

ROYAUME DU MAROC

INSTITUT AGRONOMIQUE
ET VETERINAIRE HASSAN II



معهد الحسن الثاني
للزراعة و البيطرة

THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN
PARASITOLOGIE « Parazoon »

Etude rétrospective et moléculaire de la leishmaniose cutanée dans la province d'Essaouira.

Présentée et soutenue publiquement par :
Mlle HELHALI Merieme

Devant le jury constitué de :

Pr. KHALLAAYOUNE Khalid	(IAV Hassan II, Rabat)	Président
Dr. SEBTI Faiza	(INH, Rabat)	Rapporteur
Dr. FELLAH Hajiba	(INH, Rabat)	Rapporteur
Pr. SAHIBI Hamid	(IAV Hassan II, Rabat)	Examineur

31 Octobre 2013

Adresse : Madinat Al Irfane, B.P. 6202. Rabat – Maroc
Tél : (00 212) 0537 77 17 58/59
Fax : (00 212) 0537 77 58 45
Site web : <http://www.iav.ac.ma>

العنوان : ص. ب 6202 الرباط المعاهد الرباط – المغرب
الهاتف : (00 212) 0537 77 17 58/59
الفاكس : (00 212) 0537 77 58 45
موقع الإنترنت : <http://www.iav.ac.ma>

Le Master Parasitologie et Zoonoses Parasitaires en Milieu Tempéré **« PARAZOON »**

Le master PARAZOON est organisé par le Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires du Département de Pathologie et Santé Public Vétérinaire de l'Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II (LPMP/IAV). Cette formation a été réalisée sous la direction du Professeur Abdelkebir RHALEM (Coordinateur) et du Professeur Hamid SAHIBI (Comité de pilotage) avec la participation d'un panel de professeurs de différentes universités et institutions nationales et internationales.

Le programme de ce Master a pour principal objectif la formation de chercheurs et de cadres de haut niveau spécialisés dans le domaine de la parasitologie afin de contribuer à la prévention et au contrôle des maladies animales au Maroc et dans les pays à climat tempéré, au développement d'un élevage durable et sain et, par conséquent, à la contribution à la sécurité alimentaire pour l'homme. Cette formation pratique et théorique permet aux futurs lauréats d'acquérir les outils pour une analyse rationnelle des situations épidémiologiques et de gérer des programmes de recherche et de développement, avec un accent plus particulier sur les programmes de lutte contre les maladies animales et les zoonoses parasitaires.

Cette formation multidisciplinaire est assurée en deux années consécutives. Ce Master va permettre de :

- ❖ Fournir la connaissance et les outils nécessaires aux candidats pour être capable de gérer des données et de présenter les résultats d'activités de recherche ;
- ❖ Renforcer la capacité des participants dans les domaines de la planification, de la gestion et de l'évaluation de programmes d'élevage participatifs et durables ou de projets de recherche vétérinaire ;
- ❖ Fournir les outils nécessaires pour la compréhension des problèmes de sécurité alimentaire, de globalisation et de commercialisation, dans le contexte d'un développement durable de l'élevage ;
- ❖ Donner aux participants les outils nécessaires pour analyser des données expérimentales et épidémiologiques, interpréter les résultats repris dans la littérature et organiser des études ;
- ❖ Augmenter les compétences dans l'organisation et l'interprétation d'enquêtes ;
- ❖ Permettre aux étudiants de réaliser une analyse des risques détaillée en épidémiologie vétérinaire ;
- ❖ Familiariser les participants avec l'utilisation des systèmes d'information géographique (SIG) et avec la technologie de l'information spatiale, dans le but de renforcer leurs capacités à comprendre les processus épidémiologiques et élaborer des systèmes de support décisionnel ;
- ❖ Permettre aux participants d'appliquer les connaissances théoriques acquises en épidémiologie, en diagnostic et en contrôle de maladie sur un exemple épidémiologique pratique.

- ❖ Familiariser les étudiants avec les techniques de diagnostic sérologiques et moléculaires et tout en respectant les principes de bonne pratique en laboratoire ;
- ❖ Donner aux participants de bonnes connaissances de base et les compétences techniques nécessaires pour améliorer le contrôle intégré des maladies du bétail transmises par vecteurs.
- ❖ Familiariser les participants avec plusieurs maladies infectieuses afin de leur permettre de collaborer de façon active et efficace dans un programme de contrôle ;
- ❖ Permettre aux participants d'appliquer les connaissances théoriques acquises dans les domaines de l'épidémiologie, du diagnostic et du contrôle des maladies grâce à des études épidémiologiques sur des exemples concrets, de l'épidémiosurveillance, et de l'analyse des risques.

Adresse: INH, 27, Avenue Ibn Batouta, B.P. 769 - Agdal, Rabat.

Tel: (00212) 0537-77-19-02/0537-77-19-65/0537-77-21-62.

Fax: (00212) 0537-77-20-67.

Site web: santé.gov.ma/Department/INH/index.htm

Présentation de l'INH et du service de parasitologie :

L'Institut National d'Hygiène du Maroc est sous la tutelle du Ministère de la Santé. Il constitue l'organisme de référence en matière de biologie médicale et environnement. Cette instance étatique œuvre depuis 1930 à garantir une prise en charge efficace des problèmes d'hygiène et d'épidémiologie au Maroc. Ses 75 ans d'existence sont dédiés à la recherche et à la mise en place d'outils garantissant le développement des techniques de biologie médicale et environnementale servant de base pour le diagnostic médical, la surveillance épidémiologique, le contrôle de la qualité d'hygiène communautaire et de la sécurité sanitaire au Maroc. L'INH a ainsi contribué à l'éradication de la Peste, de la Variole et du Typhus et au contrôle des maladies entériques, de la Tuberculose et du Paludisme.

Principales attributions

- *L'appui et le soutien scientifique et technique aux programmes sanitaires du ministère de la santé.
- *Proposition des normes en matière de biologie sanitaire.
- *Développement et standardisation des techniques de références à implanter dans les laboratoires de santé publique.
- *Développement de la recherche dans les domaines de la biologie sanitaire.
- *Formation et recyclage du personnel médical, paramédical et scientifique.
- *Contrôle externe de la qualité des laboratoires de santé publique.
- *Promotion et développement de la coopération nationale et internationale (COPEP, OMS, Coopération française, Union européenne, REMER, Universités américaines...).
- *Participation à la sécurité sanitaire.
- *Diffusion de l'information en matière de biologie sanitaire et de vigilance en la matière.
- *Expertise médico-légale et environnementale.
- *Prestations en biologie médicale et environnementale.
- *Missions de contrôle sur le terrain dans le cadre de la surveillance épidémiologique.
- *Organisation de conférences, de journées d'information, de séminaire et d'atelier.
- *Diffusion de l'information en élaborant des supports didactiques: manuels, fiches techniques, Cédéroms, diaporamas, brochures.

- ◆ Réponse téléphonique pour les conseils et la conduite à tenir lors des intoxications ou lors d'un voyage à l'étranger.
- ◆ Expertise relative à la validation du fonctionnement des équipements de laboratoire, au contrôle de qualité des réactifs et des produits de laboratoire à usage diagnostique.

Présentation du laboratoire de parasitologie

Les unités de département sont :

-Laboratoire d'Immunologie Parasitaire -Laboratoire de Parasitologie Générale -Laboratoire de Mycologie -Laboratoire de Référence du Paludisme -Laboratoire de Référence des Leishmanioses -Laboratoire de Référence de la Bilharziose -Laboratoire d'Entomologie Médicale -Centre de Conseils aux Voyageurs

Les principales activités du laboratoire de parasitologie sont :

- *Diagnostic des maladies parasitaires.
- *Recherche des parasites en hygiène alimentaire et dans l'environnement.
- *Activités de support technique des programmes nationaux du Ministère de la Santé.
- *Contrôle de qualité interne et externe.
- *Activités de recherche et enquêtes sur le terrain.
- *Normalisation des procédures en biologie médicale.
- *Élaboration de documents pour la diffusion de l'information (brochures de sensibilisation, documents, diapositives, CDROM...).
- *Supervision des laboratoires provinciaux.
- *Formation, encadrement et recyclage du personnel médical et paramédical (médecins et pharmaciens stagiaires, licenciés de la faculté des sciences, infirmiers, techniciens de laboratoire et d'hygiène du milieu).
- *Organisation des séminaires.
- *Participation aux campagnes de masse pour le diagnostic et le traitement de certaines affections parasitaires.
- *Conseils aux voyageurs.
- *Prise en charge diagnostique et thérapeutique de certaines maladies parasitaires (parasitoses intestinales, hydatidose, paludisme, leishmanioses)

DEDICACES

 *Je dédie ce modeste travail ...* 

À la plus merveilleuse mère

Que j'adore à en mourir qui m'a tout donné depuis mon enfance.

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer
le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.*

*Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que
je puisse te combler à mon tour.*

Au plus adorable et gentil père au monde

Qui m'a tout donné sans rien recevoir en parallèle.

*Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne
sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.*

Je te remercie infiniment pour tes sacrifices.

*Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur,
quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

À mes frères et sœurs

En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration.

Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

À mes chères nièces et mes chers neveux

*Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous,
Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.*

*Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à
votre tour vos vœux les plus chers.*

À mes tantes et oncle

*En témoignage de mon amour, de mon profond respect et de ma
reconnaissance.*

À mes cousins et cousines

En témoignage de mon affection et mon respect

À ma très chère amie Aouatif

*Merci pour ton amour, ton amitié. Tu étais toujours là pour me
soutenir, m'aider et m'écouter.*

*Que Dieu te protège et te procure joie et bonheur et que notre amitié
reste à jamais.*

À tous mes professeurs

Avec tous mes respects et mon éternelle reconnaissance.

À toute la promotion du master PARAZOON

Remerciements

*A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE
THESE*

*MONSIEUR LE PROFESSEUR
Khalid KHALLAAYOUNE*

*Professeur de Parasitologie à l'Institut Agronomique
et Vétérinaire Hassan II*

*Vous nous avez honoré d'accepter avec grande
Sympathie de siéger à la présidence de notre jury de thèse.*

*Nous vous exprimons notre profonde admiration pour
la gentillesse, la sympathie et la modestie émanant de
votre personne.*

Veillez trouver ici l'expression de notre estime et notre considération.

*Puisse Dieu le tout puissant vous accorder bonne santé, bonheur et
prospérité.*

*A notre rapporteur de thèse
Madame SEBTI Faiza*

*Responsable de l'unité de Biologie
Moléculaire du Laboratoire National de
Référence des Leishmanioses et Responsable de
qualité du Département de Parasitologie*

Qui m'a soutenu tout au long de ce travail

*Je la remercie particulièrement pour sa confiance, sa générosité, sa
gentillesse et pour la qualité des relations humaines que nous
entretiens.*

*Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent
toute admiration.*

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde
gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

*A notre rapporteur de thèse
Madame FELLAH Hajiba*

*Responsable du laboratoire de parasitologie à
l'Institut National d'Hygiène*

*Pour m'avoir encadré, tout en me faisant bénéficiaire de votre savoir et
votre expérience, pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre
confiance quant à cette thèse.*

*Je vous remercie pour l'appui que vous m'avez apporté durant
l'élaboration de ce travail.*

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

*A notre maître et juge de thèse
Monsieur le professeur Hamid SAHIBI*

*Professeur de Parasitologie à l'Institut Agronomique
et Vétérinaire Hassan II*

*Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de
siéger parmi notre jury de thèse.*

*Veillez accepter ce travail maître, en gage de notre grand respect et
notre profonde reconnaissance.*

A Monsieur RHAJAOUI Mohamed

Directeur de l'Institut National d'Hygiène

Qui m'a autorisé à effectuer mon stage au sein de cet établissement.

A toute l'équipe du laboratoire de parasitologie de l'INH

Pour leur aimable collaboration et leur encouragement.

A la doctorante Asmae Hmamouche

Pour sa collaboration durant l'élaboration de ce travail.

A Monsieur l'animateur du SIAAP de la province d'Essaouira.

A toute l'équipe du SIAAP de la province d'Essaouira.

*A Monsieur KHALOIR Abderrazak, Technicien d'hygiène au
centre de santé Had Draa.*

A Monsieur BENAJIBA Mohamed, Directeur du CNTS, et

Madame HAJJOUT Khadija, Directrice du CRTS du Rabat

Qui m'ont autorisé à poursuivre mes études.

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration
de ce travail.*

Résumé

La leishmaniose cutanée est connue au Maroc depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Elle constitue un véritable problème de santé publique. C'est une maladie à déclaration obligatoire. La situation est devenue préoccupante dès les années 1970. La province d'Essaouira est située à côté d'un foyer actif, la province de Chichaoua. Nous avons étudié l'évolution temporelle et sectorielle des cas de LC au niveau de cette province, ainsi, une étude moléculaire est réalisée afin de déterminer l'espèce circulante de *Leishmania* au niveau des différents secteurs.

Au cours de la période 2000-2012, une augmentation du nombre de cas de LC a été constatée, avec un total de 518 cas recensés durant cette période. 20 secteurs sont touchés par rapport à 56, ce qui montre une extension géographique de la LC dans cette province avec concentration des cas de LC au niveau du secteur Had Draa (244 cas), Smimou (110 cas), Imi N'tlit (54 cas) et El hanchane (29 cas).

Les deux sexes ont été touchés (Sexe ratio F/M=1,34), la plupart des cas appartient à la tranche d'âge 0-9 ans avec une prévalence de 46,85%. Les lésions étaient souvent uniques (58.6%) et localisées au niveau du visage (35.8%).

L'étude moléculaire par la technique PCR-ITS1, suivi de la digestion enzymatique HaeIII, a montré pour la première fois que *Leishmania tropica* est l'espèce responsable de la LC au niveau des différents secteurs de la province d'Essaouira.

Mots clés: Leishmaniose cutanée, *L.tropica*, ITS1-PCR, Essaouira, Maroc.

Abstract

Leishmaniasis is parasitic diseases frequent in the Mediterranean Basin. Cutaneous leishmaniasis (CL) has been recently emerged in new foci, posing a public health problem. Increasing cases of CL have been reported during recent years in Essaouira province, a previously non-endemic area. The present study was designed for epidemiological and parasitological characterization of the disease for the first time in this area.

From 2000 to 2012, 518 cases of CL were reported in this province. The majority of cases were recorded in four sectors Had Draa (244 cases), Smimou (110 cases), ImiN'tlit (54 cases) and El hanchane (29 cases). Remaining cases (81 cases) have been reported in other sectors reflecting the geographical spread of the disease.

The highest rate lesions were found in the age group of 9 years or less with a prevalence of 46,85%. Sexes were equally affected (sex ratio: 1.34). The most affected lesion was localized in the face (35,8%). The average number of lesions per patient was 1.38. The causative agents of CL in this province were identified as *L.tropica* by species-specific ITS1-PCR-RFLP assay.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, *L.tropica*, ITS1-PCR, Essaouira, Morocco.

Liste des figures

- Figure 1 :** Poterie pré-inca représentant de lésions cutané-muqueuses retrouvées au Pérou et en Equateur.
- Figure 2 :** Répartition géographique de la leishmaniose dans le monde.
- Figure 3 :** Distribution de la leishmaniose cutanée et viscérale dans l'ancien et le nouveau monde.
- Figure 4:** Lésion unique au niveau du visage.
- Figure 5:** Lésion ulcéro-végétante multiple des membres.
- Figure 6:** Distribution de la leishmaniose (gris clair) et co-infection (gris foncé) *Leishmania*/VIH
- Figure 7:** Enfant souffrant de leishmaniose viscérale à *L. infantum*.
- Figure 8:** Formes amastigotes de *Leishmania* intracellulaires et libres, sur frottis de moelle.
- Figure 9:** Photo de la forme amastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'un frottis réalisé au département de parasitologie à l'INH.
- Figure 10:** schéma de la forme amastigote.
- Figure 11:** Stade promastigote de *Leishmania* en culture in vitro.
- Figure 12:** Photo de la forme promastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'une culture réalisé à l'INH.
- Figure 13:** Schéma de la forme promastigote.
- Figure 14:** Phlébotome femelle gorgée de sang (photo Dr Arezki IZRI).
- Figure 15:** Dessin de phlébotome, aspect général. D'après CIPA. (Computer - aided Identification of Phlebotomine sandflies of America).
- Figure 16:** Cycle biologique du phlébotome.
- Figure 17:** cycle évolutif de leishmaniose.
- Figure 18:** Carte de répartition des leishmanioses au Maroc.
- Figure 19:** Evolution des cas de la leishmaniose viscérale, Maroc.
- Figure 20:** Evolution des cas de la LC à *L. major*, Maroc.
- Figure 21:** Evolution des cas de la LC à *L. major*, Maroc.
- Figure 22:** Epidémiologie moléculaire de la LC au Maroc.
- Figure 23:** Découpage administratif de la région de Marrakech Tensift Al Haouz.
- Figure 24:** La répartition des secteurs dans la province d'Essaouira.
- Figure 25:** Evolution de la LC dans la région de Marrakech Tensift El Haouz de 2000 à 2012 selon les données de la DELM.
- Figure 26:** Nombre de cas de LC selon la DELM et LNRL entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Al Haouz.
- Figure 27:** Nombre de cas de LC selon la DELM et LNRL entre 2000 et 2012 au niveau de la province de Chichaoua.
- Figure 28:** Nombre de cas de LC selon DELM et LNRL entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.

- Figure 29:** Evolution de LC selon les données de la DELM et du SIAAP entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.
- Figure 30:** Evolution de l'incidence de la LC selon les données de la DELM et du SIAAP entre 2006 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.
- Figure 31:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2000.
- Figure 32:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2002.
- Figure 33:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2004.
- Figure 34:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2006.
- Figure 35:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2009.
- Figure 36:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2010.
- Figure 37:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2011.
- Figure 38:** Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2012.
- Figure 39:** les secteurs touchés par la LC au niveau de la province d'Essaouira de 2000 à 2012.
- Figure 40:** Répartition des cas de LC selon l'âge de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira
- Figure 41:** Répartition des cas de LC selon l'âge de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira
- Figure 42:** Répartition des cas de LC selon la localisation des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.
- Figure 43:** Répartition des cas de LC selon la localisation des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.
- Figure 44:** Répartition des cas de LC selon la taille des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.
- Figure 45:** Photo du gel d'agarose du produit d'amplification de la région ITS1 par PCR
- Figure 46:** Photo du gel d'agarose de la digestion par l'enzyme HaeIII de la région ITS1 par PCR.
- Figure 47:** Topographie plate du secteur Had Draa.
- Figure 48:** Actions de sensibilisation au niveau des établissements scolaires du secteur Had Draa
- Figure 49:** Dépistage actif des cas de LC au niveau établissements scolaires du secteur Had Draa
- Figure 50:** Secteur Had Draa, localité Tabia « ordures à proximité des ménages».
- Figure 51:** Secteur Had Draa, localité Tabia « Situation des écuries à coté des habitations ».
- Figure 52:** Secteur Had Draa, localité Tabia. « Foyers du phlébotome».
- Figure 53:** Secteur Had Draa, localité Soualeh « Situation des écuries à coté des habitations ».
- Figure 54:** Secteur Had Draa, localité Soualeh. « Foyers du phlébotome ».
- Figure 55:** Secteur Smimou.

Figure 56: Secteur El hanchane.

Figure 57: Secteur El hanchane, déchets de bétails.

Figure 58: Secteur El hanchane, dépôt des ordures.

Liste des tableaux

Tableau 1: classification de Levine *et al* des *leishmanies*.

Tableau 2: Espèces de *Leishmania*.

Tableau 3: La taxonomie des phlébotomes.

Tableau 4: Leishmaniose viscérale (LV), cutanée (LC) et tégumentaire américaine (LT).

Tableau 5: communes rurales et urbaines de la province d'Essaouira.

Tableau 6: Lames sélectionnées représentant les secteurs les plus touchés de la province d'Essaouira.

Tableau 7: Composition du Master Mix pour l'amplification ITS1.

Tableau 8: Programme du thermocycleur.

Tableau 9: Composition du Mix pour l'analyse de restriction.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
BET	Bromure d'éthidium
DAT	Test d'agglutination direct
DELM	direction d'épidémiologie et de lutte contre les maladies.
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IFI	Immunofluorescence indirecte.
INH	Institut National d'Hygiène.
LC	leishmaniose cutanée
LCL	leishmaniose cutanée localisée
LCD	leishmaniose cutanée diffuse
LCM	leishmaniose cutanéomuqueuse
LNRL	laboratoire national de référence en leishmaniose
LV	leishmaniose viscérale
LVA	leishmaniose viscérale anthroponotique
LVZ	leishmaniose viscérale zoonotique
MGG	May-Grünwald Giemsa
NNN	Novy-Nicolle-Mc Neal
OMS	organisation mondiale de la santé
PCR	Polymérase Chain Réaction
RFLP	restriction fragment length polymorphisme
RGPH	recensement général de la population et de l'habitat
S.I.A.A.P	service d'Infrastructure des Actions Ambulatoires Provincial

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I/LES LEISHMANIOSES DANS LE MONDE.....	4
1/Historique.....	4
2/Répartition géographique dans le monde.....	5
3/Manifestations cliniques.....	6
3-1/La leishmaniose cutanée (LC).....	6
3-2/La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).....	8
3-3/La leishmaniose Viscérale (LV).....	8
4/ Cycle biologique de la leishmaniose.....	10
4-1/Le parasite.....	10
4-2/Le vecteur.....	14
4-3/Le réservoir.....	17
4-5/Le cycle évolutif.....	19
5/Diagnostic de la leishmaniose.....	20
5-1/Diagnostic clinique.....	20
5-2/Diagnostic biologique.....	20
6/Traitement de la leishmaniose.....	25
6-1/ Médicaments.....	25
6-2/Vaccination.....	26
7/Prévention et lutte:.....	26
II/LES LEISHMANIOSES AU MAROC.....	27
1/Historique.....	27
2/Répartition géographique.....	27
2-1/La leishmaniose viscérale à <i>L. infantum</i>	28
2-2/La leishmaniose cutanée à <i>L.major</i> ou LC zoonotique.....	29
2-3/La leishmaniose cutanée à <i>L.tropica</i>	30
2-3/La leishmaniose cutanée à <i>L.infantum</i>	31
PARTIE II: MATERIELS ET METHODES.....	32
I/Zone d'étude.....	33
1/Présentation de la région Marrakech-Tensift-El Haouz.....	33
2/PRESENTATION DE LA PROVINCE D'ESSAOUIRA.....	34

2-1/Découpage administratif.....	34
2-2/Cadre climatique	34
2-3/Cadre géographique.....	35
2-4/Données démographiques.....	36
3/Laboratoire d'accueil	36
II/PERIODE D'ETUDE	36
III/TYPE D'ETUDE.....	36
1/Etude rétrospective.....	36
2/Etude prospective.....	37
2-1/ Echantillon biologique	37
2-2/Diagnostic moléculaire par PCR-ITS1-RFLP	38
PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION	44
I/ ETUDE RETROSPECTIVE DE LA LEISHMANIOSE.....	45
1/Synthèse sur l'évolution de la LC selon la DELM au niveau de la région de Marrakech-Tensift-El Haouz de 2000 à 2012	45
2/Analyse des données de la LC au niveau de la province d'Essaouira	47
2-1/Evolution temporelle de la LC selon les données de la DELM et les données du Service d'Infrastructure des Actions Ambulatoires Provincial (S.I.A.A.P) d'Essaouira ..	47
2-2/Evolution de l'incidence de la LC par 100000 dans la province d'Essaouira selon les données de la DELM et du SIAAP	47
2-3/Evolution spatiale (par secteur) de la leishmaniose cutanée selon les données du service d'Infrastructure des Actions Ambulatoires Provincial (S.I.A.A.P) d'Essaouira...	48
4/Répartition de la LC par sexe et par tranche d'âge dans la province d'Essaouira	57
5/Répartition de leishmaniose cutanée selon la localisation, l'aspect et le nombre des lésions dans la province d'Essaouira	58
II/IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE L'ESPECE DES LEISHMANIES CIRCULANTES DANS LA PROVINCE D'ESSAOUIRA	59
1/Résultats de l'amplification de l'ADN par PCR ITS1	59
2/Résultat de la digestion par l'enzyme HaeIII	60
DISCUSSION	62
CONCLUSION	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71
Annexe	79

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des parasites du genre *Leishmania* et transmises par des phlébotomes femelles.

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 (LC):
 - * localisée (LC, bouton d'orient) 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).

Les leishmanioses sont endémiques dans 66 pays de l'Ancien Monde et 22 du Nouveau Monde. La maladie menace 350 millions de personnes, elle est responsable tous les ans de deux millions de nouveaux cas dans le monde, de ce fait au moins 1/10 de la population mondiale risque d'être infecté (**OMS, 2010**).

Au Maroc, les leishmanioses constituent un vrai problème de santé publique, la distribution géographique s'étend et de nouvelles zones d'endémie apparaissent, malgré les efforts de lutte engagés par le ministère de la santé aussi bien contre le parasite que contre le vecteur.

Cette persistance de la leishmaniose au Maroc et son extension est surtout liés à un grand nombre de facteurs de risques, tel que :

- ✓ L'urbanisation accélérée et/ou non planifié.
- ✓ La détérioration du tissu économique et social dans les banlieues des villes, ou des populations à faible revenus s'amassent à cause d'un exode rural massif, facilitant ainsi l'apparition d'épidémies.

Deux formes cliniques y sont présentes, la leishmaniose viscérale (LV) à *L. infantum*; sévit essentiellement au Nord du pays sous un mode hypo-endémique dans des foyers ruraux dispersés; et la leishmaniose cutanée (LC). Cette dernière regroupe la LC zoonotique due à *L. major*; se manifeste de manière endémo-épidémique dans les zones pré-sahariennes; et la LC à *L. tropica* dans les foyers hypo-endémiques au centre du pays (**Rhajaoui M et al., 2011**).

Pour faire face à cette problématique, une étude épidémiologique approfondit des provinces et une identification moléculaire des espèces circulantes sera d'un grand apport pour améliorer et cibler les stratégies de lutte. C'est dans ce contexte que nous avons choisir la province d'Essaouira localisée dans la région de Marrakech-Tensift-El haouz pour deux raisons:

- ✓ Cette province est située à coté d'un foyer actif et persistant, la province de Chichaoua.
- ✓ Le nombre de cas de LC a connu une augmentation importante au cours de ces dernières années.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette partie présentera une synthèse bibliographique sur la leishmaniose au niveau mondiale, à savoir sa répartition géographique, ses manifestations cliniques, ses principaux acteurs et son diagnostic et traitement. Ainsi qu'au niveau national avec une description détaillée de l'historique de cette maladie et sa distribution géographique.

I/LES LEISHMANIOSES DANS LE MONDE:

1/Historique:

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires très anciennes.

Les premières descriptions cliniques de ces pathologies concernent les leishmanioses tégumentaires d'Amérique latine et datent de l'invasion espagnole du XVIème siècle.

Pendant la période pré-Inca, des visages présentant des mutilations faciales probablement dues à des leishmanioses cutané-muqueuses étaient déjà représentés sur des figurines provenant du Pérou et d'Equateur (Figure 1).



Figure 1 : Poterie pré-inca représentant de lésions cutané-muqueuses retrouvées au Pérou et en Equateur. (www.who.int/emc/diseases/leish/leisdat1.html).

- ✦ En 1882, La première description clinique moderne a été faite par McNaught (**Dedet J.P, 1999**).
- ✦ En 1885, Cunningham découvrit les parasites dans un prélèvement de bouton d'Orient (**Dedet J.P, 1999**).
- ✦ En 1891, redécouvertes par Firth.
- ✦ En 1900, Borowsky a décrit pour la première fois l'agent étiologique de la LC de l'ancien monde (*Leishmania tropica*). Il fut suivi de près, par Leishman et Donovan (Figure 1), qui décrivent le parasite *Leishmania donovani* responsable de la forme viscérale dite aussi Kala-Azar indien (ou fièvre noire) en 1903 (**Dedet J.P, 1999**).
- ✦ En 1901, Sir William Leishman observa des petites cellules de 2-3µm dans le foie d'un soldat atteint de kala azar (**Dedet J.P, 1999**).
- ✦ En 1903, Il publia sa découverte, il s'agissait des formes amastigotes de *Leishmania donovani* (**Roberts et Janovy, 2000**).
- ✦ En 1908, Charles Nicolle fut le premier à démontrer le caractère zoonotique de ces parasitoses.
- ✦ En 1921, le rôle vecteur des phlébotomes est découvert, grâce aux travaux des frères Sergent.
- ✦ La transmission des leishmanies par piqûre de phlébotome infecté en laboratoire est décrite en 1941 par Adler et Ber.
- ✦ A partir de 1970, la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies est devenue courante après la publication de l'OMS (1982) sur le sujet.

- ✳ Les premiers cas de co-infection VIH-leishmanies sont signalés à partir de 1985 (Jarry, 1999).

Depuis ces premières découvertes, les connaissances sur les leishmanioses n'ont cessé de s'accroître. Pourtant, ces pathologies demeurent toujours un grave problème de santé publique.

2/Répartition géographique dans le monde:

La leishmaniose est endémique dans 88 pays dans le monde, y compris le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le Moyen-Orient, l'Amérique centrale et l'Inde. Elle n'est pas endémique dans le sud-est de l'Asie et l'Australie (Figure 2).

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

Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania* d'une part, et elles sont propagées par différents genres et espèces de phlébotomes selon la région d'autre part.

La leishmaniose a été reconnue, en 2007, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la maladie tropicale la plus négligée (OMS 2007).

Il existe dans le monde 350 millions de personnes considérées à risque, plus de 12 millions de personnes infectées et ce chiffre augmente d'environ 2 millions chaque année :

- ✳ leishmaniose cutanée (LC) 1-1,5 million.
- ✳ leishmaniose viscérale (LV) 0,5 million.

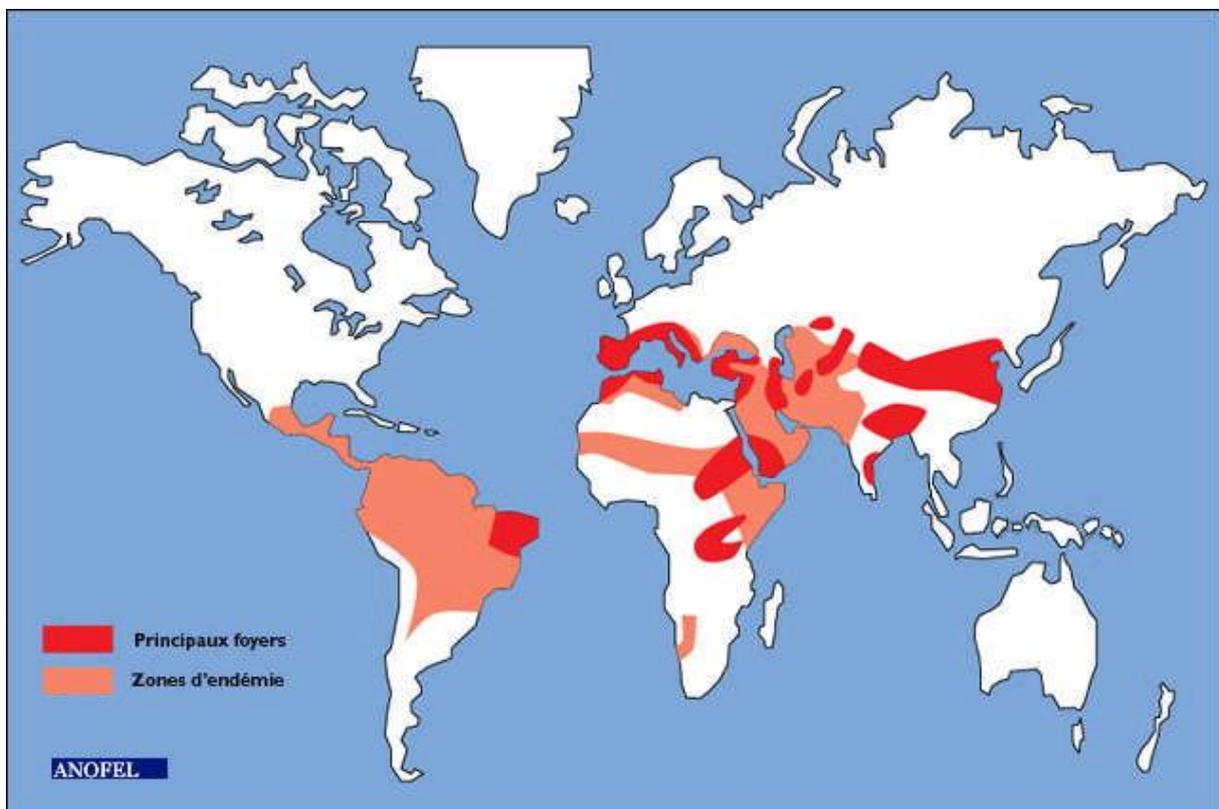


Figure 2 : Répartition géographique de la leishmaniose dans le monde (Anofel, 2007)

La grande majorité des cas (près de 90%) sont localisés :

- ✳ en Afghanistan, au Pakistan, en Syrie, en Arabie Saoudite, Algérie, Iran, au Brésil, et au Pérou pour la LC.
- ✳ en Inde, au Bangladesh, au Népal, au Soudan et au Brésil pour la LV. (Desjeux et al.,2004).

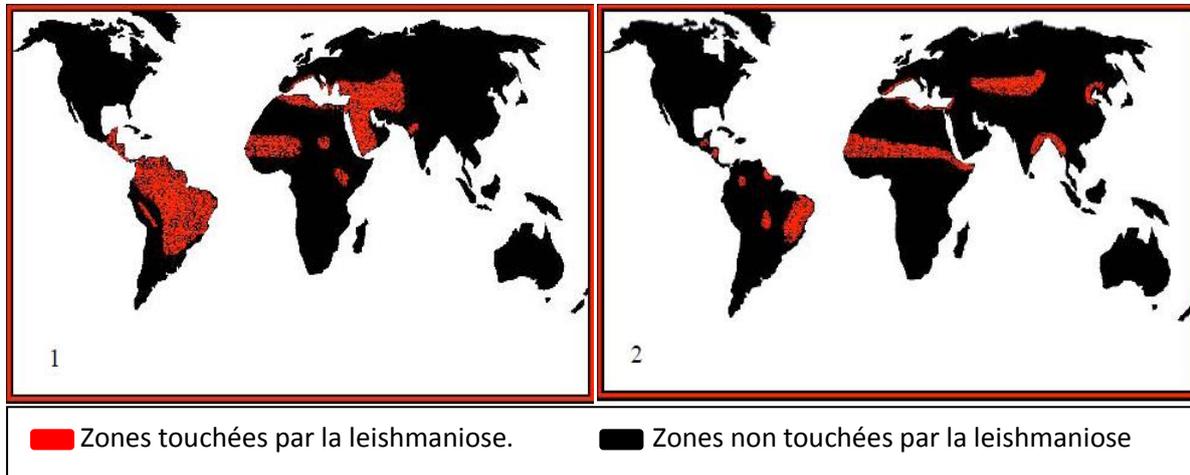


Figure 3 : Distribution de la leishmaniose cutanée (à gauche) et viscérale (à droite) dans l'ancien et le nouveau monde (Santos, D. O.2008).

La distribution géographique de la leishmaniose est limitée par celle du phlébotome, par la sensibilité de l'insecte aux climats froids et par sa capacité à transmettre telle ou telle espèce de leishmanies.

3/Manifestations cliniques:

Les leishmanioses représentent un spectre clinique allant d'une simple lésion cutanée auto-résolutive aux formes cutanéomuqueuses et viscérales mortelles pour cette dernière en absence de traitement.

3-1/La leishmaniose cutanée (LC):

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 mononuclées de la peau. En général, les cellules infectées et les 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 J.P, 1999**).

Après la piqure infectante par le vecteur, l'incubation peut varier d'une semaine à 2 ans (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**). Les lésions sont habituellement retrouvées sur les parties exposées du corps telles que le visage, les bras, et les jambes. Ces lésions peuvent commencer comme de petites papules rouges (5 à 10 millimètres au début). Selon les

espèces de *Leishmania*, elles peuvent progresser vers des nodules érythémateux, des plaques durcies, des plaques écailleuses ou des ulcères avec les bords relevés.

➔ Leishmaniose Cutanée Localisée (LCL) :

Elle correspond à la forme bénigne de la maladie, elle reste localisée au point de piqûre du phlébotome. 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 (Figure 4 et 5).

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 J.P,1999).

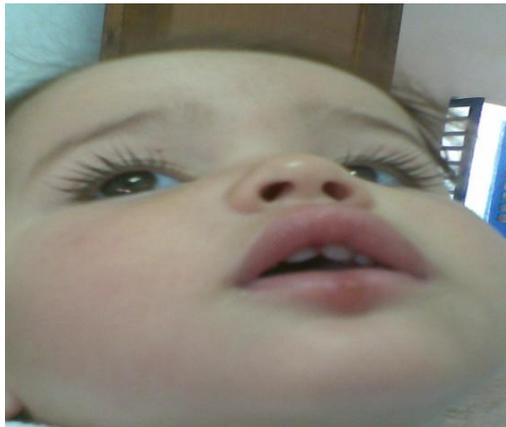


Figure 4: Lésion unique au niveau de la lèvre inférieure (Essaouira, 2013)



Figure 5: Lésion ulcéro-végétante multiple des membres (D.E.L.M 2010)

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

La LCD peut cliniquement ressembler à la lèpre lépromateuse. Elle se présente initialement comme une papule rouge dans la zone d'inoculation, après, elle se disperse comme des macules érythémateuses ou violacées non-ulcérées, et des plaques fortement infiltrées par des amastigotes. La face, les extrémités supérieures et inférieures et les fesses sont généralement les zones les plus affectées.

3-2/La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) :

La LCM ou « espundia » 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).

La plupart des cas de LCM se manifestent chez des patients qui ont développé précédemment une épisode de LC. Les lésions de ce type se situent normalement dans la partie arrière du septum nasal où elles forment des lésions nodulaires qui évoluent vers des ulcères arrondis de bords élevés qui donnent lieu à des sécrétions nocturnes sanguinolentes. Ensuite, il peut se produire une perforation du septum, une ulcération palatale ou un œdème gingival. Eventuellement, il y a destruction de la muqueuse oro-naso-pharyngée, des structures cartilagineuses faciales et des voies aériennes supérieures, ayant pour résultat la défiguration, l'infection secondaire, et l'obstruction des voies respiratoires.

3-3/La leishmaniose Viscérale (LV):

La LV connue aussi sous le nom de « kala-azar », est une maladie qui peut être mortelle en absence de traitement. Elle est provoquée par deux espèces de Leishmanie :

✳ *L. donovani* (Laveran et Mesnil, 1903) et *L. infantum* (Nicolle, 1908) dans l'ancien monde.

✳ *L. chagasi* en Amérique.

Depuis les années 1980, la LV est une maladie opportuniste émergente dans le sud-ouest de l'Europe (Portugal, Espagne, France, Italie) ou plus de 1500 cas de co-infections VIH Leishmania ont été rapportés (Figure 5). De plus, la question du portage asymptomatique et du rôle de réservoir de l'Homme, en particulier par l'échange de seringues chez les toxicomanes, a été posée. (Alvar J, et al., 1997 ; Albrecht H.1998; Fichoux Y et al., 1999).

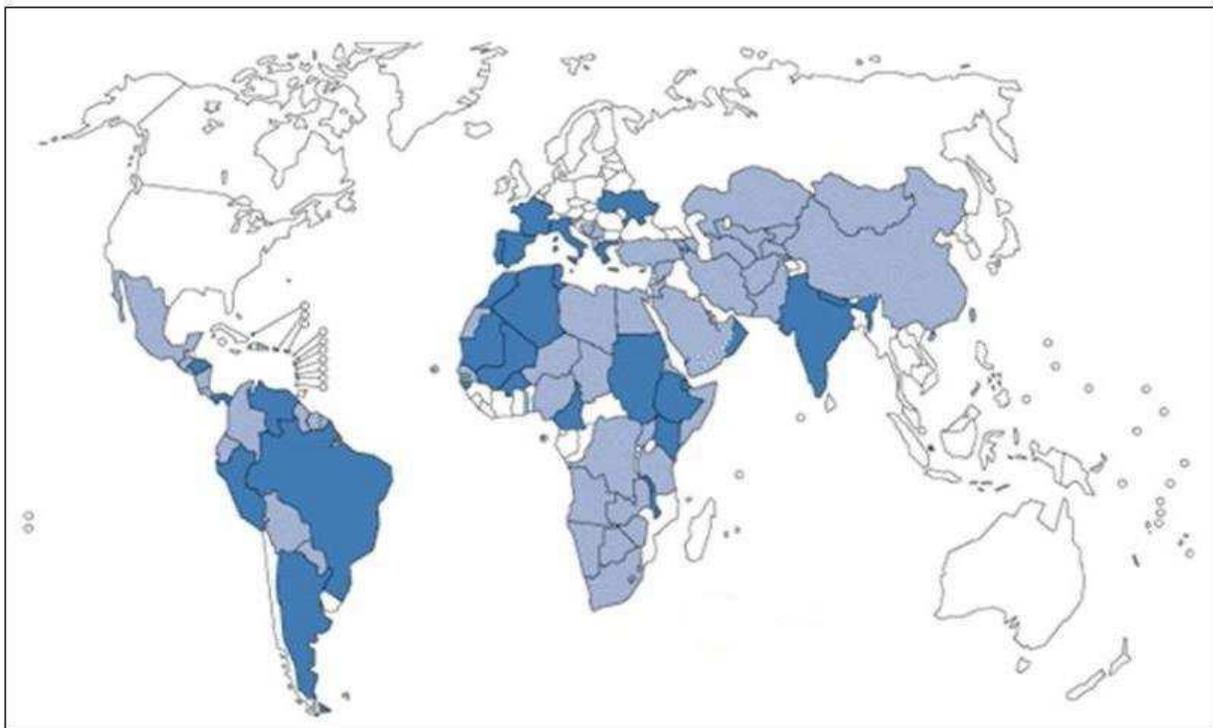


Figure 5: Distribution de la leishmaniose (gris clair) et co-infection (gris foncé) *Leishmania*/VIH (OMS., 2000)

On distingue deux types de LV :

La LV anthroponotique (LVA) : avec l'Homme comme seul réservoir de *Leishmania donovani*. Elle sévit sous forme d'épidémies au Soudan, en Ethiopie, en Inde, au Népal et au Bangladesh.

La LV zoonotique (LVZ) : due à *Leishmania infantum* (synonyme *L. chagasi* en Amérique latine) avec comme réservoir de parasite le chien qui peut développer une maladie mortelle. Elle est décrite en Chine, au Pakistan, en Amérique Latine et dans le Bassin méditerranéen.

Pour favoriser le développement de la maladie chez un homme contaminé après pique de phlébotome plusieurs facteurs de risque liés à l'hôte ou au parasite interviendraient, de façon isolée ou concomitante : prédisposition génétique, immunodépression acquise ou iatrogène, malnutrition, quantité de parasites inoculée, virulence de la souche, rôle de la salive du phlébotome...

La période d'incubation de la LV est de 2 à 6 mois. Après cette période, le patient présente des symptômes et des signes de l'infection systémique persistante (fièvre, fatigue, faiblesse, perte d'appétit et perte de poids) et de l'invasion parasitaire du sang et du système réticuloendothélial (inflammation des ganglions lymphatiques, de la rate et du foie) (**Reithinger, R.et al., 2007**). La fièvre est en général récurrente avec deux états transitoires par jour ; la fièvre persistante est moins commune. Un symptôme présenté par des patients en Inde est l'hyperpigmentation, ce qui à l'origine du nom « kala-azar » (fièvre noire en indhi). Avec la progression de la maladie, on voit apparaître des ulcérations intestinales, associées à des hémorragies et d'autres complications à cause de l'anémie ou une septicémie qui peuvent provoquer la mort. La LV est fulminante chez les patients atteints du SIDA, l'efficacité du traitement est alors très basse quelque soit le type de médicament utilisé (Figure 6).



Figure 6: Enfant souffrant de leishmaniose viscérale à *L. infantum* (D.E.L.M, 2010)

4/ Cycle biologique de la leishmaniose:

4-1/Le parasite:

➡ Taxonomie :

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* (Ross, 1903).

Tableau 1 : classification de Levine *et al.*, (1980)

Règne	Protista	Haeckel, 1866
Sous-Règne	Protozoa	Goldfuss, 1817 emend. Siebold, 1848.
Embranchement	Sarcomastigophora	Honigberg et Balamuth, 1963
Sous- Embranchement	Mastigophora	Diesing, 1866
Classe	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Ordre	Kinetoplastida	Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976
Sous-Ordre	Trypanosomatina	Kent, 1880
Famille	Trypanosomatidae	Doflein, 1901 emend. Grobбен, 1905
Genre	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903

Une nouvelle classification est élaborée par **Adl et al., 2005** en se basant sur l'étude de l'ultrastructure de **Levine et al., 1980** ainsi que des études moléculaires phylogénétiques :

Ordre	Euglenozoa	Cavalier-Smith, 1981, emend. Simpson, 1997
Sous-ordre	Kinetoplastea	Honigberg, 1963
Famille	Metakinetoplastina	Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia.
Genre	<i>Leishmania</i>	Vickerman, 2004

Le genre *Leishmania* est subdivisé en deux sous-genres, *Leishmania* et *Viannia*, selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur, respectivement.

On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en complexes selon la similarité biochimique de leurs isoenzymes.

Tableau 2 : Espèces de *Leishmania* (d'après Roberts et Janovy, 2000; Forget, 2004).

Sous genre	Complexe	Espèce	Localité
<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903)	Inde, Chine, Bangladesh
		<i>L. archibaldi</i> (Castellani et Chalmers, 1919)	Soudan, Éthiopie Centre nord de l'Asie, nord-ouest de la Chine,
	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)	Moyen-Orient, sud de l'Europe, nord-ouest de l'Afrique
		<i>L. chagasi</i> (Cunha et Chagas, 1937)	Amérique du Sud et Centrale
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)	Milieus urbains du Moyen-Orient et de l'Inde
		<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986)	Tunisie
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique
	<i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu et Guan, 1973)	Chine, Mongolie
	<i>L. arabica</i>	<i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari et Evans, 1986)	Arabie Saoudite
	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford et Bray, 1973)	Éthiopie, Kenya
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953)	Mexique, Belize, Guatemala, centre sud des États-Unis
		<i>L. amazonensis</i> (Lainson et Shaw, 1972) <i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Bassin Amazonien, Brésil Venezuela
	<i>L. enrietti</i>	<i>L. enrietti</i> (Muniz et Medina, 1948)	Brésil

	<i>L. hertigi</i>	<i>L. hertigi</i> (Herrer, 1971)	Panama, Costa Rica
		<i>L. deanei</i> (Lainson et Shaw, 1977)	Brésil
<i>Viannia</i> (Lainson et Shaw, 1987)	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (Viannia, 1911)	Brésil
		<i>L. peruviana</i> (Velez, 1913)	Ouest des Andes
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954)	Guyane Française, Guyane, Surinam

➡ Morphologie:

Morphologiquement, les leishmanies se ressemblent et passent obligatoirement, au cours de leur évolution, par deux formes distinctes : la forme promastigote mobile grâce à un flagelle antérieur et la forme amastigote sans flagelle extériorisé.

La forme amastigote :

Présente chez l'hôte définitif vertébré dont l'Homme, elle a une forme ovale ou arrondie, mesure entre 2-3µm et ne présente pas de mobilité. Le noyau est central et il est près du kinétoplaste, avec une structure mitochondriale qui contient l'ADN extracellulaire (kDNA) (Figure 7 et 8).

Les amastigotes sont adaptés à la température corporelle et au milieu acide des phagolysosomes des macrophages où ils résident. La multiplication se produit par division binaire (scissiparité). Après leur libération, ils infectent d'autres macrophages (**Bailey, M. S. et al., 2007**).

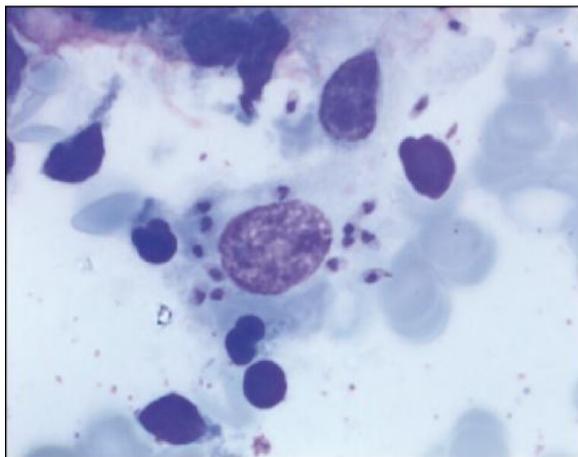


Figure 7: Formes amastigotes de *Leishmania* intracellulaires et libres, sur frottis de moelle (Coloration MGG, grossissement x 1 000). (www.who.int).

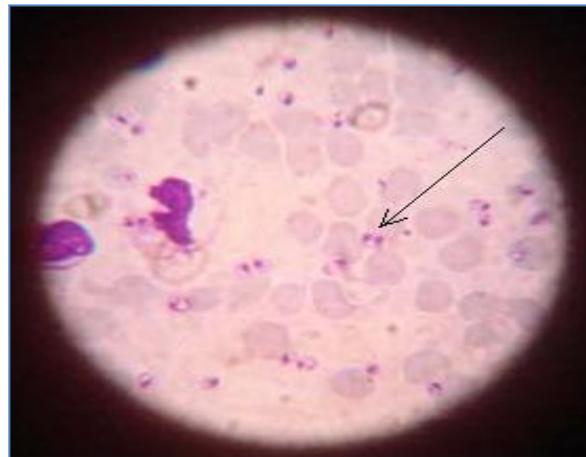


Figure 8: Photo de la forme amastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'un frottis réalisé au département de parasitologie à l'INH (17/06/2013).

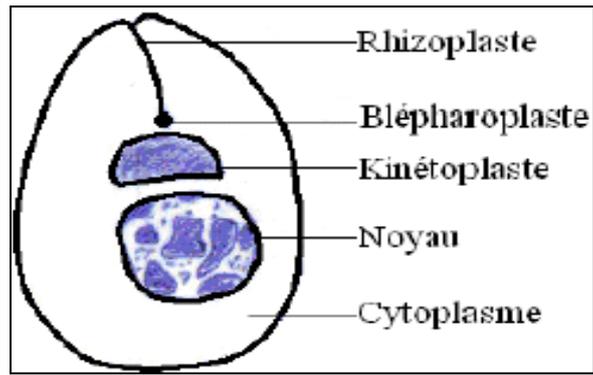


Figure 9: schéma de la forme amastigote (Golvan, 1990)

La forme promastigote :

Se trouve dans le tube digestif du vecteur, elle se présente sous une forme élargie et d'une longueur moyenne de 20 µm. Ils sont également munis d'un noyau central et d'un kinétoplaste. Ils possèdent aussi un flagelle de longueur équivalente à celle du corps et qui leur donne la mobilité (Figure 10 et 11). Les promastigotes peuvent se multiplier dans des milieux artificiels de culture à la température de 22-26 °C.

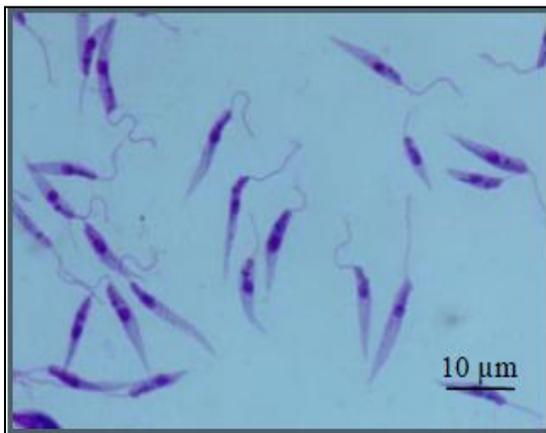


Figure 10: Stade promastigote de Leishmania en culture in vitro. (www.who.int)

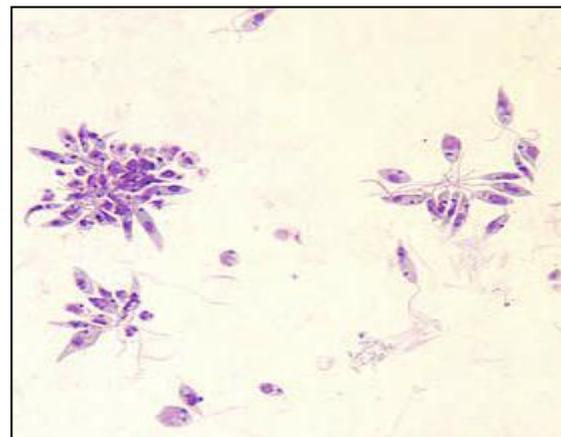


Figure 11: Photo de la forme promastigote vue au microscope optique (*100) à partir d'une culture réalisée à l'INH 2013.

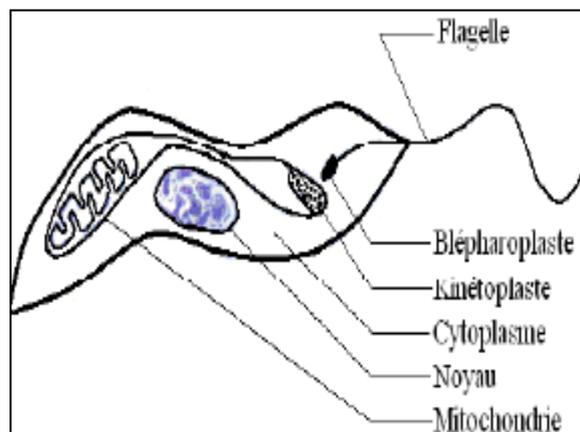


Figure 12: Schéma de la forme promastigote (Golvan, 1990).

➡ Quelques caractéristiques du parasite:

Le génome

Le génome haploïde de *Leishmania* comporte généralement 36 chromosomes, à l'exception de *L. braziliensis* et *L. mexicana* qui en contiennent 35 et 34, respectivement, pour un total de 34 Mb (**Wincker et al., 1996**). Bien que ce nombre varie, l'organisation et l'ordre des gènes restent conservés entre les espèces, pathogènes ou non (**Tamar et al., 2000**). La taille de chaque chromosome varie de 0,28 à 2,80 Mb. Le génome est riche en GC avec un taux de 64% et code pour environ 8300 gènes. Le séquençage du génome de *L. major* par l'Institut Sanger est maintenant terminé et celui de *L. donovani* et *L. infantum* est en annotation (www.GeneDB.org).

Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré

Le parasite a développé plusieurs mécanismes lui permettant de survivre dans un milieu aussi extrême qu'est le phagolysosome des macrophages (**Cunningham, 2002**). *Leishmania* exprime à sa surface cellulaire un lipophosphoglycan (LPG) unique et une métalloprotéase, gp63. D'abord, les promastigotes métacycliques inhibent les propriétés fusogéniques de la membrane avec leur LPG et empêchent la fusion du lysosome avec le phagosome. L'activité de plusieurs enzymes hydrolytiques est aussi altérée. Le LPG, encore une fois, agit en tant que barrière hydrolytique dû à sa nature hautement anionique. Il peut également chélater le calcium qui régule plusieurs fonctions cellulaires telle que la transduction de signaux (**Descoteaux et al., 1991**). De plus, la gp63 peut dégrader les enzymes lysosomales (**Cunningham, 2002**). Les cascades signalétiques cellulaires sont aussi affectées car le parasite exprime des phosphatases qui agissent sur les protéines du macrophage. *Leishmania* semble, en plus, activer la phosphatase SHP-1 cellulaire qui déphosphoryle normalement les protéines impliquées dans la cascade de kinases JAK et MAP (**Blanchette et al., 1999**). Les glycosylinoitol phospholipides des amastigotes inhibent la production d'oxyde nitrique du macrophage servant à la réponse à plusieurs signaux extracellulaires, tandis que le LPG et le gp63 pourraient protéger le parasite de métabolites d'oxygène toxiques. La survie du parasite est aussi assurée par l'inhibition de la production de cytokines. En effet, les promastigotes et les amastigotes ont la capacité de diminuer la production d'IL-12 impliquée dans la réponse TH1. *Leishmania* se distingue d'autres parasites par le fait qu'il ne fait pas simplement se défendre à l'intérieur de l'hôte mais il agit activement en manipulant la réponse immune. De plus, certaines kinases sont excrétées par les promastigotes dans leur milieu et ces kinases ont conservé leur activité même à pH acide (**Vieira et al., 2002**). Il va sans dire que ces enzymes doivent jouer un rôle important dans la survie intracellulaire pour que leur activité soit conservée dans une étendue de pH aussi large.

4-2/Le vecteur:

Le phlébotome est le seul vecteur connu des leishmanioses. La focalisation de ces infections dépend étroitement de la distribution de ces insectes.

➡ Morphologie:

Les phlébotomes sont de petits moucheron nocturnes, à peine visibles à l'œil nu avec un vol silencieux. Ils sont actifs la nuit et se cachent le jour dans des anfractuosités de murs, dans des terriers de rongeurs et autres abris d'animaux d'herbivores.

Ils mesurent 2 à 3 mm et ils sont parfois confondus avec des petits moustiques. Ils sont de couleur claire, jaune pâle, à brune. Leurs ailes, de forme lancéolée, se dressent en V à 45° sur le dos lorsqu'ils sont au repos (Figures 13 et 14).

Examinés à la loupe, ils apparaissent velus, bossus, pourvus de longues pattes et d'une nervation alaire caractéristique (DOLMATOVA AV et al., 1971 ;OMS 1984).



Figure 13: Phlébotome femelle gorgée de sang (photo Dr Arezki IZRI, Med Trop 2006).

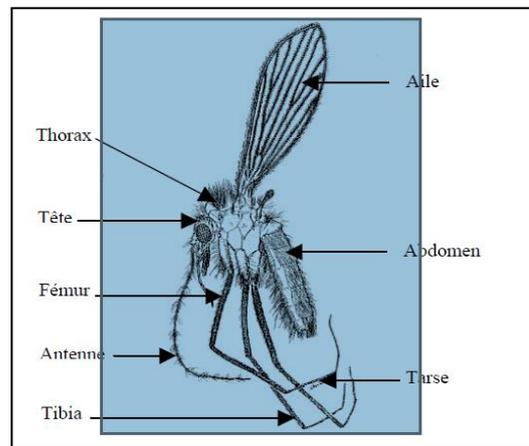


Figure 14: Dessin de phlébotome, aspect général. D'après CIPA. (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America).

➡ Taxonomie:

Les phlébotomes appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, classe des Insectes, Ordre des Diptères, sous-ordre des Nématocères, famille des *Psychodidae* (Bigot, 1845) et à la sous-famille des *Phlebotominae* (Kertész, 1904).

Environ huit cents espèces de phlébotomes ont été décrites dans le monde parmi lesquelles quarante assurent la transmission de la leishmaniose et des arboviroses (BALDET, 2004). Dix neuf espèces appartenant à deux genres ont été confirmées comme vecteurs des différentes espèces de *Leishmania* (HAUSMANN et coll., 1996) le genre *Phlebotomus* prédominant dans l'Ancien Monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale). Quatre autres genres existent et ne transmettent pas la maladie chez l'homme. Il s'agit de *Sergentomyia spp*, *Werileya spp*, *Hertigia spp* et *Brumptomyia spp* (BALDET, 2004).

Tableau 3 : La taxonomie des phlébotomes (Dedet J.P., 1999)

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Sous-embranchement	<i>Hexapoda</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Sous-classe	<i>Pterygota</i>
Ordre	<i>Diptera</i>
Famille	<i>Psychodidae</i>
Sous-famille	<i>Phlebotominae</i>
Genre	<i>Phlebotomus</i>
Espèces	<i>Ariasi, Longicuspis, Papatasi, Perniciosus, et Sergenti</i>

➡ **Cycle de vie :**

Les phlébotomes adultes ont une activité crépusculaire à nocturne (**Rioux et Golvan., 1969**). Ils se nourrissent de sucs végétaux. Seules les femelles sont, en outre, hématophages. Elles piquent divers hôtes mammifères, oiseaux, reptiles ou batraciens pour se procurer des éléments nutritifs nécessaires pour leur ovogenèse.

Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs est fonction de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante. Pour des colonies de laboratoire, la période varie de 4 à 8 jours (**Killick-Kendrick., 1990**). L'oviposition est déclenchée par la maturité ovarienne et par la disponibilité des gîtes propices au développement des stades préimaginaux (**Tesh et Guzman., 1996**).

Les phlébotomes présentent un cycle de vie holométabole qui comprend (Figure 15):

- ✘ **L'œuf :** la survie et le développement des œufs dépendent des conditions d'humidité et de température appropriées (26-30°). L'incubation de ces œufs varie avec la température : elle est de l'ordre de quatre à dix-sept jours.
- ✘ **La larve :** (quatre stades larvaires) Elle est terricole, sédentaire, saprophage et phytophage. Les gîtes larvaires varient selon les espèces. Ils peuvent être présentés par les fissures du sol, terriers de micromammifères, nids d'oiseaux, creux d'arbres fentes des murs, sols des habitations et des étables. Tous ces gîtes constituent des microhabitats caractérisés par des conditions constantes ; lieux calmes, abrités des courants d'air, humides et sombres. Les larves s'y nourrissent de débris organiques surtout végétaux. La durée des quatre stades larvaires successifs varie selon les conditions climatiques.
- ✘ **La nymphe :** Elle est fixée en position verticale par son extrémité postérieure et se rencontre au niveau des mêmes gîtes que ceux de la larve. Elle ne se nourrit pas et la durée du seul stade nymphal serait de six à quinze jours.
- ✘ **L'adulte :** Dans les pays tempérés, les adultes n'apparaissent que vers le mois de Mai, sont actifs pendant les mois chauds puis disparaissent à l'automne. Dans les zones intertropicales, ils sont plus ou moins actifs toute l'année (**D.E.L.M, 2010**).

Les femelles gravides déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades préimaginaux. L'éclosion donne naissance à une larve qui passe par 4 stades larvaires séparés par 3 mues, La larve du 4ème stade subit la nymphose et se transforme en nymphe qui subira enfin la mue imaginale conduisant à l'adulte.

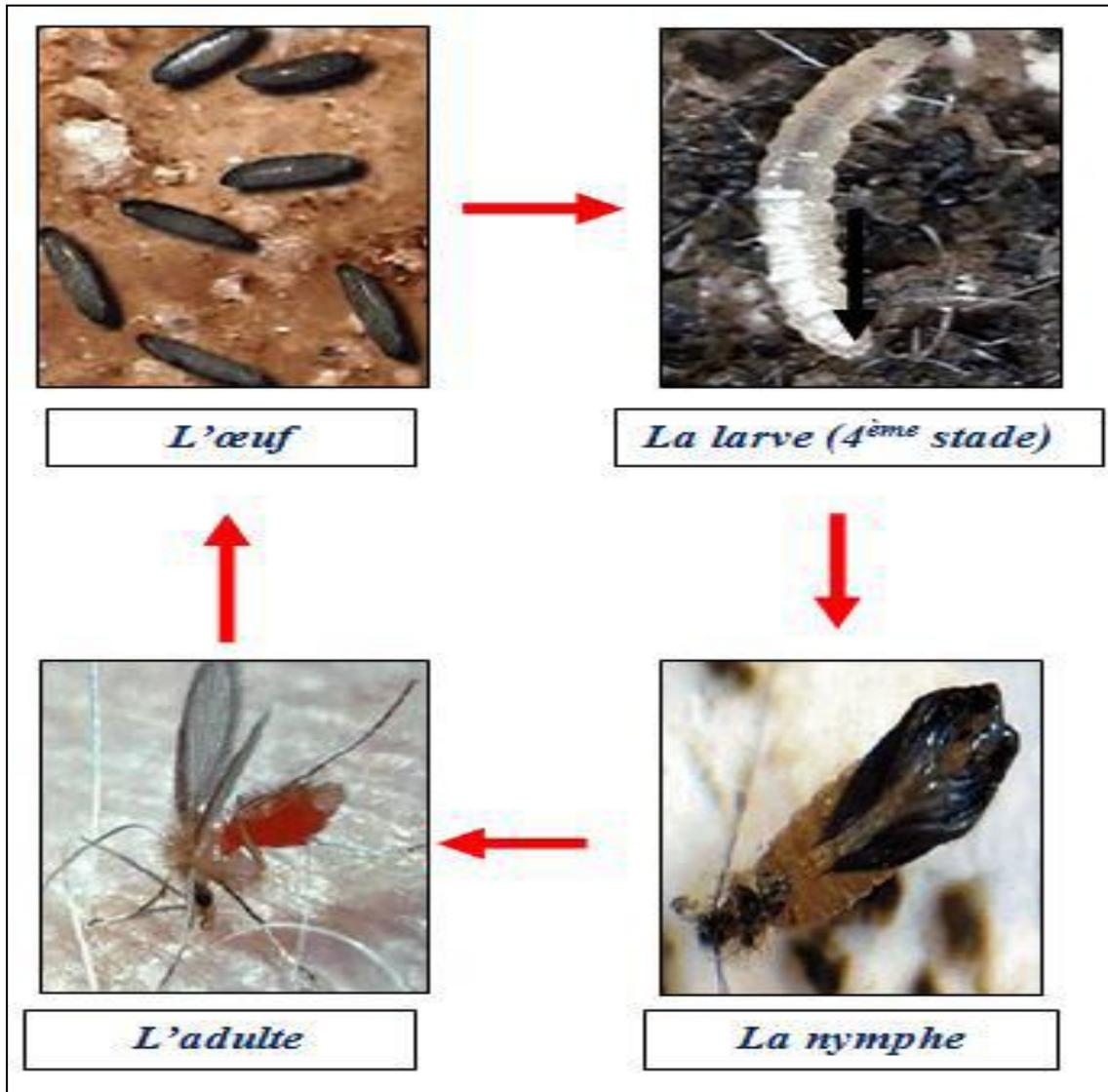


Figure 15: Cycle biologique du phlébotome (D.E.L.M, 2010)

4-3/Le réservoir:

Un réservoir de parasites de la *Leishmania* est considéré comme un système écologique dans lequel la population de parasites peut rester indéfiniment. Ce système est constitué par un petit nombre d'espèces de vecteurs et un petit nombre de vertébrés, les hôtes. Normalement, il existe un seul hôte pour une espèce de *Leishmania* dans un secteur déterminé. Il est possible que d'autres mammifères vivant dans le même biotope puissent être infectés, mais ces hôtes accidentels n'ont pas de rôle dans la survie à long terme de la population de parasites. Les hôtes mammifères incluent les humains, les rongeurs, les chiens, les loups, et des renards. Les reptiles et les amphibiens sont moins souvent des réservoirs pour l'infection (OMS 1984).

Tableau 4: Leishmaniose viscérale (LV), cutanée (LC) et tégumentaire américaine (LT) (OMS, 1990).

	Parasite	Réservoir	Autres animaux infectés
LV	<i>L. (L.) donovani</i> (Ross, 1903)	Homme	
	<i>L. (L.) infantum</i> (Nicolle, 1908)	Chiens	Canidés sauvages
LC	<i>L. (L.) tropica</i> (Wright, 1903)	Homme	Chien, rat
	<i>L. (L.) killicki</i> (Rioux <i>et al.</i> , 1986)	Homme	
	<i>L. (L.) aethiopica</i> (Bray <i>et al.</i> , 1973)	Damans	
	<i>L. (L.) major</i> (Yakimoff et Schokhor, 1914)	Gerbillidés	
LT	<i>L. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	Rongeurs	
	<i>L. (L.) amazonensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)	Rongeurs	
	<i>L. (L.) aristidesi</i> (Lainson et Shaw, 1979)	Rongeurs, Marsupiaux	
	<i>L. (L.) enriettii</i> (Muniz et Médina, 1948)	Cobayes	
	<i>L. (L.) deanei</i> (Lainson et Shaw, 1977)	Coendous	
	<i>L. (L.) hertigi</i> (Herrer, 1971)	Coendous	
	<i>L. (V.) braziliensis</i> (Vianna, 1911)	Inconnu	Rongeurs, Marsupiaux, chiens
	<i>L. (V.) guyenensis</i> (Floch, 1954)	Paresseux, Tamandua	
	<i>L. (V.) panamensis</i> (Lainson et Shaw, 1979)	Paresseux	Singes, Kinkajou
	<i>L. (V.) lainsoni</i> (Silveira <i>et al.</i> , 1987)	Agouti paca	
	<i>L. (V.) naiffi</i> (Lainson et Shaw, 1979)	Tatous	
	<i>L. (V.) shawi</i> (Lainson <i>et al.</i> , 1989)	Singes, Carnivores, Paresseux	

4-5/Le cycle évolutif:

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, l'insecte Phlébotome femelle et un mammifère (Figure 16).

- ✓ Les promastigotes de *Leishmania* sont introduits dans les capillaires sanguins par la piqûre du vecteur (1).
- ✓ A l'intérieur, ils pénètrent le macrophage par phagocytose (2).
- ✓ Les parasites sont enfermés dans une vacuole (3) et soumis à une série d'attaques de la part du système de défense du macrophage pour l'éliminer, ceci inclut la libération d'oxyde nitrique et des hydrolases lysosomales.
- ✓ Le parasite se protège de ces attaques et, sous la forme d'amastigotes (4,5), se reproduit à l'intérieur du macrophage jusqu'à la mort de celui-ci, (7) ce qui libère les parasites (8) qui vont pouvoir infecter d'autres macrophages.
- ✓ Le cycle est complété lorsqu'un vecteur prend du sang de l'hôte infecté, les macrophages libèrent les amastigotes à l'intérieur du vecteur (10).
- ✓ Les amastigotes se transforment en promastigotes (11). Le flagelle qui apparaît sur cette forme leur permet de se fixer sur les microvillosités de l'endothélium digestif (12) pour se multiplier, migrer vers le tractus digestif (13) et être libérés dans le proboscide (14) pour être transmis lors d'une prochaine piqûre (Alvar, J. P. 2001).

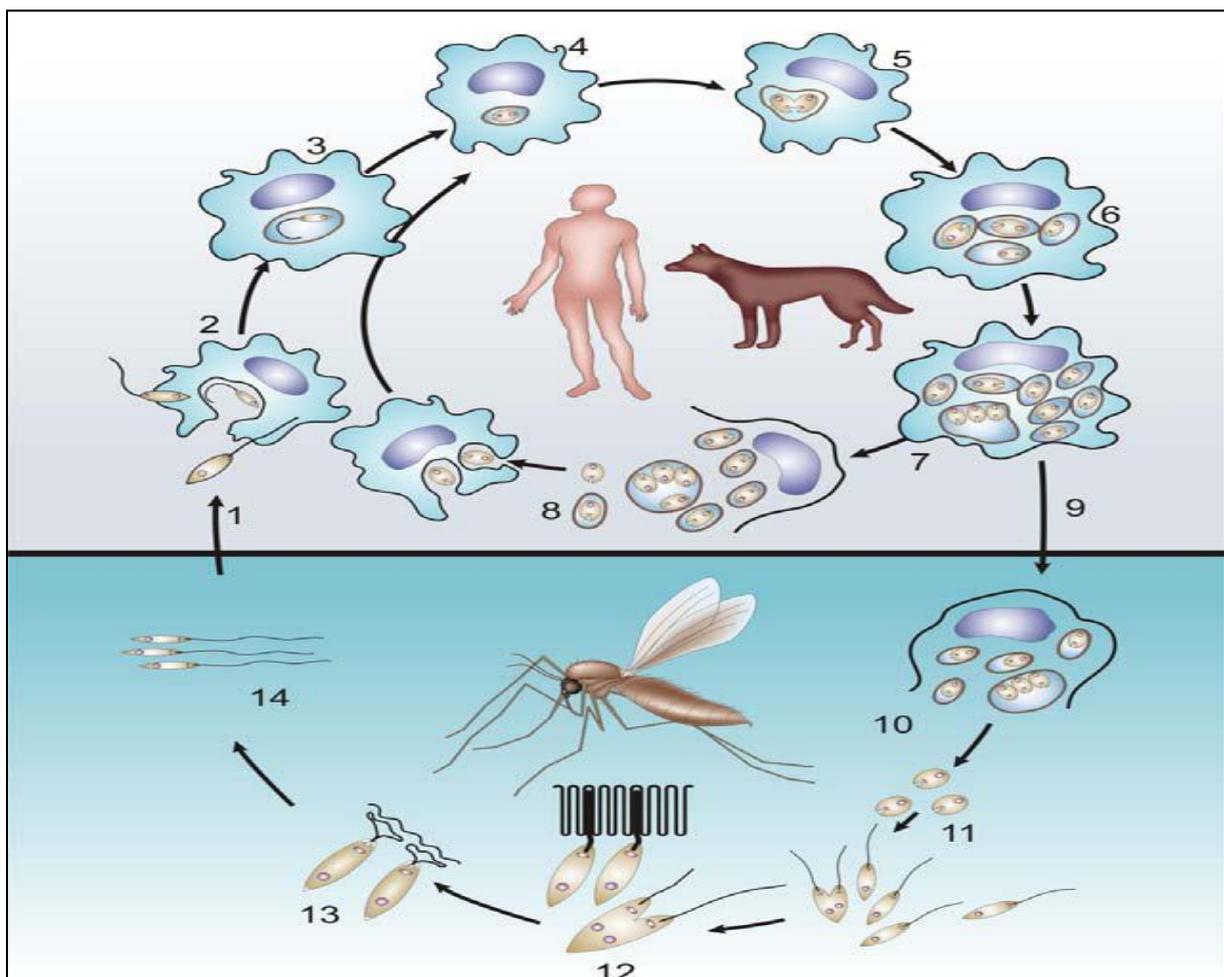


Figure 16: cycle évolutif de leishmaniose (Alvar, J. P. 2001).

5/Diagnostic de la leishmaniose:

5-1/Diagnostic clinique:

➡ La leishmaniose viscérale :

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

➡ La leishmaniose cutanée :

Le polymorphisme des leishmanioses cutanées est tel qu'elles peuvent simuler de nombreuses autres dermatoses: furoncle, tuberculose, syphilis, lèpre, mycose, épithélioma.

L'absence de douleurs, sauf en cas de surinfection, le siège aux zones découvertes et la chronicité sont les caractères distinctifs cliniques fondamentaux.

En pratique, chez une personne ayant séjourné ou habitant en zone d'endémie, toute lésion cutanée persistant plus de 2 semaines et rebelle aux traitements classiques doit faire évoquer le diagnostic de leishmaniose. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

5-2/Diagnostic biologique:

➡ Signes de présomption (pour la leishmaniose viscérale) :

* L'hémogramme met en évidence une insuffisance médullaire:

- une anémie normochrome.
- une leuconéutropénie constante parfois importante autour de 2000 GB/mm³.
- une thrombopénie modérée.

* La vitesse de sédimentation est toujours augmentée dépassant 100 mm à la première heure.

➡ Diagnostic direct :

Prélèvement :

***La leishmaniose viscérale :** C'est le prélèvement de moelle qui est indiqué en première intention. Il se fait soit par ponction sternale ou de la crête iliaque.

Le prélèvement est douloureux et doit être réalisé par un personnel médical expérimenté en milieu hospitalier avec observation scrupuleuse des règles d'asepsie. La moelle prélevée servira à la confection de frottis mince ou pour la culture. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

***La leishmaniose cutanée :**

- **Raclage des lésions:** l'ulcération cutanée est soigneusement désinfectée après avoir enlevé les croûtes qui la recouvrent. Le raclage est réalisé par un vaccinostyle stérile dans la partie infiltrée loin des zones surinfectées. Le produit de raclage et le recueil des sérosités serviront à la confection des frottis ainsi que pour la réalisation des cultures.

- **Biopsie cutanée:** elle se fait à l'aide d'un punch. Elle permet de réaliser des coupes histologiques, des appositions sur lame ou des cultures après broyage du prélèvement. La

biopsie est indiquée lors de lésions papulo-nodulaires non ulcérées. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Mise en évidence des parasites sur le frottis :

Les frottis de moelle osseuse ou des sérosités cutanées sont fixés et colorés au GIEMSA.

Les leishmanies sont recherchées au microscope optique (objectif *100) avec de l'huile à immersion.

Elles se présentent sous forme amastigote ou micro-amastigotes qui sont des éléments immobiles strictement intracellulaires. Lors de la confection du frottis, les cellules macrophagiques hôtes peuvent éclater et les leishmanies s'en trouvent éparpillées sur le frottis.

Ce sont des éléments ronds ou ovoïdes de 2 à 6µ de diamètre. Le cytoplasme est bleu contenant 2 ponctuations rouges: l'une est grosse excentrée, rouge violacée correspondant au noyau, l'autre est bacilliforme rouge vermeil correspondant au blepharoplaste. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

La culture :

La culture est réalisée sur milieu NNN (Novy-Nicolle-Mc Neal), avec ajout ou non de liquide nutritif.

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

La culture est utile pour:

- le diagnostic quand cela est possible. Elle permet de mettre en évidence des formes promastigotes après 4 à 30 jours de culture. Ce sont des formes flagellées mobiles et libres.
- une identification d'espèces avec des techniques enzymatiques. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Typage par la Polymérase Chain Réaction (PCR) :

L'identification des espèces de *Leishmanie* demeure impossible à faire par microscopie optique. Différentes techniques sophistiquées ont été mises au point, visant la recherche de l'ADN du parasite en utilisant le procédé d'amplification génique par Polymérase Chain Réaction (PCR) (**Reithinger, 2007**).

✓ La PCR classique :

La PCR classique passe par des étapes d'extraction, d'amplification et une visualisation de l'ADN par électrophorèse.

✱ Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des leishmanies peut être mise au point par de nombreux protocoles à savoir l'extraction classique par l'usage du couple phénol-chloroforme ou même l'usage de la résine Chelex (**Reithinger et Dujardin J.C., 2007**).

Aussi, cette extraction peut être réalisée par un ensemble de kits commercialisés dont :

- Le kit sigma (**Pizzuto et al., 2001**)
- Le kit Easy-DNA produit par Invitrogen (**Bossolasco et al., 2003**)
- Le QIAamp DNA Mini Kit (**Wilber Quispe Tintaya et al., 2004**)
- Le kit DNeasy Blood Tissue produit par Qiagen (**Mahdy et al., 2010**)

Ces kits présentent plusieurs avantages puisqu'ils facilitent et simplifient les opérations de purification d'ADN, mais leur coût reste beaucoup plus élevé que celui de l'extraction classique.

✦ Amplification

Le principe de l'amplification par PCR de l'ADN des leishmanies consiste à utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice en utilisant des amorces spécifiques. L'amplification permet à la PCR d'être largement utilisée vu sa sensibilité qui permet de détecter un seul fragment d'ADN.

Plusieurs régions peuvent être ciblées par la PCR qu'elles soient codantes ou intergéniques non codantes du gène gp63, du SLME (Splice Leader Mini Exon), ou même SSU rRNA pour l'identification du parasite (**Marfurt J. et al., 2003**).

L'étude de Bensoussan et al. en 2006 qui a concerné la comparaison entre les différents PCR utilisés dans le diagnostic de la leishmaniose a démontré :

- Une sensibilité très élevée de l'amplification de l'ADN kinétoplaste (98,7%)

L'ADN-K contient presque 1000 mini-cercles par cellule avec presque 800 pb dont 200 identiques et 600 différents. (**Aviles et al., 1999 ; Battacharyya et al., 1996 ; Nuzum et al., 1995**).

- Une sensibilité élevée de l'amplification de la partie transcrite interne ribosomale ou la région ITS1 (91%) . L'amplification de la région ITS1 reste la plus utilisée étant donné que cette région est polymorphe entre les différentes espèces de *Leishmania*.

- Une sensibilité de (53,8%) pour l'amplification de la région SLME (**Bensoussan et al., 2006**).

Même si l'amplification de l'ADN kinétoplaste prouve une sensibilité très élevée, celle de la région ITS1 (partie transcrite interne ribosomale) reste la plus utilisée étant donné que cette région est polymorphe entre les différentes espèces de *Leishmania*. La digestion de son amplicon ITS1 avec les enzymes telles que Hae III, HhaI, MnlI ou RsaI permet de distinguer entre les espèces de *Leishmania* (**Schonian G. et al., 2003**).

La Ln PCR ou nested (PCR) cible l'amplification des parties variables du gène SSU rRNA de *Leishmania*, elle est basée sur des amorces de PCR précédemment décrite par van Eys et al. (1992). Les amorces utilisées dans la première PCR (R221 et R332) sont spécifiques à l'ordre des Kinetoplastida mais non exclusivement pour *Leishmania*, un résultat positif doit donc être confirmée par une deuxième PCR qui utilise des amorces spécifiques de *Leishmania* R223 (5'- TCC CAT CGC AAC CTC GGT T - 3') et R333 (5'- AAA GCG GGC GCG GTG CTG - 3') (**Cruz I. et al., 2002**).

✦ Electrophorèse

Après l'obtention des différents types de produits PCR, ces derniers sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (**Cruz I. et al., 2002**) ou de polyacrylamide permettant ainsi d'analyser la présence et la taille des acides nucléiques présents dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium (BE), un colorant dont la fluorescence augmente très remarquablement quand il interagit avec l'ADN.

A côté de la PCR classique on retrouve d'autres types de PCR , on cite :

✓ La PCR quantitative en temps réel:

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière (Epsy M. J. et al., 2006). Cette technique permet d'éviter la phase post-PCR c'est-à-dire la migration sur gel d'agarose, donc elle est plus rapide, limite les risques de dissémination de l'ADN et les contaminations et permet une évaluation quantitative de l'ADN contenu dans les prélèvements ce qui a un intérêt pour le suivi de la maladie (Bossolasco S. et al., 2003).

✓ La PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA):

Elle permet la détection de l'ADN de *leishmania* et la visualisation des produits de PCR en utilisant un dosage colorimétrique. Il s'agit d'une "hybridation inverse" ; méthode basée sur la capture des amplicons de PCR par des sondes spécifiques immobilisées dans des puits de microtitration ELISA et la visualisation colorimétrique (De Doncker et al., 2005).

La détection des espèces de leishmanies a été également pratiquée par PCR Oligochromatography assay. La région cible est la partie cystéine protéinase b (cpb). Les produits PCR sont visualisés en 5 min sur une bandelette par hybridation avec une sonde d'or conjuguée (Marfurt J. et al., 2003).

✓ Le séquençage

Il permet la détection de l'ADN des espèces de *Leishmania* en déterminant l'ordre d'enchaînement de ses nucléotides.

Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994. Ce projet de séquençage a débuté avec la souche *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin. Son génome d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0,3 à 2,8 Mb. Il faut noter que certaines espèces de *L. major* n'ont que 34 ou 35 chromosomes (Britto C. et al., 1998), mais la complexité du génome est globalement conservée. Actuellement, plus de 34 Mb de séquences ont été accumulées dans les banques de données. La séquence des chromosomes 1, 3, 4, 5, 15, 24, 25 et 31 est terminée et le génome de *Leishmania* est régulièrement annoté. L'analyse des données disponibles a révélé une densité de 1 gène/3,5 kb avec très peu de séquences répétées.

Les gènes sont organisés de façon particulière puisqu'ils font partie de larges unités polycistroniques. Ainsi sur le chromosome 1, il y a une unité de 29 gènes sur un brin d'ADN et de 50 gènes sur l'autre brin (Myler P.J. et al., 1999).

Typage enzymatique :

C'est la technique de référence qui permet de trouver le zymodème des espèces par l'analyse biochimique des isoenzymes, afin d'adapter les méthodes de lutte au réservoir de parasites qui diffère d'une espèce à l'autre. (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010).

Celle-ci fait appel à deux techniques : l'électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques (Rioux J.A. et al., 1990) et l'isoélectrofocalisation (Piarroux R. et al., 1994).

➡ **Diagnostic indirect ou immunologique:**

Concernant les leishmanioses cutanées, l'immunodiagnostic est peu opérant puisque la sérologie est rarement positive et à des taux d'anticorps très faible. L'IDR de Monténégro, malgré sa sensibilité, a peu de valeur diagnostique en zone endémo-épidémique car elle reste indéfiniment positive après une contamination. Elle garde toutefois un intérêt épidémiologique. Par contre pour la leishmaniose viscérale, la sérologie offre une approche diagnostique très appréciable. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Les techniques les plus utilisées sont l'immunofluorescence indirecte qui reste le test de référence et la technique Enzyme Linked Immuno Sorbent qui a les mêmes qualités que la précédente. Le test d'agglutination direct, de mise au point récente, est un excellent test de dépistage, d'utilisation plus facile et donc à la portée de laboratoires périphériques. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Immunofluorescence indirecte (IFI) :

La technique d'immunofluorescence consiste à faire réagir les sérums avec les antigènes figurés déposés sur des lames. Les éventuels anticorps spécifiques sont révélés par des antiglobulines conjuguées à une substance fluorescente.

Cette technique est largement utilisée parce qu'elle est facile à réaliser. L'épreuve est spécifique de genre, bien que des réactions croisées significatives aient été signalées chez des individus infectés avec *Trypanosoma cruzi*.

Dans les régions sans maladie de Chagas, l'épreuve d'IFI a une sensibilité de 96 % et une spécificité de 98 %, semblables à celles des réactions immuno-enzymatiques (ELISA). (**Manuel terrestre de l'OIE 2005**).

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA):

C'est une technique qui utilise des antigènes solubles fixés par absorption sur l'alvéole des plaques de microtitration. Les anticorps qui viennent s'y fixer sont révélés par des antiglobulines humaines liées par une enzyme (souvent la peroxydase) qui, en agissant sur un substrat incolore entraîne l'apparition d'une coloration plus ou moins intense en fonction de la quantité d'enzymes présentes, donc du complexe anticorps-antiglobulines humaines fixés.

La lecture se fait soit à l'œil nu, après dilutions successives, le titre étant l'inverse de la plus forte dilution ayant donné un résultat encore positif, soit au spectrophotomètre, par la mesure d'une densité optique sur une seule dilution (**Kamoun et Fréjaville, 2002**).

Cette technique a les mêmes qualités de sensibilité et de spécificité que l'IFI. Elle permet une lecture objective et de traiter une grande quantité de sérum lors d'une étude séro-épidémiologique. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Test d'agglutination direct (DAT):

Cette technique est plus simple et peut être pratiquée dans un laboratoire périphérique peu outillé. Sa sensibilité élevée lui confère sa qualité de test de dépistage malgré une spécificité modérée. (**Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010**).

Le principe de ce test est basé sur la mise en évidence de l'agglutination formée après incubation de l'antigène et l'anticorps est visible à l'œil nu. Ce test est simple et permet

l'analyse d'un grand nombre de prélèvements, c'est pour cela qu'il est largement utilisé au cours des épidémies. (Meredith et al., 1995).

Hémagglutination indirect (HAI):

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

L'Électrosynerèse :

Cette méthode encore appelée contre-immunoelectrophorèse, elle a comme principe l'utilisation au cours d'une électrophorèse du courant électrique, celui-ci provoque la migration élective, au sein du gel, des Ac vers la cathode, tandis que l'Ag migre vers l'anode. La rencontre entre l'Ag et l'Ac se concrétise par l'apparition de raies de précipitation.

Intradermoréaction de Montenegro à la leishmanine :

C'est une réaction d'hypersensibilité retardée provoquée par l'injection intradermique de promastigotes de culture, lavés et mis en suspension dans une solution saline contenant 0,5 p.100 de phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance (il n'y a pas de spécificité d'espèce). La "leishmanine" contient un million de parasites par ml. La dose individuelle comporte 0,1 ml, c'est-à-dire 100.000 parasites. Une injection de 0,1 ml de solution phénolée sans parasites est faite à proximité, comme témoin d'une éventuelle sensibilité du patient au phénol. Après 48 à 72 heures, une réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème. On facilite la mesure en traçant, sur la peau avoisinante et suivant les diamètres, des lignes qui s'arrêtent au bord de l'induration. Les degrés sont exprimés de 1 à 4, d'après le diamètre (de < 4 mm à > 8 mm). Cette réaction est positive chez les sujets ayant fait une leishmaniose viscérale antérieurement. Elle reste positive après la guérison pendant toute la vie du patient et est utilisée en épidémiologie du kala-azar. Pour les leishmanioses cutanées, elle peut aider au diagnostic.

6/Traitement de la leishmaniose:

6-1/ Médicaments:

La leishmaniose se manifeste de différentes manières ce qui conditionne le traitement à suivre (posologie, voie d'administration) et l'efficacité de celui-ci. Parmi les composés les plus utilisés pour combattre toutes les formes de leishmaniose, se trouvent: les antimonies pentavalents, l'amphotéricine B, la pentamidine et la miltéfosine.

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**), mais au cours de ces dernières années ; on a noté à plusieurs reprises une résistance à ce médicament surtout pour le traitement de la LV. Les médecins au niveau hospitalier réclament

son remplacement par l'Amphotéricine. Reste la démarche à suivre pour sa prise en charge par l'état et sa disponibilité sur le marché.

6-2/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, ce 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.

Des vaccins préparés à partir de la protéine gp 63 de la membrane de la leishmanie, ainsi que l'utilisation de bactéries (BCG, Typhimurium) ou de virus recombinant exprimant le gp 63 sont en cours d'études actuellement, cependant aucun vaccin n'est commercialisé à ce jour (**Ajjan N., 2009**).

7/Prévention et lutte:

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.
- ✓ **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 précoces 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 à tous les niveaux.

II/LES LEISHMANIOSES AU MAROC:

1/Historique:

Au Maroc, comme dans la plupart des pays circumméditerranéens, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. Qu'elles soient zoonotiques ou anthroponotique, cutanées ou viscérales. (**Rhajaoui M., 2011**). La situation est devenue préoccupante dès les années 1970 et continue à l'être jusqu'à nos jours. Avec les mouvements de la population, les aménagements hydrauliques, la surpopulation, l'urbanisation non planifiée..., la maladie a pris beaucoup plus d'ampleur ces dernières années, et on a noté l'apparition de nouveaux foyers leishmaniens.

La leishmaniose cutanée est connue au Maroc depuis près d'un siècle. Elle était considérée comme une affection sporadique.

*En 1913 Remlinger rapportera la première observation de leishmaniose infantile et la publia

*En 1914, Foley *et al.*, signale l'existence dans le sud marocain du bouton d'orient à l'état endémique. Des cas de bouton d'Orient ont été rapportés à Figuig

en 1921. D'autres observations ont été rapportées : à Meknès par Kippel et Monier Vinard en 1922, à Ouazzane par Fabien Luengo en 1929 et à Kalâat Sraghna par Blanc en 1933.

*En 1925, Leblanc a rapporté des cas de bouton d'orient à Figuig (**Souhail, 1994**) et dans l'Atlas marocain (**Colonieu, 1931**).

*A partir de 1957, plusieurs travaux ont été réalisés. En effet, Cadi Soussi, M. et al. (1974) ont étudié la répartition géographique de la leishmaniose viscérale et cutanée au Maroc.

*A partir de 1977 avec l'arrêt des opérations d'aspersion au DDT contre le paludisme dans le sud du pays, elle a commencé à se développer sur le mode épidémique. Plusieurs poussées épidémiques éclatent alors au sud de l'Atlas dans les zones subsahariennes, dues à *L. major* (**Rioux et al., 1986**).

*Avant 1993, l'absence d'un système de recueil de l'information épidémiologique concernant les leishmanioses fait que les données disponibles ne reflètent guère la situation épidémiologique réelle.

*A partir de Mars 1995, les leishmanioses sont devenues des maladies à déclaration obligatoire ce qui a permis une meilleure connaissance de leur profil épidémiologique à l'échelle nationale. « (**Arrêté ministériel N° 683-95 du 31 mars 1995**) »

La situation des différentes leishmanioses peut être illustrée en trois entités épidémiologiques (**Laamrani-Idrissi, 2000**) : la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*, leishmaniose cutanée anthroponotique à *L. tropica* et leishmanioses cutanée et viscérale à *L. infantum*.

2/Répartition géographique:

Les leishmanioses sont largement représentées, depuis les montagnes du Rif jusqu'aux palmeraies perarides des piémonts de l'Anti-Atlas (Figure 17).

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

- ✗ La leishmaniose viscérale (LV) répartie principalement au Nord du Maroc.

- × La leishmaniose cutanée (LC) observée dans le centre du pays, le Sud et le Sud–Est de la chaîne de l’Atlas. (Rhajaoui M., 2011).

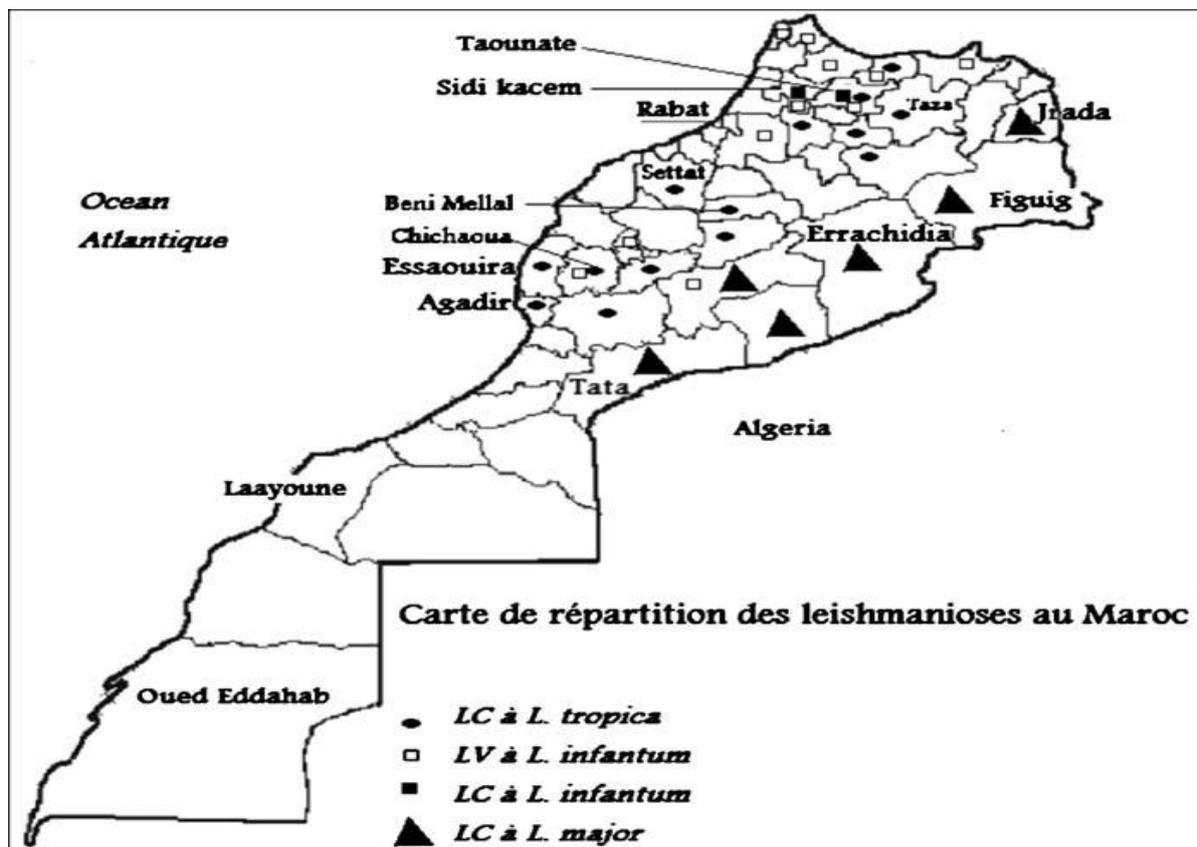


Figure 17: Carte de répartition des leishmanioses au Maroc. (Rhajaoui M., 2011).

2-1/La leishmaniose viscérale à *L. infantum* :

La leishmaniose viscérale au Maroc est due à *L. infantum* dont le zymodème MON 1 est le plus commun sur le pourtour méditerranéen (Rioux et al., 1983) et dont le principal vecteur est *Phlebotomus perniciosus* et le réservoir du parasite est le chien. Le *Phlebotomus ariasi* a été démontré comme vecteur de *L. infantum* dans la province de Taounate. (DELM 2010).

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 M., 2011).

A travers une étude synthétique réalisée au LNRL sur la leishmaniose viscérale (données épidémiologiques et parasitologiques sur la LV au Maroc, Oumar Fall Djeinaba en 2011), on a démontré que cette affection se localise dans les régions du Rif et du pré-Rif (Nador, Al Hoceima, Tétouan, Taza, Taounate, Sidi Kacem, Fès et Méknès) sans pour autant exclure d'autres régions du pays. En effet cette maladie s'étend plus au sud sur le versant septentrional du Haut Atlas. On a déclaré des cas de la L.V au cours des années au niveau d’un ensemble de 55 provinces d’une manière très dispersée. Ceci peut s’expliquer par la succession géographique des vecteurs, jusqu’au Sahara (bulletin épidémiologique, 1999).

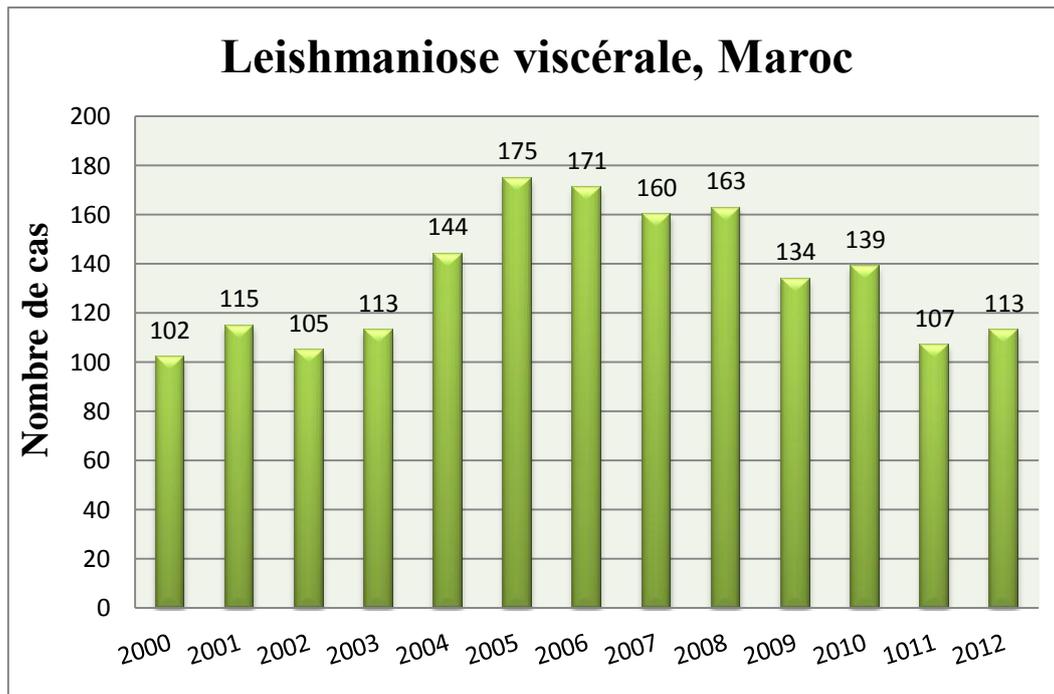


Figure 18: Evolution des cas de la leishmaniose viscérale, Maroc, DELM, 2012.

2-2/La leishmaniose cutanée à *L.major* ou LC zoonotique:

Au Maroc, la leishmaniose à *L.major* est localisée dans un macro-foyer s'étendant de la côte atlantique au Sud de l'Anti-Atlas jusqu'à la région d'Oujda passant par les zones sahariennes au Sud du Haut et de l'Anti Atlas et à l'Est du Moyen Atlas.

Il s'agit de palmeraies bien délimitées formées de douars ou de ksours de petite ou moyenne importance longeant des oasis ou de zones périurbaines formées d'habitat insalubre. (DELM 2010).

Le premier foyer est identifié au sud de l'Anti-Atlas, dans les palmeraies de l'oued Tata où une importante épidémie de leishmaniose cutanée s'était manifestée à la fin des années 1970. Après l'épidémie de Tata, deux nouveaux foyers ont été identifiés : un à Ouarzazate et l'autre à Oujda (Rioux et al., 1986a et b).

La transmission du parasite depuis le réservoir à l'homme se fait par le biais du *Phlebotomus papatasi* abondant dans les douars contaminés (Adler S et al., 1941 ; Rioux JA et al., 1986b).

L'analyse enzymatique des isolats obtenus au tout début de l'épidémie a permis d'identifier *L.major* MON-25 (Maazoun et al., 1986), seul zymodème en cause sur l'ensemble du Maghreb.

L'infestation intra-vectorielle est mise en évidence dans le douar d'Akka-Ighan (Est de Tata) par l'identification d'une femelle de *P. papatasi* porteuse de promastigotes de *L. major* (Rioux et al., 1986b).

L. major s'observe exclusivement dans les étages bioclimatiques aride et péri-aride. L'espèce vectrice est *P. papatasi* et sa densité croît avec l'augmentation de l'aridité. Les principaux acteurs du cycle ont pu être identifiés par l'isolement du parasite (*L. major* MON-25) chez l'homme, le vecteur et le réservoir *Meriones shawi* (Rioux et al., 1982).

L'infestation humaine se fait à partir d'un seul réservoir: *Meriones shawi* chez qui l'infestation dure toute la vie (1 à 3 ans). Ce gerbillidé vit en contact étroit de l'homme dans les palmeraies. Son développement et sa multiplication sont favorisés par l'existence d'ordures ménagères à proximité des maisons (micro-foyer). (DELM 2010)

L'évolution du nombre de cas de LC à *L.major* répertorié au Maroc depuis 2000 jusqu'à 2012 est décrite dans la figure ci-dessous, réalisé à partir des données épidémiologiques du ministère de la santé du Maroc.

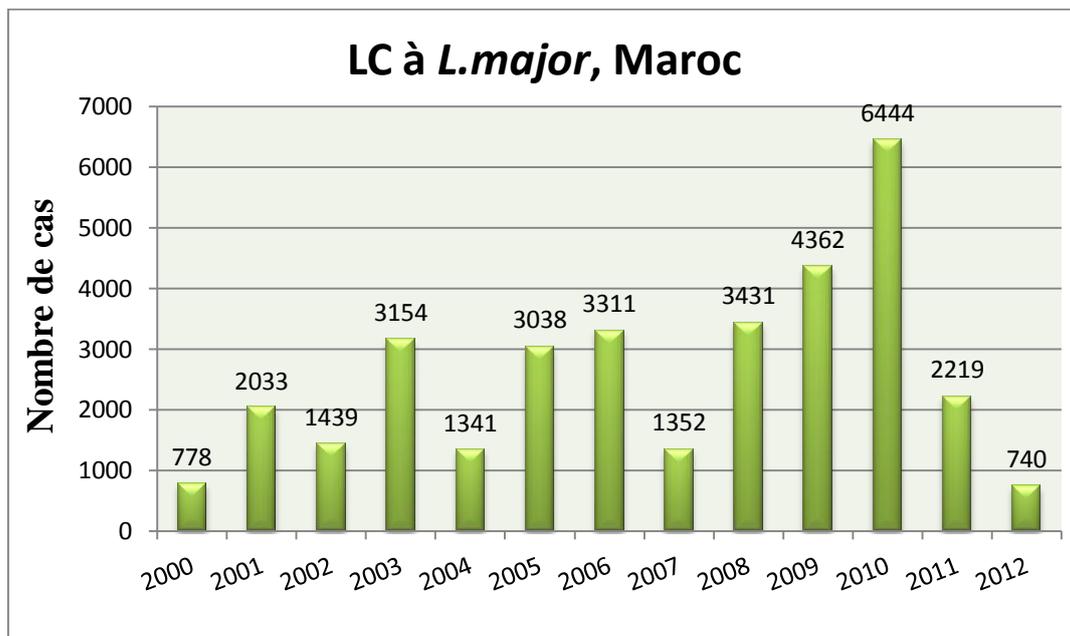


Figure 19: Evolution des cas de la LC à *L. major*, Maroc, DELM, 2012.

2-3/La leishmaniose cutanée à *L.tropica*:

Cette forme de leishmaniose sévit dans les zones semi-arides du pays allant de la région de l'Ouest aux plateaux péri-Réfin de Taza à l'Est en passant par le versant Ouest de la chaîne de l'Atlas touchant le centre du pays dans les régions de Marrakech, Béni Mellal, Meknès, Fès, et le Nord du pays. Dans ces régions la maladie s'observe dans des douars ruraux situés entre 400 et 1000 mètres d'altitude au voisinage de vastes forêts de Thuya (méso-foyer).

Dans ce biotope, commun à plusieurs régions du Maroc, la maladie évolue sous forme hypodémique avec un nombre réduit de cas. (DELM 2010)

La leishmaniose cutanée à *L. tropica* MON 102 est une anthroponose dont le vecteur prouvé est *P.sergenti* (Guilvard *et al.*, 1991).

Le premier cas de 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 al.*).

Depuis lors, les atteintes leishmaniennes dues à *L. tropica* ne cessent pas d'apparaître. Un grand foyer, s'étendant sur une superficie d'environ 40 000 km² 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* dans notre pays (Guilvard *et al.*, 1991).

D'autres foyers, comparables à celui de Tanant, ont été identifiés à Smimou (**Pratlong et al., 1991**) à Taza (**Guessous Idrissi, 1999**), Zouagha My Yacoub (**Rhajaoui et al., 2004, Fellah et al., 2007**) et Chichaoua (**Guernaoui et al., 2005a, 2006a et Bacaër et Guernaoui, 2006**).

L'identification des souches isolées chez l'homme, le chien et le vecteur (*P. sergenti*) a montré une diversité interfocale de ces leishmanies. En effet, le typage enzymatique des leishmanies a montré la présence de sept zymodèmes de *L. tropica* à savoir :

L. tropica MON102, MON107, MON109, MON112, MON113, MON122 et MON 123 (**Pratlong F et al., 1991**).

Seuls les zymodèmes MON 102 (majoritaire), MON 107, MON109, MON 112 et MON 113 ont été isolés chez l'homme.

Chez le chien, ils s'agissaient de MON 113 (majoritaire), MON102. Alors que chez le vecteur *P. sergenti*, on a trouvé le MON 107 (majoritaire), MON 123, MON 122 et MON 102 (**Pratlong F et al., 1991**).

A Azilal, tous les zymodèmes identifiés étaient présents, à l'exception du MON 113. A la province d'Essaouira on a trouvé le MON 102 et MON 113 et au Sud (Agadir-Guelmim), seul était présent le MON 107 (**Pratlong F et al., 1991**).

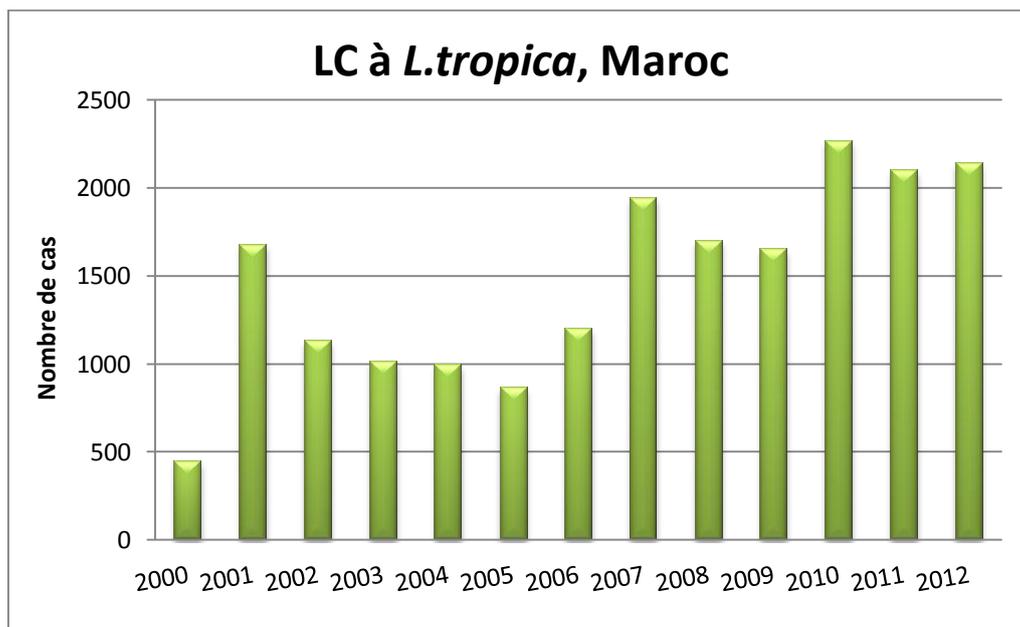


Figure 20: Evolution des cas de la LC à *L.tropica*, Maroc, DELM, 2012.

2-3/La leishmaniose cutanée à *L.infantum* :

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 JA et al., 1996**).

Le premier cas marocain a été dépisté, dans le Rif central à Taounate. 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 M et al., 2007**).

PARTIE II

MATERIELS ET METHODES

Cette partie présentera la zone d'étude, le laboratoire d'accueil, la période d'étude ainsi que les méthodes utilisées pour collecter les données.

I/Zone d'étude:

Notre étude concerne la province d'Essaouira qui appartient à la région de Marrakech Tensift El Haouz.

1/Présentation de la région Marrakech-Tensift-El Haouz :

La région de Marrakech Tensift Al Haouz est l'une des 16 régions du Royaume créées par Décret n° 2-97-246 du 13 Rabiâ II (17 août 1997) complétant le Dahir n° 1-97-84 du 23 Dou Al Kaâda 1417 (2 avril 1997).

Elle s'étend sur une superficie de 31 160 km² et compte près de 3 millions d'habitants, soit une densité de 87 habitants au km². La superficie de la région représente 4,4% de la superficie totale du pays.

Elle est limitée au Nord par la région de Chaouia-Ouardigha, au Nord Ouest par la région de Doukkala-Abda , à l'Est par la région de Tadla Azilal , au Sud par la région de Souss-Massa-Drâa et à l'Ouest par l'Océan Atlantique.

Elle est composée de quatre provinces et une préfecture : Chichaoua, Al Haouz, El Kalâa des Sraghna et Essaouira puis la préfecture de Marrakech chef lieu de la région (Figure 22).

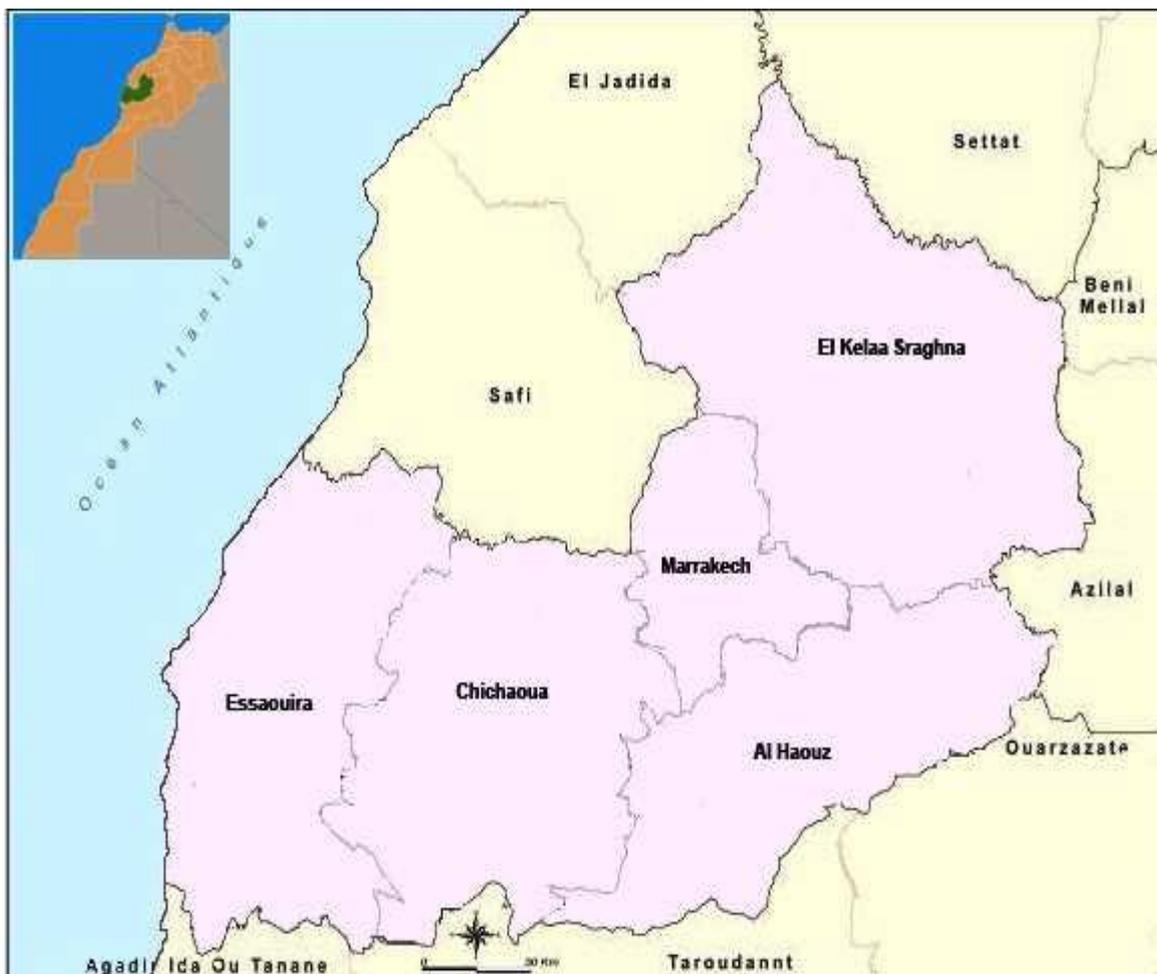


Figure 22: Découpage administratif de la région de Marrakech Tensift Al Haouz.
(Monographie de la région Marrakech Tensift el Haouz, 2004)

2/PRESENTATION DE LA PROVINCE D'ESSAOUIRA:

2-1/Découpage administratif:

La province d'Essaouira est composée de :

- ✓ 5 Communes urbaines ou municipalités.
- ✓ 2 Cercles.
- ✓ 7 Caïdats.
- ✓ 52 Communes rurales.

Tableau 5: communes rurales et urbaines de la province d'Essaouira (DIRECTION REGIONALE DE MARRAKECH-TENSIFT-AL HAOUZ 2006)

Province	Communes urbaines	Communes rurales
Province d'Essaouira	AIT DAOUD EL HANCHANE ESSAOUIRA TALMEST TAMANAR	MZILATE, SIDI M'HAMED OU MARZOUQ, M'RAMER, SIDI BOULAALAM, SIDI AISSA REGRAGUI, TAKATE, OULAD M'RABET, TAFETACHTE, MEJJI, KECHOULA, MOULAY BOUZARQTOUNE, OUNAGHA, HAD DRA, MESKALA, MOUARID, KORIMATE, LAHSINATE, AIT SAID, LAGDADRA, SIDI ISHAQ, SIDI ALI EL KORATI, AQUERMOUD, ZAOUIAT BEN HMIDA, M'KHALIF, SIDI ABDELJALIL, SIDI LAAROUSSI, ADAGHAS, ASSAIS, BOUZEMMOUR, AGLIF, TAKOUCHT, SIDI GHANEME, EZZAOUITE, TAHELOUANTE, BIZDAD, SIDI KAOUKI, AGUERD, SIDI H'MAD OU HAMED, TIDZI, SIDI EL JAZOULI, IMI N'TLIT, SMIMOU, TAFEDNA, SIDI AHMED ESSAYEH, IDA OU AAZZA, TIMZGUIDA-OUFTAS, AIT AISSI IHAHANE, IDA OU KAZZOU, IDA OU GUELLOUL, SIDI HMAD OU M'BAREK, IMGRADE, TARGANTE

2-2/Cadre climatique:

Le climat de la province est un microclimat légèrement doux et variable. Les températures annuelles varient entre 18°C et 23°C. Le climat présente aussi une diversité tant du point de vue des températures que des précipitations. Ceci est dû à l'encadrement océanique (Atlantique) d'un côté et la hauteur des montagnes de l'autre. La pluviométrie annuelle

moyenne est relativement faible, elle dépasse rarement les 300m/m. (**Monographie de la région de Marrakech Tensift el Haouz, 2004**)

2-3/Cadre géographique :

La province d'Essaouira est Située sur le versant occidental du grand Atlas, elle est délimitée au nord par la province de Safi, au Sud par la préfecture d'Agadir et la province de Taroudante, à l'Est par la province de Chichaoua et à l'Ouest par l'Océan Atlantique avec une côte qui s'étend sur 153 km environ. Le relief de la région est caractérisé par 3 zones distinctes :

- ✓ une zone montagneuse du haut Atlas occidental (le point culminant est à 1400m d'altitude).
- ✓ la plaine côtière.
- ✓ la zone du Dir qui fait la transition entre la plaine côtière et la zone montagneuse.

La province d'Essaouira figure parmi les provinces les plus boisées au Maroc avec un taux de couverture forestière qui atteint les 44%.

La Superficie de la province est de : 6 335 km². ((**Monographie de la région de Marrakech Tensift el Haouz, 2004**)

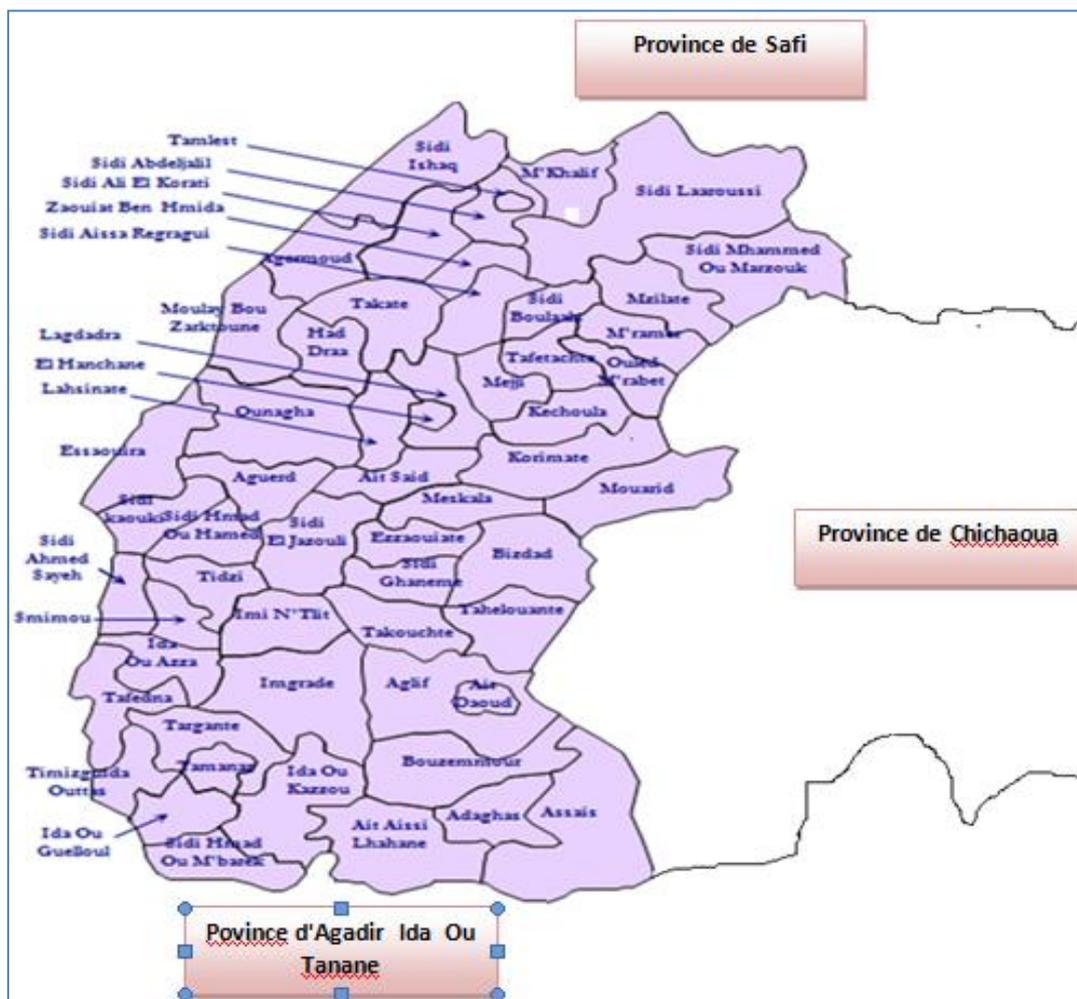


Figure 23: La répartition des secteurs dans la province d'Essaouira (délégation provinciale d'Essaouira).

2-4/Données démographiques:

Selon les données du RGPH 2004, la population de la province s'élève à 452 979 dont 21% urbaine. La densité démographique est de 72 habitants/km². En 2012, la population estimée est de 456016 dont 102000 présente la population urbaine et 354015 présentes la population rurale. (Selon la Délégation Provinciale d'Essaouira, Service statistiques)

3/Laboratoire d'accueil:

L'Institut National d'Hygiène (INH) constitue l'organe de référence en matière de biologie médicale et environnementale.

Il garantit une prise en charge efficace des problèmes d'hygiène et d'épidémiologie au Maroc. Son champ d'intervention est très vaste et ses laboratoires jouent le rôle de support technique et scientifique aux différents programmes sanitaires tels que les leishmanioses.

Il est composé de 9 départements (Parasitologie, Microbiologie, Immunologie, Toxicologie, Hydrologie, Génétique, Hygiène alimentaire, biochimie et anatomo-pathologie).

Notre travail s'est déroulé au département de parasitologie composé de 6 laboratoires :

- Immuno-parasitologie
- Leishmanioses et Biologie moléculaire
- Parasitologie générale et bilharziose
- Mycologie
- Paludisme
- Entomologie

Le laboratoire National de Référence des leishmanioses (LNRL) a pour mission :

- ✓ l'installation des laboratoires des leishmanioses au niveau des provinces.
- ✓ le contrôle et la confirmation des lames et sérums reçues de toutes les provinces du Royaume.
- ✓ la formation, la supervision et la dotation des laboratoires provinciaux en matériels et réactifs nécessaires.
- ✓ Le Typage des espèces circulantes des Leishmanies au niveau des foyers actifs et des foyers nouvellement déclarés.

II/PERIODE D'ETUDE:

La période d'étude s'est étalée du mois Mars 2013 au mois d'octobre de l'année 2013.

III/TYPE D'ETUDE:

1/Etude rétrospective:

Notre étude consiste à analyser des fiches de renseignements de patients suspects d'une LC et prélevés au niveau du centre de santé correspondant à son secteur, de 2000 à 2012.

En effet, après le diagnostic microscopique effectué au niveau du laboratoire provincial des maladies parasitaires, les lames accompagnées des fiches de renseignements sont envoyées au LNRL à l'INH pour confirmation et contrôle.

Les fiches de renseignement contiennent les informations suivantes : **Nom, Prénom, Age, Sexe, Secteur, Localité, Type de leishmaniose, Nombre de lésion, Localisation des**

lésions, Aspect des lésions, Taille des lésions, Date de début des lésions, Date du prélèvements...(Annexe 1).

Pour compléter le manque d'information sur certains cas de LC au niveau central, un écrit officiel a été adressé à cette province et un déplacement sur les lieux a été effectué.

Les données collectées ont été exploitées par le logiciel Microsoft Office Excel. L'analyse de la répartition des cas de leishmanioses de la province d'Essaouira s'est faite en fonction des secteurs, de l'âge ainsi que du sexe des sujets atteints.

2/Etude prospective:

Il s'agit d'une étude moléculaire de la leishmaniose par la méthode RFLP-ITS1.

2-1/ Echantillon biologique:

L'étude moléculaire est réalisée sur les lames de frottis cutanés de L.C. des patients originaires de la province d'Essaouira, reçues au niveau du L.N.R.L.

Les lames étudiées sont réparties selon les secteurs cités ci- dessous:

Tableau 6: Lames sélectionnées représentant les secteurs les plus touchés de la province d'Essaouira.

Secteur	Localité	N° de lame	Observation par 10 champs	Lame très riche (> à 100), riche (≥ à 10 et ≤ à 100), moyennement riche (> à 5 et < à 10) ou pauvre (≤ à 5)
Had Draa	Tabia	15498	110/champ	Très riche
Had Draa	Tabia	15452	104/champ	Très riche
Had Draa	Soualeh	5478	65/champ	Riche
Had Draa	Soualeh	38386	29/champ	Riche
Had Draa	Ait allal	8484	33/champ	Riche
Had Draa	Ait hmad	8482	6-7/champ	Moyennement riche
Smimou	Id addi	71852	54/champ	Riche
Smimou	Douar houda	2336	45/champ	Riche
Smimou	Sidi boujir	2328	90/champ	Riche
Smimou	Ait kadour	1100	8/champ	Moyennement riche
Smimou	Sidi bourja	5055	28-30/champ	Riche
Imi N'tlit	Ait hmed	2103	34-36/champ	Riche
Imi N'tlit	Ait ahmane	5124	35/champ	Riche
Elhanchane	Zaouia	2954	52/champ	Riche
Elhanchane	Zaouia	2955	96/champ	Riche
Dhar	Tabrida	2332	130/champ	Très riche

2-2/Diagnostic moléculaire par PCR-ITS1-RFLP:

Pour l'identification du genre *Leishmania*, on a utilisé la méthode PCR-ITS1, qui cible la partie transcrite interne ribosomale 1 dans le ribosome opéron des différentes espèces de leishmanie. Cette PCR est suivie d'une digestion enzymatique qui permet de différencier entre les espèces des *Leishmanias*.

Les étapes de cette méthode sont:

- ✗ L'extraction de l'ADN.
- ✗ L'amplification de la région ITS1.
- ✗ L'électrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser l'ADN du genre *Leishmania*.
- ✗ La digestion enzymatique pour différencier entre les espèces.

2-2-1/Extraction d'ADN:

A/Principe:

L'extraction d'ADN à partir des frottis cutanés est délicate, vu la nature sèche de l'échantillon biologique, sa teneur faible en amastigotes ainsi que le risque de contamination entre les échantillons.

L'extraction par le kit «QIAamp DNA kit » est la méthode utilisée dans cette étude.

Ce kit fournit une purification rapide et facile de l'ADN total des échantillons.

L'ADN purifié est de haute qualité et bien adapté à une utilisation en PCR et d'autres réactions enzymatiques en aval. La procédure d'utilisation de la colonne de purification donne un ADN pur prêt à être utilisé directement en moins d'1 heure. La purification ne nécessite pas l'utilisation du phénol-chloroforme ou la précipitation à l'alcool, et implique un minimum de manipulation. L'ADN est élué dans une solution tampon exempte de protéines, de nucléases et d'autres impuretés ou inhibiteurs. L'ADN purifié est prête pour une utilisation PCR ou d'autres réactions enzymatiques.

B/Matériels nécessaires :

a/ Tampons et solutions:

- Le kit QIAamp ADN contient les solutions et tampons suivants : Tampon ATL, Tampon AL, Tampon AW1, Tampon AW2, Tampon AE et Protéinase K.
- Ethanol (96 à 100%).

b/ Equipements et consommables:

- Micro centrifugeuse réfrigérée.
- Bain Marie à 56°C.
- Colonnes de centrifugation (fournies par le kit).
- Tubes collecteurs (2ml)(fournies par le kit).
- Tubes eppendorfs.
- Cônes stériles de 20, 200 et 1000µl.
- Micropipettes.

C/Méthode:

L'extraction d'ADN par le kit "QIAamp DNA kit" s'effectue selon les étapes suivantes :

- ✗ 100µl du tampon ATL est ajouté sur le matériel tissulaire adhérent sur la lame. Avec un cône stérile les débris sont grattés et aspirés et le mélange en suspension sur la surface de la lame est transféré à un tube marqué de 1,5ml. la procédure est répétée en utilisant un volume total de 200µl du Tampon de lyse.
- ✗ 40 µl de la protéinase K est Ajouté en solution, suivi d'un vortex pendant 15 secondes
- ✗ L'ensemble est Incubé à 56°C pendant 1 heure.
- ✗ 200 µl du Tampon AL est ajouté, son pH convient pour que le produit adhère à la colonne. Cette étape est suivie d'un Vortex pendant 15 secondes.
- ✗ L'ensemble est incubé à 56°C pendant 10 mn.
- ✗ 200 µl de l'éthanol est ajouté.
- ✗ Le mélange est transféré dans la colonne et centrifugé à 8000 tr/mn pendant 1 minute.
- ✗ Le culot est jeté et la colonne est transféré dans un tube neuf.
- ✗ 500 µl de la solution AW1 (Wash Buffer n°1) est ajouté dans la colonne et centrifugé pendant une minute à 8000tr/mn. le culot est jeté et la colonne est transféré dans un tube neuf.
- ✗ Le culot est jeté et la colonne est transféré dans un tube neuf.
- ✗ 500 µl de la solution AW2 est ajouté dans la colonne et centrifuger pendant 3 minutes à 1400tr/mn. (AW2 empêche l'ADN d'être éluée et l'éthanol joue le rôle de purification de l'ADN).
- ✗ Le culot est jeté et la colonne est transférée dans un nouveau tube.
- ✗ Pour éluer les acides nucléique, 50 µl du Tampon AE est ajouté à la colonne associée à un tube eppendorf stérilisé et étiqueté et centrifuger pendant une minute à 8000tr/mn.
- ✗ Le tube eppendorf contient les acides nucléiques élués. L'éluant d'ADN est gardé au réfrigérateur pour une utilisation immédiate dans les 24 heures ou bien stocké à -20°C pour une analyse future.

2-2-2/Amplification par PCR de la région ITS1:

La région ITS1 est amplifiée par PCR selon les protocoles décrits par Al -jawabreh, 2004 et schonian, 2003.

A/Principe:

Cette PCR a pour cible la partie transcrite interne ribosomale 1 (ITS1) dans le ribosome opéron des différentes espèces de leishmanies. Cette région, polymorphe chez les différentes espèces de leishmania, sera amplifiée en utilisant l'extrait d'ADN des lames sélectionnées.

B/Matériel d'étude:

a/Echantillons:

- ✗ Extrait de l'ADN à partir de lames positives de la province d'Essaouira.
- ✗ Les contrôles positifs des trois espèces (*L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*).
- ✗ Le contrôle négatif (eau).

b/Tampons et solutions:

- × Primer 1:
Forward primer (20pmol / μ l) LITSR: 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'
- × Primer 2
Reverse primer (20pmol / μ l) L58S: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'
(Schonian et al., 2003)
- × Eau free DNase water.

c/Equipements et consommables:

- × Thermocycleur.
- × Pipettes de 10,200 et 1000 μ l.
- × Cônes pour pipette.
- × Tubes stériles pour PCR de 0.5 ml.
- × Tubes eppendorfs stériles de 1.5 ml.
- × Tubes ready mix.

C/Technique d'amplification :

- × Préparation du Mix.

Tableau 7: Composition du Master Mix pour l'amplification ITS1.

N°	Mix pour une réaction de volume totale de 25 μ l	
	Composants	Quantité pour un échantillon. μ l
		PCR-ITS1
1	Eau free DNase water	18
2	Primer, Forward, (20pmol/ μ l)	1
3	Primer, reverse, (20pmol/ μ l)	1
Volume total du Mix		20

Les volumes mentionnés dans le tableau pour un seul échantillon, si on a plusieurs échantillons, on va multiplier les volumes par le nombre des échantillons.

- × 20 μ l du Mix et 5 μ l d'ADN des échantillons et des contrôles (positif et négatif) sont ajoutés à chaque tube ready mix.
- × Les mélanges sont vortexés.
- × L'amplification des acides nucléiques est lancée dans le thermocycleur selon les paramètres décrits dans le tableau ci dessous.

Tableau 8: Programme du thermocycleur.

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

2-2-3/Electrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser l'ADN des leishmanies:

A/Principe:

L'étape de l'électrophorèse consiste à séparer les fragments d'ADN qui seront détectés par intercalation avec le bromure d'éthidium (BET) et visualisé via les rayons d'ultra-violet sous forme de bandes. La séparation des fragments d'ADN est facilitée par un courant électrique et basé sur la différence de charge et de poids entre les molécules.

B/Matériel d'étude:

a/Echantillons:

- ✗ Les produits d'amplification (PCR).
- ✗ Marqueur de taille (100bp DNA leader).

b/Tampons et solutions:

- ✗ Tampon Tris -acétate-EDTA (TAE) buffer (x1).
- ✗ Colorant de charge (loading dye).
- ✗ Bromure d'éthidium (10mg/ml).

c/Equipements et consommables:

- ✗ Four à micro-onde.
- ✗ Balance.
- ✗ Bain marie.
- ✗ Cuve d'électrophorèse horizontale.
- ✗ Ballon stérile.
- ✗ Pipettes et cônes stériles.
- ✗ Transilluminateur lié à un logiciel Gel smart, équipé d'une caméra -photo pour la visualisation et la capture des photos de gel.

C/Technique d'électrophorèse:

- ✗ Une quantité suffisante de tampon d'électrophorèse (tampon 1xTAE) est préparée pour remplir la cuve et pour préparer le gel.

- ✗ Le gel d'agarose à 1,2% est préparé (On pèse 0,6g d'agarose en poudre, qu'on met dans un ballon propre en verre et on ajoute 50 ml du tampon 1XTAE à température ambiante, le ballon en verre est chauffé dans le four à micro-ondes jusqu'à obtention d'une solution transparente, Le ballon sera refroidi à température de 55°C).
- ✗ Le bromure d'éthidium est ajouté pour avoir une concentration dans le gel de 0.2µg/ml (2µl du bromure d'éthidium dans 100 ml d'agarose).
- ✗ Le mélange est laissé se refroidir pour atteindre une température de 50 à 60 °C, et ensuite versé sur la plaque d'électrophorèse horizontale jusqu'à solidification (20 min). Le gel devrait être de 3 à 5 millimètres d'épaisseur.
- ✗ La cuve de migration est préparée, on verse le tampon TAE qui doit couvrir tout le gel.
- ✗ Le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse.
- ✗ Un volume de 5 µl des échantillons est déposé, ainsi que des témoins et du marqueur de taille (DNA Ladder) mélangé avec 2µl du tampon de charge.
- ✗ La cuve est fermée et branchée. Le voltmètre de la cuve est réglé à une tension de 90Volts (utiliser un voltage de 1-5V/cm=100-120). L'ADN doit migrer vers l'anode positive. Le temps de migration est d'environ 1 heure.
- ✗ Pour la lecture de la plaque, la plaque est placée dans le transilluminateur sous UV, le TAE s'intercale entre les brins d'ADN en émettant une radiation fluorescente. L'emplacement des fragments d'ADN apparaît sous forme de bandes après prise de photos.

2-2-4/La digestion du produit PCR par l'analyse de Restriction Fragment Length Polymorphisme (RFLP):

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

A/Principe:

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

B/Matériel d'étude:

a/Echantillons:

- ✗ Produits du PCR ITS1.
- ✗ ADN marqueur de taille standard.

b/Tampons et solutions:

- ✗ 10xtampon enzyme de restriction.
- ✗ Enzyme de restriction Hae III.
- ✗ Sérum albumine du bovin (BSA).
- ✗ Eau ultrapure stérile.

- × L'agarose à 2,5%.

c/Equipements et consommables:

- × Four à micro-onde.
- × Balance.
- × Bain marie.
- × Cuve d'électrophorèse et accessoires.
- × Transilluminateur.
- × Ballon stérile.
- × Pipettes et cônes.

C/Technique de digestion:

- Préparation du produit PCR pour la digestion :
 - × La totalité du produit PCR est introduit dans un tube eppendorf stérile.
- Digestion enzymatique :
 - × Le Mix est préparé pour l'analyse de restriction :

Tableau 9: Composition du Mix pour l'analyse de restriction.

Composants	Quantité en µl
10xtampon Buffer	2
Enzyme Hae III	2
H2O	4
Volume total	8

- × L'enzyme est additionné à la dernière minute.
- × Le Mix est vortexé et centrifugé afin de décanter toutes les gouttelettes déposées sur les bords.
- × 8 µl du mix est mis dans chaque tube eppendorf contenant le produit PCR.
- × Le mélange est Vortexer et centrifugé pendant quelques secondes.
- × Les tubes sont incubés dans un bain-marie pendant une nuit à 37°C.
- × Les produits de digestion sont déposés sur gel d'agarose de 2,5% (7,5g d'agarose et 300 ml de TAE).
- × Les bandes caractérisant chaque espèce seront visualisées sous U.V.

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie présentera les résultats de notre travail, à savoir l'analyse rétrospective au niveau de la province d'Essaouira et l'analyse moléculaire de l'espèce circulante au niveau sectoriel.

I/ ETUDE RETROSPECTIVE DE LA LEISHMANIOSE:

1/Synthèse sur l'évolution de la LC selon la DELM au niveau de la région de Marrakech-Tensift-El Haouz de 2000 à 2012 :

Au niveau de la région de Marrakech Tensift El Haouz, la province de Chichaoua est la plus touchée par la LC entre l'année 2000 et 2012 avec un effectif de 4413 cas (76,16%). suivi par la province d'El Haouz avec 773 cas (13,34%) et la province d'Essaouira 554 cas (9,56%), la province d'El kelaa et la préfecture de Marrakech reste les moins touchés au niveau de cette région (Figure 24).

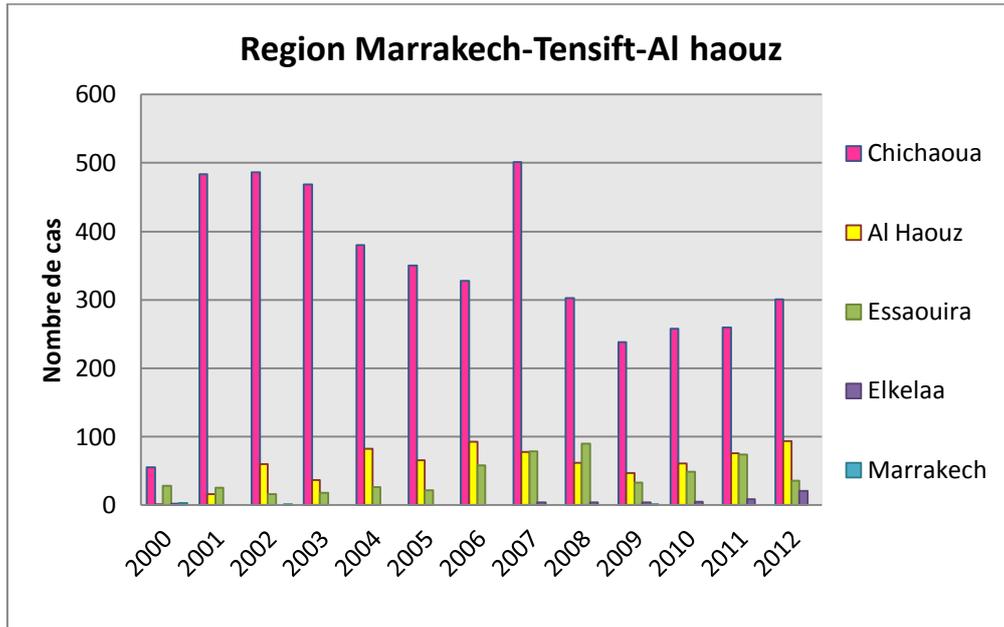


Figure 24 : Evolution de la LC dans la région de Marrakech Tensift El Haouz de 2000 à 2012 selon les données de la DELM.

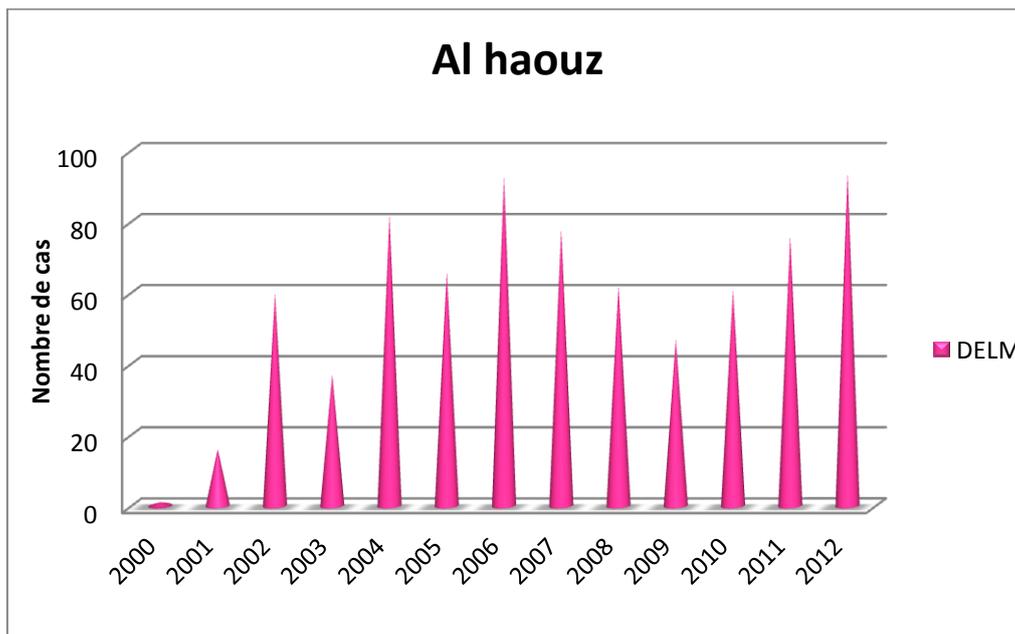


Figure 25: Nombre de cas de LC selon la DELM entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Al Haouz.

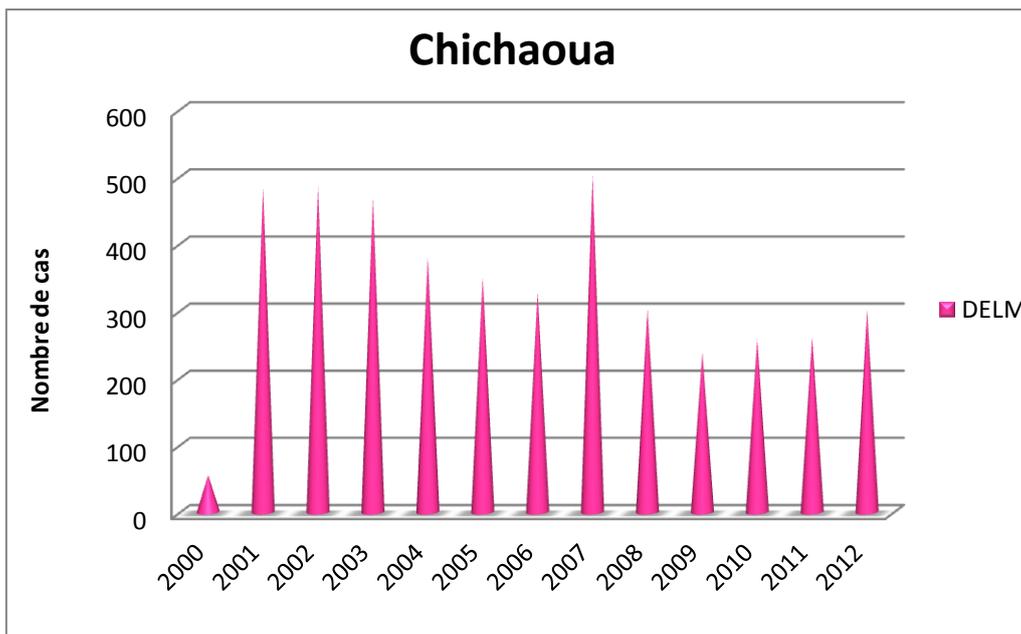
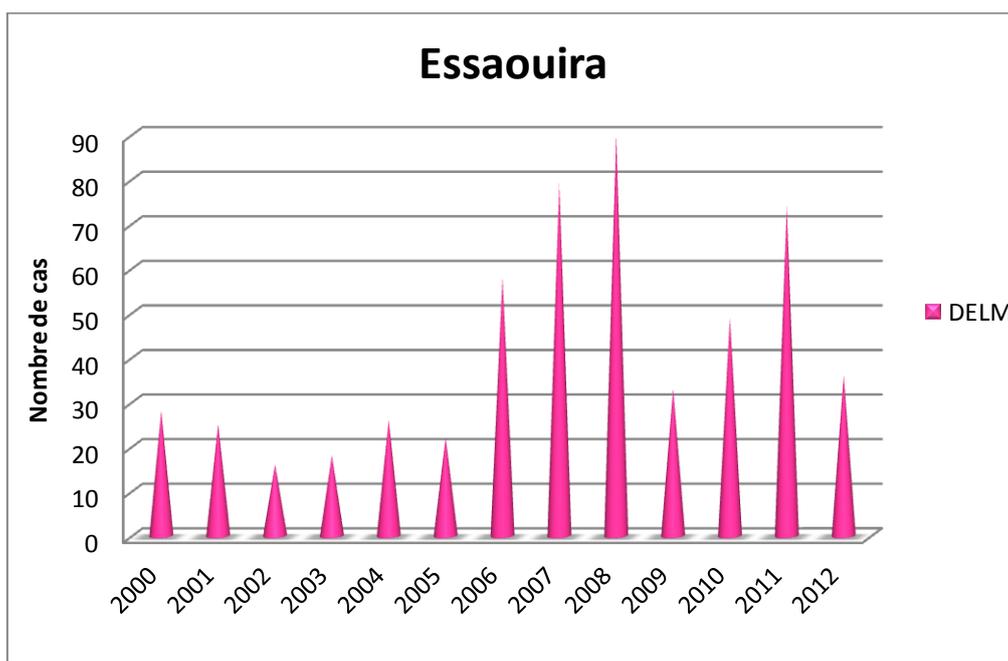


Figure 26: Nombre de cas de LC selon la DELM entre 2000 et 2012 au niveau de la province de Chichaoua.



Graph 27: Nombre de cas de LC selon DELM entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.

Pour la province d'Essaouira, les données qui vont être analysés nous ont été fournies directement au niveau du SIAAP.

2/Analyse des données de la LC au niveau de la province d'Essaouira:

2-1/Evolution temporelle de la LC selon les données de la DELM et les données du Service d'Infrastructure des Actions Ambulatoires Provincial (S.I.A.A.P) d'Essaouira :

Les données sur la LC au niveau d'Essaouira sont collectées au niveau de la DELM, le SIAAP d'Essaouira, mais aussi les cas enregistrés au niveau LNRL de l'INH.

Ainsi, 554 cas ont été déclarés dans la province d'Essaouira de 2000 à 2012. Le nombre de cas enregistré de la LC était faible entre les années 2000 et 2005 avec une moyenne de 22 cas par an, ce taux n'a cessé d'augmenter à partir de l'année 2006 avec un pic enregistré de 90 cas en 2008.

Les cas déclarés par la DELM et ceux recensés au niveau du SIAAP sont presque les mêmes avec une différence de 5 cas durant les 13 ans (Figure 28).

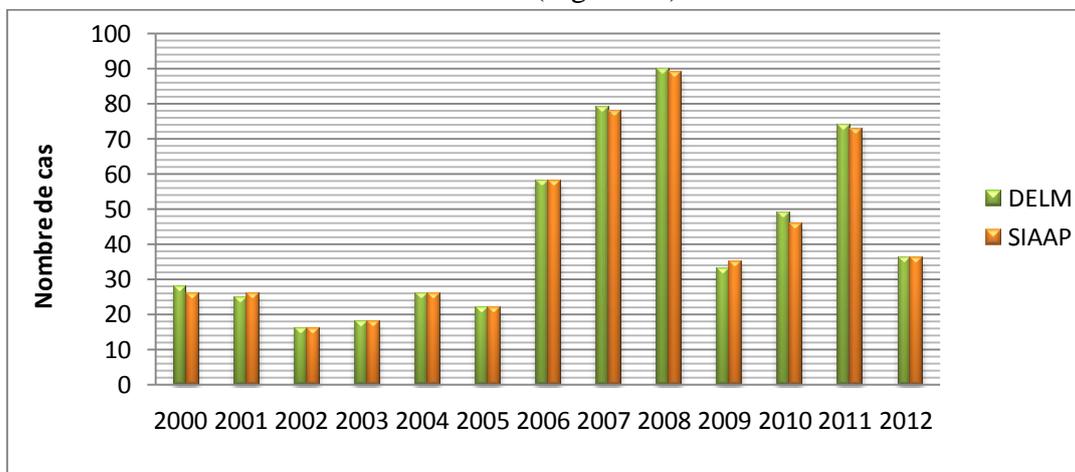


Figure 28: Evolution de LC selon les données de la DELM et du SIAAP entre 2000 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.

2-2/Evolution de l'incidence de la LC par 100000 dans la province d'Essaouira selon les données de la DELM et du SIAAP:

L'incidence par 1000000 habitants varie au fil des années avec un pic en 2008 (19.91 cas/100000 habitants) et une moyenne de 13.12 cas/100000 habitants.

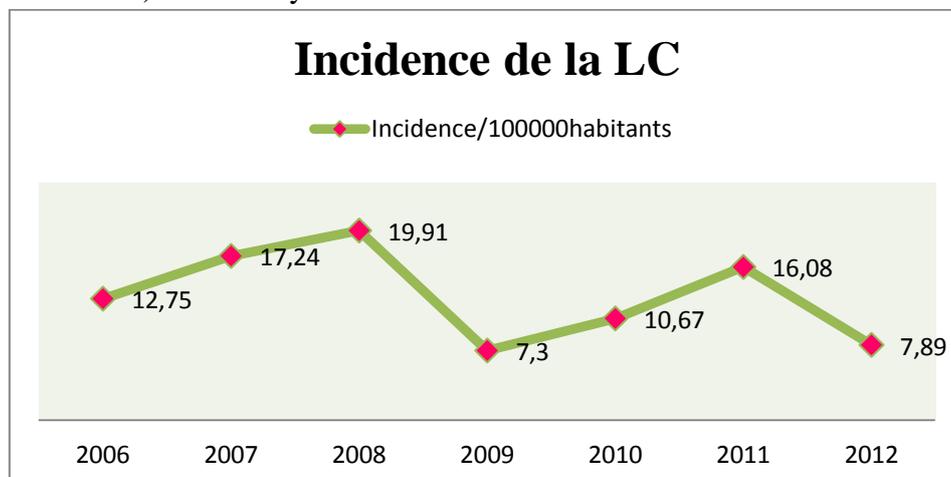


Figure 29: Evolution de l'incidence de la LC selon les données de la DELM et du SIAAP entre 2006 et 2012 au niveau de la province d'Essaouira.

L'année 2001:

26 cas de LC déclaré répartis sur seulement 7 secteurs, toujours avec un maximum de cas dans le secteur Smimou (13 cas).

On a noté la disparition des cas au niveau des secteurs suivants : Talmest, Mzilate, Ezzaouite, Targante et Tamar, et apparition d'un cas au niveau d'un nouveau secteur Aguerd.

L'année 2002:

16 cas ont été recensés dans 5 secteurs avec diminution du nombre de cas dans le secteur Smimou, augmentation du nombre de cas au niveau du secteur Meskala et apparition de 2 nouveaux secteurs Takate et Bizdad (Figure 31).

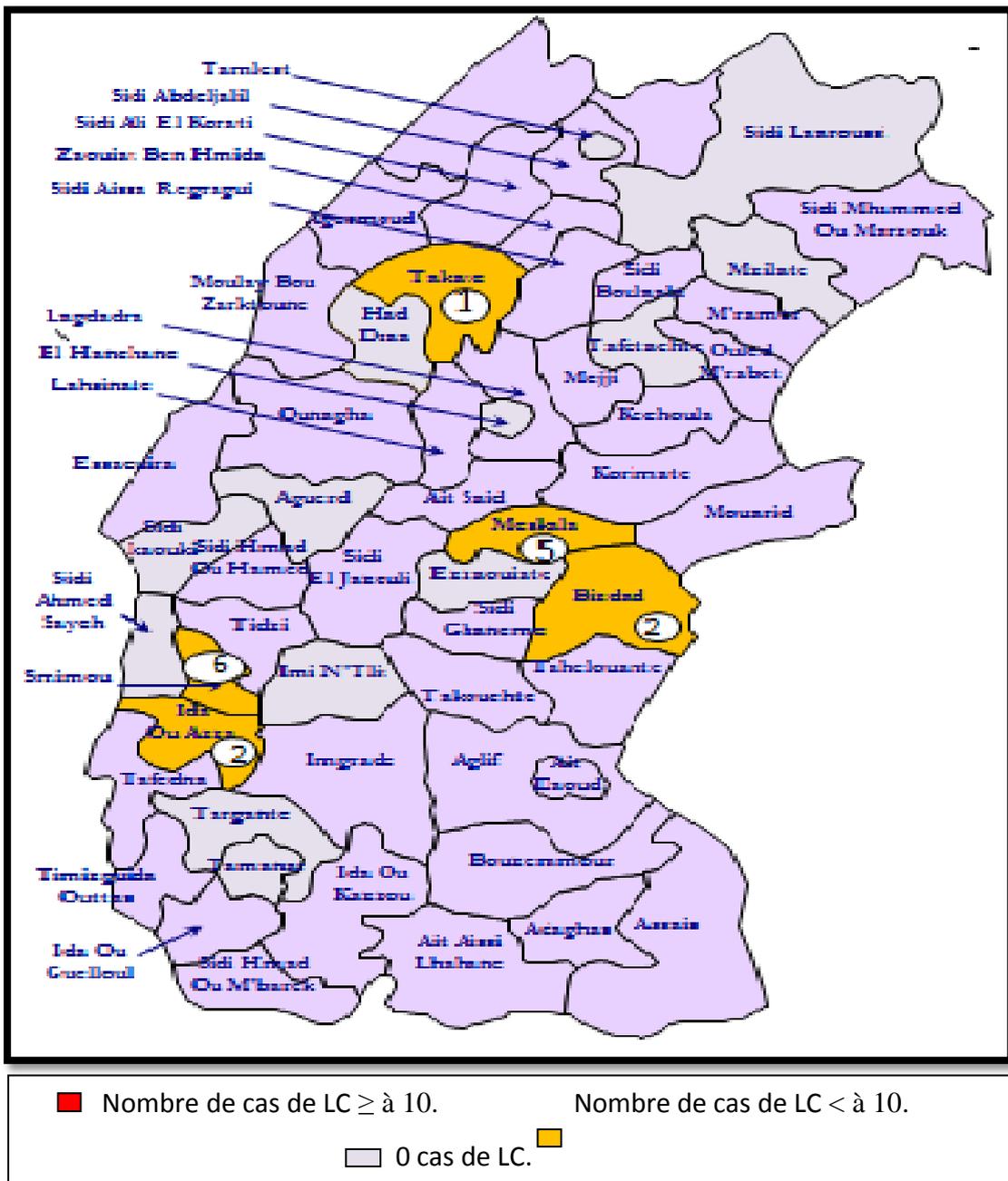


Figure 31: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2002.

L'année 2003:

18 cas ont été recensés dans 6 secteurs avec apparition de 2 nouveaux secteurs Sidi laaroussi et Had Draa.

L'année 2004:

26 cas ont été enregistré l'année 2004 dans 4 secteurs : Smimou, Imi N'tlit, Meskala et Sidi Ahmed Sayeh. Avec un pic au niveau des 2 secteurs Smimou (14 cas) et Meskala (9 cas) (Figure 32).

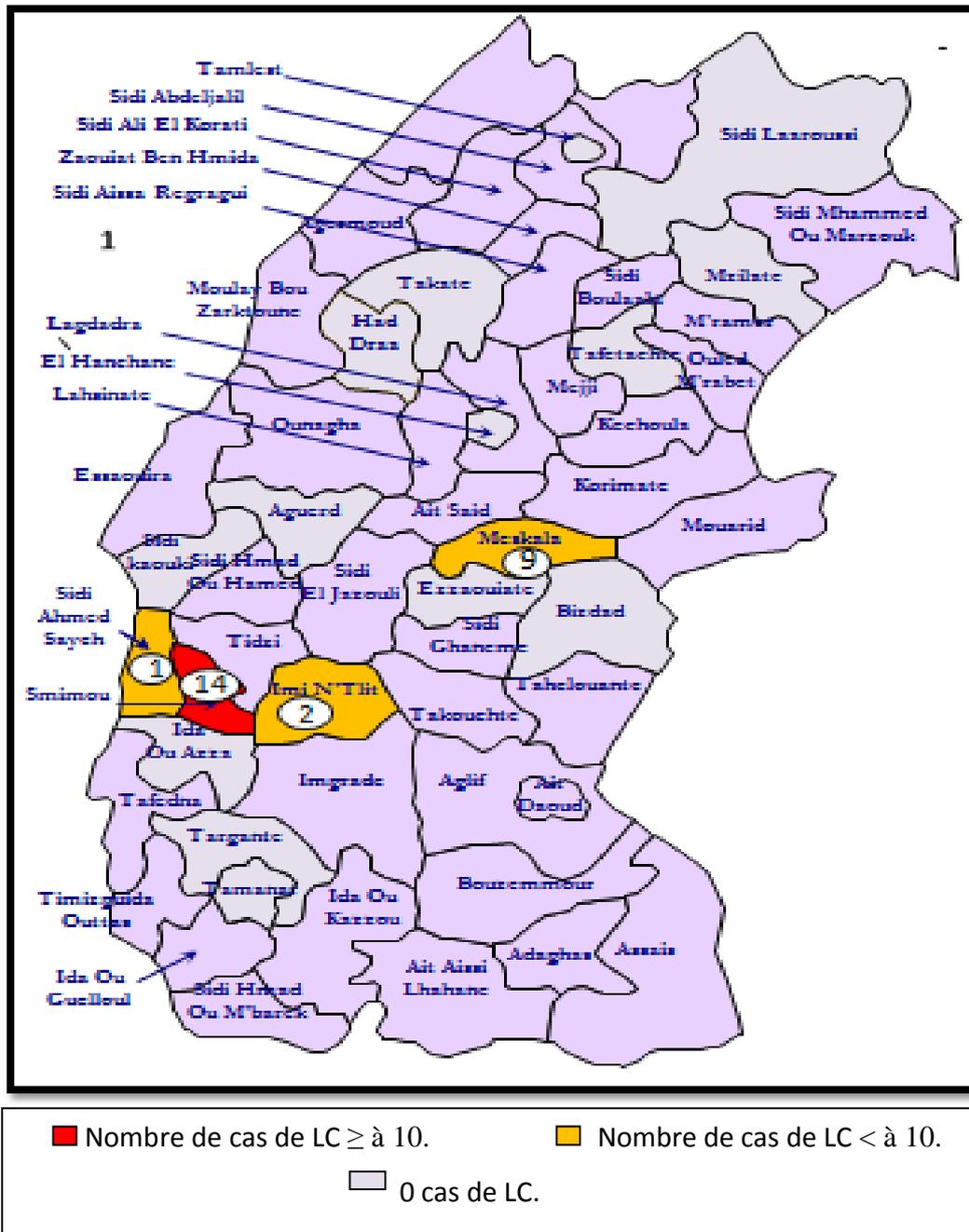


Figure 32: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2004.

L'année 2005:

22 cas ont été recensés dans 6 secteurs: Aguerd, Tafetachte, Smimou, Imi N'Tlit, Idda Ou Azza et Bizdad. On a noté un pic au niveau du secteur Bizdad (8 cas) suivie du secteur Smimou et Imi N'Tlit avec 5 cas de LC dans chacun de ces secteurs.

L'année 2006:

A partir de cette année, le nombre de cas de LC n'a cessé d'augmenter (22 cas en 2005 et 58 cas en 2006).

Cette année a connu une augmentation fortuite au niveau du secteur Had Draa qui a enregistré presque la totalité des cas (58 cas), alors que les autres cas sont enregistrés au niveau du secteur Smimou et Imi N'Tlit (Figure 33).



Figure 33: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2006.

L'année 2007:

On note toujours une augmentation des cas de LC dans la province d'Essaouira, le nombre a atteint 78 cas, avec une concentration des cas dans le secteur Had Draa, les autres cas sont répartis sur 7 secteurs : Smimou, Imi N'Tlit, Bizdad, Meskala, Aguerd, Sidi Ahmed Sayeh et Ida Ou Azza.

L'année 2008:

L'année 2008 a enregistré un pic de 89 cas durant les 12 ans de 2000 à 2012. Le secteur Had Draa reste toujours le plus touché avec 69 cas, les autres cas sont répartis sur 6 Secteur qui sont Meskala, Bizdad, Smimou, Imi N'Tlit, Sidi ahmed Sayeh avec apparition d'un cas dans un nouveau secteur Sidi Kaouki.

L'année 2009:

Durant cette année la province d'Essaouira a connu une diminution du nombre de cas de LC (35cas) avec une diminution remarquable des cas dans le secteur Had Draa. Cette année a connu aussi une diminution dans le nombre des secteurs touchés (3 secteurs) (Figure 34).

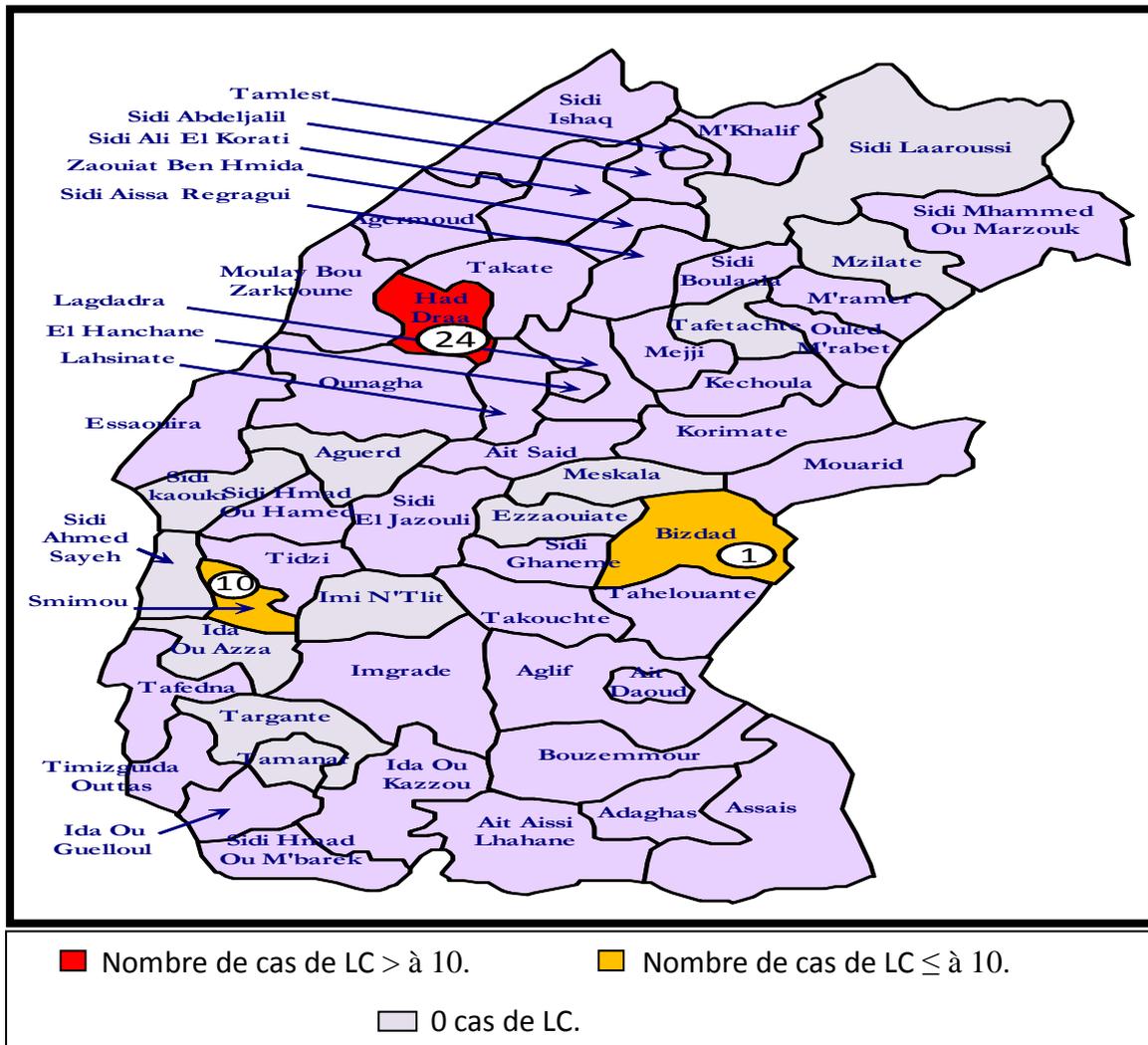


Figure 34: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2009.

L'année 2010:

46 cas ont été recensés dans 5 secteurs.

On note une augmentation de cas dans le secteur Smimou (10 cas en 2009 et 25 cas en 2010), et apparition de 3 cas dans un nouveau secteur El Hanchane (Figure 35).

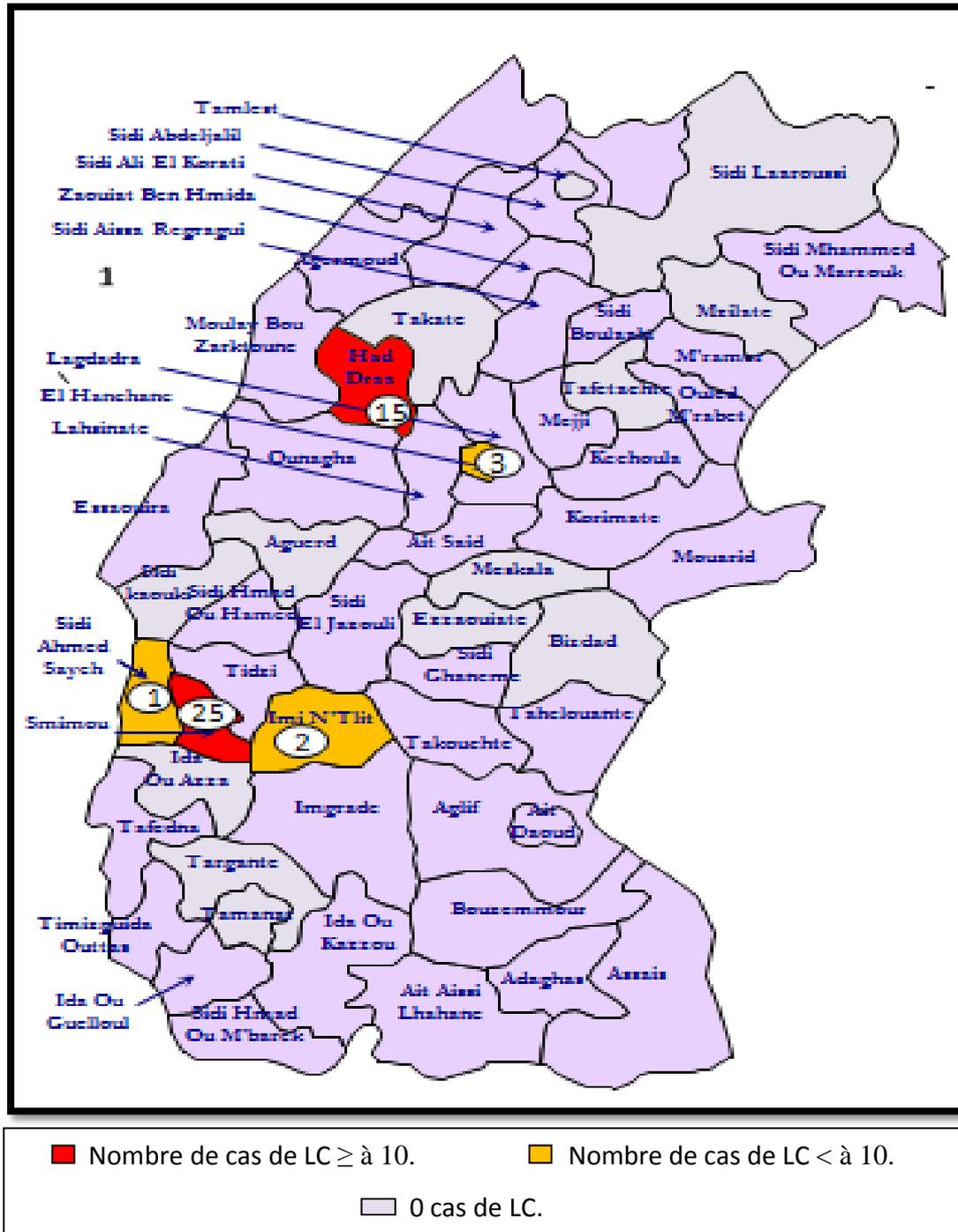


Figure 35: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2010.

✚ L'année 2011:

Au cours de l'année 2011 on a noté une ré-augmentation des cas de LC (73 cas), répartis sur les mêmes secteurs avec une augmentation fortuite des cas au niveau du secteur El Hanchane dont le nombre des cas a atteint 25 (3 cas recensé en 2010) (Figure 36).

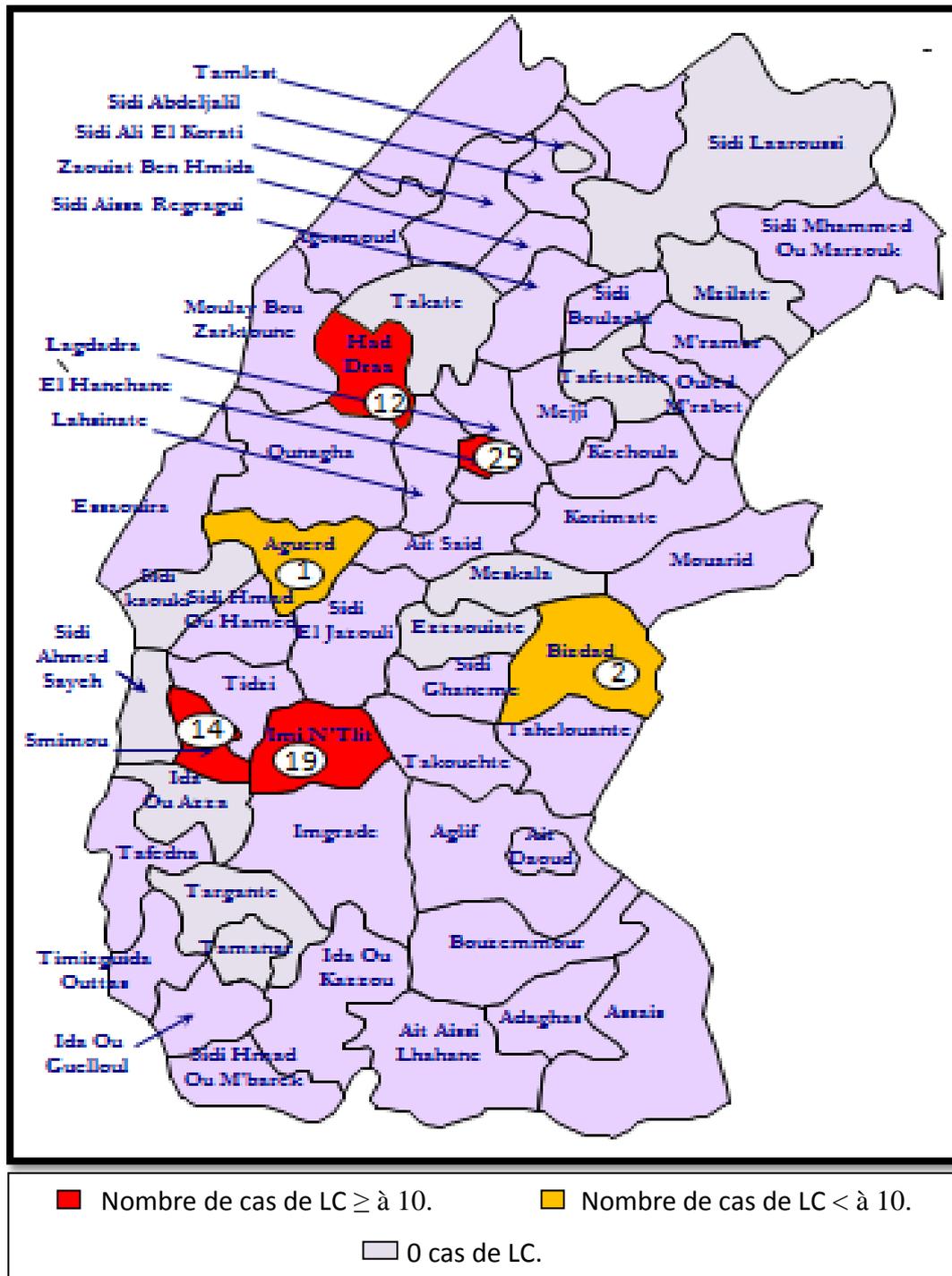


Figure 36: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2011.

L'année 2012:

Le nombre de cas enregistré l'année 2012 est diminué (36 cas), ces cas sont répartis sur 5 secteurs dont les plus touchés sont Smimou (17 cas) et Had Draa (13 cas).

On note une régression dans le nombre des cas au niveau du secteur El Hanchane (1 cas), et une augmentation remarquable dans le nombre des cas au niveau du secteur Imi N'Tlit qui a atteint 19 cas (Figure 37).

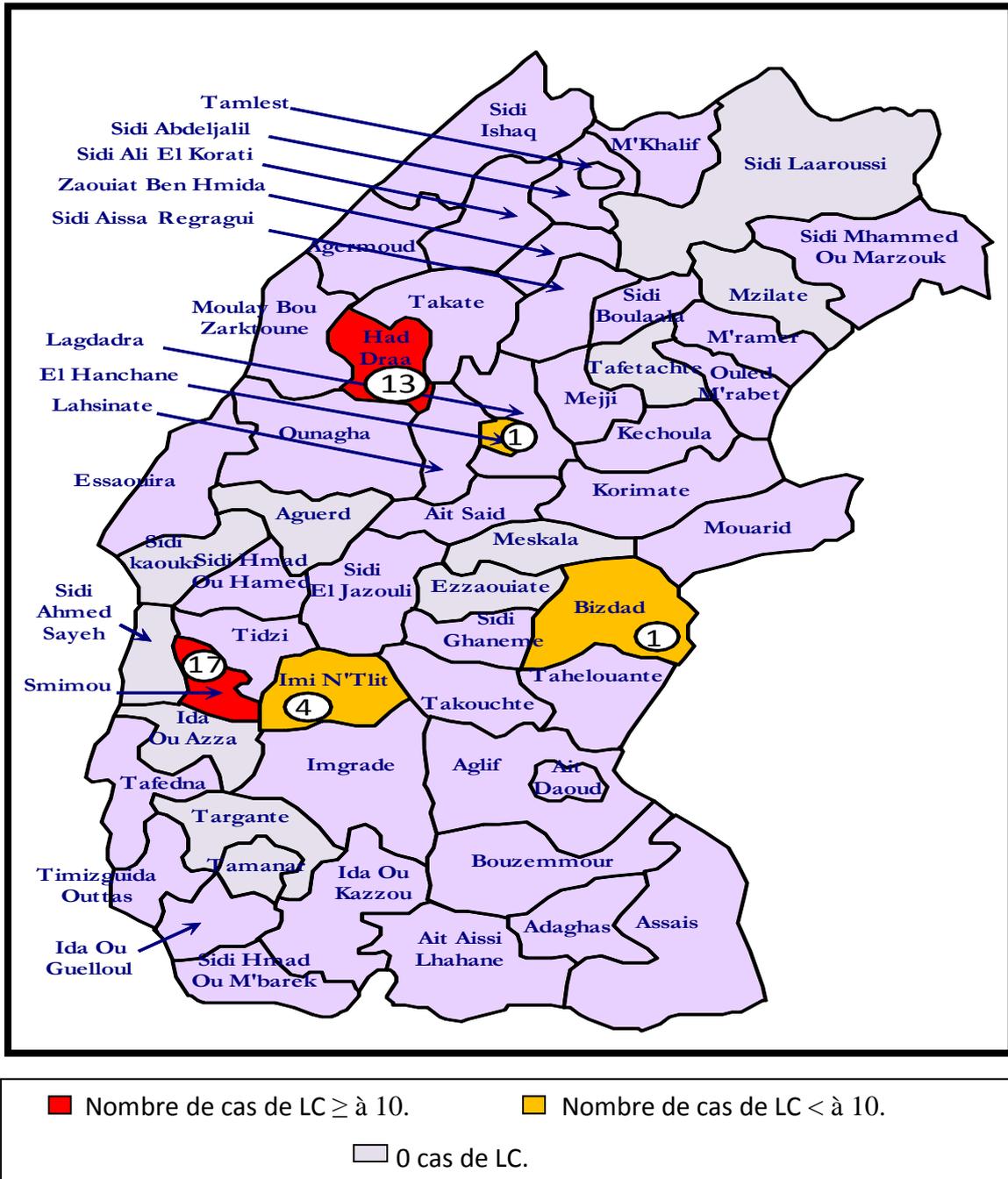


Figure 37: Le nombre de cas de LC au niveau des secteurs touchés par la LC dans la province d'Essaouira l'année 2012.

En résumé, 549 cas de LC déclarés entre l'année 2000 et 2012 sont répartis sur 20 secteurs parmi 56 ce qui représente 36% des secteurs touchés. Les secteurs les plus touchés sont Had Draa (244 cas soit 44,44%), Smimou (137 cas soit 24,95%) et enfin Imi N'tlit (54 cas soit 9,83%). (Figure 38).

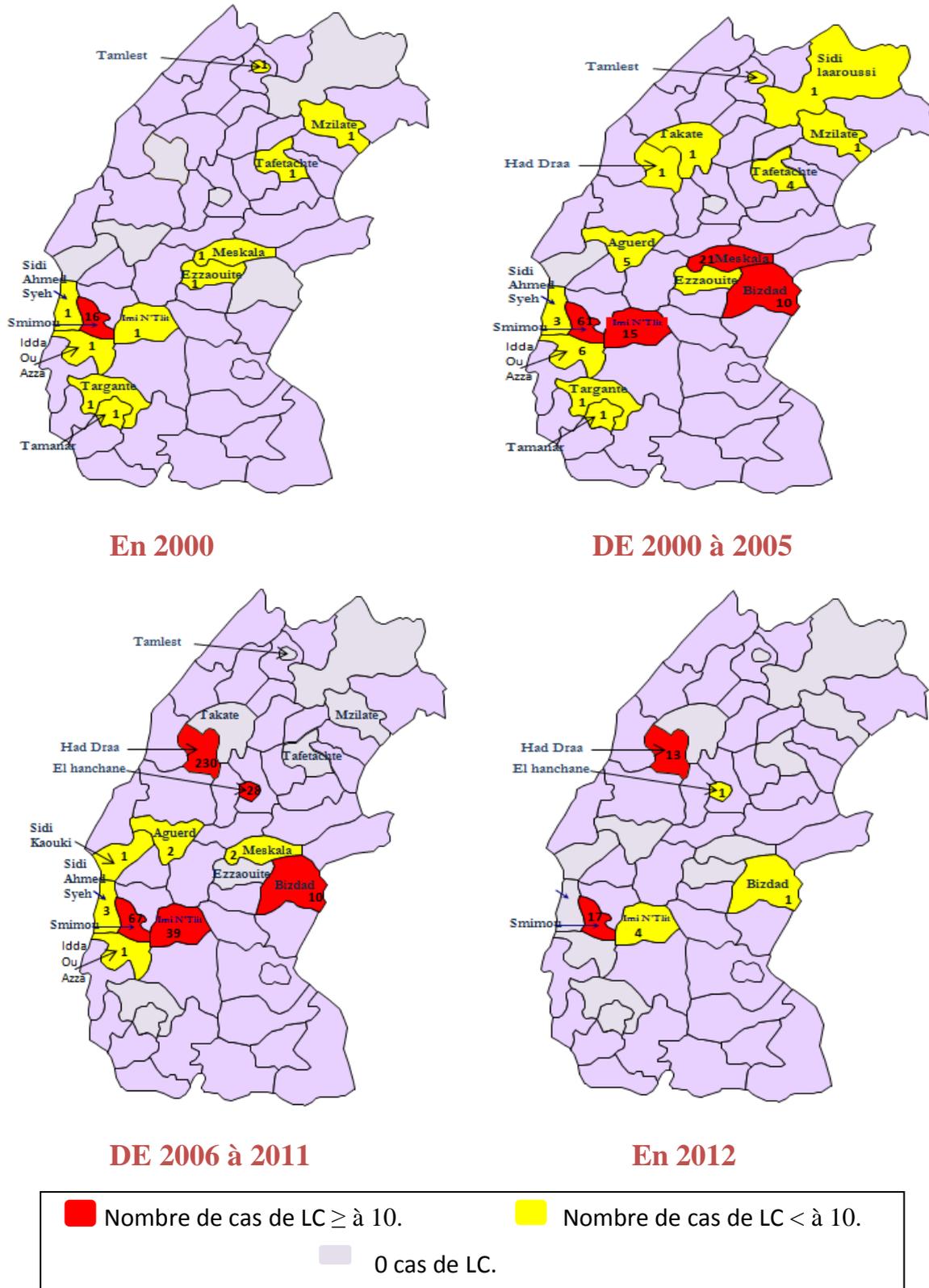


Figure 38: les secteurs touchés par la LC au niveau de la province d'Essaouira de 2000 à 2012.

4/Répartition de la LC par sexe et par tranche d'âge dans la province d'Essaouira :

L'âge :

254 patients ont été recensés dont l'âge variait entre 6 mois et 82 ans, toutes les tranches d'âge sont touchées par cette maladie avec une prédominance chez les sujets âgés de 0 à 9 ans avec un pourcentage de 46,85%, suivie par la tranche d'âge de 10 à 19 ans avec un pourcentage de 23,22%, les personnes âgées de plus de 50 ans sont touchées avec un pourcentage de 14,9%. Les tranches d'âges allant de 20 à 29 ans, de 30 à 39 ans et de 40 à 49 ans sont les moins touchées avec respectivement des pourcentages de 5,9%, 5,11 et 3,93% (Figure 39).

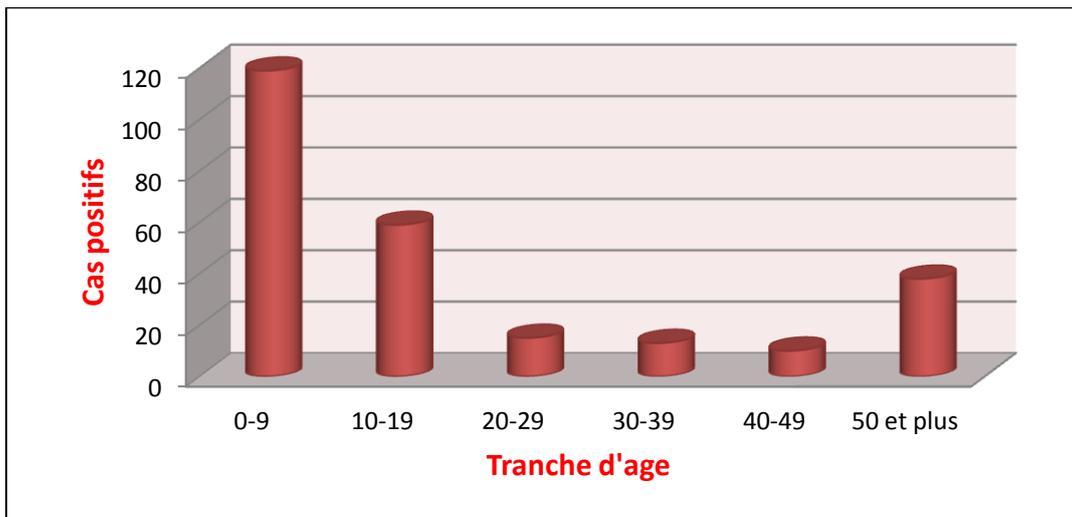
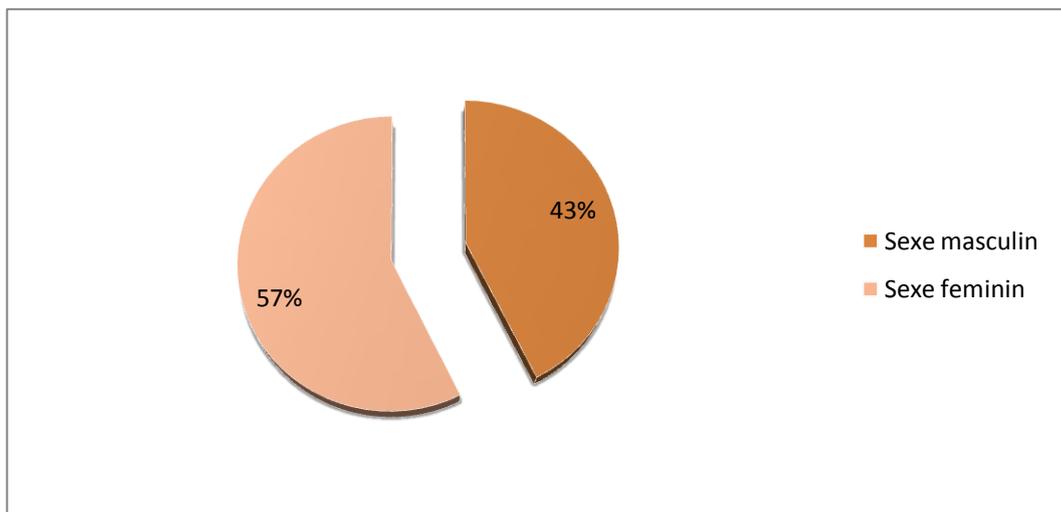


Figure 39: Répartition des cas de LC selon l'âge de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.

Le sexe :

Parmi 265 patients dont le sexe a été précisé, nous avons constaté que les deux sexes sont touchés par cette maladie avec une prédominance féminine 57%. (Sex-ratio F/H=1,34) (Figure 40).



Graph 40: Répartition des cas de LC selon l'âge de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.

5/Répartition de leishmaniose cutanée selon la localisation, l'aspect et le nombre des lésions dans la province d'Essaouira :

Siège des lésions :

Parmi les 135 patients chez qui le siège des lésions a été précisé, le visage a été le plus concerné, 95 cas soit 35.8%, les membres supérieurs sont touchés chez 26 cas (9.8%) et enfin les membres inférieurs ont été notés chez 14 cas (5.3%) (Figure 41).

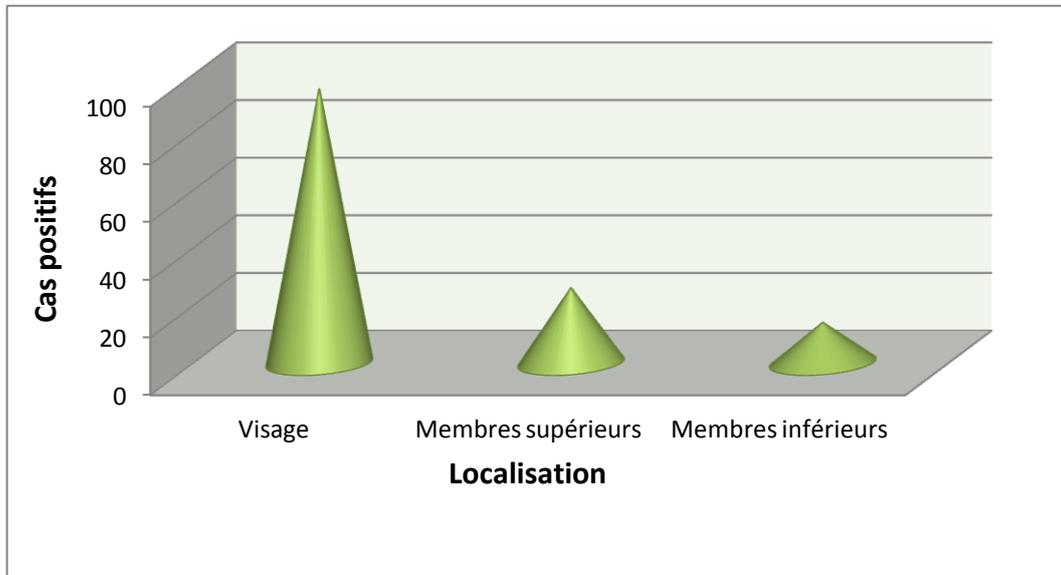


Figure 41: Répartition des cas de LC selon la localisation des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.

Nombre des lésions :

Pour les 116 personnes dont le nombre de lésions a été mentionné, 68 malades avaient une lésion unique (58.6%), les lésions doubles ont été retrouvées chez 24 malades (20.7%). On a noté aussi la présence de 3 et 4 lésions chez des malades mais avec un faible pourcentage qui est respectivement de 4.3% et 6%. 12 cas présentent des lésions multiples soit un pourcentage de 10.3% (Figure 42).

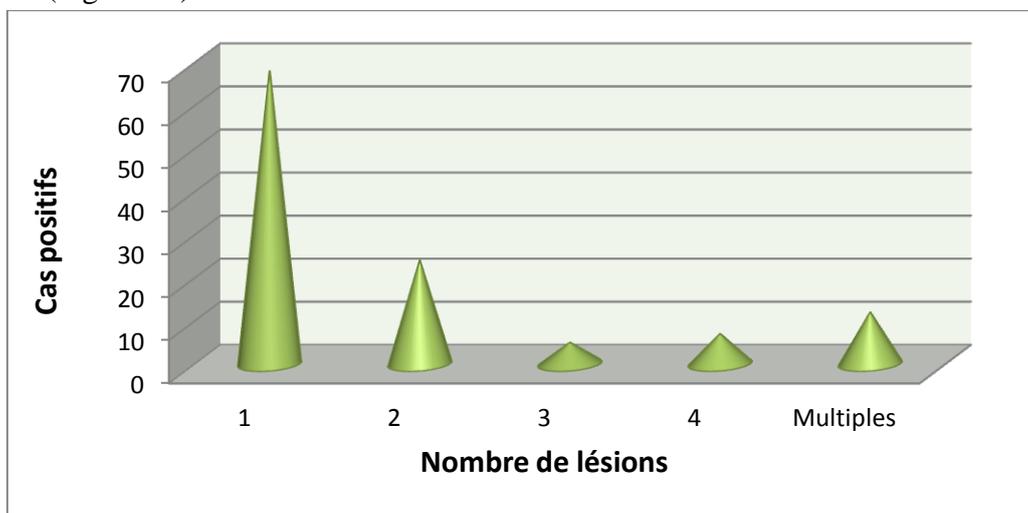


Figure 42: Répartition des cas de LC selon la localisation des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.

Taille des lésions :

Pour les 98 cas dont la taille des lésions a été mentionné, et dont la taille variait de 0,1 à 4 cm, 44 (44,89%) malades présentaient des lésions de petites taille (de 0,1 à 1cm). Alors que 28 des cas (28,57%) avaient des lésions d'une taille de 1,1 à 2 cm. On note aussi la présence des lésions dont la taille varie de 2,1 à 4 cm chez 26 personnes soit un pourcentage de 26,53%.

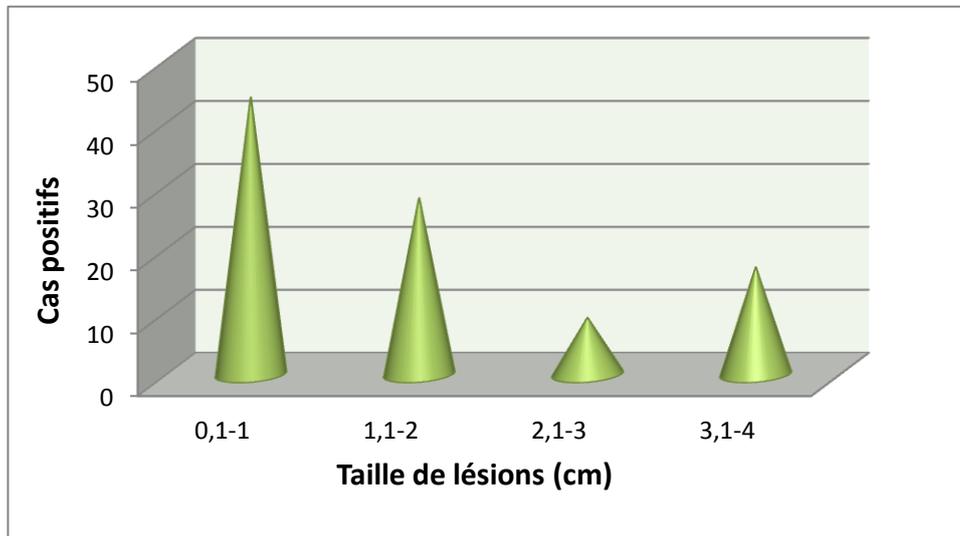


Figure 43: Répartition des cas de LC selon la taille des lésions de 2000 à 2012 dans la province d'Essaouira.

II/IDENTIFICATION MOLECULAIRE DE L'ESPECE DES LEISHMANIES CIRCULANTES DANS LA PROVINCE D'ESSAOUIRA:

16 frottis cutanés appartenant à 4 secteurs ont fait l'objet de notre étude. Six échantillons appartiennent au secteur Had Draa dont deux échantillons proviennent de la localité Tabia, deux de la localité soualeh et deux des localités Ait allal et Ait hmad respectivement. Cinq échantillons du secteur Smimou appartenant aux localités d'Id addi, de Douar houda, de sidi boujir, d'Ait kadour et de sidi bourja. Deux échantillons du secteur Elhanchane et de la localité zaouia et enfin un échantillon du secteur Dhar et de la localité Tabrida.

1/Résultats de l'amplification de l'ADN par PCR ITS1:

L'amplification de la région ITS1 des 16 frottis cutanés, sont confirmées positives.

Le résultat positif se traduit par la présence d'une bande de 300pb correspondant au genre *Leishmania* (Figure 44).

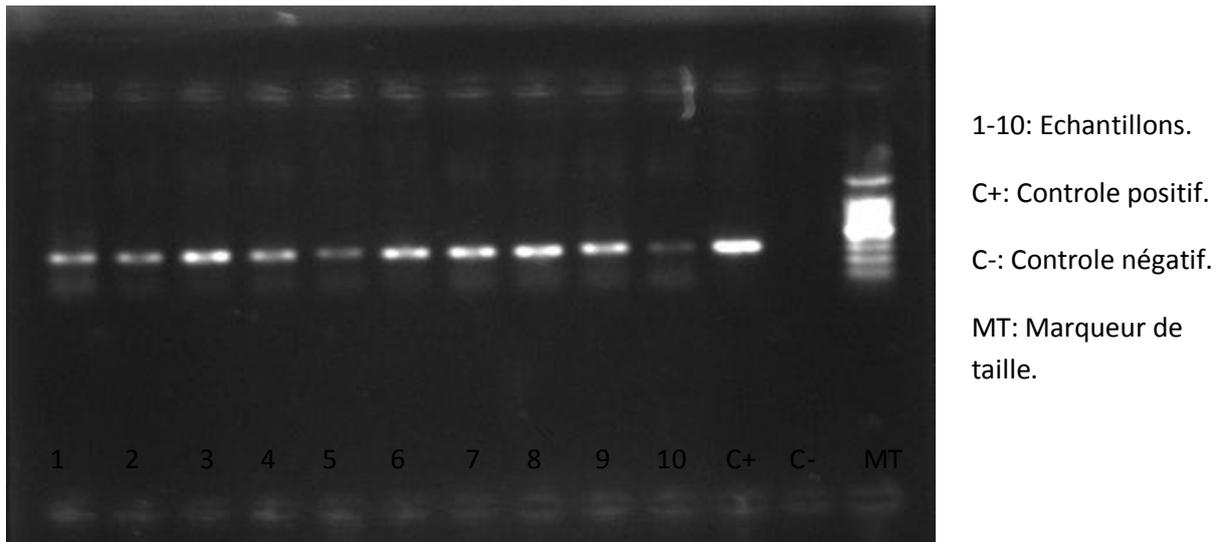


Figure 44: Photo du gel d'agarose du produit d'amplification de la région ITS1 par PCR.

*les 10 échantillons appartenant à 5 secteurs :

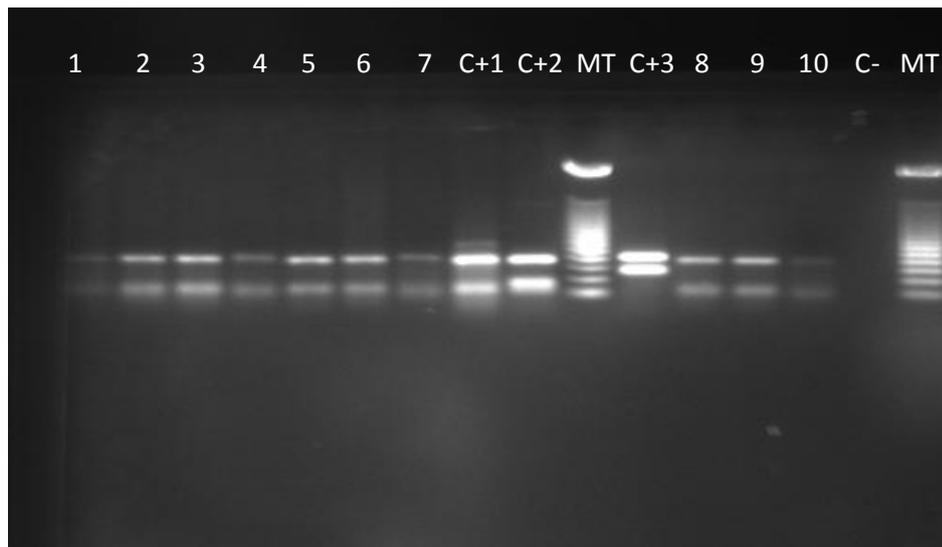
- Had Draa (1: localité Ait hmad / 2: localité Ait allal/ 3: localité Tabia/ 9: localité Soualeh).
- El hanchane (4: localité Zaouia).
- Imi N'tlit (5: localité Ait hmed).
- Dhar (6: localité Tabrida).
- Smimou (7: localité Sidi boujir/ 8: localité Id addi/10: localité Douar houda).

2/Résultat de la digestion par l'enzyme HaeIII:

La digestion par l'enzyme HaeIII permet de différencier entre les 3 espèces circulantes au Maroc à savoir *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum*.

Cet enzyme possède un site de restriction au niveau de la région ITS1 de *L.tropica* générant ainsi 2 bandes sur le pattern électrophorétique ; une bande mesurant 185 pb et l'autre 57 pb. Au niveau de la région ITS1 de *L.infantum*, il génère des bandes mesurant 184 pb et 72 pb. La différence de *L.tropica* avec *L.infantum* est visualisée par rapport à la deuxième bande qui est de 72 pb. Pour *L.major* la région ITS1 comprend 2 sites de restriction correspondant à l'enzyme HaeIII, bien distinguées par rapport aux autres espèces qui sont 232 pb et 132 pb.

La digestion par l'enzyme HaeIII de l'amplifié des ADN des 16 frottis étudiés ont montré l'existence de l'espèce *L.tropica* pour tous les échantillons.



1-10: Echantillons.
C+1: Contrôle positif à *L.tropica*.
C+2: Contrôle positif à *L.infantum*.
C+3: Contrôle positif à *L.major*.
C- : Contrôle négatif.
MT: Marqueur de taille 50 pb.

Figure 45: Photo du gel d'agarose 2,5 % de la digestion par l'enzyme HaeIII de la région ITS1 des frottis cutanées provenant des secteurs de la province d'essaouira .

*les 10 échantillons appartenant à 5 secteurs :

- Had Draa (1: localité Ait hmad / 2: localité Ait allal/ 3: localité Tabia/ 9: localité Soualeh).
- El hanchane (4: localité Zaouia).
- Imi N'tlit (5: localité Ait hmed).
- Dhar (6: localité Tabrida).
- Smimou (7: localité Sidi boujir/ 8: localité Id addi/10: localité Douar houda).

DISCUSSION

Au Maroc, comme dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, la leishmaniose constitue un important problème de santé publique (**MSP, 2001**). La situation est devenue préoccupante dès les années 1970 et continue à l'être jusqu'à nos jours, puisque cette maladie a pris l'ampleur et touche des régions non endémiques auparavant. Face à ce problème de santé, un Programme National de Lutte contre les Leishmanioses a été élaboré pour limiter la propagation de la maladie d'autres zones à risque et contrôler la transmission des leishmanioses cutanées au niveau de tous les foyers actifs.

Les leishmanioses sont devenues ainsi des maladies à déclaration obligatoire. (**Arrêté ministériel n 683-95 du 31 mars 1995**).

Le nombre total des cas déclaré est passé de 2332 cas en 2000 à 4000 cas en 2011 répartis sur toutes les régions.

Cette augmentation est liée à plusieurs facteurs de risque que **Desjeux 1999** a résumé en sept points:

- ✓ l'installation de la population dans des zones d'endémie à cause de problème démographique ou manque de terres agricoles;
- ✓ les mouvements de populations pour raison professionnelle ou autres;
- ✓ le développement de nouveaux projets agricoles ou industriels, amenant des populations non immunisées dans des zones d'endémie, mais aussi le tourisme ou les activités militaires;
- ✓ l'urbanisation accélérée et/ou non planifiée;
- ✓ la détérioration du tissu économique et social dans les banlieues des villes, où des populations à faibles revenus s'accumulent à cause d'un exode rural massif, facilitant ainsi l'apparition d'épidémies;
- ✓ les modifications de l'environnement (construction de barrages, systèmes d'irrigation, puits);
- ✓ la réduction ou l'achèvement des campagnes de pulvérisation d'insecticides pour la lutte contre le paludisme.

Au niveau de la région de Marrakech-Tensift-El Haouz, le nombre de cas déclaré est passé de 89 cas en 2000 à 452 en 2012, cette région représente 12,7% par rapport aux autres régions du Maroc. La province de Chichaoua limitrophe de la province d'Essaouira vient en tête avec un total de cas déclarés de LC de 4413 enregistrés entre 2000 à 2012.

➤ L'étude rétrospective :

L'étude rétrospective, de 2000 à 2012, nous a permis de suivre l'évolution temporelle et sectorielle de la LC au niveau de la province d'Essaouira.

L'étude temporelle a montré une augmentation des cas de LC de 2000 à 2012, avec 518 cas recensés durant cette période. En 2000, 28 cas ont été déclarés, ce nombre n'a cessé d'augmenter à partir de l'année 2006 (58 cas), après il a atteint son pic en 2008 (90 cas). Ce

chiffre a connu une diminution importante l'année 2009 (33 cas). Ce résultat est le fruit d'une lutte efficace et ciblé déployé par le SIAAP, à savoir:

- ✓ Les opérations de pulvérisation.
- ✓ L'organisation des campagnes de sensibilisation.
- ✓ Le dépistage actif des cas de LC au niveau des établissements scolaires.

L'étude sectorielle nous a permis de suivre la répartition des cas de LC au niveau des différents secteurs de la province, ainsi 20 secteurs sont touchés par rapport à 56, avec une concentration des cas au niveau des secteurs: Had Draa, Smimou, Imi N'tlit et El hanchane.

Le secteur semi urbain Had Draa a enregistré un maximum de cas de LC durant cette période (244 cas soit 44,44%) avec une incidence de 124 cas pour 100000 habitant en 2012. La LC a été déclarée dans ce secteur la première fois en 2003 avec un cas. Après une épidémie s'est déclenchée l'année 2006 où le nombre de cas est passé à 51. Durant cette année le nombre de cas déclaré a augmenter dans toute la province et 87,9% des cas étaient enregistrés au niveau du ce secteur qui a enregistré le maximum de cas durant les années 2007 et 2008 (79 cas et 90 cas respectivement).

Ce caractère épidémique, est sans doute dû, à l'introduction du parasite dans une population humaine non immunisé. Ce secteur est semi urbain, avec une topographie plate (Figure 46) et une population groupée. Il est connu par la présence d'un grand souk qui constitue une destination pour la population provenant des autres secteurs, ce qui favoriserait l'extension et la dissémination de la maladie dans la province.



Figure 46: Topographie plate du secteur Had Draa » (Essaouira 06/06/2013).

En 2009, le nombre de cas a diminué grâce à des actions de la lutte menées par le SIAAP (Figure 47 et 48), à savoir :

- ✓ Le dépistage actif de masse au niveau des établissements scolaires.
- ✓ La surveillance entomologique.
- ✓ La sensibilisation de la population.
- ✓ La Distribution des moustiquaires dans les ménages touchés.



Figure 47: Actions de sensibilisation au niveau des établissements scolaires du secteur Had Draa



Figure 48: Dépistage actif des cas de LC au niveau des établissements scolaires du secteur Had Draa

Les localités les plus touchés au niveau de ce secteur sont Soualeh et Tabia, Notre visite à ces 2 localités, nous a permis de constater qu'elles constituent un habitat favorable pour les phlébotomes puisque les écuries se situent à proximité des habitations et les ordures sont cumulées à proximité des locaux (Figures 49, 50, 51et 52).



Figure 49: Secteur Had Draa, localité Tabia « ordures à proximité des ménages» (Essaouira 06/06/2013)

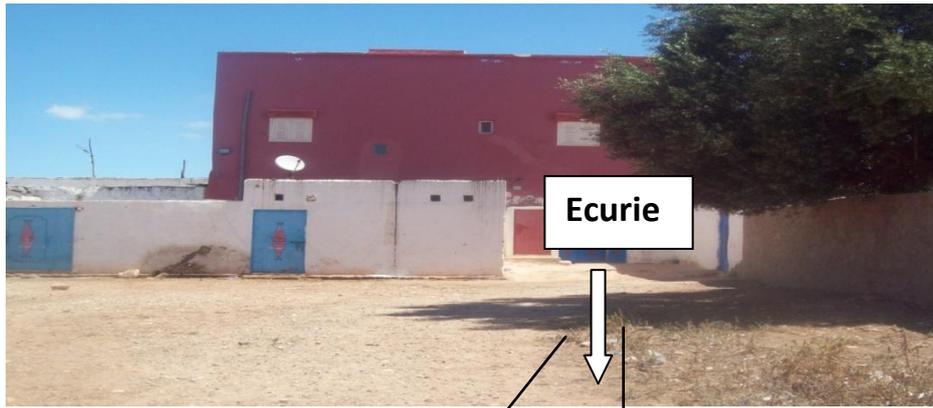


Figure 50: Secteur Had Draa, localité Tabia « Situation des écuries   coté des habitations » (Essaouira 06/06/2013)



Figure 51: Secteur Had Draa, localité Tabia. « Foyers du phlébotome»(Essaouira 06/06/2013)



Figure 52: Secteur Had Draa, localité Soualeh « Situation des écuries   coté des habitations » (Essaouira 06/06/2013)



Figure 53: Secteur Had Draa, localité Soualeh. « Foyers du phlébotome » (Essaouira 06/06/2013)

Le secteur urbain El Hanchane a connue pour la première fois 3 cas de LC déclarés en 2010. En 2011, on a noté la déclaration d'une épidémie avec 25 cas de LC. En 2012, et grâce aux actions de lutte déployées par le ministère de la santé dans ce secteur, on a noté une diminution importante du nombre de cas (1 cas déclaré). Ce secteur comme pour le secteur Had Draa a une topographie plate, une population groupée et contient un grand souk Tlata El Hanchane, qui est un lieu de rencontre d'un grand nombre de population venant des autres secteurs et des provinces avoisinantes. Ceci augmente le risque d'importation et de propagation de la maladie, surtout en présence des conditions favorables pour le vecteur tel que le manque des conditions d'hygiène, la présence des déchets, des décharges et des animaux non contrôlés (Figure 54, 55 et 56) .



Figure 54: Secteur El hanchane. (Essaouira le 06/06/2013)



Figure 55: Secteur El hanchane, déchets de bétails. (Essaouira le 06/06/2013)



Figure 56: Secteur El hanchane, dépôt des ordures. (Essaouira le 06/06/2013)

Le secteur rural Smimou est le deuxième secteur touché au niveau de la province, avec un nombre total de 110 cas durant les 13 ans soit 24,95% de l'ensemble des cas touchés et une incidence de 145,65 cas pour 100000 habitants en 2012. Il s'agit d'un ancien foyer de LC déclaré en 1991 par **Rioux et ses collaborateurs (Rioux et al., 1991)**.

Ce secteur a toujours enregistré des cas de LC, avec une moyenne de 9 cas par an, l'année 2010 a noté un pic avec 25 cas de la LC. La persistance de la LC dans ce secteur rural pourrait s'expliquer par le fait qu'il fait partie des plateaux de Haha, c'est une zone montagnarde (Figure 57) avec un climat aride et une population dispersée. En effet la présence des grottes dans les montagnes constitue un environnement favorable pour l'installation des phlébotomes. L'éloignement de la population touchée des centres de santé et l'accès difficile aux localités touchées par le personnel médical et paramédical rend la sensibilisation de la population envers la maladie laborieuse et la prise en charge des malades (diagnostic et traitement) difficiles voir impossible.



Figure 57: Secteur Smimou (Essaouira 06/06/2013)

Le secteur Imi N'tlit est le troisième secteur touché avec un nombre de cas de 54 durant la période 2000-2013 et une incidence de 71,55 cas pour 100000 habitants en 2012. Comme pour le secteur Smimou, ce secteur rural fait partie des plateaux de Haha. Il est caractérisé par des hautes montagnes et un climat chaud. Sa géographie difficile a conduit à la persistance de la maladie vue la difficulté d'accès pour la population à la prise en charge et la difficulté à mener les actions de lutte par le personnel de la santé

➤ **La répartition des cas de la LC selon l'âge, le sexe, nombre de lésions et localisation :**

Durant notre étude, on a observé que les deux sexes sont concernés avec une prédominance du sexe féminin (57%) (Sex-ratio = 1,34) ceci peut être expliqué par une consultation fréquente chez les femmes, surtout lorsqu'il s'agit des lésions au niveau du visage.

Ces résultats concordent avec celles de Guernaoui et ses collaborateurs (**S.Guernaoui et al, 2005**) au niveau de la province de Chichaoua dont les résultats montrent que le sexe féminin prédomine avec un pourcentage de 58%, et celles de Abbour et ses collaborateurs (**Abbour et al, 2012**) à Azilal qui ont trouvé que le sexe féminin constitue 56% des cas atteints.

Concernant la distribution de la LC en fonction de l'âge, toutes les tranches d'âges sont touchées, notamment celle entre 0 et 9 ans avec une prévalence de 46,85%. Les études menées à Chichaoua (**Zougaghi et al, 2003**), en Tunisie (**Ben Abida et al, 2009**) et dans la préfecture de Fès (**Slaoui, 2011**) ont montré les mêmes résultats avec respectivement des pourcentages de 25%, 26% et 32,6%.

Cette répartition serait fort probablement liée à l'immunisation progressive avec l'âge, la fragilité de la peau des enfants et leurs complètes nudités qui les rendent vulnérables aux piqûres des phlébotomes.

L'étude de la LC en fonction du nombre de lésions montre qu'il varie de 1 à plusieurs lésions. Les plus observées sont les lésions uniques (58,6% des cas). Ceci est observé aussi dans d'autres travaux (**Fellah et al., 2007**) et (**Zait et al., 2009**). La taille des lésions est dans 44.89% ne dépassant pas 1cm.

Pour la localisation des lésions, on a noté que le visage constitue le siège le plus concerné par rapport aux membres supérieurs et inférieurs, avec un pourcentage de 35,8%. Ceci est conforme aux données des études menées en Algérie par Zait et ses collaborateurs qui ont trouvé un pourcentage de 52,2% (**Zait et al., 2009**). Contrairement à nos résultats, Fellah et ses collaborateurs ont trouvés que les membres inférieurs sont les plus touchés avec une prévalence de 42% (**Fellah et al., 2007**).

➤ L'étude moléculaire :

La province d'Essaouira a un relief caractérisé par 3 zones distinctes, une zone montagneuse du haut Atlas occidental, la plaine côtière et la zone du Dir qui fait la transition entre la plaine côtière et la zone montagneuse. Cette province comme on a démontré d'après l'étude rétrospective présente aussi une variation éco-épidémiologique importante ce qui pourrait agir sur la nature des espèces circulantes au niveau des différents secteurs touché par la LC.

Les études anciennes faites en 1991 par Rioux et ses collaborateurs sur le Maroc central et méridional, ont couvert une zone de 40000 km² comprenant les provinces d'Azilal, d'Agadir, de Guelmim et entre autre celle d'Essaouira. Ces études ont rapporté l'existence du complexe *L. tropica* dans toute la zone, avec comme seul secteur étudié au niveau de la province d'Essaouira, celui de Smimou qui appartient à la zone montagneuse.

Pour actualiser les anciennes données sur la répartition de l'espèce circulante de la LC au niveau de la province et aussi pour étudier les principaux secteurs touchés. Notre travail a consisté au typage moléculaire, par la technique PCR-ITS1-RFLP, de l'espèce circulante au niveau de 5 secteurs (2 secteurs montagnards, un semi urbain et un urbain) et 12 localités.

Les résultats de cette étude montrent que l'espèce circulante au niveau de tous les secteurs et localités étudiées de la province est de *L.tropica*.

Les symptômes cliniques observés dans cette zone à savoir la lésion souvent unique et de petite taille sont similaires à ceux observés dans les foyers à *L.tropica* à Taza (**Guessouss Idrissi et al., 1997**) et Zouagha My Yaacoub (**Fellah et al., 2007**), et sont différent à ceux observés dans les foyers à *L.major*.

Aussi, la présence de *L. tropica* dans cette zone est due à la présence du vecteur *Phlebotomus sergenti*, vecteur prouvé de *L. tropica* (**Al Zahrani et al., 1988**), ce même vecteur a été récemment identifié à Essaouira (secteur El hanchane) (**Ajaoud et al., 2013; Chafika Faraj**

et al., 2013), en plus cette province est limitrophe avec la province de Chichaoua foyer à *L.tropica* (**Rhajaoui M et al., 2012**)

Le manque des conditions d'hygiène, l'accumulation des déchets, le mouvement de la population envers les souks au niveau des secteurs Had Draa El Hanchane d'une part la dispersion de la population au niveau des montagnes pour les secteurs smimou et Imi N'tlit d'autre part constituent des conditions très favorables pour l'extension et la circulation de la LC à *L.tropica*.

CONCLUSION

L'étude épidémiologique de la LC au niveau de la province d'Essaouira, nous a permis de suivre l'évolution temporelle et sectorielle de la LC durant la période 2000-2012. Une nette augmentation du nombre de cas est enregistrée avec une extension géographique et une émergence de nouveaux secteurs. Ceci nécessite une surveillance continue par les responsables concernés avec une étroite collaboration intersectorielle afin d'arrêter la transmission de la maladie, de diminuer le nombre de cas positifs et d'empêcher la réapparition de nouvelles épidémies et de nouveaux secteurs touchés.

L'étude moléculaire a montré que *L.tropica* est l'espèce responsable de la LC au niveau de cette province. Sachant que l'Homme est le réservoir de *L.tropica* MON102 et que ce zymodème a été trouvé majoritaire au niveau des foyers marocains, la lutte doit donc cibler tous les facteurs qui contribuent à la diffusion de cette maladie:

- ✓ Rapprochement de la structure sanitaire à la population lointaine pour la prise en charge précoce et traitement des cas positifs afin d'arrêter la transmission de la maladie.
- ✓ Organisation des campagnes de masse au niveau des écoles et des secteurs touchés.
- ✓ Sensibilisation de la population et des autorités locales pour améliorer les conditions d'hygiène.

En terme de perspective, une étude épidémiologique au niveau de la province de Chichaoua, d'El Haouz et d'El kelaa, ainsi qu'une identification moléculaire des espèces circulantes au niveau des secteurs touchés de la province d'El Haouz et d'El kelaa aidera à orienter les stratégies de lutte dans toute la région de Marrakech-Tensift-El Haouz.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ***ABONNENCE, 1972** - Les Phlébotomes de la région éthiopienne. ORSTOM ed, 289 p.
- ***Adler S, Ber M, 1941**. Transmission of *L. tropica* by the bite of *P. papatasi*. *Ind J Med Res*;29:803–9.
- ***Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Andersen O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Frederrig S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A, Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F. & Taylor M.F.J.R. 2005**- The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451.
- ***Albrecht H. 1998**. Leishmaniosis. New perspectives on an underappreciated opportunistic infection. *AIDS* ; 12 : 2225-6.
- ***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.
- ***Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, et al. 1997**. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection : the first ten years. *Clin Microbiol Rev*; 10: 298-319.
- ***Alvar, J. P., 2001**. *La Leishmaniasis: de la biología al control*, 2ed., Laboratorios Intervert S.A., Madrid.
- ***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.
- ***Anon., 2003**- Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Rapport Annuel de la Ministère de la Santé, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc. 34–49.
- ***Arroub, H., Alaoui, A., Lemrani, M. Abbari, K., 2012**. Cutaneous Leishmaniasis in Foum Jamâa (Azilal, Morocco): Micro-environmental and Socio-Economical Risk Factors. *J.Agric.Soc.Sci.* 1, 10-16.
- ***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

***Bacaër N. & Guernaoui S. 2006-** The epidemic threshold of a simple seasonal model of cutaneous leishmaniasis. *J. Math. Biol.* 53, 421–436.

***Bailey, M. S. 2007;** MRCP; Lockwood, D. N. J.; BSc; MD; FRCP Clinics in Dermatology, 25, 203-211. Cutaneous leishmaniasis.

***Ben Abida, I., Aoun, K., Ben Alaya, N., Bousslimi, N., Mokni, M. Bouratbine, A., 2009.** Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques actualisées de la leishmaniose cutanée en Tunisie. *Revue tunisienne d'infectiologie.*2, 31-36.

***Blanc G. & Pietri A. 1934-** Nouveau cas de leishmaniose viscérale infantile au Maroc. *Maroc méd.*146, 327-329.

***Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999).** Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol*, **29**, 3737-3744.

***Bossolasco S., Gaiera G., Olchini D. ET AL., (2003).** Real-Time PCR Assay for Clinical Management of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*,p. 5080-5084, Vol. 41, No. 11.

***Colonieu L. 1931-** Sur un cas de boutons d'Orient multiples contractés dans l'Atlas marocain.

***Cunningham, A.C. (2002).** Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. *Exp and Mol Pathol*, **72**, 132-141.

***DE BRUJIN M.H.L., LABRADA L.A., SMYTH A.J., SANTRIC C. & BARKER D.C. (1993).** A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.*, 44, 201–207.

***De doncker S., Hutse V., Abdellati S., Rijal S., Singh-karri B. M., Decuypere S., Jacquet D., Le ray D., Boelaert M., Koirala S., & Dujardin J. C., (2005).** A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99:25–31.

***Dedet JP. 1999.** Les leishmanioses. Edition Manson

***DEDET JP, PRATLONG F, LANOTTE G, RAVEL C, 1999 -** The parasite. *Clinics in Dermatology*; **17** : 2681-2686.

***DOLMATOVA AV, DEMINA NA, 1971** - Les Phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. ORSTOM ed, 168 p.

***Desjeux P., 1996.** Leishmaniasis public health aspects and control, Clin Dermatol ; 14:417-23.

***Desjeux P. 1999-** Les leishmanioses. Aspect de santé publique et lutte. Edition Ellipses, 253p.

***Desjeux P. & Alvar J. 2003-** Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97, 3-15.

***Desjeux, P. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2004.** Leishmaniasis: current situation and new perspectives, 27, 305-310.

***Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D., Wengenack N. L., Rosenblati J. E., Cockerill III F. R., & Smith T. F., (2006).** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin. Microbiol. Rev. 19:165–256.

***Faraj, C., El Bachir, A., Ouahabi, S., El Kohli, M., El Rhazi, M., Lakraa, L. Ameer, B., 2012.** Distribution and Bionomic of Sand Flies in Five Ecologically Different Cutaneous Leishmaniasis Foci in Morocco. ISRN Epidemiology. 2013,1-8

***Foley H., Vialatte C. & Adde R. 1914-** Existence dans le sud marocain (Haut Guir) du bouton d'orient à l'état endémique. Bull. Soc. Path. Exot. 7, 114-115.

***Forget G. (2004).** Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par Leishmania pour contrer la réponse immunitaire innée. Thèse de Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine. Université Laval. France.

***Golvan Y J., 1990** – Eléments de parasitologie médicale 4 ème Ed. Flammarion. Chp3. p245.

***Guernaoui S., Boumezzough A., Pesson B. & Pichon G. 2005a-** Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. J. Med. Entomol. 42, 697–701.

***Guernaoui S., Boussaa S., Pesson B. & Boumezzough A. 2006a-** Nocturnal activity of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in Chichaoua, Morocco. Parasitol. Res. 98, 184–188.

- *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.
- *Guessouss-Idrissi N. 1999-** La leishmaniose cutanée à Taza. Recherche Nationale, les Cahiers du Médecin. Tome II- N° 19, 37-40.
- *Guilvard E, Rioux JA, Gallego M, Pratlong F, Mahjour J, Martinez-Ortega E, et al, 1991.** Leishmania tropica au Maroc. Ann Para Hum Comp;66(3):96–9.
- *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.
- *Hoares CA, Wallace FG.** Development of trypanosomatid flagellates. Nature 196; 212: 1385–6.
- *H. Fellah, M. Rhajaoui, S. Ouahabi, D. Belghiti and M. Lyagoubi, 2007.** Occurrence of human cutaneous leishmaniasis in Zougha My Yacoub province (Morocco). International Journal of Agriculture & Biologie. 1, 197-8.
- *Jarry D.M. 1999-** Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. In Dedet J-P., Les Leishmanioses, Ellipses Ed., Paris, 89-108.
- *Kamoun et Fréjaville, 2002,** Guide des examens de laboratoire, 4^{ème} édition, Médecine sciences, Flammarion.
- *Killick-Kendrick R. 1990-** Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. Med. Vet. Entomol. 4, 1-24.
- *Klippel, Monier-Vignard. 1922.** Premier cas de Kala–azar d’origine marocaine. SocMed Hop Paris ;20:72–85.
- *Laamrani-Idrissi M. 2000-** Programme de lutte contre les leishmanioses. Séminaire national sur la surveillance et la lutte contre les rongeurs. Marrakech, 07 et 08 juin.
- *Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, et al. 1999.** Occurrence of Leishmania infantum parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J Clin Microbiol; 37: 1953-7.
- *Le Houerou H. 1989-** Classification écoclimatique des zones arides (s. l.) de l’Afrique du nord. Ecol. Médit. 15(3/4), 95-144.
- *Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.F.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague**

V., Vavra J. & Wallace F. G. 1980- A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27. 37-58.

***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.

***Maazoun R., Pratlong F., Lanotte G. & Rioux J.A. 1986-** Le complexe *Leishmania major*. A propos de l'analyse numérique de 35 souches identifiées par la méthode enzymatique. In: *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques.* J.A. Rioux éd. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier. 129-137.

***Marsden PD. 1986.** Mucosal leishmaniasis, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:859-876.

***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.

***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.

***Marty P, Le Fichoux Y, Pratlong F, Lanotte G, Rioux JA, Lacour JP.** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in young Moroccan child observed in Nice France. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 198; 83:510.

***MATHIS A & DEPLAZES P. (1995).** PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1145–1149.

***M. Riyad, S. Chiheb and M. Soussi-Abdallaoui , 2013:** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Morocco: still a topical question. *Eastern Mediterranean Health Journal, La Revue de Santé de la Méditerranée orientale.*

***Ministère de la santé publique, Maroc, 2001.**Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Direction épidémiologique de lutte contre les maladies. Rabat. Morocco.

***Ministère de Santé. 2010.** Lutte contre les leishmanioses (Maroc). Guide des activités. Ed. El Maarif Al Jadida. Rabat, 25- 45.

***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.

***OMS, 2000-** *Leishmania* and HIV co-infection. *Lepr. Rev.* 71, 104-5.

***PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H. & QUILICI M. (1993).** Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence for *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 364–369.

***Piarroux R., Trouve V., Pratlong F., Martini A., Lambert M. & Rioux J.A. (1994).** The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of Old World *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **88**, 475-478.

***Pratlong F, Rioux JA, Derreure J, Mahjour J, Gallego M, Guilvard E, et al, 1991.** *Leishmania tropica* au Maroc. Diversité isozymique intrafocale. *Ann Para Hum Comp*;66(3):100–4.

***Reithinger, R.; Dujardin, J-C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. 2007.** *The Lancet Infectious Diseases*, **7**, 9, 581-596. Cutaneous Leishmaniasis.

***Reithinger. & Dujardin J.C., (2007).** Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 21–25.

***Remlinger P, 1921.** Un cas de Kala-azar infantile observé au Maroc. *Arch Inst Pasteur Afr Noi*;1:240–1.

***Rhajaoui M, Fella H, Pratlong F, Dedet JP, Lyagoubi M. 2004.** Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans Roy Soc TropMed Hyg*; **98**:299–301.

***Rhajaoui M, Abdelmajeed N, Fella H, Azmi K, Amrir F, Al-jawabreh A, et al, 2007.** Molecular typing reveals emergence of a new clinic-epidemiologic profile of Cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Em Infec Dis*;3(9):1358–60.

***Rhajaoui M, Sebti F, Fella 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).

***Rhajaoui M., Sebti F., Felleh H., Alam M.Z., Nasereddine A., Abbasi I & Schonian G, 2012.** Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco. *Parasite*, **19**, 81-84.

***Rioux J.A. & Golvan Y. 1969-** Épidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France.

***Rioux J.A., Petter F., Akalay O., Lanotte G., Ouazani A., Seguignes M. & Mohcine A. 1982-** *Meriones shawi* (Duvernoy, 1842) (Rodentia, Gerbillidae), réservoir de *Leishmania major* Yakimoff et Shokhor, 1914 dans le Sud Marocain. C.R. Acad. Sci. Paris. 294, 515–517.

***Rioux JA, Rispail G, 1983.** La Leishmaniose viscérale. Cah Med; 8(63):88.

***Rioux J.A., Lanotte G., Pratlong F. Dereure J., Jarry D., Moreno G., Killick-Kendrick R., Perieres J., Guilvard E., Belmonte A. & Portus M. (1985).** La leishmaniose cutanée autochtone dans le Sud-Est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les pyrénées-Orientales. Méd. Mal. Infect., 11 : 650-656.

***Rioux JA, Lanotte G, Petter F, Derreure J, Akalay O, Pratlong F, et al, 1986b.** Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. In: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Application écoépidémiologique. Coll. Int. CNRS/Inserm:365–95.

***Rioux J.A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P. & Périères J., (1990).** Taxonomy of *Leishmania*, use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annl Parasitol hum comp.*, 65, 111-125

***Rioux JA, Mahjour J, Gallego M, Dereure J, Perieres J, Lahmrani A, et al, 1996.** Leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania infantum* Mon 24 au Maroc. *Bull Soc Fran Parasito*;14:2.

***Roberts L.S. & Janovy J.J. 2000-** Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. McGraw-Hill Higher Education, Boston.

***Santos, D. O.; Coutinho, C. E. R.; Madeira, M. F.; Bottino, C. G.; Vieira, R. T.; Nascimento, S. B.; Bernardino. A.; Bourguignon, S. C.; Corte-Real, S.; Pinho, T.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. Parasitol. Res. 2008.** Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review, 103, 1-10.

***Schonian G., Nasereddine A., Dince N. et AL., (2003).** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47, 349–358.

***SLAOUI M., (2010/2011):** Mémoire : Etude rétrospective et moléculaire de la leishmaniose cutanée à la préfecture de Fès et la province de Moulay Yacoub,

***Souhail M. 1994-** La leishmaniose viscérale (revue de littérature nationale et internationale). Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté de Médecine, Casablanca. Maroc. 90 p.

***Tamar, S., Dumas, C. and Papadopoulou, B. (2000).** Chromosome structure and sequence organization between pathogenic and non-pathogenic *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 401-414.

- *Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E, 1993. Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp.;68(2):107-8.**
- *Vieira, L.L., Sacerdoti-Sierra, N. and Jaffe, C.L. (2002).** Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol*, **32**, 1085-1093.
- *World Health Organization, 1984.** The leishmaniasis. Technical report series 701. World Health Organization (edit.), Ginebra.
- *World Health Organization, 2007.** Report of the Fifth Consultative Meeting On Leishmania/HIV Coinfection.
- *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.
- *Zijlstra EE, El Hassan AM. 2001.** Leishmaniasis in Sudan. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene*; 95 (Suppl. 1): S27-S1158.
- *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.

Annexe 1

Fiche de renseignement

INSTITUT NATIONAL D'HYGIENE

DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE

UNITE DES LEISHMANIOSES Fiche de renseignement

Date : /_____/

N° de la fiche /_____/

RENSEIGNEMENTS SUR LE MALADE

Nom Prénom Age /_____/ sexe : /_____/

Province Ville/Village Secteur

Localité/Quartier Centre de santé

Déplacements effectués au cours de la dernière année

Lieu date /__/__/____/ durée

Cas familiaux atteints de leishmaniose /__/

Cas entourage atteints de leishmaniose /__/

Date de début de la maladie /__/__/____/

CLINIQUE

Type de leishmaniose Viscérale /__/

Cutanée /__/

Nombre des lésions cutanées /__/

L1 : Taille cm Localisation

L2 : Taille cm Localisation

BIOLOGIE

Date du prélèvement

Nombre de lames envoyées /__/____/

Numéro (code) de la lame	Date d'examen	Résultat

TRAITEMENT

Posologie	Date
-----------	------

