

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taxonomie du genre <i>Leishmania</i>	7
Figure 2 : Amastigotes de leishmanies à l'intérieur des macrophages	7
Figure 3 : Promastigotes de leishmanies chez le phlébotome.....	8
Figure 4 : Représentation schématique du cycle général des leishmanioses	9
Figure 5 : Morphologie du phlébotome adulte.....	11
Figure 6 : Phlébotome à l'état de larve de stade 4 avec 4 soies caudales	11
Figure 7 : Repas sanguin de la femelle de phlébotome	13
Figure 8 : Cycle biologique des phlébotomes	13
Figure 9 : Repas sanguin et transmission des leishmanies	16
Figure 10 : Cycle de vie des leishmanies chez le phlébotome vecteur.....	17
Figure 11 : Répartition géographique des leishmanioses	20
Figure 12 : Tracé de la Grande Muraille Verte au Sénégal	25
Figure 13 : Carte de localisation des périmètres de capture à Widou Thiengoly ..	25
Figure 14 : Capture par piégeage adhésif, pièges posés en forme de cône.....	26
Figure 15 : Capture par piégeage lumineux	27
Figure 16 : Capture par pulvérisation intradomiciliaire.....	28

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principales espèces de phlébotomes vecteurs incriminées ou suspectées dans le Nouveau Monde	14
Tableau II: Principales espèces de phlébotomes vecteurs incriminées ou suspectées dans l'Ancien Monde	15
Tableau III: Inventaire des phlébotomes capturés à Widou en fonction des espèces	33
Tableau IV: Répartition des phlébotomes capturés à Widou en fonction des pièges	35
Tableau V: Résultats obtenus pour les PCR diagnostiques	36

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ANOFEL	Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie
AL	Tampon de lyse
ATL	Tampon de lyse
AW	Tampon de lavage
CDC	Centers for Disease Control
FMPOS	Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
FRH	Faune Résiduelle Humaine
IFAN	Institut Fondamental d'Afrique Noire
LC	Leishmaniose Cutanée
LV	Leishmaniose Viscérale
MTN	Maladies Tropicales Négligées
ml	Millilitre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Réaction de Polymérisation en chaîne
PK	Protéinase K
PH	Papier Huilé
rpm	rotation par minute
UCAD	Université Cheikh Anta DIOP de Dakar
µl	Microlitre
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WHO	World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES.....	4
1- DEFINITION.....	5
2- EPIDEMIOLOGIE.....	5
2-1 Les agents pathogènes	5
2-1-1 Classification.....	5
2-1-2 Morphologie	6
2-1-2-1 La forme amastigote	6
2-1-2-2 La forme promastigote.....	7
2-1-2 Biologie.....	7
2-1-2-1 Cycle évolutif.....	7
2-1-2-2 Habitat.....	10
2-2 Le vecteur: le phlébotome.....	10
2-2-1 Morphologie	10
2-2-2 Classification.....	12
2-2-3 Biologie	12
2-2-4 Importance médicale des phlébotomes	14
2-2-5 Les espèces vectrices de leishmanioses	14
2-2-5-1 Vecteurs du Nouveau Monde	14
2-2-5-2 Vecteurs de l'Ancien Monde	15
2-2-6 Cycle intravectoriel	16
2-3 Le réservoir de parasites.....	17
2-4 Facteurs de risque	17
2-4-1 Conditions socioéconomiques.....	17
2-4-2 Malnutrition	18
2-4-3 Mobilité de la population	18
2-4-4 Changements environnementaux	18
2-4-5 Changement climatique.....	18

2-5 Répartition géographique.....	19
3-MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	20
4-TRAITEMENT	20
5- PREVENTION ET LUTTE	21
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL DE RECHERCHE	23
1-MATÉRIELS ET MÉTHODES	24
1- 1 Le cadre géographique	24
1- 2 Méthodologie	26
1-2-1Sites d'échantillonnage.....	26
1-2-2Méthodes de capture	26
1-2-3Protocole d'échantillonnage.....	28
1-2-4Conservation.....	28
1-2-5Montage et identification.....	29
1-2-6Diagnostic moléculaire.....	29
1-2-6-1 Extraction ADN	29
1-2-6-2 PCR diagnostique <i>Leishmania</i>	31
2-RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	31
2- 1 Diversité et abondance	31
2- 2 Répartition des phlébotomes en fonction du piégeage	33
2- 3 Etude parasitologique moléculaire	35
CONCLUSION	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	43

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies à transmission vectorielle très diverses et complexes dans leur écologie et leur épidémiologie. Ces anthropozoonoses (touchant des populations humaines et animales) sont provoquées par des protozoaires kinétoplastidés, les *Leishmania* et transmises par des insectes piqueurs, les phlébotomes. Plus de 30 espèces de parasites *Leishmania* sont actuellement décrites dans le monde et environ 20 parmi elles présentent un intérêt médical [8].

Elles posent de nos jours d'importants problèmes de santé publique dans de nombreux pays. Elles peuvent être à l'origine de lésions cutanées qui peuvent se résorber d'elles mêmes, ou bien d'atteintes muqueuses avec parfois des défigurations complètes, ou encore des formes viscérales mortelles sans traitement.

Ces formes cliniques sont d'une manière générale associées à l'espèce de *Leishmania* (L.) responsable de l'infection. Par exemple, la forme viscérale est causée principalement par deux espèces : *Leishmania donovani* (anthroponotique) et *Leishmania. infantum* (syn : *L. chagasi*) (zoonotique). Cette dernière est responsable de la forme canine (chien), réservoir principal du parasite.

Les vecteurs des leishmanioses, les phlébotomes, appartiennent à l'ordre des Diptères, à la famille des *Psychodidae* Bigot, 1854 et à la sous-famille des *Phlebotominae* Kertesz, 1904. L'importance médicale des phlébotomes est due à leur rôle vecteur de diverses affections humaines et animales tels que les phléboviruses (agents de différentes pathologies comme la fièvre de la vallée du rift) ou la bactérie *Bartonella* (agent responsable des bartonelloses). Cependant les leishmanioses, causées par les leishmanies, restent la principale affection que les phlébotomes transmettent à travers le monde.

Approximativement plus de 800 espèces de phlébotomes sont actuellement décrites à travers le monde. Parmi elles, environ 10 % ont été incriminées comme vecteur des leishmanioses. Toutefois, la capacité vectorielle a été

confirmée seulement pour une trentaine d'espèces [9, 42]. C'est le cas pour certaines espèces du genre *Phlebotomus* de l'Ancien Monde et du genre *Lutzomyia* du Nouveau Monde.

Les leishmanioses (incluses dans le groupe des Maladies Tropicales Négligées (MTN)), sont largement répandues sur tous les continents, sauf en Antarctique, et représentent un problème de santé publique dans de nombreux pays. Elles sont endémiques dans 88 pays dont 72 sont des pays en développement. Le nombre de cas signalés et les zones géographiques touchées par les leishmanioses ne cessent d'augmenter. L'OMS a estimé que 367 millions de personnes sont exposées à la maladie avec 14 millions de personnes atteintes. Chaque année, environ 1,5 à 2 millions de nouveaux cas sont déclarés. Cette situation est aujourd'hui susceptible de s'aggraver en raison du réchauffement climatique et des modifications des écosystèmes [20]. A cela s'ajoutent les cas de co-infections VIH/*Leishmania* qui ont augmenté dans de nombreux pays que ce soit dans les pays industrialisés ou en développement, compliquant le diagnostic et la prise en charge médicamenteuse.

Au Sénégal ces maladies sont bien connues comme étant endémiques dans plusieurs régions du pays [21, 63, 64] avec des conséquences socioéconomiques et sanitaires (stigmatisation, situations d'exclusion, invalidité, baisse de rendement, mort). Cependant, elles ont été uniquement étudiées dans l'Ouest du pays, particulièrement dans la région de Thiès [15, 17].

Deux foyers y ont été ainsi identifiés. Le foyer de leishmaniose cutanée humaine de keur Moussa avec *Leishmania (L) major* comme agent responsable de la maladie et l'espèce *Phlebotomus duboscqi* identifiée comme son vecteur principal [17]. Le deuxième est celui de leishmaniose canine de la communauté rurale de Mont-Rolland [63, 64], avec comme agent responsable *L. infantum* [25] et deux vecteurs suspectés *S. dubia* et *S. schwetzi* comme les vecteurs potentiels [71].

Pourtant des cas de leishmanioses sont signalés dans d'autres localités du Sénégal comme la vallée du fleuve Sénégal, le centre-ouest, le Sénégal oriental et surtout dans le Ferlo. Néanmoins, nous ne sommes pas en mesure, à ce jour, de dire quels sont l'ampleur et l'impact réels de ces maladies sur la santé humaine et animale dans ces zones.

C'est dans ce contexte, suite à la mise en place de la « Grande Muraille Verte » au Sénégal dans le Ferlo (régions de Louga et de Matam), que nous avons mené du 11 au 21 Août 2014 des travaux dans cette zone avec comme objectif principal d'étudier la faune phlébotomienne et ses implications parasitologiques, dans les leishmanioses.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient de :

- faire l'inventaire de la faune phlébotomienne des périmètres reboisés dans le ferlo à Widou Thiengoly ;
- étudier la distribution des différentes espèces de phlébotomes ;
- réaliser une étude parasitologique moléculaire (PCR) afin d'identifier des espèces infectées par des leishmanies, qui pourraient être de potentiels vecteurs de leishmaniose.

Première partie :
Généralités sur les Leishmanioses

1- DEFINITION

Les leishmanioses sont des réticulo-endothélioses parasitaires dont l'agent pathogène est un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*, transmis par la piqûre d'un insecte appartenant au genre *Phlebotomus*. Cet agent pathogène infecte les macrophages des mammifères dont l'homme. Il existe trois formes de leishmaniose : la leishmaniose cutanée, la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose viscérale.

2- EPIDEMIOLOGIE

2-1 Les agents pathogènes

2-1-1 Classification

Les leishmanies appartiennent :

- à l'ordre des *Kinetoplastida*,
- à la famille des *Trypanosomatidae*,
- au genre *Leishmania*.

Le genre *Leishmania* a été subdivisé en deux sous genres en fonction de la partie de l'intestin du phlébotome vecteur colonisé par le parasite.

- Les parasites qui se développent dans la partie antérieure de la région du pylore (suprapylaria) forment le sous genre *Leishmania* ;
- Les parasites se développant au niveau de la région du pylore (péripylaria) forment le sous genre *Viannia*.

Cette classification basée sur les caractères décrits ci-dessus [41], a été par la suite confirmée par des analyses phylogénétiques [14, 58].

Les sous genres *Leishmania* et *Viannia* sont composés de plusieurs complexes d'espèces (Figure 1). Près de 30 espèces sont actuellement décrites et environ 20 parmi elles présentent un intérêt médical ou vétérinaire.

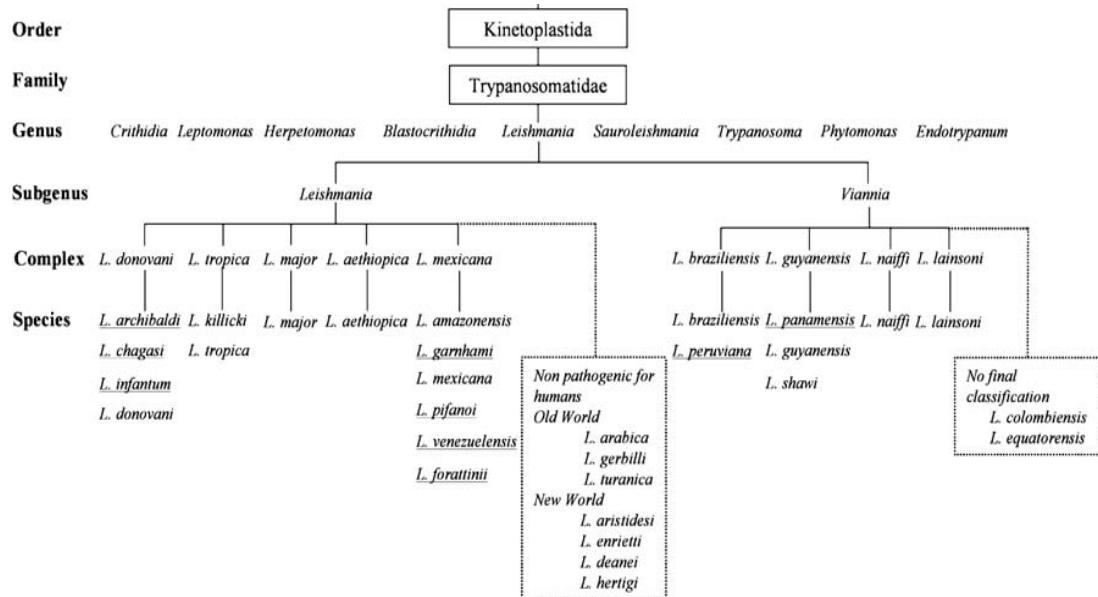


Figure 1 : Taxonomie du genre *Leishmania* [8]

2-1-2 Morphologie

Les leishmanies passent par deux formes au cours de leur cycle évolutif : la forme amastigote et la forme promastigote.

2-1-2-1 La forme amastigote

C'est une forme ovoïde immobile de 3-5 µm, possédant un noyau, un kinétopaste et un flagelle intracytoplasmique. On la trouve dans les phagolysosomes des macrophages et d'autres cellules phagocytaires des mammifères. L'observation se fait par examen direct de prélèvements (sang, moelle osseuse, rate, etc.) au microscope optique (Figure 2).



Figure 2 : Amastigotes de leishmanies à l'intérieur des macrophages (UMR MIVEGEC)

2-1-2-2 La forme promastigote

Chez le vecteur, les amastigotes se transforment en promastigotes dans le tube digestif du phlébotome (Figure 3). Cette forme est observée uniquement chez le vecteur et en culture *in vitro* à 26°C : il s'agit d'un organisme fusiforme allongé, de 15-20 µm, très mobile grâce à un flagelle libre ; à la base du flagelle, au voisinage du blépharoplaste, se trouve le kinétoplaste qui est une formation d'ADN mitochondrial caractéristique des *kinétoplastidae*.

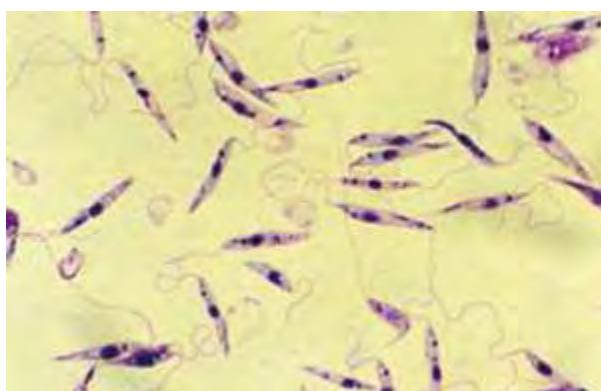


Figure 3 : Promastigotes de leishmanies chez le phlébotome(http://fundacionio.org/blog/uploaded_images/promastigotes)

2-1-3 Biologie

2-1-3-1 Cycle évolutif

Les leishmanies sont des organismes à cycle hétéroxène. Elles alternent entre une phase intracellulaire chez un hôte vertébré, essentiellement des mammifères et une phase extracellulaire chez un hôte invertébré, le phlébotome (Figure 4).

Pendant le repas de sang, le phlébotome infesté injecte à l'hôte les leishmanies au stade infectant, les promastigotes métacycliques. Ils sont ensuite phagocytés par les macrophages et se transforment en amastigotes. Dans les vacuoles parasitophores, les amastigotes vont se diviser jusqu'à provoquer l'éclatement des macrophages. Les leishmanies libérées vont coloniser d'autres macrophages. Ainsi, elles atteignent différents tissus, suivant l'espèce de *Leishmania* impliquée. La femelle du phlébotome se contamine en ingérant des macrophages parasités pendant un repas de sang sur un hôte contaminé. Dans le tube digestif du phlébotome, les parasites migrent vers l'intestin antérieur et passent par

différentes formes promastigotes (promastigotes procycliques, promastigotes nectomonades, promastigotes leptomonades, promastigotes métacycliques). Les promastigotes métacycliques, qui sont les formes infectantes, sont ensuite amassés au niveau de la valve stomodéale du phlébotome, prêts à être injectés à un mammifère hôte lors du prochain repas sanguin [9, 35, 48, 67].

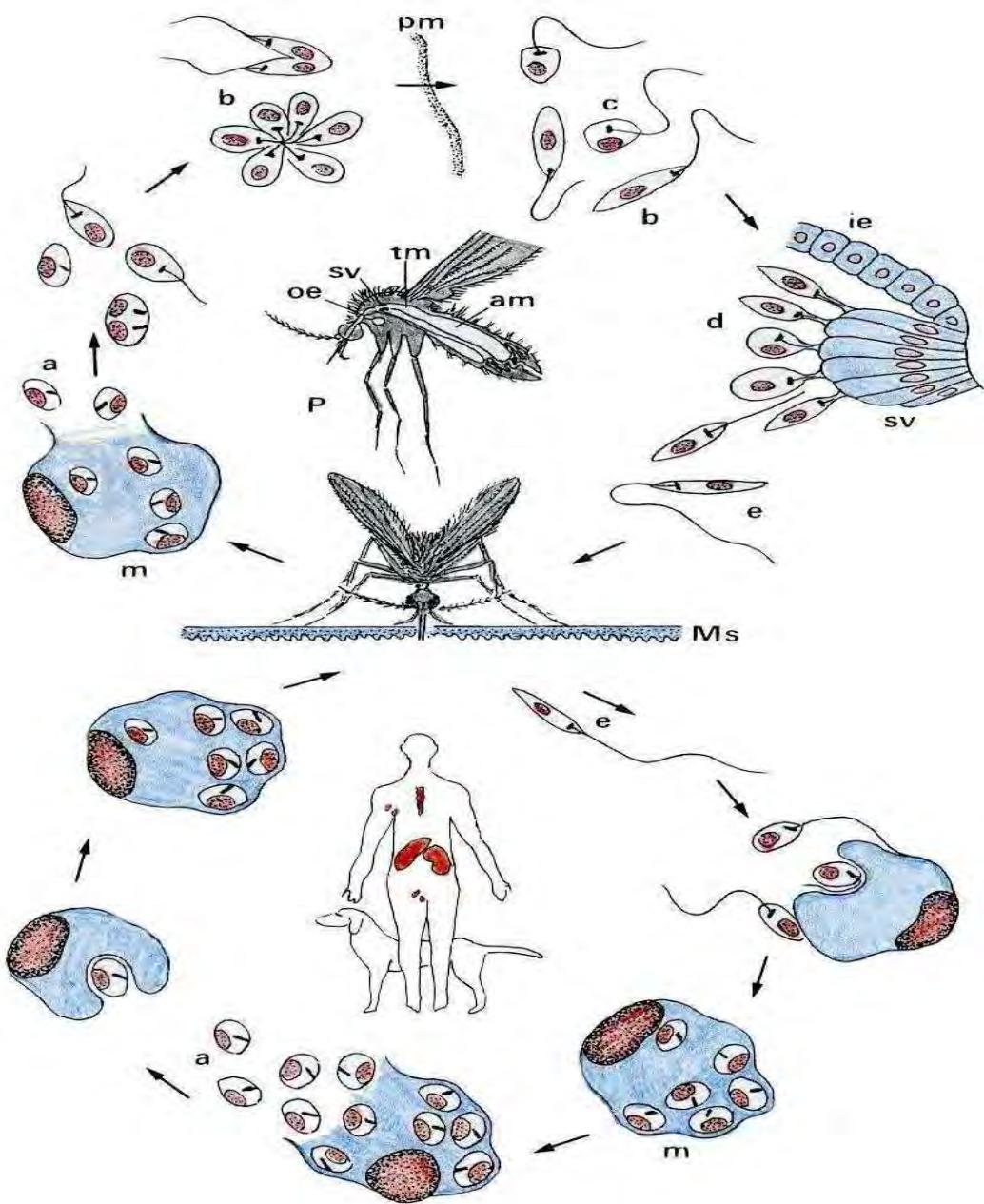


Figure 4: Représentation schématique du cycle général des leishmanioses
<http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/images/cycle.jpg>

2-1-3-2 Habitat

Il existe un lien étroit entre les différentes manifestations cliniques observées, l'espèce de *Leishmania* concernée et sa localisation à l'intérieur du mammifère hôte.

C'est ainsi que *L. major* zoonotique et *L. tropica* anthroponotique qui sont les deux principales espèces responsables de la forme cutanée dans le monde colonisent particulièrement la zone cutanée de l'hôte. *L. braziliensis* responsable de la forme cutanéo-muqueuse dépasse la peau et colonise les parties muqueuses. Pendant que les deux espèces vicérotropes, *L. donovani* et *L. infantum* responsables des formes viscérales vont ériger domicile au niveau des viscères: le foie, la rate, la moelle osseuse etc.

2-2 Le vecteur: le phlébotome

2-2-1 Morphologie

La connaissance de la morphologie des phlébotomes est un élément obligatoire pour la nomenclature des espèces. Le vocabulaire général reconnu, adapté à l'identification des phlébotomes est largement basé sur divers caractères morphologiques tels que la forme, la taille et la disposition d'un certain nombre d'éléments. Ces éléments sont essentiellement situés au niveau de la tête et du génitalia.

- Les adultes

Les phlébotomes sont des insectes de petite taille (2-3 mm) (Figure 5). Ils n'attirent guère l'attention du public, en dehors des épisodes de pullulation intense. Cependant, pour peu qu'on y prête attention, ils sont faciles à identifier à cause de leur morphologie générale particulière. Ils ont une couleur gris-jaunâtre, une allure de moustique ; le corps et les ailes sont velus. Ils ont un aspect bossu avec de longues pattes grêles et des ailes lancéolées, dressées au repos en « V » au-dessus du corps [44]. Leur vol est heurté, interrompu par de brèves périodes de repos. L'observation de la morphologie détaillée, en vue

notamment de leur identification spécifique, nécessite le montage entre lame et lamelle et l'observation au microscope [1].



Figure 5 : Morphologie du phlébotome adulte : à gauche une femelle, à droite un mâle
(http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php / http://www-fac-pharma.u-strasbg.fr/Officine/Upload/These_Moreno_Insectes/dipteres/phlebotomes.htm)

- Les stades pré-imaginaux

A la ponte, les oeufs sont de couleur blanchâtre ou jaune clair qui vire au brun foncé quelques heures après. La larve de phlébotome est de type éruciforme, avec une tête fortement chitinisée et des pièces buccales broyeuses. Le tégument est couvert de tubercules de soies lisses ou épineux soigneusement répertoriés par les spécialistes qui les utilisent en systématique. La nymphe mesure environ 3 mm de long et comprend un céphalothorax et un abdomen. Le tégument est couvert de soies courtes, disposées comme chez la larve (Figure 6).



Figure 6 : Phlébotome à l'état de larve de stade 4 avec 4 soies caudales
(<http://www.gruppoleishmania.org/fr/phlc3A9botome-C3A0-l>)

2-2-2 Classification

Les phlébotomes appartiennent au phylum des Arthropodes, à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, au sous ordre des Nématocères, à la famille des *Psychodidae* et à la sous famille des *Phlebotominae*. La systématique des phlébotomes est encore loin de faire l'unanimité entre les spécialistes. Cependant la classification la plus utilisée actuellement reste celle de Lewis *et al* en 1977[47] et Leng, en 1987 [45]. Ils reconnaissent 6 genres dont trois dans le Nouveau Monde *Brumomyia*, *Warileya* et *Lutzomyia* et trois dans l'Ancien Monde *Sergentomyia*, *Phlebotomus* et *Chinius*. Les vecteurs habituels du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde se recrutent respectivement chez les *Lutzomyia* et les *Phlebotomus* [37].

Environ plus de 800 espèces de phlébotomes sont actuellement décrites à travers le monde. Parmi elles, près de 10 % sont suspectées ou incriminées dans la transmission des leishmanioses [9, 37].

2-2-3 Biologie

- Habitat et comportement

Les phlébotomes sont cosmopolites mais surtout présents dans les régions chaudes et tempérées. Les habitats des phlébotomes comprennent d'une part le gîte de l'hôte vertébré sur lequel les femelles doivent obligatoirement se nourrir, d'autre part le refuge où elles trouveront la tranquillité nécessaire à l'élaboration et à la ponte de leurs œufs, par exemple dans un terrier de rongeur. L'habitat des phlébotomes est donc conditionné par de nombreux paramètres. Les espèces anthropophiles fréquentent les lieux habités par l'homme et les animaux domestiques.

- Nutrition et reproduction

Les phlébotomes mâles et femelles se nourrissent à partir de sources naturelles de sucre, en particulier de sucs végétaux [69] et de miellat des pucerons [11, 38]. Seule la femelle est hématophage car elle a besoin de sang pour la maturation de

ses œufs (Figure 7). Les phlébotomes femelles sont des telmophages car elles puisent leur repas dans une petite mare de sang obtenue par dilacération de la peau à l'aide des mâchoires et des mandibules, et maintenue liquide grâce à l'injection d'une salive anticoagulante. Cette salive inoculée participe activement à l'installation et la multiplication des leishmanies chez l'hôte [9, 34, 35]. Leur cycle biologique passe par quatre stades larvaires. Le développement larvaire est relativement lent, prenant au moins 3 semaines avant la nymphose. Les adultes émergent des pupes au bout de 10 jours. [38, 40]. (Figure 8)



Figure 7: Repas sanguin de la femelle de phlébotome
(<http://www.infectionlandscapes.org>)

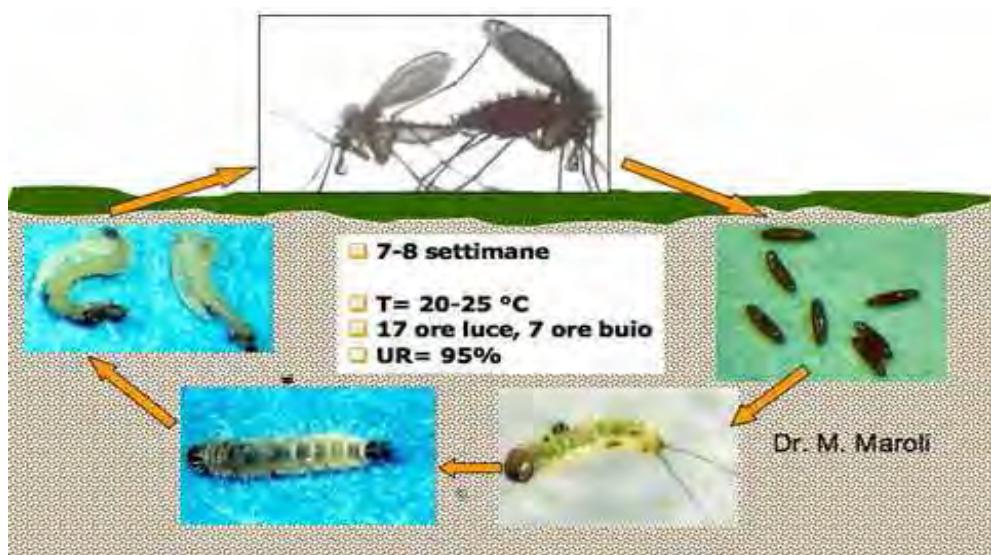


Figure 8 : Cycle biologique des phlébotomes : 1, Accouplement de phlébotomes : la femelle à droite, le mâle à gauche ; 2, les œufs ; 3, larve de 1er stade ; 4, larve de 4ème stade ; 5, nymphe ; (les stades 2 et 3 ne sont pas représentés) (<http://www.gruppoleishmania.org/fr/>)

2-2-4 Importance médicale des phlébotomes

L'importance médicale des phlébotomes provient du rôle vecteur que jouent certaines espèces dans la transmission de certaines affections. Les phlébotomes peuvent, en effet, inoculer à l'homme *Bartonella*, responsable de la bartonellose ou maladie de Carrion en Amérique du sud, *Phlébovirus*, agent de la fièvre des trois jours ou fièvre à papataci en Afrique du nord et dans une partie de l'Asie [1, 2, 37]. Plusieurs phlébovirus sont également transmis par le genre *Lutzomyia* en Amérique et les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* en Afrique et sur le pourtour méditerranéen [12, 18, 27].

Cependant, les leishmanioses restent la principale affection que les phlébotomes transmettent à travers le monde.

Il faut noter que la piqûre de phlébotome peut parfois provoquer des éruptions prurigineuses assez violentes chez certains individus.

2-2-5 Les espèces vectrices de leishmanioses

2-2-5-1 Vecteurs du Nouveau Monde

Les vecteurs du Nouveau Monde sont représentés dans le tableau I.

Tableau I: Principales espèces de phlébotomes vecteurs incriminées ou suspectées dans le Nouveau Monde

Genre	Sous genre	Espèces incriminées	Leishmanies
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>longipalpis</i> <i>diabolica</i>	<i>infantum</i> <i>(=chagasi)</i> <i>mexicana</i>
	<i>Nyssomyia</i>	<i>olmeca olmeca</i> <i>flaviscute/lata</i> <i>olmeca bicolor</i> <i>intermedia</i> <i>umbratilis, anduzei, whitmani,</i> <i>trapidoi</i>	<i>mexicana</i> <i>amazonensis</i> <i>venezuelensis</i> <i>braziliensis</i> <i>guyanensis</i> <i>panamensis</i>
	<i>Psychodopygus</i>	<i>wellcomei</i> <i>panamensis</i>	<i>braziliensis</i> <i>(panamensis)</i>
	<i>Helcocyrtomyia</i>	<i>peruensis</i>	<i>peruviana</i>
	<i>Pintomyia</i>	<i>pessoai</i>	<i>(braziliensis)</i>

2-2-5-2 Vecteurs de l'Ancien Monde

Les vecteurs de l'Ancien Monde sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Principales espèces de phlébotomes vecteurs incriminées ou suspectées dans l'Ancien Monde.

Genre	Sous genre	Espèces incriminées	Leishmanies
<i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>papatasi, duboscqi</i>	<i>major</i>
	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>sergenti</i> <i>alexandri</i> <i>caucasicus (alexandri)</i>	<i>tropica</i> <i>donovani</i> <i>major</i>
	<i>Synphlebotomus</i>	<i>martini</i> <i>guggisbergi</i> <i>ansarii</i>	<i>donovani</i> <i>tropica</i> <i>(major)</i>
	<i>Larroussius</i>	<i>ariasi, langeroni, neglectus,</i> <i>perfiliewi,</i> <i>perniciosus, tobbi</i> <i>longicuspis, pedifer</i>	<i>infantum</i> <i>aethiopica</i>
	<i>Adlerius</i>	<i>chinensis</i>	<i>infantum</i>
	<i>Euphlebotomus</i>	<i>argentipes</i>	<i>donovani</i>

Les espèces du genre *Sergentomyia* ont toujours été considérées comme non impliquées dans la transmission des leishmanioses [37], même si certaines études ont observé des espèces de *Sergentomyia* infestées par des *Leishmania*. C'est le cas de *L. donovani* chez *S. babu* [51] en Inde et de *L. major* chez *S. garnhami* [52] au Kenya. Plus récemment, au congrès ISOPS (International Symposium On Phlebotomine Sandflies, Turquie, 2011), une étude montre par PCR la présence de *L. major* chez trois espèces de *Sergentomyia* (*S. africana africana*, *S. ingrami* et *S. hamoni*), dans un foyer endémique de leishmaniose cutanée de la région du Volta au Ghana [10]. Ceci montre qu'il reste encore de nos jours, malgré tous les travaux déjà réalisés, beaucoup de zones d'ombre sur la capacité ou l'incapacité de certaines espèces de phlébotomes à transmettre les leishmanies. Ceci est dû en majorité à la grande diversité des foyers d'infection dans lesquels de nombreux animaux jouent le rôle de réservoir et dans lesquels il existe une multiplicité d'espèces de phlébotomes à l'écologie mal connue. Cette

diversité écologique et biologique et les échanges internationaux et intercontinentaux de plus en plus fréquents peuvent avoir comme conséquence l'émergence de vecteurs insolites. Un autre point fondamental est que les arthropodes vecteurs sont très sensibles aux variations climatiques et environnementales. L'impact des changements climatiques ajoutés aux effets de l'urbanisation et des modifications environnementales engendrées par l'homme peuvent entraîner l'apparition de nouveaux habitats favorables pour de nombreux arthropodes. Dans ce contexte, le risque majeur dans ces nouveaux foyers est l'émergence de maladies infectieuses suite à une capture de cycle par un nouveau vecteur, ou bien par l'introduction de nouveaux vecteurs avec de nouveaux pathogènes.

2-2-6 Cycle intravectoriel

Le cycle intravectoriel des leishmanies commence depuis l'ingestion des leishmanies par le phlébotome vecteur lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté dont l'homme et comprend l'ensemble des transformations aboutissant à la formation de promastigotes métacycliques infectants (Figures 9 et 10). A l'intérieur du vecteur, les leishmanies mettent en place des interactions pour échapper aux différentes barrières rencontrées dans l'intestin du phlébotome [9, 35].

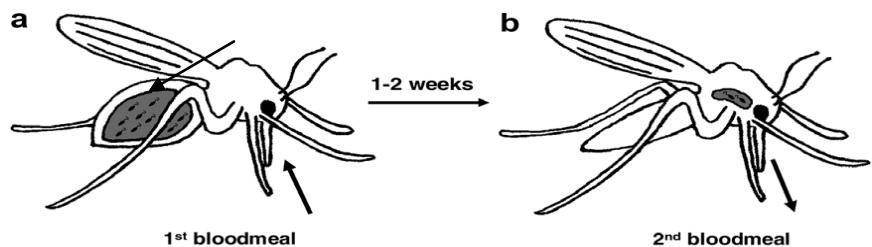


Figure 9 : Repas sanguin et transmission des leishmanies : (a), le phlébotome s'infeste en ingérant des amastigotes lors d'un premier repas sanguin ; (b), une à deux semaines plus tard, les amastigotes se transforment en promastigotes métacycliques infectants que le phlébotome transmet lors d'un deuxième repas de sang [9]

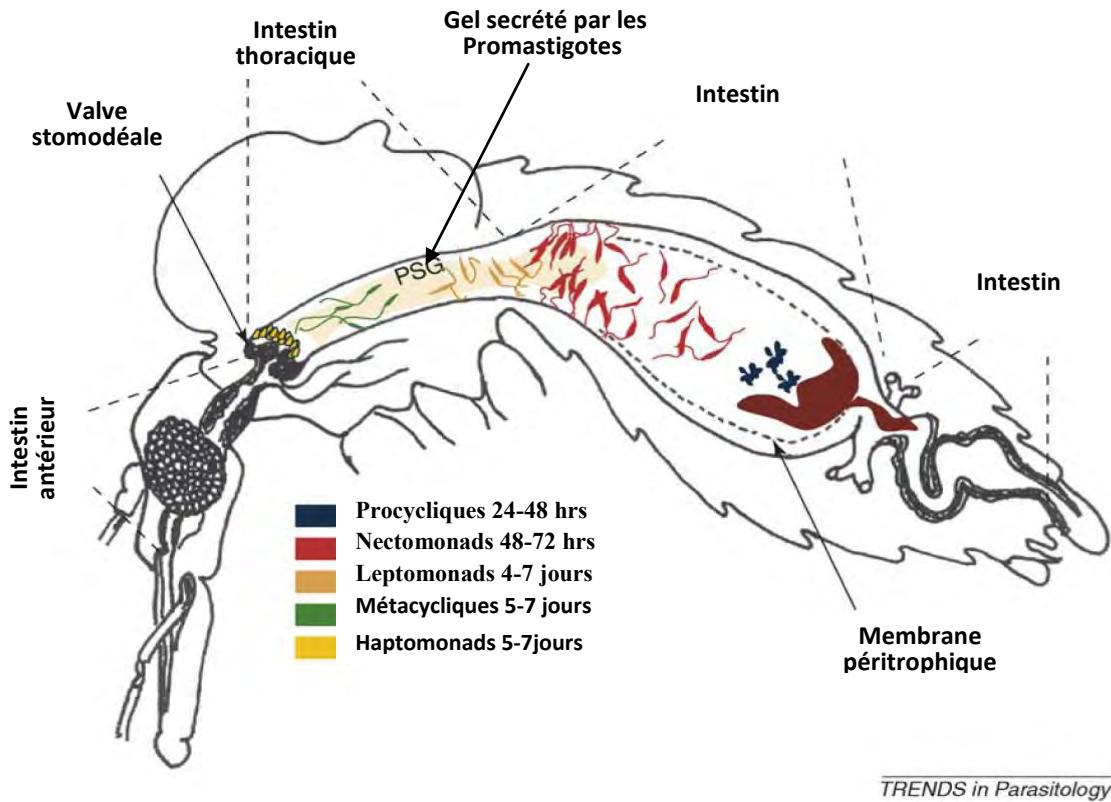


Figure 10. Cycle de vie des leishmanies chez le phlébotome vecteur : les différentes formes morphologiques de promastigotes et leur temps d'apparition [35]

2-3 Le réservoir de parasites

Seuls les mammifères sont, à ce jour, trouvés porteurs d'espèces du genre *Leishmania* qu'elles soient ou non pathogènes pour l'homme. On peut qualifier les leishmanioses d'anthroponoses ou de zoonoses selon que l'homme soit l'hôte réservoir ou l'hôte accidentel. Les réservoirs du Nouveau Monde sont principalement les paresseux, les rongeurs, les primates [60]. Dans l'Ancien Monde, ce sont principalement les petits rongeurs, les canidés et occasionnellement les félidés [74].

2-4 Facteurs de risque [59]

2-4-1 Conditions socioéconomiques

La pauvreté accroît le risque de leishmaniose. Les mauvaises conditions de logement et les insuffisances de l'assainissement domestique (par exemple, absence de système de gestion des déchets, égouts à ciel ouvert) peuvent

favoriser le développement des sites de reproduction et de repos des phlébotomes et augmenter les contacts avec l'homme. Les phlébotomes sont attirés par les repas de sang potentiels que leur offrent les logements surpeuplés. Les comportements humains (par exemple, dormir dehors ou à même le sol) sont également susceptibles d'accroître le risque, que modère l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides.

2-4-2 Malnutrition

Les régimes alimentaires pauvres en protéines, en fer, en vitamine A et en zinc augmentent la probabilité de voir l'infection évoluer en kala-azar.

2-4-3 Mobilité de la population

Les épidémies des deux principales formes de leishmaniose sont souvent associées aux migrations et à l'arrivée de personnes non immunisées dans des zones où il existe déjà des cycles de transmission. L'exposition professionnelle et l'intensification de la déforestation restent des facteurs importants. Par exemple, les personnes qui s'installent dans des terres autrefois boisées se rapprochent de l'habitat du phlébotome, ce qui peut augmenter rapidement le nombre de cas.

2-4-4 Changements environnementaux

Plusieurs changements environnementaux peuvent influencer l'incidence de la leishmaniose, dont l'urbanisation, l'intégration du cycle de transmission dans l'habitat humain et l'empietement des exploitations agricoles et des zones de peuplement sur les forêts.

2-4-5 Changement climatique

Les conditions climatiques jouent sur la leishmaniose, et l'évolution des précipitations, des températures et de l'humidité a des répercussions importantes à cet égard. Le réchauffement planétaire et la dégradation des terres modifient de plusieurs manières l'épidémiologie de la leishmaniose:

- L'évolution des températures, de la pluviométrie et de l'humidité peut avoir des effets importants sur les vecteurs et les réservoirs en modifiant

la distribution et en influant sur les taux de survie et la taille des populations.

- Même les plus faibles variations de températures peuvent avoir une profonde incidence sur le cycle de développement des promastigotes de *Leishmania* dans les phlébotomes, et permettre ainsi au parasite de se transmettre là où la maladie n'était pas endémique auparavant.
- Il est possible que les sécheresses, les famines et les inondations imputables au changement climatique entraînent des déplacements et migrations massives vers les zones de transmission de la leishmaniose et que la malnutrition affaiblisse l'immunité des populations concernées.

2-5 Répartition géographique

Il s'agit d'une parasitose des zones intertropicales (hormis l'Océanie) et tempérées chaudes, signalée dans 88 pays répartis en cinq foyers : méditerranéen, chinois, indien, africain et américain (Figure 11). La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence annuelle à 2 millions (1,5 million de leishmanioses cutanées dont 90% en Algérie, Afghanistan, Arabie saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie, et 500 000 leishmanioses viscérales dont 90% au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan).

L'Europe du Sud fait partie du foyer méditerranéen dans la partie occidentale et septentrionale. On n'y rencontre que *Leishmania infantum*, dont le réservoir principal est le chien [5].

Au Sénégal ces maladies sont bien connues comme étant endémiques dans plusieurs régions du pays [21, 63, 64]. Cependant, elles ont été uniquement étudiées dans l'Ouest du pays, particulièrement dans la région de Thiès [15, 17].

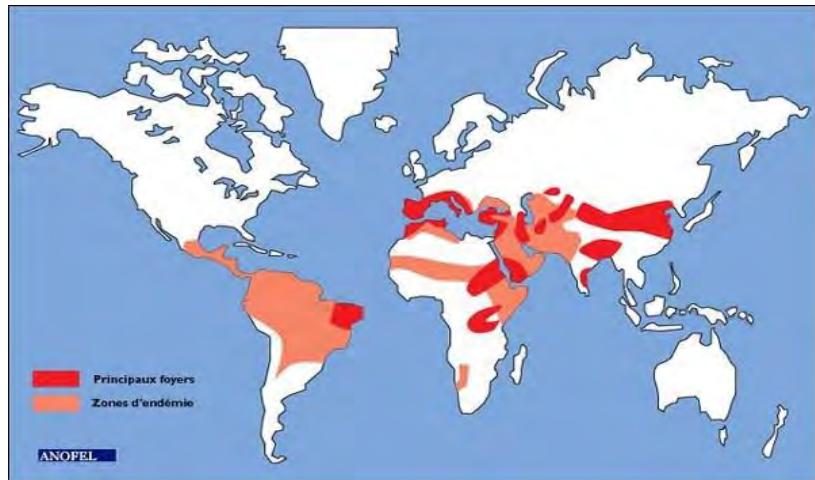


Figure 11: Répartition géographique des leishmanioses [5]

3- MANIFESTATIONS CLINIQUES [59]

- **La leishmaniose viscérale** (LV, également appelée kala-azar) est mortelle en l'absence de traitement. Caractérisée par des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépato-splénomégalie et une anémie ;
- **La leishmaniose cutanée** (LC) est la forme la plus fréquente, qui provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices définitives et des handicaps sévères;
- **La leishmaniose cutanéo-muqueuse** détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge.

4- TRAITEMENT

Le traitement de la leishmaniose est conditionné par plusieurs facteurs parmi lesquels la forme de la maladie, l'espèce du parasite et la situation géographique. La leishmaniose est une maladie traitable dont on peut guérir. Un traitement complet doit être administré rapidement à tous les patients chez qui la leishmaniose a été diagnostiquée [59]. Les molécules utilisées sont [5] :

- **Antimoniés pentavalents** : L'efficacité des antimoniés dans le traitement des leishmanioses est confirmée par près d'un siècle d'utilisation. Les

produits disponibles sont l'antimoniate de méglumine (Glucantime®) en France et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) dans les pays anglo-saxons.

- **Amphotéricine B :** L'amphotéricine B (Fungizone®), antifongique utilisé dans le traitement des mycoses systémiques, représente un antileishmanien puissant utilisé dans le traitement des leishmanioses graves (viscérales et muqueuses) ou résistantes aux antimonés.
- **Pentamidine :** Seul l'iséthionate de pentamidine, commercialisé sous le nom de Pentacarinat®, est disponible. Il est aujourd'hui surtout utilisé comme médicament de première intention dans le traitement de certaines formes de leishmaniose cutanée en cure courte.
- **Miltéfosine :** La miltéfosine (Impavido®) est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. Il est efficace et moins toxique que la pentamidine ou les antimonés.

5- PREVENTION ET LUTTE [59]

Une panoplie de stratégies d'intervention doit être mobilisée pour prévenir et combattre la leishmaniose. La transmission, en effet, s'inscrit dans un système biologique complexe associant l'hôte humain, le parasite, le phlébotome et, parfois, un réservoir animal. Les principales stratégies sont les suivantes :

- Un diagnostic précoce et une prise en charge efficace des cas permettent de réduire la prévalence et de prévenir handicaps et décès. Des médicaments très efficaces et sûrs existent aujourd'hui contre la leishmaniose, en particulier contre sa forme viscérale, et l'accès à ceux-ci s'améliore de façon significative.
- La lutte antivectorielle aide à atténuer ou interrompre la transmission de la maladie en s'attaquant aux phlébotomes, en particulier au niveau domestique. Parmi les méthodes utilisées figurent la pulvérisation

d'insecticides, les moustiquaires imprégnées d'insecticides, l'aménagement de l'environnement et la protection personnelle.

- Une surveillance efficace de la maladie est importante. Le dépistage et le traitement précoce des cas aident à réduire la transmission et permettent de surveiller la propagation et la charge de morbidité.
- La lutte contre les réservoirs est complexe et doit être adaptée à la situation locale.
- Mobilisation sociale et renforcement des partenariats : il s'agit de mobiliser les communautés et de les informer au moyen d'interventions efficaces visant à modifier les comportements par des stratégies de communication adaptées à la situation locale. Les partenariats et la collaboration avec les différentes parties intéressées et avec les autres programmes de lutte contre les maladies à transmission vectorielle sont essentiels.

Deuxième partie : Travail de recherche

1- MATÉRIELS ET MÉTHODES

1-1 Le cadre géographique

Notre zone d'étude est située dans l'aire géographique du Ferlo plus précisément à Widou Thiengoly, considérée comme une zone sylvopastorale. Le Ferlo est une vaste région sous-peuplée, constituée de plateaux arides. Il couvre près du tiers du territoire sénégalais [72].

Il est localisé entre les isohyètes 300 et 500 mm, à cheval sur 3 régions administratives : la région de Louga à l'ouest, la région de Matam au nord-est et la région de Saint-Louis au nord-ouest. Elle s'étend sur une superficie estimée à environ 70 000 km².

Le climat est de type sahélien, caractérisé par une grande sécheresse, l'évaporation potentielle dépassant largement la pluviométrie [72]. La pluviométrie est faible, de quatre mois de pluies avec un maximum en août. Le Ferlo comprend trois sous-zones : Ferlo sableux, Ferlo sablo-argileux et Ferlo ferreux. Le réseau hydrographique est presque nul, caractérisé par la présence du lac de Guiers au niveau de la partie Ouest. Cependant, il faut noter la présence de mares temporaires, de juillet à décembre, résultant de l'eau de ruissellement durant la saison pluvieuse.

C'est une zone de transition bioclimatique entre le domaine saharien au nord et les savanes soudanaises au sud. Elle est caractérisée par des crises écologiques et humaines consécutives aux périodes de sécheresse qui touchent l'Afrique depuis plusieurs décennies. Toutefois, depuis quelques années, de nombreux aménagements de types bassins de rétention permettent de garder les eaux de pluies presque toute l'année. Cette zone qui est au cœur d'un important programme panafricain de développement et de reforestation appelée Grande Muraille Verte présente tous les traits propres au Sahel (déficit pluviométrique, pression anthropique sur le milieu, modifications des grands équilibres écologiques) (Figure 12).

Nos sites d'études sont à dominance sableuse. La végétation est de type savane arbustive sahélienne, caractérisée par des espèces ligneuses, souvent rabougries et épineuses. Des prairies estivales se développent dès les premières pluies [72].

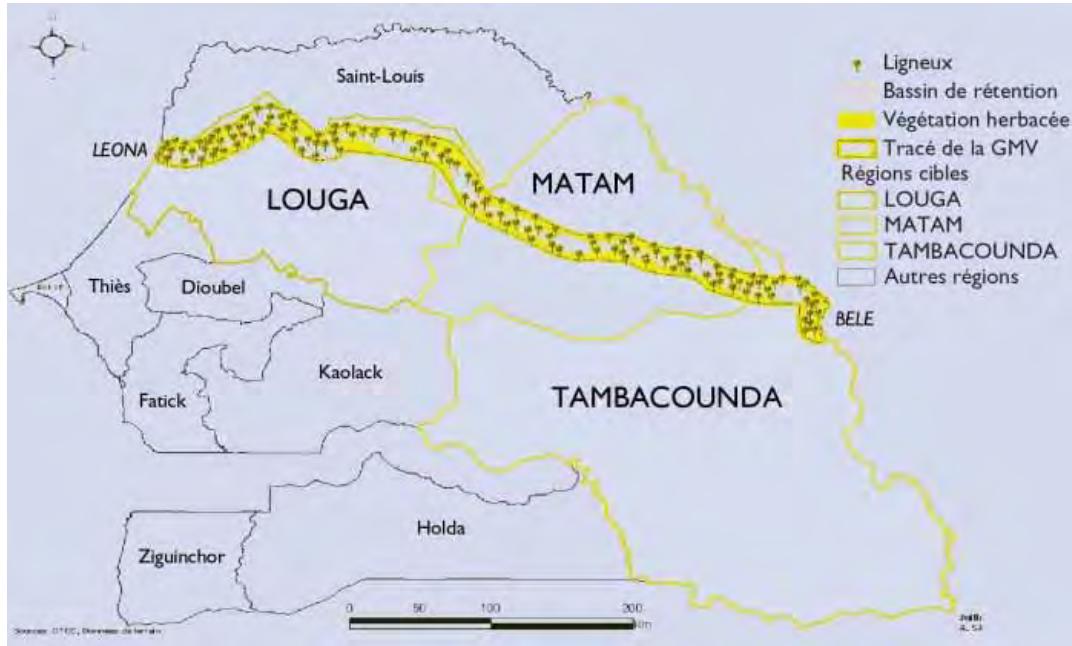


Figure 12. Tracé de la Grande Muraille Verte au Sénégal. [24] (Source : Dia & Duponnois, 2010).

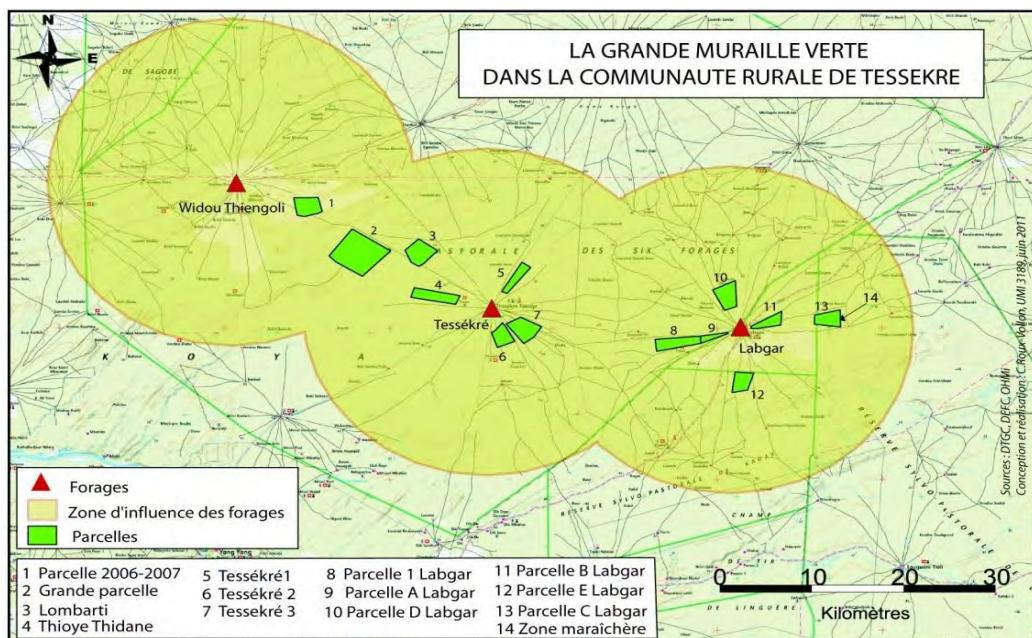


Figure 13. Carte de localisation des périmètres de capture à Widou Thiengoly (source : DTGC, DEFC OHMI, 2011)

1-2 Méthodologie

1-2-1 Sites d'échantillonnage

Nous avons effectué nos échantillonnages dans les périmètres (parcelles) reboisés à Widou Thiengoly représentés sur la carte de la figure (13). Les lieux de collecte étaient représentés par les terriers, autres petits trous du sol, les trous des termitières, les anfractuosités au niveau des arbres et des murs, les chambres des habitations.

1-2-2 Méthodes de capture

Plusieurs techniques de piégeages de phlébotomes ont été utilisées : le piégeage adhésif, le piégeage lumineux de type CDC et les pulvérisations intra-domiciliaires avec insecticides.

- Le piégeage adhésif :

Le piège adhésif consiste en une feuille de papier blanc de 20 cm de côté, de faible épaisseur mais assez rigide, enduite d'huile de Ricin sur les deux faces. Le piège est disposé à l'entrée de terriers, autres petits trous du sol, dans les trous des termitières, les anfractuosités au niveau des arbres et des murs, etc. Il doit être disposé de telle sorte qu'il permette l'entrée et la sortie des animaux qui y ont élu domicile, sans la moindre gêne, ceci pour éviter qu'il soit déplacé (Figure 14). Ce piégeage est le mieux adapté pour recenser le peuplement phlébotomien d'une localité. Il permet une bonne étude de la distribution géographique de ces insectes [54].



Figure 14 : Capture par piégeage adhésif, les pièges sont posés en forme de cône : A le long d'une haie ; B, dans un terrier de rongeur

- Le piégeage lumineux de type CDC

Le piège est constitué d'un cylindre en plastique, muni d'un système d'aspiration composé d'un petit moteur relié à un ventilateur. Une lampe de faible éclairage est située au-dessus du moteur. Ce cylindre est relié à son extrémité une cage en tulle moustiquaire ; cette dernière permet de recueillir les individus aspirés à l'intérieur par le ventilateur (Figure 15).

Cette méthode de piégeage, qui présente l'avantage de capturer des phlébotomes vivants, est basée sur le phototactisme positif de ces insectes. Les échantillons obtenus sont généralement en bon état et permettent de faire des études systématiques, taxonomiques et surtout parasitologiques efficaces.

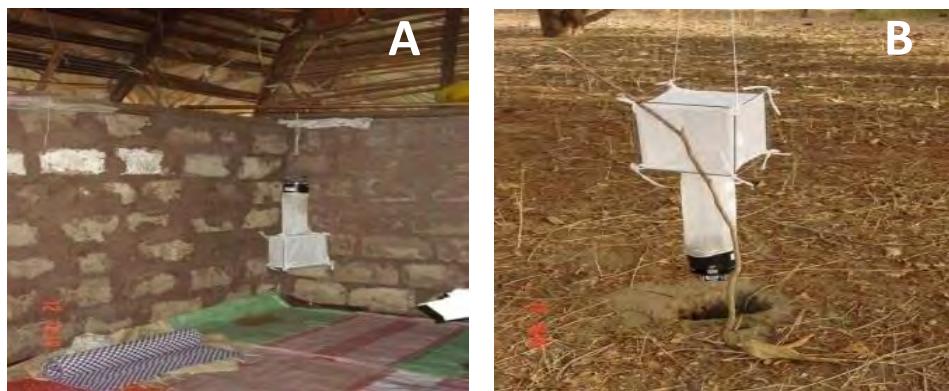


Figure 15 : Capture par piégeage lumineux : A, position normale à l'intérieur d'une case ; B, position renversée au dessus d'un terrier.

- Les pulvérisations intra-domiciliaires

La méthode est basée sur les propriétés asphyxiantes de la pyréthrine, principe actif du produit insecticide "Yotox" qui a été utilisé ici. Après pulvérisation avec les bonbonnes de "Yotox", la pièce est fermée pendant une douzaine de minutes, le temps nécessaire pour permettre à la pyréthrine d'agir sur les insectes. Un drap blanc étalé sur tout le plancher de la pièce permet de recueillir les insectes tués ou assommés (Figure 16). Les pulvérisations se déroulent entre 8 et 11 heures du matin, période pendant laquelle les phlébotomes sont encore présents dans les habitations.

Cette méthode de capture permet d'avoir une bonne idée de la diversité spécifique des espèces endophiles. Les individus capturés sont soit morts, soit endormis.



Figure 16 : Capture par pulvérisation intradomiciliaire : A, pulvérisation de la case ; B, récupération des insectes à l'extérieur.

1-2-3 Protocole d'échantillonnage

Les phlébotomes étant des insectes à activité nocturne, les pièges CDC et les papiers huilés sont mis en place en fin d'après-midi, juste avant la tombée de la nuit, pour être relevés le lendemain matin avant 8 heures.

Pour le piégeage lumineux, ce sont 18 pièges de type CDC, en raison de 12 pièges dans les périmètres reboisés, principalement dans des touffes d'arbres, à l'entrée de grands terriers et de petits terriers parfois, 6 dans les habitations dont 3 à l'intérieur et 3 autour des habitations.

Pour le piégeage adhésif, 30 papiers huilés ont été utilisés en fonction des périmètres de captures retenus.

Les pulvérisations de pyréthrines à l'intérieur des habitations ont été faites en raison de 3 chambres par village et par jour représentant 30 pièces pulvérisées.

1-2-4 Conservation

Les individus récoltés sont classés selon la date et le type de piégeage, ceci pour permettre une meilleure exploitation des résultats.

Les individus capturés à l'aide des papiers huilés sont conservés dans de l'alcool à 70°.

Pour le piégeage lumineux CDC et les pulvérisations intradomiciliaires, les phlébotomes capturés sont prélevés et conservés dans de l'alcool à 70°.

1-2-5 Montage et identification

L'ensemble des individus capturés (mâles et femelles), ont été identifiés au laboratoire. Les mâles ont été montés de façon permanente entre lame et lamelle, la tête en position dorsoventrale, les ailes et les pattes bien étalées. Après passages successifs dans les bains suivants : éclaircissement dans une solution de potasse 20 %, pendant deux heures, rinçage à l'eau distillée pendant 2 x 30 minutes, mordançage dans la solution de Marc André pendant 1 heure au moins, déshydratation à l'alcool à 70° (30 minutes) puis à 90° (30 minutes). L'identification des espèces a été réalisée au microscope photonique après séchage des lames dans une étuve à 40° C pendant au moins 48 heures.

Concernant les femelles c'est la méthode d'identification rapide qui a été utilisée. Seuls la tête et le génitalia ont été montés sur la lame. Ils ont tout d'abord été séparés du reste du corps. Ils ont été ensuite immergés dans une goutte du liquide Marc André portée à ébullition grâce à la flamme d'un briquet ou d'un bec de gaz. Après cette étape, ils ont été bien étalés sur la lame, dans une goutte de liquide de montage (baume du Canada), la face ventrale de la tête vers le haut. L'identification peut se faire juste après la pose de la lamelle ou plusieurs jours après. Cette méthode a permis de garder le reste du corps pour d'autres utilisations comme les extractions.

1-2-6 Diagnostic moléculaire

1-2-6-1 Extraction ADN

Après dissection des phlébotomes (montage tête + génitalia), le corps est placé à sec à -20°C dans des tubes 1,5 ml.

- 1) Ajouter 30µl du 1^{er} tampon de lyse (ATL) et broyer le corps dedans avec un petit « piston pellet » à usage unique ou stérilisé.
- 2) Compléter après broyage avec 150 µl pour arriver au 180 µl finaux de tampon. Enlever le piston. (évidemment).
- 3) Ajouter 20 µl de PK
- 4) 30 mn à 56°C (cela suffit surtout si l'on remue un peu après 10 et 20 minutes). Vortex 15 secondes
- 5) Ajouter 200 µl de tampon AL. Vortex 15 secondes
- 6) 10 minutes à 70°C (nettoyer le bas des tubes avec papier + javel)
- 7) Ajouter 200 µl d'éthanol absolu
- 8) Vortex 15 secondes
- 9) Transférer le tout dans une colonne (ne pas toucher la colonne)
- 10) Centrifuger 1 minute à 6000 rpm
- 11) Transférer la colonne dans un tube propre et rinçage avec 500µl de tampon AW1
- 12) centrifuger 1 minute à 6000 rpm
- 13) Transférer la colonne dans un tube propre et rinçage avec 500µl de tampon AW2
- 14) Centrifuger 3 minutes à 14000 rpm
- 15) Transférer la colonne dans un tube 1,5 ml identifié et mettre 30 µl du tampon d'élution.
- 16) Important : attendre 15 minutes sur le portoir pour augmenter le rendement de l'extraction
- 17) Centrifuger 1 minute à 8000 rpm
- 18) Transférer la colonne dans un nouveau tube 1,5 ml identifié et mettre 20 µl du tampon d'élution.
- 19) Important : attendre 15 minutes sur le portoir pour augmenter le rendement de l'extraction.

1-2-6-2 PCR diagnostique *Leishmania*

Le diagnostic de *Leishmania* a été réalisé sur chaque lot de femelle de phlébotome en suivant la méthode utilisée par Noyes *et al.* (1998) [57]. Cette méthode est une PCR nichée spécifique des espèces de *Leishmania* qui consiste en une amplification de la région des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Elle est très sensible en raison de sa cible, une région hyper répétée, et de son caractère « nichée ». Elle permet de distinguer clairement les espèces de l'Ancien Monde et en particulier : *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum*. De manière intéressante, elle permet d'amplifier les *Sauroleishmania* et de donner un profil distinct des espèces du genre *Leishmania*. Le protocole utilisé est celui décrit dans Noyes *et al.* (1998) [57]. Les amplifications sont vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose à 1,6%.

2- RÉSULTATS ET DISCUSSION

2-1 Diversité et abondance

La première étape de cette étude (menée du 11 au 21 Août 2014) était de faire un inventaire des phlébotomes, d'étudier leur écologie et leur distribution sur l'ensemble des périmètres reboisés. A l'aide de piégeages adhésifs, de piégeages lumineux et de pulvérisations intradomiciliaires de pyréthrinoïdes, nous avons récolté un total de 618 phlébotomes (336 mâles, 282 femelles).

La faune phlébotomienne collectée était composée de 8 espèces Saïd *et al.*, dans la même zone, en 2014, n'en avaient trouvé que 6.

Le genre *Phlebotomus* est représenté par une seule espèce : *P. duboscqi*, vecteur de la leishmaniose cutanée au Sénégal [15], qui est très faiblement récolté avec seulement 0,2%. Ces résultats sont en accord avec ceux de Saïd *et al* [68] qui avaient trouvé également *P. duboscqi* comme la seule espèce de *Phlebotomus* présente dans la localité mais à une proportion de 0,4%, plus importante que la nôtre (0,2%). Bâ *et al* [7] durant toute l'année 1998 en avaient récolté 0,14% dans la communauté rurale de Mont Rolland pendant que Ranque *et al* [64] en

une année n'avaient obtenu aucun spécimen de *P. duboscqi*. Toutefois dans le foyer de leishmaniose cutanée de Keur Moussa (situé à 27 km de Mont Rolland et à plus de 400 km de notre zone d'étude), *P. duboscqi*, vecteur de *Leishmania major* dans la localité a représenté 28% des captures en 1996. Senghor et al [71] avaient obtenu en 2007 30% de cette espèce dans ce foyer de leishmaniose.

Le genre *Sergentomyia* représente la majorité des captures avec plus de 98%. Il est constitué de 7 espèces : *S. clydei*, *S. schwetzi*, *S. ghesquierei*, *S. adleri*, *S. antennata*, *S. buxtoni*, *S. dubia*. Dans cet échantillon, *S. clydei* domine les captures avec 85,4%. *S. schwetzi*, occupe la deuxième position en abondance avec 12,3% Ces deux espèces forment donc l'essentiel des captures et représentent à elles seules plus de 97% de la faune. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Saïd et al [68] en 2014 mais ces derniers avaient 3 espèces majoritaires: *S. clydei* (72,4%), *S. dubia* (13,3%) *S. schwetzi* (11,6%). Il apparaît que *S. schwetzi* et *S. dubia*, espèces impliquées dans la transmission de la leishmaniose canine au Sénégal [71] sont bien représentés même si la proportion *S. dubia* trouvée par Saïd et al. en 2014 [68] est plus importante que la nôtre. Les échantillonnages effectués en 1995 à Barkédji (distant d'environ 95 km des périmètres reboisés), autour de la mare temporaire de Niakha, ont révélé une forte abondance de ces deux espèces avec, respectivement 25% et 40% du peuplement [72]. *S. clydei* n'y occupe que la troisième place avec 14%. *S. dubia* s'est révélée être l'espèce dominante dans l'ensemble des travaux effectués dans cette zone. Cette espèce est également dominante avec un pourcentage de 44,5% au nord de notre zone d'étude, le long de la vallée du Fleuve Sénégal en 1978 [15]. L'espèce *S. clydei* y est à la 3e position derrière *S. magna* et est suivie de *S. schwetzi*. Une étude effectuée dans la même zone quinze ans après par Niang & Trouillet (1995) [15] confirme la large répartition et l'abondance de *S. dubia* avec près de 50% de l'ensemble des récoltes, suivie cette fois de *S. schwetzi*. *S. clydei* est présente dans ces travaux mais avec une faible densité. Par contre, à l'ouest du pays, sous des conditions

climatiques et biogéographiques très différentes du Ferlo et du bassin du Fleuve Sénégal, les peuplements sont sous la dominance de *S. schwetzi* suivi de *P. duboscqi* et *S. dubia* à Keur Moussa et de *S. dubia* et *S. buxtoni* à Mont-Rolland [21, 53, 71].

Les autres espèces, respectivement *S. ghesquierei*, *S. adleri*, *S. antennata*, *S. buxtoni*, *S. dubia* sont très faiblement représentées avec moins 3% de l'ensemble des récoltes (Tableau III).

Tableau III : Inventaire des phlébotomes capturés à Widou en fonction des espèces

Spécies	Mâle (%)	Femelles (%)	Totaux Nbre (%)
<i>S. clydei</i>	311 (92.5)	217 (77)	528 (85.4)
<i>S. schwetzi</i>	19 (5.7)	57 (20)	76 (12.3)
<i>P. duboscqi</i>	1 (0.3)	0 (0)	1 (0.2)
<i>S. ghesquierei</i>	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. adleri</i>	5 (1.5)	3 (1.1)	8 (1.2)
<i>S. antennata</i>	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. buxtoni</i>	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)
<i>S. dubia</i>	0 (0)	2 (0.7)	2 (0.3)
Totaux	336 (54,4)	282 (45,6)	618 (100)

2-2 Répartition des phlébotomes en fonction du piégeage

Le nombre d'individus et la composition en espèces varie en fonction des pièges. L'essentiel de l'échantillonnage a été obtenu par la méthode des papiers huilés qui est très efficace, car elle permet, du fait de son caractère non sélectif, d'avoir une idée précise de la diversité et de l'abondance spécifique d'une zone donnée. Ainsi sur les 618 phlébotomes, 436 ont été capturés sur papiers huilés, soit 70,6 % représentant un total de 6 espèces sur les 8 capturées. Cela avait déjà été observé par des travaux antérieurs dans la même localité [68], et dans la communauté rurale de Mont-Rolland [71]. En effet, les papiers huilés sont les méthodes de captures les mieux adaptées à l'étude des phlébotomes. Ceci est dû au fait que les abris ne sont pas colonisés avec la même intensité. Les termitières, les trous d'arbres et les terriers de rongeurs, accueillent le plus grand

nombre de phlébotomes. Ces trois types de biotopes apparaissent donc comme les gîtes préférentiels des phlébotomes, l'un ou l'autre étant prépondérant selon la région [15, 16, 23, 72]. Ces cavités naturelles offrent à ces petits diptères un environnement très favorable : humidité élevée, températures aux fluctuations très atténuées, hôtes variés. Autant de conditions qui en font des lieux de prédilection pour leur repos et leur reproduction. De ce fait, les papiers huilés qui sont le plus souvent placés dans ces biotopes fournissent une plus grande diversité spécifique et permettent une bonne étude des phlébotomes. A l'image de l'échantillonnage global, *S. clydei* et *S. schwetzi* sont les espèces les plus abondantes avec cette méthode de capture. Il est à noter également que l'unique spécimen de *P. dubosqi* capturé l'a été avec cette méthode.

Les captures par pièges lumineux et pulvérisations de pyréthrine représentent 29,4% des récoltes avec respectivement 27,8% et 1,6% (Tableau IV). Au niveau des captures par pièges lumineux, 5 espèces ont été répertoriées avec toujours *S. clydei* et *S. schwetzi* comme espèces dominantes.

Quant aux captures par pulvérisations intra domiciliaires seules les 2 espèces dominantes ont été répertoriées.

Ces deux dernières méthodes récoltent généralement moins d'individus que le papier huilé. Ceci est dû au fait qu'elles présentent une certaine limite. En effet le piégeage lumineux ne récolte que les espèces qui présentent un phototactisme positif et la pulvérisation intra domiciliaire ne concerne que les individus restant dans les chambres le matin.

Tableau IV : Répartition des phlébotomes capturés à Widou en fonction des pièges

Pièges Espèces	PH			FRH			CDC			TOTALS	
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	Nbre	
<i>S. clydei</i>	234	154	388	5	4	9	72	59	131	528	
<i>S. schwetzi</i>	17	20	37	0	1	1	2	36	38	76	
<i>P. dubosqi</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
<i>S. ghesquierei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
<i>S. adleri</i>	5	3	8	0	0	0	0	0	0	8	
<i>S. antennata</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
<i>S. buxtoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
<i>S. dubia</i>	0	1	1	0	0	0	0	1	1	2	
TOTALS	257	179	436	5	5	10	74	97	172	618	

2- 3 Etude parasitologique moléculaire

Sur les 282 femelles récoltées lors de cette étude, les abdomens de 263 individus appartenant à toutes les espèces ont fait l'objet d'extraction d'ADN. Ces abdomens ont été préalablement divisés en lots de taille connue. Chaque lot est constitué par des individus d'une même espèce. Les individus d'un même lot sont issus de la même méthode de capture et du même lieu de capture. A l'exception d'un premier lot de 9 individus qui été constitué en considérant uniquement le lieu de capture, la taille maximale des lots était fixée à 5. De ce fait un nombre d'individus inférieurs à 5 et provenant de la même méthode et du même lieu de capture constitue 1 lot. Ainsi 68 lots ont été constitués dont 14 lots à 1 individu, 6 lots à 2 individus, 3 lots à 3 individus, 1 lot à 4 individus, 43 lots à 5 individus et 1 lot à 9 individus.

Des PCR diagnostiques spécifiques ont été réalisées sur chaque lot pour détecter la présence de leishmanies selon la technique publiée par Noyes *et al.* (1998) [57]. Cette PCR a été choisie car elle permet de clairement distinguer *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* et *Sauroleishmania*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats obtenus pour les PCR diagnostiques. Le tableau présente pour chaque espèce : le nombre de femelles examinées, le nombre de lots et leur taille, le nombre et les lieux de capture des lots positifs à *L. infantum*.

Spécies	Nbre d'individus	Taille des lots	Nbre de lots	Lots positifs	Lieux de capture lot positif	Prévalence	Etat des femelles du lot positif
<i>P. dubosqi</i>	0	0	0	0		-	-
<i>S. clydei</i>	9	9	1	0		-	-
	175	5	35	1	Terrier	4,16%	2 gorgées
	4	4	1	0		-	-
	3	3	1	0		-	-
	8	2	4	1	Chambre	-	2 gorgées
	6	1	6	0		-	-
<i>S. schwetzi</i>	40	5	8	0		-	-
	3	3	1	0		6,7%	-
	4	2	2	0		-	-
	4	1	4	1	Chambre	-	-
<i>S. ghesquierei</i>	1	1	1	0		-	-
<i>S. adleri</i>	3	3	1	0		-	-
<i>S. antennata</i>	1	1	1	0		-	-
<i>S. buxtoni</i>	1	1	1	0		-	-
<i>S. dubia</i>	1	1	0	0		-	-
Totaux	263	-	68	3		4,4%	-

Cette étude nous a permis de trouver pour la première fois la présence de *Leishmania infantum* chez des phlébotomes appartenant au genre *Sergentomyia* dans le Ferlo. Au total, l'ADN de *L. infantum* a été détecté dans 3 lots (4,4%) appartenant à deux espèces du genre *Sergentomyia* : *S. clydei* et *S. schwetzi*. En effet, 2 lots (4,16%) de *S. clydei*, sur 48 testés et 1 lot (6,7%) de *S. schwetzi* sur 15 testés ont été trouvés infectés par *L. infantum*. Ces données sont en accord avec Aransay *et al.* (2000); Azizi *et al.* (2006); Kishor *et al.* (2008) ; Senghor *et al* (2011) [4, 6, 39, 71] qui avaient respectivement des taux de 3,9% ; 6,7% ; 8,25% et 6,3% de femelles testées positives à l'ADN de leishmanies par PCR diagnostique. Ce taux d'infection obtenu est également conforme à la moyenne observée chez les espèces vectrices [37, 28]. En effet, par dissection, même chez

les principaux vecteurs, le taux d'infection par des leishmanies peut être très faible [31, 33]. Dans certaines études, il était nécessaire d'examiner près de 1000 femelles de phlébotomes pour trouver un spécimen infecté [37, 45, 65, 60].

Les 2 lots positifs de *S. clydei* sont constitués de 5 et 2 individus. Dans le lot de 5 individus, 2 spécimens étaient gorgés. Pour le deuxième lot de *S. clydei*, tous les 2 spécimens qui le composent étaient gorgés. Plusieurs études expérimentales réalisées sur le développement des leishmanies ont montré que la persistance des parasites, chez les vecteurs inappropriés, était liée à la présence du sang dans l'intestin du phlébotome et leur totale élimination est fortement associée à l'excrétion du repas de sang digéré [30, 36, 67]. Par exemple, il a été observé que le taux d'infection de *S. schwetzi* par *L. major* est élevé comme chez son vecteur principal *P. duboscqi* pendant les trois premiers jours qui suivent le repas de sang infecté. Après cette période, les parasites étaient complètement éliminés lors de l'excrétion [43]. Même chez les vrais vecteurs, le taux de réussite des parasites et donc de leur échappement à l'élimination lors de la digestion et de l'excrétion n'est pas de 100%, mais que les parasites peuvent parfois être éliminés avant d'atteindre le stade infectant. Par exemple, une différence de taux d'infection à *L. infantum* a été détectée chez son principal vecteur, *P. perniciosus*, respectivement 58,7% chez les gorgées et 27,6% chez les femelles à jeun [66]. Donc des femelles gorgées, trouvées infectées ne permettent pas de dire que l'espèce en question peut transmettre le parasite à son hôte, mais elles peuvent donner des indices importants pour la recherche de vecteur potentiel [50].

Concernant le lot positif de *S. schwetzi*, il est constitué d'un seul spécimen qui n'est ni gorgé ni gravide. Comme souligné précédemment, l'infection naturelle persistant au-delà de la digestion du repas sanguin, de la défécation et de la ponte est un élément supplémentaire pour l'incrimination du vecteur [6, 37]. De telles infections montrent que les parasites sont capables de résister aux principales barrières existant chez le phlébotome vecteur et donc de finaliser

leur développement jusqu'au stade infectant. En effet, plusieurs études expérimentales réalisées sur le développement des leishmanies ont montré que la persistance des parasites, chez les vecteurs inappropriés, était liée à la présence du sang dans l'intestin du phlébotome et leur totale élimination fortement associée à l'excration du repas de sang digéré [30, 36, 67]. Il faut noter que la digestion du repas de sang chez les phlébotomes varie entre 4 jours et plus d'une semaine selon les espèces et selon les conditions climatiques ; plus il fait chaud plus la durée diminue [1, 55]. Le développement des leishmanies chez leur vecteur est très complexe et moins bien connu [73], mais des travaux expérimentaux montrent que le passage des leishmanies du stade amastigote au stade promastigote métacyclique infectant varie entre 5 et 7 jours après la prise du repas sanguin [9, 29, 35]. Toutes ces informations suggèrent qu'une femelle de phlébotome, ni gorgée ni gravide trouvée infestée par des leishmanies, présente une forte probabilité de porter des promastigotes à un stade très avancé proche de la forme infectante.

Le reste de l'échantillon testé par PCR diagnostique à la recherche de la présence d'ADN de *Leismania* était composé d'un lot de chacune des espèces suivantes: *S. ghesquierei*, *S. adleri*, *S. antennata*, *S. buxtoni*, *S. dubia*. Aucune de ces espèces n'a été trouvée infestée par *L. infantum*.

S'agissant des lieux de capture des lots positifs à *L. infantum*, deux ont été capturés au niveau intradomiciliaire dans des chambres par piégeage lumineux. Parmi eux, le lot de 2 *S. clydei* gorgés, et le lot d'un spécimen de *S. schwetzi* ni gorgé, ni gravide. Le troisième lot, constitué de 5 *S. clydei* dont 2 gorgées, a été capturé par papier huilé dans les périmètres à l'entrée des terriers de rongeurs.

Les spécimens des 2 lots trouvés à l'intérieur des habitations, bien qu'ils puissent s'agir d'individus exophages et endophiles se sont probablement gorgés sur homme hébergeant le parasite. Ceci est d'autant plus probable que les travaux de Senghor et al. [71] dans la communauté rurale de Mont-Rolland, ont

montré que ces 2 espèces se gorgeaient régulièrement sur homme. Cette situation nous amène à penser qu'à l'image du foyer de Mont-Rolland où 30% des personnes ont été positives à *L. infantum* [25, 26], le parasite est également en train de circuler chez les hommes dans le Ferlo. Toutes ces données montrent que, même s'il est faible étant donnée l'épidémiologie de *L. infantum*, il existe un réel risque clinique dans le Ferlo. Aucun cas de leishmanioses viscérales n'a été signalé dans cette région comme dans le reste du Sénégal. Cependant, nos résultats nous incitent à penser que la maladie pourrait exister même si cette dernière est jusqu'à présent passée inaperçue sans doute confondue avec d'autres affections fébriles. En effet, la leishmaniose viscérale n'a pas de signes cliniques spécifiques et peut être confondue avec d'autres maladies comme les coccidioidomycoses extrapulmonaires ou encore les histoplasmoses [3]. De plus, le personnel sanitaire du pays n'est pas formé pour diagnostiquer cette maladie [25, 26]. Sa présence au Sénégal est d'autant plus probable qu'en Gambie, pays enclavé dans le territoire Sénégalais, deux cas de leishmaniose viscérale ont été rapportés [13]. Il faut noter cependant que l'agent pathogène n'a pas été identifié.

Si nous ne sommes pas en mesure, à ce jour, de dire si ces parasites peuvent provoquer la forme viscérale de la maladie chez l'homme au Sénégal, le cas de leishmaniose cutanée due à *L. infantum* détecté chez un enfant de 10 ans à Mont-Rolland montre que ces parasites peuvent être pathogènes pour l'homme [25, 26].

Conclusion

Les leishmanioses sont des maladies tropicales endémiques dans plusieurs régions du globe avec de graves conséquences socioéconomiques et sanitaires. Elles font partie du groupe des Maladies Tropicales Négligées (MTN).

Au Sénégal, les leishmanioses ont été étudiées dans l’Ouest du pays, particulièrement dans la région de Thiès (70 Km de la capitale). Cependant, elles sont très répandues à travers le Sénégal où différents foyers restent à être élucidés [22]. La région du Ferlo qui, depuis environ une décennie, est au cœur d’un important programme panafricain de développement et de reforestation appelée Grande Muraille Verte a connu d’énormes modifications environnementales pouvant expliquer l’émergence ou la réémergence des leishmanioses.

Les travaux que nous avons effectués dans cette zone ont permis, malgré leur courte durée, de collecter un ensemble d’informations sur l’écologie du peuplement phlébotomien et leur implication parasitologique.

La faune phlébotomienne compte 8 espèces. Elle est dominée par *S. clydei*. La deuxième espèce en abondance sur l’ensemble des captures est *S. schwetzi* qui constitue avec *S. dubia* les vecteurs de *L. infantum* au Sénégal. *P. duboscqi*, vecteur de la leishmaniose cutanée au Sénégal, a été représenté par un seul spécimen.

L’étude parasitologique moléculaire nous a permis de trouver pour la première fois la présence de *Leishmania infantum* chez des phlébotomes appartenant au genre *Sergentomyia* dans le Ferlo. Au total, l’ADN de *L. infantum* a été détecté dans 3 lots (4,4%) appartenant à deux espèces dont 2 lots de *S. clydei* et 1 lot de *S. schwetzi*.

Cette présence de *L. infantum* chez *S. clydei* et surtout chez son vecteur confirmé *S. schwetzi* montre que le parasite est en circulation dans cette région. Ceci constitue un risque réel sur la santé humaine et animale. Dans ce contexte, une attention particulière doit être accordée aux patients atteints du VIH car les leishmanies sont connues pour être des parasites opportunistes [19]. Des cas de

co-infections *Leishmania*/VIH sont déjà signalées dans 33 pays dans le monde, où elles présentent parfois de graves problèmes de santé publique [49, 62, 70].

Au Sénégal, Bien que la prévalence du VIH soit relativement faible (835 pour 100 000 habitants), des observations récentes indiquent une augmentation de la population séropositive au VIH, principalement chez les jeunes adultes se déplaçant des zones rurales vers les centres urbains à la recherche de travail. Le risque d'augmentation du nombre de cas n'est donc pas nul en raison des déplacements des populations et donc de la possibilité d'exposition de plus en plus fréquente de personnes VIH au parasite *L. infantum*.

Sous ce rapport nous suggérons des séances d'échantillonnage plus régulières pendant encore quelques années, en les élargissant aux autres périmètres et villages environnants. Il faudra également faire des recherches parasitaires aussi bien chez les phlébotomes que chez les populations humaines et animales (les rongeurs et les chiens en particulier) pour détecter d'éventuelle présence d'affections leishmaniennes dans le cadre d'une surveillance épidémiologique permanante.

Références bibliographiques

- 1- **Abonnenc E. 1972.** Les Phlébotomes de la région éthiopienne. (Diptera, Psychodidae. *Mémoire ORSTOM* **55** 289 pp.
- 2-**Alexander B, Usma MC, Cadena H, Quesada BL, Solarte Y, Roa W et al. 1995.** Phlebotomine sandflies associated with a focus of cutaneous leishmaniasis in Valle del Cauca, Colombia. *Medical and Veterinary Entomology* **9**: 273-8.
- 3-**Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP et al. 2008.** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology review* **21**: 334-59.
- 4-**Aransay AM, Scoulica E and Tselentis Y. 2000.** Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplasmic DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1933-8.
- 5-**Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie.** Cours Leishmaniose 2014. Disponible à l'URL <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/cours.pdf>
- 6-**Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Yaghoobi Ershadi MR et al. 2006.** *Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* **100**: 63-8.
- 7-**Ba Y, Trouillet J, Thonnon J and Fontenille D. 1998.** Phlebotomines of Senegal (Diptera: Psychodidae): population and population dynamics of the Mont-Rolland region. *Parasite* **5**: 143-50.
- 8-**Bañuls AL, Hide M. and Prugnolle F. 2007.** *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* **64**:109.
- 9-**Bates PA. 2007.** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* **37**: 1097-106.

- 10-**Boakye DA, Nzelu1 CO, Adadie-Gomez DA, Desewu K, Odoom SC, Oyofo BA et al.** 2011. First detection and identification of *Leishmania* parasite in *Sergentomyia* species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in an outbreak area in the Ho District, Volta Region of Ghana by polymerase chain reaction assay. *International Symposium on Phlebotomine Sandflies*.
- 11-**Cameron MM, Pessoa FA, Vasconcelos AW and Ward RD.** 1995. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceara State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* **9**: 263-72.
- 12-**Charrel RN, Moureau G, Temmam S, Izri A, Marty P, Parola P et al.** 2009. Massilia virus, a novel *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**: 519-30.
- 13-**Conteh S and Desjeux P.** 1983. Leishmaniasis in the Gambia. I. A case of cutaneous leishmaniasis and a case of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**: 298-302.
- 14-**Croan DG, Morrison DA and Ellis JT.** 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* **89**: 149-59.
- 15-**Dedet JP, Desjeux P and derouin F.** 1980 a. Ecologie d'un foyer de leishmaniose cutanée dans la région de Thiès (Sénégal, Afrique de l'Ouest). 4. Infestation spontanée et biologie de *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906. *Bull. Soc. Path. exot.*, **73**: 266-276.
- 16-**Dedet JP, Derouin F and Cornet M.** 1978. Infestation spontanée de *Phlebotomus duboscqi* par des promastigotes de *Leishmania* au Sénégal. *Comptes-rendus Séances Académie des Sciences, Paris, Série D* **286**: 301-30.
- 17-**Dedet JP, Safjanova VM, Desjeux P, Emelyanova LP, Schnur LF and Chance ML.** 1982. Ecologie d'un foyer de leishmaniose cutanée dans la région de Thiès (Sénégal, Afrique de L'Ouest). 6. Caractérisation et typage des souches de *Leishmania* isolées. *Bull. Soc. Path. exot.* **75**: 155-168.

- 18-**Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE and Peyrefitte C.** 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* **15**: 19507.
- 19-**Desjeux P.** 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **95**: 239-43.
- 20-**Desjeux P.** 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **27**: 305-18.
- 21-**Desjeux P and Dedet JP.** 1982. Ecology of a focus of cutaneous leishmaniasis in the Thies region (Senegal, West Africa). 7. Epidemiologic synthesis after 5 years observation and a working hypothesis. *Bull Soc Pathol Exot.* **75**: 620-30.
- 22-**Desjeux P.** 1991. Information sur l'épidémiologie des leishmanioses et la lutte contre ces maladies par pays ou territoire. *WHO/LEISH* **30**: 48 pp.
- 23-**Desjeux P, Dérouin F, Waroquy L and Dedet JP.** 1981. - Écologie d'un foyer de leishmaniose cutanée au Sénégal. Structure et hypothèse de fonctionnement. *Afrique Médicale* **20**: 427-432.
- 24-**Dia A, Robin D.** 2010 Le projet majeur africain de la Grande Muraille Verte, Concepts et mise en œuvre, IRD Éditions, 2010
- 25-**Faye B, Bañuls AL, Bucheton B, Dione MM., Bassanganam O, Hide M, et al.** 2010. Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? *Microbes Infect* **12**: 1219-25.
- 26-**Faye B, Bucheton B, Bañuls AL, Senghor MW, Niang AA, Diedhiou S et al.** 2011. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: analysis of risk factors involved in transmission to humans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **105**: 333-40.
- 27-**François F, Zongli L, Eric ID, Dahai L, Yeehwa W, Bruno C et al.** 2011. Structure of the Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein Suggests a Mechanism for its Assembly into Ribonucleoprotein Complexes. *PLoS Pathog* **7**(5): e1002030.
- 28-**Gradoni L.** 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the *Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain*, pp: 7-14.

- 29-**Gramiccia M and Gradoni L.** 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* **35**: 1169-80.
- 30-**Heyneman D.** 1963. **Leishmaniasis in the Soudan Republic.** 12. Comparison of experimental *Leishmania donovani* infection in *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) with natural infections found in man-baited *P. orientalis* captured in a kala-azar endemic region of Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **12**, 725-740.
- 31-**Izri MA, Belazzoug S, Boudjebla Y, Dereure J, Pratlong S, Delalbre-Belmonte A. and Rioux JA.** 1990. *Leishmania infantum* MON-1 isolated from *Phlebotomus perniciosus*, in Kabylie (Algeria). *Ann Parasitol Hum Comp* **65**: 151-2.
- 32-**Izri MA, Belazzoug S, Pratlong F and Rioux JA.** 1992. Isolation of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* in Biskra (Algeria). The end of an ecoepidemiological saga. *Ann Parasitol Hum Comp* **67**: 31-2.
- 33-**Izri MA, Marty P, Rahal A, Lelievre A, Ozon C, Baldelli G et al.** 1992. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturally infected by promastigotes in the region of Nice (France). *Bull Soc Pathol Exot* **85**: 385-7.
- 34-**Kamhawi S.** 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* **2**: 1765-73.
- 35-**Kamhawi S.** 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* **22**: 439-45.
- 36-**Killick-Kendrick R.** 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot* **78**: 747-55.
- 37-**Killick-Kendrick R.** 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **4**: 1-24.
- 38-**Killick-Kendrick R. and Killick-Kendrick M.** 1987. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. *Medical and Veterinary Entomology* **1**: 297-302.

- 39-**Kishor P, Shishir P, Hiroji KM, N S, Arun KM, Basu DP et al.** 2008. Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal. *Parasitol* **103**: 293-297.
- 40-**Kumar V and Kishore K.** 1991. A preliminary observation on larval diapause of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae). *J Commun Dis* **23**: 165-6.
- 41-**Lainson R and Killick-Kendrick R.** 1997. Percy Cyril Claude Garnham, C.M.G. 15 January 1901-25 December 1994. *Biogr Mem Fellows R Soc* **43**: 171-92.
- 42-**Lane RP.** 1993. Sandflies (Phlebotominae). In: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (Eds.), Medical Insects and Arachnids. *Chapman and Hall, London*, pp: 78-119.
- 43-**Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure J I et al.** 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* **43**: 31-43.
- 44-**Léger and Depaquit.** 2001. Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Française des Laboratoires* **338**: 41- 48.
- 45-**Leng YJ and Lewis DJ.** 1987. The subgenus *Euphlebotomus* (Diptera: Psychodidae) in China, with description of a new species, *Phlebotomus yunshengensis*. *Ann Trop Med Parasitol* **81**: 305-9.
- 46-**Lewis DJ, Young DG and Ward RD.** 1987. Transmission and vectors. the leishmaniasis. *In Biology and Medicine*. **1**: 235-262.
- 47-**Lewis DJ, Young DG, Fairchild GB and Minter DM.** 1977. Proposal for stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* **2**: 319-332
- 48-**McKean PG, Denny PW, Knuepfer E, Keen JK and Smith DF.** 2001. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol* **3**: 511-23.
- 49-**Miceli MD and Mansueto S.** 1987. Canine leishmaniasis in western Sicily. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **81**: 175.

- 50-**Molyneux DH and Ashford RW.** 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor & Francis, London.
- 51-**Mukherjee S, Hassan MQ GA, Ghosh KN BA. and SA.** 1997. *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* **57**: 423-5.
- 52-**Mutinga MJ, Massamba NN BM, Kamau CC, Amimo FA, Onyido AE, Omogo DM et al.** 1994. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: *Sergentomyia garnhami* (Diptera Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui District: a new focus of the disease. *East Afr Med J.* **71**: 424-8.
- 53-**Niang AA, Trouillet J and Faye O.** 1998. Surveillance inter épidémique du foyer leishmanien de Keur Moussa (Thiès, Sénégal). *Parasite.* **5**: 51-59.
- 54-**Niang AA and Trouillet J.** 1993. Phlébotomes du Sénégal. La faune du campus universitaire de Dakar (Diptera, Psychodidae). *Bulletin de la Société Française de Parasitologie.* **11**: 151-157.
- 55-**Niang, AA.** (1992).- *Étude bioécologique de Phlebotomus duboscqi Neveu-Lemaire, 1906 (Diptera-Psychodidae), vecteur de la leishmaniose cutanée humaine, au Sénégal.* Doct. 3è cycle : UCAD, Dakar. n°008 : 148 pp.
- 56-**Niang AA and Trouillet J.** 1995. Phlébotomes du Sénégal (Diptera, Psychodidae). Faune de la vallée du fleuve Sénégal. *Bulletin de l'Institut Fondamental de l'Afrique Noire, Cheikh Anta Diop Dakar, serie, A,* **48**: 67-78
- 57-**Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW and Smith D.** 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clinical Microbiology Review* **36**: 2877-81.
- 58-**Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G and Dedet JP.** 2002. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique is the most divergent member of the genus *Leishmania* sp. *Parasitology* **12**: 17-24.

59-Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Leishmaniose. Aide-mémoire N°375. Février 2015. Disponible à l'URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/>

- 60-Oshaghi MA, Rasolian M, Shirzadi MR, Mohtarami F and Doosti S. 2010. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban Cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. *Exp Parasitol* **126**: 445-50.
- 61-Pinto MC, Campbell-Lendrum DH, Lozovei AL, Teodoro U and Davies CR. 2001. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and Veterinary Entomology* **15**: 132-9.
- 62-Quilici M, Dunan S, Dumon H, Franck J, Gambarelli F, Toga I et al. 1987. Infantile Mediterranean kala-azar in the southeast of France. Current considerations. *Ann Pediatr Paris* **34**: 369-73.
- 63-Ranque P and Bussières J. 1971. La leishmaniose canine au Sénégal. *Médecine d'Afrique Noire* **18**: 761-762.
- 64-Ranque P, Bussieras J, Chevalier JL, Quilici M and Mattei X. 1970. Present importance of dog leishmaniasis in Senegal. Value of immunologic diagnosis. Possible incidence in human pathology. *Bull Acad Nat Med* **154**: 510-2.
- 65-Rocha LS, Falqueto A, Dos Santos CB, Ferreira AL, da Graça GC., Grimaldi GJ and Cupolillo E. 2010. Survey of natural infection by *Leishmania* in sandfly species collected in southeastern Brazil. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (Epub ahead of print).
- 66-Rossi E, Bongiorno G, Ciolfi E, Di Muccio T, Scalzone A, Gramiccia M et al. 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop* **105**: 158-65.
- 67-Sacks D and Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**: 453-83.

- 68- **Said OSA, Senghor MW & Niang AA.** Phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Sénégal. Peuplement phlébotomien dans les périmètres reboisés de Tessékéré (Ferlo, Sénégal). *Bulletin IFAN Ch. A. Diop, Dakar* sér. A, 2014, 53 (2) : 67 -82
- 69-**Schlein Y and Warburg A.** 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Med Entomol* 23: 11-5.
- 70-**Seimenis A, Morelli D and Mantovani A.** 2006. Zoonoses in the Mediterranean region. *Ann Ist Super Sanita* 42: 437-45.
- 71-**Senghor MW, Faye MN, Faye B, Diarra K, Elguero E, Gaye O et al.** 2011. Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès region, Senegal): area of transmission of canine leishmaniasis. *PLoS One* 6: e14773.
- 72-**Trouillet J, Bâ Y, Traoré-Lamizana M, Zeller H-G and Fontenille D.** 1995. Phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Sénégal. Peuplement du Ferlo. Isolement d'arbovirus. *Parasite*, 2: 289-296.
- 73-**Walters LL.** 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Eukaryot Microbiol* 40: 196-206.
- 74-**WHO, W.H.O.-.** (2002)
http://www.who.int/water_sanitation_health/Documents/PEEM2/english/peem2ann3.htm.