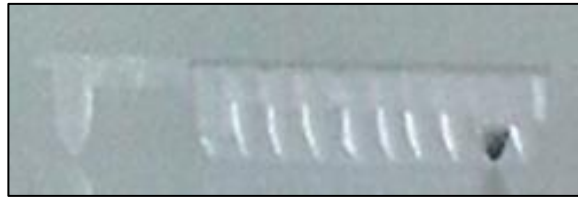


Figure 35 : Cartouches des réactifs

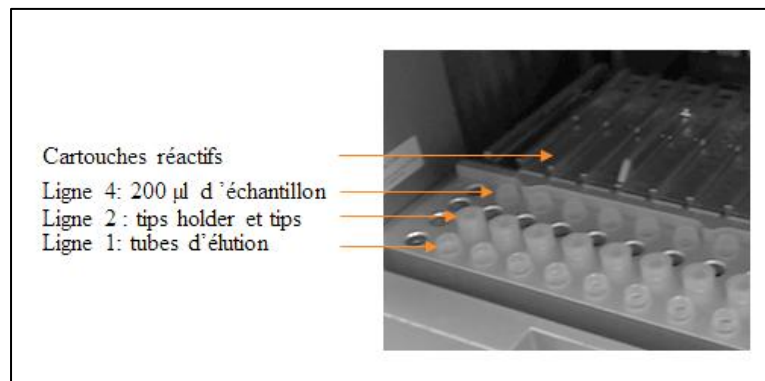


Figure 36 : Emplacement des cartouches et des tubes dans l'automate EZ1

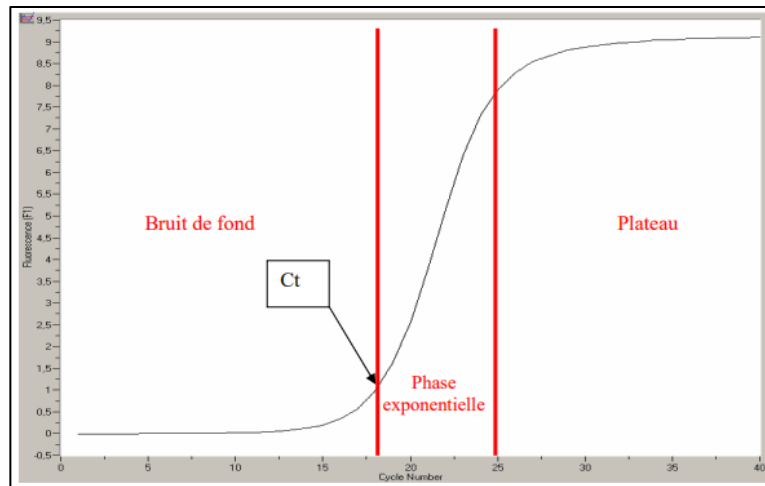
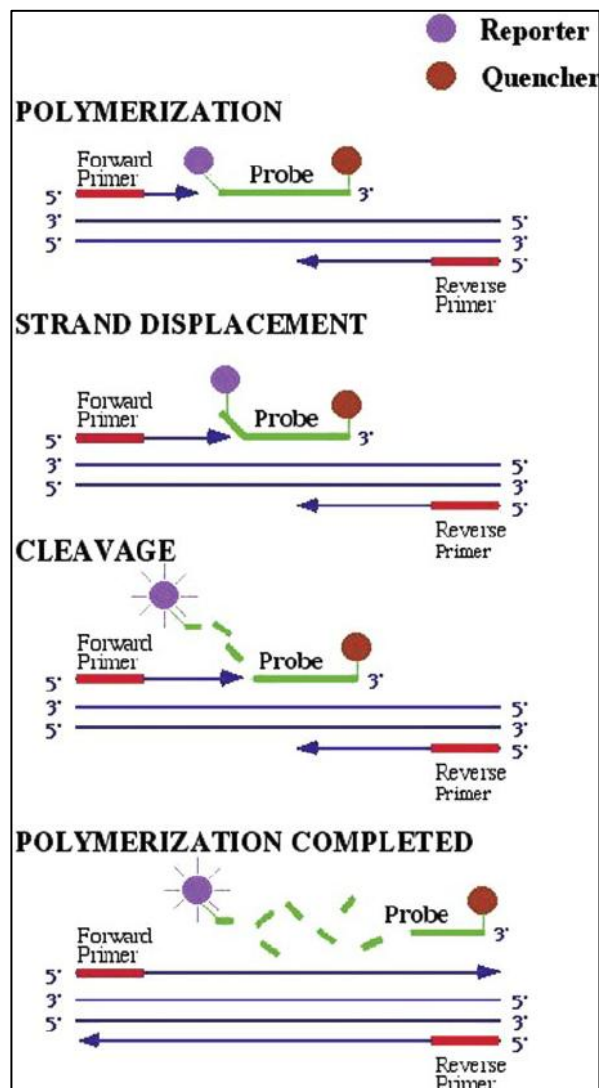
3.2.4.2. PCR en temps réel

Cette technique a concerné les ADN extraits à partir des échantillons de sérum et de moelle osseuse.

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de PCR à l'aide de la fluorescence.

Le suivi de cette fluorescence permet l'observation de son augmentation et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (Figure 37):

- phase de bruit de fond: la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil
- phase exponentielle: la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. La Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le reporter du quencher (Figure 38). La fluorescence associée au fluorochrome reporter est proportionnelle à la quantité de produit généré (China *et al.*, 2002)
- phase de plateau (ou de saturation): certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle

Figure 37 : Modèle graphique de la PCR en temps réel⁽⁶⁾Figure 38 : Principe de la PCR en temps réel (Schaad *et al.*, 2003)

⁽⁶⁾https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative/files/principes-de-la-PCRq.pdf (consulté le 12/07/2018)

• Procédure :

Etape 1. Reconstitution et dilution des amorces et de la sonde qui ciblent l'ADN ribosomique 18s (Annexe 9)

- centrifuger les tubes à 7000t/mn pendant 41s pour récupérer toute la poudre
- ajouter autant d'H₂O DNase/RNase Free (µl) que la quantité en nmol indiquée sur le flacon des amorces. Pour la sonde, il faut ajouter 60 µl d'eau distillée DNase/RNase Free
- laisser reposer 10 mn
- vortexer et centrifuger les flacons
- diluer les amorces au 1/50^{ème} pour obtenir une solution fille à 20 µM et la sonde au 1/20^{ème} pour obtenir une solution de 5 µM
- conserver à -20°C

Etape 2. Préparation du Mix

Cette étape doit se réaliser sous les conditions aseptiques (DNA Free) dans une unité isolée et sous une hotte à UV pour éviter toute contamination du Mix.

Les produits du Mix et leurs volumes sont représentés dans le tableau II et les séquences des amorces et de la sonde utilisées sont indiquées dans le tableau III.

Etape 3. Préparation des échantillons

- tracer un plan de plaque (Tableau IV)
- répartir le Mix dans les cupules de la plaque à raison de 15 µl par cupule sous une hotte Biocap
- répartir 5 µl d'ADN dans chaque puits à l'exception de ceux des deux témoins négatifs placés dans les deux dernières cupules

Etape 4. Programmation du thermocycleur CFX96 BIO RAD :

- dénaturation initiale : 95°C pendant 5 mn
 - dénaturation : 95°C pendant 30s
 - annealing et élongation : 60°C pendant 60 s
- } x 40

La dénaturation initiale permet de déshybrider les ADN double brin, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases et de dénaturer d'éventuelles autres enzymes présentes dans la solution. La dénaturation, généralement de 0 à 1 minute à 95 °C, permet de déshybrider les ADN, de décrocher les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

Annealing et élongation permettent aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable et aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice.

Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

Tableau II : Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR en temps réel

Réactifs	1 échantillon	100 échantillons
Mix (Takyon)	10µl	1000µl
H ₂ O	3,5µl	350µl
S (Sonde)	0,5µl	50µl
F (Amorce forward)	0,5µl	50µl
R (Amorce reverse)	0,5µl	50µl
15 µl MIX + 5 µl ADN		

Tableau III : Amorces et sonde utilisées

Amorce	Séquences
Leish F	ACA-AGT-GCT-TTC-CCA-TCG
Leish R	CCT-AGA-GGC-CGT-GAG-TTG
Sonde	Séquence
Leish P	CGG-TTC-GGT-GTG-TGG-CGC-C

Tableau IV : Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24	2	11	38	34	TNEG						
B	14	8	42	31	7	TNEG						
C	5	12	30	43	16							
D	19	28	21	29	18							
E	13	17	33	36	32							
F	9	10	TNEG	44	37							
G	15	26	25	27	39							
H	23	4	20	40	22							

Codes des échantillons

Témoin négatif

3.2.4.3. PCR standard

Cette technique a été utilisée pour tous les échantillons d'ADN parasite détecté par la PCR en temps réel réalisée à partir de la moelle osseuse.

- Principe

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier et au point de le rendre visible à l'œil nu sur gel (d'agarose dans cette étude).

- Procédure:

Dans cette étude, la PCR cible les segments 500, 400 et 800 pb de la région ITS1, ITS2 et du gène Cytb respectivement (Annexe 9).

Etape 1. Reconstitution et dilution des amorces :

- centrifuger les tubes à 7000t/mn pendant 41s pour récupérer toute la poudre
- repérer sur le tube la quantité en nmol
- ajouter la même quantité en µl d'eau distillée Dnase/Rnase Free (sans aspirer ni refouler et sans toucher les parois du tube) (Annexe 10)
- laisser 10 mn à température ambiante puis vortexer
- diluer les amorces au 1/100^{ème}.

Etape 2. Préparation du Mix (Ampli Taq Gold master)

Les produits du Mix et leurs volumes sont présentés dans le tableau V et les amorces et leurs séquences dans le tableau VI. Chaque échantillon est mélangé dans un tube Eppendorf.

Etape 3. Préparation des échantillons

- tracer un plan de plaque
- répartir le Mix dans les microtubes des barrettes à raison de 45 µl par microtube sous une hotte Biocap
- répartir 5 µl d'ADN dans chaque microtube sous une autre hotte Biocap (Tableau V)
- mettre les témoins négatifs (eau distillée DNase/RNaseFree) et positifs (échantillon fortement positif par la PCR en temps réel) dans les dernières cupules
- disposer les barrettes sur une plaque et centrifuger à 1300 t/mn pendant 1 mn

Etape 4. Programmation du thermocycleur

Après centrifugation, les microtubes sont placés dans le thermocycleur, ce dernier est programmé selon les propriétés du gène et de la Taq utilisée.

La réaction de polymérisation en chaîne est cyclique, elle se déroule en trois étapes qui sont :

- La dénaturation qui consiste à chauffer le microtube à 95°C pendant 15mn, ceci permet de dénaturer l'ADN à amplifier (séparer les deux brins), d'homogénéiser la solution et d'activer l'enzyme ADN polymérase.
 - L'hybridation des ADN, la température est baissée à 55°C (ITS1), à 60°C (ITS2), à 52°C (Cytb), ceci permet aux amorces de s'hybrider à l'ADN complémentaire. Les amorces étant plus courtes et en plus grande concentration que l'ADN chromosomique, peuvent s'hybrider plus rapidement.
 - L'élongation : cette dernière étape est la polymérisation qui se déroule à 72°C, l'ADN polymérase synthétise un brin complémentaire pour chaque fragment d'ADN matrice à partir des nucléotides libres se trouvant dans le tube (de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'). L'ADN polymérase a besoin d'une amorce lui fournissant l'extrémité 3'OH pour démarrer la synthèse. Ce sera la partie de la molécule d'ADN située entre les amorces qui sera donc amplifiée. Puis, une nouvelle amplification se répète en formant un cycle de dénaturation-amplification 40 fois (Tableau VII).
- Après 3 heures (durée de la PCR standard), les produits de PCR sont récupérés et conservés à +4°C.

Tableau V : Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR standard

Réactifs	1 échantillon	100 échantillons
ATG Master Mix	25µl	2500µl
H ₂ O	17µl	1700µl
Amorce F (20 µM)	1,5µl	150µl
Amorce R (20 µM)	1,5µl	150µl
45 µl MIX + 5 µl ADN		

Tableau VI : Séquences des amorces utilisées

Amorce	Séquences	Taille
ITS1 R	CAC GGG GAT GAC ACA ATA GAG	500 pb
ITS1 F	CAA TAC AGG TGA TCG GAC AGG	
ITS2 R	GGC CAA CGC GAA GTT GAA TTC	400 pb
ITS2 F	GCA TGC CAT ATT CTC AGT GTC	
LCYT S	GGT GTA GGT TTT AGT YTA GG	800 pb
LCYT R	CTA CAA TAA ACA AAT CAT AAT ATR CAA TT	

Tableau VII : Programmation du thermocycleur

Région ciblée	ITS1	ITS2	Cytb		
Etape	Température (°C)			Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95	95	95	15 mn	
Dénaturation	95	95	95	45 s	x40
Hybridation	55	60	52	30 s	
Elongation	72	72	72	1 mn	
Elongation finale	72	72	72	5 mn	
Conservation	04	04	04	∞	

Etape 5. Lecture des résultats de PCR (migration sur un gel d'agarose)

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique. Elle décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

▪ Préparation du gel d'agarose à 1.5%

- mettre 3 g d'agarose dans un flacon en verre résistant à la chaleur
- ajouter 200 ml de tampon TBE 0.5x
- faire fondre la préparation aux micro-ondes jusqu'à ce que le liquide devient limpide
- mélanger délicatement et boucher le flacon

La solution d'agarose peut être conservée à température ambiante. La dissoudre aux micro-ondes lors de la prochaine utilisation.

▪ Coulage du gel dans la cuve à électrophorèse

- ajouter la quantité du Syber Safe correspondant à la quantité du gel (tableau VIII)
- mélanger délicatement et couler lentement le gel dans le support après avoir positionné le (s) peigne (s)
- laisser polymériser le gel 10 à 15 mn à température ambiante.

Tableau VIII : Composition du gel en Syber Safe

Taille du gel	Agarose	Syber Safe
Petit gel	30 ml	0,5 µl
Moyen gel	50 ml	1 µl
Grand gel	100 ml	2 µl

▪ Electrophorèse et révélation

- ôter le peigne et immerger le gel et son support dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 0,5x
- mélanger 6 µl de produit de PCR avec 2 µl de bleu de charge (Blue juiceloading buffer) et mettre 6µl du mélange dans un micro-puits du gel. Procéder ainsi pour chaque échantillon. Le bleu de charge assure le maintien du dépôt en immersion dans le puits et permet la visualisation de la migration
- déposer le marqueur de taille (2,5 µl sans ajout de bleu de charge) ainsi que les T+ et T –
- fermer la cuve et brancher les cordons d'alimentation de manière à ce que les dépôts soient du côté de la cathode (-)
- procéder à la migration à 135 volts pendant 20 mn
- débrancher le générateur de la cuve
- faire la lecture du gel sous Gel Doc XR+ (BIO-RAD)

En fonction des fragments d'ADN étudiés, la bande et la taille des échantillons sont respectivement repérées par rapport au témoin positif et au marqueur de poids moléculaire.

3.2.4.4. Identification génomique du parasite

Une caractérisation génomique a été effectuée pour tous les ADN détectés par la PCR standard.

Etape 1. Purification des produits de PCR

- ajouter 50µl d'eau distillée DNase/RNase Free au produit de PCR revenu positif à la PCR-standard
- déposer la totalité du mélange sur une plaque de purification Machery Nagel
- mettre la plaque en aspiration pendant 10 mn
- ajouter 50 µl d'eau distillée DNase/RNase Free
- mettre la plaque en agitation pendant 10 mn à vitesse 600
- récupérer les 50µl de produit de PCR purifié dans un micro-tube préalablement identifié

Etape 2.Séquençage moléculaire

• Principe

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné (Delarue et Furelaud, 2004).

Les techniques de PCR utilisent des enzymes particulières, les ADN polymérases qui sont capables de synthétiser un brin complémentaire d'ADN, à partir d'un brin matrice.

Ces réactions se font par ajout de dNTP. Les ddNTP, des nucléotides légèrement différents (par l'absence d'un groupement OH), sont utilisés pour le séquençage.

En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite, la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

L'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer. Dans le milieu de réaction se trouvent des dNTP en grand nombre, et une faible proportion d'un ddNTP (à Adénine, ou Guanine, ou Thymine, ou Cytosine) (Figure 39). A un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase. Cette synthèse s'arrêtera donc à cet endroit.

La grande majorité des séquences réalisées et publiées sont effectuées sur des séquenceurs automatiques. Pour cela, les fragments d'ADN sont repérés grâce à des marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par chromatographie.

Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise (Delarue et Furelaud, 2004). Le résultat est représenté sous forme de courbes (Figure 40).

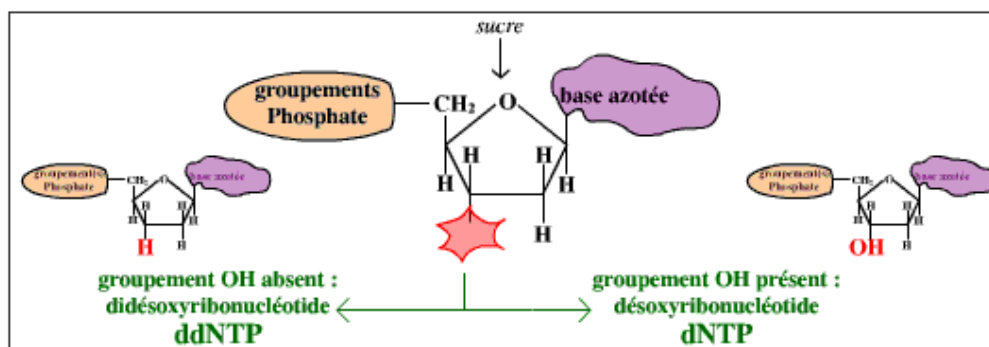
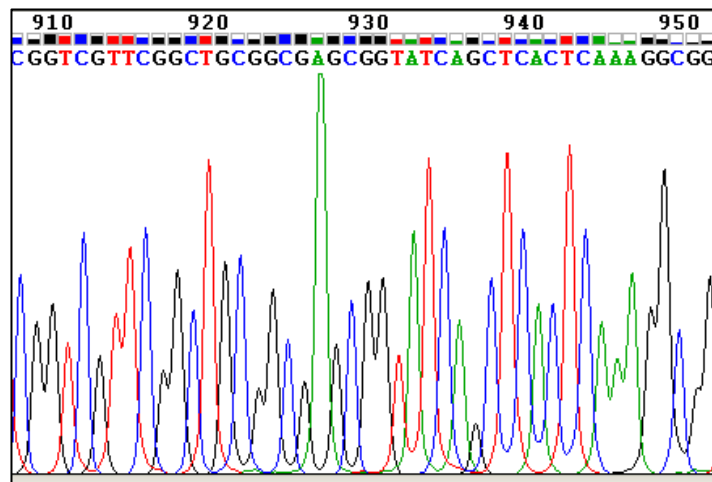


Figure 39 : Deux types de nucléotides triphosphates (Delarue et Furelaud, 2004)

Figure 40 : Séquençage d'ADN ⁽⁷⁾

En vert : Adénine, en rouge : Thymine, en noire : Guanine et en bleu : Cytosine.

• Procédure :

Le séquençage s'effectue en plusieurs étapes :

Etape 1. Préparation d'un Mix de séquence (BigDye)

La manipulation du mix pour la réaction du BigDye se fait de la même manière qu'une réaction de PCR standard. Le mix est distribué dans des tubes Eppendorf numérotés à raison de 2 cupules pour chaque échantillon, une pour l'amorce sens (Forward) et une pour l'amorce anti-sens (Reverse) comme indiqué dans le tableau IX.

Remarque : Concernant le cytochrome b, vu sa longueur, deux autres amorces ont été introduites, il s'agit de :

LCB F2: GTT-ACC-ATG-TAC-AAT-GAT-GTC

LCBR4: GAA-CTC-ATA-AAA-TAA-TGT-AAA-CAA-AA

Tableau IX : Liste des réactifs du BigDye avec leurs volumes

Mix Forward		Mix Reverse	
Réactifs	Volume (µl)	Réactifs	Volume (µl)
BigDye	1	BigDye	1
Tampon BigDye	1,5	Tampon BigDye	1,5
H ₂ O	3	H ₂ O	3
Amorce F	0,5	Amorce R	0,5
Volume total	6 µl	Volume total	6 µl
+ 4µl d'ADN purifié		+ 4µl d'ADN purifié	

Etape 2. Programmation du Thermocycleur pour la réaction de BigDye

Le BigDye se fait sur le même thermocycleur utilisé pour la PCR Standard. La température d'hybridation est constante quelle que soit l'amorce (Tableau X).

⁽⁷⁾<http://www.biofidal-lab.com/site/images/normal/DNA-Sequencing-Services5aa2a1580ec89.png> (consulté le 12/07/2018)

Tableau X : Programme du thermocycleur pour la réaction de BigDye

Etapes	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	96	1 mn	X 25
Dénaturation	96	10 s	
Hybridation	50	5 s	
Elongation	60	3mn	
Conservation	04	∞	

Etape 3. Purification des produits de PCR au Séphadex et séquençage :

- mettre la résine en poudre sur la plaque à puits, remplir ces puits et éliminer le surplus
- poser dessus une plaque Millipore MAHV5 et la caler en butée
- retourner la plaque pour faire tomber la résine dans les puits
- ajouter 300µl d'eau distillée DNase/RNase Free dans chaque puits et couvrir la plaque
- laisser gonfler la résine 2h30 mn à 3h (la plaque se conserve 24h à température ambiante) ; pour une durée plus importante, elle se conserve à +4°C ; la sortir du réfrigérateur au moins 15mn avant l'utilisation
- centrifuger à 1300t/mn pendant 5 mn la plaque de Séphadex avec son couvercle après l'avoir posée sur une plaque MicroAmp N801-560 «poubelle»
- ajouter 10 µl d'eau distillée stérile DNase/RNaseFree aux produits de séquence
- poser la plaque Séphadex sur une plaque MicroAmp N801-560 qui aura été préalablement identifiée ; bien faire coïncider les A1
- déposer 20 µl de produits de séquence, bien au centre des mini colonnes, sans toucher les parois
- centrifuger la plaque couverte à 1300tr/mn pendant 5 mn
- veiller à remplir toutes les cupules vides par l'eau distillée DNase/RNase Free
- couvrir la plaque MicroAmp N801-560 d'une Septa (Caoutchouc perforé)

La plaque MicroAmp peut être ainsi placée dans le séquenceur. Les résultats du séquençage sont récupérés de l'ordinateur connecté au séquenceur sous forme de « Run » à l'aide d'une clé USB.

Les séquences obtenues sont analysées, corrigées et assemblées à l'aide du logiciel Codon CodeAligner.

L'identification des spécimens a été réalisée en faisant un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dans la base de données moléculaires (Genbank , NCBI) sur le site suivant:https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

Des séquences d'ADN de chaque parasite sont récupérées sous format FASTA puis alignées avec d'autres séquences référencées dans le GenBank. Les pourcentages de similarité sont déterminés en utilisant le logiciel MEGA 7. Les arbres phylogéniques sont construits avec le logiciel MEGA en utilisant le programme statistique ML (Maximum Likelihood) avec 500 réplifications des bootstraps (Tamura *et al.*, 2011).

3.2.5. Etude entomologique

Ce travail a été complété par un inventaire taxonomique d'une population de phlébotomes, avec l'analyse moléculaire de spécimens femelles, de la région qui nous a semblé la plus touchée par la leishmaniose viscérale.

3.2.5.1. Région d'origine des phlébotomes

Les phlébotomes étudiés proviennent d'une ferme située dans la commune de Yellel, wilaya de Relizane. Cette commune est située au Nord-Ouest de l'Algérie à 270 km de la capitale, Alger et 91 km d'Oran (Figure 41).

Elle s'étend sur une superficie 116,47 km² et sa population est d'environ 38 101 habitants. Elle est comprise entre les longitudes 35° 43' 19" Nord et 0° 21' 13" Est et entre les latitudes 35° 43' 19" Nord. Son altitude est de 135 m minimale et de 135 m maximale. Elle est caractérisée par un Climat semi-aride sec et chaud⁽⁸⁾.

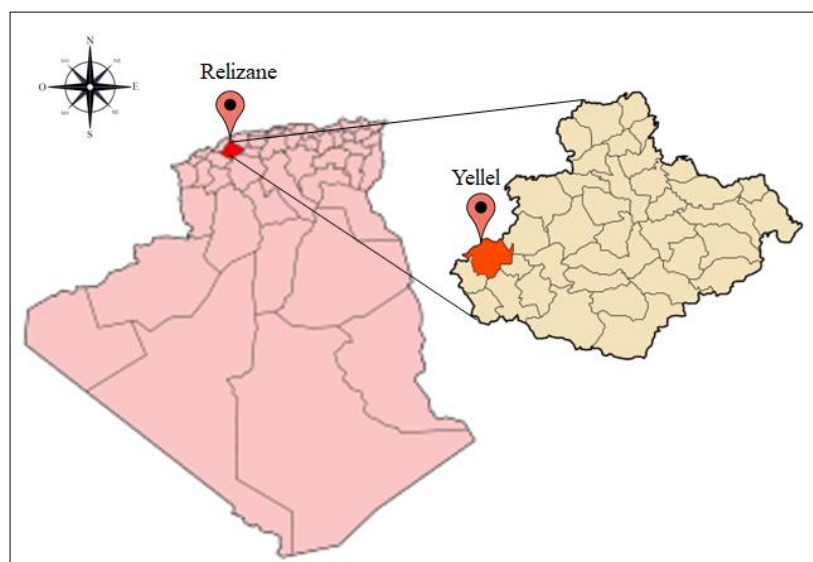


Figure 41 : Localisation de la région d'origine des phlébotomes (Commune de Yellel, Wilaya de Relizane) ⁽⁹⁾

⁽⁸⁾<http://fr.db-city.com/--Yellel> (consulté le 27/07/2018)

⁽⁹⁾https://fr.wikipedia.org/wiki/Communes_de_la_wilaya_de_Relizane#/media/File:Algeria-Relizane.png (consulté et modifié le 22/07/2018)

3.2.5.2. Technique de piégeage des phlébotomes

Les phlébotomes ont été capturés, de façon irrégulière pendant les étés 2014, 2015 et 2016, au moyen de pièges adhésifs. Connue depuis les importants travaux des épidémiologistes Russes Vlasov (1932) et Petrischeva (1935), cette technique est la mieux adaptée à l'inventaire qualitatif et quantitatif des phlébotomes (Abonnenc, 1972). Du fait qu'elle soit non sélective, elle a été largement utilisée dans ce genre d'étude dans divers pays de la région méditerranéenne (Rioux *et al.*, 1964; Lane *et al.*, 1988).

Des feuilles de papier blanc 20 x 20 cm sont enduites d'huile de ricin à l'aide d'un pinceau et stockées par petits paquets dans des bacs en plastique jusqu'au jour de l'emploi. L'huile de ricin est choisie parce qu'elle est soluble dans l'alcool, facilitant la récupération des phlébotomes, de plus elle ne possède aucun pouvoir répulsif sur ces derniers. Les pièges sont placés avant la tombée de la nuit dans divers endroits abrités (végétations et fissures de murs en pierres ou en argile). Lorsque les pièges sont placés à proximité des agglomérations, il convient d'avertir la population afin de récupérer le maximum de pièges.

Les pièges sont ramassés le lendemain matin dans des boîtes en plastique et le dépouillement doit être effectué le plus rapidement possible pour éviter la détérioration des phlébotomes (développement fongique). Ceux-ci sont récupérés à l'aide de pinceaux imbibés d'alcool et conservés dans l'alcool à 70° (Figure 42).

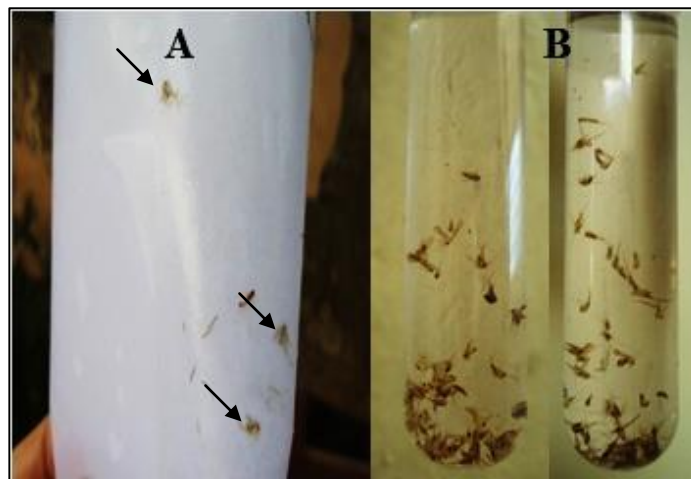


Figure 42 : Capture et conservation des phlébotomes (Photo originale)

- A. Phlébotomes pris dans le piège adhésif
- B. Phlébotomes conservés dans l'alcool à 70°

3.2.5.3. Traitement et diagnose des phlébotomes

Les phlébotomes sont retirés de l'alcool puis mis à éclaircir pendant 2 heures dans un verre à montre contenant la solution de potasse à 20%. Ils sont ensuite lavés deux fois à l'eau distillée

pendant une heure, en changeant chaque bain toutes les 30 minutes. Après le rinçage, les insectes sont placés pendant une heure dans la solution de Marc André (Annexe 11).

Chaque spécimen est monté individuellement entre lame et lamelle, dans une goutte de cette solution, la tête en position dorso-ventrale. L'identification a été faite sur la base de critères morphologiques selon la clé d'identification des phlébotomes d'Algérie établie par Dedet *et al.* (1984) (Annexe 12). Les structures examinées sont celles du cibarium, et du génitalia. En cas de difficulté de diagnose, le nombre de soies médianes du coxite peut être pris en considération.

L'abondance relative de chaque espèce identifiée est calculée selon la formule suivante :

$$C = \frac{n_i}{N} \times 100$$

n_i : nombre d'individus de l'espèce i

N : nombre total des relevés effectués

3.2.5.4. Détection du parasite par PCR en temps réel

Une étude moléculaire par PCR en temps réel a été envisagée pour la détection de l'ADN de leishmanies chez des phlébotomes femelles non traités. Les spécimens (séparés de leurs génitalia, utilisés pour l'identification après leur éclaircissement) ont été mis séparément dans un tube à fond plat (fournis dans le kit d'extraction) contenant 180 µl de tampon buffer et 20 µl de la protéinase K. Ils sont incubés à sec à 56°C pendant toute une nuit. Le mélange est ensuite centrifugé à 8000 tr/mn pendant 5 secondes.

L'extraction de l'ADN et son amplification ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment pour l'étude de la moelle osseuse.

3.2.6. Recueil des données et méthodologie statistique

Les données de chaque malade sont recueillies à partir de son dossier et reportées sur une fiche de renseignements (Annexe 13) puis sur fichier Excel en respectant son anonymat et la confidentialité de ses informations.

Les paramètres ont été analysés par le logiciel Epi Info version 6.04d f. Pour certains paramètres, les données ont été exportées du fichier Excel vers SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 13.0 et XLSTAT. Les moyennes, les variances et les écarts types ont été calculés pour les variables quantitatives alors que les pourcentages ont été surtout déterminés pour les variables qualitatives. La comparaison entre les moyennes a été réalisée par le test t de Student et les histogrammes représentés ont été saisis par Excel (Microsoft).

Une analyse statistique a concerné aussi l'étude entomologique.

3.2.7. Tests d'évaluation des performances des techniques utilisées

Sensibilité (Se): Aptitude du test à donner un résultat positif chez un individu malade.

$$Se = VP / (VP + FN)$$

Spécificité (Sp) : Aptitude du test à donner un résultat négatif chez un individu sain.

$$Sp = VN / (VN + FP)$$

Valeur prédictive positive (VPP): La probabilité que la personne soit malade lorsqu'elle a fourni un résultat positif au test.

$$VPP = VP / (VP + FP)$$

La valeur prédictive positive d'un test est d'autant plus élevée que le test est spécifique (diminution du nombre de résultats faux positifs) et que la prévalence de la maladie dans la population étudiée est élevée.

Valeur prédictive négative (VPN): La probabilité que la personne soit indemne sachant qu'elle a fourni un résultat négatif au test.

$$VPN = VN / (VN + FN)$$

Indice de Yuden (J) : Est une mesure de la précision de la méthode de diagnostic. L'addition des deux qualités d'un test, sa sensibilité et sa spécificité, conduit à un indice synthétique tel que : $J = (Se + Sp) - 1$

L'indice de Youden varie entre -1 et 1.

Coefficient Q de Yule : Mesure l'intensité de la liaison entre les deux variables (maladie/test) (tableaux XI et XII).

$$Q = (a \times d - b \times c) / (a \times d + b \times c)$$

Tableau XI: Identification des malades selon le résultat du test utilisé

Test	Maladie présente		Maladie absente	
Positif	a	VP	b	FN
Négatif	c	FP	d	VN

VP (Vrai (s) positif (s)): Personne (s) malade(s) à test positif

VN: (Vrai (s) négatif (s)): Personne (s) saine (s) à test négatif

FP: (Faux positif (s)): Personne(s) saine(s) à test positif

FN: (Faux négatif (s)): Personne(s) malade(s) à test négatif

Tableau XII: Interprétation du résultat du Coefficient Q de Yule

Seuil du test	Interprétation
0	Test nul
0,01 – 0,09	Test négligeable
0,10 – 0,29	Test léger
0,30 – 0,49	Test modéré
0,50 – 0,69	Test fort
0,70 - 1	Test très fort

Kappa de Cohen (K): Est un coefficient destiné à mesurer l'accord entre deux variables qualitatives. Classiquement, il est utilisé pour évaluer le degré de concordance entre deux tests. L'interprétation des résultats est représentée dans le tableau suivant.

Tableau XIII: Interprétation des différents résultats du Kappa de Cohen

Valeurs limites	Degré d'accord
$\geq 0,81$	Excellent
0,80 – 0,61	Bon
0,60 – 0,41	Modéré
0,40 – 0,21	Médiocre
0,21 – 0,0	Mauvais
0,0	Très mauvais

CHAPITRE III

RESULTATS

1. Diagnostic de la leishmaniose viscérale

Selon les résultats de l'étude rétrospective, 37 cas de LVI ont été enregistrés de janvier 2007 à septembre 2010. Le diagnostic a été apporté par le myélogramme pour 31 patients et posé devant la persistance des signes cliniques et biologiques évocateurs de la maladie, pour les 6 autres.

Différents tests diagnostiques ont été utilisés, avec la confrontation des résultats fournis, pour détecter cette pathologie parmi les cas suspects, objet de l'étude prospective qui s'est étendue sur sept ans d'octobre 2010 à décembre 2017.

1.1. Diagnostic spécifique

1.1.1. Myélogramme

L'examen parasitologique des frottis médullaires de tous les cas suspects (n=69) a mis en évidence des formes amastigotes intracellulaires et extracellulaires de leishmanies (Figures 43 et 44) dans 28 d'entre eux, soit un taux de positivité de 40,6%.

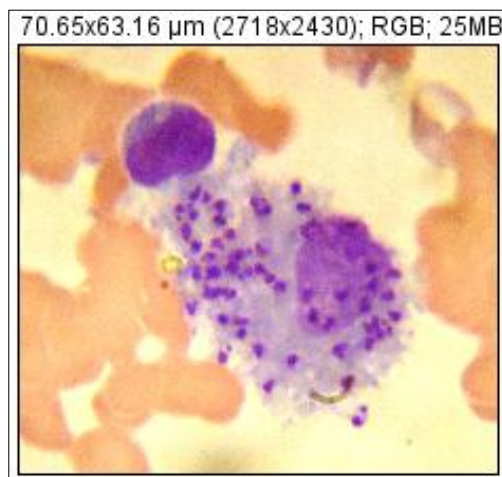


Figure 43: Formes amastigotes intracellulaires de *Leishmania* (1000x)
(Photo originale)



Figure 44: Formes amastigotes extracellulaires de *Leishmania* (1000x)
(Photo originale)

1.1.2. Test de diagnostic rapide par immunochromatographie

Des anticorps anti- *Leishmania* ont été détectés par le TDR rk 39 chez 17 patients sur les 41 dont le myélogramme était négatif.

Ce résultat s'est traduit par l'apparition des deux lignes (test et contrôle) sur la bandelette de nitrocellulose (Figure 45).



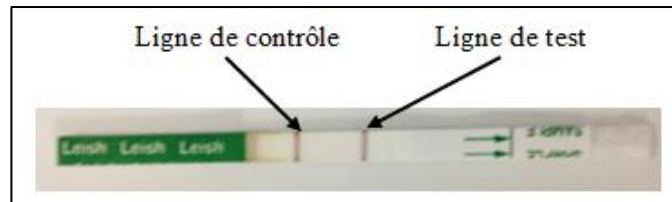


Figure 45 : Profil du résultat positif par immunochromatographie (Photo originale)

1.1.3. Confirmation diagnostic de la LV

La confirmation du diagnostic des 17 cas testés par TDR a été apportée par la positivité:

- de l'IFI dans 2 cas sur 7 à un titre de 1/320e et 1/160e respectivement (Figure 46)
- du WB dans les 15 cas restants, par la détection des protéines 14 et/ou 16 kDa sur les bandelettes de nitrocellulose (Figure 47).

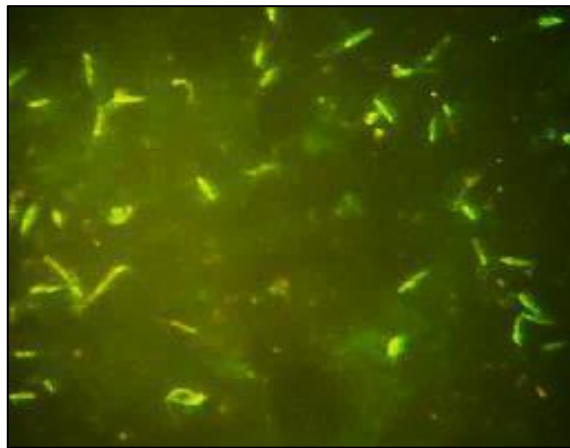


Figure 46: Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* positive par IFI (400x) (Photo originale)



Figure 47 : Profil des résultats du WB (Photo originale)

P : Résultat positif
N : Résultat négatif

Ces deux tests ont confirmé la maladie dans les 17 cas à myélogramme négatif et conforté le résultat positif du TDR.

A partir des résultats du myélogramme et de la sérologie, la LVI est retrouvée chez 45 patients sur les 69 inclus dans l'étude. Les 24 autres ont été exclus du fait de la négativité de leurs résultats et du diagnostic d'autres pathologies.

1.1.4. Evaluation des performances du TDR

1.1.4.1. Immunochromatographie

Testé sur les 28 sérums des cas à myélogramme+, le TDR a détecté les anticorps anti-*Leishmania* dans 25 d'entre eux (Tableau XIV).

La négativité des cas témoins est en faveur de l'absence de réactions croisées entre la LV et les autres infections (tuberculose, paludisme, toxoplasmose, brucellose, hépatite B, leishmaniose cutanée, sida et polyarthrites rhumatoïdes) et augmente la spécificité de ce test.

Tableau XIV: Résultats du myélogramme et du TDR

TDR	Myélogramme	Nombre de cas	Fréquence (%)
+	+	25	36,2
-	+	3	4,4
+	-	17	24,6
-	-	24	34,8
Total		69	100,0

1.1.4.2. ELISA

Sur les 45 sérums de cas de LV confirmés, 37 se sont révélés positifs au test ELISA avec la détection d'anticorps anti-*Leishmania* et un seuil de positivité de 0,676. Pour les 8 cas restants, le test a été négatif dans 4 et douteux dans les 4 autres.

L'application de ce test a montré une sérologie positive dans 12 cas négatifs au myélogramme et 2 négatifs au TDR (Tableau XV).

Un résultat négatif a été obtenu chez les sujets témoins (n=14), indiquant l'absence de réactions croisées entre la LV et les autres infections (toxoplasmose, hépatite B, paludisme) et augmentant la spécificité de ce test (Tableau XV).

La moyenne de la densité optique calculée est de $1,05 \pm 0,40$ sans différence statistiquement significative ($P=0,56$) pour les deux sexes au risque de 5% (Figure 48). L'interprétation des résultats du test ELISA est donnée en annexe 14.

Tableau XV: Résultats du TDR et du test ELISA

ELISA	TDR	Nombre de cas	Fréquence (%)
+	+	35	59,3
-	+	3	5,1
+	-	2	3,4
-	-	1*	1,7
-	-	14**	23,7
Douteux***	+	4	6,8
Total		59	100,0

* : Faux négatif (cas leishmaniens à résultat négatif par le test ELISA et le TDR)

** : Vrais négatifs

*** : Résultat très proche de la valeur seuil

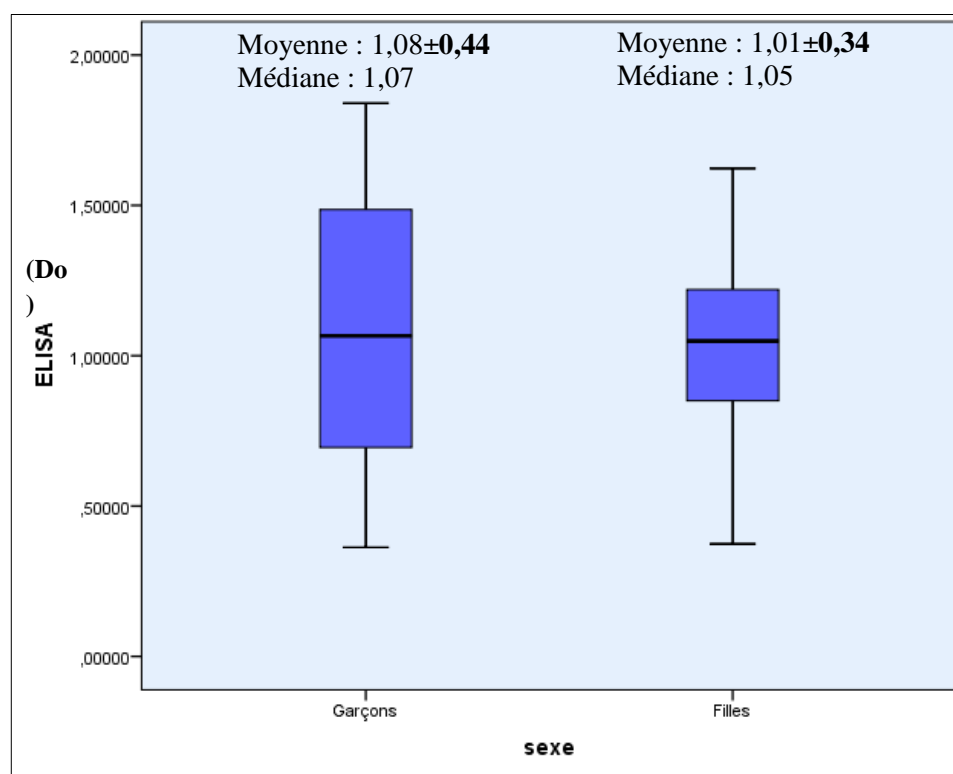


Figure 48 : Diagramme en boîtes de la densité optique selon le sexe des cas de LV
Do : Densité optique.

1.1.5. Diagnostic moléculaire

La PCR en temps réel a détecté la présence d'ADN parasite dans 36 échantillons sériques positifs sur les 39 analysés (Figure 49). Ainsi, la maladie est retrouvée chez 15 patients à myélogramme négatif (Tableau XVI) et 4 séronégatifs dont un au TDR (Tableau XVII) et 3 à l'ELISA (Tableau XVIII).

La négativité des sérums contrôles augmente la spécificité de la technique.

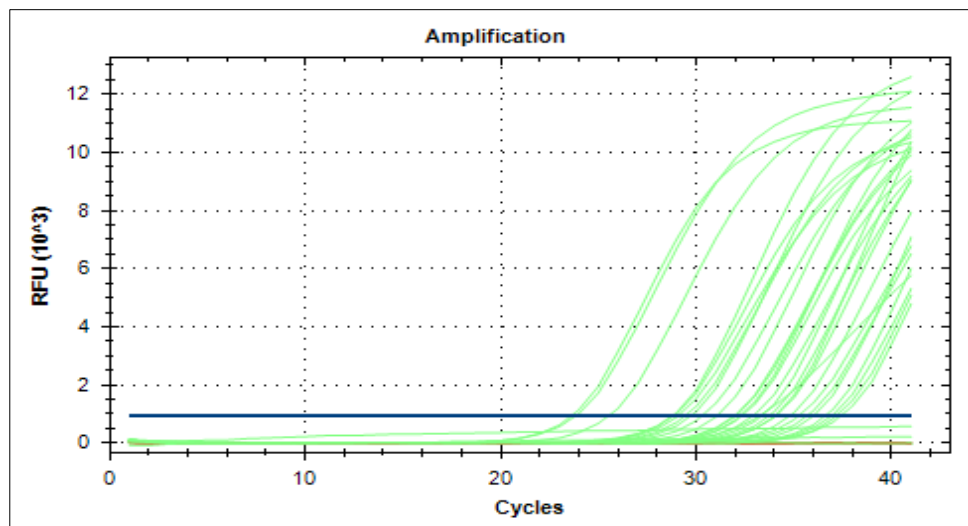


Figure 49 : Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir des sérums
RFU : Unités de Fluorescence Relative

Tableau XVI: Résultats de la PCR en temps réel et du myélogramme

PCR en temps réel	Myélogramme	Nombre de cas	Fréquence (%)
+	+	21	53,8
-	+	1	2,6
+	-	15	38,5
-	-	2	5,1
Total		39	100,0

Tableau XVII: Résultats de la PCR en temps réel et du TDR

PCR en temps réel	TDR	Nombre de cas	Fréquence (%)
+	+	35	71,4
-	+	3	6,1
+	-	1	2,0
-	-	10	20,5
Total		49	100,0

Tableau XVIII: Résultats de la PCR en temps réel et de l'ELISA

PCR en temps réel	ELISA	Nombre de cas	Fréquence (%)
+	+	30	66,7
-	+	2	4,4
+	-	3	6,7
-	-	10	22,2
Total		45	100,0

Les performances des techniques sérologiques, TDR et ELISA, et moléculaires et l'évaluation de leur concordance sont indiquées dans les tableaux suivants.

Tableau XIX : Performances des techniques utilisées

Technique	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons positifs parmi les cas confirmés	Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)	J	Q
TDR	106	42/45	93,3	100,0	100,0	95,3	0,9	1
ELISA *	55	37/41	90,2	100,0	100,0	77,8	0,9	1
PCR en temps réel	49	36/39	92,3	100,0	100,0	76,9	0,9	1

* Les échantillons à résultat douteux (n=4) ne sont pas inclus dans l'évaluation des performances du test.

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

VPP : Valeur Prédictive Positive

VPN : Valeur Prédictive Négative

J : Indice de Youden

Q : Coefficient de Yule

Tableau XX : Evaluation de la concordance entre les tests

Couple de Tests à comparer	Valeur du test Kappa	Degré d'accord
TDR / PCR en temps réel	0,779	Bon
TDR/ELISA	0,790	Bon
PCR en temps réel/ELISA	0,723	Bon

Un bon degré d'accord est obtenu avec l'appariement des deux tests :

- TDR/ELISA
- TDR/PCR en temps réel
- PCR en temps réel/ELISA

Il existe une bonne concordance entre ces tests avec des résultats équivalents lors de leurs applications.

Les résultats des différentes techniques réalisées pour chaque malade sont représentés en annexe 15.

1.2. Délai de diagnostic

Au terme de cette étude rétro-prospective, 82 cas de LVI ont été diagnostiqués. Le délai de diagnostic est connu pour 77 cas avec une moyenne de $8,5 \pm 11,9$ jours et des extrêmes de 1 à 60 jours. Ce délai était d'une semaine pour 70,1% des cas (n=54).

1. 3. Diagnostic spécifique

1.3.1. Données cliniques

Comme signes cliniques, la majorité des malades ont présenté une splénomégalie, une pâleur cutanéomuqueuse et une fièvre qui résistait au traitement antibiotique. La température prise

quotidiennement toutes les 3 heures, était intermittente, irrégulière avec un à quatre pics (39-42°C) entrecoupée de période d'apyrexie dans les cas à accès fébrile.

La triade: fièvre-pâleur-splénomégalie, signes en faveur d'une LVI, a été observée dans 62,2% des cas et l'hépatomégalie dans 54,9% (Figure 50).

Dans 56,1% (n=46) des cas, ces signes ont débuté entre mars et juin (Tableau XXI).

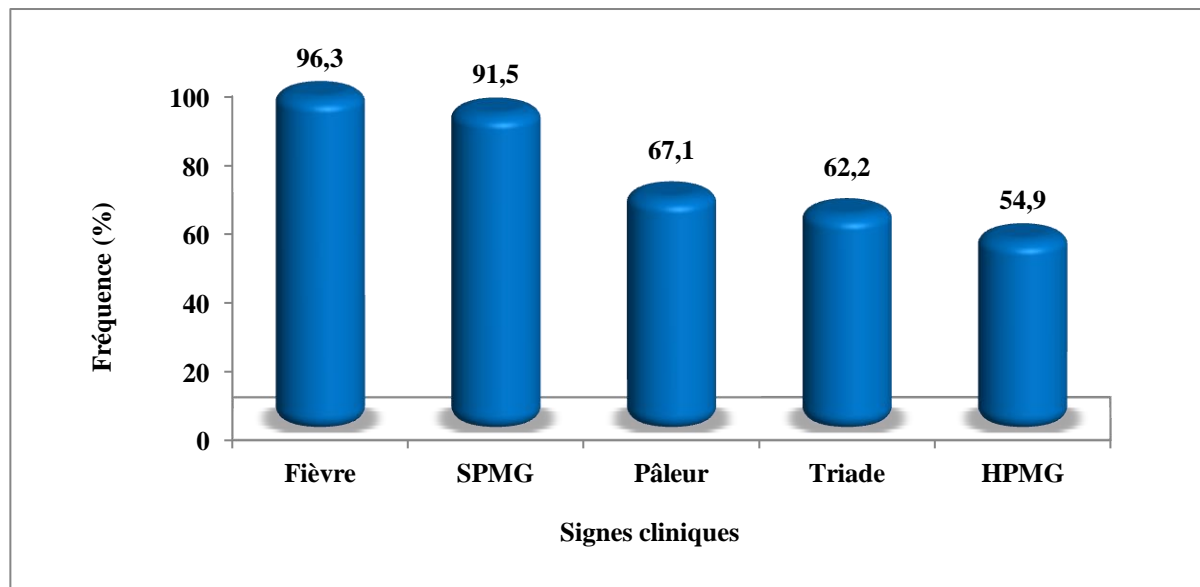


Figure 50 : Répartition des cas de LV selon les signes cliniques évocateurs de la maladie
 SPMG: Splénomégalie
 HPMG: Hépatomégalie
 Triade (Fièvre, pâleur et splénomégalie)

Tableau XXI : Répartition par sexe des cas de LV selon le mois de début de symptômes

Mois	Garçons		Filles		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Janvier	2	5	2	4,8	4	4,9
Février	5	12,5	3	7,1	8	9,8
Mars	7	17,5	11	26,2	18	22,0
Avril	5	12,5	4	9,5	9	11,0
Mai	4	10,0	8	19,1	12	14,6
Juin	5	12,5	2	4,8	7	8,5
Juillet	1	2,5	3	7,1	4	4,9
Aout	2	5,0	0	0,0	2	2,4
Septembre	5	12,5	1	2,4	6	7,3
Octobre	0	0,0	2	4,8	2	2,4
Novembre	1	2,5	2	4,8	3	3,7
Décembre	3	7,5	4	9,5	7	8,5
Total	40	48,8	42	51,2	82	100,0

Hormis les signes cliniques évocateurs de la LV, les malades ont présenté des signes moins fréquents représentés dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Répartition des cas de LV selon d'autres signes cliniques, biologiques et comorbidités associés

Signes cliniques/maladie	Effectif	%
Anorexie	23	28,0
Asthénie	23	28,0
Toux	17	20,7
Infections bactériennes	16	19,5
Vomissements	14	17,1
Cedèmes	12	14,6
Epistaxis	10	12,2
Altération de l'état général	10	12,2
Diarrhées	9	11,0
Amaigrissement	7	8,5
Lésions cutanées	6	7,3
Malnutrition	6	7,3
Candidose orale	5	6,1
SAM	4	4,9
Autres	10	12,2

1.3.2. Données biologiques

1.3.2.1. Hémogramme

L'hémogramme a révélé une anémie chez l'ensemble des enfants (100%), puis par ordre de fréquence par la thrombopénie (82,9%) et la leucopénie (59,8%).

28,0% (n=23) des cas ont présenté une bicytopénie avec une anémie associée, selon les cas, à une thrombopénie, à une leucopénie et à une neutropénie dans respectivement 78,3%, 13% et 8,7% des cas. Une pancytopénie a été retrouvée chez 62,2% (n=51) des patients (Figure 51) et une monocytopenie, due à l'anémie, chez 9,8%.

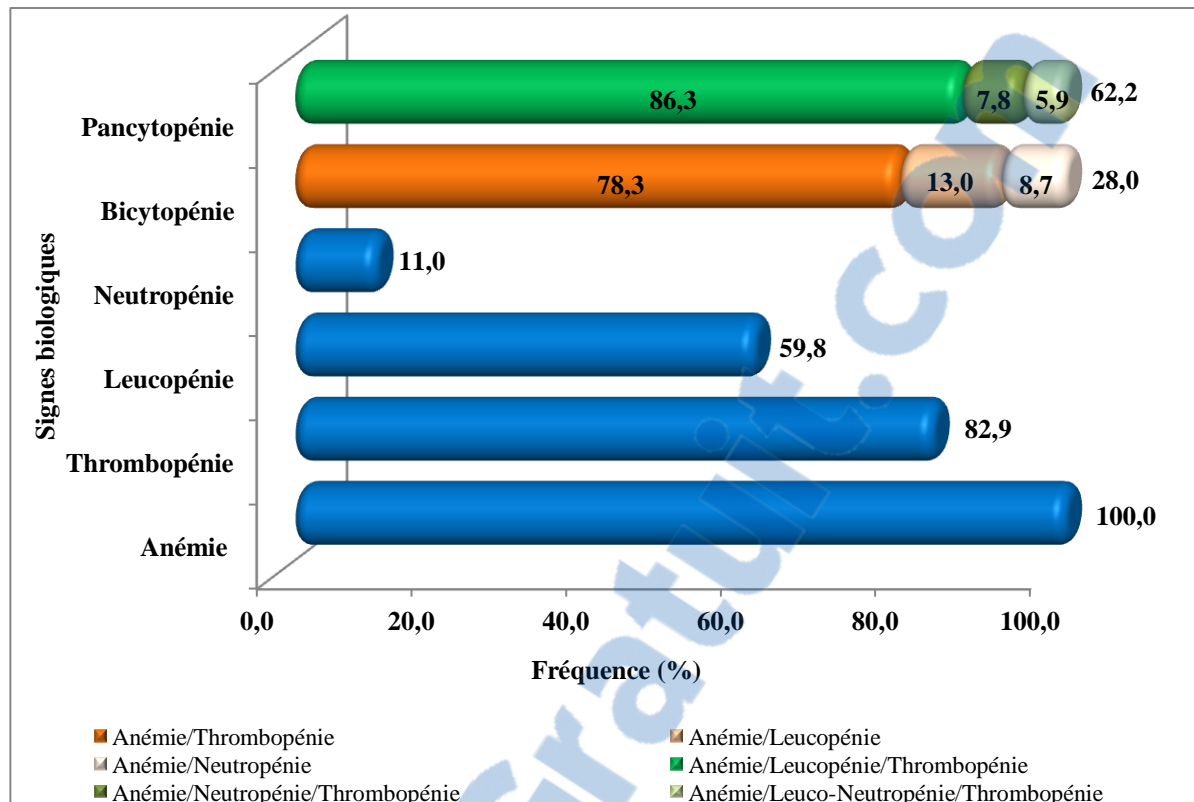


Figure 51: Anomalies de l'hémogramme des cas de LV

L'anémie, présente chez tous les patients, était essentiellement de type hypochrome microcytaire dans 74,4% des cas et normochrome normocytaire dans 25,6%, avec un taux d'hémoglobine variant de 3 à 13 g/dl ($6,4 \pm 2,1$ g/dl).

1.3.2.2. Syndrome inflammatoire

Il est représenté par une CRP positive et une VS accélérée dans respectivement 53,7% et 32,9% des cas.

1.3.3. Syndrome d'activation macrophagique

Quatre patients ont développé un SAM secondaire à la LV. Le diagnostic a été posé devant la présence de la fièvre, de la cytopénie et de la splénomégalie, associées à des paramètres biologiques (Tableau XXIII). Sur les 8 caractères cités par Henter *et al.* (2007), cinq ont été retenus pour évoquer ce syndrome (Annexe 16).

Tableau XXIII : Résultats des paramètres biologiques chez les cas LVI-SAM

Paramètres biologiques	Patient1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Leucocytes (4 000-10 000/mm ³)	1230	2640	2900	3250
Hémoglobine (12-18g/dl)	4,7	4,6	3,4	3,4
Plaquettes (150 000-400 000/mm ³)	37 000	1100	6000	9000
Ferritine (20-300µg/L)	11 645,33	NR	70 786	96 820
Triglycérides (<1,5nmol/L)	1,56	3,6	4,94	4,3
Protéine C réactive (<10mg/L)	87,39	60	>60	36
Fibrinogène (2-4g/L)	3,37	1,66	3,74	1,18

NR : non réalisé

2. Profil épidémiologique des cas de LV recensés

Parmi les cas de LV recensés, 40 étaient de sexe masculin et 42 de sexe féminin, soit un *sex ratio* équivalent à 0,95.

2.1. Répartition des cas selon le lieu de résidence

- La majorité des cas résident dans la wilaya de Relizane avec une fréquence de 36,6% (n=30) (Figure 52).

- 97,6% des cas ont contracté la maladie dans leur wilaya de résidence. Les parents des cas restants (2,4%) ont déclaré que leurs enfants avaient séjourné en dehors de la wilaya de leur résidence (Oran). Il s'agit de deux cas, l'un ayant séjourné à Relizane et l'autre à Oum El Bouaghi.

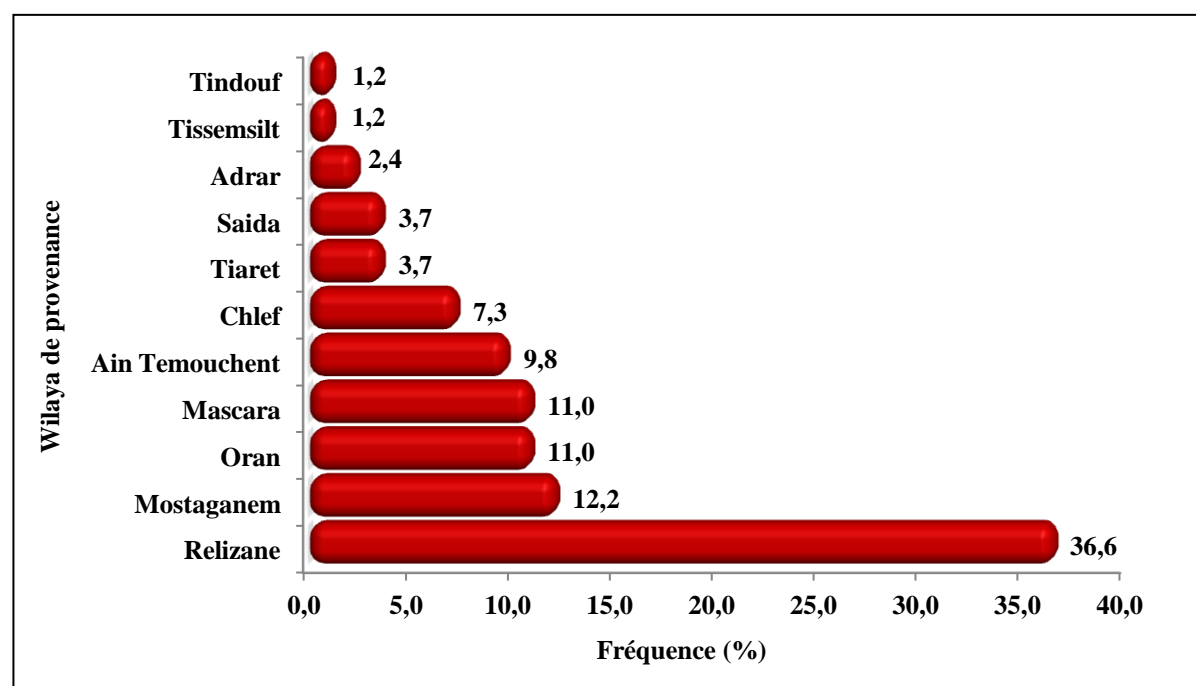


Figure 52: Répartition des cas de LV selon la wilaya de provenance

- 96,3% des cas proviennent des régions du Nord-Ouest du Tell algérien, à étages bioclimatiques sub-humides à semi arides et 3,7% d'Adrar et de Tindouf à climat saharien (Figure 53).
- 91,5% des cas sont issus d'un milieu rural ou semi-urbain.

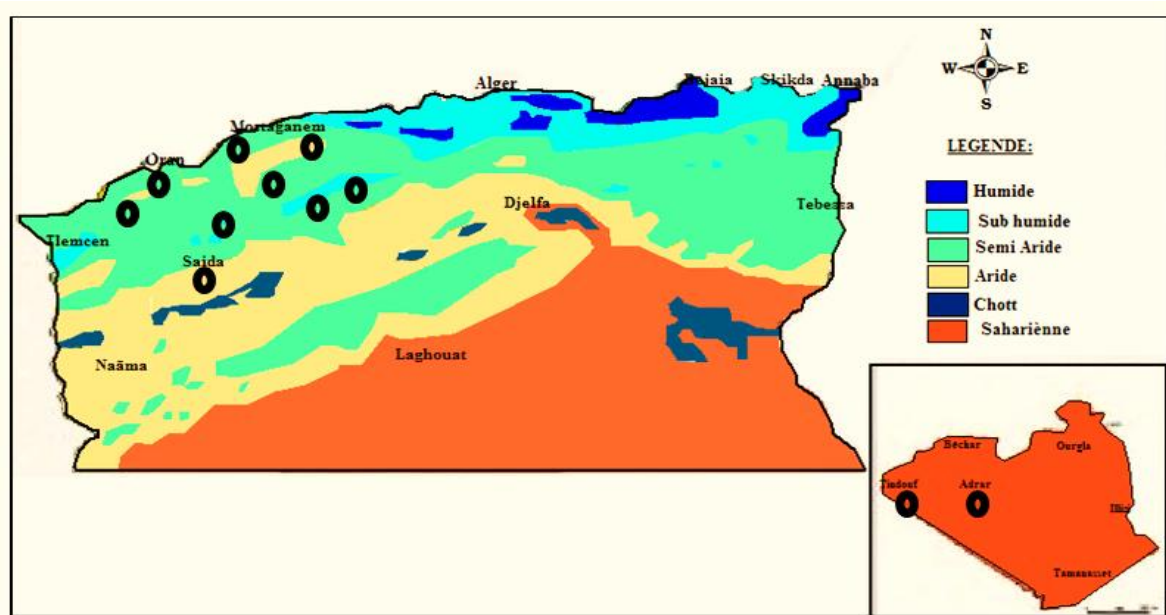


Figure 53: Répartition des cas de LV selon l'étage bioclimatique (A.N.A.T, 2004 modifiée)

● : Cas de LV

2.2. Répartition des cas selon l'âge et le sexe

95,1% des cas colligés avaient moins de 5 ans avec un âge moyen de $22,9 \pm 22,7$ mois sans différence statistiquement significative entre les deux sexes ($p=0,95$) au seuil de 0,05 et une médiane de 17,5 mois (Tableau XXIV).

La distribution de l'âge montre une classe modale comprise entre 10 et 19 mois, qui inclut plus de la moitié des cas (Figure 54). La valeur élevée de l'écart type indique que les données de la variable sont très dispersées (Figure 55).



Tableau XXIV : Répartition des cas de LV selon l'âge et le sexe

Age (mois)	Garçons		Filles		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
0-9	4	57,1	3	42,9	7	8,5
10-19	20	47,6	22	52,4	42	51,2
20-29	7	36,8	12	63,2	19	23,2
30-39	5	62,5	3	37,5	8	9,8
40-49	2	100,0	0	00,0	2	2,4
50-59	0	00,0	0	00,0	0	00,0
≥60	2	50,0	2	50,0	4	4,9
Total	40	48,8	42	51,2	82	100,0
Moy±ET	22,8±18,8		23,0±26,2		22,9±22,7	
Médiane	15,5		18,0		17,5	
Mode	12,0		18,0		10,0	
Etendue	103		167		167	

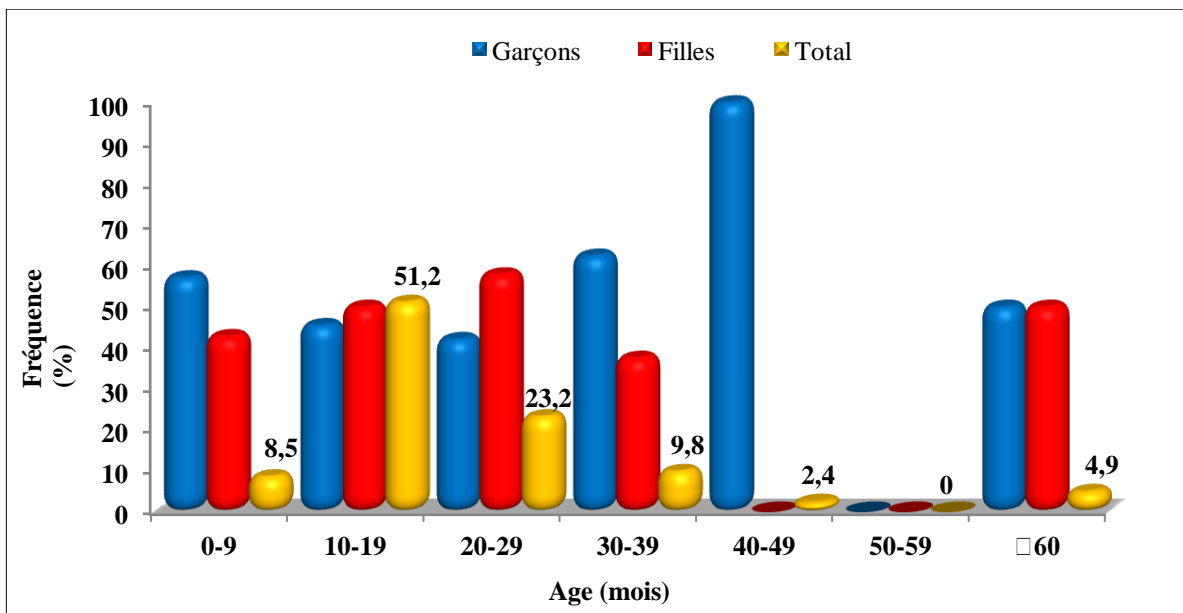


Figure 54: Distribution des cas de LV selon l'âge et le sexe

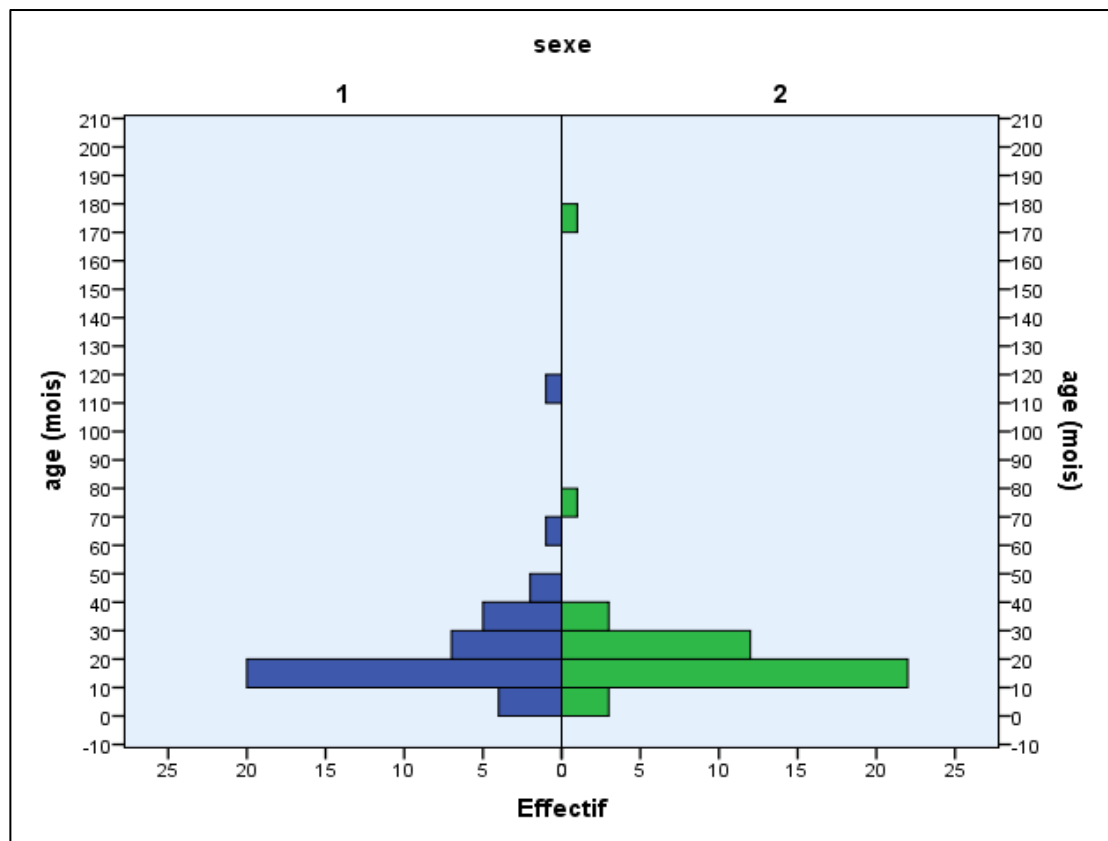


Figure 55 : Pyramide des âges des cas de LV selon le sexe.

1 : Masculin
2 : Féminin

2.3. Répartition des cas selon le groupe sanguin

Parmi 73 patients, une prédominance de l'allèle O est retrouvée chez 38 d'entre eux (52,1%) par rapport aux allèles A (23,3%) et B (19,2%).

La majorité des enfants, soit 94,5%, sont de phénotype Rh+ contre 5,5% de phénotype Rh-. Le groupe sanguin O Rh+ prédomine chez 50,7% d'entre eux (Figure 56).

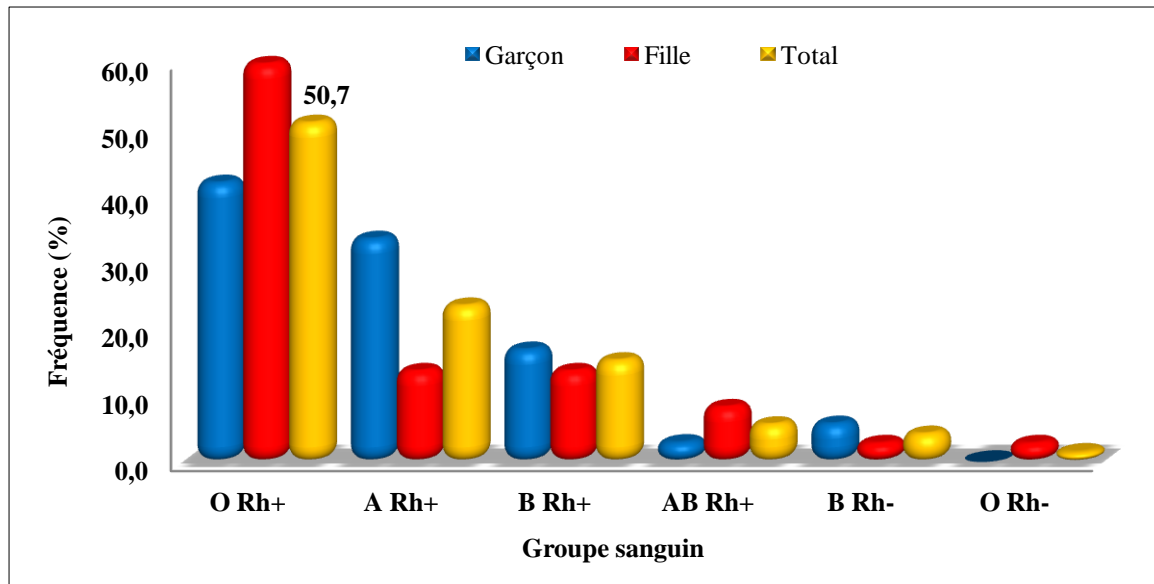


Figure 56: Répartition des cas de LV selon le groupe sanguin

2.4. Répartition des cas selon le niveau socio-économique

Plus de la moitié des cas sont issus d'un bas niveau socio-économique. 60,98% des parents (n=50) n'ont pas de profession (Figure 57).

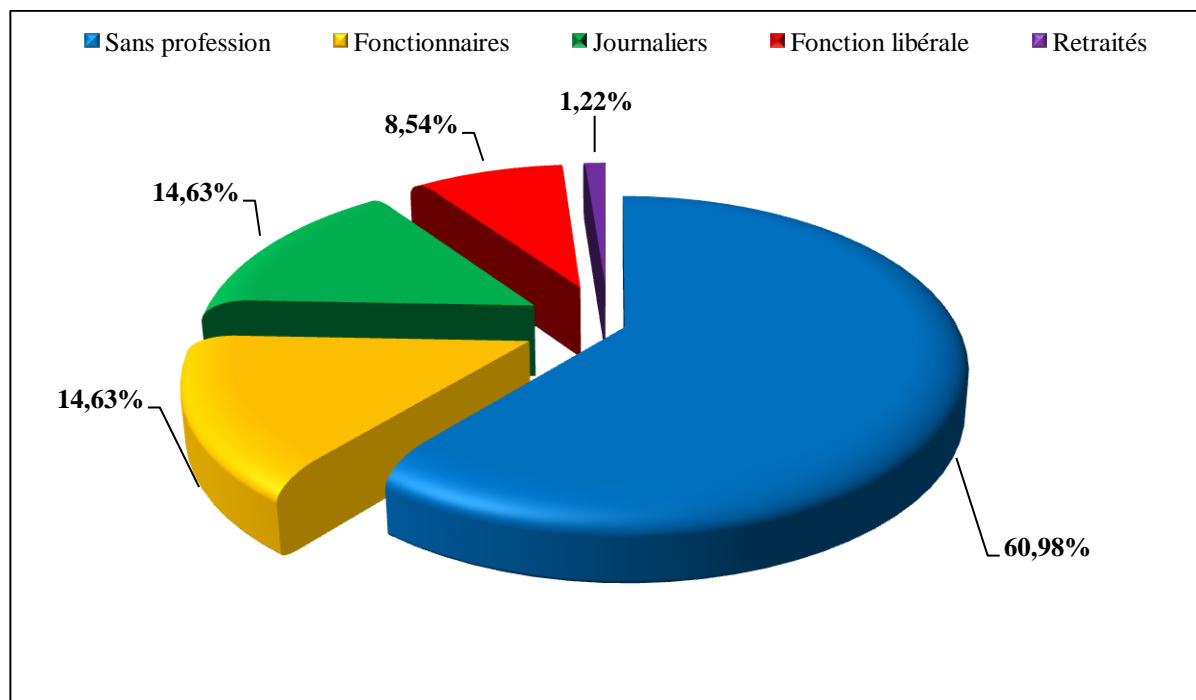


Figure 57 : Répartition des cas de LV selon les conditions socio-économiques des parents

2.5. Répartition saisonnière des cas

Les cas de notre série se répartissent sur tous les mois de l'année. Une augmentation du nombre de malades est constatée durant la saison printanière qui s'étale du 21 mars au 21 juin avec une fréquence de 47,6% (n=39) (Figure 58).

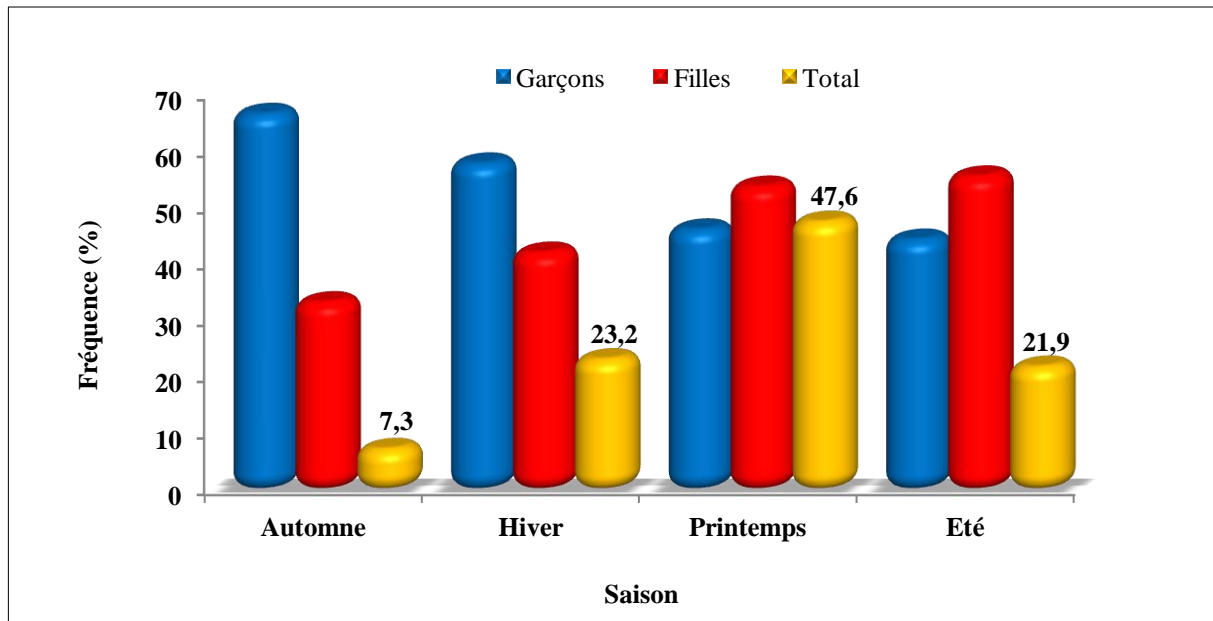


Figure 58: Répartition saisonnière des cas de LV

2.6. Répartition annuelle des cas

La répartition annuelle des cas de LV montre que la fréquence la plus élevée (13,4%) est enregistrée en 2007, 2012 et 2013 (Figure 59). En 2007, le pic est suivi d'une chute progressive qui atteint 8,5% en 2009 puis une légère augmentation (11%) est notée en 2010 suivie d'une chute pour atteindre 7,3% en 2011.

Le pic devient stationnaire à partir de 2012, une chute prolongée survient en 2014 (6,1%) et en 2015 (3,7%). A partir de cette année, la fréquence reste stationnaire puis augmente en 2017 (7,3%).

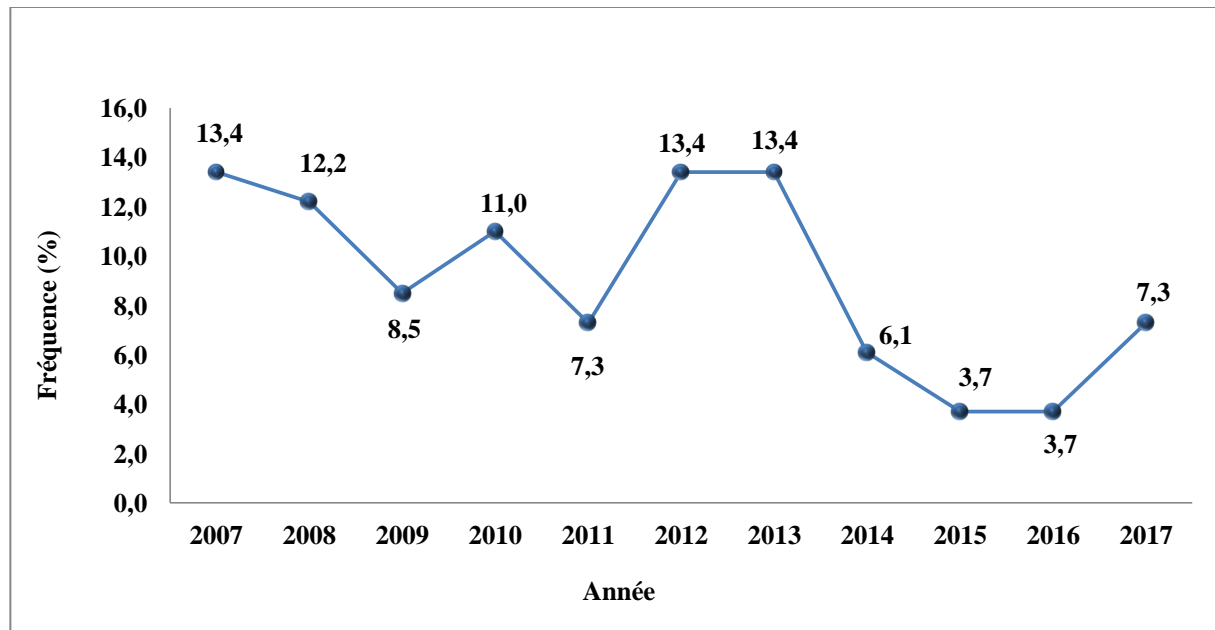


Figure 59 : Répartition annuelle des cas de LV

2.7. Répartition des cas selon le motif d'hospitalisation

Des signes généraux de la maladie ont été observés chez tous les patients, en particulier la fièvre qui était associée ou non aux autres signes cliniques et biologiques (Tableau XXV).

Le délai de consultation après l'apparition des premiers signes de la maladie varie entre 3 et 360 jours, soit une étendue de 357 jours et une moyenne de $64,6 \pm 64,6$ jours.

Tableau XXV : Motif d'hospitalisation des cas de LV

Motif d'hospitalisation	Garçons		Filles		Total	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Fièvre prolongée	15	45,5	18	54,5	33	40,2
SPMG fébrile	7	38,9	11	61,1	18	22,0
HSPMG fébrile	8	72,7	3	27,3	11	13,6
HPMG fébrile	2	100,0	0	00,0	2	2,4
Fièvre et pancytopenie	2	66,7	1	33,3	3	3,7
SPMG fébrile et pancytopenie	3	75,0	1	25,0	4	4,9
HSPMG fébrile et SAM	0	00,0	2	100,0	2	2,4
Pancytopenie	0	00,0	2	100,0	2	2,4
HSPMG fébrile et bicytopenie	0	00,0	1	100,0	1	1,2
Pancytopenie et asthénie	0	00,0	1	100,0	1	1,2
SAM	0	00,0	1	100,0	1	1,2
Bicytopenie	0	00,0	1	100,0	1	1,2
Fièvre intermittente	1	100,0	0	00,0	1	1,2
Epistaxis à répétition	1	100,0	0	00,0	1	1,2
SPMG et anémie	1	100,0	0	00,0	1	1,2
Total	40	48,8	42	51,2	82	100,0

2.8. Données thérapeutiques et évolutives

L'antibiothérapie, basée essentiellement sur les céphalosporines de 3^{ème} génération « Céfotaxime » était prescrite chez 58 enfants (70,7%) sur les 82 et la corticothérapie chez 4 enfants ayant développé un SAM secondaire à la LV.

L'anémie présente chez tous les patients, a été corrigée chez 92,7% (n=76) d'entre eux par des transfusions sanguines.

La transfusion de culot globulaire est la plus utilisée, soit dans 82,9% des cas, suivie par la transfusion de culot plaquettaire dans 23,2% (Figure 60).

95,1% des cas (78/82) ont été mis sous traitement à base de N-Méthylglucamine (Glucantime®). 73 cas l'ont reçu à raison de deux cures de 15 jours chacune à 15 jours d'intervalle en intra musculaire profonde à la dose de 60 mg/Kg/jour (20 mg SbV+/Kg /j) et à des doses progressives (J1 : ¼ de dose, J2 : ½ dose, J3 : ¾ de dose et à partir de J4 la dose complète).

Un enfant a reçu une cure de 15 jours puis ne s'est plus manifesté pour terminer son traitement.

La persistance de la fièvre (signe de stibio-intolérance) chez deux enfants a nécessité le changement du schéma thérapeutique de deux cures de 15 jours chacune en une cure unique de 30 jours chez l'un et de deux cures de 21 jours chacune à dose réduite chez l'autre.

Un cas n'a pas nécessité de traitement en raison d'une guérison spontanée. Il s'agit d'un garçon âgé de 3 ans à la date du diagnostic, ne présentant aucune particularité sauf qu'à l'âge d'un an, son allaitement a été complété par du lait de vache.

Tous les patients traités ont été surveillés de façon rigoureuse, pour évaluer l'amélioration clinique et la tolérance au traitement.

Cependant, nous déplorons trois décès survenus avant l'instauration du traitement et deux autres dus à une mauvaise observance thérapeutique, un à J4 du traitement et l'autre à J7.

L'évolution au traitement était favorable dans 97,4% des cas (76/78), avec une guérison marquée par une apyréxie, une reprise pondérale et un myélogramme négatif (chez les patients ayant subi une ponction de contrôle).

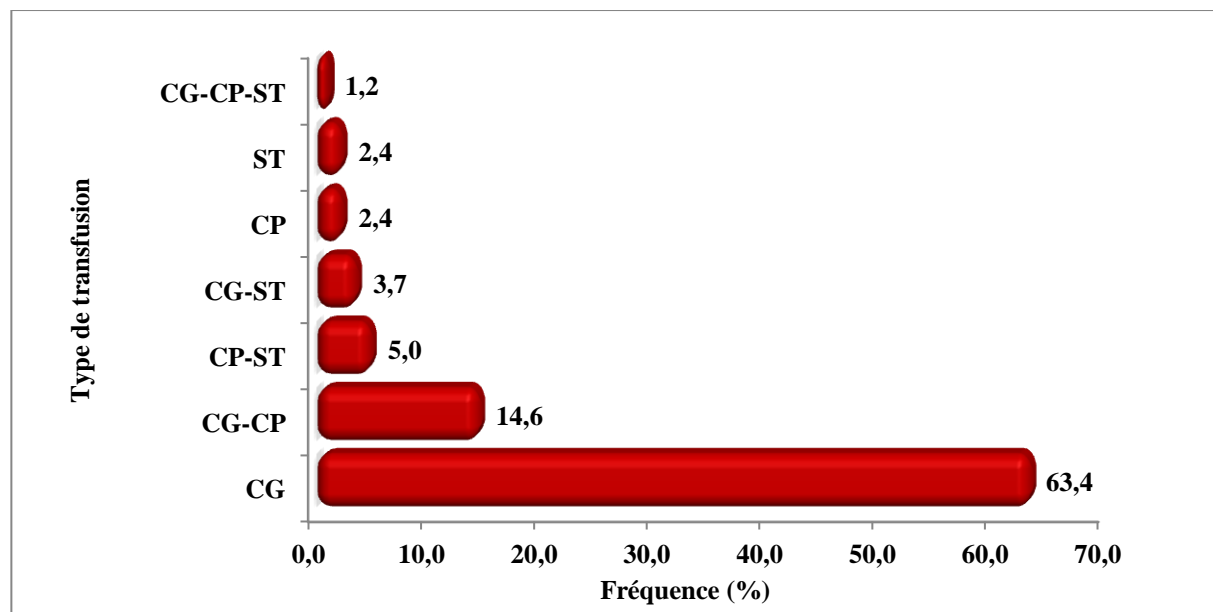


Figure 60: Répartition des cas de LV en fonction du dérivé sanguin utilisé

CG-CP-ST: Association culot globulaire, culot plaquettaire et sang total

ST: Sang total

CP: Culotplaquettaire

CG-ST: Association culot globulaire et sang total

CP-ST: Association culot plaquettaire et sang total

CG-CP: Association culot globulaire et culot plaquettaire

CG: Culotglobulaire

3. Détection et identification du parasite

L'analyse par PCR en temps réel de la moelle osseuse de 37 cas de LV (12 cas rétrospectifs et 25 prospectifs), a révélé la présence de l'ADN parasitaire dans 32 cas (86,5%) (Figure 61). Elle a confirmé la maladie dans 8 cas à myélogramme négatif.

Cinq prélèvements sont donc à PCR en temps réel négative, ce qui rejoint le résultat du myélogramme qui n'a pas objectivé la présence de parasites.

La négativité des moelles contrôles a augmenté la spécificité de la technique.

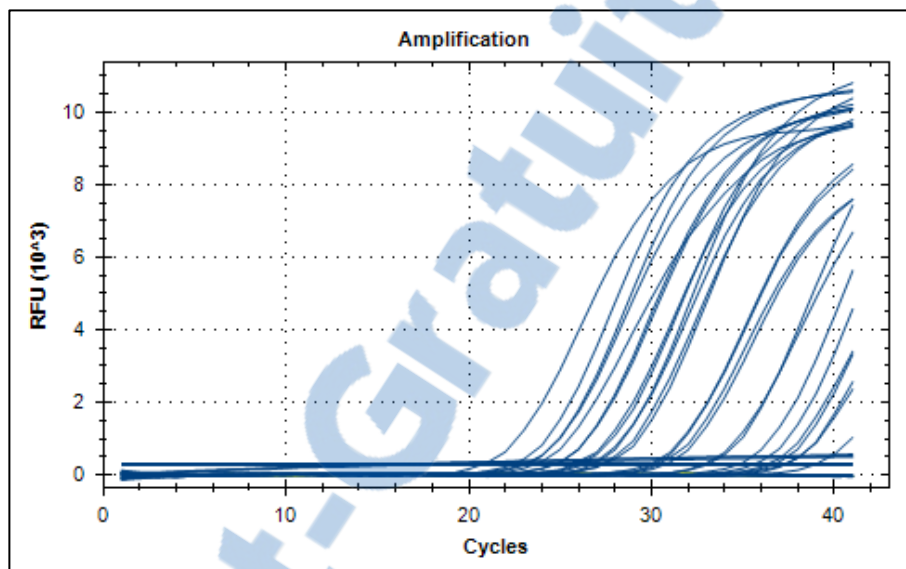


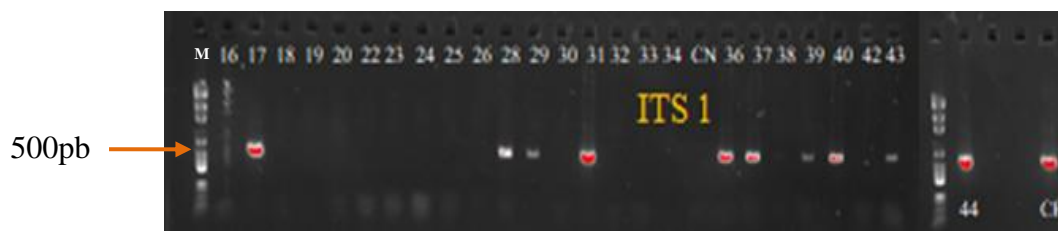
Figure 61 : Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir de la poudre de moelle osseuse
RFU : Unités de Fluorescence Relative

Le parasite a été identifié par la PCR-séquençage à partir des échantillons de moelle osseuse revenus positifs à la PCR standard qui a ciblé le segment de 500 pb couvrant la séquence ITS1 (Figure 62), le segment 400 pb couvrant la séquence ITS2 (Figure 63) et 800 pb pour le cytb (Figure 64).

Des séquences de bonne qualité pour les régions ITS1 et ITS2 ont été obtenues à partir de 11 échantillons de moelle osseuse (Annexe 17).

Le séquençage direct du cytb n'a pas été effectué avec succès, malgré plusieurs tentatives excepté pour l'échantillon 2 (Annexe 17).

L'arbre phylogénétique, montre que l'espèce responsable de la leishmaniose viscérale est *L. infantum* avec 74% de similitude avec *L. infantum* AB095958 référencée dans le GenBank (Figure 65).



Echantillons positifs (17, 28, 29, 31, 36, 37, 39, 40, 43, 44).

Figure 62: Résultat de l'amplification de la région ITS1 (500pb) de *Leishmania* par La PCR standard



Echantillons positifs (17, 28, 29, 31, 36, 37, 39, 40, 43, 44).

Figure 63 : Résultat de l'amplification de la région ITS2 (400pb) de *Leishmania* par La PCR standard



Echantillons positifs (2, 4, 5, 12).

Figure 64 : Résultat de l'amplification du gène cytb (800pb) de *Leishmania* par PCR standard

CN : Contrôle négatif
CP : Contrôle positif
M : Marqueur de taille

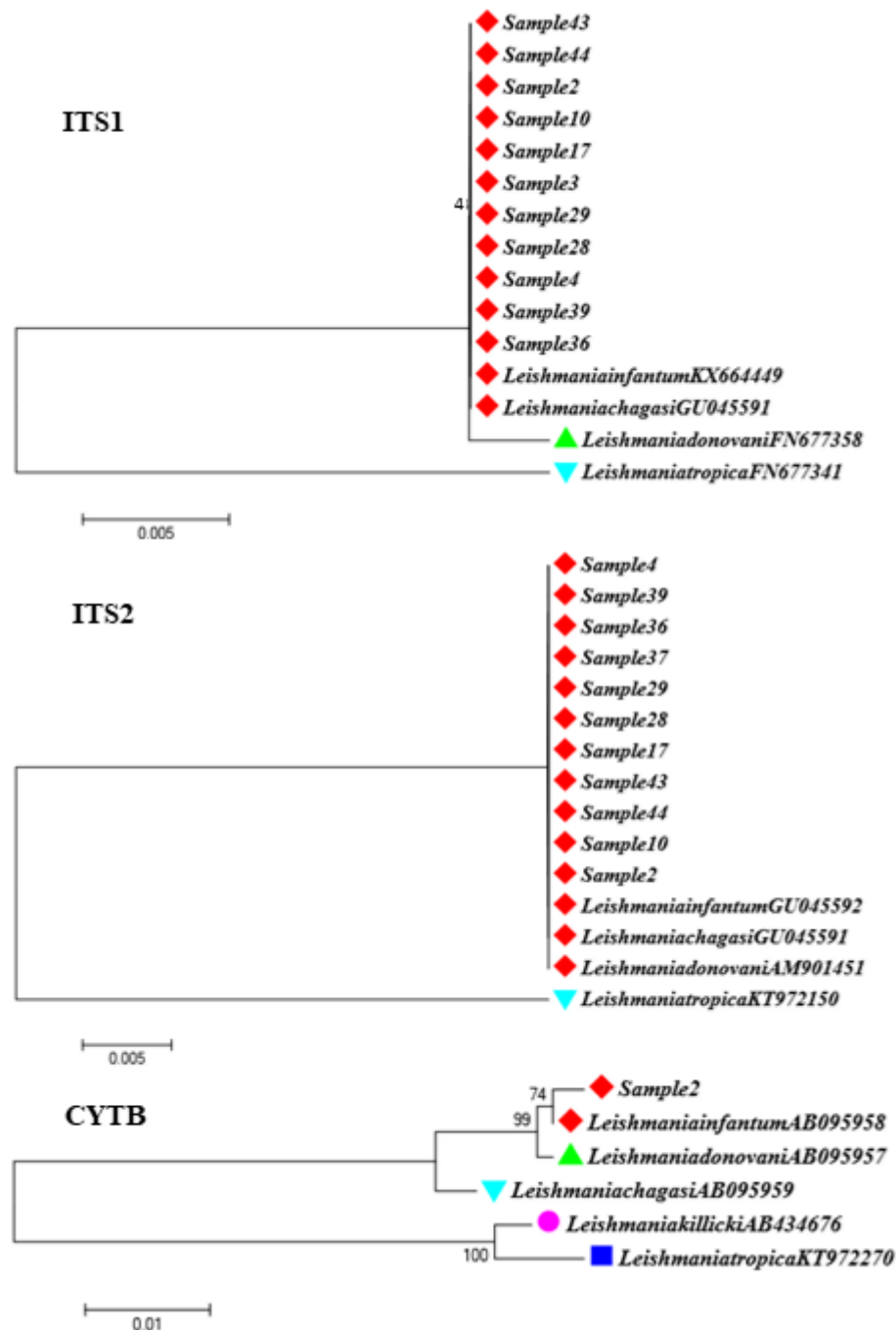


Figure 65 : Arbre phylogénétique basé sur la méthode Maximum Likelihood avec 500 réplifications de bootstraps comparant les régions ITS1, ITS2 et le gène Cytb du parasite des cas de LV avec ceux des espèces référencées dans le Genbank

4. Résultats entomologiques

4.1. Identification des phlébotomes capturés

Les phlébotomes étudiés ont été capturés en période d'activité, de juin à septembre des années 2014, 2015 et 2016, en utilisant des pièges adhésifs. Sur un total de 800 spécimens récoltés, 643 étaient de sexe mâle et 157 de sexe femelle (Figures 66 et 67).

L'étude taxonomique a montré la présence de cinq espèces réparties sur deux genres, *Phlebotomus* et *Sergentomyia*. Il s'agit de *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. longicuspis* et *S. minuta*.



Figure 66 : Phlébotome adulte mâle (50x) (Photo originale)
Flèche : Génitalia



Figure 67 : Phlébotome adulte femelle (50x) (Photo originale)
Flèche : Génitalia

4.1.1. *Phlebotomus perniciosus*

La détermination du mâle est basée sur le style qui est composé de 5 épines bien développées, dont 2 terminales et 3 médianes (Figure 68) et les valves pénienues bifurquées, à extrémité pointue (Figure 69). Le coxite présente généralement un nombre de soies inférieur à 18 (Figure 70).

Chez les femelles, la tête de la spermathèque est composée de 7 à 12 anneaux (Figure 71).

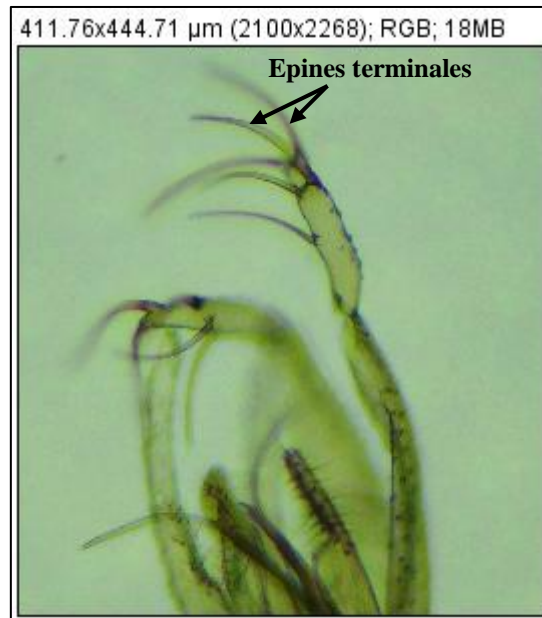


Figure 68 : Génitalia mâle de *P. perniciosus* (100x)
(Photo originale)

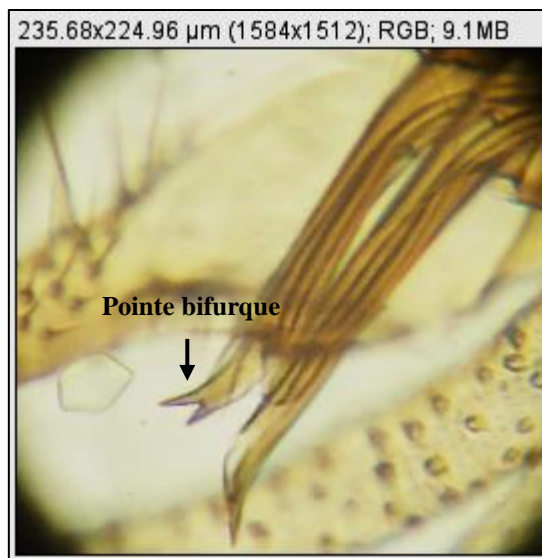


Figure 69 : Fourreau pénien de *P. perniciosus* (400x)
(Photo originale)

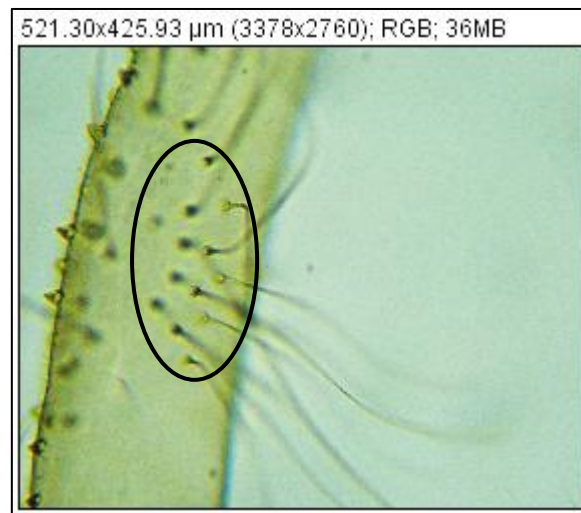


Figure 70 : Soies médianes du coxite de *P. perniciosus* (400x)
(Photo originale)

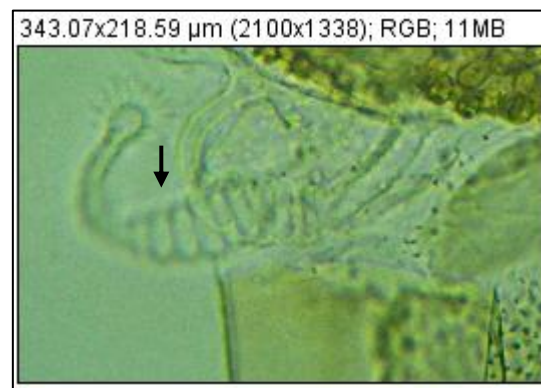


Figure 71: Spermathèque de *P. perniciosus* (400x)
(Photo originale)

4.1.2. *Phlebotomus longicuspis*

Le mâle se caractérise par un style composé de 5 épines bien développées, dont 2 terminales et 3 médianes, par la morphologie de la structure terminale de la valve pénienne et par le nombre de soies sur la face ventrale du coxite. La valve pénienne est simple, droite, pointue et effilée avec 18 à 31 soies sur le coxite (Figure 72).

L'aspect de la base de la spermathèque sépare les femelles de *P. perniciosus* de celles de *P. longicuspis*. Les autres structures de cet organe (corps, conduit et cou) sont identiques dans les deux espèces.

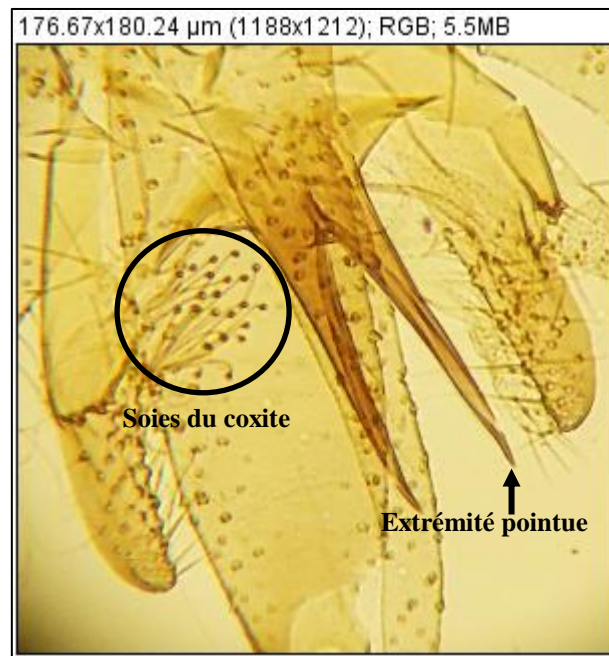


Figure 72 : Soies du coxite et extrémité de la valve pénienne de *P. longicuspis* (400x) (Photo originale)

La figure 73 montre le nombre des soies médianes des coxites des deux espèces, *P. perniciosus* et *P. longicuspis*.

La comparaison des moyennes effectuées sur les deux populations par le test t de student ($t=18,57$) montre qu'il existe une différence significative entre les deux espèces au seuil de 5%. Ceci implique qu'il n'y a pas de confusion entre ces deux espèces (Tableau XXVI).

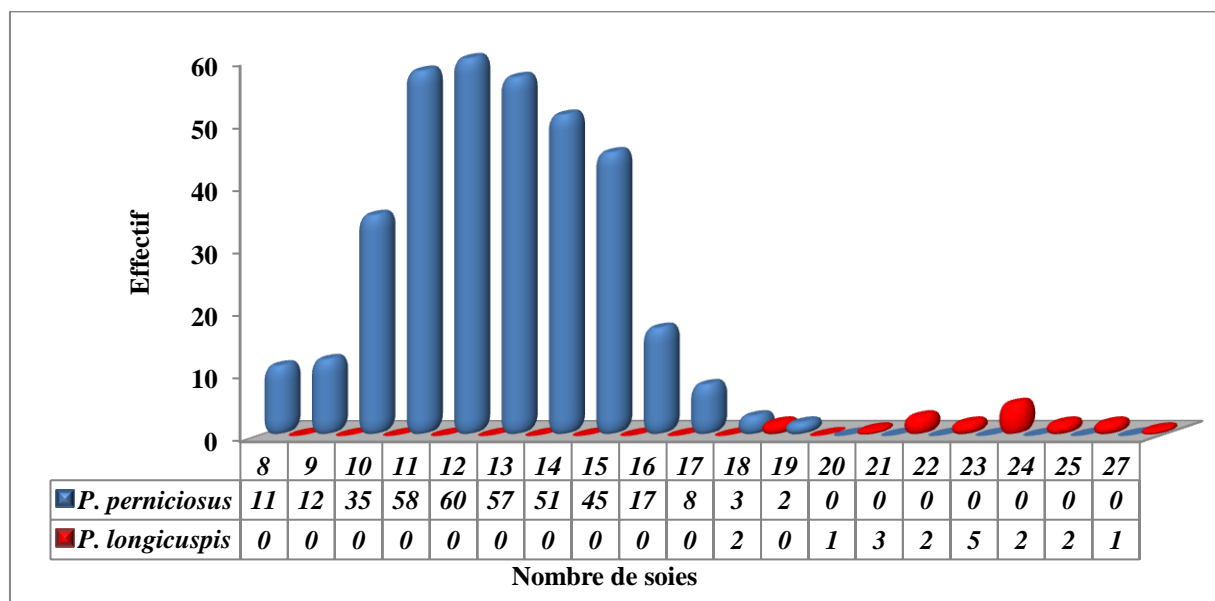


Figure 73 : Effectif de *P. perniciosus* et de *P. longicuspis* en fonction du nombre de soies médianes des coxites.

Tableau XXVI : Nombre de soies médianes du coxite de *P. longicuspis* et de *P. perniciosus*

Espèce	Nombre d'individus	Moyenne des soies	Min.	Max.
<i>P. longicuspis</i>	18	22,39±2,33	18	27
<i>P. perniciosus</i>	359	12,63±2,17	8	19
Test t	18,57	P<0,0001*		

* : significativité du test au risque $p < 0,05$

4.1.3. *Phlebotomus perfiliewi*

Chez le mâle, le style possède cinq épines, 2 apicales et 3 médianes. Le coxite porte, sur sa face interne, 16 à 20 soies dirigées ventralement et situées près du milieu du coxite et décalées vers la base.

La valve pénienne présente une face interne incurvée constituée d'une membrane claire et translucide donnant un aspect tronqué à la valve (Figure 74).

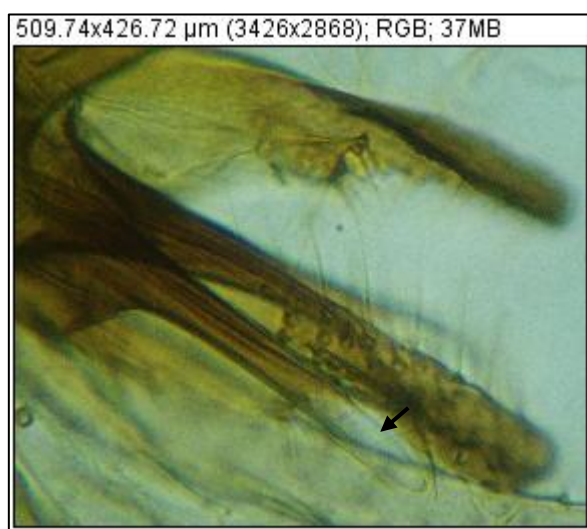


Figure 74: Valve pénienne de *P. perfiliewi* (400x) (Photo originale)

4.1.4. *Phlebotomus papatasi*

C'est une espèce de grande taille. Le mâle est caractérisé par la présence d'un génitalia bien développé avec des styles longs et grêles portant 5 épines courtes dont 3 apicales et 2 sub-terminales (Figure 75). Le coxite porte une touffe de 12 soies longues et bien différenciées. La valve pénienne est courte avec une extrémité mousse (Figure 76).

La spermathèque de la femelle est segmentée (6 à 10 segments) sans col (Figure 77).



Figure 75 : Génitalia mâle de *P. papatasi* (100x) (Photo originale)
Flèche blanche : Touffe de soies
Flèches noires: Epines

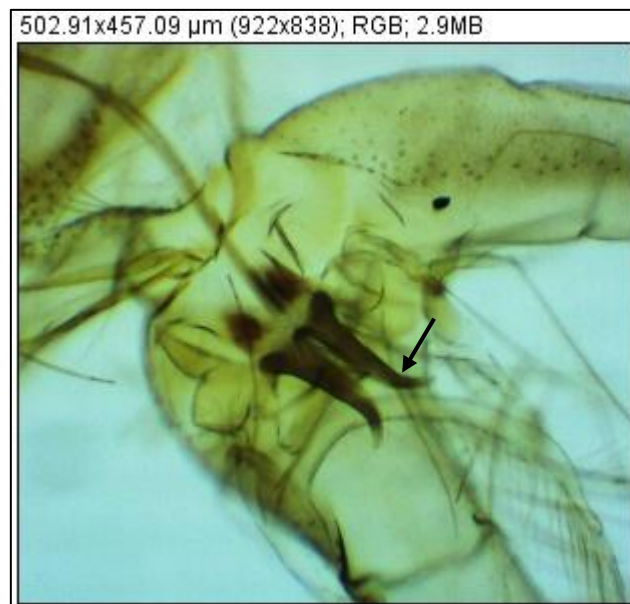


Figure 76 : Valves péniennes de *P. papatasi* (100x)
(Photo originale)

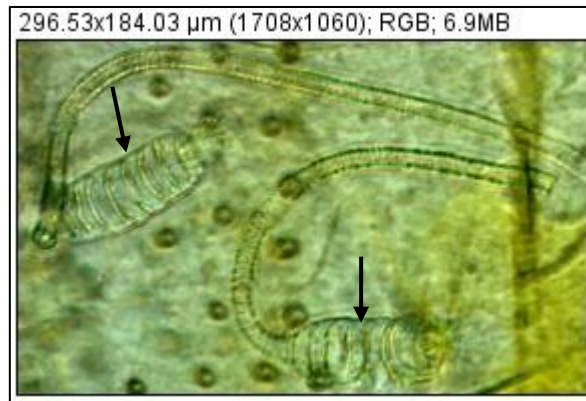


Figure 77: Spermathèques de *P. papatasi* (400x)
(Photo originale)

4.1.5. *Sergentomyia minuta*

Le génitalia mâle de *S. minuta* se distingue par une valve pénienne épaisse, arrondie à l'apex. Le style court porte 4 épines terminales groupées et une soie non caduque insérée au niveau du tiers apical (Figure 78).

Chez la femelle, les spermathèques sont tubulaires, lisses et non segmentées (Figure 79) et la tête (Figure 80) présente une armature cibiale disposée en rangée transversale et régulière (Figure 81).

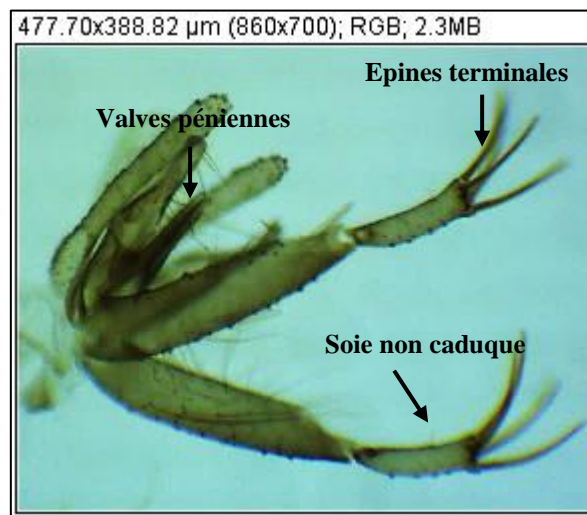


Figure 78 : Génitalia mâle de *S. minuta* (100x)
(Photo originale)



Figure 79 : Spermathèque de *S. minuta* (400x)
(Photo originale)

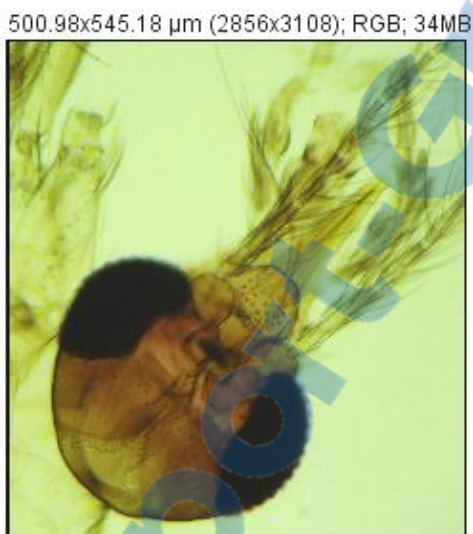


Figure 80: Tête de *S. minuta* (100x)
(Photo originale)

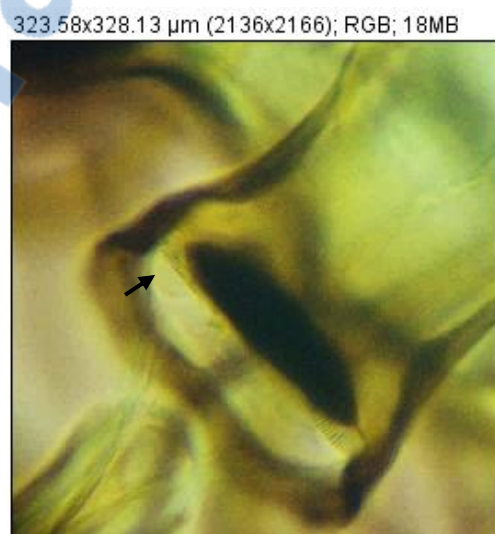


Figure 81: Cibarium de *S. minuta* (400x)
(Photo originale)

4.2. Abondance relative des espèces identifiées

Seule l'abondance relative a été déterminée comme indice écologique. Parmi les espèces recensées, *P. perniciosus* est la plus fréquente, constituant l'essentiel des spécimens récoltés, avec une abondance relative de 55,1%. Elle est suivie par *P. papatasi* (30,5%), *S. minuta* (10,8%) et *P. longicuspis* (3,5%) (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : Abondance relative par sexe des espèces de phlébotomes capturés

Espèces	Nombre de phlébotomes mâles	A.R. de phlébotome mâles (%)	Nombre de phlébotomes femelles	A.R. de phlébotomes femelles (%)	Nombre de phlébotomes mâles et femelles	A.R. de phlébotomes mâles et femelles (%)	<i>Sex ratio</i>
<i>P. perniciosus</i>	359	55,8	82	52,2	441	55,1	4,4
<i>P. papatasi</i>	226	35,1	18	11,5	244	30,5	12,6
<i>S. minuta</i>	39	6,1	47	29,9	86	10,8	0,8
<i>P. longicuspis</i>	18	2,8	10	6,4	28	3,5	1,8
<i>P. perfiliewi</i>	1	0,2	0	0,0	1	0,1	0
Total	643	100,0	157	100,0	800	100,0	4,1

A.R. : Abondance relative

4. 3. Résultat de la recherche de leishmanies à partir du vecteur

L'analyse par PCR en temps réel de 44 phlébotomes femelles identifiés, en vue de détecter la présence du parasite, a donné un résultat négatif (Figure 82).

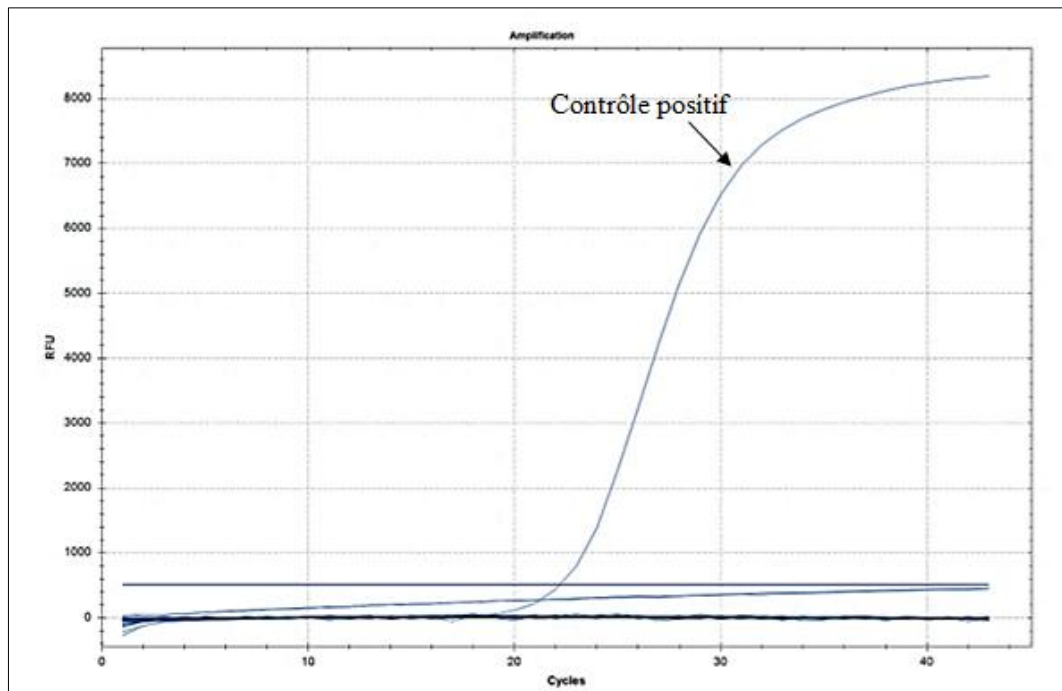


Figure 82 : Résultat de la PCR en temps réel réalisée à partir des phlébotomes femelles



CHAPITRE IV

DISCUSSION

Discussion

L'examen direct de la moelle osseuse représente le moyen de référence et de première intention pour le diagnostic de la LV. La littérature rapporte un taux de positivité de 50 à 85 % qui peut même dépasser les 90% dans certains cas (Maltezou *et al.*, 2000; Peacock *et al.*, 2001; Samake, 2006). Il peut donner un résultat négatif en cas d'une hémodilution de la moelle osseuse, d'une coloration défectueuse ou d'une erreur du microscopiste. Ce dernier doit être expérimenté pour ne pas passer à côté des formes amastigotes qui simulent les plaquettes. La négativité de la recherche de ces formes dans les frottis de la moelle osseuse des cas suspects peut être attribuée à l'une de ces hypothèses.

D'autres sites peuvent être prélevés pour mettre en évidence le parasite, tels que la rate. En effet, la ponction splénique est considérée comme plus performante mais elle est moins pratiquée en raison du danger qu'elle présente en cas de trouble de l'hémostase (Da Silva *et al.*, 2005). La ponction hépatique est possible, mais comporte autant de risques.

La grande étendue du délai de diagnostic (59 jours) des patients de notre série, justifiée par l'absence d'alternative à l'examen direct, notamment pour quelques cas rétrospectifs, a conduit à une prise en charge thérapeutique tardive de certains d'entre eux. Selon ce qui est ressorti d'un colloque international « La leishmaniose viscérale au Maghreb: du diagnostic au contrôle » (tenu à l'Institut Pasteur de Tunis du 2 au 4 avril 2015), les délais de diagnostic sont encore assez élevés et doivent être réduits davantage afin de faire baisser le taux de mortalité. L'une des recommandations des participants (des experts des leishmanioses d'Algérie, du Maroc, de la Tunisie, d'Espagne et de la France) est d'introduire et de diffuser les tests de diagnostic rapide de la LV dans les structures sanitaires régionales des zones les plus concernées (Aoun *et al.*, 2015).

Les espèces de *Leishmania* responsables de cette pathologie induisent habituellement une réponse immunitaire cellulaire et humorale avec une forte production d'anticorps. Leur recherche dans le sérum du malade est donc préconisée.

A partir d'octobre 2010, nous avons fait bénéficier l'ensemble des malades, qui présentaient une suspicion de LV, d'une étude du frottis médullaire couplée à la sérologie pour le diagnostic et sa confirmation.

L'antigène rk 39 (antigène recombinant de 39 acides aminés) est le plus utilisé dans le test immunochromatographique pour la détection de cas de LV. Cependant, deux autres antigènes, le rk26 et le rkE16, ont été évalués pour le diagnostic rapide et leur fiabilité comparée dans plusieurs études à celle de l'Ag rk 39. Une étude comparative de l'examen microscopique direct et de tests immunochromatographiques rk39 et rk26 a été menée sur 452 prélèvements

(230 cas de LV confirmée, 52 cas suspects et des cas de témoins sains, 100 provenant d'une zone d'endémie et 70 hors zone d'endémie). Les résultats ont montré une sensibilité et une spécificité respectivement de 100% et 97% pour l'Ag rk39 et de 22,6% et 100% pour l'Ag rk26 (Sundar *et al.*, 2007).

En 2011, l'organisation mondiale de la santé (WHO) a publié une étude d'évaluation des tests de diagnostic rapide de la LV dans trois régions endémiques, le sous-continent indien, l'Afrique de l'Est et le Brésil. Les antigènes utilisés, rk39 et rkE16, ont montré, dans le sous-continent indien, une spécificité dépassant 95% et une sensibilité de plus de 92%. Leur sensibilité respective était de 77,4 et 55 % en Afrique et de 88,4% et 70,4% au Brésil. La faible sensibilité du test rkE16 dans ces régions est peut-être due à l'utilisation d'un antigène recombinant, dérivant d'une souche de *L. donovani* de l'Inde.

L'étude de Kumar *et al.* (2001) a abouti à des résultats prometteurs pour l'utilisation de l'antigène rk39 qui a présenté une sensibilité de 100% et une spécificité de 96%.

La variabilité de la sensibilité de ces tests dans le cas de la LV dans les différentes régions du monde serait liée à la diversité des souches parasitaires et aux taux d'anticorps. Ces derniers dépendent de facteurs génétiques individuels, immunologiques, nutritionnels et environnementaux.

Dans notre étude, ce test a permis de diagnostiquer la LV chez des patients à myélogramme négatif; ses performances (sensibilité, spécificité, VPP et VPN) se rapprochent de celles décrites dans la littérature (Tableau XXVIII). Sa spécificité est augmentée par l'absence de positivité des sérums témoins de cas présentant d'autres pathologies.

Devant les signes cliniques et biologiques évocateurs de la LV, l'indice de Youden (j) de (0,9) (résultat proche de 1) et le coefficient Q de Yule équivalent à (1), utilisés pour la première fois dans l'évaluation du rk39, augmentent ses performances dans le diagnostic de la maladie. Cependant, cet antigène peut donner des résultats faussement négatifs dans le stade précoce de la maladie et chez les immunodéprimés et ne distingue pas une infection récente d'une ancienne, ce qui limite son utilisation dans le diagnostic d'une rechute (Pandey *et al.*, 2013). Les anticorps sont détectés plus de 24 mois après succès thérapeutique (Otranto *et al.*, 2005; Marty *et al.*, 2007).

Devant un test rk39 négatif contrastant avec des données cliniques, biologiques et épidémiologiques en faveur d'une leishmaniose viscérale, un autre examen de certitude doit être fait pour confirmer ou infirmer le diagnostic (Saghrouni *et al.*, 2009).

En raison des moyens insuffisants, seuls 7 cas sur les 17 à TDR positif ont été testés par l'IFI qui a confirmé 2 cas, les 15 autres l'ont été par le WB. Ce dernier est un des tests sérologiques les plus sensibles (100%) et les plus spécifiques (99%) et de plus un test de confirmation d'un résultat équivoque obtenu par les tests classiques de dépistage (Marty *et al.*, 1995). Il permet de différencier les profils des malades et des porteurs asymptomatiques (Hassani *et al.*, 2011). Il met en évidence des anticorps spécifiques d'antigènes de *Leishmania* et ceux recherchés n'induisent pas de réactions croisées; les plus importants ont un poids moléculaire de 14 et 16kDa. Il s'agit d'un test sérologique de choix mais vu son coût élevé, son utilisation est réservée aux laboratoires spécialisés. Dans la présente étude, il a affirmé le diagnostic apporté par le TDR.

Le TDR semble présenter une meilleure sensibilité (93,3%) que l'ELISA (90,2%) mais une même spécificité (100%) a été observée. L'étude de Mniouil *et al.* (2018) montre un résultat comparable, une sensibilité de 95,8% par le TDR rk 39 contre 75% par l'ELISA. La spécificité était respectivement de 100% et 95,8%.

Quant aux résultats faussement négatifs obtenus avec le test ELISA, ils sont dus probablement à un faible taux d'anticorps.

L'outil moléculaire est un moyen performant de diagnostic et de suivi des leishmanioses. La PCR détecte des parasitemies inférieures à un parasite par microlitre (Mary *et al.*, 2006). Sa sensibilité approche 100% dans un prélèvement médullaire (Guerin *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2005) et dépasse largement celle des autres techniques utilisées notamment dans des cas de portage asymptomatique.

Cette méthode a permis de diagnostiquer la maladie chez 19 patients à myélogramme négatif à partir de la moelle osseuse (4), du sérum (11) et des deux prélèvements (4) (Annexe 15). Elle a montré une sensibilité presque similaire sur prélèvements de moelle osseuse et sanguins, évitant ainsi la répétition des médullogrammes (Pintado *et al.*, 2001; Mary *et al.*, 2006; Boelaert *et al.*, 2007). Sa sensibilité sur sérum était de 92,3%. Fissore *et al.* (2004) et De Assis *et al.* (2009) ont rapporté une sensibilité de 97% et de 85% respectivement.

La PCR a été négative à partir de sérums:

- des cas témoins, ce qui témoigne de la bonne spécificité de la technique;
- de deux patients, du fait peut-être de l'absence de formes amastigotes extracellulaires dans le sang veineux au moment du prélèvement et par conséquent dans le sérum;
- du patient à guérison spontanée, malgré la détection du parasite et de traces d'anticorps par les tests conventionnels, ce qui suggère qu'on est en présence d'une nouvelle espèce de *Leishmania*. Le séquençage du génome complet peut confirmer cette hypothèse ou l'infirmer.

Des signes généraux de la maladie ont été enregistrés chez la plupart des patients, ils étaient dominés par la fièvre, retrouvée dans 96,3% des cas. Ce signe représente le motif de consultation le plus fréquent.

La triade classique en faveur d'une LVI était présente dans 62,2% des cas. Il s'agit d'une splénomégalie (signe précoce et fréquent) associée à une pâleur cutanéomuqueuse et à une fièvre qui résiste au traitement antibiotique. L'hépatomégalie était constatée dans 54,9% des cas.

La fréquence de ces signes est retrouvée dans d'autres séries (Tableau XXIX).

Tableau XXVIII : Performances du TDR selon la littérature

Etudes	Se(%)	Sp(%)	VPP(%)	VPN(%)	J	Q	Nombre d'échantillons sériques
Italie (Brandonisio <i>et al.</i> , 2002)	100	100	-	-	-	-	11
Brésil (Schallig <i>et al.</i> , 2002)	85.7	82	-	-	-	-	21
Népal (1^{ère} étude) (Bern <i>et al.</i> , 2000)	97	71	-	-	-	-	139
Népal (2^{ème} étude) (Chappuis <i>et al.</i> , 2003)	100	100	-	-	-	-	14
Inde (Sundar <i>et al.</i> , 2006)	99	89	-	-	-	-	150
France (Marty <i>et al.</i> , 2007)	97	98	89	94	-	-	34
Brésil (De Assis <i>et al.</i> , 2011)	93	97	98	89	-	-	332
Tunis (Saghrouni <i>et al.</i> , 2009)	87.1	94.4	96.2	81.9	-	-	574
Présente étude	93,3	100,0	100,0	95,3	0,9	1	106

Se : Sensibilité

Sp : Spécificité

VPP : Valeur prédictive positive

VPN : Valeur prédictive négative

J : Indice de Yuden

Q : Coefficient Q de Yule

Tableau XXIX: Fréquence des principaux signes cliniques de la LV selon quelques études

Etudes	SPMG	Fièvre	Triade	HPMG	Pâleur
Moziane <i>et al.</i> , 1983	92,8%	100,0%	-	85,7%	-
Lakhdar Idrissi <i>et al.</i> , 2007	97,7%	94,5%	-	47,4%	50,0%
Zougaghi <i>et al.</i> , 2009	98,9%	92,4%	76,3%	48,4%	-
Aissi <i>et al.</i> , 2015	97,9%	79,9%	-	47,3%	-
Présente étude	91,5%	96,3%	62,2%	54,9%	67,1%

SPMG : Splénomégalie

Triade : Fièvre-pâleur-splénomégalie

HPMG : Hépatomégalie

Les signes biologiques aspécifiques de la LVI, cités dans la littérature, correspondent à une bicytopenie ou une pancytopenie et à un syndrome inflammatoire important (Minodier et Garnier, 2000; Lakhdar Idrissi *et al.*, 2007). Parmi ceux évocateurs de la maladie, certains permettent l'orientation du diagnostic et d'autres recherchent les complications qui surviennent chez le patient, telles que le syndrome d'activation macrophagique.

- L'anémie, constante chez tous les patients de notre série avec une sévérité variable, résulte de deux mécanismes distincts:

- Le premier est central, dû à une irritation de la moelle osseuse par les antigènes du parasite (Dotis *et al.*, 2003).

- Le second est périphérique; lié d'une part, à l'hypersplénisme et d'autre part, à un mécanisme auto-immun faisant intervenir le complément activé par la formation du complexe antigène anticorps. De ce fait, l'allongement de la durée du parasitisme contribue à aggraver progressivement l'anémie (Dedet, 1999). L'hypersplénisme est incriminé dans la destruction des leucocytes, à l'origine d'une leucopénie et d'une neutropénie, chez respectivement 59,8% et 11% des patients. Ces anomalies exposent les patients à de nombreuses complications infectieuses pouvant rendre difficile leur prise en charge (Bouraoui *et al.*, 1994). Ceci justifie la prescription d'une antibiothérapie chez 70,8% d'entre eux.

Plusieurs patients (82,9%) ont présenté une thrombopénie qui se manifeste dans environ 70 à 90% des cas des séries publiées. Dans les stades les plus évolués de la maladie, elle devient majeure et s'associe à une altération de la synthèse des facteurs de coagulation par le foie pouvant causer de graves hémorragies et nécessitant des transfusions à répétition (Bouraoui *et al.*, 1994; Dedet, 1999).

Bien qu'elle soit aspécifique, la manifestation de la pancytopenie constitue un des arguments en faveur d'une LVI (Zougaghi *et al.*, 2009).

L'apparition d'un syndrome inflammatoire chez nos patients était marquée par une CRP positive dans 53,7% des cas et une VS accélérée dans 32,9%. Une CRP+ associée aux autres signes évocateurs de la LV, est un bon élément d'orientation du diagnostic. Cependant, des signes cliniques non spécifiques qui se confondent avec ceux d'autres infections (Paludisme, tuberculose, brucellose, fièvre entérique, etc...) rendent le diagnostic difficile (Boelaert *et al.*, 2007; Bhargava et Singh, 2012).

La maladie s'est compliquée par un syndrome d'activation macrophagique chez quatre patients (4,9%), ce qui a conduit au décès de deux d'entre eux.

Le SAM secondaire à la LV est une maladie principalement pédiatrique comme le montre une étude faite sur 56 cas dont 8 seulement étaient d'âge adulte (Rajagopala *et al.*, 2008). Il serait dû à une dysrégulation immunitaire favorisée par une hyperproduction de cytokines par un agent infectieux.

Chez l'adulte immunocompétent, l'infection à *L. infantum* n'est pas toujours asymptomatique, des manifestations sévères peuvent parfois survenir (Benbella *et al.*, 2016). Néanmoins, le risque est plus élevé chez la population infantile (Faucher, 2013).

Au Maghreb, la LV est majoritaire chez le jeune enfant avec 95% des cas de moins de 5 ans, réalisant le classique Kala-azar méditerranéen infantile (Carré *et al.*, 2010), décrit en Algérie par Harrat *et al.* (1996) et Belazzoug *et al.* (1985). La susceptibilité de cette tranche d'âge s'explique essentiellement par l'immaturité de son système immunitaire et par une affinité particulière du phlébotome pour le jeune enfant (Dedet, 2001a).

L'âge d'apparition de la maladie correspond à la période à laquelle le nourrisson perd les anticorps maternels (7 à 15 mois) et devient sensible aux agents pathogènes (Louzir et Dellagi, 1999). Cependant, des cas ont été signalés chez de jeunes adolescents de 13 à 14 ans (Bachi, 2006), ce qui concorde avec nos résultats qui montrent que la moyenne d'âge était de $1,90 \pm 1,89$ ans avec des extrêmes allant de 7 mois à 14,5 ans. 95,1% avaient moins de 5 ans et 22,0% moins de un an

Aoun *et al.* (2009) font mention d'une majorité d'enfants de moins de un an, s'expliquant par la diminution des délais de diagnostic de la maladie suite à l'amélioration de la couverture sanitaire du pays et donc au dépistage des cas.

Chez la population étudiée, une légère proportion du sexe féminin prédomine; Figuigui *et al.* (2017) font la même observation mais dans la majorité des séries de la littérature, les auteurs signalent une prédominance masculine (Lakhdar Idrissi *et al.*, 2007). Selon la synthèse faite

sur la LV par Carré *et al.* (2010), il n'existe pas de différence en fonction du sexe, en dehors du foyer indien où la prédominance des sujets de sexe masculin s'explique par une plus grande exposition aux piqûres que par une sensibilité particulière.

La répartition des cas selon le groupe sanguin a montré une prédominance de ORh+. Sur la rive sud de la méditerranée, la majorité des populations sont de phénotype O (Loua *et al.*, 2007)(Figure 83). Chez la population de l'Oranie, les groupes sanguins se distribuent selon l'ordre O>A>B>AB (Deba, 2017).

Certains auteurs ont lié la distribution mondiale du polymorphisme du système ABO à certaines maladies infectieuses voire à de grandes épidémies. Les différences dans ce système peuvent agir sur les réponses à certaines infections.

Des maladies telles que le choléra et la diarrhée infantile, causée par *Escherichia coli*, touchent plus souvent les individus du groupe O. Par rapport à ces derniers, les individus du groupe A font une tuberculose pulmonaire et un ulcère gastrique et duodénal plus sévères (Chadli *et al.*, 2007).

La répartition géographique actuelle du groupe O est également compatible avec une pression de sélection exercée par *P. falciparum* en faveur des individus de ce groupe dans les régions d'endémie palustre (Cserti et Dzik, 2007). Certaines études suspectent le rôle du vecteur dans la relation entre la maladie et le système ABO. Selon Wood *et al.* (1972), *Anopheles gambiae* préfère se nourrir sur les individus de groupe O.

Comme des oligosaccharides sont sécrétés au niveau de la peau par certains individus, des auteurs ont avancé l'existence d'une attirance d'*Aedes albopictus* plus par le groupe sanguin O disaccharide (antigène H) que par le groupe sanguin A trisaccharides (Shirai *et al.*, 2004).

La prédominance du groupe sanguin ORh+, chez les patients de notre série, est due soit au hasard, compte tenu du fait qu'il s'agit d'un groupe dominant dans le nord-ouest algérien, soit à l'attraction des phlébotomes femelles par les sécréteurs du groupe sanguin ORh+.

L'absence de travaux faisant la corrélation entre le groupe sanguin et la leishmaniose viscérale laisse la discussion ouverte.

Par rapport à la provenance des patients, la majorité d'entre eux (87,8%) sont originaires des régions du nord-ouest algérien, à étages bioclimatiques sub-humides à semi-arides. Les travaux de Harrat *et al.* (1992; 1996) soulignent l'apparition probable de nouveaux foyers de leishmaniose viscérale dans cette partie du pays.

De nombreux cas de LV sont survenus dans les régions arides connues pour être des foyers de LCZ, comme à Biskra (Belazzoug *et al.*, 1986) et dans le Hoggar et le Tassili (Belkaid et

Harrat, 1997). Ces données expliquent la provenance du Sahara et des hauts plateaux (Adrar, Tindouf, Saida, Tissemsilt et Tiaret) de 12,2% des cas.

Les deux cas ayant séjournés en dehors de leur wilaya de résidence (Oran) pendant la période d'activité des phlébotomes, ont du contracté la maladie à Relizane ou à Oum El Bouaghi. Ces deux Wilaya disposent d'une économie essentiellement rurale avec la pratique de l'agriculture et de l'élevage; de plus Oum El Bouaghi est limitrophe au nord avec la région de Constantine, connue comme endémique pour la LV (Mihoubi *et al.*, 2012).

91,5% des cas sont issus d'un milieu rural ou semi-urbain et 75,6% des cas d'un bas niveau socio-économique. Zougaghi *et al.* (2009) et Aoun *et al.* (2009), rapportent que ces conditions sont à l'origine de cas de LVI et suggèrent qu'elles représentent des facteurs qui contribuent à la pérennisation de cette parasitose. Les enfants malnutris et vivant en grande promiscuité des chiens errants sont les plus touchés. Par ailleurs, l'abondance de la matière organique dans ces milieux offre aux phlébotomes les conditions favorables au développement de leurs larves.

Sur le plan de l'information, les parents de ces enfants malades ignorent tout de la LV bien qu'elle soit à déclaration obligatoire en Algérie (Annexe 18). L'absence de campagnes de sensibilisation des populations des zones rurales sur la gravité de cette pathologie est probablement à l'origine d'hospitalisation tardive de certains cas et de leur répartition sur toute l'année sous une forme sporadique. Selon Louzir et Dellagi (1999), la sous-estimation par les parents de certains symptômes précoces (fièvre modérée non continue ou anémie discrète) prolonge le délai de consultation des malades.

Le pourcentage élevé du nombre de cas au printemps (47,6%) serait en relation avec une transmission saisonnière de *L. infantum* dans les pays du pourtour méditerranéen, qui est selon Ghrab *et al.* (2006), de juillet à octobre. La contamination de ces enfants a du se produire pendant la période estivo-automnale où les soirées sont suffisamment chaudes (19-20°C) et humides, correspondant à la période d'activité des phlébotomes (Mazelet, 2004). Elle est suivie d'une période d'incubation du parasite entre 3 à 6 mois (Pearson et Queiroz Souza, 1995). Cette hypothèse pourrait expliquer l'apparition des premiers symptômes de mars à juin dans 56,1% des cas. Les mêmes observations découlent de l'étude d'Aoun *et al.* (2009).

La régression du nombre de cas à partir de l'année 2014 est vraisemblablement liée à une prise en charge des malades par le secteur sanitaire de leur wilaya d'origine ou à la sous-estimation des cas du fait de la difficulté d'accès aux soins de certaines populations.

La LV est une maladie chronique à évolution lente qui peut durer plusieurs mois, voire plusieurs années. Sans traitement, l'évolution est marquée par l'aggravation des signes

cliniques et biologiques suivie par une détérioration de l'état général et susceptibilité accrue aux infections. La mort survient le plus souvent par infection intercurrente ou hémorragie.

La première molécule utilisée est l'antimoine trivalent mais elle a été vite abandonnée du fait de sa toxicité. Depuis 1940, les médicaments de première ligne sont des antimoines pentavalents, le N-méthylglucamine (Glucantime®) et le stiboglyconate de sodium (Pentostam®).

En Algérie, le traitement classique de la LV est basé sur le N-méthylglucamine. Il est administré habituellement en cure de 30 jours (28 jours selon les recommandations de l'OMS) à la dose de 20mg d'antimoine pentavalent/kg/jour. Une seule cure ne conduit pas toujours à la guérison et doit être répétée après un temps de repos (Hassani *et al.*, 2011).

Lorsque le traitement est institué suffisamment tôt, l'évolution est favorable et conduit à la guérison clinique (Zougaghi *et al.*, 2009).

Les patients étaient sous surveillance et malgré la toxicité du traitement, 97,4% ont montré une bonne évolution. Malheureusement, cinq décès ont été enregistrés. Deux enfants ont succombé à la maladie du fait probablement de leur hospitalisation tardive (un mois pour l'un et trois mois pour l'autre), et un troisième suite à une détresse respiratoire. Pour celui-ci, le délai hospitalisation était réduit, le diagnostic précoce et le traitement instauré suffisamment tôt. Quant aux deux autres enfants, cas inclus dans l'étude rétrospective, le délai de diagnostic n'était pas connu.

La répartition des espèces du genre *Leishmania* varie en fonction des foyers. *L. infantum* est retrouvé dans 90% des cas en Algérie, au Maroc et en Tunisie (Agoumi *et al.*, 1991; Besbes *et al.*, 1994).

Selon Hé *et al.*, (2009), la PCR permet de confirmer l'espèce et de retrouver le lieu de contamination notamment en cas de séjours multiples en zone d'endémie. Dans une étude faite en Iran, les espèces *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* ont été détectées par PCR-RFLP dans de la moelle osseuse colorée au MGG (Kazemi-Rad *et al.*, 2008).

L'espèce de *Leishmania* responsable de la maladie chez les patients de notre série a pu être identifiée par PCR-séquençage. L'utilisation du segment 400 pb (qui couvre la séquence ITS2 de l'ADN ribosomique du parasite), comme outil d'analyse, n'a pas permis de différencier les espèces, *L. infantum*, *L. chagasi* et *L. donovani*. Celles-ci sont incriminées dans l'apparition de la leishmaniose viscérale, qu'elle soit anthroponotique ou zoonotique. Ce résultat est probablement dû au fait que ces espèces appartiennent au même complexe, *L. donovani*.

De même, la distinction entre *L. infantum* de *L. chagasi* n'a pas été possible en utilisant le segment 500 pb qui couvre la séquence ITS1 de l'ADN ribosomique parasite. Ces deux

espèces sont considérées comme espèces synonymes par plusieurs auteurs (Mauricio *et al.*, 2000 ; Kuhls *et al.*, 2005). Pour certains, *L. infantum* a été introduit en Amérique à partir de l'Europe au cours de la colonisation espagnole (Killick-Kendrick 1985, Rioux *et al.*, 1990).

Par contre, le gène cytochrome b a séparé ces deux espèces et identifié l'espèce responsable de la maladie à partir d'un seul cas. Il s'agit de *L. infantum* avec une similitude de 74%, pourcentage dû peut-être au choix des amorces. Ce résultat est conforté par ceux d'auteurs qui stipulent que *L. chagasi* aurait été présent avant la colonisation européenne (Lainson et Rangel, 2005).

Ainsi, la discussion sur l'origine de l'agent causal de la LV dans les Amériques et le bassin méditerranéen reste ouverte.

Le vecteur représente un maillon important dans la chaîne de transmission de la maladie. Son identification joue un rôle clé dans les études épidémiologiques.

Les espèces de phlébotomes identifiées à partir de nos captures de (*P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. longicuspis* et *Sergentomyia minuta*) ont été recensées par Boulkenafet (2006) dans la région de Skikda, Bounamous (2010) dans l'Est algérien et enfin par Frahtia-Benotmane (2015) dans la région de Constantine.

P. perniciosus est considéré depuis longtemps comme vecteur de *Leishmania infantum* dans le bassin méditerranéen. En Algérie, son implication dans la transmission de la LV a été suspectée par Sinton en 1925, démontrée par Parrot à Alger, puis confirmée en Kabylie en 1990 par la découverte d'un spécimen parasité par *L. infantum* MON-1 (Izri *et al.*, 1990). C'est l'espèce la plus répandue dans le Nord du pays (Littoral et Hauts plateaux) avec une répartition géographique qui est essentiellement Atlas tellienne (Sergent, 1914). Elle est particulièrement constante en grande Kabylie et dans le constantinois, régions endémiques de la leishmaniose viscérale (Louzir et Dellagi, 1999). En dehors de ces régions, sa distribution s'étend au sud (Aurès, Steppe pré-saharienne), région caractérisée par un climat aride voire saharien (Dedet *et al.*, 1984). Elle est signalée pour la première fois dans la région du M'Zab par Boukraa *et al.* (2011). Il s'agit d'une espèce zoo-anthropophile qui semble bien adaptée à l'environnement humain (Mouloua *et al.*, 2017).

Selon Bounamous (2010), elle prédomine dans l'étage bioclimatique humide et dans l'étage semi-aride de l'Est algérien où il l'a enregistrée avec des fréquences respectives de 38% et de 46,33%. Nos résultats indiquent sa prédominance avec une abondance relative de 55,1% durant la période d'étude.

P. papatasi est considéré comme premier vecteur de *L. major* (Killick-Kendrick, 1990), responsable des graves lésions de leishmaniose cutanée dans les régions steppiques et

sahariennes algériennes (Izri *et al.*, 1992). Il a constitué 30,5% des individus capturés; cette fréquence peut s'expliquer par les préférences anthropophile et domestique de l'insecte (Depaquit *et al.*, 2001 ; Hanafi *et al.*, 2007).

P.longicuspis, représentant seulement 3,5% de nos captures, est la deuxième espèce incriminée en Algérie dans la transmission de la LV. L'amplification de l'ADN de *L. infantum* à partir de 1/169 (0,6%) femelle, réalisée lors des travaux de Berdjane-Brouk *et al.* (2012), confirme ce rôle vecteur, déjà évoqué par Parrot *et al.* (1941).

Quant à *P.perfiliewi*, autre espèce impliquée dans la transmission de *L. infantum* en Algérie (Depaquit *et al.*, 2013), n'était représenté, lors de notre inventaire que par un spécimen mâle (0,1%). Dans l'étude de Mouloua *et al.* (2017), ce phlébotome était majoritairement capturé par les pièges lumineux dans la dépression de Dra El Mizan soit 67,5% contre 22,2% pour *P. perniciosus*. Cette différence serait due au fait que *P. perfiliewi* est une espèce très endophile, plus facilement capturée à l'intérieur des bâtiments d'élevage au moyen de pièges lumineux. Moulahem (1998) montre que 75,5% des phlébotomes capturés à l'intérieur d'un appartement à Constantine appartiennent à cette espèce contre seulement 23,3% pour *P. perniciosus*.

S. minuta se rencontre exclusivement sur la bordure Nord et Sud du bassin méditerranéen, du Maroc à Chypre et de la Méditerranée au Sahara (Bounamous, 2010), avec de fortes densités aux étages subhumide et humide (Croset, 1969; Boussaa *et al.*, 2007).

En Algérie, c'est l'espèce la plus abondante (Belazzoug *et al.*, 1982) du fait de sa présence sur l'ensemble du territoire du Nord au Sud, d'Est en Ouest, dans chaque étage bioclimatique et à toute altitude y compris au-dessus de 1200 m (Bounamous, 2010). Les fortes densités se situent dans les étages subhumide et humide (Harrat *et al.*, 1993).

Il s'agit d'une espèce herpétophile qui se rencontre aussi bien en milieu urbain qu'en pleine nature; la femelle cohabite avec le lézard des murailles qui constitue son hôte préférentiel (Dedet *et al.*, 1984). Elle a représenté 10.8% de l'ensemble des phlébotomes piégés à partir de papiers huilés placés dans les fissures de murs.

Concernant l'étude moléculaire, la recherche de l'ADN parasite chez les femelles s'est révélée négative en raison probablement du faible échantillonnage.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

La leishmaniose viscérale qui constitue un véritable problème de santé publique pour de nombreux pays en voie de développement, compte parmi les plus importantes maladies parasitaires qui touchent la population algérienne. Elle peut mettre en jeu le pronostic vital ; la diminution du délai de son diagnostic permet une meilleure gestion des cas suspects.

La recherche du parasite par examen direct de la moelle osseuse, qui reste un moyen de diagnostic de certitude de cette affection, est souvent décevante d'où la nécessité d'introduire une méthode alternative.

Notre étude, la première menée en Algérie et dont les résultats ont fait l'objet d'une publication, a évalué les performances du TDR par immunochromatographie rk39 dans un but diagnostique de la leishmaniose viscérale et montré que le sérum est un prélèvement de choix pour un diagnostic par PCR. Les résultats obtenus et comparés à ceux de la littérature montrent l'intérêt de l'application de ce test sérologique comme outil de diagnostic. Il est facile à exécuter, rapide, peu coûteux et donne des résultats reproductibles. Le coffret peut être conservé à température ambiante et utilisé même dans les conditions de terrain constituant ainsi un test de diagnostic de première ligne en zone rurale. Son protocole est simple et ne nécessite aucune formation préalable de l'opérateur.

Devant un tableau bioclinique évocateur, la positivité de la sérologie par immunochromatographie permet une très forte présomption. Quelques faux négatifs existent mais l'obtention du profil spécifique en IFI ou en immuno-empreinte (WB) permet de lever le doute.

La mise en évidence de l'ADN parasite dans les liquides corporels des patients contribuerait à l'amélioration de la méthode de diagnostic de la leishmaniose viscérale par examen direct. En raison de sa sensibilité et de sa simplicité, la PCR en temps réel réalisée à partir d'échantillons sériques est une méthode à privilégier pour un diagnostic précoce, de certitude et sans agressivité. Elle pourrait être utilisée dans les enquêtes épidémiologiques pour détecter les porteurs asymptomatiques.

La triade (fièvre-pâleur-splénomégalie) retrouvée dans plus de la moitié des cas, l'anémie, l'élévation de la VS ainsi que la positivité de la CRP constituent de bons éléments d'orientation du diagnostic. Malheureusement, ce diagnostic aspécifique est rendu difficile par la similitude des signes biocliniques avec ceux d'autres pathologies, tels que le syndrome d'activation macrophagique. Celui-ci, d'étiologies diverses, est considéré comme un facteur de mauvais pronostic. Son traitement dépend d'une démarche diagnostique et d'une prise en charge rapides de la pathologie en cause pour éviter d'éventuelles complications.

Lorsqu'il est associé à une manifestation clinique grave, il y a lieu d'évoquer, sur la base de données épidémiologiques, une leishmaniose viscérale et de procéder à la recherche des formes amastigotes de *Leishmania*.

Les lames de moelle osseuse colorées et conservées, qu'elles soient anciennes ou fraîchement préparées, peuvent être exploitées lors d'enquêtes épidémiologiques pour identifier l'espèce parasite.

Les résultats de cette étude montrent par ailleurs que la LV sévit dans l'Ouest algérien sous sa forme méditerranéenne infantile. La majorité des enfants atteints avaient moins de cinq ans et provenaient de zones défavorisées de cette région.

L'espèce responsable de cette maladie dans l'ouest du pays a été identifiée pour la première fois par PCR-séquençage. Il s'agit de *L. infantum* qui a présenté 74% de similitude avec *L. infantum* AB095958 référencée dans le GenBank.

Pour une meilleure surveillance épidémiologique de cette parasitose et une bonne prise en charge des malades, une collaboration doit être envisagée entre pouvoirs publics, cliniciens, épidémiologistes et biologistes. Il serait par conséquent intéressant dans un travail futur :

- de poursuivre l'étude d'évaluation des performances de l'immunochromatographie en testant un grand nombre d'échantillons sériques ;
- d'élargir l'étude épidémiologique aux autres wilayas de cette région et de collecter le maximum de lames de moelle osseuse, dans le but de chercher un éventuel polymorphisme nucléotidique ;
- de séquencer le génome complet du parasite à partir de l'ADN des cas à examens conventionnels positifs et à PCR négative, afin de l'identifier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abonnenc E. (1972). Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). Mémoire de l'O.R.S.T.O.M. 55 : 1-289.

Achour N., Bouhamed R. Harrat Z. (2017). Profile of Patients' Visceral Leishmaniasis-HIV co-infection in Kabylia. *J. AIDS. Clin. Res.* **8**(1): 649.

Addadi K., Dedet J.P. (1976). Epidémiologie des leishmanioses en Algérie. 6- Recensement des cas de leishmanioses viscérales infantiles entre 1965 et 1974. *Bull. Soc. Path.Exot.* **69**: 68-75.

Adler S, Ber M. (1941). Transmission of *L. tropica* by the bite of *P. papatasi*. *Ind. J Med. Res.* **29**:803-9. In **Steverding D. (2017).** The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*, **10**: 82.

Aga, E., Katschinski D.M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Müller K., Solbach W., Laskay T.(2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* **169**(2): 898-905. In **Laffitte M.C. (2016).** Caractérisation des mécanismes de réarrangements géniques chez le parasite *Leishmania* résistant aux drogues. Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, p181. Université LAVAL, Québec, Canada.

Agoumi A., Rouichi A., Lahrech M.T. (1991). Mise au point sur le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale humaine au Maroc 1957-1989. *Maroc Med.* **XIII** (1):5-10.

Aissi W., Ben Hellel K., Habboul Z., Ben Sghaier I., Harrat Z., Bouratbine A., Aoun K.(2015). Profils épidémiologique, clinique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile à l'hôpital de Kairouan (Tunisie): à propos de 240 cas. *Bull. Soc. Path. Exo.* **108**(4):265-271.

Akhoundi M., Kuhls K., Cannet A., Votypka J., Marty P., Delaunay P., Sereno D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS. Negl. Trop Dis.* **10**(6): e0004770.

Alam A., Bouadjdja S., Cherrouf A, Soufi A. (1999). Données épidémiologiques sur l'infection VIH en Algérie. *Arch Inst Pasteur Algérie* 63: 37-50. In **Achour N., Bouhamed R. Harrat Z. (2017).** Profile of Patients' Visceral Leishmaniasis-HIV co-infection in Kabylia. *J. AIDS. Clin. Res.* **8**(1): 649.

Albrecht H., Sobotika1., Emmenger C. Jablonowski H. , Just G. , Stoehr A. , Kubin T., Salzberger B., Lutz T., van Lunzen J. (1996). Visceral leishmaniasis emerging as an important opportunistic infection in HIV-infected persons living in areas nonendemic for *Leishmania donovani*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **120** (2): 189-198.

Alvar J., Canavate C., Gutierrez-Solar B. Jiménez M., Laguna F., López-Vélez R., Molina R., Moreno J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin.Microbiol. Rev.* **10**(2): 298-319.

Alvar J., Vélez ID., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS.one.* **7** (5): e35671.

A.N.A.T. (Agence Nationale de l'Aménagement du Territoire) (2004). Carte bioclimatique de l'Algérie. In Nedjraoui D. et Bédrani S. (2008). La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte. *VertigO - la revue électronique en sciences*

de l'environnement, **8** (1): URL : <http://journals.openedition.org/vertigo/5375> ; DOI : 10.4000/vertigo.5375

Andrade B.B., Oliviera C.I., Brodskyn C.I., Barral A., Barral-Netto M. (2007). Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand. J. Immunol.***66**: 122-127.

Aoun K., Bouratbine A., Harrat Z., Belkaid M., Bel Hadjali S. (2001). Profil particulier des zymodèmes de *Leishmania infantum* causant la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **94**(5):375-377.

Aoun K., Chouihi E., Amri F., Ben Alaya N., Raies A., Mary C., Bourabtime A. (2009). Short Report: Contribution of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction to Follow-Up of Visceral Leishmaniasis Patients Treated with Meglumine Antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.***81**(6): 1004-1006.

Aoun K., Laamrani El Idrissi A., Harrat Z., Marty P. (2015). Réunion « Leishmaniose viscérale au Maghreb », 2-4 avril 2015 à Tunis. Recommandations. *Bull. Soc. Pathol. Exot.***108**:229-230.

Bach J.F. (1986). Immunologie. 3^{ème} Edition. Flammarion. *Méd Sci.* Paris. p190.

Bachi F. (2001). Amélioration des moyens de diagnostic des leishmanioses en Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.

Bachi F. (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'Infectiologue*, **21**(1): 9-15.

Bañuls A.L., Hide M., Prugnolle F.(2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.***64**:1-109.

Bates P.A. (1994). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.***79**(2): 215-8.

Bates P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* **37**(10): 1097-106.

Belazzoug S., Mahzoul D., Addadi K., Dedet J.P. (1982). *Sergentomyia minuta* parroti (Adler et Theodor, 1927) en Algérie (Diptera: Psychodidae). *Ann Par Hum Com.* **57**(6) : 621-630.

Belazzoug S. (1983). Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie) infestation naturelle de "*Psammomys obesus*" (rongeur, gerbillide). *Bull. Soc. Pathol. Exot.***76**: 146-149.

Belazzoug S. (1984). La leishmaniose en Algérie à travers l'identification isoenzymatique des souches. *Coll. Inter. Tax. Phy. des Leishmania.* Montpellier, 397-400.

Belazzoug S. (1985). Épidémiologie des leishmanioses en Algérie: étude des réservoirs. Analyse chimiotaxonomique des parasites. Thèse Doctorat Sciences Médicales. Université d'Alger. p163.

Belazzoug S., Addadi K., Mokrani T., Hafirassou N., Hamrioui B., Belkaid M. (1985). La leishmaniose viscérale en Algérie: étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **65**: 329-35.

Belazzoug S. (1986). Découverte d'un *Merinos shawi* (rongeur, Gerbillide) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **79** : 630-633.

Belazzoug S., Bendali-Braham S., Lakhal Z., Abdennebi H. (1986). Hémagglutination indirecte dans le sérodiagnostic de la leishmaniose viscérale, comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. *Arch. Inst. Past. Alger*, **55**:107-12.

Belazzoug S. (1987). La leishmaniose canine en Algérie. *Magh. Veter.* **13**: 11-3.

Belazzoug S. (1991). The sandflies of Algeria. *Parassitologia*. **33**: 85–87.

Belkaid M., Harrat Z., Hamrioui B., Thellier M., Datry A., Danis M. (1996). A propos d'un milieu simple pour l'isolement et la culture des leishmanies. *Bull. Soc. Path. Exo.* **89** : 276-277.

Belkaid M., Harrat Z. (1997). La leishmaniose en Algérie. Mise au point. *Rev. Med. Phar.* 43-6.

Benbella I., Aich F., Elkhayat M., Khalki H., Khermach A., Bergui I., Tlemçani I., Hassani A.M. (2016). La leishmaniose viscérale chez l'adulte à propos de douze cas. *Pan. Afr. Med. J.* **23** :194.

Berdjane-Brouk Z., Charrel RN., Bitam I. , Hamrioui, B., Izri, A. (2011). Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 and *Phlebotomus (Larroussius) chadlii* Rioux, Juminer & Gibily, 1966 female in Algeria. *Parasite*. **18**(4), 337.

Berdjane-Brouk Z., Charrel R., Hamrioui B., Izri A. (2012). First detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Par. Res.* **111** (1): 419-422.

Berman J. (2003). Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**(5) : 397-401.

Bern C., Jha SN., Joshi AB., Thakur GD., Bista MB. (2000). Use of recombinant rk39 dipstick test and direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**(3-4): 153-7.

Besbes A., Pousse H. Ben Said, Kharrat, H., Ghenimi, L. (1994). Leishmanioses viscérales infantiles du centre tunisien (221 cas). *Med. Mal. Infect.* **24** : 628-34.

Bethe N., Wolday O., Hailu A. Abraham Y., Ali A., Gebre-Michael T., Desjeux P., Sönnernborg A., Akuffo H., Britton S. (1999). HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS*. **13**(14): 1921-5.

Bhargava P., Singh R. (2012). Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* Article ID 626838, 13p. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/626838>

- Bodman-Smith K.B., Mbuchu M., Culley F.J., Bates P.A., Raynes J.G. (2002).** Creactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. *Parasite Immunology*.**24** (9-10): 447-54.
- Boelaert M., El Safi S., Jacquet D. de Muynck A., van der Stuyft P., Le Ray D. (1999).**Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis.*Am. J.Trop. Med. Hyg.***60**(1) : 129-34.
- Boelaert M., Bhattacharya S., Chappuis F., El Safi SH., Hailu A., Mondal D., Rijal S., Sundar S., Wasunna M., Peeling RW. (2007).** Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: S30-S39.
- Bogdan C., Nathan C. (1993).**Macrophage function by transforming growth factor β , interleukin 4 and interleukin 10. *Ann. NY. Acad. Sci.* **685** (1): 713-739.
- Bogdan C., Rollinghoff M. (1998).** The immune reponse to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int Journ Parasit.* **28**: 121-134.
- Boubidi S.C., Benallal K., Boudrissa A. Bouiba L. (2011).** *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaia, south Algeria. *Microbes Infect.* **13** (7): 691–696.
- Boukraa S., Boubidi SC., Zimmer JY., Francis F., Haubruge E., Ali benali-Lounaci Z., Doumandji S. (2011).** Surveillance des populations de phlébotomes (Diptera: Psychodidae), vecteurs des agents responsables des leishmanioses dans la région du M'Zab-Ghardaïa (Algérie). *Entomol. faun.***63** (3) :97-101.
- Boulkenafet F. (2006).** Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Mémoire de magister, p191. Université Mentouri de Constantine, Algérie.
- Bounamous A., Boudabous R., Jouet D., Augot D., Ferté H., Babba H., S. Berchi S., Depaquit J. (2008).** Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines de Paraphlebotomus: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 (Diptera: Psychodidae). *Parasite*.**15**(4), 565-571.
- Bounamous A. (2010).** Biosystematique et caracterisation par la biologie moleculaire des phlebotomes de l'est algerien. Thèse de Doctorat en Sciences, p302. Université Mentouri de Constantine, Algérie.
- Bouraoui F., Harbi A., Essoussi A.S., Ben Said M., Khelif A. (1994).** Dysérythroïtose et aspects cytologiques médullaires au cours de la leishmaniose viscérale. *Rev. Mag. Pediatr.***4**: 230-2.
- Boussaa S., Pesson B., Boumezzough A. (2007).** Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **101**(8) :715-24.
- Boussaa S. (2008)** Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. Th. Doc. Univ. Louis Pasteur Strasbourg I. Fr.181p.
- Brandonisio O., Fumarola L., Maggi P. Cavaliere R., Spinelli R., Pastore G.(2002).**Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis.*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.***21**(6): 461-4.

- Brasileiro B.T.R.V., Maria Raquel Moura Coimbra M.R.M., Morais M.A., de Oliveira N.T. (2004).** Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on pcr markers. *Braz. J. Microbiol.* **35**(3).
- Brittingham A., Morrison C.J., MC Master W.R. McGwire B.S., Chang K.P., Mosser DM.(1995).** Role of the *Lcishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis, *J. Immunol.* **155**(6):3102-11.
- Brunhes J., Hassain K., Rhaim A., Hervy J-P. (2000).** Les Culicidés de l'Afrique méditerranéenne: Espèces présentes et répartition: (Diptera:Nematocera). *Bull. Ent.* **105** (2) : 195-204.
- Burchmore R.J., Hart D.T. (1995).** Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74** :77-86.
- Burchmore R. J., Landfear S. M. (1998).** Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* **273**, 29118-29126.
- Bussiéras J., Chermette R. (1992).** Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie. *Eco. Nat. Vét. Alfort*. Service de Parasitologie, 186p.
- Carbonnelle E., Nassif X. (2012).** Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ? *Réanimation*. **21**(3):351-361.
- Carré N., Collot M., Guillard P., Horellou M., Gangneux J.P. (2010).** La leishmaniose viscérale, Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *J Pharm. Clin.* **29** (3): 121-48.
- Carrera L., Gazzinelli R.T., Badolato R. Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks DL. (1996).** *Leishmnnia* promastigotes inhibit interleukin 12 induction in bone marrow- derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* **183**(2): 515-526.
- Cassier P., Brugeroll G., Combes C. Grain J., Raibaut A. (1998).** Le parasitisme. Edition masson.120-123.
- Chadli.S., Brakerz.Z., Belhachmi. A. Izaabel H.(2007).** Gradient de distribution des allèles du système ABO au Maroc : Polymorphisme du système ABO dans la population du Souss. *Antropo.* **15** : 49 -53.
- Chagas C.(1927).** Quelques aspects évolutifs du *Trypanosoma cruzi* dans l'insecte transmetteur. *C.r. Soc. Biol.* **97** : 829-832. In **Chouicha N. (1996).** Le compexe *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Analyses cladistique et de génétique des populations au moyen des caractères isoenzymatiques. Etude du caryotype moléculaire. Thèse de doctorat en Parasitologie, université Montpellier, faculté de médecine, France.
- Chappuis F., Rijal S., Singh R., Acharya P., Karki B.M., Das M.L., Bovier P.A., Desjeux P., Le Ray D., Koirala S., Loutan L.(2003).** Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop. Med. Int. Health.* **8** (3): 277-85.
- Chappuis F. (2007).** Leishmaniose: diagnostic et traitement. 22ème Séminaire en Sciences Pharmaceutiques, Zermatt, Genève.

- Chastel, C. (2009).** Lessons from the Greek dengue epidemic of 1927-1928. *Bull. Acad. Natl. Med.* **193** (2): 485-93.
- China B., Ghafir Y., Daube G.(2002).** Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **147**: 99-109.
- Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013).** Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(3):547–603.
- Costa Durão J.F., Rebelo E., Peleteiro M.C. Correia J.J., Simões G. (1994).** Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminary. *Revista Portuguesa Ciências Veterinária*. **89**(511):140-144.
- Cox F. E. (2002).** History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews*. **15**(4), 595-612.
- Croan D.G., Morrison D.A., Ellis J.T. (1997).** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular Biochem. Parasitol.* **89** (2): 149-159.
- Croset H. (1969).** Ecologie et systématique des Phlebotomini (Diptera : Psychodidae) dans deux foyers français et tunisiens de leishmaniose viscérale. Essai d'interprétation épidémiologique. Thèse Sciences Montpellier, 516 p. In **Frahtia-Benotmane K. (2015).** Détection moléculaire des leishmanies à partir du genre phlebotomus (diptera : psychodidae) : tendance vers la régression de la leishmaniose à Constantine ? Thèse de Doctorat en Sciences, p120. Université des Frères Mentouri de Constantine, Algérie.
- Cserti C.M. et Dzik W.H. (2007).** The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*. **110**(7):2250-8.
- Culley F.J., Harris R.A., Kaye P.M. McAdam K.P., Raynes J.G. (1996).** C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *Journal of Immunology*. **156** (12) : 4691-4696.
- Cunningham A.C. (2002).** Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.* **72**(2):132-41.
- Dana. M. (1972).** La Leishmaniose viscérale méditerranéenne et son diagnostic immunologique. *Nou. Pres. Med.* **1** (20): 1363.
- Da Silva M.R., Stewart J. M., Costa C.H. (2005).** Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **72** (6): 811-4. In **Zougaghi L., Moutaj R., Chabaa L., Agoumi A.(2009).** Leishmaniose viscérale infantile: profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. *Arch. Pédiat.* **16**(11):1513-1518.
- De Assis T.S., Caligiorne R.B., Romero G.A. Rabello A.(2009).** Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**(12):1269-72.
- De Assis T.S., Braga A.S., Pedras M.J., Oliveira E., Barral A., de Siqueira I.C., Costa C.H., Costa D.L., Holanda T.A., Soares V.Y., Biá M., Caldas Ade J., Romero G.A., Rabello A. (2011).** Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct

agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **105**(2) :81-85.

Deba T. (2017). Etude du génotype du système ABO dans la population de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat des sciences médicales. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algérie.

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

Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. (1984). Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah.O.R.S.T.O.M..Sér.Ent. Med. Parasitol.* **XXII** (2) : 99-127.

Dedet, J. P. (1999). Les leishmanioses. Ed. Ellipses Paris, 253p.

Dedet J.P. (2001a). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *EMC Maladies infectieuses*, Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS. Paris. <http://www.em-consulte.com/article/11876/leishmanies-leishmanioses-biologie-clinique-et-the>

Dedet J.P. (2001b). Répartition géographique des leishmanioses (Geographical distribution of leishmaniasis). *Méd. Mal. Infect.* **31** (2) : 178-183.

Dedet J.P. (2009). Leishmanies, leishmanioses : Biologie, clinique et thérapeutique. *EMC-Maladies infectieuses*, Elsevier SAS. <http://www.em-consulte.com/article/201174/Leishmanies-leishmanioses-biologie-clinique-et-the>

Delarue M., Furelaud G. (2004). Le séquençage d'un ADN. (Consulté le 05/08/2018 : <https://planet-vie.ens.fr/article/1485/sequencage-adn>).

Del Giudice P., Marty P., Lacour J.P. Perrin C., Pratlong F., Haas H., Dellamonica P., Le Fichoux Y. (1998). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*, case report and review. *Arch. Dermatol.* **134**(2) : 193-198.

Depaquit J., Léger N., Ferté H., Rioux J.A., Gantier J.C., Michaelides A., Economides P. (2001). Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae) de l'île de Chypre. III- Inventaire faunistique. *Parasite* **8** (1): 11-20.

Depaquit J., Bounamous A., Akhoundi M., Augot D., Sauvage F., Dvorak V., Chaibullinova A., Pesson B., Volf P., Léger N. (2013). A taxonomic study of *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* s. l. *Infect. Genet. Evol.* **20** : 500-508.

Dereure J., Lanotte G., Pratlong F., Gouvernet J., Majhour J., Belazzoug S., Khiami A., Rageh H., Jarry D., Periere J., Rioux J.A. (1998). Leishmaniose canine à *Leishmania infantum*: Intérêt et réalisation du test au latex. Application en écoépidémiologie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **91**(4) : 300-305.

Dereure J. (1999). Réservoirs de leishmanies. In: **Dedet J.P. (1999).** Les leishmanioses. Edition Ellipses, 109-127. Paris.

Desjeux, P. (1996) Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol.* **14** (5): 417-423.

Desjeux P. (1999). Global contrai and *Leishmania* HIV co-infection. *Clin. Dermatol.* **17**: 317-325.

- Desjeux P., Piot B., O'Neill K. Meert J.P. (2001).** Co-infection à Leishmania/VIH dans le sud de l'Europe. *Méd Trop.***61**: 187-193.
- Desjeux P. (2004).** Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.***27**(5): 305-18.
- Desjeux P., Dedet J.P. (2005).** Actualités sur le traitement de la leishmaniose viscérale. *Trop Med.* 16th International Congress.
- Dolmatova A.V et Demina N. A. (1965).** Les Phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. Éditions « Médecine » Moscou, 21 p.
- Dolmatova A.V., Demina N.A. (1971).** Les phlebotomes (*Phlebotorninae*) et les maladies qu'ils transmettent. Office de la recherche scientifique et technique outre-mer. *Initiations-Documentations Techniques.***18** :169 p.
- Dotis J., Ritsas I., Tsantali C., Tsiouris J., Haralabidis S., Roilides E. (2003).** Immune haemolytic anaemia due to visceral leishmaniasis in a young child. *Eur. J. Pediatr.* **162**(1):49-50.
- Dumonteil E., McMahon-Pratt D., Price V.L. (2001).** Report of the Fourth TDR/IDRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis. *Rev. Biomed.***13** (1): 53-58.
- El-Hossary, S. (2006).** Morphological characteristics for sand fly taxonomy. Research and Training Center on Vectors of Diseases, Ain Shams University, Egypt. In **Armed Forces Pest Management Board Technical Guide No. 49. (2015).** Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): Significance, Surveillance, and Control in Contingency Operations.
- Estevez Y. (2009).** Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité. Thèse Doctorat. Université Toulouse III. France.
- Euzeby J. (1984).** Les parasitoses humaines d'origine animale, caractères épidémiologiques. *Edition Flammarion-Médecine-Science.* Paris.
- Euzeby J. (1994).** Histoire naturelle des leishmanioses. *Rev. Méd. Vét.* **145** (2) : 97-105.
- Euzeby J. (2008).** Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. *Editions Médicales Internationales – Lavoisier éditeurs,* Paris.832p
- Fairbairn H., Culwick. A.T. (1949).** The differentiation of the polymorphic trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.***43** (1) : 90-95. In **Chouicha N. (1996).** Le complexe *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Analyses cladistique et de génétique des populations au moyen des caractères isoenzymatiques. Etude du caryotype moléculaire. Thèse de doctorat en Parasitologie, université Montpellier, faculté de médecine, France.
- Faucher B., Piarroux R. (2011).** Actualités sur les leishmanioses viscérales. *Rev. Méd. Int.***32** (9): 544–551.
- Faucher B. (2013).** Epidémiologie des protozooses autochtones en PACA : de l'optimisation du diagnostic à l'éco-épidémiologie. P85. Thèse de doctorat, Marseille, France.
- Feliciangeli M.D. (2004).** Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Vet. Entomol.***18** (1): 71-80.

- Ferrandiz G. (2013).** <http://www.hoycomentamos.com/wp-content/uploads/Mapa-de-la-Leishmaniasis-OMS.gif> (Consulté le 16/07/2018).
- Figuigui S., Bougrine N., Taghouti A., Bergui I., Benbella I., Tlamçani I., Lakhdar Idrissi M., Hida M., Mohammed E., Hassani M.A. (2017).** Visceral Leishmaniasis in Infants (<24 Month Old): A Series of 17 Cases. *Saudi J. Med. Pharm. Sci.* **3**(4) : 257-260.
- Fissore C., Delaunay P., Ferrua B. Eric Rosenthal E., Del Giudice P., Jean-Pierre Aufeuvre J.P., Le Fichoux Y., Marty P.(2004).** Convenience of Serum for Visceral Leishmaniasis Diagnosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**(11): 5332–5333.
- Foley H. et Leduc H. (1912).** Phlébotomes dans le sud-oranais. Accidents simplement locaux dûs à leurs piqûres. *Bull. Soc. Pnth. exot.* **5**: 511-513. In: **Dedet JP, Addadi K et Belazzoug S. (1984).** Les phlébotomes (Diptera, PS ychodidae) d'Algérie. Cah. O.R.S.T.O.M.; sér. Ent..*méd. Paradol.* **XXII** (2): 99-127.
- Frahtia-Benotmane K. (2015).** Detection moléculaire des leishmanies à partir du genre phlebotomus (diptera: psychodidae): tendance vers la regression de la leishmaniose à constantine? Thèse de Doctorat en Sciences, 120p. Université des Frères Mentouri de Constantine, Algérie.
- Gangneux J.P., Belaz S., Robert-Gangneux F. (2015).** Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Journal des Anti-infectieux.* **17** (1): 25-28.
- Ghrab J., Rhim A., Bach-Hamba D., Chahed M.K. Aoun K., Nour S.(2006).** Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite*, **13**:23-33. In **Aoun K., Jeddi F., Amri F., Ghrab J., Bouratbine A.(2009).** Actualités épidémiologiques de la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Med Mal Inf.* **39** (10): 775-779.
- Gossage S.M., Rogers M.E. et Bates P.A. (2003).** Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* **33**(10): 1027-34.
- Gott J.M. (2003).** Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(19): 10583-4.
- Gould, E. A., Higgs, S. (2009).** Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103** (2):109-21.
- Gramiccia M., Gradoni L., Troiani M. (1992).** HIV: *Leishmania* coinfection in Italy: isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**(2): 161-163.
- Grassé M.P.P. (1961).** La reproduction par induction du blépharoplaste et du flagelle de *Trypanosoma equiperdum* (Flagellé, Protomonadine). *Cr Acad Sci. Paris.* **252** :1-6.
- Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S. Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P., Wasunna M.K., Bryceson A.D. (2002).** Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Inf. Dis.* **2** (8): 494-501.
- Gupta S, Nishi. (2011).** Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J. Med. Res.* **133**(1): 27-39.

- Hanafi H., Fryauff D. J., Govind B.M., Ibrahim M.O., Main. A.J. (2007).** Bionomics of phlebotomine sandflies at a peacekeeping duty site in the North of Sinai, Egypt. *Acta. Tropica*. **101** (2): 106-114.
- Harrat Z., Addadi K., Tabet Derraz O. (1992).** La leishmaniose viscérale en Algérie : recensement des cas de leishmaniose. Période de 1985 à 1990. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **85**: 296-301.
- Harrat Z., Izerouel S., Belkaid M. Tabet-Derraz O. (1993).** Fluctuations saisonnières des Phlébotomes de la région d'Alger et sa banlieue. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, **59** : 245-255.
- Harrat Z., Hamrioui B., Belkaïd M. Tabet-Derraz O. (1995).** Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **88**: 180-184.
- Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M., Dedet J.P. (1996).** *Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90** (6): 625-629.
- Harrat Z., Boudrissa. A., Belkaid. M. (2006).** Evaluation d'une campagne de lutte antivectorielle dans une zone pilote: le foyer de M'sila. IPA. **Ecole de formation paramédicale de Tiaret. 18-23 Mars**
- Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F. Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C., Belkaid M. (2009).** Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103** (7): 716-720.
- Hassani M.A., Lahlou H., Alami M., Filali Baba A., El Youssfi G., Ismaili L., Chaouki S., Atmani S., Hida M. (2011).** Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile. A propos de 31 cas diagnostiqués sur 10 mois au laboratoire d'hématologie du CHU Hassan II de Fès (Maroc). *Rev. Franc. Lab.* **41** (429):55-59.
- Hé S., Roux X., Morand C., Soullié B., Koeck J-L. (2009).** Leishmaniose viscérale et PCR de la confirmation diagnostique à l'origine du lieu de contamination. *La Revue de médecine interne*, **30** (S4): 433. In **Tassou F. E. (2016).** Evaluation du test de diagnostic rapide rk39 dans la leishmaniose viscérale infantile. Mémoire de fin de spécialité. Université Sidi Mohamed Ben Abdallah Faculté de médecine et de Pharmacie de Fès, Maroc.
- Henry B. (1993).** Les leishmanioses au Nicaragua: Etude épidémiologique du foyer endémique de leishmaniose cutanée du Guayabo. Thèse Doctorat Médecine. Université de Limoges, 131p.
- Henter J.I., Horne A., Aricó M., Egeler R.M., Filipovich A.H., Imashuku S., Ladisch S., McClain K., Webb D., Winiarski J., Janka G. (2007).** HLH-2004. Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr. Blood Cancer*. **48**(2):124-31.
- Hide M. (2004).** Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania (Leishmania) donovani*, agent de la leishmaniose viscérale. Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique. Thèse Doctorat. Université de Montpellier II, France, 269p.
- IPA. (2008).** Les leishmanioses. Fiches sur les maladies infectieuses. <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000j-0hb/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/leishmanioses>.

- Izri M.A., Belazzoug S., Boudjebla Y. J., Dereure J, PratlongS, Delalbre-BelmonteA., RiouxJ.-Y. (1990).** *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie (Algérie). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65** (3): 151-152.
- Izri M.A., Belazzoug S., Pratlong F., Rioux J.A.(1992).** Isolement de *Leishmania major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie). Fin d'une épopée éco-épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum.Comp.* **67**(1) : 31-32.
- Izri A., Depaquit J., Parola P. (2006).** Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Med. Trop.* **66** (5): 429-35.
- Izri A., Belazzoug S. (2007).** Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. *Rev. Fr. Lab.* **396**:3-10.
- Janvier F., Morillon M., Olliaro P. (2008).** Leishmaniose viscérale: Efficacité clinique et résistances aux différentes molécules. *Med. Trop.* **68** : 89-101.
- Kabb A.L., Opegard L. M., McKenzie B. A. Connell G.J. (2001).** A mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplastid editing. *Nucleic Acids Res.* **29**(12) : 2575-80.
- Kamhawi S. (2000).** The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection.* **2**(14): 1765-1773.
- Kamhawi S. Ramalho-Ortigao M., Pham V.M., Kumar S., Lawyer P.G., Turco S.J., Barillas-Mury C., Sacks D.L., Valenzuela JG.(2004).** A role for insect galectins in parasite survival. *Cell.* **119**(3): 329-41.
- Kamhawi S.(2006).** Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* **22**(9): p. 439-45.
- Kazemi-Rad E., Mohebbali M., Hajjaran H., Rezaei S., et Mamishi S. (2008).** Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J. Publ. Health.* **37** (1):54-60.
- Killick-Kendrick R. (1985).** Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Path. Exot.* **78** (5 Pt 2): 747-755.
- Killick Kendrick R., (1990).** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis. *Review. Med. Vet. Entomol.* **4** (1):1-24.
- Knowles R, Napier L.E., Smith R.O. (1924).** On a Herpetomonas found in the gut of the sandfly *Phlebotomus argentipes* fed on kala-azar patients. *Ind. Med. Gaz.* **59** : 593-597.
- Théodoridès J. (1997).** Note historique sur la découverte de la transmission de la leishmaniose cutanée par les phlébotomes. *Histoire.* 1863: 2.
- Kuhls, K., I. L. Mauricio I.L., F. Pratlong F., Presber W., Schönián G. (2005).** Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* **7** (11-12):1224-34.
- Kumar R., Pai K., Pathak K., Sundar S. (2001).** Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8** (6):1220–1224.

- Lainson R., Rangel E. (2005).** *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **100** (8): 811-827. In **Dantas-Torres F. (2006).** *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. Rio de Janeiro.* **101**(1): 117-118.
- Lakhdar Idrissi M., El Ouardi M., Atmani S., Elarqam L., Bouharrou A., Hida M. (2007).** La leishmaniose viscérale infantile: à propos de 209 cas. *Science direct, Journal de pédiatrie et de puériculture.* **20**: 136–141.
- Lane R.P., Abdel-hafez S., Kamhawi S. (1988).** The distribution of phlebotomine sandflies in the principal ecological zones of Jordan. *Med. Vet. Entomol.* **2**(3): 237-246.
- Lane R.P., Crosskey R.W. (1993).** Medical Insects and Arachnids. *Editions Chapman et Hall.* 723p.
- Lanotte G., Rioux J. A. (1990).** Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C. r. Acad. Sci. Paris*, **310** (III): 285-288.
- Lasnet (1934).** Sur la répartition géographique des leishmanioses en Algérie (d'après les documents de l'Institut Pasteur d'Algérie). *Bull. Off. Int. Hyg. Pub.* **26**: 1382-1385.
- Laufs H., Müller K., Fleischer J. Reiling N., Jahnke N., Jensenius J.C., Solbach W., Laskay T. (2002).** Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.* **70**(2): 826-35. In **Laffitte M.C. (2016).** Caractérisation des mécanismes de réarrangements géniques chez le parasite *Leishmania* résistant aux drogues. Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, Université LAVAL, Québec, Canada. p181.
- Lawyer P. G., Perkins, P. V. (2004).** Leishmaniosis and trypanosomiasis. In: Medical Entomology, Revised Edition, by B. F. Eldridge and J. D. Edman (eds.), Kluwer Academic Publishers, Great Britain, 231-298 In **Beran B. (2010).** Epidemiology of leishmaniasis in southern Germany with emphasis on the family of psychodidae, Primarily phlebotominae. Of the title of Doctor in Veterinary Biology from the Faculty of Veterinary Medicine of the Ludwig-Maximilians-University Munich, 124p.
- Le Fichoux Y., Marty P., Kubar J. (1999).** Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet J.P. (1999). Ed. Les leishmanioses. Paris : Ellipses 191-203.
- Leger N., Depaquit J. (1999).** Les phlébotomes In: J-P. Dedet (ed.), les leishmanioses, Paris: Ellipses : 89-108.
- Leger N., Depaquit J., (2001).** Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Rev. Fr. labo.* **2001**(338) : 41-48.
- Lescuyer P. (2002).** Étude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe I mitochondrial humain. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier Discipline : Biologie. Grenoble I, p159.
- Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E. G., Derouxg., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F. G. (1980).** A Newly Revised Classification of the Protozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* **27**(1): 37-58.

Lewis D.J., Young D.G., Fairchild G.B., Minter D.M. (1977). Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst Ent.* **2** (4): 319-332.

Locksley R.M., Louis J.A. (1992). Immunology of leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*. **4**(4): 413-418.

Loua A., Lamah M.R., Haba N.Y., Camara M. (2007). Fréquence des groupes sanguins ABO et rhesus D dans la population guinéenne. *Transfusion Clinique et biologique*. **14**(5): 435-439.

Louzir H., Dellagi K. (1999). Les leishmanioses: un modèle d'étude des interactions hôte parasite; implication pour la maladie humaine. *Ann. Inst. Past.* **10** (1):67–80.

Luyo-Acero G.E., Uezato H., Oshiro M., Takei K., Kariya K., Katakura K. Gomez-Landires E., Hashiguchi Y., Nonaka S. (2004). Sequence variation of the Cytochrome *b* gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*. **128**(Pt5): 483-91.

Maltezou H.C., Siafas C., Mavrikou M., Spyridis P., Stavrinadis C., Karpathios Th., Kafetzis D.A (2000). Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin. Infect. Dis.* **31** (5): 1139-1143.

Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L. Charrel R.N., Gradoni L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health Concern. *Med. Vet. Entomol.* **27** (2):123-47.

Marty P. , Lelièvre A., Quaranta J. F., Suffia I., Eulalio M., Gari-Toussaint M., Le Fichoux Y., Joanna Kubar J.(1995). Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical leishmaniasis due to *Leishmania Infantum*. *Transactions of the Roy.Soc.. Trop. Med.Hyg.* **89** (6): 690-691.

Marty P., Delaunay P., Fissore C., Le Fichoux Y. (2007). La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum* mise au point - intérêts des tests de diagnostic rapide: it-leish®* et ID-PaGIA leishmaniasis®*. *Med. Trop.* **67**(1): 79-85.

Marty P. (2010). Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement. *La lettre de l'infectiologue*. **25** (3): 186-189.

Mary C., Farault F, Droguoul M.P. Xeridat B., Schleinitz N., Cuisenier B. Dumon H. (2006). Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75** (5): 858–863.

Mauricio I. L., Stothard J.R., Miles M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol.Today*. **16** (5):188-9.

Mayer G., Hudrisier D. (2012). Immunologie chapitre sept immunoglobulines: reactions antigene-anticorps et tests experimentaux pour la detection de ces réactions. <http://www.microbiologybook.org/mayer/rx-8.jpg>

Mazelet L. (2004). La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen Français. Thèse de Maîtrise de Biologie. Université Pierre et Marie-curie, Paris VI. France. 29p.

- Méresse S., Martínez-Lorenzo M.J., Gorvel J.P. (2000).** La vacuole des micro-organismes pathogènes: une niche de survie et de prolifération. *m/s.* **16** (12): 1447-51.
- Mihoubi I., Picot S., Hafirassou N., de Monbrison F. (2008).** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria, *Trans.Roy. Soc. Trop. Med.Hyg.***102** (11): 1157-1159.
- Mihoubi I., de Monbrison F., Frahtia K., Picot S., Gassem N. (2012).** Contribution de la PCR en temps réel au diagnostic de la leishmaniose viscérale infantile en Algérie. *Med. Sante Trop.* **22** : 61-64.
- Minodier P., Garnier J.M. (2000).** Childhood visceral leishmaniasis in Provence. *Arch. Pediatr.* **7** (3): 572-577.
- Mniouil M., Fellah H., Amarir F., Sadak A., Et-Touys A., Bakri Y., Moustachi A., Tassou F.Z., Hida M., Lyagoubi M., Adlaoui E.B., Rhajaoui M., Sebti F. (2018).** Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco.*Acta Trop.***182**:185-189
- Moulaheem T., Fendri A. H., Harrat Z. Benmezdad A., Aissaoui K., Ahraou S., Addadi K. (1998).**Contribution à l'étude des phlébotomes de Constantine: espèces capturées dans un appartement urbain. *Entomologie médicale*, Courte note n° 1952.
- Moulinier C. (2003).** Parasitologie et mycologie médicales – Eléments de morphologie et de biologie Lavoisier, Editions médicales internationales (EMinter), Paris.
- Mouloua A., Boubidi S.C., Bouiba L. G., Mezai., Madiou M., Harrat Z. (2017).** Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). *Revue Méd. Vét.***168** (10-12): 252-261.
- Moumni H. (2015).** Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen. Mémoire de fin des études pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université Abou Bekr Belkaïd, Faculte de médecine Dr. B. Benzerdjeb – Tlemcen. P67.
- Mouri O., Morizot G., Van der Auwera G., Ravel C., Passet M., Chartrel N., Joly I., Thellier M., Jauréguiberry S., Caumes E., Mazier D., Marinach-Patrice C., Buffet P. (2014).** Easy Identification of *Leishmania* Species by Mass Spectrometry.*PLOS Neg. Trop. Dis.***8** (6): 2841.
- Moziane F, Benalioua M, Trebycka K. Bouhass R., Belazzoug S., AguerCIF M. (1983).**Kala azar chez l'enfant dans l'Ouest algérien: à propos de 14 observations. *Med. Hyg.* **41**:3649-50.
- Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R. Saravia N.G. (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet.* **366**(9496): 1561-1577.
- Myler P.J., Sisk E., McDonagh P.D., Martínez-Calvillo S., Schnauffer S., Sunkin S.M., Yan S., Madhubala R., Ivens A., Stuart K. (2000).** Génomic organization and function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.* **28**(5) : 527-531.
- Nadau C. (2005).** Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le test d'intradermo-réaction de la leishmaniose canine. Thèse Doctorat Sciences Vétérinaires. Université Toulouse. France. p101.

- Naucke T.J., Menn B., Massberg D., Lorentz S. (2008).** Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol. Res.* **103** (Suppl1): S65-8.
- Nelson R.W., Guillermo-Couto C. (2003).** Small animal internal medicine. 23ème Edition Saint Louis, MOSBY. p1392.
- Nelson D. L., Cox N. N. (2005).** Principles of Biochemistry, 4th Ed., pp. 551–559.
- Niang A. (1992).** Etude bio-écologique de *Plebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 (Diptera-Psychodidae), vecteur de la leishmaniose cutanée humaine, au Sénégal. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle de biologie animale. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 148p.
- Niang A., Geoffroy B., Angel G., Trouillet J., Killick-Kendrick R., J.P. Hervy J.P., Brunhes J. (2000).** Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest. Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD édition.
- Nieto A., Domínguez-Bernal G., Orden J.A., De La Fuente R., Madrid-Elena N., Javier C. (2011).** Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet. Res.* **42** (1):39.
- Nozais J., Darty A., Danis M. (1996).** Traité de parasitologie médicale. Edition Pradel. France.
- OMS. (2006).** Lutte contre la leishmaniose : apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB118/B118_4-fr.pdf.
- OMS. (2007).** Lutte contre la leishmaniose. apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA60/A60_10-fr.pdf.
- OMS. (2017).** Action mondiale pour lutter contre les vecteurs 2017–2030. (Version 5.4) : www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-fre.pdf.
- Otranto D., Paradies P., Sasanelli M., Leone N., de Caprariis D., Chirico J., Spinelli R., Capelli G., Brandonisio O. (2005).** Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**(1):32-7.
- Ouellette M., Olivier M., Sato S., Papadopoulou B. (2003).** Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era. *Med. Sci.* **19**(10): 900-9.
- Pandey K., Mallik A.K., Pyakurel S., Pun S.B., Pandey B.D. (2013).** Comparative Study of Microscopy and Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Suspected Visceral Leishmaniasis Patients in Nepal. *Kathmandu University Medical Journal.* **11** (1) : 14-17.
- Parrot L., Donatien A., Lestoquard F. (1930).** Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *P. major* var *perniciosus*. Newstead. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **23**:724-6. In **Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. (1984).** Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. Cah. O.R.S.T.O.M..Sér. Ent. Med. Parasitol. **XXII** (2) : 99-127.
- Parrot L., Donatien A., Lestoquard F. (1931).** Observations nouvelles sur le développement du parasite de la leishmaniose viscérale du chien chez le phlébotome (*P. perniciosus*). *Arch Inst. Past. Alger.* **9**:438-41. In **Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. (1984).** Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Med. Parasitol. **XXII** (2) : 99-127.

- Parrot L., Donatien A., Plantureux E. (1941).** Sur l'infection naturelle des phlébotomes par la leishmaniose générale de l'homme et du chien en Algérie. *Arch Inst Pasteur Alger* **19**:209-218. In **Berdjane-Brouk Z., Charrel R., Hamrioui B., Izri A. (2012).** First detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus longicuspis* Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. *Parasitology Research*.**111** (1): 419-422.
- Passos V.M.A., Lasmar E.B., Gontijo C.M.F., Fernandes O., Degraive W. (1996).**Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais.Brazil Mem.Inst. Oswaldo Cruz.**91** (1):19-20.
- Peacock C.S., Collins A., Shaw M.A., Silveira F., Costa J., Coste C.H., Nascimento M.D., Siddiqui R., Shaw J.J., Blackwell J.M.(2001).**Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in north eastern Brazil.*Genet.Epidemiol.***20**(3):383-96.
- Peacock C.S., Seeger K., Harris D. et al. (2007).**Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease.*Nat. Genet.* **39**(7):839-47.
- Pearson R.D., Harcus J.L., Roberts D., Donowitz G.R. (1983).** Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J. Immunol.***131** (4): 1994-1999.
- Pearson R. D., Queiroz Souza A. (1995).**Clinical spectrum of leishmaniasis.*Clin.Infect. Dis.***22** (1):1–13
- Petrishcheva P. A. (1935).** The fauna, biology and ecology of the sandflies of Turkmenistan. In : Parasites, Carriers and Venomous animals, Moscou, Leningrad, 198-202 In **Croset H., Rioux J.A., Léger N. Houin R., Cadi-Soussi M., Benmansour N., Maistre M. (1977).** Les méthodes d'échantillonnages des populations de phlébotomes en région méditerranéenne. *Coll. Inter. CNRS.* **239.** Ecologie des leishmanioses, 139-151.
- Pintado V., Martin-Rabadan P., Rivera M.L. Moreno S., Bouza E. (2001).** Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine.* **80**(1):54–73. In **Faucher B., Piarroux R. (2011).**Actualités sur les leishmanioses viscérales. *Rev. Méd. Int.* **32** : 544–551.
- Plimmer H.G., Bradford J.R. (1899).**A preliminary note on the morphology and distribution of the organism found in the Tsetse Fly disease.*Proc. R. Soc. Lond.***65**: 274-281.doi: 10.1098/rspl.1899.0032
- Portus M., Gallego J., Rioux J.A. Pratlong F., Moreno G., Fisa R., Gallego M., Munoz C., Riera C., Sanchez C., Sera T.(1989).** Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in catalonia (Spain). *Rev. Iber. Parasitol.***49**: 278-289.
- Puentes S.M., Da Silva R.P., Sacks D.L. Hammer C.H., Joiner K.A. (1990).** Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J.Immunol.***145** (12): 4311-4316.
- Qian J., Cutler J.E., Cole R.B., Cai Y. (2008).** MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal.Bioanal. Chem.* (392) 439-449 In **Moussaoui W., Bouakaze C., Prevost G. (2009).** Applications de la spectrographie de masse maldi-tof à l'identification bacterienne. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.* **24**(1): 293-301.

- Rainey P. M., MacKenzie N. E. (1991).** A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**(2):307–315.
- Rajagopala S., Dutta U., Chandra K.S. Bhatia P, Varma N, Kochhar R.(2008).** Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic lymphohistiocytosis—case report and systematic review. *J. Infect.* **56** (5):381-8.
- Ralton J. E., Naderer T., Piraino H. L., Bashtannyk T.A., Judy M. Callaghan J.M., McConville M.J. (2003).** Evidence that intracellular β 1–2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* **278**:40757–40763.
- Ready P.D. (2013).** Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Ann. Review. Entomol.* **58**: 227–250. In **Kabbout N., Djemoui Merzoug D., Chenchouni H. (2016).** Ecological Status of Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) in Rural Communities of Northeastern Algeria. *J. Arthropod-Borne. Dis.* **10**(1): 24–38.
- Real F. (2013).** The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA. Res.* **20**(6):567–581.
- Rhalem A., Sahibi H., Lasri S., Jaffe C.L. (1999).** Analysis of immune responses in dog with canine visceral leishmaniasis before and after drug treatment. *Vet. Immunol.* **71**(1): 69-76.
- Rioux J.A., Coluzzi M., Bain O., Baubouy J.P. (1964).** Présence de *Phlebotomus ariasi*. Tonnoir, 1921 en Italie du Nord. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **57**: 966-971.
- Rioux, J.A., Lanotte G., Serres E. Pratlong F., Bastien P., Perieres J.(1990).** Taxonomy of *Leishmania* use of isoenzymatic. Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**: (3) 111-125.
- Rodhain F., Perez C. (1985).** Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Les phlébotomes: systématique, biologie, importance médicale. Paris: Maloine p157-175.
- Rodríguez-Contreras D., Landfear S. M. (2006).** Metabolic changes in glucose transporter-deficient *Leishmania mexicana* and parasite virulence. *J. Biol. Chem.* **281**(29): 20068–20076.
- Rogers M.E., Chance M.L., Bates P.A. (2002).** The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology.* **124**(Pt 5): 495-507.
- Rosenthal E., Marty P. (2009).** Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Rev. Med. Int.* **30** (2): S24-S28.
- Rosenthal E., Delaunay P., Jeandel P.Y., Haas H., Pomares-Estran C., Marty P.(2009).** Le traitement de la leishmaniose viscérale en Europe en 2009. Place de l'amphotéricine B liposomale. *Med. Mal. inf.* **39**(10): 741-744.
- Sacks, D.L. (1989).** Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* **69**(1): 100-3.
- Sacks D.L., Pimenta P.F., McConville M.J., Schneider P., Turco S.J.(1995).** Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **181**(2): 685-697.

- Saghrouni F., Gaïed-Meksi S., Fathallah A., Amri F., Ach H., Guizani I., Ben Saïd M. (2009).** Immunochromatographic rK39 strip test in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103** (12): 1273–1278.
- Samake S. (2006).** Epidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (Cercle de Baroueli). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Mali. 120p.
- Schaad N.W., Frederick R.D., Shaw J. Schneider W.L., Hickson R., Petrillo M.D., Luster D.G. (2003).** Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41** :305-24.
- Schallig H.D, Canto-Cavalheiro M., Silva D.A. (2002).** Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **97**(7): 1015-8.
- Schlein, Y., Jacobson R.L. et Shlomai J. (1991).** Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc. Biol. Sci.* **245**(1313):121-6.
- Schlein Y. (1993).** *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today.* **9**(7): 255-8.
- Sergent E. (1914).** Première note sur les Phlébotomes algériens. *Bull. Soc. Path. exot.* **7**: 660-662. In **Zeroual S. (2016/2017).** Les phlébotomes vecteurs de leishmaniose dans la région de Biskra: Inventaire et écologie des phlébotomes et étude épidémiologique. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Spécialité: Biologie Animale, université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie.p68.
- Shirai Y., Funada H., Seki T. Morohashi M., Kamimura K. (2004).** Landing preference of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on human skin among ABO blood groups, secretors or nonsecretors, and ABH antigens. *J. Med. Entomol.* **41**(4):796-9.
- Simon M. W., Martin E., Mukkada A. J. (1978).** Evidence for a functional glyoxylate cycle in the leishmaniae. *J. Bacteriol.* **135**(3): 895–899.
- Simpson L., Braly P. (1970).** Synchronization of *Leishmania tarentolae* Kinetoplast DNA. In Biochemistry of parasites and host-parasite relations. Edition Elsevier. France. 219-224.
- Simpson L., Neckelmann N., De La Cruz V.F. Simpson A.M., Feagin J.E., Jasmer D.P., Stuart K. (1987).** Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **262**(13), 6182-96.
- Solano-Gallego L., Koutinas A., Miró G. Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2009).** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **165**(1-2): 1-18.
- Stewart P. (1974).** Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord* **65**(1-2): 239-252. In **Dedet J.P., Addadi K., Belazzoug S. (1984).** Les Phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. Cah. O.R.S.T.O.M..Sér. Ent. Med. Parasitol. **XXII** (2) : 99-127.
- Suarez S, Nassif X, Ferroni A. (2015).** Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie.* **63**(1) : 43–52.

- Sundar S., More D.K., Singh M.K. Singh V.P., Sharma S., Makharia A., Kumar P.C., Murray HW.(2000).** Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. *Clin. Infect. Dis.***31**(4):1104-7.
- Sundar S. (2001).** Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.*Trop. Med. Int. Health.***6**(11):849-54.
- Sundar S., Rai M. (2002).**Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis.*Clin.Diagn.Lab Immunol.***9**(5): 951-8.
- Sundar S., Jha T.K., Thakur C.P., Engel J., Sindermann H., Fischer C., Junge K., Bryceson A., Berman J. (2002).**Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis.*N. Engl. J. Med.* **347** (22):1739-46.
- Sundar S., Singh R.K., Maurya R., Kumar B., Chhabra A., Singh V., Rai M.(2006).** Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans .R .Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**(6): 533-7.
- Sundar S., Singh R.K., Bimal S.K. Gidwani K., Mishra A., Maurya R., Singh S.K., Manandhar K.D., Boelaert M., Rai M. (2007).**Comparative evaluation of parasitological and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop. Med. Int. Health.* **12**(2): 284-289.
- Sunderkötter C., Kunz M., Steinbrink K., Sorg C.J. (1993).** Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J. Immunol.***151**(9): 4891-901. In **Laffitte M.C. (2016).** Caractérisation des mécanismes de réarrangements géniques chez le parasite *Leishmania* résistant aux drogues. Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire, p181. Université LAVAL, Québec, Canada.
- Suzuki E., Tanaka A.K., Toledo M.S., Takahashi H.K., Straus A.H. (2002).** Role of β -D-Galactofuranose in *Leishmania major* Macrophage Invasion.*Infect. Immun.***70**(2) : 6592-6596.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and S. Kumar S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods: *Mol. Bio.Evol.***28**(10):2731-2739.
- Tatem A. J., Hay S. I., Rogers D. J. (2006).** Global traffic and disease vector dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**(16): 6242-7.
- Thakur C. P., Sinha G. P., Pandey, A. K. (1996).** Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar.*Indian J. Med. Res.***103**: 259-263.
- Théodoridès J. (1997).** Note historique sur la découverte de la transmission de la leishmaniose cutanée par les phlébotomes. *Histoire.* 1863: 1-2.
- Trinchieri G. (1995).** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:251-76.
- Vallee P. (2004) :** <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Mitose/42fluoverte.htm> (consulté le 11/07/2018).

Vattier-Bernard G. (1970). Contribution à l'étude systématique et biologique des phlébotomes cavernicoles en Afrique intertropicale. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences d'Orsay (no d'enregistrement aux archives du C.N.R.S. : 11.0. 1973). Cah. O.R.S.T.O.M. *sér. Ent. méd. et Parasitol.* **VIII** (2,3).

Vlasov U. P. (1932). On the finding of sandflies in the environs of Szchkabad in the burrows of rodents *Rhombomys opimus*, Licht. and *Spermophilopsis leptodactylus* Licht. *Mag. Paras. Inst. Zool. Acad. Sc. U.S.S.R.* **3** : 89-102. In **Croset H., Rioux J.A., Léger N. et al. (1977).** Les méthodes d'échantillonnages des populations de phlébotomes en région méditerranéenne. *Coll. Inter. CNRS* **239**. Ecologie des leishmanioses, 139-151.

Walters L.L., Irons. K.P., Chaplin G., Tesh R.B. (1993). Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **30**(4): 699-718.

WHO. (2000). Leishmaniose et les co-infections *Leishmania* / HIV : www.who.int/Leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden.../en/.

WHO.(2010). Control of the leishmaniasis. *Tech Rep Ser* (XII-XIII) : 1-186: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485694>.

WHO.(2011). Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. On behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases : <http://www.who.int/tdr/publications/documents/vl-rdt-evaluation.pdf>

Wood C. S., Harrison G. A., Dore C. Weiner JS. (1972). Selective feeding of *Anopheles gambiae* according to ABO blood group status. *Nature*. **239** (5368) : 165.

Zait H., Hamrioui B. (2009). Leishmanioses cutanées en Algérie. Bilan de 386 cas diagnostiques au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Rev.Franco.Lab.* **39**(412) : 33-39.

Zilberstein D., Shapira M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**(1) : 449-70.

Zougaghi L., Moutaj R., Chabaa L., Agoumi.(2009). Leishmaniose viscérale infantile: profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. *Arch. Pédiat.* **16**(11): 1513-1518.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXES

Annexe 1

liste des phlébotomes d'Algérie, avec la découverte récente de nouvelles espèces (Dedet *et al.*, 1984 ; Belazzoug, 1991 ; Bounamous *et al.*, 2008 ; Berdjane–Brouk *et al.*, , 2011).

Genre <i>Phlebotomus</i>	Genre <i>Sergentomyia</i>
<p>-Sous-genre <i>Phlebotomus</i> Rondani 1843 -<i>Phlebotomus papatasi</i> Scopoli, 1786 -<i>Phlebotomus bergeroti</i> Parrot ,1934 - Sous-genre <i>Paraphlebotomus</i> Theodor ,1948 -<i>Phlebotomus sergenti</i> Parrot, 1917 -<i>Phlebotomus alexandri</i> Sinton ,1928 -<i>Phlebotomus riouxi</i> (Depaquit, Killick-Kendrick <i>et Léger</i>, 1998) -<i>Phlebotomus chabaudi</i> Croset, Abonnenc <i>et Rioux</i> ,1970 -<i>Phlebotomus kazeruni</i> Theodor <i>et Mesghali</i>, 1964 - Sous-genre <i>Larroussius</i> Nitzulescu ,1931 -<i>Phlebotomus perniciosus</i> Newstead 1911 -<i>Phlebotomus ariasi</i> Tonnoir ,1921 - <i>Phlebotomus langeroni</i> Nitzulescu,1950 -<i>Phlebotomus longicuspis</i> Nitzulescu, 1930 - <i>Phlebotomus perfiliewi</i> Parrot, 1930 - <i>Phlebotomus chadlii</i> Rioux, Juminer <i>et Gibily</i>, 1966 Sous-genre <i>Transphlebotomus</i> -<i>Phlebotomus</i> (<i>Transphlebotomus</i>) <i>mascittii</i>, Grassi, 1908</p>	<p>Genre <i>Sergentomyia</i> - Sous-genre <i>Sergentomyia</i> Franca ,1920 - <i>Sergentomyia antennata</i> Newstead ,1912 - <i>Sergentomyia fallax</i> Parrot, 1921 - <i>Sergentomyia minuta parroti</i> Adler <i>et Theodor</i>, 1927 - <i>Sergentomyia schwetzi</i> Adler, Theodor <i>et Parrot</i>, 1929 - Sous-genre <i>Parrotomyia</i> - <i>Sergentomyia africana</i> Newstead ,1921 - <i>Sergentomyia eremetis</i> Parrot <i>et Jolinière</i>, 1945 - <i>Sergentomyia lewisi</i> Parrot, 1948 - Sous-genre <i>Grassomyia</i> - <i>Sergentomyia dreyfussi</i> Parrot, 1933 -Sous genre <i>Sintonius</i> - <i>Sergentomyia clydei</i> Sinton, 1928 - <i>Sergentomyia christophersi</i> Sinton, 1927</p>

Annexe 2

Mise en évidence des leishmanies à partir du vecteur

Technique, qui s'applique obligatoirement sur des phlébotomes vivants, s'effectue généralement sur le terrain. Pour cela, un bec Bunsen est utilisé afin d'assurer une zone stérile dans laquelle les travaux peuvent être réalisés (Niang, 1992). L'agitation du tube contenant le phlébotome vivant et quelques centimètres cubes d'eau physiologique permet de débarrasser l'insecte d'une grande partie de ses soies. Le phlébotome est ensuite placé sur une lame dans une goutte d'eau physiologique (Niang, 1992). Pattes et tête sont enlevées avec deux aiguilles très fines, utilisées également pour le maintien du thorax et l'incision de l'abdomen entre le 7ème et le 8ème segment (Figure 83). Estomac, intestin postérieur et tout l'appareil génital sont ainsi dégagés. Les ovaires sont ensuite dilacérés, couverts d'une lamelle, puis examinés au microscope. Afin de déterminer les flagellés parasites contenus dans l'intestin postérieur et notamment dans l'ampoule rectale, une série d'étalements s'impose : l'ampoule rectale est isolée sur une lame, dans une goutte d'eau physiologique. Elle est ensuite ouverte avec des aiguilles très fines et dilacérée afin de permettre l'éparpillement des parasites. Une fois séchée, les frottis sont fixés avec le méthanol absolu pendant une minute. Après fixation, les lames s'imprègnent pendant 45 minutes dans le colorant de Romanowski. Après lavage à l'eau ordinaire, les lames sont séchées à l'air avant l'examen microscopique (Vattier-Bernard, 1970).

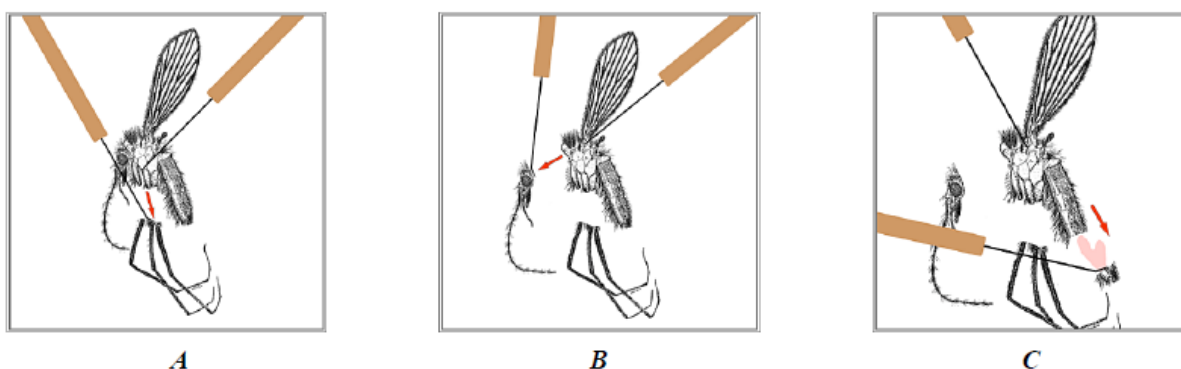


Figure 83 : Dissection de phlébotome femelle pour la détection de promastigotes (El-Hossary, 2006).

(Enlèvement des pattes (A) ; de la tête (B) ; inscision de l'abdomen (C)).



Annexe 3

1. Hémagglutination indirecte

Elle consiste à mettre en présence des dilutions croissantes de sérum et de globules rouges sensibilisés par un antigène leishmanien. Si l'échantillon sérique contient des anticorps spécifiques, ceux-ci sont agglutinés par les érythrocytes sensibilisés. Dans le cas contraire, les cellules se déposent au fond des cupules sous forme d'un bouton (Figure 84). C'est une technique qui est peu utilisée en raison de son défaut de sensibilité et de spécificité et un résultat positif nécessite une confirmation par une autre technique. Selon Belazzoug *et al.*, (1986) sa sensibilité est de l'ordre de 83,3% contre 98,3% pour l'IFI.

Principe :

1. Le sérum du patient est mis en contact avec des hématies recouvertes d'antigènes.
2. La positivité se manifeste par l'agglutination des hématies (hémagglutination).
3. La négativité provoque la chute des hématies dans le fond des cupules formant un « bouton ».

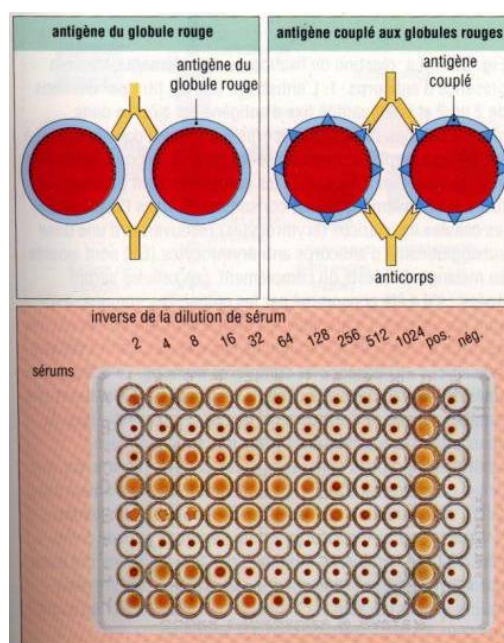


Figure 84 : Résultat de l'hémagglutination indirecte⁽¹⁰⁾

2. Agglutination directe

L'agglutination se produit lorsqu'un antigène est mis en présence de l'anticorps correspondant. Cette réaction est rapide (quelques minutes) et visible à l'oeil nu. La réaction est positive lorsqu'il se forme un voile de promastigotes au fond du puits réactionnel de plus

¹⁰ http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm (Consulté le 25/07/2018)

de la moitié du godet; elle est négative lorsqu'il se forme une sédimentation des leishmanies en bouton (Figure 85).

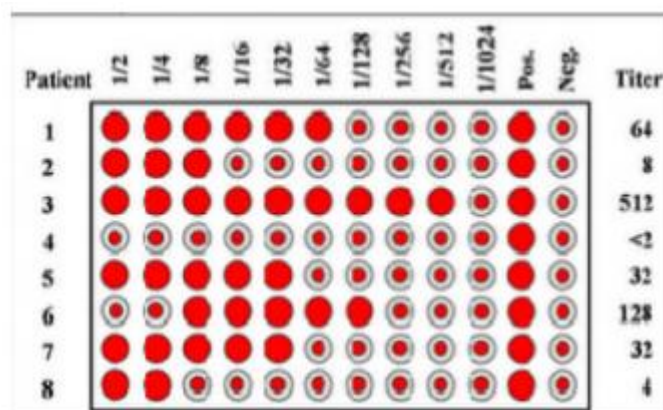


Figure 85 : Résultat d'Agglutination directe (Mayer et Hudrisier, 2012)

3. Test au Latex

Il consiste à mettre en présence le sérum avec des billes de latex sensibilisées par l'antigène leishmanien. Une réponse positive donne une agglutination visible à l'oeil nu. Ce test a été mis au point par Dereure *et al.* (1998) et appliqué au cours des enquêtes écoépidémiologiques en Algérie, au Maroc, en Syrie, au Yemen et en France. Il aurait une sensibilité comparable, sinon supérieure à celle de l'IFI avec cependant un inconvénient en étant un test qualitatif seulement.

Annexe 4

Identification des *Leishmania*

Analyse biochimique des isoenzymes (zymodèmes)

Cette analyse permet d'étudier les variations de mobilité électrophorétique, pour une protéine de même fonction enzymatique, entre différents organismes (Hide, 2004).

Les protéines extraites sont préparées à partir de culture en masse de promastigotes. Après électrophorèse, les enzymes contenues dans les extraits protéiniques sont révélées par une tâche colorée appelée électromorphe. Celui-ci correspond à la distance parcourue par l'enzyme dans le gel d'amidon à un pH déterminé.

Le zymodème est établi après obtention de 15 électromorphes correspondant aux 15 isoenzymes utilisés. Soit la souche testée peut s'apparenter à un zymodème déjà connu soit elle permet d'en définir un nouveau.

Plus de deux cents zymodèmes sont à ce jour individualisés. A chaque zymodème est affectée une souche marqueur dont l'une : MHOM/FR//LEM 75, *L. infantum* MON-1, est la souche étalon qui sert de référence pour identifier chaque électromorphe.

Le code OMS comporte quatre volets séparés par des traits obliques, se rapportant, successivement et en abrégé, à l'hôte sur lequel l'isolement a été effectué, au pays où l'infection a été contractée, à l'année du prélèvement et au sigle attribué par l'auteur de l'isolement.

Le zymodème est désigné par le sigle MON (code spécifique du laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire de Montpellier).

Les enzymes utilisées sont les suivantes : malate déshydrogénase : MDH, EC 1.1.1.37 ; enzyme malique : ME, EC 1.1.1.40 ; isocitrate déshydrogénase: ICD, EC 1.1.1.42, 6- phosphogluconate déshydrogénase: PGD, EC 1.1.1.44, glucose-6-phosphate déshydrogénase:

G6PD, EC 1.1.1.49, glutamate déshydrogénase: GLUD, EC 1.4.1.3., NADH diaphorase : DIA, EC 1.6.2.2., purine nucléoside phosphorylase:NP 1, EC 2.4.2.1., purine nucleoside phosphorylase: NP 2, EC 2.4.2., glutamate-oxaloactétate transaminase: GOT 1, EC 2.6.1.1., Glutamate-oxaloacétate transaminase: GOT 2, EC 2.6.1.1., Phosphoglucomutase: PGM EC 5.4.2.2.,Fumigated hydratase: FH, EC 4.2.1.2., Mannose phosphate isomer's: MPI, EC 5.3.1.8., Glucose phosphate isomérase: GPI, EC 5.3.1.9.

Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge.

La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides.

Un spectromètre de masse comporte toujours une source d'ionisation permettant le passage de l'échantillon en phase gazeuse, un analyseur séparant les ions en fonction de leur rapport masse/charge, un détecteur qui permet une détection des ions préalablement triés et qui fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés, et enfin un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres (Suarez et *al.*, 2015).

L'échantillon est mélangé à la matrice et placé sur une lame. Le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon (Figure 86). Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre (Figure 87).

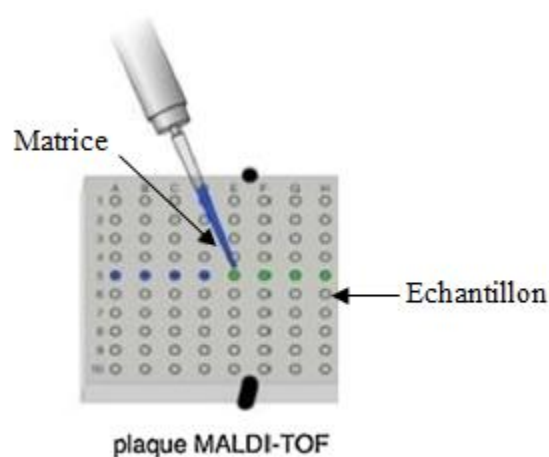


Figure 86 : Préparation de l'échantillon pour l'analyse en MALDI-TOF

(Clark et *al.*, 2013)

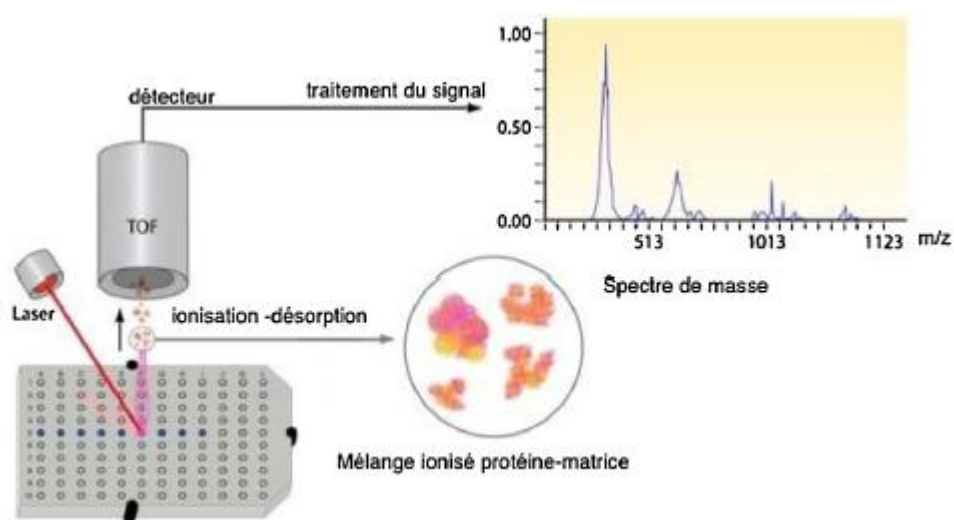


Figure 87:Analyse MALDI-TOF (Clark et *al.*, 2013)

Le mélange échantillon/matrice co-cristallisé est bombardé par un faisceau laser, permettant ainsi l'ionisation et la désorption des molécules du mélange matrice/échantillon. Les molécules ionisées passent alors dans un tube de vol et sont séparées selon leur ratio masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF). Les ions arrivent sur un détecteur qui amplifie le signal. Le résultat est traduit sous la forme d'un spectre de masse (Clark et *al.*, 2013).

Annexe 5

Traitement de la leishmaniose viscérale

La LV, parasitose endémique dans le bassin méditerranéen, où de nombreux enfants sont atteints chaque année, continue de poser de réelles difficultés thérapeutiques.

Pendant plus de 60 ans, l'antimoine pentavalent (Figure 88) a été considéré comme le traitement de référence de la LV. Sa large utilisation a montré qu'il était généralement bien toléré et efficace (Rosenthal *et al*, 2009). Il a une action inhibitrice sur la synthèse de l'ADN du parasite.

L'apparition de souches de *Leishmania* résistantes à l'antimoine pentavalent ainsi que l'observation d'effets secondaires toxiques ont conduit à rechercher d'autres thérapeutiques (Sundar *et al*, 2000; Sundar, 2001).

L'Amphotéricine B (Antibiotique isolé en 1955 d'un *Streptomyces* du sol) (Figure 89) est le plus puissant des agents anti-*Leishmania*. Son efficacité dans le traitement de la LV est reconnue dans l'ensemble des zones d'endémies. Il est très efficace avec un taux de guérison de 97% et aucune résistance n'a encore été rapportée (Thakur *et al.*, 1996).

Il provoque des modifications de la perméabilité de la membrane parasitaire entraînant une perte de substances vitales et agirait également sur les macrophages en augmentant leurs capacités phagocytaires (Dedet, 1999).

Malheureusement, il montre des effets toxiques rénaux et hématologiques non négligeables.

Pour diminuer cette toxicité, une formulation récente de l'Amphotéricine B encapsulée dans un liposome uni-lamellaire est disponible depuis peu d'années (AmBisome®). Elle demeure dans la circulation générale d'où elle est captée par les cellules du système réticulo-histiocytaire. Elle est actuellement la principale thérapeutique au cours de la LV de l'immunodéprimé (Rosenthal et Marty, 2009).

Des doses totales de 10 à 20 mg/kg permettent d'obtenir des taux de guérison compris entre 90 et 98 % sur des patients atteints de LV (Berman, 2003; Rosenthal *et al.*, 2009) mais son coût extrêmement élevé ne permet pas son usage dans les pays en voie de développement (Guerin *et al.*, 2002).

L'hexadécylphosphocholine (miltéfosine) (Figure 90), initialement développé comme anticancéreux, est le seul traitement administrable par voie orale, ayant montré une efficacité dans le traitement de la LV, y compris dans les formes résistantes aux dérivés antimoniés (Sundar *et al*, 2002). Ses effets secondaires digestifs et tératogènes, ainsi que sa demi-vie longue favorisant l'émergence de résistances, limitent cependant son utilisation.

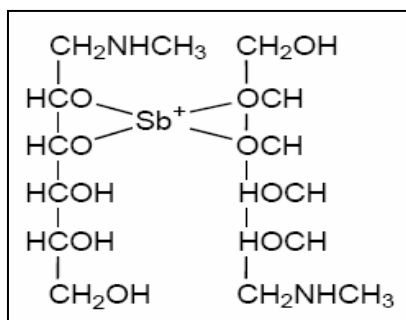


Figure 88 :
Antimoniés pentavalents
(Chappuis, 2007)

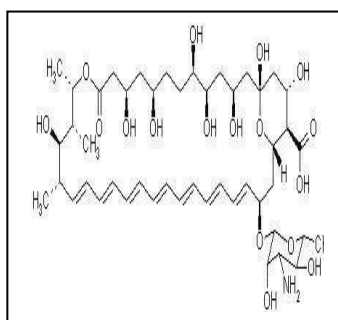


Figure 89 :
Molécule d'Amphotéricine
(Estevez, 2009)

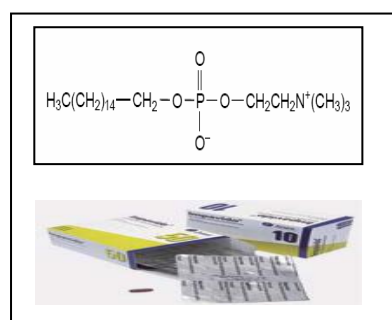


Figure 90 :
Hexadecylphosphocholine
(Chappuis, 2007)

Annexe 6

Prévention et lutte contre la leishmaniose viscérale

1. Lutte contre le phlébotome

A l'heure actuelle, elle reste l'action la plus efficace et comprend la lutte contre les vecteurs adultes et les formes larvaires.

Il est en effet facile de lutter contre les phlébotomes au repos à l'intérieur des maisons (vecteurs endophiles) en pulvérisant des insecticides à activité rémanente dans les maisons, les poulaillers, les étables et les caves. Mais il n'est pas possible de lutter de la même manière contre les phlébotomes reposant à l'extérieur (vecteurs exophiles).

Grâce à la pulvérisation à large échelle du DDT, lors des campagnes de désinfection lancées dans les années 1950, la leishmaniose viscérale a presque complètement disparu du continent indien. Malheureusement la maladie est rapidement réapparue après l'arrêt de ces campagnes de désinfection.

L'utilisation répétée des pulvérisations d'insecticides à volume ultra-faible dans la communauté entière permet de diminuer le nombre des phlébotomes, mais cette méthode ne s'emploie qu'en cas d'épidémie.

Les moustiquaires habituelles laissent passer les phlébotomes compte tenu de leur petite taille. Les mailles doivent donc être serrées et doivent être imprégnées d'insecticides rémanents pour assurer une bonne protection (Carré *et al.*, 2010).

La lutte contre les formes larvaires se fait par le labourage profond des champs et par la destruction de terriers des rongeurs.

2. Lutte contre les réservoirs du parasite

Il faut dépister et surveiller les réservoirs animaux, en l'occurrence les chiens dans la forme zoonotique de la LV due à *L. infantum*.

La lutte contre les réservoirs du parasite se fait par l'abattage des chiens errants et en gardant les chiens domestiques à l'intérieur des habitations pendant la saison des moustiques et du crépuscule à l'aube afin d'éviter au maximum qu'ils soient piqués par les phlébotomes.

Une nouvelle approche est l'utilisation d'insecticides qui offrent un haut niveau de protection contre les piqûres de phlébotomes (Solano-Gallego *et al.*, 2009) :

-des colliers canins imprégnés d'un insecticide qui assurent une libération continue et efficace du principe actif seulement s'il est bien fixé. L'objectif est d'assurer une surface de contact maximale entre le collier et la surface de la région du cou du chien aussi longtemps qu'il porte le collier,

- des sprays insecticides et des formulations à déposer directement sur le pelage,
- des poudres qui permettent un effet immédiat mais aussi plus court.

3. Prophylaxie humaine

L'association du dépistage actif et du traitement est fondamentale pour combattre la maladie. Pourtant, cette méthode apparemment simple se heurte à d'importants obstacles. Il n'existe pas de données objectives à l'heure actuelle car :

- la maladie se transmet dans des zones rurales reculées,
- beaucoup de cas ne sont pas diagnostiqués,
- la déclaration de la leishmaniose n'est obligatoire que dans 33 des 88 pays d'endémie.

Les valeurs réelles de la prévalence et de l'incidence ne peuvent être estimées vu qu'aucune étude prospective de grande ampleur n'a jamais été effectuée et que la situation globale a toujours été établie à partir des données fragmentaires existantes.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin, ni médicament prophylactique (IPA, 2008; Dumonteil *et al.*, 2001) mais d'abondantes preuves cliniques et expérimentales indiquent que la leishmaniose pourrait être prévenue par la vaccination. Plusieurs vaccins potentiels sont développés, à la demande de l'OMS, mais aucun n'est encore disponible.

Les seules mesures prophylactiques individuelles efficaces consistent à :

- utiliser des moustiquaires imprégnées de produits rémanents,
- éviter de se promener à la tombée du jour en bordure des bois,
- porter des vêtements recouvrant le maximum de surface corporelle,
- utiliser des produits répulsifs sur les zones de peau découvertes.

Annexe 7

Présentation de l'établissement hospitalier spécialisé en pédiatrie

L'hôpital pédiatrique de canastel baptisé au nom de Boukhroufa Abdelkader a été créé par le décret exécutif n° 97-465 du 02 décembre 1997.

Il est structuré en 21 services dont 11 ont été hospitalo-universitaire par l'arrêté ministériel du 25 juillet 2013 portant agrément de certaines structures de l'établissement hospitalier spécialisé en pédiatrie pour assurer des activités hospitalo-universitaires.

Ila a une capacité de 256 lits qui vont être portés à 340 lits après l'achèvement de l'extension de l'hôpital actuellement en cours de réalisation. Il présente un taux d'occupation de 70%.

Annexe 8

REACTIFS ETILISES

Figure 91 : Différents réactifs du coffret *Leishmania* Western Blot

R1 : Pochette contenant les bandelettes de nitrocellulose sensibilisées par l'Ag leishmanien ;
 R2 : Diluant échantillons ; R3 : Tampon de lavage ; R4 : Conjugué ; R5 : Contrôle positif ; R6 : Substrat

Figure 92: Différents réactifs du coffret ELISA (Novagnost®*Leishmania*IgG)

R1 : Diluant, R2 : Solution de lavage, R3 : Conjugué, R4 : Solution Stop, R5 : Substrat,
 R6 : Contrôle négatif, R7 : Contrôle cut-off, R8 : Contrôle positif.

Annexe 9

ADNr 18S

Gène codant l'ARN ribosomique 18S situé dans la petite sous-unité des ribosomes d'eucaryotes (Figure 93).

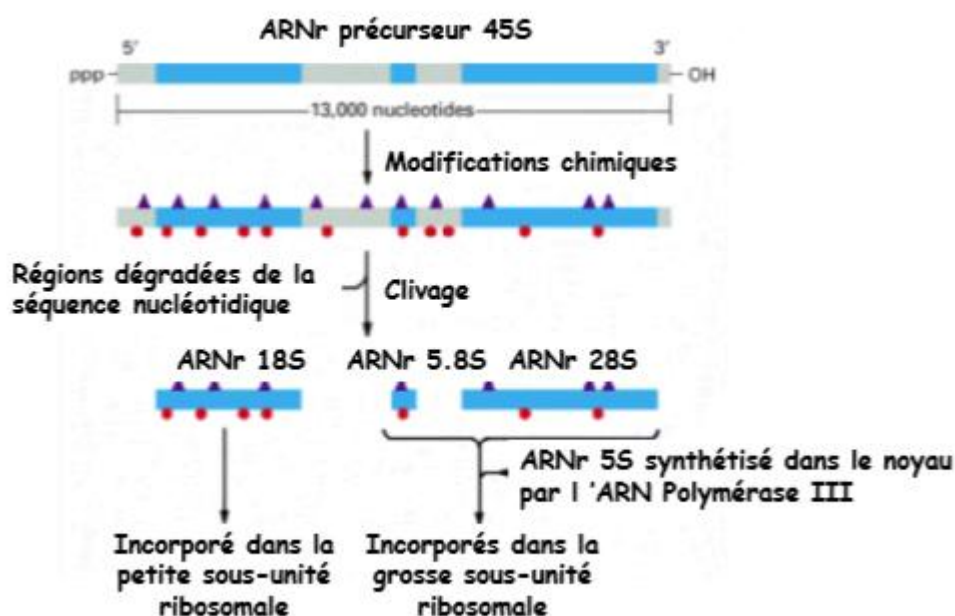


Figure 93 : Maturation de l'ARNr précurseur 45S ⁽¹¹⁾

Régions ITS1 et ITS2

ITS : Région de l'ADN ribosomique. Elle comprend les régions ITS1 et ITS2, séparées par le gène 5.8S. Elles sont situées entre les gènes 18S et 28S.

C'est une région non codante et hautement polymorphe. Pour cette raison, elle est très fréquemment utilisée en biologie cellulaire pour mettre en évidence une différence génétique entre deux espèces.

La présence des régions flanquantes conservées (18S et 28S) aux deux extrémités 5' et 3' facilite la définition des amorces qui permettent l'amplification des régions ITS1 et ITS2 (Figure 94).

¹¹<https://lille2p1.wordpress.com/2015/08/08/ue2-le-noyau/> (consulté le 26/07/2018)

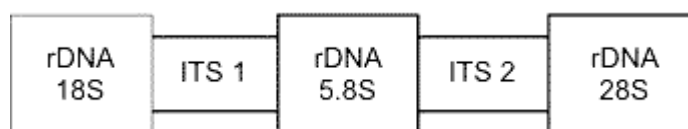


Figure 94 : Régions ITS1 et ITS2 (Brasileiro *et al.*, 2004)

Cytochrome b

Gène de l'ADN mitochondrial (Figure 95), utilisé comme marqueur phylogénétique. Le gène Cytochrome b (Cyt b) s'est avéré utile pour l'identification et la classification de nombreux mammifères et plantes. Afin d'évaluer l'utilité de ce gène pour la différenciation des parasites du genre *Leishmania* ainsi que pour explorer leurs relations phylogénétiques, Luyo-Acero *et al.* (2004) ont déterminé les séquences nucléotidiques du gène Cyt b de 13 espèces de *Leishmania* infectant l'homme (14 souches) du Nouveau et du Vieux Monde. Les gènes Cyt b, d'environ 1080 paires de bases, se sont avérés être riches en A / T. La variation de la séquence nucléotidique entre eux était suffisante pour différencier entre les espèces; 245 positions nucléotidiques étaient polymorphes.

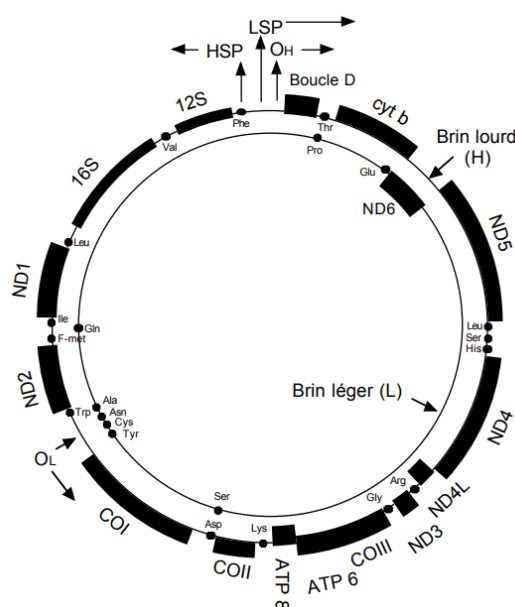


Figure 95 : Organisation de l'ADN mitochondrial (Lescuyer, 2002)

Annexe 10

Composition des amorces régénérées en eau distillée RNase DNase free

Amorce	Séquences	Quantité d'eau à ajouter
ITS1 R	CAC GGG GAT GAC ACA ATA GAG	68,3 µl
ITS1 F	CAA TAC AGG TGA TCG GAC AGG	64,9 µl
ITS2 R	GGC CAA CGC GAA GTT GAA TTC	84,7 µl
ITS2 F	GCA TGC CAT ATT CTC AGT GTC	83 µl
LCYT S	GGT GTA GGT TTT AGT YTA GG	47,8 µl
LCYT R	CTA CAA TAA ACA AAT CAT AAT ATR CAA TT	33,8 µl
LCB F2	GTT ATG TAC AAT GAT GTC	68,6 µl
LCB R4	GAA CTC ATA AAA TAA TGT AAA CAA AA	72,1 µl

Annexe 11

Liquide de Marc-André d'après Abonnenc (1972)

- Eau distillée.....30 ml
- Hydrate de chloral.....40 g
- Acide acétique cristallisable.....30 ml

Annexe 12

Clé d'identification des phlébotomes d'Algérie (Dedet *et al.*, 1984)

Clé des mâles

1. - Soies des tergites abdominaux II et VI uniformément dressées. Cibarium inerme. Style porteur de quatre ou cinq épines insérées à des niveaux différents et dépourvu de soie caduque :
Genre Phlebotomus2
 -Soies des tergites abdominaux II et VI uniformément couchées. Cibarium armé de dents. Style à quatre épines terminales fortes et une soie non caduque :
Genre Sergentomyia.....12
2. -Style à quatre épines :
Sous-genre Paraphlebotomus.....5
 -Style à cinq épines.....3
3. -Style long à cinq épines courtes et spatulées, dont trois sont terminales ; paramère trilobé, lobe latéral armé de deux épines terminales :
sous-genre Phlebotomus.....4
 -Style trapu à cinq épines, dont deux sont terminales, lobe latéral inerme :
Sous-genre Larroussius.....7
4. -Épine médiane du style plus rapprochée de l'épine basale que des épines terminales ; touffe de soies longues et bien différenciées à l'apex du coxite ; petit tubercule basal du coxite portant plus de six soies :
Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi
 -Épine médiane du style à mi-distance entre l'épine basale et le groupe des épines terminales, ou plus près de ce dernier ; touffe de six ou sept soies longues à l'apex du coxite ; petit tubercule basal du coxite portant six soies :
Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti
5. Valve pénienne en lame aigüe, transparente, non recourbée à l'apex :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi
 -Valve pénienne recourbée en « bec de rapace », à l'apex.....6
6. Une seule épine terminale sur le style ; lobe latéral plus court ou égal au coxite ; à la base du coxite, présence d'un lobe court, trapu et nettement dilaté à l'extrémité :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri
 -Deux épines terminales sur le style ; lobe latéral plus long que le coxite ; à la base du coxite, lobe de taille moyenne, peu élargi à l'apex, à soies courtes :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti
7. -Valve pénienne bifide à l'apex :
Phlebotomus (Larroussius) perniciosus
 -Valve pénienne simple à l'apex.....8
8. -Valve pénienne pointue à l'apex.....9
 -Valve pénienne arrondie à l'apex.....10
9. -Valve pénienne régulièrement effilée, se terminant par une pointe longue, légèrement asymétrique :
Phlebotomus (Larroussius) longicuspis
 -Valve pénienne tronquée en biseau, se terminant par une pointe très courte, nettement asymétrique :
Phlebotomus (Larroussius) langeroni
10. -Bord dorsal de la valve pénienne porteur de quatre à six dents ; valve arquée et spatulée à l'apex :

<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i>	
-Valve pénienne renflée en battant de cloche.....	11
11. -Coxite pourvu d'un placard de 30 à 45 soies :	
<i>Phlebotomus (Larroussius) chadlii</i>	
12. -Vlve du pénis épaisse, digitiforme, arrondie à l'apex :	
Sou-genre <i>Sergentomyia</i>	13
-Valve du pénis triangulaire, en cône à apex pointu :.....	16
13. -Style cinq à sept fois plus long que large ; soie non caduque très courtr est insérée tout près des épines terminales :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i>	
-Style plus court et trapu.....	14
14. -Soie non caduque du style assez éloignée des épines terminales.....	15
-Soie non caduque du style très proche des épines terminales ; les quatre épines du style sont souvent disposées en deux groupes bien séparés l'un de l'autre ; cibarium armé de deux rangées de dents très courtes et aigues :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) shwetzii</i>	
15. -Cibarium armé de dents disposées sur ligne droite ou légèrement concave en arrière :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta parroti</i>	
Cibarium armé de dents disposées sur un arc profondément concave en arrière :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i>	
16. -Valve pénienne en forme de cône très allongé.....	17
-Valve pénienne en forme de cône court.....	19
17. -Dents cibariales très aigues à pointes obliquement dirigées vers le centre, 12 à 14 dents :	
<i>Sergentomyia (Sintonius) tiberiadis</i>	
-Dents cibariales mousses.....	18
18. -Cibarium armé de 20 dents mousses disposées sur une ligne légèrement convexe vers l'arrière :	
<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i>	
-Cibarium armé de 30 à 35 dents monomorphes, rangées en palissade régulière suivant un arc de cercle légèrement concave vers l'arrière :	
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) eremitis</i>	
19. -Cibarium armé de 25 à 35 petites dents disposées par groupe de quatre ou six et d'une rangée antérieure de denticules punctiforme :	
<i>Sergentomyia (Sintonius) clydei</i>	
-Cibarium armé de deux ou trois dents courtes et fortes et d'une série de denticules fins disposés sans ordre :	
<i>Sergentomyia (Sintonius) christophersi</i>	

Clé des femelles

1. -Soies des tergites abdominaux II et VI uniformément dressées. Cibarium inerme (ou armé seulement de petits denticules épars difficilement visibles).	
Genre <i>Phlebotomus</i>	2
-Soies des tergites abdominaux II et VI uniformément couchées. Cibarium armé d'une rangée transversale de dents bien visibles :	
Genre <i>Sergentomyia</i>	9
2. -Spermathèque à réservoir annelé, à tête sessile.....	3
-Spermathèque à réservoir annelé et munie d'un col long et étroit :	
Sous-genre <i>Larroussius</i>	7

3. Anneaux de la spermathèque tous de la même taille. Pharynx postérieur muni de denticulation irrégulière :
Sous-genre *Phlebotomus*.....4
-Anneaux terminal de la spermathèque plus grand que les autres. Pharynx postérieur armé de fortes écailles :
Sous-genre *Paraphlebotomus*.....5
4. -Spermathèque de cinq à huit anneaux :
Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti
-Spermathèque de huit à douze anneaux :
Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi
5. -Troisième segment de l'antenne court (longueur du troisième segment de l'antenne inférieure ou égale à celle de la somme des quatrième et cinquième segments : 100 à 160 microns) :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri
-Troisième segment de l'antenne long (longueur du troisième segment de l'antenne supérieure à celle de la somme des quatrième et cinquième segments : plus de 200 microns).....6
6. -Spermathèque munie d'une collerette terminale. Pharynx présentant une plage écailleuse (1/3 postérieur de l'organe) formée d'écailles de taille moyenne, très nombreuses et régulières :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi
-Spermathèque dépourvue d'une collerette terminale. Pharynx présentant une plage écailleuse occupant le 1/4 postérieur de l'organe et formée d'un nombre réduit d'écailles de grande taille et très acérées :
Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti
7. -Conduit de la spermathèque lisse et dilaté dans sa partie proximale :
Phlebotomus (Larroussius) ariasi
-Conduit de la spermathèque de calibre uniforme et strié transversalement sur toute la longueur.....8
8. -Spermathèque de 12 à 18 anneaux :
Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi
-Spermathèque de 7 à 12 anneaux :
Phlebotomus (Larroussius) perniciosus, ou
Phlebotomus (Larroussius) longicuspis, ou
Phlebotomus (Larroussius) langeroni
9. Spermathèque annelée :
Sous-genre *Sintonius*..... 10
-Spermathèque lisse.....12
10. -Cibarium armé d'une rangée de quatre à sept dents fortes et aigues et d'une rangée antérieure de quatre ou cinq denticules punctiformes :
Sergentomyia (Sintonius) christophersi
-Cibarium armé de plus de dix dents.....11
11. Cibarium armé de 12 dents aigues disposées en ligne droite et d'une rangée antérieure de 16 à 18 denticules punctiformes :
Sergentomyia (Sintonius) clydei
-Cibarium armé de 18 dents aigues fortes et serrées (les latérales étant plus larges que les médianes) disposées suivant un arc de cercle à peine concave vers l'arrière et très obliquement dirigées vers le centre ; en avant deux rangées de denticulations :
Sergentomyia (Sintonius) tiberiadis
12. -Spermathèque en forme de capsule allongé, couverte de fins spicules :

<i>Sergentomyia (Grassomyia) dreyfussi</i>	
-Spermathèque dépourvue de spicules.....	13
13. -Cibarium armé de 40 à 90 dents disposées sur une ligne droite ou légèrement concave vers l'arrière.....	14
-Cibarium armé de 16 à 30 dents disposées sur une ligne concave à l'arrière.....	15
14. -Troisième segment de l'antenne court (70 à 95 microns) :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta parroti</i>	
-Troisième segment de l'antenne long (130 à 170 microns) :	
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) eremitis</i>	
15. -Pharynx globalement cordiforme.....	16
- Pharynx en verre de lampe.....	17
16. -Pharynx très nettement cordiforme, fortement encoché dans sa partie postérieure ; dents pharyngiennes postérieures beaucoup plus nombreuses et plus fines que les antérieures :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) fallax</i>	
-Pharynx d'aspect moins nettement cordiforme, peu ou pas encoché à sa partie postérieure :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) antennata</i>	
17. Cibarium ne présentant pas de denticulations en avant de la rangée de dents principales (13 à 20 dents fortes et aiguës, les dents latérales externes et les dents médianes sont plus petites que les dents latérales médianes) :	
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) shwetzi</i>	
-Cibarium présentant une rangée de 16 à 20 denticules punctiformes en avant d'une rangée de 15 à 20 dents :	
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) lewisi</i>	

Leishmaniose viscérale	Fiche de renseignements	Page : 1/4
-------------------------------	--------------------------------	-------------------

Code :	Date d'hospitalisation :	
Sexe :	Masculin <input type="checkbox"/>	Féminin <input type="checkbox"/>
Nom et Prénom :		
Date et lieu de naissance :		
Age :		
Lieu de résidence :		
Notion de séjour dans une zone endémique :		
Profession du père :		
Groupe sanguin :		
Motif d'hospitalisation :		
Date du début de symptômes :		
Date du diagnostic de la maladie :		
<u>Signes cliniques</u>		
Fièvre :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Pâleur cutanéomuqueuse :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Splénomégalie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Triade :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Hépatomégalie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Vomissement :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Diarrhée :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Anorexie	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Amaigrissement :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

Leishmaniose viscérale	Fiche de renseignements	Page : 2/4
------------------------	-------------------------	------------

Signes cliniques(suite)

Asthénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Lésions cutanées :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Toux :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Syndrome hémorragique :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Œdèmes (Préciser) :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Malnutrition :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Altération de l'état général :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

Signes biologiques

Anémie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Leucopénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Neutropénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Thrombopénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Bicytopénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Pancytopénie :	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>

VS :	Accélérée <input type="checkbox"/>	Normale <input type="checkbox"/>	Non réalisée <input type="checkbox"/>
CRP :	Positive <input type="checkbox"/>	Négative <input type="checkbox"/>	Non réalisée <input type="checkbox"/>

Autres signes cliniques :

Leishmaniose viscérale	Fiche de renseignements	Page : 3/4
------------------------	-------------------------	------------

Méthodes de diagnostic

Examen direct (Myélogramme)

Recherche de parasites positive ☐Recherche de parasites négative ☐

Sérologie

Immunochromatographie :

Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* positive ☐Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* négative ☐Non réalisée ☐

Immunofluorescence indirecte :

Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* positive ☐Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* négative ☐Non réalisée ☐

Western Blot :

Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* positive ☐Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* négative ☐Non réalisée ☐

ELISA :

Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* positive ☐Recherche d'anticorps anti-*Leishmania* négative ☐Non réalisée ☐

Biologie moléculaire

PCR en temps réel

PCR- Standard

ITS1

ITS2

CYT B

Recherche de l'ADN parasitaire positive ☐☐☐☐Recherche de l'ADN parasitaire négative ☐☐☐☐Non réalisée ☐

Leishmaniose viscérale	Fiche de renseignements	Page : 4/4
------------------------	-------------------------	------------

Transfusion sanguineOui ☐ (Préciser le type)Non ☐**Traitement :**

Nombres de cures :

1 ☐2 ☐

Evolution :

Favorable

☐

Défavorable (Préciser)

☐

Annexe 14

Interprétation des résultats de l'ELISA

SMP : $SMP > (Cutoff + (Cutoff \times Greyzone))$: POS (Résultat positif)

SMP : $SMP < (Cutoff - (Cutoff \times Greyzone))$: NEG (Résultat négatif)

SMP : $SMP < (Cutoff + (Cutoff \times Greyzone))$ AND $SMP > (Cutoff - (Cutoff \times Greyzone))$:
EQUIV

Greyzone = 0,150

Cutoff= 0,588 (moyenne d'absorbance du contrôle Cut-off (B1 ; C1))

SMP : Sample (échantillon)

EQUIV : Résultat indéterminé (douteux)

Annexe 15

Résultats des différentes techniques de diagnostic utilisées

Code du malade	ED	TDR	ELISA	IFI	WB	RT-PCR (MOs)	RT-PCR (Sérum)
1	1	-	-	-	-	-	-
2	1	-	-	-	-	-	-
3	1	-	-	-	-	1	-
4	1	-	-	-	-	-	-
5	1	-	-	-	-	-	-
6	0	-	-	-	-	0	-
7	0	-	-	-	-	0	-
8	1	-	-	-	-	-	-
9	1	-	-	-	-	-	-
10	1	-	-	-	-	1	-
11	1	-	-	-	-	-	-
12	1	-	-	-	-	-	-
13	1	-	-	-	-	-	-
14	1	-	-	-	-	-	-
15	0	-	-	-	-	1	-
16	1	-	-	-	-	1	-
17	0	-	-	-	-	0	-
18	1	-	-	-	-	1	-
19	1	-	-	-	-	1	-
20	1	-	-	-	-	-	-
21	0	-	-	-	-	-	-
22	0	-	-	-	-	1	-
23	1	-	-	-	-	-	-
24	1	-	-	-	-	-	-
25	1	-	-	-	-	1	-
26	1	-	-	-	-	-	-
27	1	-	-	-	-	-	-
28	1	-	-	-	-	-	-
29	1	-	-	-	-	-	-
30	1	-	-	-	-	-	-
31	1	-	-	-	-	1	-
32	1	-	-	-	-	-	-
33	1	-	-	-	-	-	-
34	1	-	-	-	-	-	-
35	1	-	-	-	-	-	-
36	1	-	-	-	-	-	-
37	1	-	-	-	-	-	-
38	0	1	1	0	1	0	1
39	0	1	D	1	-	1	0
40	0	1	D	0	1	-	1
41	0	1	1	0	1	-	1
42	0	1	0	0	1	1	1
43	0	1	1	0	1	-	1
44	1	1	1	-	-	-	1
45	0	1	1	-	1	-	1
46	1	1	1	-	-	1	1
47	1	1	1	-	-	1	1

Code du malade	ED	TDR	ELISA	IFI	WB	RT-PCR (MOs)	RT-PCR (Sérum)
48	1	1	0	-	-	1	1
49	1	1	1	-	-	1	1
50	0	1	1	1	-	1	1
51	1	1	1	-	-	-	1
52	1	1	1	-	-	1	1
53	1	1	1	-	-	1	1
54	0	1	1	-	1	-	1
55	0	1	1	-	1	1	0
56	0	1	1	-	1	-	1
57	1	0	1	-	-	-	1
58	0	1	0	-	1	-	1
59	0	1	1	-	1	-	1
60	1	1	1	-	-	1	1
61	0	1	1	-	1	1	1
62	1	1	1	-	-	1	1
63	1	1	1	-	-	1	1
64	1	1	1	-	-	1	1
65	1	1	1	-	-	1	1
66	0	1	D	-	1	-	1
67	0	1	1	-	1	1	1
68	0	1	1	-	1	0	1
69	1	1	1	-	-	-	1
70	1	1	1	-	1	-	0
71	1	1	1	-	-	1	1
72	1	1	1	-	-	1	1
73	1	1	D	-	-	1	1
74	1	1	1	-	-	1	1
75	1	1	1	-	-	1	1
76	1	1	1	-	-	1	1
77	1	0	0	-	-	-	-
78	1	1	1	-	-	-	-
79	1	1	1	-	-	-	-
80	1	0	1	-	-	-	-
81	1	1	1	-	-	-	-
82	1	1	1	-	-	-	-

0 : Résultat négatif

1 : Résultat positif

- : Examen non réalisé

ED : Examen direct (myélogramme)

D : Résultat douteux

MOs : Moelle osseuse

RT-PCR : PCR en temps réel

Annexe 16

Critères diagnostiques du syndrome d'activation macrophagique

Le diagnostic de SAM repose sur l'association de signes cliniques, biologiques et histologiques ou cytologiques. Les critères diagnostiques ont été récemment redéfinis et sont présentés dans le Tableau (Henter *et al.*, 2007).

Critères diagnostiques du syndrome d'activation macrophagique,
d'après Henter *et al.*, 2007

Au moins cinq critères parmi les suivants :

Fièvre

Splénomégalie

Cytopénies affectant au moins deux lignées

- Hémoglobine < 9g/dl
- Plaquettes < 100 000/mm³
- Polynucléaires neutrophiles < 1000/mm³

Hypertriglycéridémie et/ou hypofibrinogénémie

- Triglycérides > 3 mmol/l
- Fibrinogène < 1,5g/l

Hémophagocytose dans la moelle osseuse, la rate ou les ganglions lymphatiques

Pas de néoplasie

Activité des cellules Natural Killer basse ou nulle (selon les références du laboratoire local)

Ferritinémie $\geq 500 \mu\text{g/l}$

Récepteur soluble à l'IL-2 $\geq 2400 \text{ UI/ml}$

Annexe 17

ITS1

>Sample43,44, 2, 10, 17, 3, 29, 28, 4, 39, 36

CTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCGTTTTATACAAAATATACGGCGTTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTGCAGATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAG

>LeishmaniadonovaniFN677358

CGGTGTTTTATCCGCCCGAAAGTTCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAATATACGGCGTTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAG

>LeishmaniainfantumKX664449

GCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAATATACGGCGTTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCCTCCTCTCTTCTGCAATAT

>LeishmaniachagasiGU045591

CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAATATACGGCGTTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATGTGTGCATCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCCTCCTCTCTTCTGCAATATATATATATACCATACACAGTATATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTTTGTGTTGTGCATATTATATGTATATATGCTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACACATGCACTCTCTTTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAACTCCTCTCTGCTTGCAAGCAGTCTTTTTCTCTTTCTCTTTCTCTCTCCATTCTCTCTCTCTTTTTTTCATCAAAAAGGGGGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTTCGAGGGAGAGAGGCTGTGACCAGGATTATTAACAAAAAACCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGCTTAATGGGGGAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGTGGCTCTCTCTGTGTGGTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTGTGTGTATGTGTTTTACACATATATATATCCGCGCCCTCACTCTCTCATATATAATTTATATGTACGCACAGAGAAAAAGAGAGGCGCTCTCTTTTCCCCCACCCCGACAACCTTTGTTTACAGACCTGAG

>LeishmaniatropicaFN677341

CGGTGTTTTATCCGCCCGAAAGTTCACCGATATTTCTTCAATAGAGGAAGCAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCAGCTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATATACAAAACCTCGGGGAGGCTATATATTATACATTATATATAGGCCTTTCCACACATACACAGCAAACCTTTTATACTCGAAGTTTGCAGTAAACAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAATATACGGCGTTTTGGTTTTGTTGGCGGGGGTGCCTGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTGCAGAAATCATTTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAG

ITS2

>Sample4, 39, 36, 37, 29, 28, 17, 43, 44, 10, 2,

TCGTTTTGGTTTTTTGTTTAATAATCCTGGTCACAGCCTCTCTCCCTCGACCCCCCTCCTCTCTCTTTTCTCT
CCCCCTTTTTGATGAAAAAAGAGAGGAGAGAATGGAGAGAGAAAAAGAGAAAGAGAAAAAGACTGCTTTGCAAG
CACCAGAGAGGAGTTTCCACGCGCGCACCCACACAAAAGAGAGTGCATGTGTGTATTTGTCCAACCTCTAAGTGT
CTACGTGTGCACACAGCATATATACATATAATATGCGCACAAACACACACGCTCCTCTTGGCTTCCAACAC
ATAATTATATATATACTGTGTATGGTATAATATATATATGTGCAGAAGAGAGGAGGCGCGTGTGTGTTTTTGT

>LeishmaniainfantumGU045592

CTGGATCATTTTTCCGATGATTACACCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCT
TTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCG
CCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGT
GTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGC
GATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTAT
TGTGTATCCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCTCCTCTCTTCTGCACATA
TATATATTATACCATACACAGTATATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTGTGTTGTGC
GCATATTATATGTATATATGCTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACACATGCACTCTCTT
TTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAACTCCTCTCTGCTTGCAAGCAGTCTTTTTCTCTTCTCTTTTTCTCTCT
CCATTCTCTCCTCTCTTTTTTTCATCAAAAAGGGGGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTTCGAGGGAGAGAGG
CTGTGACCAGGATTATTAACAAAAAACCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGTCTAATGGGG
GGAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGTGGCTCTCTCTCTGTGTGGTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTG
TGTGTATGTGTTTTACACATATATATATCCGCGCCCTCACTCTCTCATATATAATTTATATGTACGCACAGAGAA
AAAAGAGAGGCGCTCTCTTTTCCCCCACCCCCGACAACCTTTGTTTACAGACCTGAG

>LeishmaniachagasiGU045591

CTGGATCATTTTTCCGATGATTACACCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCT
TTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCG
CCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGT
GTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGC
GATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTAT
TGTGTATCCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCTCCTCTCTTCTGCACATA
TATATATTATACCATACACAGTATATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTGTGTTGTGC
GCATATTATATGTATATATGCTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACACATGCACTCTCTT
TTGTGTGGGTGCGCGCGTGGAACTCCTCTCTGCTTGCAAGCAGTCTTTTTCTCTTCTCTTTTTCTCTCT
CCATTCTCTCCTCTCTTTTTTTCATCAAAAAGGGGGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTTCGAGGGAGAGAGG
CTGTGACCAGGATTATTAACAAAAAACCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGTCTAATGGGG
GGAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGTGGCTCTCTCTCTGTGTGGTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTG
TGTGTATGTGTTTTACACATATATATATCCGCGCCCTCACTCTCTCATATATAATTTATATGTACGCACAGAG
AAAAAGAGAGGCGCTCTCTTTTCCCCCACCCCCGACAACCTTTGTTTACAGACCTGAG

>LeishmaniadonovaniAM901451

CTGGATCATTTTTCCGATGATTACACCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCT
TTCCACATACACAGCAAAGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCG
CCTATACAAAAGCAAAATGTCCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGT
GTGGATAACGGCTCACATAACGTGTGCGGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGG
ATAAGTGGTATCAATTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTTGAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATT
GTGTATCCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCTCCTCTCTTCTGCACATAT
ATATATTATACCATACACAGTATATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGAGGAGGCGTGTGTTGTGTTGTGCG
CATATTATATGTATATATGCTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACACATGCACTCTCTT
TGTGTGGGTGCGCGCGTGGAACTCCTCTCTGCTTGCAAGCAGTCTTTTTCTCTTCTCTTTTTCTCTCTC
CATTCTCTCCTCTCTTTTTTTCATCAAAAAGGGGGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTTCGAGGGAGAGAGG
TGTGACCAGGATTATTAACAAAAAACCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGTCTAATGGGG
GAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGTGGCTCTCTCTCTGTGTGGTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTG
GTGTGTGTATGTGTTTTACACATATATATATCCGCGCCCTCACTCTCTCATATATAATTTATATGTACGCACAGA
GAAAAAGAGAGGCGCTCTCTTTNCCCCCACCCCCGACAACCTTTGTTTACAGACCTGAGTGT

>LeishmaniatropicaKT972150

CACGCCGCCTCCTCTCTTCTGCATATATGTATATATATACATTATATATAATATGTGTGGAAGCCAAGAGGAGGC
GTGTGTTTTGTGTTGTGCGCATATATATATATATTATATGTGTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAA
ATACACGCATGCACTCTCTTTTGTGTGGGTGCGAGCGTCGAACTCCTCTCTGGTGCTTGCGCAAAGCAGTCTTT
CCCTTTCTCTCTTTCTCTCTCCATTTTCTCTCCTCTTTTTTCATCAAAAAAGGGGGAGAGAAAAAGAGGGGAGAA
AAAGGGGGTCGAGAGGGAGAGAGGCTGTGACCAGGATTATTAAACAAAAAACAAAACGAGAATTCAACTTCGCG
TTGGCCATTTTTTGCTTAATGGGGGGTGGGTGTGGTGTGTGTGGCCCTCTCTCTCTCTGTATGTGTGTGGTATAT
ATATTATATTACACGCACAGAGAACAAAGAGAGGGGTCTTCCCCCAACCCTTCCCCCGACAACCTTTGTTTACA
GACCTGAGTGT

CYTB

>Sample2

17

TGGTGTAGGTTTTAGTCTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATAATATGTGGTGTGTGTTAGCGTGGTTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTTCGACTTAGGTTTTGTAATACGTAG
TACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTTCTTCTTTATGTCCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAAT
ATTGTTTGATACACATATTTTAGTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTAT
TGGTTATGTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTAGCAACCGTCCC
AGTTATAGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACATTATTAATAATTACA
TGTATTACATGTTTTATTACCATTTCGTATTAATACTTGAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACCTTATTTTAT
GAGTTCGGATGGGTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTTGTATGTGATTTTATTTAAG
AGATATGTTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTTTGTGATTTATTTTATTTTTATAAATTGATATTTTGTATTTCA
TGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTAATAACATCTGATAAGATTCTCCCCTGAATGATTTTTTTTATTCTT
ATTTGGTTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAGTTTACTGGTTTATTATTAATGG

730

516

>LeishmaniainfantumAB095958

TGGTGTAGGTTTTAGTCTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATAATATGTGGTGTGTGTTAGCGTGGTTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTTCGACTTAGGTTTTGTAATACGTAG
TACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTTCTTCTTTATGTCCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAAT
ATTGTTTGATACACATATTTTAGTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTAT
TGGTTATGTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTAGCAACCGTCCC
AGTTATAGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACATTATTAATAATTACA
TGTATTACATGTTTTATTACCATTTCGTATTAATACTTGAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACCTTATTTTAT
GAGTTCGGATGGGTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTTGTATGTGATTTTATTTAAG
AGATATGTTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTTTGTGATTTATTTTATTTTTATAAATTGATATTTTGTATTTCA
TGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTAATAACATCTGATAAGATTCTCCCCTGAATGATTTTTTTTATTCTT
ATTTGGTTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAGTTTACTGGTTTATTATTAATGG

>LeishmaniadonovaniAB095957

TGGTGTAGGTTTTAGTCTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATAATATGTGGCGTGTGTTAGCGTGGTTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTTTTATTTTTATGAGATTTTCGACTTAGGTTTTGTAATACGTAG
TACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTTCTTCTTTATGTCCATATATTTAAGTGTATAGTATTAATAAT
ATTGTTTGATACACATATTTTAGTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTTATAGTAATAATAGGTTTTAT
TGGTTATGTATTACCATGTACGATGATGTCGTATTGAGGTCTAACAGTATTTAGTAATATTTTAGCAACCGTCCC
AGTTATAGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACATTATTAATAATTACA
TGTATTACATGTTTTATTACCATTTCGTATTAATACTTGAATATTTATGCATTTATTTTGTTTACATTATTTTAT
GAGTTCGGATGGGTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTTGTATGTGATTTTATTTAAG
AGATATGTTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTTTGTGATTTATTTTATTTTTATAAATTGATATTTTGTATTTCA
TGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTAATAACATCTGATAAGATTCTCCCAGAAATGATTTTTTTTATTCTT
ATTTGGTTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAGTTTACTGGTTTATTATTAATGG

>LeishmaniachagasiAB095959

TGGTGTAGGTTTTAGTTTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATAATATGTGGTGTGTGTTTAGCGTGGTTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAAATTGATATTTTGTGTTTTATTTTTATGAGATTTTCGACTTAGGTTTTGTAATACGTAG
TACACACATTTGTTTTACTTCATTATTATTTTTCTTCTTTATGTTTCATATATTTAAGTGATAGTATTAATAAT
ATTGTTTGATACACATATTTTAGTATGAGTGGTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTAT
TGTTTATGTATTACCATGTACGATGATGTCGATTGGGGTTTAAACAGTATTTAGTAATATTTTAGCAACCGTCCC
AGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATTTGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACATTATTAATAATTACA
TGTATTACATGTTTTATTACCATTCGTATTAATACTTGTAATATTTATGCATTTATTTTGTGTTACATTATTTTAT
GAGTTCAGATGGGTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTTGTATGTGATTTTATTTACG
AGATATGTTTTTAGCATTTTTAATATTGTTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTGTATTTC
TGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACATTAACATCTGATAAGATTCTCCAGAATGATTTTTTTTATTCTT
ATTTGGTTTTTTAAAGGCAGTACCTGATAAGTTTACTGGTCTATTATTAATGG

>LeishmaniakillickiAB434676

TGGTGTAGGTTTTAGTTTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATCATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGATTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAACTGATATTTTGTGTTTTATTTTTATGAGATTTTGATTTAGGGTTTGTAAATACGAAG
TACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTCTTCTTTATGTTTCATATATTTAAGTGCATAGTATTAATAAT
ATTATTTGACACACATATTTTAGTGTGGGTGGTAGGTTTTGTAATATATATATTTATAGTAGTAATAGGTTTTAT
TGTTTATGTTTTACCATGTACAATGATGTCTTATTGGGGATTAACAGTGTTTAGTAATATTTTAGCAACTGTTCC
AGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACACTGTTAAATAATTACA
TGTATTGCATGTACTATTACCTTTTGTATTAATACTTGTTATATTTATGCATTTGTTTTGTTTACATTACTTTAT
GAGTTCAGATGGTTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAGCGTTTATGTTTTTGTATGTGGTTTTATTTGCG
TGATATGTTTTTAGCTTTTTTGTATATTATTTTTTGCATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTGTGTTTTCA
TGAAGAGTCATGAGTAATAGTTGATACCTTAACATCTGATAAGATTCTTCTGAATGATTTTTTTTATTTTT
ATTCCGATTTTTTAAAGGCTGTACCAGATAAATTTACTGGTTTATTATTGATGG

>LeishmaniatropicaKT972270

TGGTGTAGGTTTTAGTTTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAGATCATATGTGGTGTGTTGTTTAGCATGATTATTTTT
TAGTTGTTTTATATGTACAACTGATATTTTGTGTTTTATTTTTATGAGATTTTGATTTAGGGTTTGTAAATACGAAG
TACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTCTTCTTTATGTTTCATATATTTAAGTGCATAGTATTAATAAT
ATTATTTGACACACATATTTTAGTGTGGGTGGTAGGTTTTGTAATATATATATTTATAGTAGTAATAGGTTTTAT
TGTTTATGTTTTACCATGTACAATGATGTCTTATTGGGGATTAACAGTGTTTAGTAATATTTTAGCAACTGTTCC
AGTTATTGGTACTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAGTATATTAATGATTTTACATTGTTAAATAATTACA
TGTATTGCATGTACTATTACCTTTTGTATTAATACTTGTTATATTTATGCATTTGTTTTGTTTACATTATTTTAT
GAGTTCAGATGGTTTTTGTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAGCGTTTATGTTTTTGTATGTGGTTTTATTTGCG
TGATATGTTTTTGGCTTTTTTGTATATTATTTTTTGTGATTTATTTTATTTTATAAATTGATATTTGTGTTTTCA
TGAAGAATCATGAGTAATAGTTGATACCTTAACATCTGATAAGATTCTTCTGAATGGTTTTTTTATTTTT
ATTCCGATTTTTTAAAGGCTGTACCAGATAAATTTACTGGTTTACTATTGATGG

Annexe 18

CIRCULAIRE N°01/MSRH/OGPPS DU 05 JANVIER 2014 RELATIVE A LA MISE EN ŒUVRE DES DISPOSITIONS FIXEES DANS L'ARRETE N°133/MSPRH/SG DU 30 DECEMBRE 2013 MODIFIANT ET COMPLETANT LA LISTE DES MALADIES A DECLARATION OBLIGATOIRE FIXEE PAR L'ARRETE N°179/MS. DU 17 NOVEMBRE 1990

<p>CATEGORIE 1 : La nouvelle liste des maladies sous surveillance nationale soumise à une déclaration obligatoire selon modalités fixes par l'arrêté n° 179</p>	<p>CATEGORIE 2 : Les maladies sous surveillance internationale soumise à une déclaration obligatoire à l'autorité sanitaire nationale et obligatoirement notifiés à l'OMS</p>
<ol style="list-style-type: none"> 1. BILHARZIOSE 2. BOTULISME 3. BRUCELOSE 4. CHARBON 5. COQUELUCHE 6. DIPHTERIE 7. DYSENTERIE AMIBIENNE ET BACILLAIRE 8. FIEVRE TYPHOÏDE ET PARATYPHOÏDE 9. HEPATITE VIRALE A 10. HEPATITE VIRALE B 11. HEPATITE VIRALE C 12. INFECTION VIH/SIDA SYMPTOMATIQUE ET ASYMPTOMATIQUE 13. KYSTE HYDATIQUE 14. LEGIONELLOSE 15. LEISHMANIOSE VISCERALE 16. LEISHMANIOSE CUTANEE 17. LEPRE 18. LEPTOSPIROSE 19. MENINGITE A MENINGOCOQUE 20. MENINGITE A PNEUMOCOQUE 21. MENINGITE A HAEMOPHILUS INFLUENZAE 22. AUTRES MENINGITES (A PRECISER) 23. PALUDISME 24. PARALYSIE FLASQUE AIGU 25. PESTE 26. RAGE 27. RICKETTSIOSES (Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne) 28. ROUGEOLE 29. RUBEOLE 30. SYPHILIS 31. TETANOS NEONATAL 32. TETANOS NON NEONATAL 33. TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES COLLECTIVES 34. TRACHOME 35. TUBERCULOSE PULMONAIRE 36. TUBERCULOSE EXTRA-PULMONAIRE 37. TYPHUS EXANTHEMATIQUE 38. URETHRITE GONOCOCCIQUE ET NON GONOCOCCIQUE 	<ol style="list-style-type: none"> 1. CHIKUNGUNYA 2. CHOLERA 3. DENGUE 4. FIEVRES HEMORRAGIQUES 5. FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT 6. FIEVRE DU WEST NILE 7. GRIPPE HUMAINE CAUSEE PAR UN NOUVEAU SOUS TYPE 8. POLIOMYELITIS A UN POLIOVIRUS SAUVAGE 9. SYNDROME RESPIRATOIRE AIGU SEVERE (SRAS) 10. VARIOLE

Epidemiology of Infantile Visceral Leishmaniasis in Western Algerian And The Convenience of Serum For The Disease Diagnosis by PCR and Immunochromatography

Hadj Slimane Touria^{1*}, Senouci Kheira¹, Midoun Nori², Bouchetara Assia³, Laradj Amel³, Bittar Fadi⁴

1. Natural and Life Sciences Faculty, Department of Biology, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria.

2. Department of Epidemiology and Preventive Medicine, University Hospital of Oran (EHU), Oran, Algeria.

3. Infectious Diseases Department, Pediatric Hospital of Oran (EHS), Oran, Algeria.

4. Aix-Marseille University- Faculty of Pharmacy, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France.

Submitted 2 December 2017; Accepted 14 February 2018; Published 14 March 2018

Epidemiological situation of infantile visceral leishmaniasis (IVL), which is a public health problem in Algeria, is almost unknown in the cities of Western part of the country. The aim of this study was to analyze the epidemiological, clinical, biological, therapeutic, and evolutionary aspects of IVL in Western Algeria, to evaluate the performance of the immunochromatography as a rapid diagnostic test of the disease, and to propose a diagnosis approach by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay from the serum. This prospective study was performed on 63 suspicious cases of visceral leishmaniasis collected from the infectious diseases department at the Pediatric Hospital of Oran from January 2012 to July 2017. For each patient, the epidemiological parameters, and the clinical and biological data were collected. Bone marrow and blood samples were drawn from all cases. Bone marrow was performed to research amastigote forms of *Leishmania* and to identify the species by PCR-sequencing. Blood samples were used to detect anti-*Leishmania* antibodies as well as parasite DNA. Patients from the Western regions were mostly from rural areas. Sensitivity of RT-PCR from the bone marrow and from serum was 95.45% and 94.44%, respectively. The immunochromatography allowed the disease's diagnosis for 11 cases whose myelogram did not confirm the presence of the amastigote forms of *Leishmania*. Immunochromatography was revealed to be a good technique for disease diagnosis regarding the strongly evocative clinical signs. The results also suggest the interest of the RT-PCR assay from patient serum as a non-invasive sample, in the detection of parasite DNA.

Key words: Immunochromatography, RT-PCR, bone marrow, serum, sequencing, *Leishmania infantum*

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by the multiplication of a protozoan parasite, *Leishmania* in the reticulo- endothelial system cells.

They are transmitted by the bite of a vector insect, the female sandfly. Algeria is the most affected country in the Mediterranean basin and in the

* Corresponding author: Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, 31 000, Algérie. Email: hadjslimanetouria@gmail.com

Maghreb by two clinical forms, cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. Both are part of the notifiable diseases.

Visceral leishmaniasis is distributed on the northern part of the country at the bioclimatic humid and subhumid level floors, mainly in Kabylie. Currently, it extends into all areas; many cases are reported in the foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis (1, 2).

Leishmaniasis usually affects young children with 111 new cases each year (3). The most often isolated parasite is *Leishmania infantum* zymodeme MON-1, having as the animal reservoir; the dog, and as vectors, *Phlebotomus perniciosus* and *P. longicuspis* (4, 5).

The epidemiological situation of IVL in Western Algeria is poorly documented. The diagnosis is still based on direct examination of the parasite in the bone marrow smear after staining.

The aim of this study was to draw up epidemiological, clinical and biological profile of IVL in Western Algeria through children hospitalized at the pediatric hospital of Oran, and to show the convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR and by immunochromatography.

Materials and methods

Patient and sample collection

This prospective study has concerned 63 suspicious cases of IVL collected from the infectious diseases department at the Pediatric Hospital of Oran over a 67 months period. The children were hospitalized under clinical and biological arguments, evoking a visceral leishmaniasis.

For each patient included in the study, the epidemiological parameters (age, sex, geographical origin, etc.), the clinical and biological data, were collected from the medical record. Bone marrow and blood samples were drawn from all cases. The

anonymity of the patients and the confidentiality of their information were respected.

Bone marrow, collected at the level of the iliac crest, was spread in thin smear, on slides, fixed with methanol or the May Grünwald, and colored with Giemsa for the research of *Leishmania*'s amastigote forms. After reading, the slides were kept at room temperature.

The blood samples drawn in dry tube were centrifuged at 1509 xg for 5 min. After separation, 20 µl of sera were placed on the absorbent part on the strip of the rapid test by immunochromatography for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. The remaining sera were later aliquoted into Eppendorf tubes, and stored at -20 °C.

To evaluate its specificity, the immunochromatography was carried out on 27 serum samples of patients with other pathologies (tuberculosis, malaria, toxoplasmosis, brucellosis, hepatitis B, cutaneous leishmaniasis, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), and polyarthritis), and 10 serum samples from negative controls.

A total of 22 bone marrow smears from confirmed cases were scraped using a sterile scalpel. The scraping powder of each of these smears was placed in a previously coded sterile Eppendorf tube. To evaluate its specificity, the bone marrows of 9 cases with other pathologies as well as that of a negative control case were introduced in the study.

The sera and powders of the conserved bone marrows were intended for molecular study by RT-PCR and PCR-sequencing.

The research protocol was approved by the Ethics Committee of University Hospital of Oran (EHU).

DNA Extraction

DNA was extracted from the two types of samples using Qiagen EZ1 kit (QIAamp DNA tissue kit, Qiagen, Germany). 200 µl of each patient's serum was deposited in a flat-bottom sample tube provided in the kit. The tube was the

nplaced in the extraction automat (EZ1 Biorobot QIAGEN).

Pretreatment of bone marrow's scraping powder by 200 µl of buffer and 20 µl of proteinase K, and a dry incubation at 56 °C for 2 h was performed. The mixture was centrifuged at 3578 xg for 5 s, and 200 µl of the supernatant of each sample was placed in a flat bottom tube.

For both sample types, the program with 200 µl of elution volume was selected and launched.

Real time PCR

Parasites of the genus *Leishmania* have been targeted by RT-PCR in a CFX96 Real-time System (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) instrument, using the following primers: Leish F (5' ACAAGTGCTTTCCCATCG 3'), Leish R (5' CTCAGAGGCCGTGAGTTG 3') and the probe Leish P (6FAM CGGTTCGGTGTGTGGGSC-C). The final volume of the PCR mixture was 20 µl (15 µl Mix (Taqyon)+5 µl DNA). Amplification was done as follows: an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing and elongation at 60 °C for 60 s.

PCR Amplification and sequencing

Standard PCR instrument (AB Applied Biosystems, USA) was used to detect the *Leishmania* parasite by amplifying 500-, 400-and 800 bp segments of the internal transcribed spacer1 (ITS1) region, the internal transcribed spacer2 (ITS2) region, and the cytochrome b (Cytb) gene, respectively, using primers: ITS1 R (5' CAC GGGGATGACACAATAGAG 3'), ITS1 F (5' CAATACAGGTGATCGGACAGG 3'), ITS2 R (5' GGCCAACGCGAAGTTGAATTC 3'), ITS2 F (5' GCATGCCATATTCTCAGTGTC 3'), LCYT S (5' GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG 3') and LCYT R (5' CTACAATAAACA AATCATAATATRCAATT 3').

The final volume of the PCR reaction was 50 µl (45 µl Mix (ATQ Gold Master amplifier)+5 µl DNA). The technique was performed with an initial denaturation step at 95°C for 15 min, followed by 40

cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, an annealing temperature which depends on the used primer (ITS1: 55 °C, ITS2: 60 °C; CYTB: at 52 °C) for 30 s, and elongation at 72 °C for 1 min, with final extension step at 72 °C for 5 min.

The PCR products were analyzed using agarose gel electrophoresis and visualized in a darkroom on the UV table of the Doc XR+ gel transilluminator (BIO-RAD). Positive PCR products were then purified and sequenced in both directions using the BigDye® Terminator. Sequencing was performed on an automated ABI PRISM 3130 sequencer (Applied biosystems, Foster City, CA). The resulting sequences have been analyzed, corrected, and assembled using the CodonCode Aligner software.

Leishmania species were identified by using a BLAST (basic Local Alignment Search Tool) accessible in the molecular database (Genbank, NCBI) available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. DNA sequences from each parasite were retrieved in FASTA format and aligned with other sequences referenced in the GenBank. The similarity percentages were determined using the MEGA 7 software.

Statistical analysis

In this descriptive study, all parameters have been analyzed by the Epi Info software version 6.04d f. The average and standard deviation were calculated for the quantitative variables and the percentage for the qualitative variables. Sensitivity, specificity, negative and positive predictive values were estimated with confidence intervals at 95%.

The Youden Index (j) and the coefficient of Yule (Q) were introduced for the first time in the evaluation of the rapid test's performance by immunochromatography (rk39).

Results

A total of 39 patients were retained in this study. The others (n=24) were excluded because other

diseases with clinical signs that were similar with those of LV have been confirmed, revealing either malaria and leukemia.

Patients were divided into 21 boys and 18 girls, with a sex ratio of 1.17. The average age was 2.16 ± 2.48 years with extremes ranging from 7 months to 14.5 years; 94.87% of patients were less than 5 years old. All patients were from Western Algeria, Relizane (12), Mostaganeme (6), Oran (4), Ain Temouchent (4), Chlef (3), Mascara (3), Saïda

(3), Adrar (1), Tiarat (1), Tindouf (1) and Tissemsilt (1) (Figure 1).

89.74% (n=35) of patients originated from a rural or semi-urban environment, and 79.49% (n=31) had low socio-economic level. The disease occurred in Spring in 48.72% of cases (n=19).

The average hospitalization time of patients was 65.89 ± 66.03 days with extremes of 7 to 360 days, and the diagnosis period was 7.92 ± 13.93 days with extremes from 1 to 60 days. The reasons for

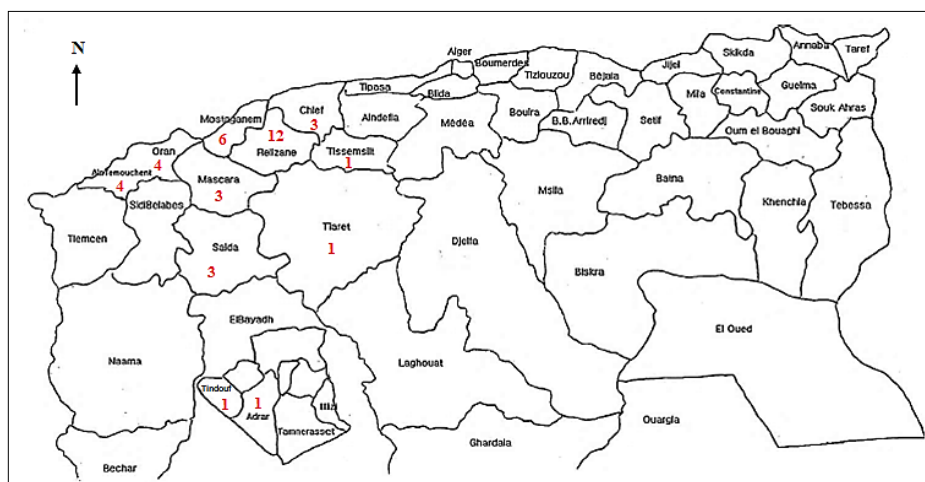


Fig. 1. Distribution of cases according to the state of provenance.

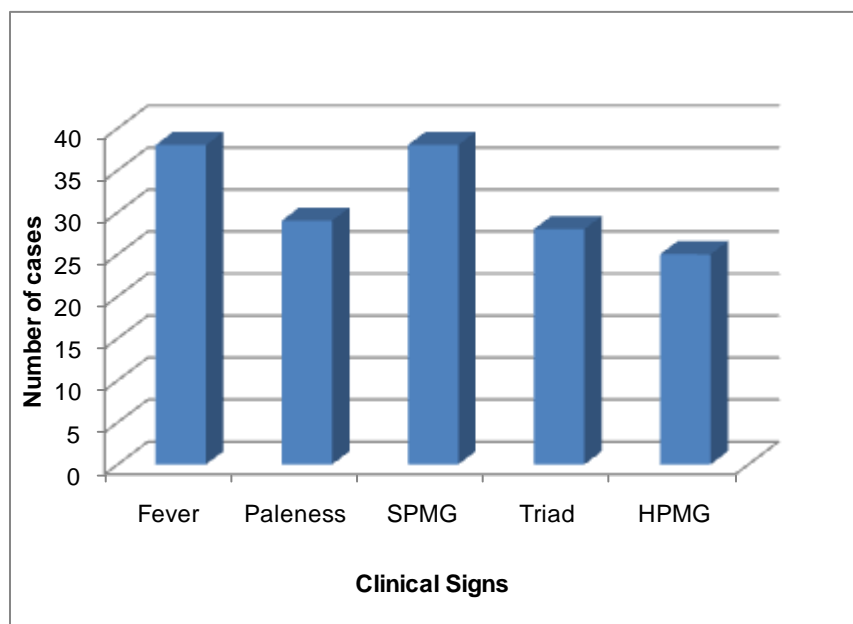


Fig. 2. Distribution of cases according to clinical signs suggestive of the VL. HPMG : hepatomegaly; SPMG: splenomegaly.

hospitalization are shown in table 1.

The evocative clinical signs of LV are shown in Figure 2; they are dominated by the classic triad: fever, paleness, and splenomegaly (SPMG).

The temperature was taken daily, every 3 h was intermittent, irregular with one to four peaks (39-42 C) interspersed of apyrexia periods.

Biological signs were represented in 100% of cases by anemia, mainly of hypochromic microcytic type with a hemoglobin rate ranging from 3.4 to 10.1 g/dl. It was corrected in 94.87% of cases by the blood transfusion. Leukopenia, thrombocytopenia, and C reactive protein (CRP) were observed in 66.67%, 92.31%, and 79.49% of cases respectively (Figure 3).

Apart from the clinical signs suggestive of the VL, the patients showed less frequent signs, represented in table 2.

Four cases have presented a macrophage activation syndrome (MAS) secondary to visceral leishmaniasis, in which the diagnosis was posed by the presence of fever, cytopenia and splenomegaly, associated with the biological parameters indicated in table 3. Direct exam and immunochromatography performed for all patients showed a positivity rate of 44, 44% and 57.14%, respectively.

Myelogram showed the amastigote forms of *Leishmania* in 71.8% (n=28) of cases (Figure 4). The immunochromatography detected the anti-*Leishmania* antibodies in 92.3% (n=36) of cases. This latter showed a specificity and a positive predictive value (PPV) of 100%, a negative predictive value (NPV) of 88.9%, a Youden index (j) of 0.92 and a Yule's coefficient Q equivalent to 1.

The absence of the test line on the immunochromatography strips in control cases sera justifies the lack of cross-reaction between VL and other infections (tuberculosis, malaria, toxoplasmosis, brucellosis, hepatitis B, cutaneous leishmaniasis, AIDS and rheumatoid arthritis) and increases the specificity of the test.

RT-PCR, realized from the bone marrow's scraping powder of the 22 confirmed cases, has detected parasitic DNA in 21 of them. It showed a sensitivity of 95.45%, and a specificity of 100%. RT-PCR made from sera of 33 patients, showed a sensitivity of 93.9%, and a specificity of 100%.

Phylogenetic analysis revealed that the obtained sequences were regrouped and corresponded to the sequences of *L. infantum*. In the case of Cytb, the sequence assembly was only possible for one case (Figure 5).

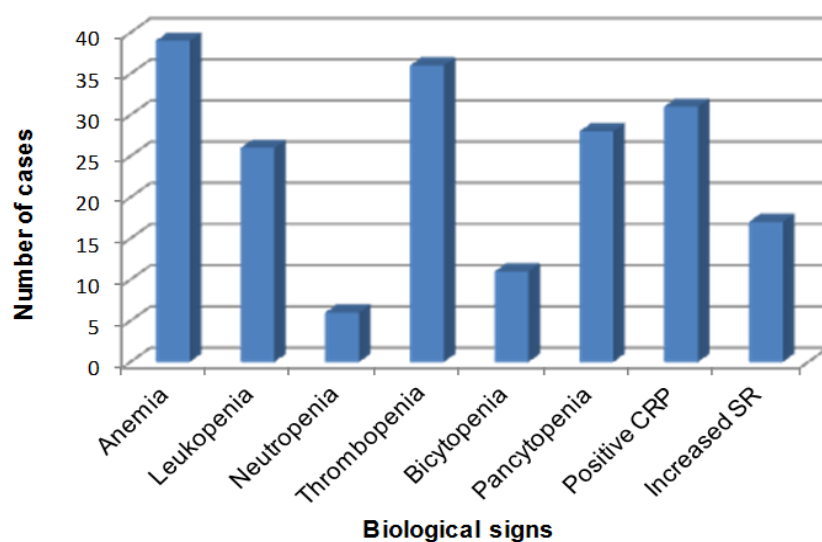


Fig. 3. Distribution of cases according to the biological signs. SR: Increased sedimentation rate.

Table 1. Hospitalization motifs of patients.

Hospitalization motif	Number of cases	Percentage
Febrile hepatosplenomegaly	13	33,33
Fever	11	28, 2
Febrile splenomegaly	8	20,51
Febrile splenomegaly and Pancytopenia	3	7,69
Pancytopenia	1	2,56
Fever and Pancytopenia	1	2,56
Bicytopenia	1	2,56
Febrile hepatosplenomegaly and bicytopenia	1	2,56
Total	39	100

Table 2. Other clinical Signs

Clinical signs	Number of cases	Percentage
Anorexia	13	33,33
Asthenia	14	35,90
Cough	10	25,64
Altered general status	7	17,95
Vomiting	6	15,38
Malnutrition	6	15,38
Epistaxis	6	15,38
Edema	4	10,26
Oral candidiasis	5	12,82
Skin Lesions	3	7,69
Slimming	4	10,26
Diarrhea	1	2,56
Dehydration	2	5,13
Peri-rectum abscess	2	5,13
Cervical adenopathy	2	5,13

Table 3. Biological parameters in VL-MAS cases.

Biological parameters	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Leukocytes (4 000-10 000/mm ³)	1230	2640	2900	3250
Hemoglobin (12-18g/dl)	4,7	4,6	3,4	3,4
Platelets (150 000-400 000/mm ³)	37 000	1100	6000	9000
Ferritin (20-300µg/L)	11 645,33	NR	70 786	96 820
Triglycerides (<1,5nmol/L)	1,56	3,6	4,94	4,3
C-reactive protein (<10mg/L)	87,39	60	>60	36
Fibrinogen (2-4g/L)	3,37	1,66	3,74	1,18

NR: Not realized

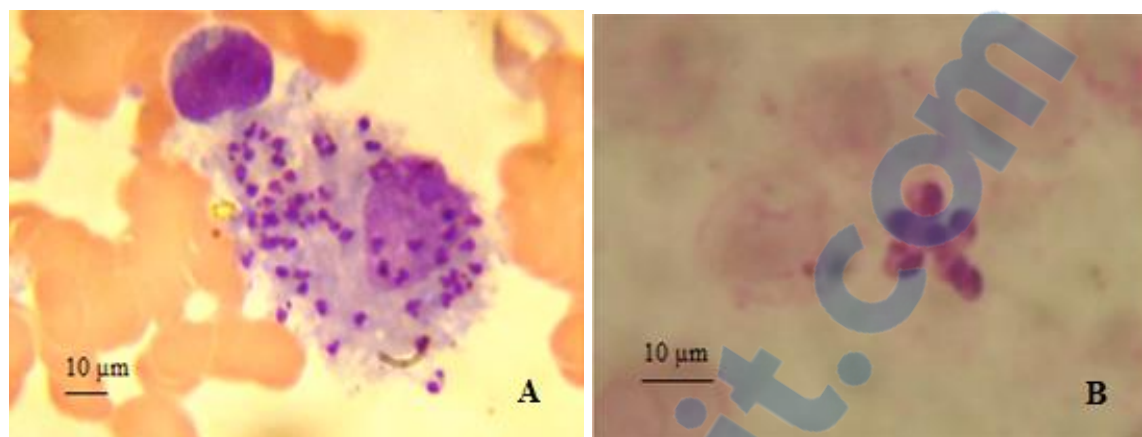


Fig. 4. *Leishmania* amastigote forms. A: intracellular and B: extracellular forms observed under optical microscope (x 1000)

Among the patients of our series, 37 cases were treated with N-methyl-glucamine (Glucantime®), of which 36 were given two cures of 15 days each and 15 days of interval by deep intra muscular injection at the dose of 20 mg/Kg/day. The 37th who has presented a stibio-intolerance's sign (fever resumption) that received a single cure of 30 days at the same dose. A case that healed spontaneously did not need the treatment. One patient died before receiving his treatment, and two others did not respond to the treatment.

Discussion

In the Maghreb countries, IVL is predominant in young children in which 95% of cases are less than 5 years old, realizing the infantile Mediterranean Kala-azar (6). The disease in this age group has already been registered in Algeria (7, 8). The disease occurrence is explained by a beam of arguments among which the immaturity of the child's immune system and the sandfly's most marked affinity for this latter (9).

The appearance age of the disease corresponds to the period in which the infant loses maternal antibodies (7-15 months) and becomes sensitive to pathogens (10). However, cases were indicated in young adolescents aged from 13 to 14 years old (11). These results support those in our series.

A slight male dominance is noted in the majority of series (12), which reinforces our results. But according to the synthesis made on the VL by Carré and al. (2010), there is no gender difference outside the Indian hotbed where the prevalence of male subjects is due to their greater exposure to bites than to a particular sensitivity. 84.61% of the surveyed cases originated from the Algerian northwest regions, with humid or subhumid bioclimatic levels. The work of Harrat and collaborators (7, 13) emphasizes the likely emergence of new hotbeds particularly in this part of the country.

15.38% of the cases (n = 6) originated from the highlands and the Sahara, areas with arid or semi-arid climates, favorable to parasitic cycle of zoonotic cutaneous leishmaniasis (7).

Also, the majority of this child population was derived from a rural or semi-urban environment which combines the favorable conditions to the parasite's transmission, the animal's reservoirs (stray and domestic dogs) are numerous, and the larvae find in abundance the organic matter necessary for their development.

The high rate of cases in Spring (48.72%) would be related to the seasonal transmission of *L. Infantum* from July to October, which could also explain the appearance of the first symptoms

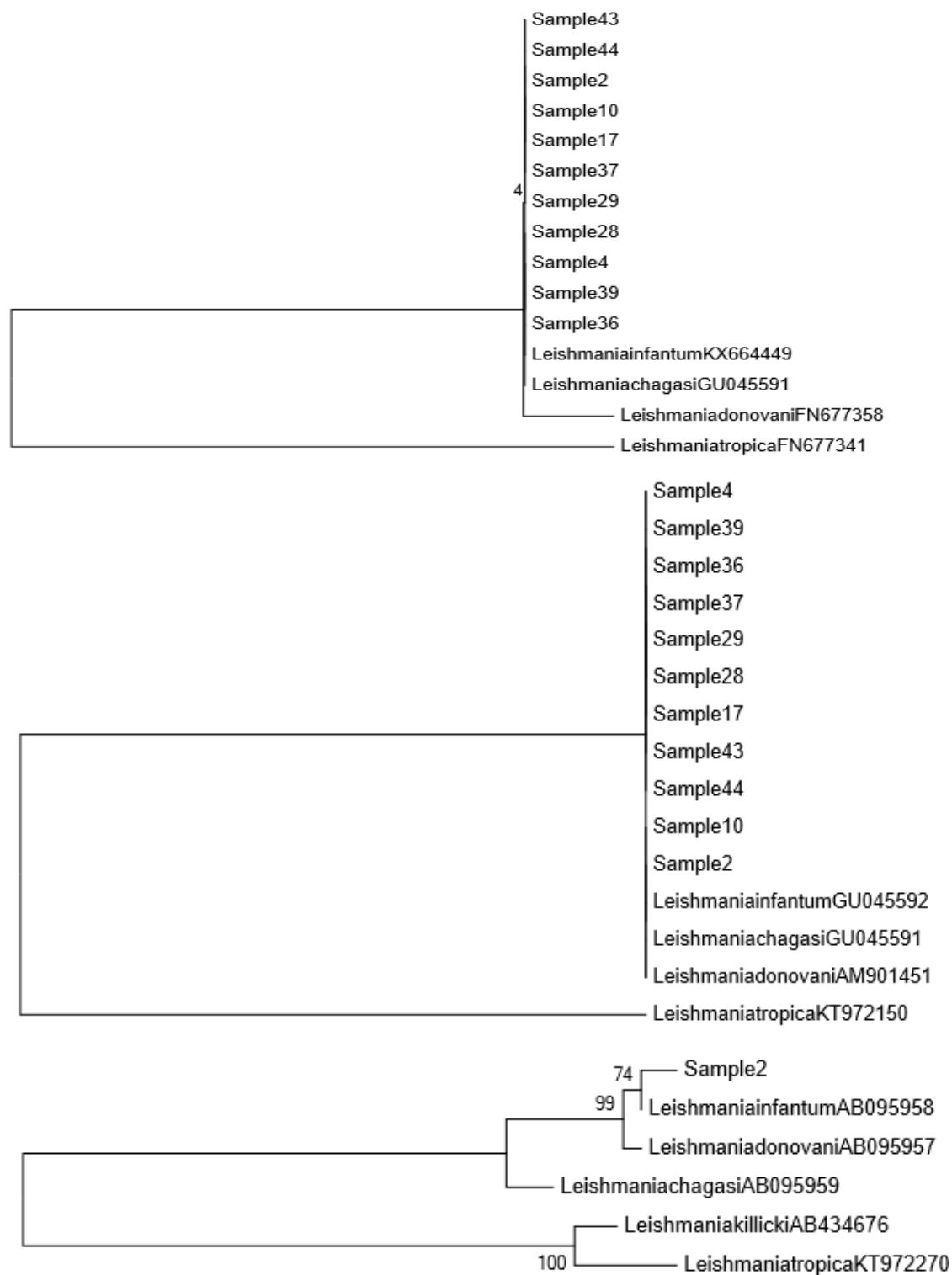


Fig. 5. Phylogenetic tree of the *Leishmania* species. Phylogenetic tree was drawn based on sequences of the ITS1 (500 pb), ITS2 (400 bp), and Cytb (800 bp) amplified from bone marrow samples of prospective cases.

in 28.57% of cases in March. The same observations are resulting from studies performed in Tunisia(14,15).

Prolonged hospitalization is probably due to the absence of rural population awareness campaigns on the severity of VL. Underestimation by parents of certain early symptoms (moderate non-continuous fever or discrete anemia) extends this period and, as a result, cases are registered throughout the year (10).

The case distribution of our study throughout the year and their late hospitalization has led to serious complications and even death.

As clinical signs, the majority of the patients had a splenomegaly, a skin-mucous pallor, and a fever that resisted antibiotic treatment. The triad: paler-splenomegaly-fever, signing in favor of an IVL, was observed in 71.79% of cases, and

hepatomegaly was present in in 64.10% of cases. These results are close to those found in other studies (Table 4).

Macrophage activation syndrome secondary to visceral leishmaniasis (MAS-VL) is a predominantly pediatric disease as shown in the study of 56 cases including 8 adults only (20). It is due to an immune dysregulation favored by hyperproduction of cytokines by the infectious agent, *Leishmania*. The diagnosis of MAS was retained in 4 children by the presence of 5 characters out of 8 cited by Henter et al. (21).

The specific biological signs of IVL, found in the literature, correspond to a bicytopenia or a pancytopenia, and an important inflammatory syndrome (22, 12). These signs reinforce our observations with the presence of bicytopenia in 28.21% of cases, and pancytopenia in 71.79% of

Table 4. Rate of clinical signs appearance of the VL according to some literature studies.

Studies	SPMG	Fever	Triad	HPMG	Paleness
(Oran, Algeria, 1 st study) (n=14) (16)	92,85%	100%	-	85,71%	-
(Fes, Morocco) (n=209) (12)	97.66%	94.5%	-	47.36%	50%
(Rabat, Morocco) (n=93) (17)	98,9%	92,4%	76,3%	48,4%	-
(Oran, Algeria, 2 nd study) (n=40) (18)	90%	87.5%	47.5%	42.5%	60%
(Kairouan, Tunisia) (n=240) (19)	97,9%	79,9%	-	47,3%	-
Our study (n=39)	97,44%	97,44%	71,79%	64,10%	74,36%

SPMG: splenomegaly; HPMG: hepatomegaly.

Table 5. Summary of the bibliographic data

Studies	Se	Sp	PPV	NPV	J	Q	Serum number
Italia (28)	100%	100%	-	-	-	-	11
Bresilia (1 st study) (30)	85.7%	82%	-	-	-	-	21
Nepal (1 st study) (31)	97%	71%	-	-	-	-	139
Nepal (2 nd study) (32)	100%	100%	-	-	-	-	14
India (33)	99%	89%	-	-	-	-	150
French (34)	97%	98%	89%	94%	-	-	34
Bresil (2 nd study) (35)	93%	97%	98%	89%	-	-	332
Tunisia (36)	87.1%	94.4%	96.2%	81.9%	-	-	574
Present study	92,3%	100%	100%	88,9%	0,92	1	100

Se: sensitivity; Sp: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; J: Youden index; Q: Yule's coefficient.

cases. The inflammatory syndrome was represented by a positive CRP in 79.49% of cases, and by accelerated erythrocyte sedimentation rate in 43.59% of cases.

A positive CRP associated with other signs suggestive of VL, is a good element of diagnosis orientation. This diagnosis is often difficult in front of non-specific clinical signs that are confused with those of other infections (malaria, tuberculosis, brucellosis, enteric fever,...) (23, 24). The direct examination of the bone marrow, thus represents the reference method, and of the first intention of the parasitosis's diagnosis. The literature reports a positivity rate of 54 to 85% which may even exceed 90% when the examiner is experienced (25, 26). In this study, the diagnosis of the disease was brought by the direct exam in 66.67% of the cases.

This exam was negative in 11 cases, probably due to the hemodilution of the sample and the very low parasitaemia.

Leishmania species usually induce a cellular and humoral immune response with high antibody production. Their search in the host's serum is therefore recommended.

The rapid diagnosis test by immunochromatography (RK39) has highlighted anti-*Leishmania* antibodies in 92.3% of cases (n=36), that joins the literature data, which also reported a sensitivity of 53.3% to 100% (27, 28). It has allowed the disease diagnosis in 11 patients for whom the direct exam was negative. The performance of this test (sensitivity, specificity, PPV and NPV) was relatively similar to those described in the literature (Table 5).

Front of the clinical and biological signs suggestive of the VL, the index of Youden of (0.92) (result close to 1) and the coefficient Q of Yule equivalent to 1, increase the performance of the rk39 in the diagnosis of the disease, especially in the developing countries.

The rk39 is a very interesting test, but it gives false negative results in the early stage of the

disease, and does not distinguish a recent infection from an old one, thus limiting its use for relapse diagnosis (29).

Recently, RT-PCR has been successfully used for the diagnosis of leishmaniasis (30, 15) because of its sensitivity and specificity (31).

In this study, the sensitivity of 95.45% and the specificity of 100%, place the real-time PCR made from bone marrow scraping powder at peak of the list of VL diagnosis techniques. It can therefore be used as a routine diagnosis method. PCR-Sequencing presented an interesting alternative to conventional methods for the identification of *Leishmania*'s species. It has highlighted the presence of *L. infantum* in the Western Algeria through the cases studied.

The RT-PCR performance in the VL diagnosis was evaluated from serum samples of 33 patients; The sensitivity was 93.9%. Fissore et al., and De Assis et al. reported a sensitivity of 97% and 85%, respectively (32, 33).

The absence of DNA amplification of serum samples from two patients in our series could be explained by the fact that *Leishmania*, an intracellular parasite, was just going into the serum. Due to its sensitivity and simplicity, RT-PCR from serum samples represents a valuable tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis and could even be used in epidemiological investigations to detect asymptomatic carriers.

In Algeria, the classical treatment of VL is based on the pentavalent derivatives of antimony, (Glucantime ®). It is usually administered on a 30-day treatment (28 days according to WHO recommendations) at the dose of 20 mg/kg/day. A single cure does not always lead to healing and must be repeated after a resting time (34). If left untreated, the IVL usually evolves towards death within a few months.

The evolution of treatment was favorable in 94.59% of cases (35/37). The persistence of fever (a sign of stibio-intolerance) in one child, required a

change from two-cure regimen of 15 days into a single cure of 30-days. Because of the altered general condition followed by the cumulative hospitalization period, three deaths were deplored.

The results of this study suggest the benefit of a diagnosis by RT-PCR that can be made from a non-invasive sample; such as the patient's serum. The use of RT-PCR from bone marrow is recommended for highly suspected cases, with negative results. In front of evocative bio-clinical signs, the positivity of serology by immuno-chromatography allows a very strong presumption. Obtaining the specific profile by a confirmation technique such as western blotting may help to remove doubts about false negatives.

Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest.

References

1. Belazzoug S, Bendali-Braham S, Lakhal Z. Hémagglutination indirecte dans le sérodiagnostic de la leishmaniose viscérale, comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. Arch Inst Past Alger 1986;55:107-12[Press in French].
2. Belkaid M, Harrat Z. La leishmaniose en Algérie. Mise au point. Rev Méd Phar 1997;43-6[Press in French].
3. Alvar J, Velez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7:e35671.
4. Izri MA, Belazzoug S, Boudjebba Y. Leishmania infantum MON-1 isolé de Phlebotomus perniciosus en Kabylie (Algérie). Ann Parasitol Hum Comp 1990;65:151-2[Press in French].
5. Berdjane-Brouk Z, Charrel RN, Hamrioui B, et al. First detection of Leishmania infantum DNA in Phlebotomus longicuspis Nitzulescu, 1930 from visceral leishmaniasis endemic focus in Algeria. Parasitol Res 2012;111:419-22.
6. Carré N, Collot M, Guillard P. La leishmaniose viscérale Épidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. J Pharm Clin 2010;29:121-48[Press in French].
7. Harrat Z, Pratlong F, Belazzoug S, et al. Leishmania infantum and L. major in Algeria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996;90:625-9.
8. Belazzoug S, Addadi K, Mokrani T, et al., editors. La leishmaniose viscérale en Algérie. Etude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. Annales de la Société Belge de Médecine tropicale; 1985.
9. Dedet JP. Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 2001;8:506-10[Press in French].
10. Louzir H, Dellagi K, editors. Les leishmanioses: un modèle d'étude des interactions hôte-parasite; implications pour la maladie humaine. Ann Inst Past; 1999: Elsevier.
11. Bachi F. Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La Lettre de l'infectiologue 2006;21:9-15[Press in French].
12. Idrissi ML, El Ouardi M, Atmani S, et al. La leishmaniose viscérale infantile: à propos de 209 cas. Journal de pédiatrie et de puériculture 2007;20:136-41[Press in French].
13. Harrat Z, Addadi K, Belkaid M, et al. La leishmaniose viscérale en Algérie: recensement des cas de leishmaniose viscérale (période 1985-1990). Bull Soc Pathol Exot 1992;85:296-301[Press in French].
14. Ghrab J, Rhim A, Bach-Hamba D, et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. Parasite 2006;13:23-33[Press in French].
15. Aoun K, Jeddi F, Amri F, et al. Actualités épidémiologiques de la leishmaniose viscérale en Tunisie. Médecine et maladies infectieuses 2009;39:775-9[Press in French].
16. Moziane F, Benalioua M, Trebycka K, et al. Kalar-Azar chez l'enfant dans l'ouest de l'Algérie. A propos de 14 observations. Méd Hyg 1983;41:3649-52[Press in French].
17. Zougaghi L, Moutaj R, Chabaa L. Leishmaniose viscérale infantile: profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. Arch Pédiat 2009;16:1513-8[Press in French].
18. Hadj Slimane T. Profil épidémiologique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest algérien. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister. Université d'Oran, Algérie. 2012; P94.
19. Aissi W, Hellel KB, Habboul Z, et al. Profils épidémiologique, clinique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile à l'hôpital de Kairouan (Tunisie): à propos de 240 casEpidemiological, clinical and biological features of infantile visceral leishmaniasis at Kairouan hospital (Tunisia): about 240 cases. bull soc pathol exot 2015;108:265-71[Press in French].
20. Rajagopala S, Dutta U, Chandra KS, et al. Visceral

leishmaniasis associated hemophagocytic lymphohistiocytosis—case report and systematic review. *J Infect* 2008;56:381-8.

21. Henter JL, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31.

22. Minodier P, Garnier J. Childhood visceral leishmaniasis in Provence. *Arch Pediatr : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 2000;7:572s-7s.

23. Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:S30-S9.

24. Bhargava P, Singh R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012;2012:626838.

25. Maltezou HC, Siafas C, Mavrikou M, et al. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. *Clin Infect Dis* 2000;31:1139-43.

26. Peacock CS, Collins A, Shaw MA, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Genet Epidemiol* 2001;20:383-96.

27. Schallig HD, Canto-Cavaleiro M, da Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1015-8.

28. Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral

leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:461-4.

29. Pandey K, Mallik AK, Pyakurel S, et al. Comparative study of microscopy and polymerase chain reaction for the diagnosis of suspected visceral leishmaniasis patients in Nepal. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2013;11:14-7.

30. Mihoubi I, Monbrison Fd, Romeuf N, et al. Diagnostic delocalise par PCR temps reel de la leishmaniose cutanee sevrissant dans le foyer de Constantine (Algerie). *Méd trop* 2006;66:39-43[Press in French].

31. Mary C, Faraut F, Drogoul MP, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:858-63.

32. Fissore C, Delaunay P, Ferrua B, et al. Convenience of serum for visceral leishmaniasis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:5332-3.

33. de Assis TSM, Caligiorne RB, Romero GAS, et al. Detection of *Leishmania* kDNA in human serum samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:1269-72.

34. Hassani MA, Lahlou H, Alami M, et al. Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile: À propos de 31 cas diagnostiqués sur 10 mois au laboratoire d'hématologie du CHU Hassan II de Fès (Maroc). *Rev Franc Lab* 2011;2011:55-60[Press in French].

Résumé

La leishmaniose viscérale est une affection causée par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, parasite du système réticulo-endothélial et transmis aux mammifères par la piqure d'un insecte vecteur, le phlébotome femelle. Elle est mortelle dans presque tous les cas si elle n'est pas diagnostiquée et prise en charge précocement. En Algérie, l'agent incriminé est *Leishmania infantum* zymodème MON-1, ayant comme réservoir le chien et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus*. Des progrès ont été réalisés dans le diagnostic et la prise en charge de cette parasitose dans la région centre de l'Algérie. Par contre, dans l'Ouest algérien, le diagnostic repose encore dans la majorité des cas sur la mise en évidence du parasite à l'examen direct. De plus, aucune étude à ce jour n'a été consacrée à la situation épidémiologique de la maladie dans cette région. Ce travail avait pour objectifs :- de proposer, pour un diagnostic précoce de la leishmaniose viscérale infantile, l'utilisation de l'immunochromatographie comme test alternatif à l'examen direct et de la PCR en temps réel à partir du sérum, un prélèvement non invasif;- d'apporter des éléments de connaissance sur la situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest algérien en déterminant le profil épidémiologique, clinique et biologique des cas recensés et en identifiant l'espèce de *Leishmania* en cause par PCR-séquençage et des espèces de phlébotomes vectrices. Deux types d'étude ont été réalisés, une étude descriptive à recueil rétrospectif et une autre transversale avec niche prospective. La première, allant de janvier 2007 à septembre 2010, a inclus 37 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués dans le service des maladies infectieuses pédiatriques de l'EHS pédiatrie d'Oran. La seconde, menée dans ce même service, d'octobre 2010 à décembre 2017, a porté sur 69 cas de suspicion de cette pathologie. A l'issue de ces deux études, 82 cas de leishmaniose viscérale ont été enregistrés. L'âge moyen des malades était de $22,9 \pm 22,7$ mois avec une légère prédominance féminine. 36,6% des cas sont originaires de la wilaya de Relizane. Les signes biocliniques évocateurs de la LV étaient dominés par la triade (fièvre-pâleur-splénomégalie) dans 62,2% des cas et l'anémie dans 100% des cas. L'immunochromatographie a permis le diagnostic de la maladie chez 17 cas; la sensibilité de la PCR en temps réel réalisée à partir de la moelle osseuse et du sérum était respectivement de 86,5% et de 92,3%. Ces résultats suggèrent l'intérêt de l'utilisation de ce test sérologique et de la PCR en temps réel à partir du sérum dans le diagnostic de cette parasitose. La présence de *P. perniciosus* avec une abondance relative de 55,1% et le parasite identifié avec 74% de similitude avec *L. infantum* et les signes biocliniques et épidémiologiques observés chez les patients constituent les principales caractéristiques de la leishmaniose viscérale méditerranéenne.

Mots clés :

Leishmaniose viscérale infantile; Moelle osseuse; Sérum; Immunochromatographie; PCR en temps réel; PCR standard; PCR-séquençage; *Leishmania infantum*; *Phlebotomus perniciosus*; Ouest Algérien.