

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

IV.	Mani
festations cliniques des leishmanioses	6
1..... La	
leishmaniose cutanée	6
2..... La	
leishmaniose viscérale	7
3..... La	
leishmaniose cutanéo-muqueuse	8
V.	Les
leishmanioses au MAROC	8
1..... La	
leishmaniose viscérale	9
2..... La	
leishmaniose cutanée	9
VI.	Les
éléments du cycle biologique de la leishmaniose	13
1..... Les	
leishmanies.....	13
2..... Le	
vecteur	16
3..... Le	
réservoir	19
4..... Le	
cycle parasitaire	19
VII.	Biolo
gie moléculaire des leishmanies	21
1..... Orga	
nisation générale du génome	21
2..... Expre	
ssion des gènes kinétoplastiques	21
3..... Expre	
ssion des gènes nucléaires	21
VIII.	Diag
nostic de la leishmaniose.....	22

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

1.	La
	leishmaniose cutanée	22
2.	La
	leishmaniose viscérale	23
IX.	Ident
	ification des souches leishmaniennes	24
1.	Ident
	ification enzymatique	24
2.	Ident
	ification moléculaire	25
X.	Trait
	ement de la leishmaniose.....	26
XI.	Aspe
	cts de santé publique et de lutte	27

Partie B : MATERIEL ET METHODE

I.	MATERIELS	29
I.1.	Zone d'étude	29
I.2.	Période d'étude.....	32
	I.3. Inventaire des lames parvenus à l'INH depuis l'an 2005 jusqu'à l'an 2010...32	
II.	METHODE	33
II.1.	L'étude rétrospective	33
II.2.	L'étude prospective	33
	II.2.1. Extraction d'ADN par phénol-chloroforme-alcool.....	33
	II.2.2. Amplification par PCR de la région ITS1	36
	II.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser l'ADN des Leishmanies....38	
	II .2.4. L'analyse RFLP du produit PCR ITS1	40

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Partie C : RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS	42
A.....	Etud
e rétrospective.....	42
I.....	Anal
 yse des cas de la LC dans la préfecture de FES de 2005 à 2010.....	42
1.....	Evolu
tion de la LC de 2005 à 2010.....	42
2.....	Répa
rtition des cas positifs selon le sexe	43
3.....	Répa
rtition des cas positifs selon les secteurs	43
4.....	Répa
rtition des cas positifs selon l'âge en 2010.....	45
5.....	Répa
rtition des cas positifs selon le nombre et l'aspect des lésions	45
6. Répartition des cas positifs selon la localisation des lésions.....	46
II.....	Anal
 yse de la LC dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010	46
1. Evolution de la LC de 2005 à 2010	46
2. Répartition des cas positifs selon le sexe	47
3. Répartition des cas positifs selon les secteurs.....	48
B.....	Etud
e prospective	49
1. Résultat de l'amplification de la région ITS1	49
2. Résultat de la digestion par l'enzyme MnII	49
DISCUSSION	51
CONCLUSION	55

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

ABREVEATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOFEL mycologie	association française des enseignants de parasitologie et de mycologie
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
BET	Bromure d'ethidium
BSA	bovine serum albumin
DAT	Test d'agglutination direct
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DELM	direction d'épidémiologie de lutte contre les maladies
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G/C	Guanine/Cytosine
Hab	habitant
IFI	Immunofluorescence directe
INH	Institut national d'hygiène
<i>L. atheopica</i>	<i>Leishmania atheopica</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

L. tropica	<i>Leishmania tropica</i>
L. archibaldi	<i>Leishmania archibaldi</i>
LC	Leishmaniose cutanée
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCL	Leishmaniose cutanée localisée
LCM	leishmaniose cutanéo-muqueuse
LNRL	laboratoire national de référence de leishmaniose
LV	Leishmaniose viscérale
Mb	Megabase
MGG	May-Grünwald Giemsa
OMS	Organisation mondiale de santé
ORL	Oto-rhino larynx
PCR	polymérase chain réaction
PNLCL	Programme national de lutte contre les leishmanioses
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SDS	sodium dodécyl sulfate
UV	ultraviolet

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Liste des figures

Figure 1 : Distribution géographique des leishmanioses dans le monde (Anofel., 2007)

Figure 2 : carte de répartition des leishmanioses au Maroc (Rhajaoui, 2009)

Figure 3 : Photo de la forme amastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'un frottis réalisé au département de parasitologie à l'INH (2009)

Figure 4 : Photo de la forme promastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'une culture réalisé à l'INH

Figure 5: Schéma de la forme promastigote (Golvan, 1990)

Figure 6 : Photo d'un Phlébotome (Laboratoire de Parasitologie de Strasbourg, 2009)

Figure 7 : schéma d'un phlébotome montrant les différents morphotypes des leishmanies tout au long du tube digestif

Figure 8 : cycle parasitaire de la leishmaniose (REITHINGER.R et al. ; 2007)

Figure 9 : Situation de la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub dans la région Fès-Boulemane (www.fes-boulemane.ma)

Figure 10 : carte de la préfecture de Fès (Ministère de l'intérieur)

Figure 11 : carte de la province de MLY Yacoub (ministère de l'intérieur)

Figure 12 : Répartition de la LC selon les secteurs dans la préfecture de FES en 2005

Figure 13 : Répartition de la LC selon les secteurs dans la préfecture de FES en 2010

Figure 14 : Répartition de la LC selon les secteurs dans la province de MLY Yacoub en 2010

Figure 15 : photo du gel du résultat d'amplification de la région ITS1



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



Liste des tableaux

Tableau 1 : communes rurales et urbaines de la préfecture de Fès

Tableau 2 : communes urbaines et rurales de la province de MLY Yacoub

Tableau 3 : répartition des lames concernées par l'étude moléculaire selon les secteurs

Tableau 4 : Composition du Master Mix pour l'amplification ITS1

Tableau 5 : Paramètres des différents cycles de la PCR ITS1

Tableau 6 : Composition du Master Mix pour la digestion MnII

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Liste de graphes

Graphe 1 : Evolution des cas de leishmaniose viscérale (LV), leishmaniose cutanée à *L.tropica* (LCt) et celle à *L.major* (LCm) (Rhajaoui, 2009)

Graphe2 : Evolution de la LC dans la préfecture de FES de 2005 à 2010

Graphe3 : répartition des cas positifs selon le sexe dans la préfecture de FES de 2005 à 2010

Graphe 4 : Répartition des cas de la LC selon l'âge dans la préfecture de FES en 2010

Graphe 5 :répartition des cas de la LC selon le nombre et l'aspect des lésions dans la préfecture de FES en 2010

Graphe 6 : Répartition de la LC selon la localisation des lésions dans la préfecture de FES en 2010

Graphe 7: Evolution de la LC dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010

Graphe 8: Répartition des cas positifs selon le sexe dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

INTRODUCTION GENERALE

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ce parasite est transmis de mammifère à mammifère par piqûre d'un arthropode vecteur : le phlébotome femelle (dedet, 1999).

Diverses formes de manifestations cliniques de la leishmaniose humaine ont été décrites, et sont groupées en 3 entités :

- La leishmaniose viscérale (LV, kala azar), forme mortelle en absence de traitement ;
- La leishmaniose cutanée
 - ❖ localisée (LC, bouton d'orient, sore oriental, uta, pian bois, ulcère chiclero) évoluant très lentement vers la guérison au prix d'une cicatrice;
 - ❖ diffuse (LCD), difficile à guérir, et évolue vers l'aggravation.
- La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM, espundia) aboutissant à une mutulation de l'organe touché.

La leishmaniose est endémique dans 88 pays tout au long de l'Amérique latine, l'Afrique, l'Asie et l'Europe du sud. 350 millions d'individus sont exposés au risque d'infestation avec une prévalence de 12 millions de personnes par an (Desjeux, 2001).

Le Maroc est également touché par la leishmaniose. Cette maladie a été largement confinée aux régions arides du Sahara (RiouxB et al. ,1982) mais l'émergence d'autres foyers ne cesse d'apparaître (Rhajaoui, 2009). Cette augmentation est probablement due aux changements climatiques et à l'extension géographique du vecteur (Andrew et al., 2000). Ainsi 4 types de leishmanioses ont été décrits au Maroc (Rhajaoui, 2009) :

- La leishmaniose cutanée rurale causée par *Leishmania major*.
- La leishmaniose cutanée urbaine causée par *Leishmania tropica*.
- La leishmaniose cutanée causée par *Leishmania infantum*.
- La leishmaniose viscérale causée par *Leishmania infantum*.

L'épidémiologie et les caractéristiques cliniques de la maladie sont en fonction de l'interaction de nombreux facteurs concernant les parasites, les vecteurs, les hôtes et les zones concernées. Donc l'étude de ces facteurs est nécessaire pour mieux comprendre la dynamique des foyers leishmaniens qui persistent malgré les moyens



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

de lutte déployés dans le cadre du programme national de lutte contre les leishmanioses (PNLCL).

Notre travail a pour objectif :

- L'étude épidémiologique des foyers leishmaniens dans la préfecture de FES et la province de Moulay Yacoub durant les 5 dernières années ;
- Et, le typage moléculaire des souches circulantes dans les secteurs les plus touchés dans la zone étudiée, à partir des lames positives collectées en 2010.

Cette étude réalisée au sein du laboratoire national de référence de leishmaniose(LNRL) à l'institut national d'hygiène (INH), nous a permis dans un premier temps de suivre l'évolution de la leishmaniose dans ces 2 zones, étant donné que plusieurs actions de lutte et des mesures préventives ont été menées par le ministère de santé dans le cadre du Programme National de Lutte Contre les Leishmanioses (PNLCL) pour réduire l'incidence de la LC depuis l'exploration des premiers foyers en 2000 (Rhajaoui et al., 2004) ; et en second temps, d'actualiser les données sur les souches circulantes par biologie moléculaire.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

I. HISTORIQUE

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

AL BOUKHARI, médecin arabe qui vivait au X^{ème} siècle, a décrit incontestablement cette infestation cutanée et puis **AVICENNE** l'attribua à une piqûre de moustique.

En 1882, **MAC NAUGHT** a donné la première description clinique de la maladie en Inde.

C'est sir **WILLIAM LEISHMAN**, qui le premier en 1900 a isolé le parasite dans la rate d'un soldat décédé en Angleterre d'où le nom des leishmanies.

En 1903, **CHARLES DONOVAN** a identifié l'agent pathogène.

En 1906, **LUHE** a décrit la taxonomie dans un livre allemand.

En 1921, le rôle du phlébotome dans la transmission des leishmanioses a été décrit par **BAUPERE** et **ARAGO**.

En 1973, description par **BRAY** et al. d'un nouveau taxon, *Leishmania.aethiopica* (*L.aethiopica*), et adoption de la nomenclature binomiale, *Leishmania.tropica* (*L. tropica*) et *Leishmania.major* (*L. major*).

II. HISTORIQUE AU MAROC

La leishmaniose est connue au MAROC depuis près d'un siècle. Elle était considérée comme une infection sporadique.

A partir de 1977, date de l'arrêt d'utilisation des opérations d'aspersion au dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) contre le paludisme dans le sud du pays, elle commença à se développer sur le mode épidémique.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Plusieurs poussées épidémiques ont ainsi éclaté au sud de l'Atlas dans les zones subsahariennes des provinces d'Errachidia (Alnif), d'Ourzzazate (Tazarine) et de Tata (guide de lutte contre les leishmanioses au Maroc, 2010)

Le premier cas de leishmaniose à *L.tropica* au Maroc a été identifié par Rioux en novembre 1987 à Nice en France chez une petite fille marocaine.

Avant 1993, il n'existe pas de système de recueil d'informations épidémiologiques concernant les leishmanioses, de ce fait, les données épidémiologiques ne reflètent guère la situation épidémiologique réelle.

A partir de 1993, la situation épidémiologique des différents types de leishmanioses au Maroc a pu être bien détaillée grâce aux déclarations des cas faites par les provinces et les préfectures.

En 1995, les leishmanioses sont devenues des maladies à déclaration obligatoire selon l'arrêté ministériel n° 683-95 du 31 mars 1995.

Le lancement du programme de lutte contre les leishmanioses en 1997, a été le couronnement de plusieurs années de recherches éco-épidémiologiques dans les différentes régions du pays. Ces recherches ont permis de cerner la problématique des leishmanioses et d'élaborer une stratégie de lutte traduite en directives visant à assurer les bases techniques du programme de lutte (Guide de lutte contre les leishmanioses, 1997).

III. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES LEISHMANIOSES AU MONDE

La leishmaniose affecte quatre continents ; l'Asie, l'Amérique, l'Europe et l'Afrique. Les zones d'endémie sont l'Europe du sud ainsi que de nombreux pays d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique de sud.

On distingue deux grandes situations géographiques : l'Ancien Monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amérique du Nord, Amérique du Sud et l'Amérique centrale).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Dans les deux Mondes, on retrouve les différentes manifestations cliniques qui ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* et qui sont propagées par différents espèces de phlébotomes.

La leishmaniose viscérale (LV) à *Leishmania donovani* (*L. donovani*) constitue un gros foyer en Inde, des foyers moins étendus existent au Kenya, au Soudan, et en Ethiopie (Ashford et coll., 1992 ; Manson-Bahr, 1967 ; Seaman et coll., 1992).

La leishmaniose viscérale à *Leishmania infantum* (*L. infantum*) se présente sous forme de cas sporadiques, parfois endémiques dans les foyers de leishmaniose canine dispersés en Amérique du sud, sur le pourtour méditerranéen, au Moyen-Orient, en Asie centrale et en Chine (Alzahrani et coll., 1989 ; Rioux et coll., 1986).

La leishmaniose cutanée (LC) à *L. major* se trouve dans les zones arides d'Afrique, au nord de l'Equateur et surtout au Maghreb, au moyen orient, et en Asie centrale jusqu'en Inde (dedet, 2001).

La forme urbaine due à *L. tropica* est présente sur le pourtour de la méditerranée orientale et en Asie centrale, elle est aussi présente au Maghreb. (Guessous-Idrissi et coll., 1997 ; Guilvard et coll., 1991 ; Nadim et Rostami, 1974).

La LC à *L. aethiopica* est limitée aux hauts plateaux de l'Afrique de l'Est (Ashford, 1977).

La LC à *L. infantum* est responsable de cas de plus en plus nombreux en Europe de sud et en Afrique du nord (Rioux et coll., 1980).

La leishmaniose cutanéo-muqueuse (LCM) a une large répartition dans et autour du bloc forestier amazonien où elle est due à *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), plus rarement à *Leishmania panamensis* (*L. panamensis*) (Escomel, 1911).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

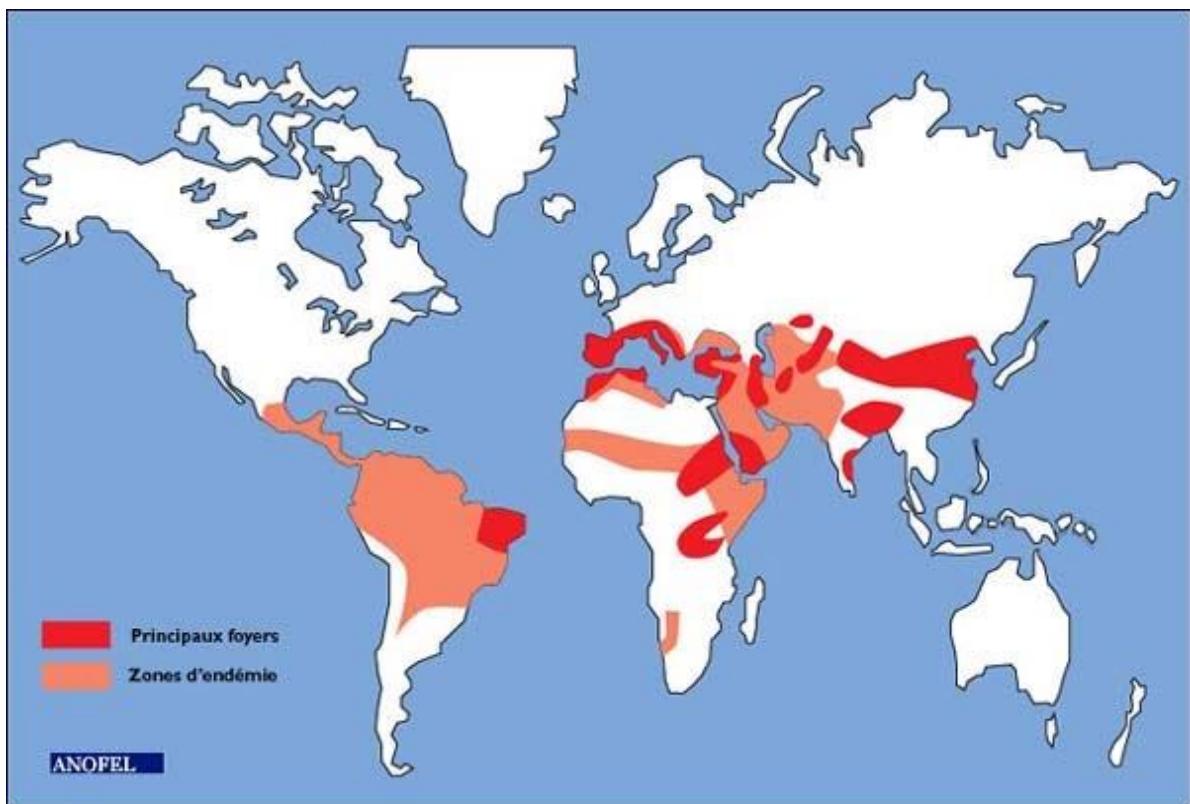


Figure 1 : Distribution géographique des leishmanioses dans le monde (Anofel., 2007)

IV. MANIFESTATIONS CLINIQUES DES LEISHMANIOSES

On distingue 3 formes de leishmaniose humaine à travers le Monde :

IV.1. La leishmaniose cutanée

C'est la forme clinique dont laquelle le parasite reste localisé au revêtement cutané.

Elle est consécutive à l'inoculation des formes infestantes du parasite par le phlébotome vecteur et résulte de son développement dans les cellules histiocytaires mononucléées de la peau. En général, cellules infectées et parasites demeurent au site d'inoculation et donnent lieu à une lésion circonscrite de leishmaniose cutanée localisée (LCL). Ils diffusent plus rarement par voie lymphatique ou sanguine vers d'autres territoires cutanés se traduisant ainsi par une leishmaniose cutanée diffuse (LCD). Cette variabilité clinique est liée à la fois à l'espèce leishmanienne en cause et au type de réponse immunitaire de l'hôte (Dedet, 1999).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Après la piqûre infectante par le vecteur, l'incubation peut varier d'une semaine à 2 ans (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010). Elle est généralement silencieuse mais parfois, il apparaît un chancre d'inoculation vesiculo-papuleux qui peut passer inaperçu.

La lésion est indurée et indolore, entourée d'une auréole rougeâtre et légèrement prurigineuse (Laamrani El Idrissi et coll., 1997).

➤ La leishmaniose cutanée localisée (LCL)

Elle correspond à la forme bénigne de l'infestation. En général les lésions sont limitées et localisées seulement à la peau, évoluent vers la guérison spontanée. Toutes les espèces de Leishmania peuvent être responsables de cette forme bénigne, y compris les espèces normalement viscérotropes : *L. infantum* et *L. donovani*.

La lésion cutanée débute par une petite papule inflammatoire, à peine surélevée, ou franchement vésiculeuse, recouverte de fines squames blanchâtres. Elle augmente régulièrement de taille, pour atteindre en quelques semaines les dimensions de la lésion définitive.

La lésion leishmanienne évolue de façon torpide, durant plusieurs mois, voire une ou plusieurs années. Une surinfection bactérienne secondaire est possible.

La lésion finit cependant par guérir spontanément, en laissant une cicatrice indélébile, déprimée, parfois rétractile, rosée ou blanchâtre en peau claire, hyperpigmentée sur peau noire. Le délai d'apparition de la guérison spontanée varie suivant l'espèce de Leishmania en cause : 6 mois environ pour les lésions à *L.major*, 2 ou 3 ans pour celles à *L.tropica*.(Dedet,1999).

➤ La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Ces lésions ont tendance à la dissémination sur l'ensemble du corps, avec un caractère récidivant marqué et une aggravation progressive.

Cette forme rare de leishmaniose cutanée, décrite pour la première fois au Venezuela par Convit et Lapenta (1948), se rencontre associée au parasitisme par les espèces

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

L.aethiopica dans l'Ancien Monde et *L.amazonensis* dans le Nouveau Monde. (Dedet et coll., 1999)

Dans la LCD, la lésion élémentaire est le nodule non ulcére. Les nodules sont, au début, de petite taille, isolés, très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps. Au fur et à mesure de l'évolution de l'affection, les nodules augmentent de taille et forment de larges plaques infiltrées. L'aspect du malade s'apparente dès lors à celui du lépreux lépromateux.

Cette forme de leishmaniose est rebelle aux antileishmaniens classiques. Elle évolue vers l'aggravation, par poussées successives entrecoupées de phases de rémission.

IV.2. La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) résulte d'une atteinte systémique généralisée de la lignée des phagocytes mononucléés par les leishmanies (Ross, 1903).

Deux espèces sont le plus souvent impliquées, ce sont *L. donovani* (Laveran et Mesnil, 1903) et *L. infantum* (Nicolle, 1908). *L. archibaldi* peut également causer la LV (Castellani et Chalmers, 1919).

La durée d'incubation est difficile à évaluer, en moyenne de 3 à 6 mois. Elle est généralement silencieuse mais parfois apparaît un chancre d'inoculation vésiculo-papuleux qui peut passer inaperçu.

Les symptômes sont : une fièvre anarchique résistante aux antibiotiques et aux autres anti-infectieux, une anémie avec pâleur extrême. La splénomégalie, l'hépatomégalie, et l'hypertrophie des ganglions sont plus nettes chez l'enfant. L'amaigrissement des membres et du thorax contraste avec l'augmentation du volume de l'abdomen. Parfois une perte d'appétit, une asthénie et des troubles digestifs sont rapportés. L'évolution de la maladie, en absence de traitement, est fatale dans un tableau de cachexie et de complications infectieuses ou digestives.

IV.3. La leishmaniose cutanéo-muqueuse (LCM)

La LCM est une entité nosologique particulière à l'Amérique du sud et centrale et due à l'espèce *L. braziliensis*, et plus rarement *L. panamensis* (Marsden, 1986).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

L'infection évolue en deux temps : une primo-invasion cutanée pouvant être ultérieurement suivie par une atteinte muqueuse secondaire. La lésion cutanée initiale est identique du point de vue clinique, histopathologique et immunologique à la leishmaniose cutanée localisée due à n'importe quelle espèce de leishmanie.

La fréquence et le délai d'apparition de l'atteinte muqueuse secondaire sont variables selon les régions.

La muqueuse nasale est la première atteinte. Le malade se plaint de congestion nasale avec gêne nocturne (Villela et coll., 1939).

En second lieu, la muqueuse buccale est atteinte par contigüité à un stade ultérieur de la maladie.

Les nécroses et les mutilations qui apparaissent dans les stades avancés sont particulièrement graves et défigurantes.

Il n'y a pas de guérison spontanée, le malade peut mourir, en outre, de détresse respiratoire ou de surinfection broncho-pulmonaire.

V. LES LEISHMANIOSES AU MAROC

Au Maroc, comme dans la plupart des pays circumméditerranéens, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. Qu'elles soient zoonotiques ou anthroponotiques, cutanées ou viscérales, ces affections y sont largement représentées, depuis les montagnes du Rif jusqu'aux palmeraies perariades des piémonts de l'Anti-Atlas (voir figure 2).

Les études écobiologiques ont révélé la présence simultanée de deux formes nosologiques et cliniques de leishmaniose dans le royaume, à savoir :

- La leishmaniose viscérale répartie principalement au Nord du Maroc ;
- La leishmaniose cutanée observée dans le centre du pays, le Sud et le Sud-Est de la chaîne de l'Atlas (Rhajaoui, 2009).

V.1. La leishmaniose viscérale



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

La LV au Maroc est connue depuis plusieurs décennies. Le premier cas du Kala-azar infantile a été décrit à Tanger en 1921 (Remlinger, 1921). Alors qu'une LV chez l'adulte a été rapportée chez une infirmière à Meknès en 1922 (Klippel et coll., 1922). Cette maladie est surtout localisée dans le Nord du pays, mais des cas sporadiques ont été observés dans d'autres régions, notamment au Sud (Dereure et coll., 1986). La morbidité de la LV fluctue en moyenne autour de 152 cas par an (Rhajaoui, 2009).

Le parasite responsable est *L.infantum*, dont le zymodème MON 1 est le plus commun sur le pourtour méditerranéen (Rioux et coll., 1983).

Deux espèces de phlébotome sont incriminées dans la transmission de cette forme au Maroc, *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Dereure et coll., 1986 ; Rioux et coll., 1986).

Le réservoir du parasite est le chien malade (Nejjar R et coll., 1998). Il assure la conservation du parasite et sa transmission par le vecteur (Rioux et coll., 1983). La LV est considérée comme étant une zoonose, c'est-à-dire que le cycle du parasite implique le phlébotome et le chien. L'Homme n'est infesté qu'accidentellement et ne constitue de ce fait qu'une impasse parasitaire (Rhajaoui, 2009).

V.2. La leishmaniose cutanée

Les LC humaines ont été subdivisées en trois entités éco-épidémiologiques différentes :

- ❖ La LC due à *L.major*, dite aussi la forme humide ou rurale ;
- ❖ La LC due à *L.tropica*, dite aussi la forme sèche ou urbaine ;
- ❖ La LC due à *L.infantum*.

✓ La LC à *L.major*

La LC humaine à *L.major* était connue au Maroc au début du XX^e siècle par quelques cas sporadiques (Guessous-Idrissi et coll., 1997 ; Foley et coll., 1991). Après, cette maladie évoluait sous forme d'épidémies alternées dans le temps par des périodes d'accalmie, dans lesquelles les zones soumises à une puissante pression parasitaire sont vraisemblablement à l'abri de nouvelles vagues épidémiques. Le nombre de cas peut atteindre plus de 2000 cas par an (voir graphe 1).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

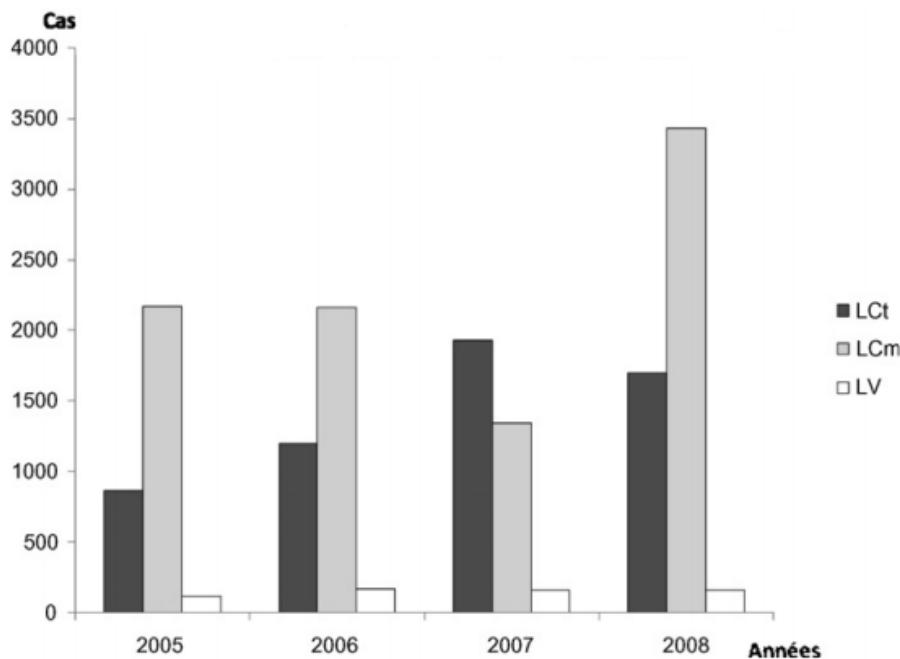
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Cliniquement, il s'agit de lésions de type « humide », souvent surinfectées, se caractérisant par une ulcération large (2 à 8 cm de diamètre) à fond bourgeonnant, papillomateux, recouvert d'un enduit plus ou moins purulent, et à bord pauvre en leishmanies.

Les « boutons » généralement, multiples, prennent volontiers le type végétant par surinfection bactérienne. Ils guérissent en 4 à 6 mois. Une cicatrice pigmentée en dépressions, permet le diagnostic rétrospectif.

La maladie s'observe en zone aride dans les palmeraies des piémonts méridionaux de l'Anti et le Haut-Atlas.



Graphe 1 : Evolution des cas de leishmaniose viscérale (LV), leishmaniose cutanée à *L.tropica* (LCt) et celle à *L.major* (LCm) (Rhajaoui, 2009)

Le cycle épidémiologique de cette forme, s'appuie sur la présence dans ses sites de répartition, d'un rongeur commensal, *Meriones shawi grandis* jouant le rôle de réservoir de parasite (RiouxB et coll., 1982).

La transmission du parasite depuis le réservoir à l'Homme se fait par le biais de *Phlebotomus papatasi*, abondant dans les Douars contaminés (Rhajaoui, 2009).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Toutes les souches isolées du réservoir, de l'Homme et du vecteur sont identiques et se sont identifiées biochimiquement, comme étant *L.major* MON 25 (Rioux et coll., 1986).

✓ La LC à *L.tropica*

Le premier cas de la LC due à *L.tropica* a été identifié en France en 1987 chez un enfant marocain ayant séjourné à Tanant dans la province d'Azilal (Marty et coll., 1987).

Depuis lors, les atteintes leishmaniennes dues à *L.tropica* ne cessent d'apparaître. Un grand foyer, s'étendant sur une superficie d'environ 400Km² allant d'Azilal au centre jusqu'à Essaouira à l'Ouest et Agadir-Guelmim au Sud, a été identifié comme lieu où sévit la LC à *L.tropica* au Maroc.

L'identification des souches isolées chez l'Homme, le chien et le vecteur (*Phlebotomus sergenti*) a montré la présence de sept zymodèmes de *L.tropica* à savoir : *L.tropica* MON 102, MON 107, MON 109, MON 112, MON 113, MON 122 et MON 123 (Pratlong et coll., 1991).

Au fil du temps, des nouveaux foyers de *L.tropica* ont apparu, témoignant ainsi d'une extension de la LC sèche aux provinces du royaume. C'est ainsi qu'en 1995, le « foyer » de Taza, a connu une flambée de la LC due à *L.tropica* MON102 (Bichichi et coll., 1999). En 2000, c'était le cas de la province de Chichaoua où une LC à *L.tropica* a touché plus de 300 personnes (Rhajaoui, 2005).

En 2001, une épidémie à *L.tropica* MON102 s'est déclenchée dans la province de Zouagha Moulay Yacoub (ZMY) à la wilaya de Fès (Fellah et coll., 2007 ; Rhajaoui et coll., 2004). Les poussées épidémiques à *L.tropica* font augmenter le nombre de personnes atteintes à plus de 1600 cas (Graphe 1). Et plus récemment, en 2007, le cercle de Labrouj situé au sein de la province de Settat a enregistré pour la première fois l'apparition de lésions cutanées causées par des leishmanies. Le nombre de personnes infectées a atteint environ 200 cas durant la période Avril à Juillet.

Toutes ces épidémies de *L.tropica* n'excluent pas la présence, à bas bruit, de cas sporadiques de LC sèche dans beaucoup de provinces du Maroc (Rhajaoui, 2003). En

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

effet, l'identification moléculaire des lames avec frottis collectées de différentes régions a montré la présence de la LC à *L.tropica* dans une large partie du royaume sans aucune manifestation épidémique (Rhajaoui et coll., 2007).

De point de vue clinique, la LC à *L.tropica* est classiquement décrite comme une forme lipoïde de petite taille et unique. Cependant, des formes ulcérocrouteuses, ulcéronodulaires, sévères, inflammatoires et multiples ont été rapportées (Chiheb et coll., 1999 ; Rhajaoui et coll., 2007). De même des lésions de forme infiltrative diffuse ou pseudolépromateuse ont été aussi observées (Rioux et coll., 1986).

✓ La LC à *L.infantum*

Cette forme a été signalée pour la première fois en France (Rioux et coll., 1980). Depuis elle a été trouvée dans la plupart des foyers à LV canine et humaine du pourtour méditerranéen.

Le premier cas marocain a été dépisté, dans le Rif central à Taounate. L'identification enzymatique du parasite a montré qu'il s'agit de *L. infantum* MON 24 (Rioux et coll., 1996).

Des investigations moléculaires réalisées en 2007, montrent l'existence de formes cutanées causées par *L. infantum*. La majorité de ces cas ont été enregistrés au niveau de la province de Sidi Kacem (Rhajaoui et coll., 2007). Il s'agit de formes sporadiques montrant des lésions uniques, ulcérocrouteuses ou lipoïdes, évoluant pendant au moins deux ans (Rioux et coll., 1996).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

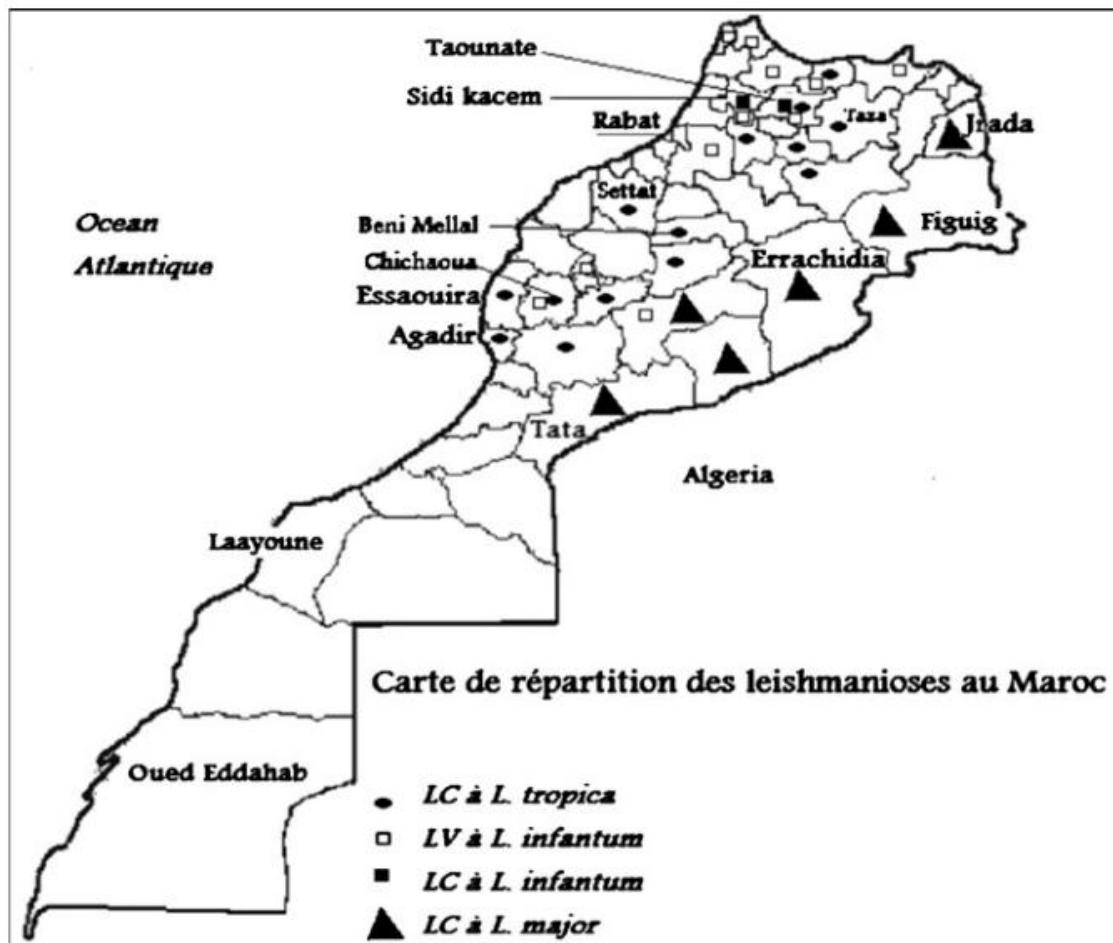


Figure 2 : carte de répartition des leishmanioses au Maroc (Rhajaoui, 2009)

VI. LES ELEMENTS DU CYCLE BIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE

La leishmaniose constitue un ensemble complexe au sein duquel sont impliqués les phlébotomes (vecteurs), les réservoirs et le parasite.

Le cycle biologique de la leishmaniose est digénétique avec un stade amastigote intracellulaire dans le système des phagocytes mononucléés d'un hôte vertébré, et un stade promastigote libre dans le tube digestif du phlébotome.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

VI.1. Les leishmanies

VI.1.1. la taxonomie des leishmanies

Lainson et Shaw sont les seuls auteurs à avoir proposé différentes classifications du genre Leishmania et à les avoir fait évoluer au cours du temps.

D'après **LAINSON et SHAW, 1987 :**

Règne: Protista

Sous règne : Protozoa

Embranchement: Sarcomastigophora

Sous embranchement: Mastigophora

Classe: Zoomastigophora

Ordre: Kinetoplastida

Sous ordre : Trypanosomastina

Famille: Trypanosomatidae

Genre:*Leishmania*

Au sein du genre Leishmania, au moins 15 espèces différentes ont été décrites, distribuées en 4 complexes (braziliensis, mexicana, tropica et donovani). (Chatenay et coll., 1989).

VI.1.2. La morphologie des leishmanies

Les leishmanies se présentent sous 2 formes :

➤ **la forme amastigote** : c'est une forme immobile intracellulaire, qu'on trouve dans les cellules réticulaires du derme, les cellules du réticulum de la moelle osseuse, de la rate, des ganglions, de la paroi intestinale, ainsi que dans les cellules de kupffer du foie. Les amastigotes sont ovoïdes mesurant 1 à 2 µm avec un noyau sphérique. Ce noyau, sur frottis coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG), apparaît rouge violacé, il est flanqué d'un élément plus petit bacillioforme coloré en rouge vermillion : le blépharoplaste (kinétoplaste) d'où part un flagelle réduit ; le

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

rhizoplaste. La cellule apparaît donc contenir une double ponctuation (Nozais et coll., 1996 ; Gentilini et coll., 1999).

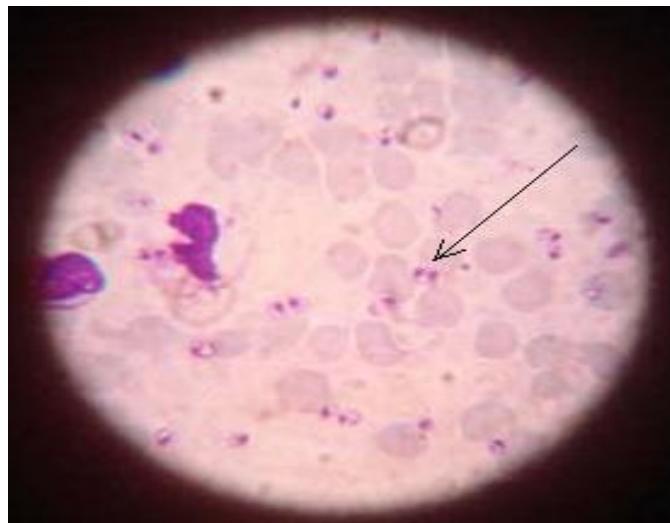


Figure 3 : Photo de la forme amastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'un frottis réalisé au département de parasitologie à l'INH (2009)

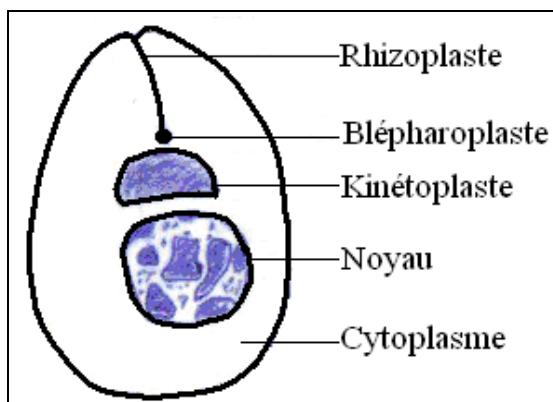


Figure 4 : schéma de la forme amastigote (Golvan, 1990)

➤ **la forme promastigote** (Leptomonas) : forme mobile, plus longue, de 20 à 30 µm de longueur avec un flagelle d'environ 20 µm. C'est sous cette forme Leptomonas que se fait la multiplication des leishmanies dans le tube digestif du phlébotome ou dans les phases liquides des milieux de culture. En résumé, c'est la forme

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

adaptée aux basses températures alors que la forme amastigote est adaptée à 37°C (Nozais et coll., 1996 ; Gentilini et coll., 1999).

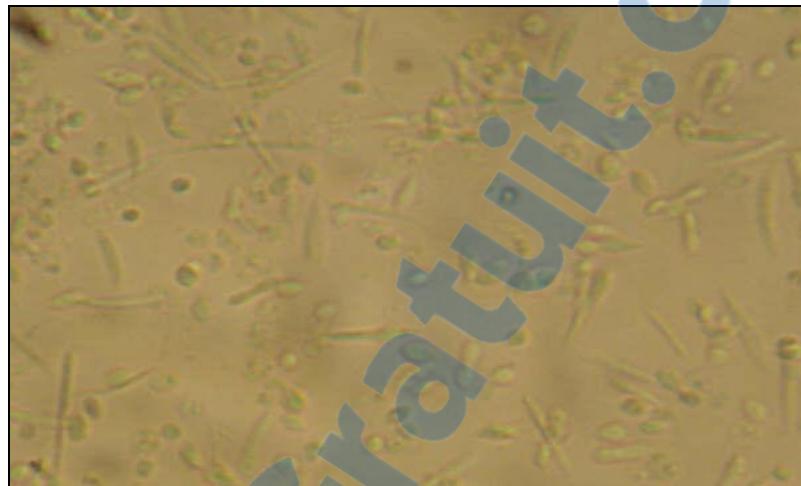


Figure 5 : Photo de la forme promastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'une culture réalisé à l'INH

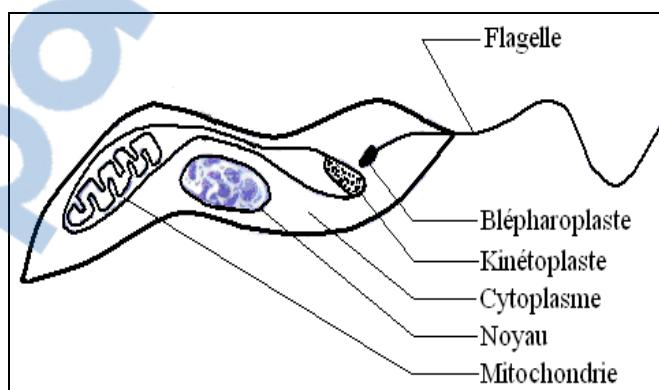


Figure 6: Schéma de la forme promastigote (Golvan, 1990)

VI.1.2. La reproduction des leishmanies

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

C'est principalement par voie asexuée, scissiparité longitudinale, que se propagent les leishmanies.

Au cours de la mitose, la division binaire se fait du pôle antérieur vers le pôle postérieur par :

- 1/ Dédoubllement du corpuscule basal.
- 2/ Emergence d'un second flagelle indépendant du premier.
- 3/ Division du kinétoplaste accompagné d'une réPLICATION d'ADN.
- 4/ Division du noyau avec persistance de la membrane nucléaire (Dedet et coll., 1999).

L'hypothèse selon laquelle les trypanosomatidae se multiplient exclusivement par reproduction asexuée a été remise en question à plusieurs reprises. Les études menées par Jenni et ses collaborateurs (Jenni et al., 1986) montrent l'existence d'un processus de sexualité grâce à la mise en évidence d'échanges génétiques chez certaines espèces. Le mode de reproduction sexuée des leishmanies dont l'existence est fortement soupçonnée reste encore à élucider en détail. Quoi qu'il en soit, la multiplication asexuée demeure le mode de reproduction le plus fréquent.

VI.1.4. L'habitat des leishmanies

Chez l'hôte vertébré, les amastigotes vivent et se multiplient à l'intérieur des cellules réticulo-histiocytaires. Dans ces cellules, les leishmanies ne sont pas libres dans le cytoplasme, mais confinées dans une vacuole parasitophore : le phagosome. N'ayant aucun dispositif leur permettant une pénétration active, les amastigotes passent d'une cellule à l'autre grâce à un processus de phagocytose effectué par la cellule hôte.

Chez le vecteur, les promastigotes vivent dans l'intestin moyen. Après une période de multiplication intrapariétale, les promastigotes reviennent dans la lumière gastrique puis se dirigent vers l'intestin antérieur et s'accumulent derrière la valve oesophagienne. La fixation des promastigotes sur la paroi du tube digestif de l'insecte se fait soit par l'interdigitation du flagelle entre les microvillosoités de la bordure en brosse des cellules épithéliales, soit à l'aide d'hemidesmosomes disposés au niveau de la partie antérieure du flagelle (Dedet et coll., 1999 ; Nozais et coll., 1996).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

VI.2. Le vecteur

Les phlébotomes sont les vecteurs de la leishmaniose de l'ancien monde alors que le genre *Lutzomyia* est rencontré dans le nouveau monde.

Les deux genres comptent environ 800 espèces (IZRI et al. ; 2006).

VI.2.1. Taxonomie des phlébotomes

Règne: Animalia

Embranchement: Arthropoda

Sous embranchement : Antennatae

Classe: Insecta

Sous classe: Ptérygota

Infra classe: Neoptera

Ordre: Diptera

Sous ordre: Nematocera

Infra ordre: Psychodomorpha

Famille : Psychodidae

Sous famille: Phlebotominae

Genre: *Phlebotomus*

(Lewis et coll., 1977)

VI.2.2. Caractéristiques du vecteur

Les phlébotomes (figure 6), ou moucheron de sable, sont de petits insectes velus de 2 à 3 mm avec de longues pattes.

Seule la femelle est hématophage, son vol est silencieux et de courte portée, sa piqûre est douloureuse mais ne laisse pas de trace.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Les larves se développent dans les terriers, les fissures des roches ou des murs.

Les adultes gîtent durant la journée dans les recoins sombres des terriers, des niches de chiens, des étables, ou des maisons. Ils sont particulièrement actifs à la tombée de la nuit.

Dans les zones modérément chaudes, les phlébotomes sont actifs pendant les mois chauds puis disparaissent à l'automne. Alors que dans les pays tropicaux, ils sont plus au moins actifs toute l'année (Léger, 1999).

La durée du cycle dépend de l'espèce, de la température et d'autres facteurs mais elle est en général inférieure à 45 jours.



Figure 7 : Photo d'un Phlébotome (Laboratoire de Parasitologie de Strasbourg, 2009)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

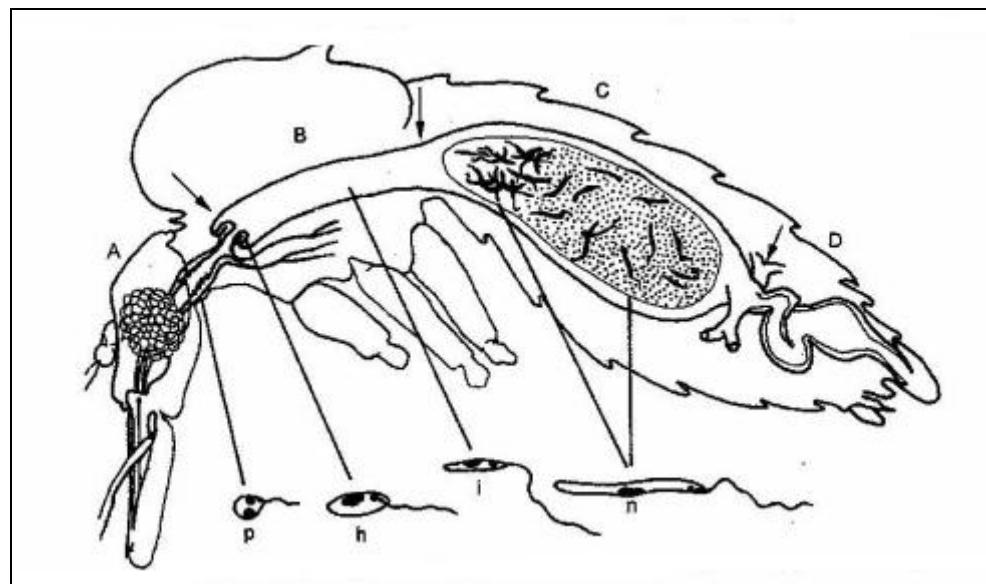


Figure 8 : schéma d'un phlébotome montrant les différents morphotypes des leishmanies tout au long du tube digestif

(Les flèches indiquent les subdivisions du tube digestif. **A.** œsophage. **B.** estomac. **C.** intestin moyen. **D.** intestin postérieur. Le sang dans l'intestin moyen est enveloppé dans la membrane péritriphique. **n** : promastigotes ; **i** : promastigote infectant ; **h** : forme haptomonad ; **p** : paramastigote). (Nozais et coll., 1996)

VI.3. Le réservoir

Les espèces de vertébrés, jouant le rôle de réservoir des *Leishmania*, différent d'une espèce parasitaire à une autre.

➤ *L. donovani*

L'Homme est le seul vertébré reconnu comme étant le réservoir de la LV endémique à *L. donovani* (OMS, 1984).

➤ *L. infantum*

C'est l'agent d'une zoonose dont le chien est le principal réservoir.

Certains canidés sauvages sont suspectés d'être des réservoirs primaires de *L. infantum*.

Par ailleurs, le rat noir (*Rattus rattus*) pourrait être impliqué comme réservoir naturel de *L. infantum* dans certains foyers méditerranéens (GRADONI et coll., 1983).

➤ *L. major*

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Ce parasite est maintenu par des rongeurs appartenant aux genres *Rhombomys*, *Meriones*, etc. (ELBIHARI et coll., 1984)

➤ *L. tropica*

D'après l'OMS (1984), c'est l'Homme qui joue le rôle de réservoir et de source de l'infestation.

Cependant, dans certains foyers, le chien a été trouvé naturellement infecté par *L. tropica* (GUESSOUS-IDRISSI et coll., 1997) voir même considéré comme un réservoir de ce parasite (NADIM et ROSTAMI, 1974).

Quand aux leishmanioses du nouveau monde, les parasites ont été isolés chez un très grand nombre de mammifères (Le paresseux, l'opossum, le fourmilier et le rat noir...) (Nozais et coll., 1996).

VI.4. Le cycle parasitaire

Le cycle de développement des leishmanies fait intervenir successivement deux hôtes : l'hôte vertébré, comme l'Homme, et l'hôte insecte, la femelle phlébotome.

Les leishmanies sont transmises par la piqûre infectante des phlébotomes femelles lors d'un repas sanguin chez un mammifère (Abonnec et coll., 1970). Les promastigotes métacycliques déposées au niveau du point de la piqûre sont phagocytés par les macrophages (Molyneux et coll., 1983 ; Baldet et coll., 2004) ; elles se transforment après en amastigotes (Bray et coll., 1973 ; Dedet, 2001). Les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées par scissiparité.

Selon l'espèce incriminée, le tissu atteint est différent.

À l'occasion d'un repas sanguin, la femelle phlébotome prélève au niveau du derme le sang du mammifère infesté, contenant des macrophages infectés par des amastigotes. Celles-ci arrivent dans le tube digestif de l'insecte, où elles sont libérées des globules blancs. Elles s'y différencient en promastigotes et s'y multiplient. Certaines d'entre elles s'accumulent ensuite dans le tube digestif de l'insecte alors que d'autres migrent vers les trompes de l'appareil salivaire: ce sont ces parasites qui seront injectés au niveau de la peau de l'hôte mammifère à l'occasion d'une piqûre (Nozais et coll., 1999).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

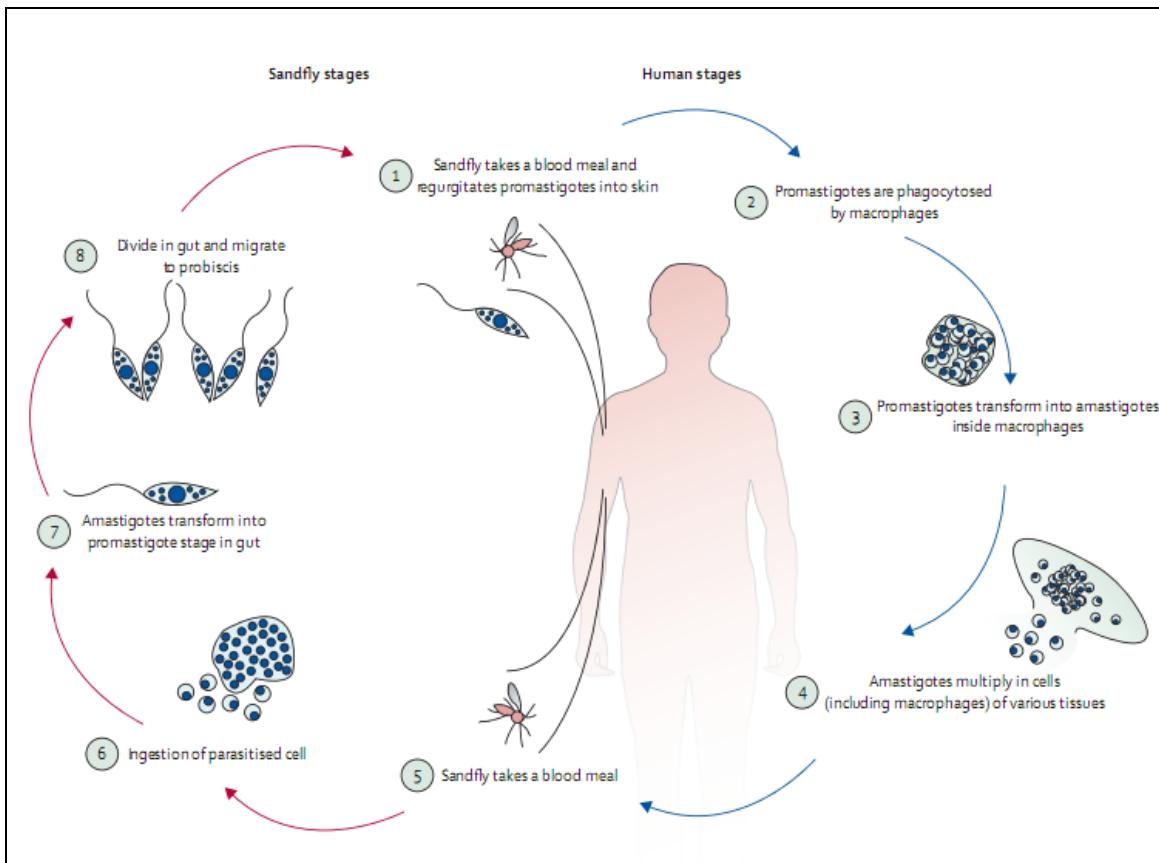


Figure 9: cycle parasitaire de la leishmaniose (REITHINGER.R et al. ; 2007)

VII. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES LEISHMANIES

VII.1. Organisation générale du génome

Comme de nombreux protozoaires d'importance médicale, le génome de Leishmania est resté longtemps peu étudié en raison des difficultés que posait son analyse.

Les leishmanies renferment deux génomes, l'un nucléaire et l'autre kinétoplastique.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

La taille du génome haploïde a pu être précisément déterminée à partir de l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé : elle est de 36 Mb (Megabases) avec des variations de $\pm 0,5$ Mb (Wincker et coll., 1996) selon les souches. Elle est relativement constante pour toutes les espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde.

Le génome a été découpé en 34 à 36 chromosomes (Britto et coll., 1988 ; Wincker et coll., 1996) de taille variante entre 0,3 et 2,8Mb.

L'une des caractéristiques essentielles du génome de Leishmania est sa richesse en Guanine/Cytosine (G/C) qui s'élève à 60% en moyenne (Alvarez et coll., 1994). Il s'agit d'un génome de complexité relativement faible, avec 60-65% de séquences uniques. 13% de séquences moyennement répétées et 12% de séquences fortement répétées (Leon et coll., 1978).

VII.2. Expression des gènes kinétoplastiques

Chez les kinétoplasmidés, le kinétopaste renferme deux types d'ADN : les maxi-cercles, équivalents du génome mitochondrial des mammifères, codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques (ARNr), et les mini-cercles qui interviennent en modifiant la transcription des gènes portés par les maxi-cercles par des phénomènes d' « editing » (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN (Kabb et coll., 2001 ; Gott, 2003).

Le kinétopaste contient 10 à 30 maxi-cercles identiques, d'une taille de 20 à 40 Kb selon les espèces, qui codent pour des gènes de la chaîne de transport des électrons, les gènes des ARNr et les ARN guides (Benne, 1985).

Les mini-cercles, au nombre de 1000 à 10000 par cellule, ont une taille inférieure à 1Kb.

VII.3. Expression des gènes nucléaires

Une des principales originalités des trypanosomatidés est le mode de transcription de l'ADN nucléaire : les gènes, qui ne comportent pas d'introns, sont fréquemment arrangés en tandem et leur transcription est polycistronique c'est-à-dire sans interruption entre les différents gènes d'une unité de transcription (Ravel et coll., 1999).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

La régulation de l'expression de ces gènes se fait principalement au niveau post-transcriptionnel via deux mécanismes : l'épissage (ajout d'une coiffe de 39 nucléotides en 5') et la polyadénylation en 3' (Ullu et coll., 1991 ; Clayton et coll., 2002). Par ce processus, les unités polycistroniques deviennent monocistroniques et chaque ARNm se retrouve avec un mini-exon en 5' et une queue poly A en 3' (Ravel et coll., 1999).

VIII. DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE

VIII.1. Diagnostic de la leishmaniose cutanée

VIII.1.1. Le prélèvement

Il est effectué à la périphérie de la lésion cutanée dans ses parties infiltrées, en évitant les zones ulcérées ou surinfectées par les bactéries.

Après désinfection de l'ulcération, le prélèvement est effectué à l'aide d'un vaccinostyle en raclant le revêtement cutané tout en allant de plus en plus profond jusqu'à la sérosité plus au moins teintée au sang.

Le matériel ainsi prélevé conviendra à la confection d'un frottis mince qui sera par la suite fixé au méthanol et coloré au Giemsa (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

VIII.1.2. Mise en évidence du parasite

La lame colorée est observée au microscope avec l'objectif *100 en ajoutant l'huile à immersion.

La recherche du parasite est souvent longue et orientée.

Une lame positive est caractérisée par la présence des amastigotes sur le frottis (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

VIII.1.3. Culture des leishmanies

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Une partie du prélèvement cutané peut être ensemencé en culture sur milieu gélosé (milieu NNN-sang) ou divers milieux liquides supplémentés.

Le milieu NNN est un milieu biphasique constitué par la gélose au sang frais de lapin décomplémenté ou non.

La culture est lente et nécessite des repiquages hebdomadaires. Une culture est dite négative après un mois et demi de repiquage négatif.

La culture est utile pour :

- Le diagnostic par la mise en évidence de la forme promastigote après 7 à 30 jours de culture. Ce sont des formes flagellées mobiles et libres.
- L'identification des espèces et des zymodèmes. Elle peut être réalisée avec des techniques de biologie moléculaire et enzymatiques (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

VIII.2. Diagnostic de la leishmaniose viscérale

VIII.2.1. Diagnostic clinique

Il est difficile même en zone d'endémie. Les leishmanioses viscérales simulent toutes les infections fébriles avec splénomégalie : paludisme, salmonelloses, certaines viroses, tuberculose hépatosplénique, et surtout hémopathies malignes et lymphomes (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

VIII.2.2. Diagnostic biologique direct

➤ Signes de présomption :

- L'hémogramme met en évidence une insuffisance médullaire :

- une anémie normochrome.
 - une leuconeutropénie.
 - une thrombopénie modérée.
- La vitesse de sédimentation est toujours augmentée.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

-les tests sérologiques permettent de détecter des taux élevés d'anticorps anti-leishmaniens au cours de la maladie (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

➤ Argument direct de certitude :

Il est apporté essentiellement par la mise en évidence des leishmanies dans un frottis de moelle osseuse et/ou dans une culture sur milieu NNN.

Dans certains cas particuliers, le parasite est retrouvé dans une biopsie du foie ou de l'intestin grêle (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

VIII.2.3. Diagnostic immunologique

Les techniques les plus utilisées sont l'IFI (immuno-fluorescence indirecte) qui reste le test de référence et la technique ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) qui a les mêmes qualités que la précédente.

Le DAT (test d'agglutination directe), une technique plus simple, est un excellent test de dépistage et d'utilisation plus facile. Il est donc à la portée des laboratoires périphériques (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

IX. IDENTIFICATION DES SOUCHES LEISHMANIENNES

IX.1. Typage enzymatique

Parmi les méthodes d'identification des leishmanies, l'analyse des isoenzymes par électrophorèse.

La première caractérisation des isoenzymes des leishmanies a été faite par Gardener et ses collaborateurs (Gardner et al., 1974) qui ont utilisé la mobilité électrophorétique de la malate déshydrogénase, complétée par la densité de flottaison de l'ADN kinétoplastique et de l'ADN nucléaire pour différencier plusieurs groupes.

Par la suite, l'analyse des isoenzymes a été largement développée et occupe actuellement une place de choix comme technique d'identification. Son succès est dû en grande partie à l'existence chez les kinetoplastida d'un polymorphisme important,

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

qui s'exprime sous la forme d'éléctromorphes stables et relativement spécifiques (Godfrey, 1979).

L'électrophorèse des isoenzymes constitue la méthode la plus courante pour l'identification des souches de *Leishmania*, au niveau spécifique ou intraspécifique. De plus, l'application des méthodes numériques de classification aux données de l'électrophorèse a permis son utilisation à des fins taxonomiques.

Cette méthode a permis d'identifier les espèces leishmaniennes présentes au Maroc, à savoir : *L.major* MON 25 (Rioux et coll., 1986), *L.infantum* MON 24 (Rioux et coll., 1996), *L.tropica* MON 102, MON 107, MON 109, MON 112, MON 113, MON 122 et MON 123 (Pratlong et coll., 1991).

Une autre application de l'analyse des isoenzymes est l'étude éco-épidémiologique des foyers leishmaniens pour déterminer les « vrais vecteurs » et les « vrais réservoirs ». De nombreuses études à travers le monde ont ainsi bénéficié de cette approche (Pratlong et coll., 1999). L'application de cette méthode est appliquée aussi dans le but d'identifier les parasites responsables de la co-infection Leishmaniose-SIDA (Pratlong et coll., 1995).

IX.2. Typage moléculaire

Depuis une vingtaine d'années, les techniques de biologie moléculaire ont eu un impact considérable comme moyen de détection et d'identification des micro-organismes. Par rapport aux autres approches, l'étude directe de la molécule d'ADN présente de nombreux avantages : grand nombre de caractères utilisables (chaque nucléotide peut être considéré comme caractère), accessibilité de la molécule tout au long du cycle parasitaire, possibilité d'étudier des espèces difficiles à entretenir *in vitro*, rapidité d'analyse avec notamment un intérêt thérapeutique quand les souches montrent une différence d'infectivité pour l'Homme (Pratlong et coll., 1999).

Le diagnostic moléculaire de la leishmaniose par la PCR (polymerase chain reaction) a fait l'objet de plusieurs études et apparaît plus sensible que les autres méthodes de diagnostic classique (Aviles et coll., 1999 ; Belli et coll., 1998 ; Bensoussan et coll., 2006 ; Marfurt et coll., 2003 ; Meredith et coll., 1993 ; Oliveira et coll., 1997 ; Osman et coll., 1997 ; Schonian et coll., 2003).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour l'étude.

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle (Boer et coll., 2006).

L'analyse par PCR est basée sur l'amplification de la région ITS1 en utilisant des amorces spécifiques.

La région ITS1 est commune chez le genre *Leishmania*, polymorphe chez les différentes espèces des leishmanies, la digestion de l'amplicon ITS1 avec les enzymes comme HaeIII, Hhal, MnII ou Rsal permettent de faire la distinction entre la majorité des espèces (Aljawabreh et coll., 2004 ; Musso et coll., 1996 ; Schonian et coll., 2003).

Il existe aussi l'amplification par PCR de l'ADN du kinétoplaste. L'ADN-K contient presque 1000 mini-cercles par cellule avec presque 800 pb dont 200 identiques et 600 différents. Ce nombre élevé de copies donne une sensibilité très élevée pour le diagnostic de ce genre mais l'hétérogénéité des régions diminue la spécificité de la PCR (Cortes et coll., 2004 ; Noyes et coll., 1998).

X. TRAITEMENT DE LA LEISHMANIOSE

Les antileishmaniens classiques qui sont les antimoniés pentavalents, l'amphotéricine B et la pentamidine demeurent d'utilisation courante. Les molécules nouvellement introduites se résument pour l'instant à l'allopurinol, à la paramomicyne et à deux imidazolés, et encore ne sont utilisées que dans les formes mineures de leishmanioses ou en association avec des drogues classiques (Dedet, 1999).

Sans traitement, le pronostic des LV est sombre. Les dérivés de l'antimoine permettent la guérison des patients dans la grande majorité des cas.

Le médicament utilisé au Maroc pour le traitement de la leishmaniose est sous forme d'une injection intra-lésionnelle ou une injection intramusculaire profonde de glucantime. Ce médicament est pris en charge par l'état (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

➤ **Vaccination**

Face au problème de santé que représentent les leishmanioses, une seule mesure apparaît opportune : la prévention par une vaccination efficace et sans complication secondaire (Cruz-cubas et coll., 1999).

De nombreux essais vaccinaux ont été réalisés avec des leishmanies tuées. Plus de 17 protéines recombinantes ont été testées chez l'animal, sans résultat probant. Chez la souris, des vaccinations avec une interleukine 12 comme adjuvant se sont montrées efficaces, mais de façon passagère comme les essais chez l'homme avec des leishmanies tuées. De ce fait, il semble que l'induction d'une réponse Th1 ne soit pas suffisante pour entraîner une immunité durable, qui nécessite la persistance de parasites vivants. Des essais encourageants ont été obtenus avec *L.major* génétiquement modifié (appelé Ipg2) qui persiste indéfiniment dans l'organisme vivant sans caractère pathogène. Cette souche est donc utilisée chez la souris pour induire une immunité durable contre les souches pathogènes et étudier les phénomènes d'immunité protectrice dans la leishmaniose. Le mécanisme de survie des parasites dans un organisme vivant n'est pas élucidé.

Dans de nombreuses régions d'Asie, la leishmaniose cutanée provoquait des lésions multiples. Aussi, le but de la leishmanisation consistait-il à extraire de l'exsudat à partir d'une lésion active et à l'inoculer aux jeunes enfants pour provoquer une lésion unique qui guérit spontanément et protège contre les infections naturelles, en particulier au niveau de la face. Puis ont été utilisées des formes promastigotes de *L. major* obtenues en culture, pour poursuivre la leishmanisation dans les années 1980, mais la standardisation de la production s'est avérée difficile (Institut Pasteur de TEHERAN ; 2008).

XI. ASPECTS DE SANTE PUBLIQUE ET DE LUTTE

Pendant de nombreuses années, l'impact des leishmanioses sur la santé publique a été grossièrement sous-estimé, principalement par manque de reconnaissance de la gravité du problème. Au cours des deux dernières décennies, il est devenu évident que la plupart des formes cliniques de la leishmaniose sont beaucoup plus fréquentes qu'on ne l'avait soupçonné, en terme d'incidence et d'extension géographique : le nombre de cas ne cesse de croître au niveau mondial, la distribution géographique

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

s'étend, de nouvelles zones d'endémie apparaissent, aggravant le problème en terme de santé publique.

Comme les leishmanioses représentent des entités d'une grande diversité clinique et épidémiologique (tant au niveau du parasite, que du vecteur et du réservoir humain et animal) il est de toute première importance, en termes de lutte, de maintenir un très bon niveau de surveillance ; ceci peut se faire, dans le cadre d'un programme national de lutte contre les leishmanioses (PNLCL) (lancé en 1997). La stratégie de lutte élaborée par ce programme a été traduite en directives et bases techniques sous forme d'un guide des activités de lutte édité en 1997. Par la suite les directives ont été ajustées et réadaptées au contexte épidémiologique actuel sous forme d'une nouvelle édition 2010. Ce document constitue donc une référence et un outil de travail indispensable pour le personnel de la santé.

Le Programme National de Lutte Contre les Leishmanioses (PNLCL)

C'est un programme qui permet d'anticiper l'apparition d'épidémies et d'identifier d'éventuels facteurs de risque « émergents » pouvant créer des situations épidémiologiques nouvelles.

Les objectifs du programme:

- Contrôler la transmission de la leishmaniose cutanée au niveau de tous les foyers actifs.
- Eviter l'extension des leishmanioses cutanées à d'autres zones à risque.
- Prise en charge précoce des cas de la LV.

La lutte contre les leishmanioses se fait selon deux actions, une action sur le parasite et une action sur le phlébotome vecteur.

La stratégie et les activités développées par le programme sont :

- Le dépistage et le traitement des cas ;
- La lutte contre les rongeurs par des actions chimiques et physiques ;
- Le renforcement de la collaboration intersectorielle avec les départements ministériels de l'Intérieur et de l'Agriculture ;



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- L'éducation sanitaire des populations des zones à risque pour les sensibiliser au problème des leishmanioses et les inciter à participer à la lutte contre la maladie.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



MATERIEL ET METHODE

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

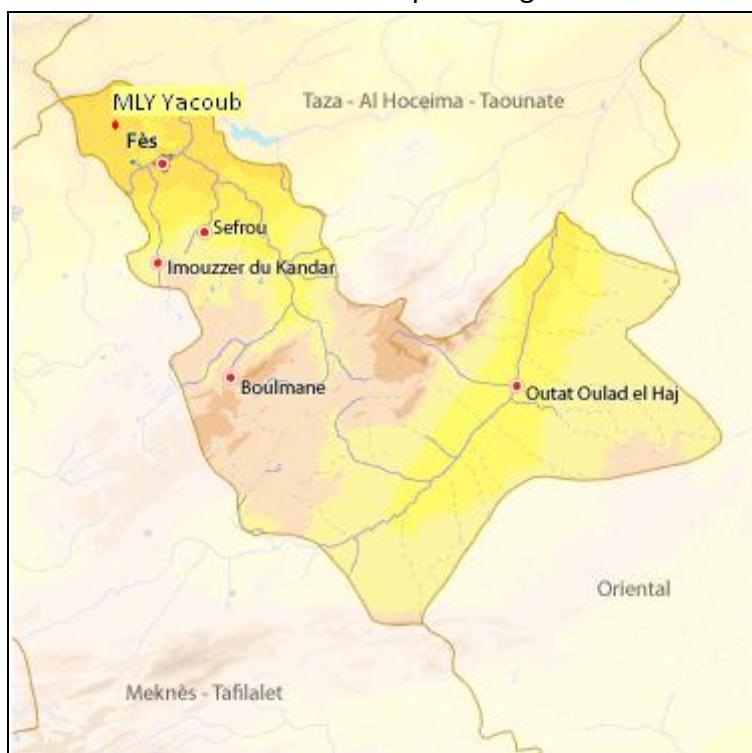
Deux types d'études seront traités dans ce travail :

- ✓ Une étude rétrospective ayant pour objectif d'étudier les cas positifs de la leishmaniose cutanée dans la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub depuis l'an 2005 jusqu'à 2010, et ;
- ✓ Une étude prospective concernant le typage moléculaire des leishmanies et l'identification de l'espèce leishmanienne en cause à partir des lames reçues à l'INH en 2010.

I. MATERIELS

I.1. Zone d'étude

La préfecture de FES et la province de MLY Yacoub font partie de la région Fès-Boulemane, créée par le dahir N°1-97-84 du 2 avril 1997 qui a découpé le royaume en 16 régions, et qui définit sa compétence ainsi que sa composition administrative et communale. La région Fès Boulemane est limitée au nord par la région Taza- Al-Hoceima Taounate, à l'est et au sud par la région de l'orientale, au Sud- Ouest par la région Meknès- Tafilalet et au Nord-Ouest par la région Gharb- Chrarda- Beni Hssen.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Figure 10 : Situation de la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub dans la région Fès-Boulemane (www.fes-boulemane.ma)

❖ La préfecture de FES

Préfecture	Communes urbaines	Communes rurales
Préfecture Fès	• Fès • Mechouar Fès Jdid	•Oulad Tayeb •Sidi Hrazem •Ain Beida

La préfecture de Fès compte deux communes urbaines (Commune Urbaine de Fès et Commune Urbaine de Mechouar Fès-Jdid) la commune de Fès contient six arrondissements (arrondissement Agdal, arrondissement Fès Medina, arrondissement Jnane EL WARD, arrondissement Zwagha, arrondissement les Mérinides et arrondissement Saïss), tandis que la commune de Mechouar Fès-Jdid contient 3 communes rurales (Commune Rurale d'Oulad Tayeb, Commune Rurale de Sidi Harazem et la Commune Rurale d'Ain Bida).

Tableau 1 : communes rurales et urbaines de la préfecture de Fès

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

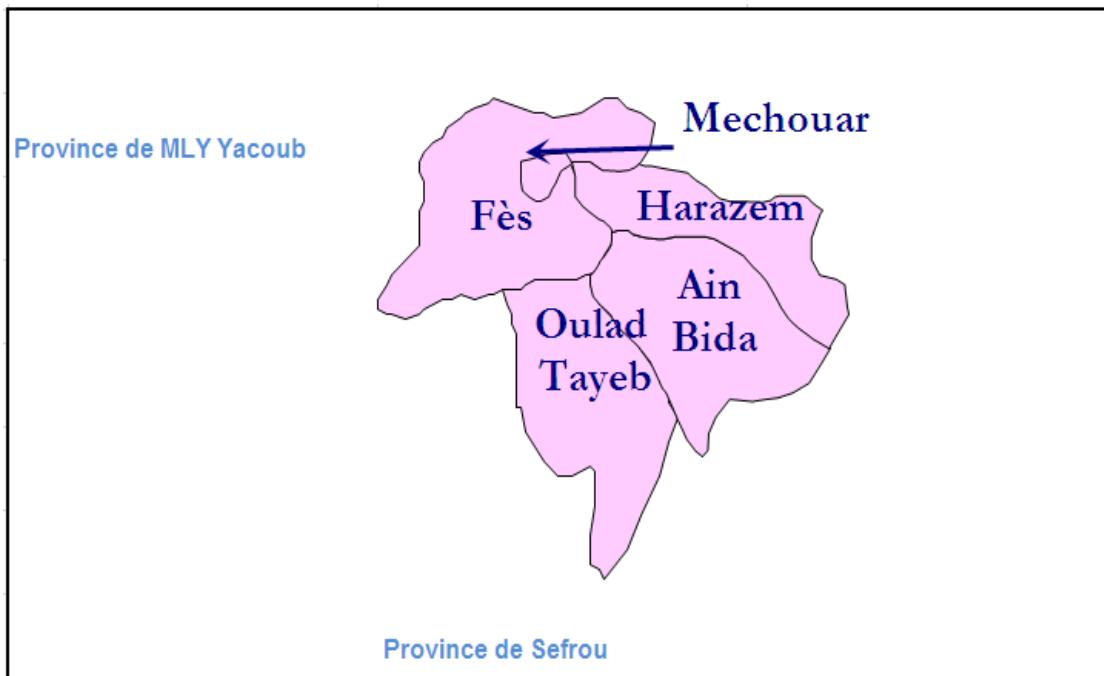


Figure 11 : carte de la préfecture de Fès (Ministère de l'interieur)

La Préfecture de Fès compte 975.507 habitants (hab), dont la population urbaine est de 952.749hab et la population rurale est estimée de 22.758hab. La densité moyenne de la population dans La médina de Fès y est de 1200 personnes / hecitar. (Source: Monographie de la région de Fès Boulemane, 2004)

Située dans la région du Moyen Atlas, le climat de la région est à la fois méditerranéen et continental. Cela se traduit par une forte amplitude thermique. Les températures moyennes maximales varient entre 15° et 22°C et les minimales de 7° à 14°C en printemps et en automne. L'été, les températures moyennes maximales montent jusqu'à plus de 40°C. Enfin, l'hiver est relativement froid. En décembre, en janvier et en février, les températures moyennes minimales et maximales sont respectivement de 2° et 11°C. (Source: Direction régionale des eaux et forêts de Fès, 2006)

❖ **La province de MLY Yacoub**

La Province de Moulay Yacoub a été créée le 10 septembre 2003, elle s'étend sur un territoire de 1700 Km², elle est limitée au nord par la province de Taounate , A l'est et au sud-est par la préfecture de Fès , au sud par les provinces de Sefrou et Elhajeb , A l'ouest par la préfecture de Meknès et la province de Sidi Kacem.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

La province de Moulay Yacoub est composée d'une seule commune urbaine et de dix communes rurales comme le montre le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : communes urbaines et rurales de la province de MLY Yacoub

Provinces	Communes urbaines	Communes rurales
Province Moulay Yacoub	• Moulay Yacoub	•Sebaa Rouadi •Ain - Kansara •Mikkes •Ain Bou Ali •Sebt Loudaya •Louadaine •Ain Chkef •Oulad Mimoun •Sidi Daoud Laajajra

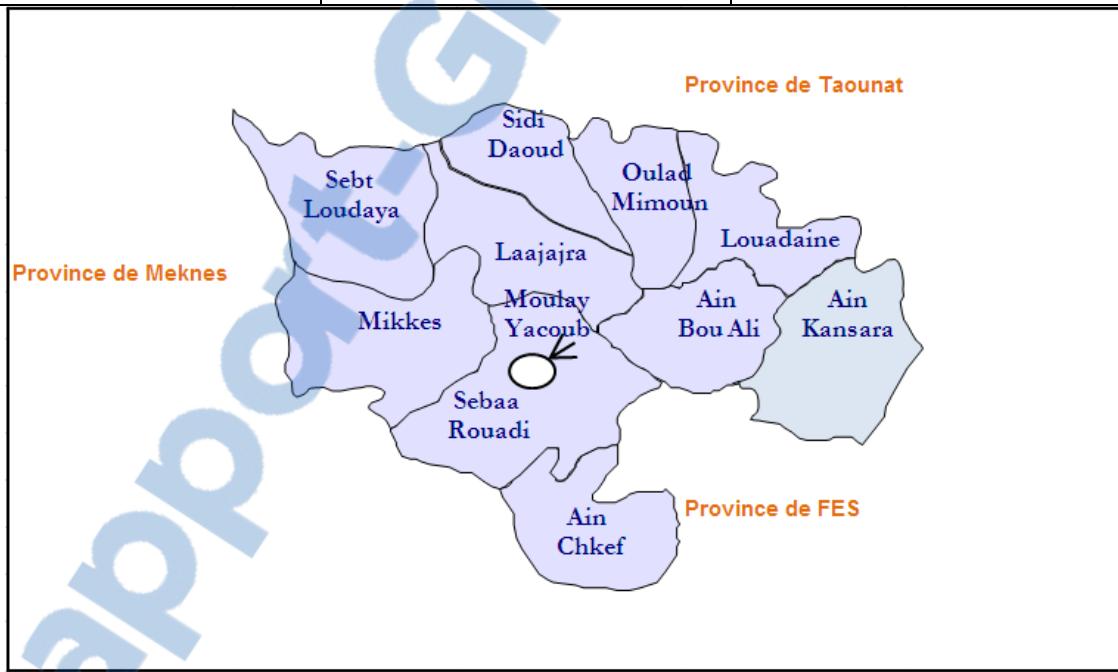


Figure12 : carte de la province de MLY Yacoub (ministère de l'intérieur)

La province se situe à une altitude de 563.33m au dessus du niveau de la mer, elle se caractérise par un relief accidenté composé de plateaux et collines, d'une altitude qui varie entre 350m et 500m, et de plaines extrêmement riches sur le plan agricole, ainsi que de montagnes dont le point culminant atteint environ 910 m (Zalagh et Tghat).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Le climat de la province de Moulay Yacoub est un climat continental caractérisé par une température minimale de 10° et maximale de plus de 30°. (Direction régionale des eaux et forêts de Fès, 2006)

La province de Moulay Yacoub compte 149.070 hab, dont la population urbaine est de 3153hab et celle rurale est estimée à 145.917hab. La population est à majorité rurale, mais la tendance récente est celle d'un rapprochement entre les 2 composantes de celle-ci à savoir la population urbaine et rurale. (Monographie de la région de Fès-Boulemane, 2004)

I.2. Période d'étude

La période d'étude s'étale de 2005 à 2010.

I.3. Inventaire des lames parvenus à l'INH depuis l'an 2005 jusqu'à l'an 2010

La leishmaniose est une maladie parasitaire à déclaration obligatoire. Chaque individu étant suspecté d'être atteint d'une leishmaniose doit effectuer un prélèvement au centre de santé correspondant à son secteur. Après le diagnostic microscopique effectué au niveau du laboratoire provincial des maladies parasitaires, les lames sont envoyées au LNRL à l'INH pour confirmation.

Une fiche de renseignement devrait être soigneusement (malheureusement ce n'est pas toujours le cas) remplie par le technicien effectuant le prélèvement ; cette fiche (Annexe 1) fournie des informations sur le patient à savoir :

- Nom et prénom
- Age
- Sexe
- Secteur
- Localité
- Type de leishmaniose
- Nombre de lésions
- Localisation des lésions

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- Date du début de la maladie et par conséquence la durée de la maladie
- Taille des lésions
- Aspect des lésions
- Durée de la maladie
- Déplacements antérieures effectués avant l'apparition des lésions.

II. Méthode

II.1. L'étude rétrospective

Les fiches de renseignements accompagnant les lames envoyées par les provinces parvenues à l'INH depuis l'an 2005 jusqu'à 2010 ont été analysées et les données qu'elles contenaient ont été exploitées par le logiciel Microsoft Office Excel. Ces données reflètent généralement la situation des leishmanioses cutanées dans la majorité des provinces. Néanmoins, quelques contradictions ont été constatées avec les données de la direction épidémiologique de lutte contre les maladies (DELM). Ces contradictions (généralement non importantes) correspondent surtout aux cas de leishmanioses diagnostiqués cliniquement et déclarés au service des maladies parasitaire de la DELM.

Les données ont été traduites sous forme de graphes permettant ainsi de mieux visualiser les résultats de notre étude.

II.2. L'étude prospective

II.2.1. Extraction d'ADN par phénol-chloroforme-alcool

✓ Principe

L'extraction d'ADN à partir des échantillons cliniques est délicate. Ceci est dû à la nature de la matière biologique qui peut être sous forme liquide, solide ou à l'état sec; et aussi en raison des risques de contamination entre échantillons. La préparation d'ADN d'échantillons biologiques inclut l'extraction d'ADN, la précipitation à l'éthanol et la purification d'ADN. L'extraction phénol-chloroforme est une méthode de purification minutieuse qui inclut beaucoup d'étapes de lyse, de digestion, d'extraction et de lavage. C'est efficace pour éliminer les facteurs d'inhibition, comme l'hémoglobine. Elle est recommandée particulièrement pour des échantillons ayant relativement une teneur importante de sang. La précipitation avec l'éthanol est la méthode standard pour récupérer les acides nucléiques dans des solutions aqueuses.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Elle est rapide et efficace pour les quantités infimes d'ADN et d'ARN. Une bonne extraction d'ADN à partir du matériel biologique et sa non contamination par des inhibiteurs sont les facteurs qui déterminent un bon diagnostic par PCR.

- ✓ Echantillon biologique (frottis cutané sur lames) ;

Les lames étudiées sont réparties selon les secteurs (origine des malades) comme suit (une lame par secteur) :

Tableau 3 : répartition des lames concernées par l'étude moléculaire selon les secteurs

Province	Secteur
Fès	1. Ain beida
	2. Ain nokbi
	3. Oulad tayeb

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

	4. Skhinat
	5. Mont Fleuri
	6. Sidi Brahim
	7. Ain haroun
	8. Benslimane
	9. Lemteyéne
	10. Sahrij Gnawa
	11. Oued Fès
	12. Aouinat Al Hajjaj
	13. Lalla Soukaina
	14. Adarissa
	15. Dar Dbibagh
MLY Yacoub	1. Ain Bouali
	2. Ain Kansara
	3. Ain Chkef

✓ **Tampons et Solutions** (Annexe 2)

- Tampon de lyse
- SDS (10% w/v)
- Protéinase K, 20mg/ml
- Phénol:chloroforme: isoamyl alcool (25:24:1, v/v)
- Chloroforme:isoamyl alcool (24:1, v/v)
- Ethanol. 96 % et 70%
- Sodium acétate (3 M, pH 5.2)
- TE (pH 8.0)

✓ **Equipement et Consommables**

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- La Micro Centrifugeuse réfrigérée avec rotor pour tube de 2ml.
- Bain Marie
- Pompe pour aspiration à vide
- Congélateur -20°C
- Tubes Eppendorff stériles de 1,5 ou 2 ml
- Pipettes et cônes stériles (10, 100, 1000 µl)

✓ **Méthode**

L'extraction d'ADN par le phénol chloroforme alcool selon les protocoles décrits par Meredith et al., 1993 et El Tai et al., 2000.

1- On ajoute 100µl du tampon de lyse sans triton contenant déjà le SDS10% à une concentration de 1% (exemple :1µl pour 100µl de tampon) sur le Matériel tissulaire adhérant sur la lame. Avec un cône stérile on gratte et on aspire les débris et le mélange en suspension sur la surface de la lame, on le transfère à un tube marqué de 1.5 ml. On répète la procédure en utilisant un volume total de 200 µl du Tampon de lyse.

2- On ajoute 3 µL de protéinase K (20mg/ml) pour obtenir une concentration finale 200 µg/ ml, on vortexe, et on incube toute la nuit à 60 °C ou utiliser 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) et incuber pendant une heure seulement.

3- On ajoute un volume égal (200 µl) du phénol à chaque tube. On vortexe pendant 2-3 minutes.

4- On centrifuge à 14 000 tr/min pendant 3 min. On transfère soigneusement la phase aqueuse (pipeter doucement en mettant le cône contre le bord du tube incliné, sans toucher l'interface) à un tube stérile et étiqueté contenant un volume égale (200 µl) de mélange Chloroform-Isoamyl Alcool (24:1,v/v) (= solution Chisam). On se débarrasse de l'interface et de la phase organique. Si la phase organique et la phase aqueuse ne sont pas bien séparer on renouvelle la centrifugation pendant un temps plus long.

5- On vortexe et on centrifuge comme auparavant.

6- On transfère soigneusement la phase aqueuse à un tube stérile étiqueté contenant le 1/10ème du volume d'Na acétate 3M ou Na Cl 5M. On rajoute après 2.5 du volume d'éthanol glacial 96% (500 µl).

7- On mélange doucement. On visualise la méduse puis on incube 30 minutes (le mieux toute la nuit) à -20°C pour permettre au précipité d'ADN de se former.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

8- On centrifuge à la vitesse Maximale pendant 10 à 30 minutes. On enlever le surnageant soigneusement par aspiration à vide en faisant attention à ne pas toucher le culot d'ADN, qui peut être invisible.

9- On lave le culot en mettant dans le tube de l'éthanol à 70% (300 µl) sans remuer ou secouer. Puis on centrifuge à la vitesse maximale pendant 5 min à 4°C. On enlève le surnageant soigneusement par aspiration à vide en faisant attention à ne pas toucher le culot d'ADN, qui peut être invisible.

10- On laisse les tubes ouverts et les faire passer au lyophilisateur pendant 30 minutes jusqu'à ce que les dernières traces d'éthanol soient évaporées.

11- On dissous le culot d'ADN dans 50 µl d'eau bi-distillée ou dans du tampon TE. Les échantillons d'ADN dilués sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

II.2.2. Amplification par PCR de la région ITS1

La région ITS1 a été amplifiée par PCR selon les protocoles décrits par Al –jawabreh, 2004 et schonian, 2003.

II.2.2.1. But

Amplifier par PCR la région ITS dans le ribosome opéron des différentes espèces de *leishmania* en utilisant l'extrait d'DNA des lames.

II.2.2.2. Principe

Cette PCR cible la partie transcrive interne ribosomale (ITS1-PCR) des Leishmania. La région ITS1 est polymorphe chez les différentes espèces de Leishmania.

II.2.2.3. Echantillons

- Extrait d'ADN à partir des lames.
- Contrôles positifs des 3 espèces (*L.major*, *L.tropica*, *L.infantum*).
- Contrôle négatif (eau).

a. Tampons et solutions

- dNTP mélange (10 Mm) contenant les dNTPs.
- 10x tampon d'amplification
- Taq polymérase (5U /µl).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- Eau bi distillée stérile ou millipore stérile.

b. Equipements et consommables

- Thermocycleur.
- Pipettes (10-200-1000).
- Cônes pour pipette (10-200-1000).
- Tubes stériles pour PCR de 0.5 ml.
- Tubes eppendorfs stériles de 1.5 ml.

c. Primers

Forward primer (10pmol /µl)
 Reverse primer (10pmol /µl)
 (Schonian et al., 2000)

LITSR: 5'-TGATACCCTTATCGCACTT-3'
 L.5, 8.S: 5'-CTGGATCATTCCGATG-3'

II.2.2.4. Méthode

Préparer le Master Mix :

Tableau 4 : Composition du Master Mix pour l'amplification ITS1

n°	Mix pour une réaction de volume total 50µl	
	Composants	Quantité pour un échantillon .µl
		PCR-ITS1
1	10X tampon PCR	5
2	dNTPs (10mM)	1
3	Primer, Forward, (20pmol/µl)	1
4	Primer, réverse, (20pmol/µl)	1
5	MgCl ₂ (25mM)	2,5
6	Taq polymérase (5unité/µl)	0,5
7	Eau	34

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Volume Total du Mix	45
----------------------------	----

Dans le cas où on a plus d'un échantillon, multiplier la quantité montrée dans le **tableau 4** par le nombre d'échantillons (18 échantillons pour cette étude)

- Vortexer le Mix et centrifuger brièvement pour que toutes les gouttelettes déposées sur les bords décantent.
- Etiqueter les tubes stériles de 0,5 ml et ajouter 45µl du Mix à chaque tube.
- Ajouter 5µl d'ADN et 3µl (20ng /µl) des contrôles positif et négatif.
- Après l'ajout de l'échantillon d'ADN ou des témoins, vortexer les mélanges et centrifuger brièvement.
- Lancer l'amplification des acides nucléiques selon les paramètres décrits dans le tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres des différents cycles de la PCR ITS1

Nombre de cycle	Dénaturation	Annealing	Polymérisation
Cycle initial	2min .95°C	0	0
32 cycles	20sec.95°C	30sec.53°C	1min.72°C
Cycle Final	0	0	6min.72°C
Infini			4°C

- A la fin du programme sortir les tubes PCR du thermocycleur.
- Les produits d'amplification des lames des contrôles peuvent alors être stockés à -20°C ou utilisés dans le gel d'agarose 1,2% dans les 24h qui suivent.

II.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser l'ADN des Leishmanies

II.2.3.1. But

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Le but d'électrophorèse sur gel horizontal est la séparation des fragments d'ADN et leur détection par intercalation avec le Bromure d'éthidium (BET) et leur visualisation sous les rayons Ultraviolets (UV). Le processus de séparation est facilité par un courant électrique et basé sur la différence de charge et de poids entre les molécules.

II.2.3.2. Matériels nécessaires

a. Echantillons

- ✓ Les produits d'amplification (PCR).
- ✓ ADN marqueur de tailles (100bq DNA leader).

b. tampon et solutions

- ✓ TAE (Tris –acetate-EDTA) buffer (x1).
- ✓ Loading dye.
- ✓ Bromure d'éthidium (10mg/ml).

c. Equipement et consommables

- ✓ Four à Micro –onde ou plaque chauffante.
- ✓ Balance.
- ✓ Bain Marie.
- ✓ Cuve d'électrophorèse.
- ✓ Transilluminateur + Camera –photo.
- ✓ Barreaux magnétiques.
- ✓ Ballons stériles de 500.
- ✓ Gants.
- ✓ Pipettes et cônes pour pipettes (10, 100,1000µl).

II.2.3.3.Méthode

- ✓ On prépare une quantité suffisante de tampon d'électrophorèse pour remplir la cuve et pour préparer le gel (tampon 1xTAE).
- ✓ On peser la quantité suffisante d'agarose en poudre (1.2% du gel d'agarose)et on la met dans un ballon propre en verre.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- ✓ On ajoute le tampon 1XTAE à température ambiante. Le tampon doit occuper au max 40% du volume du flacon.
- ✓ On ferme l'opercule du ballon avec des cotons pour garantir l'équilibre de pression.
- ✓ On réchauffe le ballon en verre dans le four à micro – ondes (au début à température élevée jusqu'à ce que les bulles apparaissent, puis réduire la température pour éviter le brouillage). On pese le ballon en verre et la solution avant le chauffage.
- ✓ On mélange soigneusement le ballon en verre de temps en temps pour s'assurer que toutes les particules d'agarose sont dissoutes complètement dans la solution. A la fin on obtient une solution transparente.
- ✓ On pese le flacon et la solution de nouveau et on vérifie si le volume de la solution n'a pas été diminué par l'évaporation pendant le bouillonnement, on rajoute de nouveau du H₂O chaude si nécessaire.
- ✓ On transfère le ballon dans le bain marie à 55°C, ou on laisse le ballon se refroidir à la température ambiante.
- ✓ Tandis que le gel d'agarose se refroidit, on choisit le peigne approprié pour former les fentes types dans le gel. On place le peigne 0.5-1 millimètre au dessus du gel.
- ✓ On ajoute le volume approprié du BET pour avoir une concentration dans le gel de 0.2µg/ml (2µl du bromure d'éthidium dans 100 ml d'agarose).
- ✓ On verse le mélange dont la température est de 50 à 60 °C sur la plaque d'électrophorèse horizontale. On place les 2 peignes dans la plaque en attente de sa solidification (=20 min).
- ✓ On enlève les peignes doucement pour ne pas abîmer les trous formés et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse (mettre un fond foncé pour voir les trous). On ajoute juste assez du tampon d'électrophorèse pour couvrir le gel à une profondeur de 1 millimètre.
- ✓ On prend un morceau de parafilm sur lequel on dépose 2µl du Loading buffer (tampon de charge).
- ✓ On prend 10µl de chaque produit d'amplification et on le mélange avec les gouttes déposées.
- ✓ On prend 5µl du marqueur de taille (DNA Ladder) mélangé aussi avec la goutte du Loading Buffer.
- ✓ On charge les trous du gel d'électrophorèse en déposant les 12µl des échantillons mélangés au tampon de charge (respecter l'ordre des échantillons déposé dans les trous du gel d'électrophorèse).
- ✓ On ferme la cuve et la brancher à 220V régler le voltmètre de la cuve à une tension de 90Volts (utiliser un voltage de 1-5V/cm=100-120) l'ADN doit migrer vers l'anode positive.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- ✓ Le temps de migration ne doit pas être dépassé. On n'utilise pas une tension supérieure à 120V.
- ✓ A la fin de la migration on éteint le courant électrique et on enlève le couvercle de la cuve.
- ✓ On lit la plaque sous UV et on prend des photos. L'emplacement des fragments d'ADN apparaît sous la forme de bandes.

II .2.4. L'analyse RFLP du produit PCR ITS1

L'analyse RFLP du produit PCR ITS1 a été réalisée selon le protocole décrit par Schonian et al., 2003.

1. Principe

Identifier les espèces de *Leishmania* par digestion du produit PCR ITS1 par des endonucléases de restriction. (RFLP= Restriction fragment length polymorphisme). L'enzyme de restriction MnII permet de distinguer entre les espèces *L.tropica*, *L.major* et *L.infantum*.

2. Matériel nécessaire

a. Echantillons

- ✓ Produit PCR ITS1.
- ✓ ADN marqueur de tailles standard.

b. tampon et solutions

- ✓ 10xtampon enzyme de restriction.
- ✓ Enzymes de restriction MnII, BSA (le sérum albumine du bovin).
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ 2% d'agarose.

c. Equipement et consommable

- ✓ Four à Micro –onde.
- ✓ Balance
- ✓ Bain Marie.
- ✓ Cuve d'électrophorèse et accessoires.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

- ✓ Transilluminateur + Camera –photo.
- ✓ Ballons stériles de 500.
- ✓ Gants.
- ✓ Pipettes et cônes pour pipettes (10 et 200).

3. Méthode

Tableau 6 : Composition du Master Mix pour la digestion MnII

Composants	Quantité en μ l
10xTampon Buffer	3
BSA	1
Enzyme (MnII)	1
H ₂ O	21
Volume total	25

- ✓ L'enzyme est additionnée à la dernière minute.
- ✓ On vortexe le Mix et centrifuger brièvement pour décanter toutes les gouttelettes déposées sur les bords.
- ✓ On étiquete des tubes stériles de 1.5ml pour micro centrifugation. A chacun d'eux on additionne 50 μ l du Mix contenant le produit PCR. On vortexe après l'ajout du Mix et centrifuger pendant quelques secondes.
- ✓ On incube à 37°C pendant 1-2 heures dans un bain marie ou un incubateur. Entre-temps, on prépare l'agarose à 2%.
- ✓ Après l'incubation, on dépose 15 μ l du mélange de restriction avec 2 μ l du Loading Buffer, cette étape peut se faire en ajoutant le tampon Loading au tube de micro centrifugation.
- ✓ On charge doucement les puits du gel par la mixture des échantillons en utilisant des micropipettes avec cônes jetables. Dans le dernier puit on dépose le marqueur de taille moléculaire appropriée.
- ✓ On démarre le gel d'agarose à un voltage de 1-5V/cm (110-120) mesuré selon la distance entre l'électrode positive et négative.
- ✓ Quand les échantillons du produit de digestion ont suffisamment migré à travers le gel (2heures), on éteigne le courant électrique et on enlève le couvercle de la cuve.
- ✓ On examine le gel sous UV et on photographie le gel.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



RESULTATS ET DISCUSSION

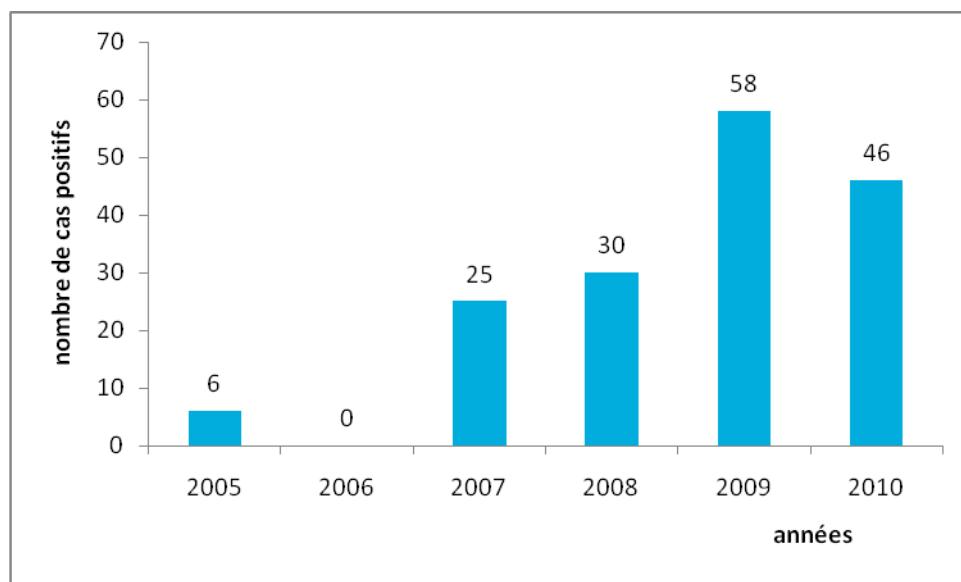
UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

RESULTATS

A. Etude rétrospective

I. Analyse de la LC dans la préfecture de FES de 2005 à 2010

1. Evolution de la LC de 2005 à 2010



Graphique 2 : Evolution de la LC dans la préfecture de FES de 2005 à 2010

Depuis l'an 2005 jusqu'à 2010, le LNRL à l'INH a confirmé 65 frottis cutané de malades atteints de la LC envoyés par la préfecture de FES.

On constate que si on répartit le nombre de cas positifs par rapport aux années, il est beaucoup plus faible que celui déclaré durant les premières années (331 cas) après la déclaration du foyer de FES (Annexe 3).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

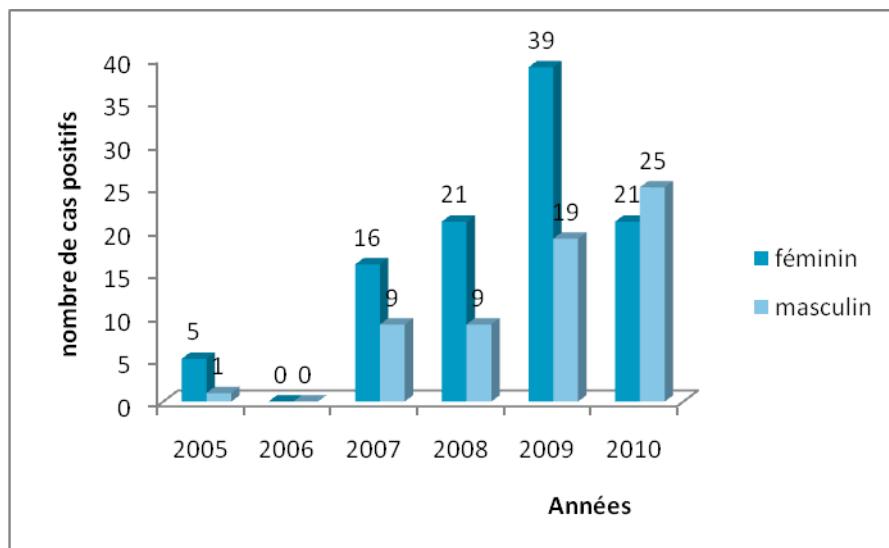
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

6 cas ont été enregistrés en 2005. En 2006, aucun cas n'a été déclaré.

La maladie a repris son apparition en 2007 avec 25 cas déclarés puis le nombre a grimpé à 58 cas en 2009.

En 2010 il y'a eu une légère diminution des cas positifs enregistrés (46 cas).

2. Répartition des cas positifs selon le sexe



Graphe 3 : répartition des cas positifs selon le sexe dans la préfecture de FES de 2005 à 2010

Généralement ,une dominance des cas positifs de LC chez le sexe féminin est observée (61,8%) avec un sexe-ratio de 1,6.

3. Répartition des cas positifs selon les secteurs

- En **2005**, 6 cas déclarés répartis sur 5 secteurs, ce nombre peut ne pas être significatif puisqu'il fallait enquêter sur la provenance des patients pour voir s'il s'agissait de cas autochtones ou importés. (figure 13)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

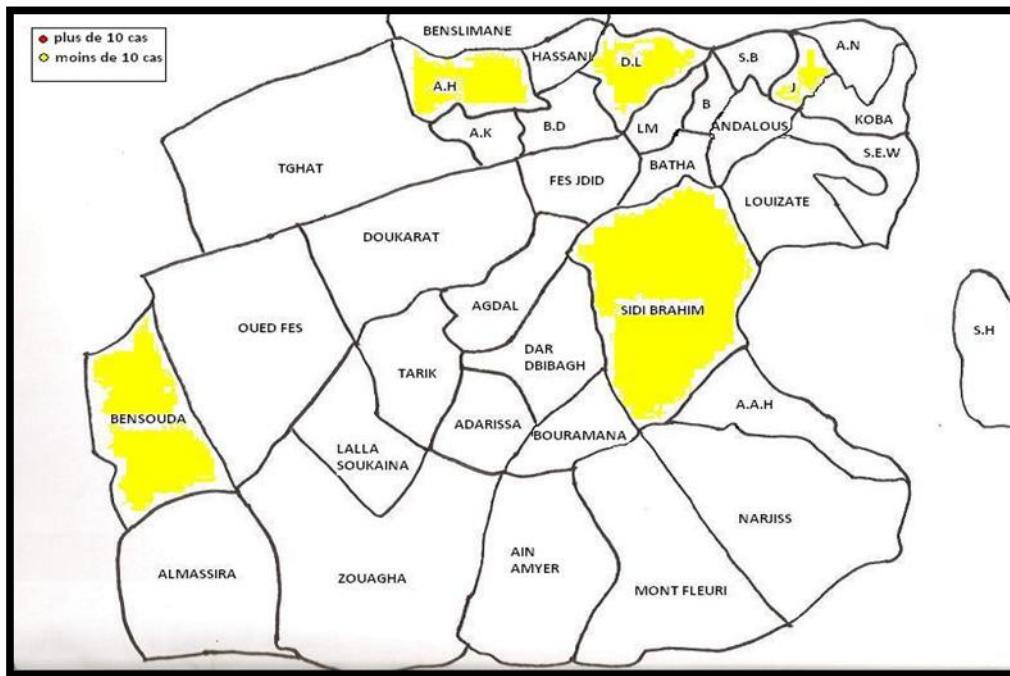


Figure 13 : Répartition de la LC selon les secteurs dans la préfecture de FES en 2005

(**A.H** : ain haroun ; **A.K** : ain kadous ; **A.A.H** : aouinat al hajjaj ; **A.N** : ain nokbi ; **B.D** : ben debbab ; **B** : blida ; **D.L** : dhar lakhmiss ; **LM** : lamteyéne ; **J** : jnanate ; **S.B** : sidi boujida ; **S.H** : sidi hrazem)

- ❖ En **2006**, aucun cas n'a été enregistré.
- ❖ En **2007**, des cas positifs de la LC ont encore réapparus dans des secteurs qui étaient indemnes durant 2 ou 3 ans, avec 25 cas au total (annexe 4).
- ❖ En **2008**, le nombre de cas positifs de la LC a atteint 30 cas dans 14 secteurs. Le plus de cas a été enregistré à Sidi Brahim (5cas). (annexe 5)
- ❖ En **2009**, le nombre de cas positifs de la LC a grimpé à 58 cas sur un total de 25 secteurs. Le plus de cas a été enregistré à Sidi Brahim. C'est à cette année qu'un secteur a connu l'apparition d'un cas pour la première fois depuis 9 ans c'est le secteur de Mont Fleuri. (annexe 6)
- ❖ En **2010**, 46 cas ont été enregistrés dans un total de 18 secteurs.

Le secteur de Mont Fleuri récemment touché a enregistré le plus de cas (5 cas). (Figure 14)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

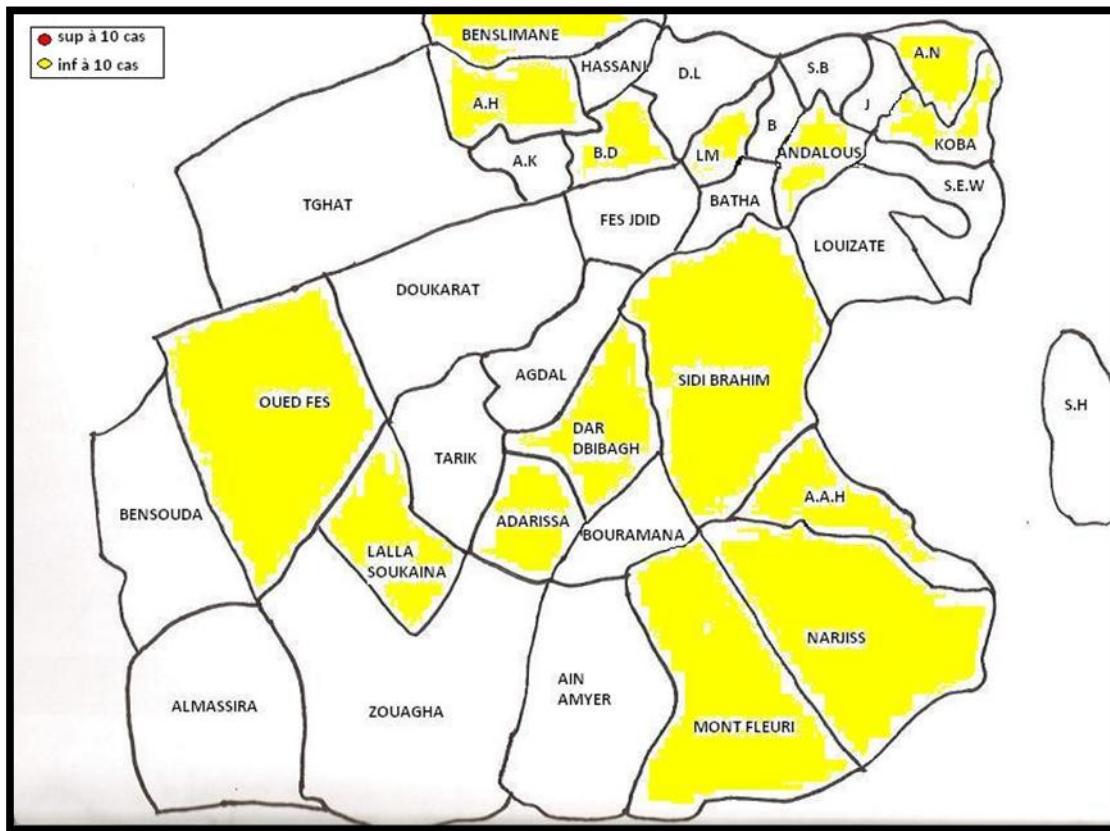
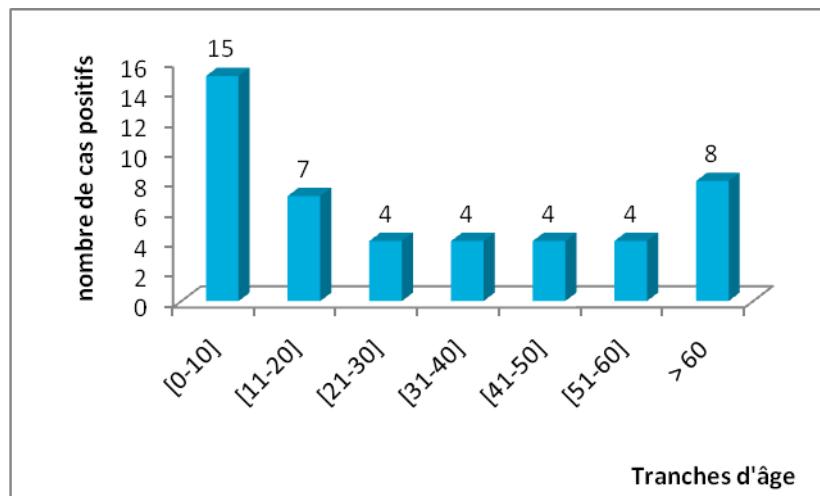


Figure 14: Répartition de la LC selon les secteurs dans la préfecture de FES en 2010

(**A.H** : ain haroun ; **A.K** : ain kadous ; **A.A.H** : aouinat al hajjaj ; **A.N** : ain nokbi ; **B.D** : ben debbab ; **B** : blida ; **D.L** : dhar lakhmiss ; **LM** : lamteyéne ; **J** : jnanate ; **S.B** : sidi boujida ; **S.H** : sidi hrazem)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

4. Répartition des cas positifs de la LC selon l'âge dans la préfecture de FES en 2010



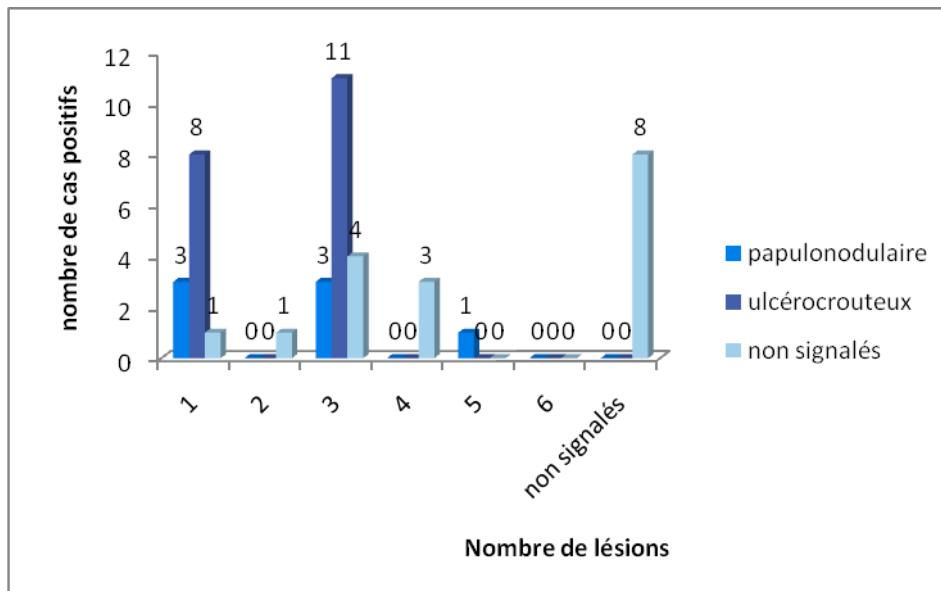
Graphe 4 : Répartition des cas de la LC selon l'âge dans la préfecture de FES en 2010

Toutes les tranches d'âge sont touchées par la leishmaniose cutanée.

Cependant, la tranche d'âge de 0 à 10 ans est la plus touchée avec 32,6% suivie de la tranche des personnes âgées de plus de 60 ans avec 17,39%.

5. Répartition des cas positifs selon le nombre et l'aspect des lésions

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



Graphé 5 : Répartition des cas de la LC selon le nombre et l'aspect des lésions dans la préfecture de FES en 2010

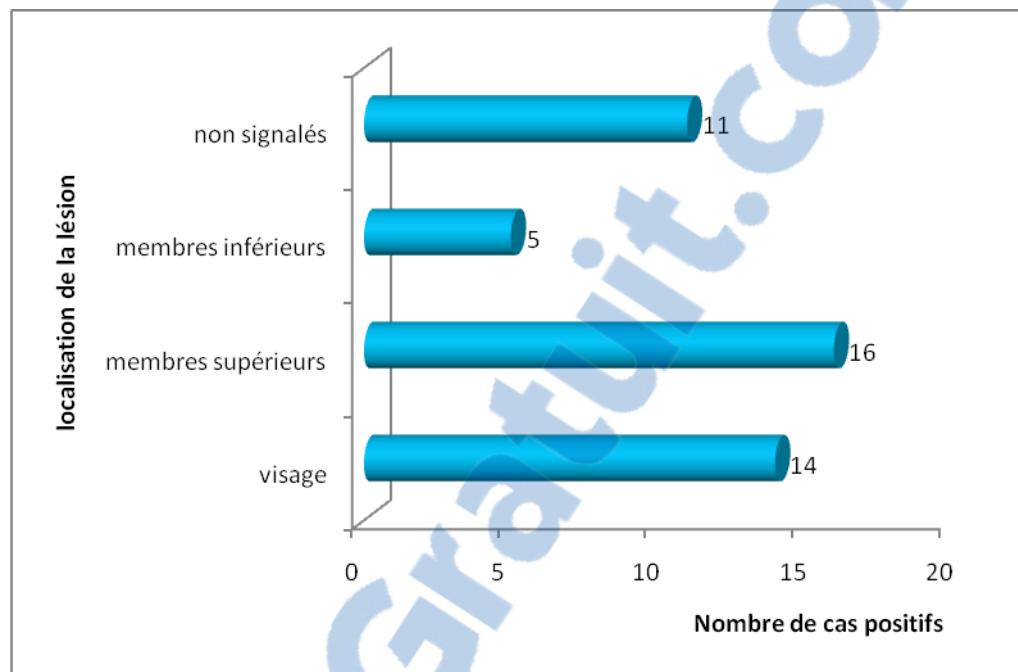
D'après le graphe 5, les malades présentant une seule lésion représentent 26% alors que 2 lésions ont été retrouvées chez 2,2% des malades.

On a noté aussi que 39,1% des malades présentent 3 lésions. Le nombre maximum de lésions qui a été enregistré est de 5 lésions, retrouvé chez une seule personne.

Les lésions ulcérocroûteuses sont observées chez 19 cas (41,3%), alors que les lésions nodulopapulaires représentent 15,2%.

6. Répartition de la LC selon la localisation des lésions

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



Graphe 6 : Répartition de la LC selon la localisation des lésions dans la préfecture de FES en 2010

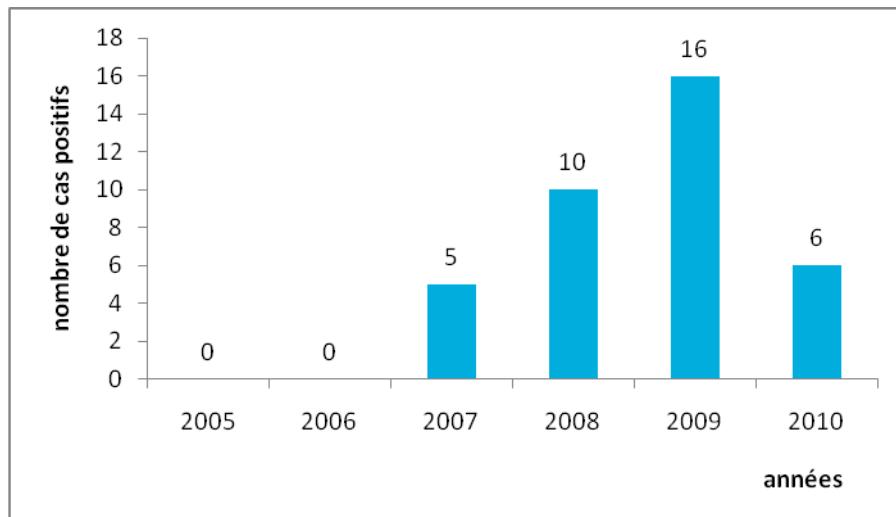
Les membres supérieurs et le visage constituent le site préférentiel des localisations chez, respectivement, 16 et 14 patients avec des prévalences respectives de 34,8% et 30,4%.

Les membres inférieurs viennent en second lieu avec une prévalence de 10,9%.

II. Analyse de la LC dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010

1. Evolution de la LC de 2005 à 2010

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



Graphe 7: Evolution de la LC dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010

Aucun cas positif n'a été enregistré en 2005 et en 2006.

Des cas positifs ont apparu en 2007 et ont connu une légère augmentation dans les années suivantes (2008 et 2009).

En 2010, 6 cas de LC ont été enregistrés.

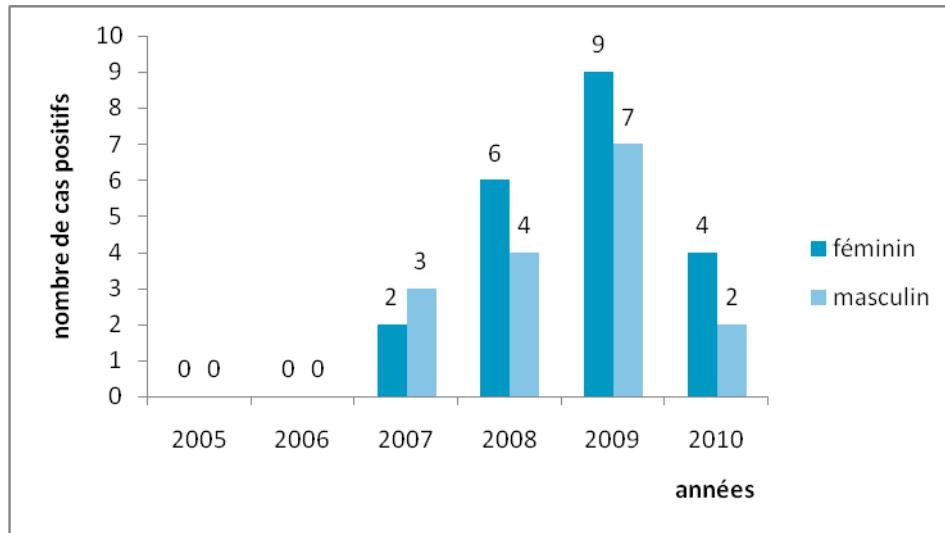
Si on compare le nombre de cas positifs enregistré à MLY Yacoub ces 5 dernières années par rapport aux années qui ont connu la déclaration de l'épidémie (2000 et 2001) (Annexe 7), on constate que la leishmaniose a presque disparu avec persistance d'un nombre réduit de cas positifs.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

2. Répartition des cas positifs à MLY Yacoub selon le sexe



Graphe 8: Répartition des cas positifs selon le sexe dans la province de MLY Yacoub de 2005 à 2010

D'après le graphe 8, le maximum de cas positifs a été enregistré chez le sexe féminin (56,7%), avec un sexe-ratio de 1,3.

Le sexe masculin ne représentait que 43,3% des cas.

3. Répartition de la LC selon les secteurs

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

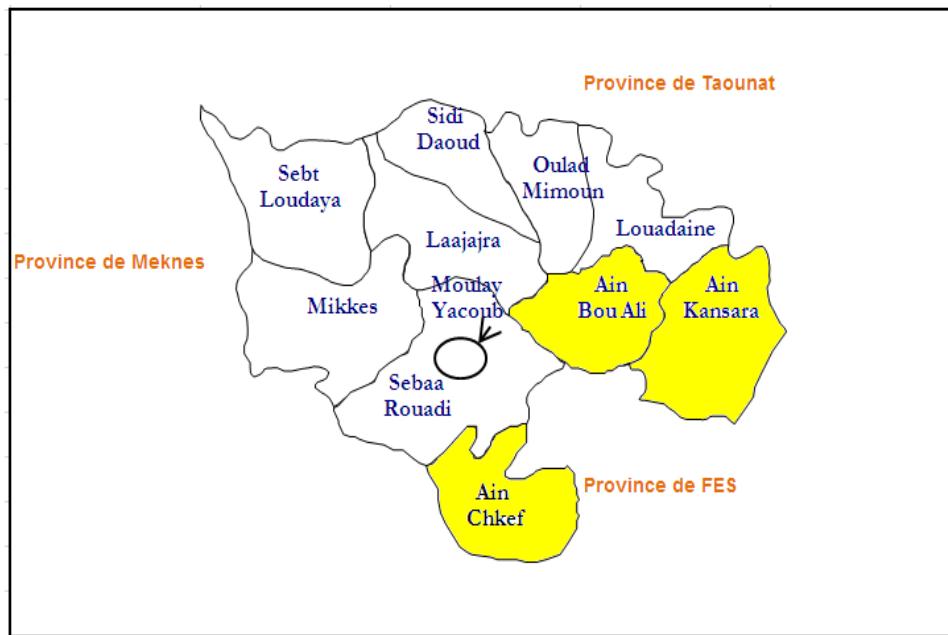


Figure 15: Répartition de la LC selon les secteurs dans la province de MLY Yacoub en 2010

Aucun cas n'a été enregistré en 2005 et en 2006.

En 2007, 5 cas ont été enregistrés dans 3 secteurs, à savoir, Ain Chkef, Ain Kansara, Ras El Ma (Annexe 8).

En 2008, 10 cas ont déclarés dans les mêmes secteurs touchés en 2007.

En 2009, on retrouve les mêmes secteurs touchés en 2007 et en 2008 avec un total de 16 cas déclarés.

En 2010, 6 cas ont été enregistrés dans les communes rurales de la province de MLY Yacoub (figure 15) répartis comme suit :

- Ain Kansara : 4cas positifs
- Ain Bouali : 1 cas positif
- Ain Chkef : 1 cas positif

B. Etude prospective

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

1. Résultat de l'amplification de la région ITS1

L'amplification de la région ITS1 a concerné 18 lames confirmées positives au LNRL.

Un résultat positif est traduit par la présence d'une bande de 300pb correspondante à la région ITS1 amplifiée.

Tous les échantillons ont donné un résultat positif pour la leishmaniose, quelque soit la concentration des frottis en corps leishmaniens (figure 16).

Parmi les lames étudiées, 2 frottis étaient des faux négatifs (résultat négatif envoyé par la province). Le résultat de l'amplification a confirmé le résultat du LNRL et le gel a révélé la présence de leishmanies sur ces lames.

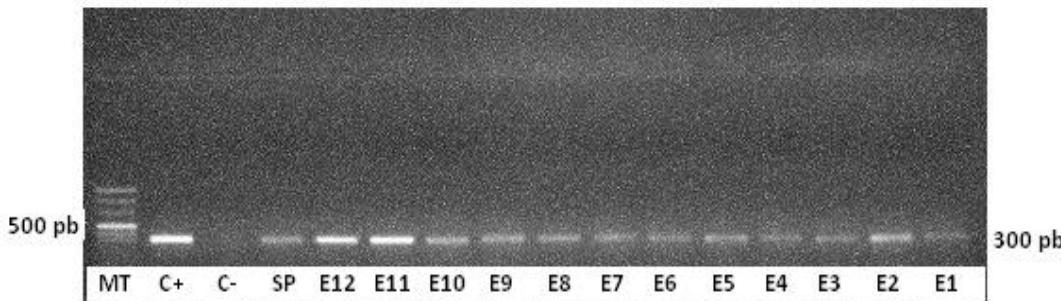


Figure 16 : photo du gel du résultat d'amplification de la région ITS1

2. Résultat de la digestion par l'enzyme MnII

L'enzyme MnII permet de différencier entre les 3 espèces circulantes au Maroc à savoir *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum*.

Cet enzyme possède 1 site de restriction au niveau de la région ITS1 de *L.tropica* générant ainsi 2 bandes sur le pattern électrophorétique ; une bande mesurant 273pb et l'autre 41pb.

Au niveau de la région ITS1 de *L.infantum*, l'enzyme MnII ne possède aucun site de restriction. Donc la bande retrouvée sur le gel de migration mesure 300pb.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Pour *L.major* la région ITS1 comprend 3 sites de restriction correspondant à l'enzyme MnII , donc le pattern élèctrophorétique révélera 4 bandes mesurant , respectivement, 173pb,109pb,43pb,10pb.

La digestion de l'amplifiat d'ADN des frottis étudiés par l'enzyme MnII a été positive pour tous les échantillons.

Tous les échantillons ont montré 2 bandes sur le pattern révélant ainsi la présence de l'espèce *L.tropica*.

DISCUSSION

La LC a été déclarée la première fois en 2000 à MLY Yacoub et surtout au secteur Ras El Ma (Zone péri-urbaine) où elle a touché 73 personnes (Annexe 7), ce nombre a connu une importante augmentation en 2001 où 121 cas ont été enregistrés. Dès lors, d'après le LNRL à l'INH, ce chiffre a connu une remarquable diminution jusqu'à annulation en 2005 et en 2006.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Par la suite en 2001, une autre épidémie a été déclarée dans la préfecture de FES, où 331 personnes ont été touchées par la LC (annexe 6). Puis ce chiffre a connu une importante diminution jusqu'à l'an 2006 où aucun cas n'a été enregistré.

La diminution de la LC dans ces deux zones était le fruit d'une lutte efficace et ciblée déployée par le ministère de la santé et la collaboration intersectorielle à savoir l'élimination des ordures ménagères. Malheureusement, des nouveaux cas ne cessent d'apparaître et de nouveaux secteurs sont réapparus. Ceci est dû probablement au relâchement des moyens de lutte et à la persistance d'un certain nombre de facteurs de risque tel que l'urbanisation anarchique et les mauvaises conditions d'hygiène.

Sachant que la leishmaniose est un véritable problème de santé publique au Maroc et est liée à plusieurs facteurs : économiques, écologiques et sociaux (Ashford, 1999), on cite :

- Les mauvaises conditions d'hygiène, et surtout la présence de décharges publiques à côté des blocs d'habitation.
- Présence de grottes et des fentes de murs notamment dans les zones rurales et périurbaines constituant des micro-habitats favorables pour les phlébotomes.
- L'urbanisation accélérée et non planifiée dans le périurbain et la cohabitation Homme-animal.
- Le réchauffement climatique enregistré ces dernières années qui favorise l'augmentation de la densité des phlébotomes (OMS, 2000).

L'analyse du nombre de cas positifs dans la préfecture de FES en fonction du sexe a montré une prédominance du sexe féminin de 61,8% et un sex-ratio de 1,6. Ce résultat est certainement dû au fait que les femmes consultent plus que les hommes, surtout

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

lorsqu'il s'agit d'une lésion au niveau du visage (30,4% des lésions sont localisées au niveau du visage), contrairement aux hommes qui ne consultent qu'en cas de complications.

De même pour la province de MLY Yacoub, on a observé une prédominance du sexe féminin (56,7%) avec un sex-ratio de 1,3.

La prédominance du sexe féminin a été déjà constatée lors de la première étude menée à MLY Yacoub en 2000 par Fellah et ses collaborateurs (Fellah et al., 2007) où le sex-ratio était de 1,5.

Ces résultats concordent avec celles trouvées en Algérie par Barchiche et ses collaborateurs (2008) où le sex-ratio est de 1,4.

Cependant, ces résultats sont en discordance avec les résultats des travaux menés à Chichaoua où le sex-ratio était de 0,8 (Zougaghi et al, 2009), et en Alger (Algérie) avec une valeur de 0,95 (Zait et al, 2009).

L'analyse du nombre de cas positifs en fonction de l'âge dans la préfecture de FES a montré que toutes les tranches d'âge sont touchées, notamment celle entre 0 et 10 ans avec une prévalence de 32,6%. Keita et ses collaborateurs (2003) ont montré eux aussi que ce sont les enfants qui sont les plus touchés par la leishmaniose cutanée et ils ont expliqué cette dominance par la fragilité de la peau des enfants, et leur complète nudité qui les rend vulnérables à la piqûre des insectes et à contracter la leishmaniose. Les études qui ont été menées à Chichaoua (Zougaghi et al., 2009), et en Algérie (Zait et al., 2009); ont montré elles aussi que c'est la tranche d'âge de 0 à 10 ans qui est la plus touchée avec respectivement 25% et 37%. Chiheb et ses collaborateurs (1999) ont rapporté dans leur étude menée au nord du Maroc, une moyenne d'âge de 24,6 ans qui est la plus touchée.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

En 2010, à la préfecture de FES, l'étude de la LC en fonction du nombre de lésions montre qu'il varie de 1 à 5 lésions. Les plus observées sont les lésions triples (39,1% des cas). Dans d'autres travaux (Fellah et al., 2007 ; Zait et al., 2009) les lésions uniques étaient plus fréquentes.

Les lésions ulcérocroûteuses sont les plus observées au cours de notre étude (41,3%). Les lésions nodulopapuleuses viennent en second lieu avec une prévalence de 15,2%.

Toutes les lésions concernaient les parties découvertes du corps humain à savoir le visage, les membres supérieurs et les membres inférieurs. Cependant les lésions sont plus observées au niveau des membres supérieurs et du visage avec des prévalences respectives de 34,8% et 30,4%.

Contrairement à nos résultats, Fellah.H et ses collaborateurs (2007) ont trouvé que les membres inférieurs sont les plus touchés avec une prévalence de 42% alors que les membres supérieurs ne représentent que 23%.

Les études menées en Algérie par Zait et ses collaborateurs (2009), ont montré que les lésions siégeaient plutôt au niveau du visage avec une prévalence de 52,2%.

La deuxième partie de notre travail a concerné l'étude moléculaire de 18 frottis cutané de différents secteurs : 15 échantillons provenaient de la préfecture de FES et 3 échantillons représentaient les 3 communes rurales qui ont été touchées en 2010 à MLY Yacoub.

L'étape d'amplification de la région ITS1 qui sert à confirmer la présence du genre Leishmania a donné un résultat positif pour toutes les lames quelque soit la richesse des frottis en corps leishmaniens, même celle qui ne contenait que 4 corps leishmaniens sur toute la lame. Ce résultat confirme la sensibilité de la PCR utilisée au LNRL même avec des concentrations très minimes en ADN leishmanien.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Le même résultat a été retrouvé par Jirku et ses collaborateurs (2006), et par Rhajaoui et ses collaborateurs à Chichaoua (article soumis). Ils ont démontré que la PCR est très sensible même avec des frottis contenant moins de 5 leishmanies par lame.

Au cours de cette même étude et dans le cadre du contrôle de qualité effectué par le LNRL, deux lames faux négatifs envoyées pour confirmation par la préfecture de FES, ont été analysées par PCR. Le résultat était visiblement positif sur le gel de migration où on a visualisé la bande de 300pb correspondante à la région ITS1 et on a pu donc confirmer la présence de leishmanies sur ces 2 frottis. Ce résultat montre que la PCR peut être utilisée pour confirmer des lames positives difficiles pouvant échapper à la microscopie.

L'amplification de la région ITS1 a été suivie par une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction MnII qui permet d'identifier les 3 espèces circulantes au Maroc à savoir : *L.tropica*, *L.major* et *L.infantum*.

Tous les échantillons ont montré 2 bandes (273pb et 41pb) sur le pattern, révélant ainsi la présence de l'espèce *L.tropica*.

Ce résultat montre que c'est toujours *L.tropica* qui circule dans les zones étudiées. Cette espèce a été trouvé la première fois par Rhajaoui et ses collaborateurs lors de l'exploration du foyer de Mly Yacoub en 2000-2001 (Rhajaoui.M et al., 2004).

Ce résultat montre aussi qu'il n'y a pas eu introduction d'une nouvelle espèce notamment *L.infantum* qui a été trouvée par Rioux et ses collaborateurs à Taounat (Rioux.J.A et al., 1996), qui est une zone limitrophe à FES.

Néanmoins, une identification plus poussée par le typage enzymatique est souhaitable. Elle pourrait nous renseigner sur le zymodème circulant, étant donné que *L.tropica* est très polymorphe au Maroc (Pratlong.F et al., 1991) et sachant bien que l'espèce typée il y'a 10 ans est *L.tropica* MON 102 où probablement l'Homme est le réservoir du parasite (Rhajaoui.M et al., 2004).

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

CONCLUSION

Au terme de ce travail, on peut dégager les conclusions suivantes :

- ✓ L'espèce qui circule à la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub est toujours *Leishmania.tropica*.
- ✓ La LC persiste dans les deux zones étudiées avec un nombre non négligeable de cas qui sont atteints chaque année.
- ✓ La nécessité d'une surveillance continue par les responsables concernés avec une étroite collaboration intersectorielle afin d'éviter l'augmentation du nombre de cas positifs et d'empêcher la réapparition de nouvelles épidémies.
- ✓ Les deux sexes sont concernés par la maladie avec une dominance du sexe féminin.
- ✓ Toutes les tranches d'âge sont touchées par la LC avec une prévalence plus importante chez la population infantile.
- ✓ Le nombre de lésions peut varier de 1 à plusieurs lésions.
- ✓ La PCR est un outil indispensable pour le typage des espèces circulantes.
- ✓ La PCR est très sensible même vis-à-vis des concentrations très minimes en leishmanies.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Etant donné qu'à travers ce travail on a identifié l'espèce circulante dans la zone étudiée comme *L.tropica*, ceci sera important dans la mise en place des moyens de lutte nécessaires pour combattre cette maladie.

Sachant que l'Homme est le réservoir de cette espèce, la lutte doit donc être sous forme d'un diagnostic précoce et d'un traitement urgent afin d'arrêter le cycle de transmission.

A travers ce travail, on a pu démontrer que la leishmaniose est en extension dans la zone étudiée, et que le nombre de cas est en train d'augmenter. Donc, il est de toute première importance de mettre en place une lutte extensive afin de protéger la nouvelle génération non immunisée et empêcher l'apparition d'une nouvelle épidémie.

Dans cette étude, on a pu déterminer l'espèce leishmanienne qui cause la Leishmaniose cutanée dans la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub. L'identification de cette espèce a été possible grâce au typage moléculaire en utilisant la PCR.

Néanmoins cette étude reste incomplète puisqu'il faut réaliser une étude biochimique sur l'espèce pour identifier le zymodème et le comparer avec celui retrouvé en 2001 à savoir *L.tropica* MON 102.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

RESUME

Sur une période s'étalant de 2005 à 2010, on a effectué une étude épidémiologique sur la Leishmaniose cutanée dans la préfecture de FES et la province de MLY Yacoub. Cette étude a montré que la Leishmaniose cutanée est en nette diminution dans ces deux régions avec persistance d'un nombre réduit de cas. On a pu démontrer que le sexe féminin est le plus touché et que les enfants de 0 à 10 ans sont les plus concernés par cette maladie. On a noté aussi que les lésions triples et ulcérocroûteuses sont les plus observées. Aussi, les membres supérieurs et le visage ont été les plus touchés par cette maladie.

Une étude moléculaire a aussi été réalisée afin d'identifier l'espèce leishmanienne circulante dans cette zone et il s'est avéré qu'il s'agit toujours de *L.tropica* .

MOTS CLES : leishmaniose cutanée, *L.tropica*, FES, MLY Yacoub.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

1. **Abonnenc E.** 1970 . Les phlébotomes de la région Ethiopienne (Diptera : Psychodidae) Mém ; O.R .S . T. O. M, Sér .Ent. Méd. Prasito., 55,289p.
2. **Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A.** 2004. The recent emergence of Leishmania tropica in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of Leishmania major. *Trop. Med. Int. Health.*, 9, 1–5.
3. **al-Zahrani MA, Peters W, Evans DA, Smith V, Ching CI** 1989. Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 5. Diversity of parasites causing visceral leishmaniasis in man and dogs in the south-west. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 503-509.
4. **Andrews, K.T., Walduck, A., Kelso, M.J., Fairlie, D.P., Saul, A. Parsons, P.G.** 2000. Antimalarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. *Int. J. Parasitol.* 30,761-768
5. **Anofel**, 2007. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales, parasitoses et mycoses des régions tempères et tropicales, Ed. Elsevier Masson, pp 78-88.
6. **Ashford R,W, P. Desjeux and P. De Raadt**, 1992, Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis, *Parasitol Today* 8 pp. 104–105
7. **Ashford R.W.** 1977. The comparative ecology of Leishmania aethiopica. In: Colloques Internationaux du C.N.R.S. No. 239, Ecologie Leishmanioses, pp. 233–240.
8. **Aviles H, A. Belli, R. Armijos, F.P. Monroy and E. Harris**,1999. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnosis methods, *J Parasitol* 85 (2) p: 181-187
9. **Belli A, Rodriguez B, Aviles H and Harris E**,1998. Simplified Polymerase Chain Reaction detection of new world Leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis, *Am J Trop Med Hyg* 58 (1), pp. 102–109
10. **Benmoussan A. Nasereddin, F. Jonas, F.L. Schnur and L.C. Jaffe**,2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, *J Clin Microbiol* 44 (4) , p:1435-1439.
11. **Bichichi M, Riyad M, Guessouss-Idrissi N.**1999. Isoenzyme characterization of Leishmania tropica in the emerging epidemic focus of Taza (North Morocco): epidemiological corollaries. *Trans Roy Soc Trop Med & Hyg* ;92:660–3.
12. **Bray R.S. Ashford R W. Bray M A.**1973. The parasite causing cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67, pp. 345–348.
13. **Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J. P. and Wincker, P.**(1988). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes. *Gene* 222, 107-17.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

14. **Castellani, A. and A.J. Chalmers.** 1919. Manual of tropical medicine, 3rd ed. Williams, Wood and Co., New York.
15. **Chatenay G, Dedet JP, Gay F,** 1989. Isolation of Leishmania species from wild mammals in French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg 83: 613–615.
16. **Chiheb S, Hamdani A, Riyad M, Bichichi M, Hamdani S, Krimech A.,** 1999. Cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica; clinical features in a new focus in northern Morocco. Ann Dermato Venerel ;126(5):419–22.
17. **Clayton, C. E.** 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. Embo J 21, 1881-8.
18. **Congrès de l'Institut Pasteur de Téhéran sur les leishmanioses,** septembre 2008, Téhéran. OptionBio n°415 p 8-9.
19. **Dedet J P.** 2001 Répartition géographique des leishmanioses. Méd Mal Infect; 31 Suppl2: 178-183.
20. **Dedet JP.** 1999. Les leishmanioses. Edition Manson
21. **Dereure J, Pratlong F, Lanotte G, Rioux J-A.,** 1986. La leishmaniose viscérale autochtone au Maroc méridional. In: Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. Coll. Int CNRS/Inserm:37;225.
22. **Desjeux P.,** 1996. Leishmaniasis public health aspects and control, Clin Dermatol ; 14:417-23.
23. **Desjeux P.,** 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Cimid;27:305-18.
24. **Desjeux P.,** 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg ;95:239-43.
25. **El Tai N O, El Fari M, Mauricio I, Miles M A, Oskam L, El Safi S, Presber W H and Schönian G,** 2000. Leishmania donovani: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates.
26. **Elbihari S, Kawasmeh ZA, Alnaeim AH.,** 1984. Possible reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Al-Hassa oasis, Saudi Arabia, Ann Trop Med Parasitol. 78: 543-545.
27. **Fellah H, RhajaouiM, Ouahabi S, Belghiti D, LyagoubiM.,** 2007. Occurrence of human cutaneous leishmaniasis in Zougha My Yacoub province (Morocco). Int J Agri & Biol;1:197–8.
28. **Foley H, Vialatte C.** 1991. Existence dans le Sud marocain du bouton d'orient à l'état endémique. Bull Soc Path Exo 191;7:114–5.
29. **Gentilini M** 1999 Médecine tropicale pp140-151.
30. **Golvan Y J.,** 1990 – Éléments de parasitologie médicale 4 ème Ed. Flammarion. Chp3. p245.
31. **Gradoni, L., Pozio, E., Gramiccia, M., Maroli, M. and Bettini, S.,** 1983. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, pp. 427–431.

32. **Guessouss-Idrissi N, Berrag B, Riyad M, Sahibi H, Bichichi M, Rhalem A.** 1997. Leishmania tropica: etiologic agent of a case of visceralizing canine leishmaniasis in north Morocco. *Am J Trop Med & Hyg* ;57:172–3.
33. **Guilvard E, Rioux JA, GallegoM, Pratlong F, Mahjour J, Martinez-Ortega E.** 1999. Leishmania tropica au Maroc. *Ann Para Hum Comp* ;66(3):96–9.
34. **Jirku M, Zemanova E, Al-jawabreh A, Schonian G, Lukes J.** 2006. Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of Leishmania.tropica. *Diagnostic Mic Inf Dis* 55. P:75-79.
35. **Keita S, Faye O, NDiaye HT, Konare HD.** 2003 Epidémiologie et polymorphisme clinique de la leishmaniose cutanée observée au CNAM (ex-institut MARCHOUX) Bamako (MALI). *Mali Médical 2003 T XVIII N° 1&2 P. 29-31.*
36. **Klippel, Monier-Vignard.** 1922. Premier cas de Kala-azar d'origine marocaine. *SocMed Hop Paris* ;20:72–85.
37. **Laamrani A, El Idrissi M, Layagoubi M, Ayoujil M.** 1997. Lutte contre les leishmanioses. In: Guide des activités (Maroc).
38. **Lainson, R., L. Ryan & J.J. Shaw.** 1987. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82:421-424.
39. **Lakhdar Idrissi M, M. El Ouardi, S. Atmani, L. Elarqam, A. Bouharrou, M. Hida.** 2007. La leishmaniose viscérale infantile : à propos de 209 cas. *Journal de pédiatrie et de puériculture* ;20:136-141.
40. **Lanotte G, J.A. Rioux and F. Pratlong.** 1980. Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 14. Les leishmanioses humaines en Cévennes. Analyse clinique et biologique des formes viscérales et muqueuses, *Ann Parasit Hum Comp* 55, pp. 635–645.
41. **Laveran A and F. Mesnil.** 1903. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. et Mesn.) parasite d'une fièvre de l'Inde, *C R Acad Sci* 137, pp. 957–961.
42. **Leblanc R.** 1992. Existence de bouton d'orient à Figuig. *Bull Soc Path Exo* ;18:146–8.
43. **Leger, N, Depaquit.** 1999. Les phlébotomes. In: Dedet J-P éd. *Les leishmanioses*. Paris: Ellipses, pp .89-108.
44. **Lemrani M, Nejjar M, Pratlong F.** 1997. A new Leishmania tropica zymodeme causitive agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *AnnTrop Med Parasito* 200, 96(6):637–8.
45. **Lewis D.J. Young D G,Fairchild G B and D.M. Minter .** 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae). *Syst. Entomol.* 2 pp. 319–332.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

46. **Manson-Bahr.** 1967. Studies in the epidemiology of East African leishmaniasis: 4. The significance of the positive leishmanin test, Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 , pp. 29–33.
47. **Marfurt J, Niederwieser I, Makia N D, Beck H P and Felger I.** 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP, Diagn. Microbiol. Infect. Dis 46 (2) , pp. 115–124.
48. **Marsden PD.** 1986. Mucosal leishmaniasis, Trans R Soc Trop Med Hyg 80:859-876.
49. **Marty P, Le Fichoux Y, Pratlong F, Lanotte G, Rioux JA, Lacour JP.** 1987. Cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica in young Moroccan child observed in Nice France. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 198;83:510.
50. **Meredith, S.E.O., Zijlstra, E.E., Schoone, G.J., Kroon, C.C.M., Van Eys, G.J.J.M., Schaeffer, K.U., El Hassan, A.M., Lawyer, P.G.** 1993 Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of Leishmania parasites in clinical material. Arch Inst Pasteur Tunis 70: 419-431.
51. **Mikou N, Bouayed K, Benhammou B, Balafrej A.** 2003. Les formes atypiques de la leishmaniose viscérale au Maroc. 28ème Congrès de la SMP, Marrakech.
52. **Ministère de Santé.** 1997. Lutte contre les leishmanioses (Maroc). Guide des activités. Ed. El Maarif Al Jadida. Rabat, 25- 45.
53. **Ministère de Santé.** 2010. Lutte contre les leishmanioses (Maroc). Guide des activités. Ed. El Maarif Al Jadida. Rabat, 25- 45.
54. **MOLYNEUX D.H. & ASHFORD R.W.** 1983. The Biology of Trypanosoma and Leishmania. Parasites of Manand Domestic Animals, Taylor & Francis, London, UK, 185–250.
55. **Moreno.G, J.A. Rioux and G. Lanotte et al.,** 1986. Le complexe Leishmania donovani s.l. Analyse enzymatique du complexe Leishmania infantum. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In: J.A. Rioux, Editor, "Leishmania". Taxonomie et phylogénese. Applications écoépidémiologiques, IMEEE, Montpellier pp. 105–117.
56. **Musso, O., Sommer, P., Drouet, E., Cotte, L., Neyra, M., Grimaud, J., and Chevallier, M.** 1996. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in Gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. J. Vir. Meth.; 56:125-137 .
57. **Nadim A. et Rostami, G.S.** 1974, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. Bulletin of the World Health Organization: 51, 45-49.
58. **Nejjar R, Lemrani M, Malki A, Ibrahimy S, Amarouch H, Benslimane A.** 1998. Canine leishmaniasis due to Leishmania infantum MON1 in northern Morocco. Parasite ;5. 325-330.
59. **Nicolle C.** 1908. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie, Arch Inst Pasteur Tunis 1 , pp. 3–26.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

60. **Noyes, H. A., Belli, A. A., and Maingon, R.** (1998). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for Leishmania identification. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 55: 98–105.
61. **NOZAIS JP.** 1989. Les leishmanioses viscérales et cutanées dans le bassin méditerranéen. Sem Hôp Paris, 65, 1397-1405.
62. **Oliveira C.D.L.** 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas gerais State, Brasil, 1994-1997. Cad. Saude Publica. 17(5): 1231-1239.
63. **OMS.** (1993). La lutte contre les maladies tropicales : Les leishmanioses. Pages 10 – 12.
64. **OMS.** (1999). La lutte antivectorielle, méthodes à usage individuel et communautaire. 1999.
65. **Osman OF, Kager PA, Oskam L.** 2000. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. Trop Med Int Health. 5:553- 562.
66. **Osman, O. F., Oskam, L., Zijlstra, E. E., Kroon, N. C., Schoone, G. J., Khalil, E. T., El-Hassan, A. M. and Kager, P. A.** 1997. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol.; 35 (10): 2454-2457.
67. **Pratlong F, Rioux JA, Derreure J, Mahjour J, Gallego M, Guilvard E,** 1991. Leishmania tropica au Maroc. Diversité ' isozymique intrafocale. Ann Para Hum Comp;66(3):100–4.
68. **Ravel.D, Bastien.M, Blackwell.L and Ivens.A,** 1999. The Leishmania Genome Network. The Complete Chromosomal Organization of the Reference Strain of the Leishmania Genome Project, L.major 'Friedlin' Parasitol Today 14, 301-303.
69. **Remlinger P.** 1921. Un cas de Kala-azar infantile observe ' auMaroc. Arch Inst Pasteur Afr Noi 1:240–1.
70. **Rhajaoui M, Abedelmajeed N, Fellah H, Azmi K, Amrir F, Al-jawabreh A,** 2007. Molecular typing reveals emergence of a new clinic-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis in Morocco. Em Infec Dis ;3(9):1358–60.
71. **Rhajaoui M, Fellah H, Pratlong F, Dedet JP, Lyagoubi M.** 2004. Leishmaniasis due to Leishmania tropicaMON-102 in a newMoroccan focus. Trans Roy Soc TropMed Hyg;98:299–301.
72. **Rhajaoui M, Sebti F, Fellah H, Alam M. Z, Nasereddin A, Abbasi I and Schonian G.** 2011. Cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco: Clinico-epidemiologic profile and causative (pathogen article soumis).
73. **Rhajaoui M.** 2003 Les déterminants éco-épidémiologiques des foyers des leishmanioses cutanées au Maroc. Premières journées sur l'impact des changements climatiques sur l'écologie des espèces animales, la santé et la population maghrébine à Rabat.
74. **Rhajaoui M.** 2009. Les leishmanioses humaines au Maroc : une diversité nosogéographique. Pathol Biol (Paris), 10.1016.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

75. **RiouxA, G. Lanotte and R. Maazoun** 1980. Leishmania infantum Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées Orientales, C R Acad Sci Paris 291 ; pp. 701–703.
76. **RiouxA, Lanotte G, Fourati K.** 1980, Résurgence de la leishmaniose cutanée dans le sud tunisien. Cambridge Abstracts, September 1980, p.109.
77. **RiouxA. and G. Lanotte,** 1993. Apport de la cladistique à l'analyse du genre Leishmania Ross, 1903 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Corollaires éco-épidémiologiques, Biosistema 8 , pp. 79–90.
78. **RiouxA, Guilvard E, Gallego J, Moreno G, Pratlong F, Portus M,** 1986. Phlebotomus ariasi et Phlebotomus perniciousus vecteurs du complexe Leishmania infantum dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques.A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: Leishmania. Taxonomie et phyllogenèse. Application écoépidémiologiques. Coll Int CNRS/Inserm a:430–444.
79. **RiouxA, Lanotte G, Maazoun R, Perello R, Pratlong F.** 1980. Leishmania infantum agent du bouton d'orient autochtone. C R Acad Sc ;291:701–3.
80. **RiouxA, Lanotte G, Petter F, Derreure J, Akalay O, Pratlong F,** 1986. Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. In: Leishmania.Taxonomie et phyllogenèse. Application éco-épidémiologiques. Coll. Int.CNRS/Inserm b:365–95.
81. **RiouxA, Mahjour J, Gallego M, Dereure J, Perieres J, Lahmrani A,** 1996. Leishmaniose cutanée humaine à Leishmania infantum Mon 24 au Maroc. Bull Soc Fran Parasito;14:2.
82. **RiouxA, Petter F, Akalay O, Lanotte G, Ouazzani A, SeguignesM,** 1982. Meriones shawi,réservoir de Leishmania major dans le Sud marocain. C R Acad Sci;294:515–7.
83. **RiouxA, Rispail G.** 1983. La Leishmaniose visce ' rale. Cah Med;8(63):88.
84. **Satti, M. B., El-Hassan, A. M., Al-Gindan, Y., Osman, M. A., and Al-Sohaibani, M. O.** 1989. Peripheral neural involvement in cutaneous leishmaniasis. A pathologic study of human and experimental animal lesions. Int. J. Dermatol.; 28(4): 243-247.
85. **Schonian G., Nasereddin A., Dinse N.,** 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infec. Dis, 47: 349-358.
86. **Schonian, G., El Fari, M., Lewin, S., Schweynoch, C. and Presber, W.** 2001. Molecular epidemiology and population genetics in Leishmania. Med. Microbiol. Immunol.;190: 61-63.
87. **SEAMAN J, PRYCE D, SONDORP HE** 1993. - Epidemic visceral leishmaniasis in Sudan:A randomized trial of aminosidine plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone. J Infect Dis ;168 : 715-20.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

88. **Ullu, E., C. Tschudi, and A. Gruenzl.** 1991. Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. In: M.Parsons, ed. Molecular Biology of parasitic protozoa, Vol. Oxford University Press Inc., New York, pp. 115-33.
89. **Villela F, Pestana BR, Pessoa SB** 1939. Presença de Leishmania braziliensis na mucosa nasal sem lesão aparente em casos recentes de leishmaniose cutânea. Hospital, Rio de Janeiro, 16: 953-956.
90. **Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P. and Bastien, P.** 1996. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Res 24, 1688-94.
91. **World Health Organization.** Division of Control of Tropical Diseases. Leishmaniasis. www.who.int/health_topics/leishmaniasis.htm (updated 2000).
92. **Zait H, Bousaad H,** 2009. leishmanioses cutanées en Algérie bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. revue francophone des laboratoires 422 p 33-39.
93. **Zougaghi L, Bouskraoui M, Amine M, Akhdari N, Said A,** 2009. Leishmaniose cutanée à Leishmania tropica dans la région de Marrakech (Maroc): un foyer rebelle. Revue francophone des laboratoires 429, p:35-39.



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



ANNEXES



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

ANNEXE 1

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

ANNEXE 2

Préparation des réactifs d'extraction

Tampon de lyse sans triton

1.46 g NaCl (Cf =50 mM/l)

10 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) (Cf =10 mM/l)

25 ml Tris.Cl (1 M, pH 7.4) voir 1M Tris-HCL (prêt à l'emploi dans le placard)

Complétez le volume à 500 ml avec H₂O distillée et aliquoter.

Stérilisez par autoclavage pendant 15 min à 15 psi dans l'autoclave à vapeur. Stockez et Garder la solution stérile à 4 °C jusqu'à un an ou à température ambiante.

5 M NaCl

1. Dissoudre 292 g (5 x m. wt= 5x58.44) de NaCl dans 800 ml d'H₂O.

2. Ajuster le volume à un litre avec H₂O.

3. Distribuer dans des aliquotes et stériliser par autoclavage.

4. Stocker la solution NaCl à température ambiante. .

Phénol

Le Phénol est commercialisé pour la séparation DNA/RNA avec spécification biologie moléculaire. Il est saturé avec TE-buffer (10mM Tris pH 7.5-8.0; 1mM EDTA-Na₂. et stocké à 4°C. Phénol/chloroforme est le phénol redistillé, chloroforme et isoamyl alcohol 25:24:1.

10% SDS

1. Dissoudre 10 g SDS conçu pour électrophorèse dans 90 ml d'H₂O.
2. Maintenir à 68 °C plus agitation pour permettre la dissolution.
3. Si nécessaire, ajustez le pH à 7.2 en ajoutant des gouttes de HCL
4. Ajustez le volume à 100 ml.
5. Stocker à température ambiante. La stérilisation n'est pas nécessaire. Ne pas autoclaver !

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

On peut garder au réfrigérateur et chauffer à 37°C

Protéinase K (20 mg/ml)

100 mg protéinase K poudre lyophilisée

5 ml Eau bi distillée stérile

Divisez la solution de réserve dans de petites aliquotes et conservez à -20 °C. Chaque aliquote peut être décongelée et congelée plusieurs fois avant de se débarrasser.

Ne pas autoclaver!

M Na-Acétate (pH 5.2)

Na-Acétate m.wt= 24,60 g (88x3= 246g pour 1litre)

Dissoudre 24,6 g (3* m. wt) de Na-Acétate dans 50-60 ml d'H₂O.

Ajuster le pH à 5.2 avec le concentré d'acide acétique glacial

Ajuster le volume à 100 ml avec l' H₂O.

(Distribuer dans des aliquotes et) stérilisez par autoclavage.

Garder à 4°C jusqu'à un an

200 ml TE, pH 8.0

2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (voir 1M Tris- HCL)

400 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Ajouter 170 ml d'eau

Vérifiez le pH et ajustez-le à 8.0 avec 1n HCl.

Complétez alors le volume à 200 ml.

Stérilisez par autoclavage pendant 20 minutes. Stockez le tampon à température ambiante.

PBS X10 PH 7.2

Na₂HPO₄ 7.15 g

NaCl 40g

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

KCL 1g

KH₂PO₄ 1g

Ajuster à un volume de 500 ml autoclaver pendant 15 min à 1 bar.

Mettre dans un flacon avec bouchon étiqueter et mettre la date.

Ranger au réfrigérateur.

1M Tris- HCl

1. Dissoudre 121.1 g (m.wt) du Tris base dans 800 ml d'H₂O.

2. Ajuster le pH à la valeur désirée en additionnant le HCl concentré.

pH HCl

7.4 70 ml

7.6 60 ml

8.0 42 ml

Mieux : mesurez le pH et ajoutez l'acide lentement!

3. Laissez la solution se refroidir à la température ambiante avant de rajuster le pH.

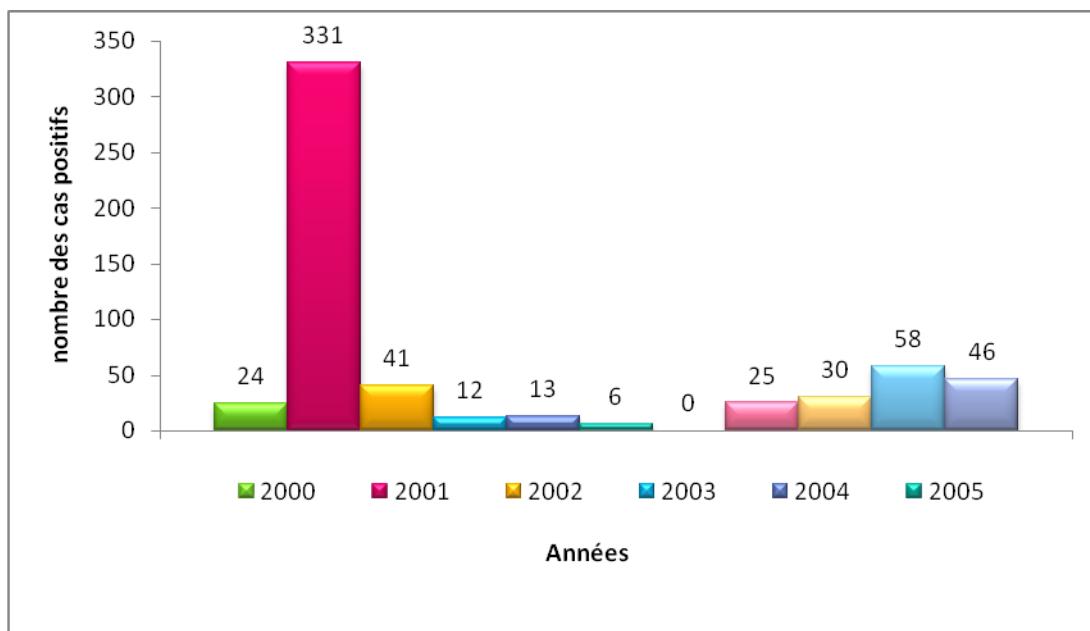
Ajustez le volume de la solution à 1 litre avec H₂O.

4. Distribuer dans des aliquotes et stériliser par autoclavage.

Si la solution de 1 M a une couleur jaune, jeter la et utiliser un Tris de meilleure qualité. Le pH de la solution Tris est dépendant de la température et diminue approximativement de 0.03 unités pH pour chaque augmentation de température de 1°C. Par exemple, une solution de 0.05 M a pH de 9.5, 8.9 et 8.6 à 5°C, 25°C et 37°C, respectivement.

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

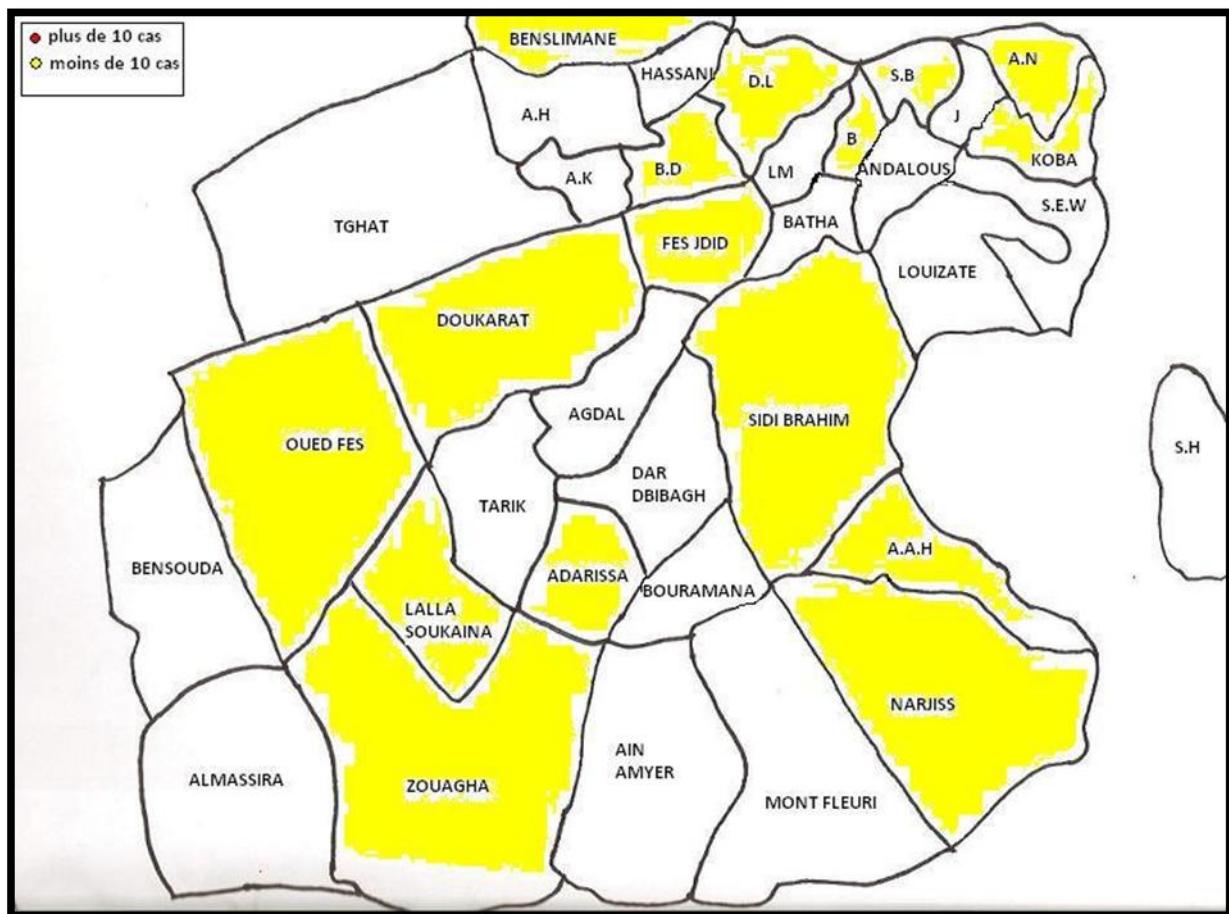
Annexe 3



Evolution de la LC dans la préfecture de FES de 2000 à 2010

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Annexe 4



Répartition de la LC dans la préfecture de FES en 2007

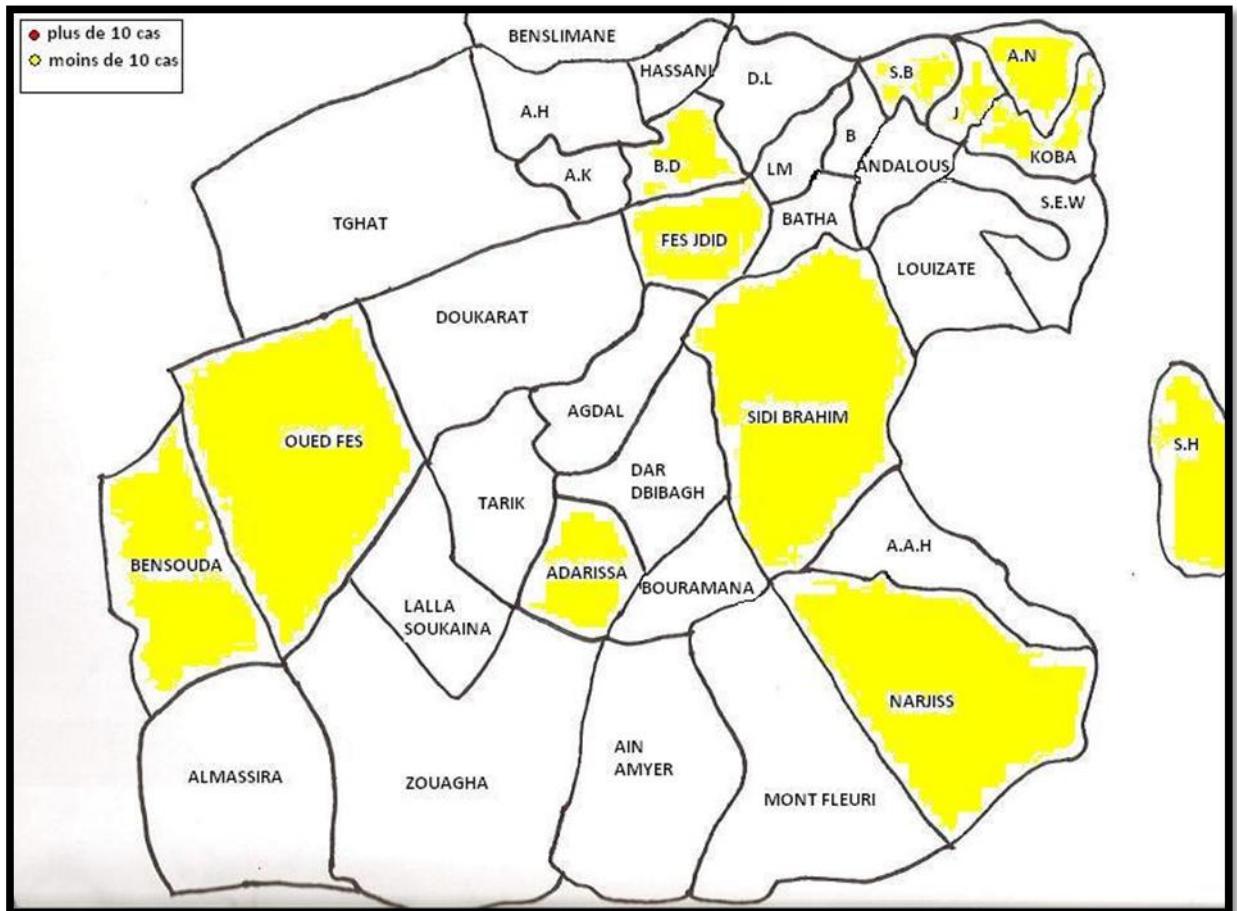
(**A.H** : ain haroun ; **A.K** : ain kadous ; **A.A.H** : aouinat al hajjaj ; **A.N** : ain nokbi ; **B.D** : ben debbab ; **B** : blida ; **D.L** : dhar lakhmiss ; **LM** : lamteyéne ; **J** : jnanate ; **S.B** : sidi boujida ; **S.H** : sidi hrazem)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

Annexe 5

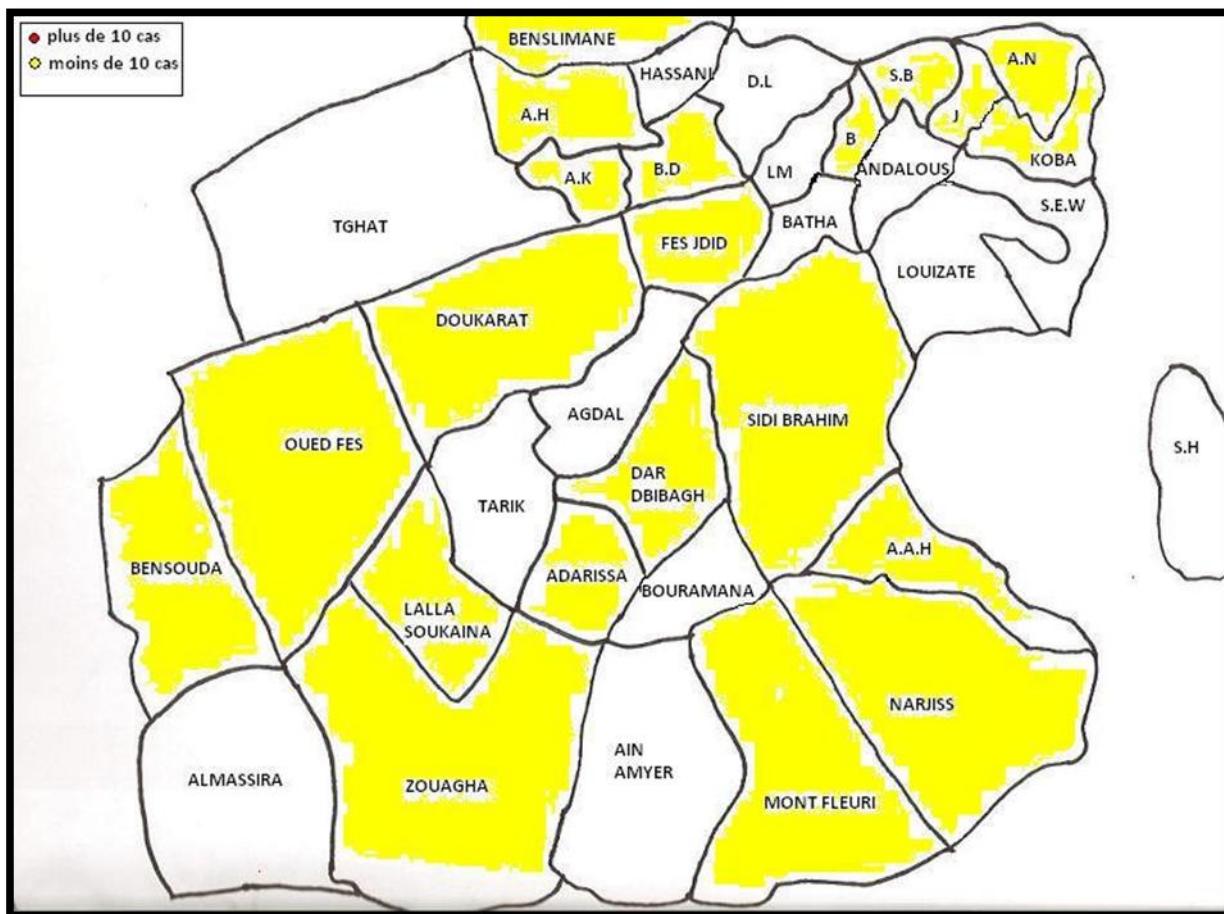


Répartition de la LC dans la préfecture de FES en 2008

(A.H : ain haroun ; A.K : ain kadous ; A.A.H : aouinat al hajjaj ; A.N : ain nokbi ; B.D : ben debbab ; B : blida ; D.L : dhar lakhmiss ; LM : lamteyéne ; J : jnanate ; S.B : sidi boujida ; S.H : sidi hrazem)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

ANNEXE 6

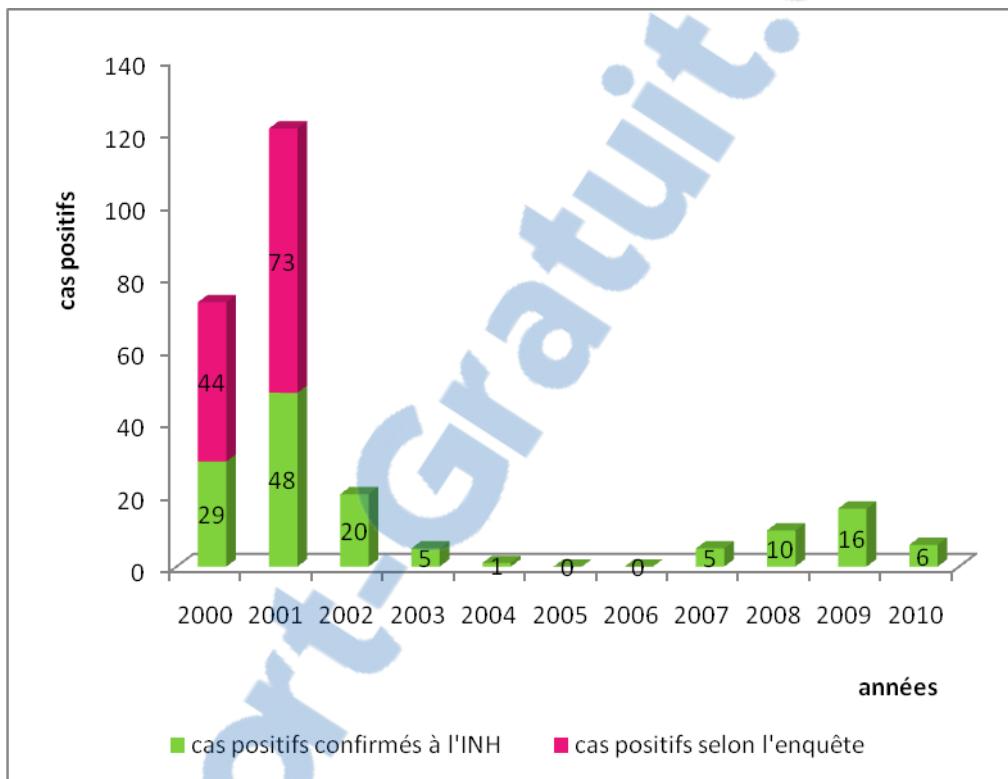


Répartition de la LC dans la préfecture de FES en 2009

(**A.H** : ain haroun ; **A.K** : ain kadous ; **A.A.H** : aouinat al hajjaj ; **A.N** : ain nokbi ; **B.D** : ben debbab ; **B** : blida ; **D.L** : dhar lakhmiss ; **LM** : lamteyéne ; **J** : jnanate ; **S.B** : sidi boujida ; **S.H** : sidi hrazem)

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

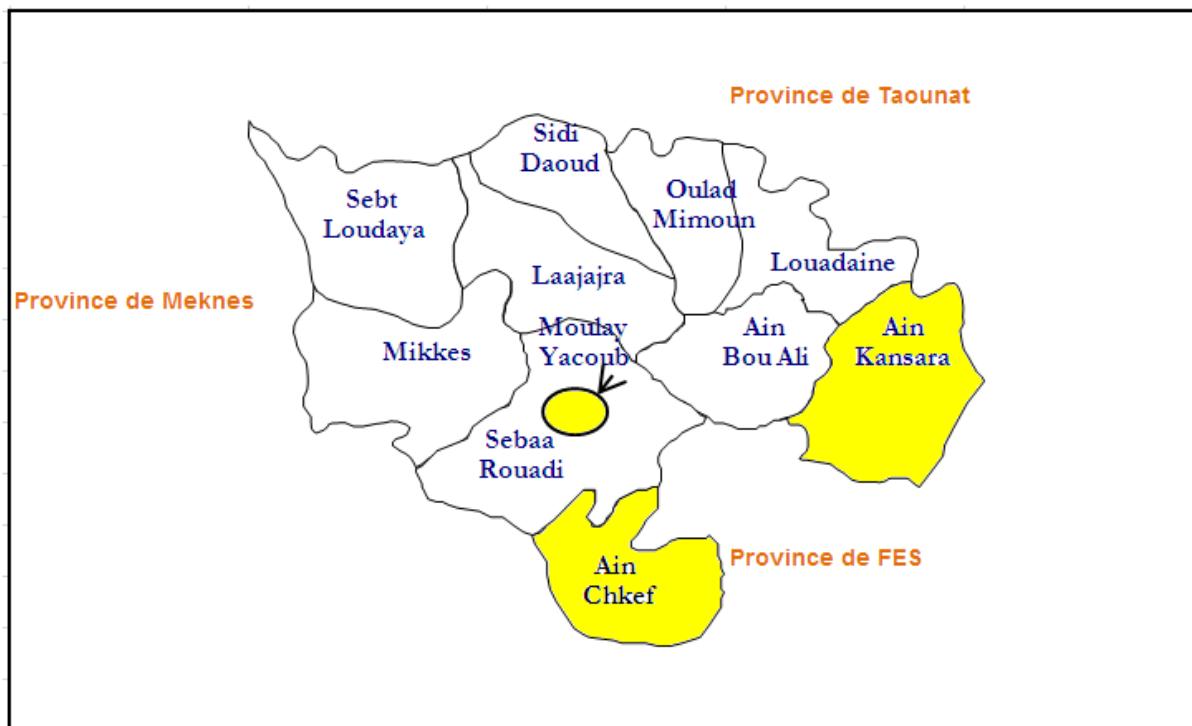
ANNEXE 7



Evolution de la LC dans la province de MLY Yacoub de 2000 à 2010

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

ANNEXE 8



Répartition de la LC dans la province de MLY Yacoub en 2007



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE