



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques Béni-Mellal



UFR : Chimie et Physico-Chimie des Substances Naturelles et Synthétiques d'intérêt
biologique

THESE

Présentée par

Hassan ARROUB

Pour obtention du grade du

Doctorat National

Spécialité : Eco- Epidémiologie Parasitaire

**ETUDE D'UN FOYER EMERGEANT DE LA LEISHMANIOSE
CUTANEE A *LEISHMANIA TROPICA* DANS LA REGION DE FOUM
JAMAA (AZILAL, MAROC).**

Soutenue le 12 octobre 2013 devant la commission d'examen :

Président	ZYAD Abdelmajid	Pr. FST Beni Mellal
Rapporteurs	BOUMAZZOUGH Ali	Pr. Université Cadi Ayyad, Marrakech
	CHAIT Abderrahmane	Pr. Université Cadi Ayyad, Marrakech
Examineurs	HABBARI Khalid	Pr. FST Beni Mellal
	CHIGR Fatiha	Pr. FST Beni Mellal
	LEMIRANI Meryem	Dr. d'Etat Institut Pasteur du Maroc

AVANT-PROPOS

Nom et prénom de l'auteur : Hassan ARROUB

Intitulé du travail :

**ETUDE D'UN FOYER EMERGEANT DE LA LEISHMANIOSE CUTANEE
A *LEISHMANIA TROPICA* DANS LA REGION DE FOUM JAMAA
(AZILAL, MAROC).**

Nom et Prénom de directeur des travaux de recherche :

-Khalid Habbari, Université Sultan Moulay Slimane Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, Maroc.

Laboratoire où les travaux ont été réalisés :

- Laboratoire d'Aménagement et de la Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Beni Mellal, Maroc.
- Laboratoire des recherches et d'étude sur les Leishmanioses, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc.

Laboratoire avec lequel il y a eu collaboration pour ce travail :

-Centre de la santé de Foug Jamaà en collaboration avec la délégation provinciale du ministère de la santé d'Azilal (Maroc).

Début des travaux de recherche : Septembre 2006.

Rapporteurs autres que l'encadrant :

- BOUMAZZOUGH Ali, Université Cadi Ayyad Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.
- CHAIT Abderrahmane, Université Cadi Ayyad Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc.

Soutien financier :

- Sans soutien financier.

Les travaux réalisés dans ce cadre ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

Publications:

Hassan Arroub, Abdelaaziz Alaoui, Meryem Lemrani and Khalid Habbari, 2012. Cutaneous leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Morocco): microenvironmental and socio-economical risk factors. *J. Agric. Soc. Sci.*, 8: 10–16.

Hassan Arroub, Abdelaaziz Alaoui, Hicham El Miri, Meryem Lemrani and Khalid Habbari, 2012: Spatiotemporal distribution of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Atlas of Morocco). *J. of Life Sciences*, 6(10): 1124-1132.

Hassan Arroub, Salsabil Hamdi, Malika Ajaoud, Khalid Habbari and Meryem Lemrani, 2013: Epidemiologic and molecular detection of *leishmania* of cutaneous leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Atlas of Morocco). *J. Acta Tropica* 127: 1-5.

Communications:

Hassan Arroub, Aziz Alaoui et Khalid Habbari: La leishmaniose cutanée dans la région de Foug Jamaà (Azilal, Maroc). Workshop de Biotechnologies. 25-26 Décembre 2009. Béni Mellal, Maroc.

Hassan Arroub, Aziz Alaoui et Khalid Habbari: Etude éco-épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans la région de Foug Jamaà (Azilal, Maroc). Le Premier Colloque International sur les Changements Climatiques et Environnement 20 et 21 Mai 2010. Rabat, Maroc.

Hassan Arroub, Aziz Alaoui, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: Les leishmanioses cutanées à Foug Jamaà (Azilal, Maroc) : étude des facteurs micro-environnementaux et socio-économiques de la persistance et de la propagation de la maladie. Troisième édition Sur L'Amélioration de la Production Agricole (APA3) Jeudi et vendredi 17-18 Mars 2011. Settat, Maroc.

Hassan Arroub, Aziz Alaoui, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Foug Jamaà (Azilal), Atlas of Morocco. ISOPS 7 International Symposium on Phlebotomine Sandflies 25-30 April 2011 Kusadasi – Turkey.

Hassan Arroub, Aziz Alaoui, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: Les leishmanioses cutanées à Foug Jamaà (Azilal, Maroc). La Première Rencontre Nationale sur les Biofilms « Journée du Vendredi 27 Mai 2011. Béni Mellal, Maroc.

Hassan Arroub, Kalid Habbari et Meryem Lemrani: «Epidémiologie de la leishmaniose cutanée dans la région de Foug Jamaà (Azilal, Maroc)». Les Journées Scientifiques et Culturelles Universitaires 24-26 avril 2012. Béni Mellal, Maroc.

Hassan Arroub, Kalid Habbari et Meryem Lemrani: Les leishmanioses cutanées à Foug Jamaà (Azilal, Maroc): Etude des facteurs démographiques, socio-économiques et environnementaux de la persistance et de la propagation de la maladie. Les Journées Scientifiques et Culturelles Universitaires 24-26 avril 2012. Béni Mellal, Maroc.

Hassan Arroub, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: L'effet des facteurs micro-environnementaux sur la propagation de la leishmaniose cutanées à Foug Jamaà (Azilal, Maroc). Forum régional planet'Ere 5 sous le thème : «Education à l'environnement et à la santé, un même combat» du 2 au 5 Juin 2013. Béni Mellal, Maroc.

Hassan Arroub, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: L'effet de quelques paramètres environnementaux sur la répartition de la leishmaniose à Foug Jamaà (Azilal, Maroc). Le septième Congrès Mondial de l'Education à l'Environnement sous le thème : «L'éducation à l'environnement et les enjeux d'une meilleure harmonie ville-campagne» du 9 au 14 Juin 2013. Marrakech, Maroc.

Hassan Arroub, Khalid Habbari et Meryem Lemrani: Epidemiologic Features of Cutaneous Leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Morocco). MESAEP 17 International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region 28 September-October 1, 2013 Istanbul- Turkey.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A ma chère défunte mère,

A mon père,

A ma petite famille Hind,

Moaàd et Hayat

A mes sœurs et mes frères

& A tous ceux qui me sont
chers.

REMERCIEMENTS

Avant d'exposer le résultat de mes recherches, il est nécessaire d'exprimer, avec plaisir, ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce modeste travail ou qui m'ont fait l'honneur de le juger.

Je tiens tout d'abord à remercier le Doyen de la faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements et à exprimer ma gratitude à Khalid Habbari, Professeur à la faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, qui me fait l'honneur de diriger ce travail sans oublier sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils.

Je dois une reconnaissance particulière au Docteur d'Etat Meryem Lemrani, Chef de la division de recherche sur les maladies transmissibles, Institut Pasteur du Maroc. Elle a accepté aimablement de co-diriger ce travail et Elle m'a permis de préparer ma thèse en co-tutelle. Elle est toujours très disponible et ouverte à la discussion ce qui m'a permis de bénéficier de son grand savoir en entomologie. Je le remercie particulièrement pour sa confiance, sa générosité et sa gentillesse, ce fut très enrichissant de travailler dans son laboratoire et sous sa direction scientifique.

Ma profonde gratitude et mes sincères remerciements vont particulièrement à Mostafa Lakhoili, Professeur Directeur de l'UFR-Doctorat «Chimie et Physico-Chimie des Substances Naturelles et Synthétiques d'intérêt biologique».

Mes remerciements vont aussi au Ministère Marocain de la Santé, spécialement Mr Hanafi, Mr. Batouli, Mr Bouabbadi, Dr Laarbi et toute l'équipe du centre de la santé du milieu de Foug Jamaà. Je les remercie vivement pour la collaboration, pour l'aide et pour le soutien moral.

J'ai le plaisir aussi de remercier chaleureusement, tous mes collègues du Laboratoire de l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca: Salsabil Hamdi, Malika Ajaoud et Nargys, pour l'aide, la gentillesse et pour les moments agréables que nous avons partagés sur le terrain et au laboratoire des leishmanioses à l'Institut Pasteur.

Mes sentiments les plus sincères d'amitié concernent mes amis M. Smayou, S. Korane, Lhassani, Zokzdou et M. Belmekki pour leur soutien pendant les périodes difficiles.

Je ne saurais remercier assez tout mes collègues et ami(e)s de Lycée Oued El Abid de Foug Jamaà (Azilal), O. Mnsouri, A. Mnsouri, M. Azatour et K. Berchami pour la gentillesse sans limite, amour et soutien pendant les périodes difficiles. Mes

remerciements vont aussi à Mr R. Jbilou, A. Alaoui, H. Elmiri et R.Arroub pour l'aide qu'ils m'ont accordé et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Enfin, je remercie toutes celles et tous ceux qui m'ont accompagné et soutenu durant ces années d'études, notamment ma petite famille; sans leur appui, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Je ne saurais exprimer mes sincères sentiments de reconnaissance à toute ma famille, spécialement à mon frère A. Arroub pour sa gentillesse, ses encouragements, ses services multiples, son soutien moral continu.

ملخص

RESUME

ABSTRACT

دراسة انتشار الليشمانيا الجلدية ذي الليشمانيا المدارية بمنطقة فم الجمعة (أزيلال، المغرب).

يعد مرض الليشمانيات مشكلا صحيا في المغرب استنادا لمعطيات وزارة الصحة. منطقة فم الجمعة معنية بشكل كبير بهذا الداء، بالنظر لارتفاع عدد حالات الليشمانيا المسجلة في الآونة الأخيرة، أضف إلى ذلك تواجد المنطقة في موقع محاط ببؤر الليشمانيز: مراكش.

بينت الدراسة الميدانية أن المنطقة تتوفر على ظروف مساعدة لانتشار ناقل المرض (تواجد النفايات قرب المنازل، السكن الغير اللائق....) و خلصت الدراسة إلى أن الظروف البيئية المتردية لبعض المنازل تؤثر على عموم الساكنة.

كشفت الدراسة الميدانية للنشاط الموسمي لأنواع الذبابة الرملية المتواجدة في المنطقة أن النوع *Phlebotomus* يسود بنسبة 80%، حيث يشكل *Phlebotomus sergenti* وحده 57%، متبوعا بـ *P. longicuspis* بنسبة 23% إلى جانب أربعة أنواع أخرى وهي *P. perniciosus*، *P. papatasi*، *P. chabaudi* و *Sergentomyia minuta* كنوع وحيد بالنسبة لصنف *Sergentomyia*.

الدراسة خلصت كذلك إلى أن الفترة الممتدة بين ماي و أكتوبر والتجمعات السكانية تعرف كثافة عديدة لهذه الحشرة في علاقة مع الظروف المناخية (خاصة الحرارة) .

الانتشار الكبير لنوع *P. sergenti* يوحي بانتشار الليشمانيا المدارية في المنطقة. للتأكد من ذلك، تطرق البحث إلى دراسة التمييز الجزيئي للطفيلي ، حيث بينت النتائج أن النوع الليشمانيا المدارية هو المسبب الوحيد لداء الليشمانيا في منطقة فم الجمعة.

الكلمات الدالة: الليشمانيا المدارية، PCR-RFLP ، الذبابة الرملية ، *Phlebotomus Sergenti*، فم الجمعة .

Etude d'un foyer émergent de la leishmaniose cutanée à *leishmania tropica* dans la région de Foum Jamaà (Azilal, Maroc).

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires transmises par la piqûre des phlébotomes. Au Maroc, la maladie constitue une source d'inquiétude à la santé publique. Foum Jamaà constitue une zone carrefour entre plusieurs foyers de la leishmaniose: Marrakech, Afourrer et Bzou.

Le présent rapport traite sous forme des enquêtes les liens pouvant exister entre les facteurs micro-environnementaux et socio-économiques (mode de vie et comportement de la population) et la recrudescence de la leishmaniose cutanée (LC). Nous avons étudié aussi l'inventaire des phlébotomes et leur répartition spatio-temporelle, ainsi que la caractérisation moléculaire de parasite.

Ainsi, l'étude épidémiologique a montré que toutes les tranches d'âges (en majorité enfants moins de 10 ans), toutes les catégories socioprofessionnelles et les deux sexes sont touchés par la maladie. Le comportement en matière d'hygiène et d'assainissement dans le cadre individuel a une conséquence sur la santé collective dans la recrudescence de la LC.

Nos résultats d'identification de souches de leishmanie, obtenus par PCR-RFLP, ont révélé que *L. tropica* est le seul agent causal de la LC dans la région de Foum Jamaà. Cependant, ces données doivent être complétées par un typage enzymatique permettant d'identifier le ou les zymodème(s) en question.

L'inventaire de la faune phlébotomienne dans la région a montré que 80% des espèces capturées appartiennent au genre *Phlebotomus* avec *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *sergenti* comme espèce dominante (57%), suivi par *Phlebotomus* (*Larrousius*) *longicuspis* (23%). En plus de ces deux espèces, on a noté la présence de *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi*, *P. (Para.) chabaudi*, *P. (L.) perniciosus* *Newstead* et *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *minuta*, Seule espèce du genre *Sergentomyia*. Une interprétation générale des résultats révèle une période annuelle à haut risque leishmanien de Mai à Octobre. L'analyse des résultats par espèce laisse conclure que les espèces montrent une activité biphasique en relation avec les conditions climatiques (température et la pluviométrie) et l'habitation humaine est le biotope préféré.

Mots clés: Epidémiologie, Phlébotome, *Phlebotomus Sergenti*, PCR-RFLP, *Leishmania tropica*, Foum Jamaà.

Epidemiologic and Clinical Features of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in Foug Jamaà (Azilal, Morocco).

The leishmaniasis are parasitic diseases transmitted by the sand flies through their bites causing many spots on the human skin. In Morocco, the disease has become a preoccupying central concern for public health. Foug Jamaa area, to an extent, constitutes a high risk as it is surrounded by several foci of leishmaniasis: Marrakech, Afouerrer and Bzou.

This research discovers the possible relationship between the micro-environmental factors and socio-economic factors from one part and the spread of the cutaneous leishmaniasis (CL) from the other. We also studied the inventory of sand flies, their spatio-temporal repartition and the parasite molecular aspects.

The studies conducted in this field reveal that the disease affects both sexes from different ages, especially children whose age is less than 10 years. The behavior of hygiene and sanitation in the individual has an impact on community health in the spread of CL.

After the analysis of clinical samples by using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis for internal transcribed spacer region 1, we conclude that *L. tropica* is the only causative agent of CL in the region of Foug Jamaà. Researches should be continued to find out if the disease in this region is due to a single or a variety of *L. tropica* genotypes.

An entomological survey of Phlebotomine sand flies was carried in Foug Jamaà region. 80% of the total collected flies were identified as *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* (57%) and *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* (23%). In addition to these dominant species, four other species were found, *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*, *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta*, *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* and *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi*. The seasonality of the sandfly fauna in Foug Jamaà was examined and they were active especially during the dry season (from Mai to October).

Overall, the population dynamics show a yearly bimodal pattern related to rainfall and temperature, and with high density around human dwellings.

Keywords: Epidemiology, sandfly *Phlebotomus Sergenti*, PCR-RFLP, *Leishmania tropica*, Foug Jamaà, Morocco.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I-Les leishmanioses	7
1-Définition.....	7
2-Les formes cliniques.....	7
a. Les leishmanioses viscérales	7
b. Les leishmanioses cutanées	8
3-Historique	9
4-Parasite	11
a. Taxonomie.....	11
b. Morphologie et cycle de transmission.....	14
c. Biologie moléculaire des leishmanies	16
5-Vecteur	18
a. Généralités et importance médicale.....	18
b. Taxonomie.....	20
c. Morphologie	22
d. Cycle de développement	25
e. Les facteurs environnementaux favorisant l'activité des phlébotomes.....	26
6-Rongeurs.....	27
a. Les sujets humains en tant qu'hôtes réservoirs	27
b. Hôtes réservoirs animaux domestiques et péri-domestiques.....	28
7- Distribution géographique	29
a. La leishmaniose viscérale.....	31
b. La leishmaniose cutanée.....	31
II-Les leishmanioses au Maroc	31
1- La leishmaniose viscérale.....	32
2- La leishmaniose cutanée.....	34
a. La leishmaniose cutanée à <i>L.tropica</i>	34
b. La leishmaniose cutanée à <i>L. infantum</i>	35
c. La leishmaniose cutanée à <i>L. major</i>	38
III-Les phlébotomes du Maroc	40
CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES	43

I-Présentation de la zone d'étude	43
1- Localisation géographique de la zone d'étude	43
2- Cadre administratif	44
3- Activités économiques.....	44
a. L'agriculture	44
b. L'élevage.....	45
c. Activités commerciales et de service	45
4- Cadre physique	45
5- Climatologie	45
6- Végétation.....	46
7- Population.....	47
8- Organisation de Foum Jamàa sur le plan sanitaire	47
9- Description de l'habitat et du cadre de vie de la région	47
a. Type d'habitat rencontré.....	47
b. Mode d'éclairage utilisé	48
c. Le système d'approvisionnement en eau potable.....	48
d. Animaux dans les ménages	48
e. Le mode de gestion des eaux usées	49
f. Le mode de gestion des excréta.....	49
g. Le mode de gestion des ordures ménagères	50
h. Système de gestion des eaux de pluie	51
II-Enquêtes épidémiologiques	52
1- Déroulement pratique des enquêtes	53
2- Analyse des données.....	53
III- Diagnostic microscopique et moléculaire des leishmanies	53
1-Prélèvement	54
2- Le frottis	54
3- Diagnostic parasitologique basé sur l'observation microscopique.....	55
4- Diagnostic moléculaire	56
a. Extraction de l'ADN.....	56
b. Amplification par PCR.....	57
c. Digestion enzymatique par HaeIII du produit PCR ITS1	58
IV- Surveillance entomologique	59
1- Technique d'échantillonnage.....	59

2- Conservation des phlébotomes	61
3- Traitement des échantillons	61
a. Eclaircissement.....	61
b. Montages	61
c. Dissection des phlébotomes	62
d. Identification morphologique des spécimens.....	62

CHAPITRE III ETUDE ECO-EPIDIMIOLOGIQUE DE LA MALADIE

ET IDENTIFICATION DU PARASITE..... 64

Partie 1: Etude des facteurs démographiques, socio-économiques et environnementaux

liés à la répartition de la leishmaniose cutanée..... 64

I-Introduction.....	64
II-Données cliniques	64
1- Nombre et localisation des lésions	64
2- Effet du traitement.....	65
3- Risque lié au type de dépistage.....	65
III-Evolution spatio-temporelle de la maladie au sein de Foum Jamaà	66
1- Evolution annuelle de la leishmaniose cutanée	66
2- Evolution saisonnière du nombre de cas de la leishmaniose cutanée.....	67
3- Dynamique de la répartition spatiale de la maladie.....	67
a. Distribution des cas à l'échelle des secteurs.....	68
b. Répartition des malades en relation avec l'altitude des localités.....	70
IV-Caractérisation de la population cible.....	70
1- Vulnérabilité liée au sexe	70
2- Vulnérabilité liée à l'âge	71
3- Perception de la maladie à l'échelle de Foum Jamaà	72
V-Paramètres socio-économiques liés à la maladie	73
1- Vulnérabilité par catégorie socio professionnelle	73
2- Effet de niveau d'instruction des parents sur la répartition de la maladie.....	74
3- Répartition des malades par rapport au niveau de vie de leurs ménages	75
VI- Effet du mode de vie et les caractéristiques du milieu dans la recrudescence de la maladie dans la région.....	76
1-Vulnérabilité par rapport à la durée d'habitation dans la région	76
2- Risque lié au mode d'éclairage.....	76

3- Risque lié au mode de gestion des ordures ménagères.....	77
4- Risque lié au mode d'aération	78
5- Vulnérabilité liée au mode d'élevage des animaux.....	79
6- Risque lié au chien.....	79
Partie 2 : Identification de l'agent causal de la maladie dans la région de Foug Jamaà.	81
I- Identification du genre	81
II-Identification de l'espèce	82
Discussion	83
CHAPITRE IV LA SURVEILLANCE ENTOMOLOGIQUE DES	
PHLEBOTOMES.....	86
Introduction	86
I- Caractérisation morphologique des phlébotomes de la région de Foug Jamaà.....	86
1- Phlébotomes du genre <i>phlebotomus</i>	86
a. <i>Phlebotomus (paraphlebotomus) sergenti</i> Parrot, 1917.....	86
b. <i>P. longicuspis</i>	88
c. <i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i> Scopoli, 1786.....	89
d. <i>Phlebotomus perniciosus</i>	90
e. <i>Phlebotomus chabaudi</i>	92
2- Phlébotomes du genre <i>Sergentomyia</i>	92
a. Introduction	92
b. Critères d'identifications du genre <i>Sergentomyia</i> et de l'espèce <i>S.</i>	
<i>minuta</i>	93
II- Ecologie des phlébotomes dans la région de Foug Jamàa.....	94
1- Sex-ratio	94
2- Effectif et abondance relatifs aux espèces capturées.....	94
3- Fréquence et répartition des espèces dans la région d'étude.....	95
4- Association des espèces à différents biotopes	99
Discussion	100
CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXES.....	137

INTRODUCTION GENERALE

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires à un large éventail de symptômes cliniques, communes à l'homme et à l'animal (anthropozoonose). La maladie est due à des protozoaires flagellés appelés leishmanies et transmise par la piqûre de la femelle hématophage d'un insecte diptère dénommé phlébotome (Danis et *al.*, 1996). Les réservoirs de parasite sont des rongeurs sauvages, l'homme et le chien (Gentilini, Duflo et *al.*, 1986; Dmbele, 1992 et Richard, 1995).

Le fonctionnement et la dynamique des foyers de la maladie sont très liés aux modifications environnementales (Ashford, 2000). L'émergence ou re-émergence des leishmanioses est étroitement liée à l'augmentation de facteurs de risque qui sont essentiellement de nature anthropogène (Desjeux, 2002). D'après Rodhain (2000), les maladies à transmission vectorielle, notamment les leishmanioses sont attachées d'une manière étroite aux changements climatiques. Dans le même contexte, l'OMS (2010) s'intéresse aux facteurs socio-économiques et au changement climatique en tant que facteurs de risque d'une extension accrue de la maladie.

La croissance démographique nécessite énormément de besoins en infrastructures et équipements communautaires liés aux conditions de vie favorables tel que l'accès à l'eau potable et à l'assainissement. Les modifications environnementales (déforestation, infrastructures hydrauliques, urbanisation anarchique, migration humaine...) qui accompagnent cette évolution, ainsi que les conditions défavorables sont étroitement liées à la leishmaniose (Desjeux, 1999). Les co-infections *Leishmania*/VIH sont aussi un facteur de risque individuel qui favorise la propagation de la maladie (Unaid, 1998; Desjeux et Alvar, 2003).

Ces dernières années, la leishmaniose a pris de l'ampleur et touche des régions connues d'être non endémiques auparavant. Ce qui a exigé une attention particulière de la part de l'OMS et les gouvernements de différents pays. En effet, le rapport de l'OMS (2010) recommande de faire avancer la connaissance épidémiologique de la maladie ainsi que les études cliniques, afin de remédier à l'absence d'un schéma thérapeutique contre la leishmaniose cutanée, la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose dermique post kala-azar qui s'appuie sur des données probantes.

L'étude des concepts et théories de l'écologie, ainsi que les méthodes et les stratégies épidémiologiques est importante pour comprendre le complexe de la maladie (parasite, vecteur, réservoir). Ce complexe est lié à un ensemble de paramètres bioclimatiques régnant dans une aire géographique déterminée (ministère marocain de la santé (MS, 2010).

Les leishmanioses regroupent deux catégories majeures bien distinctes, selon leur localisation profonde ou superficielle: les leishmanioses viscérales (LV) et les leishmanioses cutanées (LC). En général, les deux formes déterminent deux entités éco-épidémiologiques: anthroponotique et zoonotique.

On estime que 350 millions de personnes sont exposées au risque de contracter la maladie et quelque 2 millions de nouveaux cas se déclarent chaque année (OMS, 2010). La maladie touche environ 88 pays, 66 dans l'ancien monde et 22 dans le nouveau monde (Desjeux. P, 1996), cependant la déclaration de la maladie n'est obligatoire que dans 32 des 88 pays endémiques, un nombre important de cas n'est jamais déclaré (OMS, 2010). On estime qu'il existe à travers le monde 12 millions de personnes atteintes par la leishmaniose, certaines avec des manifestations cliniques et d'autres sans symptômes (OMS, 2006).

Sur le pourtour du bassin méditerranéen occidental, la leishmaniose est connue dès la fin du XIX^{ème} siècle sur la rive Nord, en Espagne (Gil Collado, 1977) et plus rarement en France (Laugier et Témime, 1973). Sur la rive sud, elle était déjà connue en Algérie (Simonet, 1951) et au Maroc (Colonieu, 1931). Dans les pays méditerranéens, *Phlebotomus (P.) sergenti* et *P. papatasi* sont les vecteurs les plus communs à la propagation de *L. tropica* et *L. major* respectivement (Pimenta et al, 1994; Kamhawi et al, 2000).

Au Maroc, comme dans la plupart des pays circumméditerranéens, la maladie s'avère endémique et présente tout un ensemble de syndromes, du fait de la variété des parasites, chacun d'entre eux est lié à un vecteur et à un réservoir spécifique. Ces dernières années, les leishmanioses constituent un vrai problème de santé publique. On a signalé une augmentation des cas de la maladie, environ 8849 en 2010 contre 5276 cas en 2008 (MS, 2010)

Bien que la LC ne soit pas une infection fatale, il faut savoir qu'elle a un impact négatif sur la santé publique, sur l'économie (vu le coût cher et la longue durée du traitement). A cela s'ajoute l'effet psychique des séquelles chez les enfants et les

filles adultes. Ces dernières surtout, sont sensibles aux cicatrices indélébiles, laissées après la guérison, notamment lorsque la lésion se localise au niveau de la partie faciale. Ces préjudices esthétiques conduisent à des cas de stigmatisation et d'exclusion sociale des femmes et des enfants en particulier.

La situation est devenue donc très préoccupante, ce qui a amené le ministère de la santé à considérer les leishmanioses parmi les maladies à déclaration obligatoire (arrêté ministériel n° 683-95 du 31 Mars 1995). Selon les rapports du ministère de la santé (1997; 2001 et 2003), l'épidémiologie des leishmanioses est marquée par la notification continue des cas sporadiques de la LV avec une certaine augmentation depuis 1995. La quasi-totalité de ces cas est originaire des foyers traditionnels du Nord.

Concernant la LC, deux formes sont rapportées: la LC zoonosique due à *L.major*, dite aussi humide et rurale, et la forme anthroponosique due à *L.tropica*, appelée aussi forme sèche et urbaine. Ces affections sont largement répandues depuis les cédraines du Haut Rif jusqu'aux régions arides de l'Anti-Atlas (Akalay, 1999). La forme *L. tropica* présente une grande répartition géographique au Maroc, y compris la province d'Azilal (Marty et al, 1989; Guessous-Idrissi et al, 1997; Chiheb et al 1999; Rhajaoui et al 2004; Guernaoui et al, 2005a). La situation actuelle de la leishmaniose au sein du royaume est alarmante. En conséquence, le ministère de la santé nationale a élaboré un programme de lutte contre la maladie. Ce programme s'est appuyé sur une série d'enquêtes destinées à analyser les différents foyers leishmaniens en se basant principalement sur la lutte contre les phlébotomes et le traitement.

En fait, comme beaucoup de villes dans l'Atlas du Maroc, Azilal a été identifiée parmi les provinces endémiques avec 4 cas de LV et 631 de LC en 2010 (MS, 2010). Selon les données de la délégation du ministère de santé d'Azilal, plusieurs villages de la province d'Azilal ont été qualifiés de très endémiques; Foug Jamàa (la région d'étude), Bzou, Rfala, Ouad Laabid...sont parmi les zones concernées par la maladie. Le taux d'incidence (suivant les statistiques de l'année 2007) varie de 0,06% à Ouad Laabid à 0,45% dans la région de Bzou. Foug Jamàa a battu durant 2009 le record de prévalence de la LC avec 176 cas. Il n'est pas évident que la région d'étude soit infectée de manière importante avant 1990.

D'après la délégation provinciale du ministère de santé, quelques cas ont été enregistrés à Tannant, 16 km de Foug Jamâa au cours de l'année académique 1986-87. La même source a reporté qu'aucun cas n'a été décelé avant 1986. A Foug Jamaà, les premières apparitions de la LC ont été signalées au centre de santé de la région sous forme de cas éparpillés au long de l'année 2000, mais la prédominance de la maladie était plus forte en 2004. Depuis, le nombre de personnes infectées ne fait qu'augmenter et gagner, sur le plan géographique, plusieurs localités de la région d'étude. Les statistiques périodiques du centre de santé local confirment cette progression. Les travaux de Rioux en 1989 ont montré que les secteurs périphériques de la zone étaient concernés. Cette maladie constitue une menace à la santé publique locale et fait l'objet d'un suivi de la part des autorités du ministère de la santé. Jusqu'au là, aucune étude n'a été consacrée à l'identification de l'agent causal de la LC ou à l'inventaire des espèces de phlébotome au sein de Foug Jamâa, ainsi que les liens pouvant exister entre les facteurs démographiques, socioéconomiques et environnementaux d'une part et le développement de la maladie au sein de la région d'une autre part.

Sur le plan géographique et socio-économique, Foug Jamâa constitue un carrefour de plusieurs activités quotidiennes des individus, de sorte que la zone, initialement rurale, s'urbanise de plus en plus. Ready (2008) note que l'évolution importante et les mécanismes de développement (l'industrie, la croissance démographique, les activités de transport) exercent une pression croissante sur l'environnement, qui subit une transformation rapide; ce qui laisse craindre que la LC peut se reproduire avec une intensité renouvelée.

Par conséquent, le choix de ce milieu, comme région d'étude est dû principalement au fait que les études scientifiques sur la leishmaniose à Foug Jamaà sont d'abord très limitées, à l'augmentation de nombre de cas de la LC anthroponotique (selon les statistiques de la délégation du ministère de santé d'Azilal) et du fait que la région constitue une bande carrefour entre plusieurs foyers de leishmaniose: Bzou, Ouad laabid, Afourer, Lebroug.... Le risque leishmanien augmente à Foug Jamaà avec sa localisation en proximité de Marrakech, qui constitue un foyer potentiel de leishmaniose (Bossaa, 2008), ainsi que le foyer Tanant (16 Km de la région d'étude) (Guilvard et *al.*, 1991), surtout, avec des mouvements de populations entre ces régions.

L'objectif général de l'étude est la contribution dans la mise en place des meilleures stratégies de lutte contre la LC, en collaboration avec le ministère de santé. Pour se faire, le présent rapport se structure en trois volets:

- Une enquête épidémiologique sous forme d'un questionnaire, se rapportant au sujet avec ses aspects socio économiques et écologiques. L'approche éco- santé, adoptée dans la conduite de cette partie de recherche, est appuyée sur une série d'enquêtes destinées à analyser la région d'étude comme foyer leishmanien. La recherche vise à établir les liens existants entre la maladie et l'environnement (physique, social et économique) dans l'espace rural de Foum Jamàa et dégager par conséquent, les facteurs de risque contribuant dans la distribution de la maladie.

- Analyse moléculaire du parasite par digestion RFLP du produit PCR-ITS1, pratiquée sur des lames contenant des frottis cutanés recensés pendant les années 2009 et 2010 à partir des secteurs les plus touchés de la région. L'objectif est d'identifier l'agent causal de la maladie.

- Inventaire faunistique des espèces de phlébotomes dans la zone d'étude et leurs fluctuations spatio-temporelles. L'objectif est de délimiter et d'estimer l'espace et la période à risque pour l'orientation de la lutte antivectorielle et le choix de la méthode de lutte appropriée. Pour répondre aux attentes de ce travail, l'étude menée, comportant une introduction et une conclusion, s'articule sur quatre (04) chapitres :

- Le chapitre I: il présente une synthèse bibliographique, traitant des généralités sur la leishmaniose;

- Le chapitre II: il aborde la méthodologie de travail sur le terrain et au laboratoire, l'approche et la démarche entreprises contribuant à la réalisation de l'étude. Il cerne le cadre de la recherche, comportant une présentation de la région d'étude avec une description de l'habitat et du cadre de vie, ainsi qu'un diagnostic moléculaire des leishmanies à partir des frottis cutanés par la technique PCR-RFLP.

- Le chapitre III et IV présentent les résultats du travail élaborés en trois grandes parties:

- La première partie décortique les facteurs d'aménagement, socio-économiques à l'origine de la persistance de la LC dans la région; Elle étudie notamment l'évolution spatio-temporelle de la maladie, les populations cibles, ainsi

que le mode de vie et les pratiques pouvant conduire à la recrudescence de cette forme de la maladie dans le contexte des trois secteurs de Foun Jamaà.

- La deuxième partie s'intéresse aux résultats de la caractérisation moléculaire des parasites obtenus à partir des frottis cutanés;

- La troisième partie est consacrée à l'étude de l'activité saisonnière des espèces capturées et identifiées en se basant sur les caractères morphologiques des phlébotomes.

- ❖ La conclusion dresse le bilan général assorti de quelques recommandations susceptibles d'améliorer la situation épidémique, source d'inquiétude.

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les leishmanioses

1- Définition

Les leishmanioses sont des affections cutanées ou viscérales causées par des protozoaires flagellés de la famille des *Trypanosomatidae*, appartenant au genre *Leishmania* (Dedet, 2001). Elles sont transmises par piqûres d'un phlébotome femelle (Diptéra: psychodidae) du genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomya* dans le nouveau monde (Anofel, 2007). La maladie se manifeste sous différentes formes :

2- Les formes cliniques

Selon leur localisation profonde ou superficielle, les leishmanioses vont déterminer deux entités de nosologies bien distinctes : les leishmanioses viscérales (LV) et les leishmanioses cutanées (LC).

a. Les leishmanioses viscérales

En général, les LV ont pour cible des organes profonds (rate, foie, moelle osseuse), où elles infectent les cellules réticuloendothéliales (Sabri, 1994). Elles présentent une allure clinique dominée par l'association des signes cliniques majeurs : fièvre irrégulière, résistance aux antibiotiques et splénomégalie volumineuse (Delmont, 1983; Bourrée et Martin, 1984; Dedet, 1994). Le rapport de l'OMS en 2010 considère comme un cas de LV un sujet qui présente un certain nombre de signes cliniques (principalement une fièvre prolongée et irrégulière, une splénomégalie et une perte de poids) et dont la maladie est confirmée par des examens parasitologiques et/ou sérologiques.

En absence de traitement, l'évolution est fatale, la mort survient en quelques mois (Garnham, 1987; MS, 2010).

b. Les leishmanioses cutanées

Les LC présentent des ulcérations superficielles de la peau et sont les plus courantes, avec 50-75 % de tous les nouveaux cas (OMS, 2002). Les manifestations cliniques de la LC humaine sont très variables d'une région à une autre, et même à l'intérieur d'une seule région (Sabri, 1994). Cliniquement la maladie est décrite par la présence d'une ou de plusieurs lésions, habituellement sur les parties découvertes du corps: ces lésions sont souvent localisées au niveau de la face, du cou, des bras et des jambes (Bessis, 2007; OMS, 2010; MS, 2010). Il apparaît au point d'inoculation un nodule qui peut grossir et évoluer vers une ulcération indolore. La lésion reste à ce stade pendant un temps plus ou moins long avant de guérir en laissant ordinairement derrière elle une cicatrice déprimée.

Les formes cutanées qui nous intéresseront dans cette étude, regroupent trois entités éco-épidémiologiques majeures :

i. La leishmaniose cutanée causée par *Leishmania tropica* (*L. tropica*)

La LC due à *L. tropica* (désignée antérieurement sous la dénomination de leishmaniose anthroponotique ou de leishmaniose cutanée anthroponotique urbaine) détermine des ulcérations sèches et indolores de la peau (OMS, 2010). La LC provoquée par *L. tropica* est habituellement anthroponotique mais dans certains foyers, elle provient non pas de sujets humains, mais d'animaux. Inversement, l'homme peut constituer une source occasionnelle d'infestation dans plusieurs formes de LC qui sont habituellement zoonotiques (OMS, 2010).

L'infection se localise dans les grandes villes anciennes du Moyen Orient, mais aussi dans les agglomérations de la frange Sud de la méditerranée, en particulier au Maghreb. L'agent pathogène est *L. tropica*. L'incubation est longue : deux à huit mois (OMS, 2010), parfois un ou deux ans (MS, 2010). La lésion cutanée se localise au niveau des parties découvertes du corps, principalement au visage. Dans sa forme typique, elle se manifeste d'abord sous forme de macule arrondie, avec des contours nets et un diamètre le plus souvent inférieur à 5 mm. Sa couleur varie du rose vif au brun. La surélévation de la lésion produit une papule qui augmente lentement de taille, pour atteindre un à deux centimètres en quelques semaines. Sa palpation met en évidence un nodule ferme et mobile sur le plan profond. Au bout de deux mois, cette papule va se recouvrir d'une croûte indurée,

solidement fixée, révélant quand on la détache un ulcère superficiel. L'ulcère a une croissance lente et reste entouré de la zone indurée. Sa profondeur n'excède pas un à trois mm. Cette lésion est indolore quelque soit son stade et n'entraîne de suppuration que dans le cas d'une infection secondaire. La cicatrisation, très lente à obtenir, est glabre, dépigmentée et indélébile (Béni Ismail et Ben Rachid, 1989; OMS, 1990). L'homme est impliqué directement dans le cycle épidémiologique de la LC urbaine de l'ancien monde due à *L. tropica* (Sabri, 1994).

ii. La leishmaniose cutanée due à *Leishmania major* (*L. major*)

Une forme humide dite rurale, est due à *L. major*. Sa période d'incubation est souvent inférieure à 4 mois (OMS, 2010). Le nodule, succédant à une papule, atteint rapidement un grand diamètre. En une à trois semaines, se constitue une ulcération profonde, à bords abrupts, et à fond nécrotique. Pour cette forme de la LC et dans certaines conditions épidémiologiques particulières, l'homme peut constituer, à côté des rongeurs, un réservoir de la parasitose (Belazzoug et *al.*, 1986 ; OMS, 1990).

iii. La leishmaniose cutanée à *Leishmania infantum*

Ce sont des formes sporadiques montrant des lésions uniques, ulcère-croûteuses (MS, 2010). Elles sont également connues sous le nom de la leishmaniose lipoïde ou tuberculoïde (OMS, 2010). Cette forme de la maladie siège au niveau de la partie découverte et évolue pendant au moins deux ans (MS, 2010).

3- Historique

Les leishmanioses ont été individualisées depuis l'antiquité. En Asie Centrale, elles ont été décrites au premier siècle après Jésus-Christ.

Le parasite a été décrit en Inde dès 1885 par Cunningham: C'est en 1900 qu'il fut découvert par Sir William Leishman dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum (l'un des anciens noms de la LV) en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, le même parasite a été identifié dans une biopsie de rate d'un patient par Charles Donovan (in Dedet, 1999). Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan (Roberts et Janovy, 2000).

Aux Etats Unis, Wright retrouve en 1903 un parasite de morphologie identique dans une lésion cutanée, chez un enfant d'origine arménienne. Après quelque hésitation, il sera rattaché au genre *Leishmania* et appelé *L. tropica*. Une année plus tard, Rogers obtint des formes promastigotes à partir d'une ponction splénique.

La première culture fut obtenue par Nicolle et Sicre en 1908 (Jarry, 1999), ils comparèrent les organismes de la peau avec ceux de la rate découverts en 1903, et conclurent : « La presque identité au point de vue morphologique du parasite de Leishman-Donovan et de celui de Wright n'est pas contestable ». Dans ce contexte, Nicolle a pu réussir la culture en série de forme promastigotes à l'institut Pasteur de Tunis sur le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal). C'est dans ce foyer tunisien que Nicolle a mis en évidence le rôle du chien comme réservoir du parasite. Il désigne ce parasite par le binôme *Leishmania infantum* en raison de la prévalence de la maladie chez l'enfant. La même année, Nicolle et Comte découvraient les mêmes protozoaires chez le chien, puis chez le cheval et le chat. Ils font ainsi de cette affection une maladie commune à l'homme et aux autres mammifères et orientent la voie aux autres recherches épidémiologiques.

En Amérique du Sud, Vianna met en exergue un parasite dans les lésions cutanées en 1911, il le désigne sous le binôme *Leishmania brazillensis* et Lainson et Shaw créeront, en 1987, le sous genre *Viannia*. En 1972, Lainson et Shaw attribuent le nom de *L. chagasi* au parasite responsable de L.V dans le nouveau monde et *Leishmania infantum* pour le parasite responsable de la leishmaniose canine et humaine en Méditerranée, Moyen Orient, centre asiatique et Chine du Nord.

En 1921, les frères Sargent et leurs collaborateurs avaient établi le rôle de vecteurs des phlébotomes. Ils ont réussi la transmission du « bouton d'Orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées. L'école soviétique, avec Latyshev et Krujukova (1941) mentionne le rôle des rongeurs comme réservoirs de virus sauvages des leishmanioses. La transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber.

En ce qui concerne la spéciation génétique, il faudra attendre l'avènement de techniques telles que l'analyse des iso-enzymes au cours des années 1970 et l'hybridation de l'ADN au début des années 1980 (OMS, 2010). A partir de 1970, la caractérisation isoenzymatique des souches de leishmanies est devenue courante,

après la publication de l’OMS en 1982 à ce propos. Les premiers cas de co-infection VIH-leishmanies sont signalés à partir de 1985 (Jarry, 1999). Les travaux précédents permettent de s’enquérir d’une idée maîtresse relative au cycle épidémiologique de ces parasitoses. Au cours des années 1990, la recherche de l’ADN cinétoplastique au moyen de la réaction d’amplification en chaîne, en présence de polymérase (PCR) a beaucoup amélioré la sensibilité et permis d’identifier l’espèce en cause dans des échantillons sanguins ou tissulaires (OMS, 2010).

Vianna en 1912 au Brésil a institué le traitement des LC et cutanéomuqueuse par des dérivés de l’antimoine trivalent, que Di Cristina et Caronia ont ensuite utilisé en Italie en 1915 pour traiter la LV (OMS, 2010).

La lutte à grande échelle contre les vecteurs de la leishmaniose au moyen d’insecticides à effet rémanent a commencé dans les années 1950 et l’utilisation de ces produits, jointe au dépistage et au traitement des cas, a permis de donner un coup d’arrêt à la LC anthroponosique en URSS et en Asie centrale, même si dans certains secteurs de cette dernière région une résurgence a été observée ces dernières années. A la même époque, la leishmaniose a pratiquement disparu dans certaines régions du Moyen-Orient et de l’Inde par succession des pulvérisations d’insecticides effectuées dans le cadre de la lutte antipaludique (OMS, 2010).

4- Parasite

a. Taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* (Dedet, 2001); la place de ce genre dans la classification de Levine et ses collaborateurs en 1980 est la suivante:

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. Grobben, 1905);

Genre: *Leishmania* (Ross, 1903).

En se basant sur l'étude de l'ultrastructure de Levine et de son équipe de 1980 et des études moléculaires phylogénétiques, Adl et ses collaborateurs ont élaboré en 2005 une nouvelle classification:

Ordre: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981, emend. Simpson, 1997);

Sous-ordre: Kinetoplastea (Honigberg, 1963);

Famille: Metakinetoplastina (Vickerman in Moreira, Lopez-Garcia, and Vickerman, 2004);

Genre: *Leishmania*.

Selon que le parasite se développe dans la partie postérieure ou centrale de l'intestin du vecteur, le genre *Leishmania* est composé de deux sous-genres, respectivement *Viannia* et *Leishmania*. Ce dernier est subdivisé en plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, sont à l'origine de manifestations cliniques, allant d'affectations cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires provoquant de graves défigurations. Habituellement, on regroupe les espèces de *Leishmania* en complexes par les marqueurs biochimiques (les isoenzymes) (tableau 1).

Tableau 1. Espèces de *Leishmania* (d'après Roberts et Janovy, 2000 in 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
	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)	Centre Nord de l'Asie, Nord-Ouest de la Chine,
		<i>L. chagasi</i> (Cunha et Chagas, 1937)	Moyen-Orient, Sud de l'Europe, Nord-Ouest de l'Afrique
		<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	Milieus urbains du Moyen-Orient et de l'Inde
		<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986)	Tunisie
	<i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu et Guan, 1973)	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique
	<i>L. arabica</i>	<i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari et Evans, 1986)	Chine, Mongolie
	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford et Bray, 1973)	Arabie Saoudite
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953)	Éthiopie, Kenya
		<i>L. amazonensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)	Mexique, Belize, Guatemala, centre Sud des Etats-Unis
		<i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Bassin Amazonien, Brésil
		<i>L. enrietti</i>	<i>L. enrietti</i> (Muniz et Medina, 1948)
<i>L. hertigi</i>		<i>L. hertigi</i> (Herrer, 1971)	Brésil
	<i>L. deanei</i> (Lainson et Shaw, 1977)	Panama, Costa Rica	
<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
		<i>L. panamensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)	Panama, Costa Rica

b. Morphologie et cycle de transmission

Les leishmanies sont des parasites sanguinoles dimorphiques qui se présentent sous deux stades évolutifs morphologiques distincts: le stade amastigote intracellulaire, à l'intérieur des cellules du système des phagocytes mononuclés de l'hôte mammifère, et le stade promastigote flagellé, à l'intérieur du tube digestif de l'insecte vecteur et en culture (Bessis, 2007). Le passage par deux hôtes est accompagné, en plus de la multiplication, de modifications morphologiques du parasite, ainsi, le cycle de transmission est résumé dans la figure 1. Les promastigotes sont inoculés dans le sang des mammifères par le phlébotome et phagocytés par les cellules du système phagocytaire mononuclé, ou ils subissent des modifications pour se transformer en amastigotes. Les neutrophiles sont les premières cellules à affronter les leishmanies au point d'inoculation par les phlébotomes (OMS, 2010). Absorbés par le phlébotome, lors de son repas de sang sur le mammifère, les amastigotes vont cette fois-ci se transformer en promastigotes mobiles dans l'estomac de l'insecte, à l'intérieur duquel ils se divisent activement (Walters et *al.*, 1989).

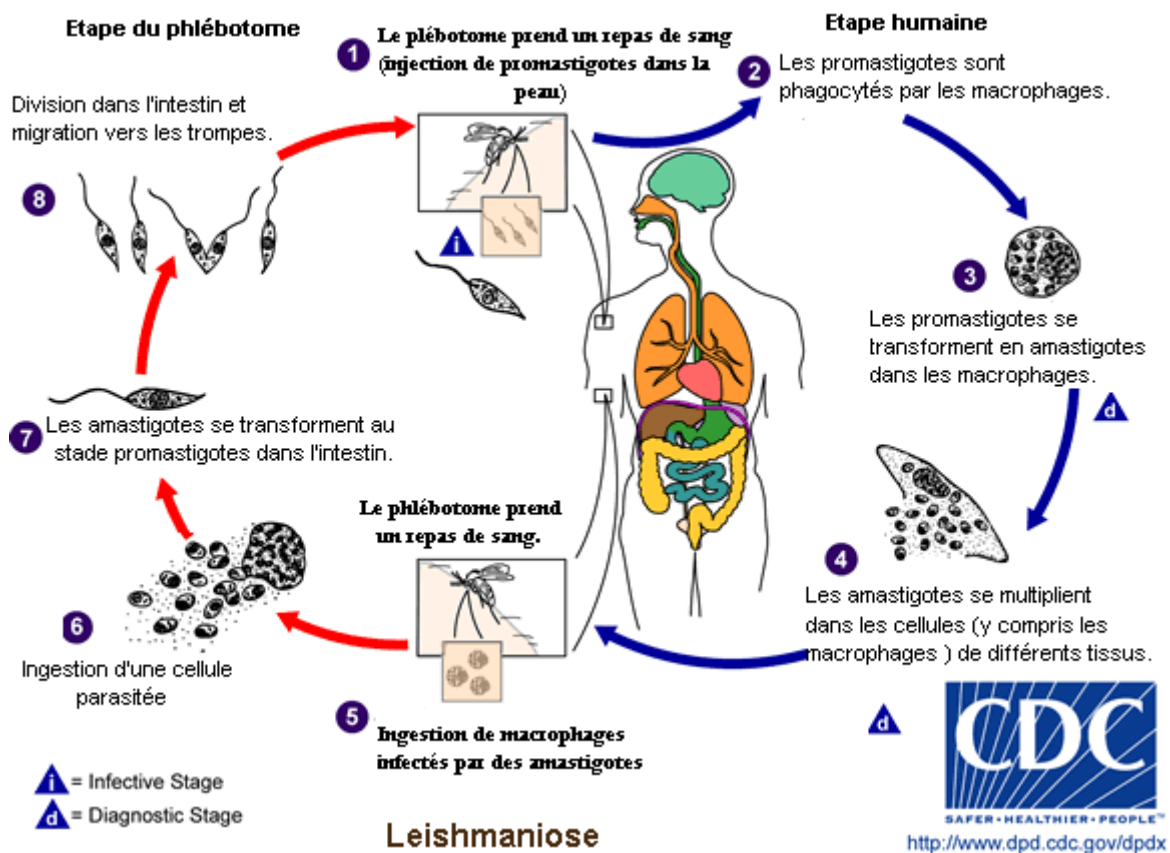


Figure 1. Cycle de vie du parasite *Leishmania* (www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1 Le phlébotome injecte les promastigotes (formes infectantes) durant le repas sanguin. **2** Les promastigotes sont phagocytés par les macrophages et **3** se transforment en amastigotes. **4** Les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées et infectent différents tissus, en fonction (en partie) de l'espèce de leishmanie. Ceci est à l'origine des différentes manifestations cliniques. (**5, 6**) Le phlébotome s'infecte en prenant un repas sanguin sur un hôte infecté (il ingère les macrophages infectés par des amastigotes). **7** Dans l'intestin du phlébotome, le parasite se différencie en promastigotes, qui **8** se multiplient et migrent vers les glandes salivaires et les trompes.

Le stade promastigote, libre et mobile, est retrouvé dans l'intestin du phlébotome et dans les milieux de culture (Anofel, 2007). Observé au microscope optique à fort grossissement, le promastigote est un corps fusiforme de 1 à 3 μm de largeur sur 20 à 30 μm de longueur. Le flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur, émerge à la partie antérieure et possède une portion libre importante (Figure 2) et très flexible, conférant au parasite une grande mobilité (Sabri, 1994).

Le stade amastigote (Figure 3) est intramacrophagique et découvert chez les hôtes vertébrés (y compris l'homme). Celui-ci, niche à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein de vacuoles nommées parasitophores.

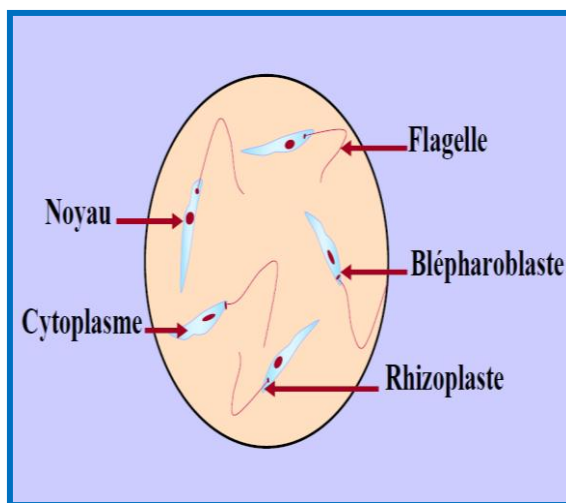


Figure 2 : Forme Promastigote

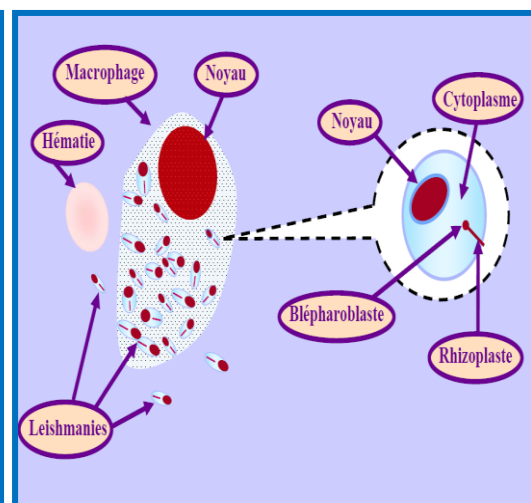


Figure 3 : Amastigote dans un macrophage

L'amastigote est un corpuscule ovoïde ou arrondi de 2 à 6 μm de diamètre, enveloppé d'une membrane bien définie et se multiplie par division binaire. Au microscope optique, deux masses chromatiques sont visibles dans le cytoplasme : un noyau volumineux et un kinétoplaste bacilliforme. De cette dernière formation, émane un court flagelle, réduit à sa proportion intra-cellulaire : le rhizoplaste et

occupe une place intra-cellulaire dans les éléments du système réticulo-endothélial de l'hôte vertébré. Malgré leurs petites tailles et leurs flagelles réduits, les formes amastigotes, présentent une ultrastructure semblable à celle de la forme promastigote (Sabri, 1994).

c. Biologie moléculaire des leishmanies

i. Organisation du génome

Les *Leishmania* ont un génome nucléaire et un génome kinétoplastique. Leurs mécanismes de transcription sont particuliers (Ravel et *al.*, 1999).

La taille du génome est d'environ 36 millions paires de bases. Le nombre de chromosomes est de 36 pour les espèces de l'ancien monde (Wincker et *al.*, 1996) et 34 à 35 pour celles du nouveau monde (Britto et *al.*, 1998).

L'ADN nucléaire se découpe en grandes unités polycistroniques (Myler, 2000). Le génome de *Leishmania*, contenant peu de séquences répétées (Ouellette, 2003) est très riche en G/C (Alvarez, 1994).

Les kinétoplastidés se caractérisent par leur ADN kinétoplastique renfermant deux types d'ADN: les minicercles impliqués dans les phénomènes «d'editing» (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN (Kabb et *al.*, 2001; Gott, 2003) et les maxicercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques (Lodish, 2000).

ii. Diagnostic moléculaire

La détection de l'acide nucléique parasitaire par une méthode moléculaire, principalement une méthode d'amplification génique (PCR), améliore la sensibilité du diagnostic et permet d'identifier l'espèce de leishmanie en cause. Il est en effet capital d'avoir désormais recours aux techniques moléculaires normalisées qui soient plus sensibles et qui permettent un diagnostic et une caractérisation irréfutables des leishmanies car bien souvent, le choix du traitement dépend de l'espèce parasitaire infectante (OMS, 2010).

L'identification des espèces est primordiale pour la lutte contre la leishmaniose et nécessite des techniques plus sophistiquées (PCR et typage enzymatique, test immunologique).

L'identification des espèces de leishmanie demeure impossible à faire par microscope optique (MS, 2010). Des différentes techniques ont été mises au point, visant la recherche de l'ADN du parasite en utilisant le procédé d'amplification génique par PCR (Reithinger et *al.*, 2007).

La technique de référence reste l'identification enzymatique qui permet de trouver l'espèce et le zymodème en cause. Par ailleurs, la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) permet une approche de l'identification d'espèce directement sur le prélèvement (Dujardin et *al.*, 2002 ; MS, 2010).

La réaction de PCR permet la détection de l'ADN parasitaire grâce à la production de plusieurs millions ou milliards de copies d'une séquence spécifique du parasite (Bessis, 2007). Cette technique a prouvé sa grande spécificité en comparaison avec les techniques classiques de diagnostic. Elle présente une sensibilité de (89-100%), nettement supérieure à celle de l'examen direct (19-77%) ou de la culture (56-82%) (Smyth et *al.*, 1992; Andresen et *al.*, 1996; Seaton, 1999).

L'amplification génique par PCR possède la capacité de détecter les leishmanies directement dans le produit biologique (prélèvement cutané, moelle osseuse, biopsie...), en faisant la différence entre les diverses espèces du parasite: *L.tropica*, *L.major* et *L. infantum* par exemple (Rioux et *al.*, 1986a; Rhajaoui et *al.*, 2004; 2007).

Extraction de l'ADN et amplification

L'extraction d'ADN à partir du frottis cutané est un processus délicat : ceci est dû à la nature de la matière biologique qui est à l'état sec, sa faible teneur en amastigotes, ainsi que les risques de contamination entre les échantillons au moment de l'extraction.

La méthode standard pour récupérer les acides nucléiques dans des solutions aqueuses est la précipitation avec l'éthanol. Elle est rapide et efficace, surtout avec une faible quantité d'ADN (Meredith et *al.*, 1993; El Tai et *al.*, 2000). L'extraction des acides nucléiques présents dans l'échantillon biologique est nécessaire avant d'effectuer la PCR. C'est l'étape préalable qui limite la sensibilité de l'analyse (Bodaghi et *al.*, 2009). Plusieurs protocoles d'extraction ont été mis au point, on cite l'extraction classique par l'usage du couple phénol-chloroforme, ainsi que l'usage de la résine Chelex (Reithinger et Dujardin, 2007).

De nombreux kits commercialisés ont été utilisés avec succès pour l'extraction de l'ADN des leishmanies (Reithinger et Dujardin, 2007). Notamment l'extraction par le Kit Sigma (Pizzuto et *al.*, 2001), par le kit Easy-DNA produit par Invitrogen (Bossolasco et *al.*, 2003) ainsi que le kit DNeasy Blood Tissue (Mahdy et *al.*, 2010) produits par Qiagen. Ces kits, prêts à l'emploi, facilitent et simplifient les opérations de purification, mais leur coût reste beaucoup plus élevé que celui de l'extraction manuelle.

Le procédé le plus utilisé pour le diagnostic des leishmanioses est l'extraction classique par le couple phénol-chloroforme à partir des produits biologiques en général (Meredith et *al.*, 1993; El Tai et *al.*, 2000) et particulièrement à partir des lames (Al Jawabreh et *al.*, 2004). Le phénol est un déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles.

Pour la phase d'amplification de l'ADN par PCR, le principe consiste à hybrider un ADN dénaturé à deux amorces oligonucléotidiques qui permettront la copie du brin d'ADN qu'elles encadrent (Chuchana, 1992). Les différentes méthodes de PCR utilisent comme cible l'ADN génomique ou kinétoplastique (ADNk). Les différentes cibles de PCR, y compris les régions codantes et ceux intergéniques non codantes du gène gp63, du SLME (splice leader mini-exon), et du SSU rRNA, ont été utilisées pour l'identification de ces parasites (Van et *al.*, 1992; Cupolillo et *al.*, 1995; Castilho et *al.*, 2003; Marfurt et *al.*, 2003; Victoir et *al.*, 2003). La sensibilité est corrélée avec le nombre de copies de la région amplifiée. La PCR à ADNk est considérée, par Bensoussan et ses collaborateurs en 2006 comme la méthode la plus sensible pour le diagnostic de la leishmaniose car il existe 10 000 minicercles par parasite. En fait cette étude, qui a concerné la comparaison des différentes PCR dans le diagnostic de la LC, a souligné la sensibilité élevée (98,7%) de l'amplification de l'ADN kinétoplastique (ADNk) suivie par la PCR de la région ITS1 avec une sensibilité de 91% et finalement la PCR SLME avec un pourcentage de 53,8%. Ceci suggère donc que la PCR utilisant l'ADNk est la technique de choix pour le diagnostic de la LC. Certes, la PCR ADNk est la technique la plus sensible pour le diagnostic de la LC, lorsque l'identification des espèces n'est pas nécessaire, toutefois, lorsque la caractérisation de l'espèce est nécessaire, la PCR ITS1 est la technique utilisée vu sa sensibilité et sa spécificité dans l'identification des espèces de *Leishmania* présentes dans la lésion à un pourcentage élevé de cas de LC (Bensoussan et *al.*, 2006).

5- Vecteur

a. Généralités et importance médicale

Les phlébotomes ont une activité essentiellement nocturne et crépusculaire (MS, 2010), mais il ne faut pas sous-estimer les risques encourus lors de la journée. Les lumières domestiques attirent un grand nombre de phlébotomes pendant le soir (Dolmatoua et *al.*, 1971).

Très sensibles au courant d'air, ils ne sortent que lorsque la soirée est calme, si la température est suffisamment élevée (19-20°C) et si le degré hygrométrique est élevé (Nikiéma, 2002). Une faible température ou une température trop élevée restent un facteur limitant pour l'activité des phlébotomes (Killick-Kendrick, 1999; Wasserberg et al, 2003). Dans ce contexte, Singh (1999) a montré en Inde, le rôle primordial de la température dans la distribution de *Phlebotomus (P). Papatasi*. En 1993, Srinivasan et ses collaborateurs avaient noté une corrélation positive entre la densité de cette espèce et la pluviométrie.

Contrairement à d'autres diptères comme les moustiques, les phlébotomes ont une faible capacité de vol (1m/s). Ils sont incapables de voler lorsque la vitesse du vent dépasse cette valeur, ce qui limite leur distance de dispersion (OMS, 2010). Leur rayon maximum de déplacement (d'environ 1km) est variable selon les espèces. Ils sont caractérisés par des vols courts, avec des arrêts fréquents, en se déplaçant par des petits bonds rapides, ce qui leur donne un aspect ébrié.

Durant la journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités, leur gîte est constitué par les anfractuosités de murs et de terriers (MS, 2010). Ils se gorgent sur des micromammifères (Anofel, 2007; MS, 2010). Afin que l'estomac d'un phlébotome soit rempli, il va falloir 30 secondes à 5 minutes. Chez l'homme, les parties découvertes du corps sont les plus exposées aux piqûres (visage, cou, mains, pieds). Chez les animaux, ce sont les zones les moins velues (museau, oreilles). Selon Pinto et ses collaborateurs (2001), il y a une dépendance entre l'attraction des phlébotomes vers l'être humain et la production de CO₂ d'une part et avec l'odeur d'autre part. Le choix de l'homme comme préférence trophique vient en second rang après les bovins pour *P. argentipes* (Palit et al., 2005).

Dans les pays tropicaux, Les phlébotomes sont présents toute l'année (Abonenc E, 1972), alors que dans les pays tempérés, ils n'apparaissent que pendant la belle saison (été), d'où le caractère saisonnier de la maladie (Dedet, 1986). La pérennité de l'espèce est assurée par les larves hibernantes de stade IV. L'apparition, la densité, la période d'activité et la disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Abonenc E., 1972 ; Lewis et al., 1977).

L'importance médicale de phlébotome tient au rôle vecteur de certaines espèces dans la transmission des affections humaines et animales. Il est le seul vecteur connu des leishmanioses. Il existe plus de 600 espèces réparties dans

presque toutes les régions biogéographiques du monde, cependant moins de 50 espèces sont impliquées dans la transmission des leishmanioses (Lightburn et *al.*, 2002). D'après le rapport de L'OMS (2010), les seuls vecteurs démontrés responsables de maladie humaine sont les espèces du genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et du genre *Lutzomyia* dans le nouveau monde. Selon Killick-Kendrick (1990), sur 81 espèces de phlébotomes, 19 ont été confirmées comme vecteurs de différentes espèces de *Leishmania*. Cela dit que la liste des espèces vectrices ne cesse pas de s'allonger (OMS, 2010). Une vingtaine seulement, sont des vecteurs prouvés d'espèces anthroponotiques de *Leishmania* (Leger et Depaquit, 1999).

La piqûre répétée et douloureuse du phlébotome peut être à l'origine d'une réaction cutanée prurigineuse, avec risque d'allergie. Les vecteurs peuvent transmettre la fièvre des trois jours, ou fièvre à papatasi dans le bassin Méditerranéen oriental, la verruga péruvienne en Amérique du Sud et les LC et LV de l'homme et du chien dans l'ancien et le nouveau monde. La piqûre est de type telmophage et douloureuse, mais l'intensité des réactions de l'hôte varie selon l'espèce de phlébotomes en cause (douleur, apparition d'une papule ou d'une tache hémorragique. L'espèce vectrice peut avoir plusieurs espèces de *Leishmania* dans sa niche écologique, mais elle ne transmettra pas nécessairement toutes les espèces de parasites de façon aléatoire. En effet, il semble que l'association vecteurs-parasites soit spécifique (Killick-Kendrick, 1985).

Les femelles de nombreuses espèces sont plutôt exophages et exophiles et on ne peut pas les combattre par des pulvérisations d'insecticide sur les murs intérieurs des habitations. D'autres espèces en revanche sont endophiles et peuvent donc être attaquées de cette manière (OMS, 2010). Seule la femelle est hématophage. Elle prend ses repas nécessaires pour son ovogenèse (Duriez et *al.*, 2002). La femelle ne pique en général que là où elle trouve des lieux de ponte appropriés (OMS, 1999). Le mâle se nourrit exclusivement de divers jus sucrés (Schlein et Yuval, 1987).

b. Taxonomie

Les phlébotomes ont suscité depuis longtemps, de nombreux travaux en systématique et plusieurs révisions ont été proposées, mais aucune n'a fait l'objet d'un accord général. Les deux plus récentes, qui sont les plus complètes, sont celles

de Galati (2003) dont la seconde révision répertorie les 464 espèces de phlébotomes néotropicaux classées en 22 genres, 20 sous-genres, 3 groupes d'espèces et 28 séries. Bien que cette classification constitue un progrès important, elle n'est pas définitivement admise et d'autres changements sont prévisibles (OMS, 2010).

En se basant sur des caractères morphologiques externes, Rondani (1843) regroupe les trois espèces connues de phlébotomes dans une famille : Phlebotomidae. Plus tard les entomologistes ont recherché d'autres critères d'identification en s'intéressant à l'anatomie interne de ces insectes, pour arriver à des approches biochimiques et moléculaires. Ces approches se sont développées pour surmonter les difficultés rencontrées lors de la classification des phlébotomes.

En général, la place des phlébotomes dans la classification zoologique peut se résumer ainsi :

Règne: Animalia (Rodhain et pererz, 1985);

Embranchement: Arthropoda (Arthropodes) (Lewis et al, 1977);

Sous-embranchement: Tracheata (Trachéates) (Lewis et al, 1977);

Classe: Insecta (Insectes) (Lewis et al, 1977);

Sous-classe: Pterygota (Rodhain et pererz, 1985);

Super-Ordre: Neuropteroidea (Neuroptéroïdes) (Lewis et al, 1977);

Ordre: Diptera (Diptères) (Lewis et al, 1977);

Sous-Ordre: Nematocera (Nématocères) (Lewis et al, 1977);

Famille: Psychodidae (Psychodidés) (Lewis et al, 1977);

Sous-famille: Phlebotominae (phlébotomes) (Lewis et al, 1977).

La sous-famille des Phlebotominae comprend cinq genres : les genres *Phlebotomus* et *Sergentomyia* dans l'ancien monde, et les genres *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* dans le nouveau monde (Lewis et al, 1977). Leger et Depaquit (1999) se basent sur des arguments morphologiques et biogéographiques et retiennent 13 genres.

Selon Baldet (2004), dans l'ancien monde, (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie), *Phlebotomus* est le genre prédominant, tandis que dans le nouveau monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale) on note la présence du genre *Lutzomyia*.

c. Morphologie

Les phlébotomes sont des diptères hématophages, présentant un corps grêle et allongé de petite taille (2 à 3 mm), couleur pâle (jaune, grisâtre au brunâtres), avec des yeux très noirs (5.1). Le thorax, présentant de nombreuses soies, forme avec la tête un angle de 45° et donne à l'insecte une allure bossue, ainsi que les ailes possèdent un aspect velu (figure 4). L'insecte possède 2 antennes à 16 segments.



Figure 4: *Phlebotomus duboscqi* femelle (Boussa, 2008).

La tête (figure 5.2) est formée en grande partie par une capsule chitineuse (épicrâne), limitée de chaque côté par un grand œil composé.

Le thorax (figure 5.3) porte une paire d'ailes et des balanciers qui donnent l'équilibre à l'insecte pendant le vol.

L'abdomen (figure 5.4) est composé de dix segments, dont les trois derniers sont modifiés pour constituer les organes génitaux externes chez les deux sexes (Dedet, 2001).

L'armature génitale du mâle, les spermathèques et l'armature buccale de la femelle varient dans leur morphologie et sont utilisés dans l'identification et la classification des espèces.

Chez le mâle, le genitalia apporte assez d'informations, auxquelles s'ajoutent quelques autres venant de l'observation de la pompe et des filaments génitaux (Lane, 1986). L'armature génitale est très développée (figure 5.5).

Chez la femelle, les spermathèques, organes internes situés à l'extrémité de l'abdomen, sont caractéristiques des espèces. L'examen se base sur la configuration

de leur réservoir et de leur conduit (Léger et *al*, 1983). L'appareil génital interne se compose de trois organes pairs: deux ovaires, deux glandes annexes et deux spermathèques (figure 5.6).

1. Corps (vue générale),
2. Tête (a: vue dorsale, b: ventrale),
3. Thorax, 4. Abdomen,
5. Génitalia du mâle,
6. Spermathèque de la femelle

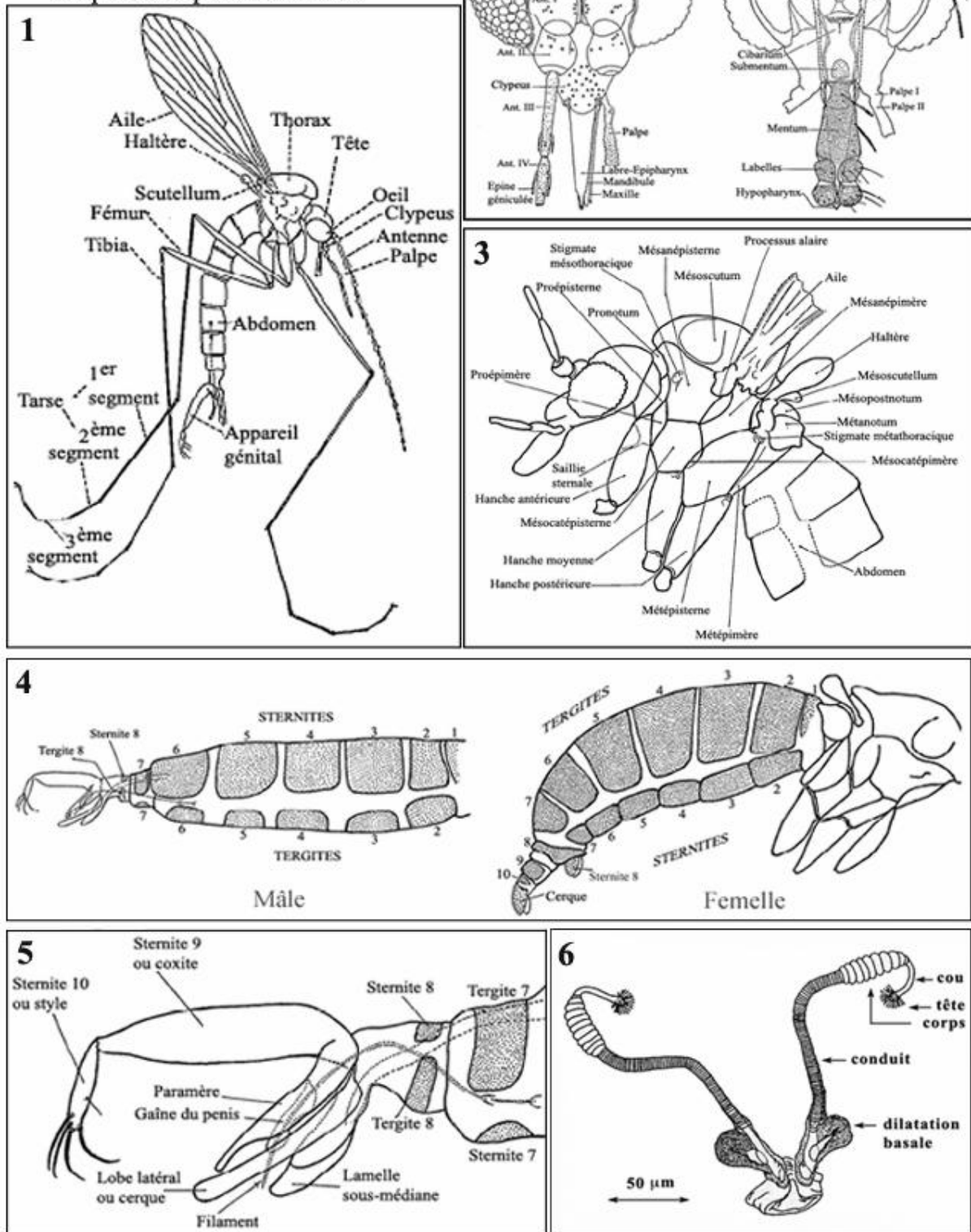


Figure 5. Morphologie du phlébotome adulte (d'après Abonnenc, 1972)

d. Cycle de développement

Les phlébotomes présentent un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (figure 6). Les œufs, les larves et les nymphes se développent dans des microbiotopes humides riches en matières organiques; ces stades ne sont pas aquatiques (OMS, 2010).

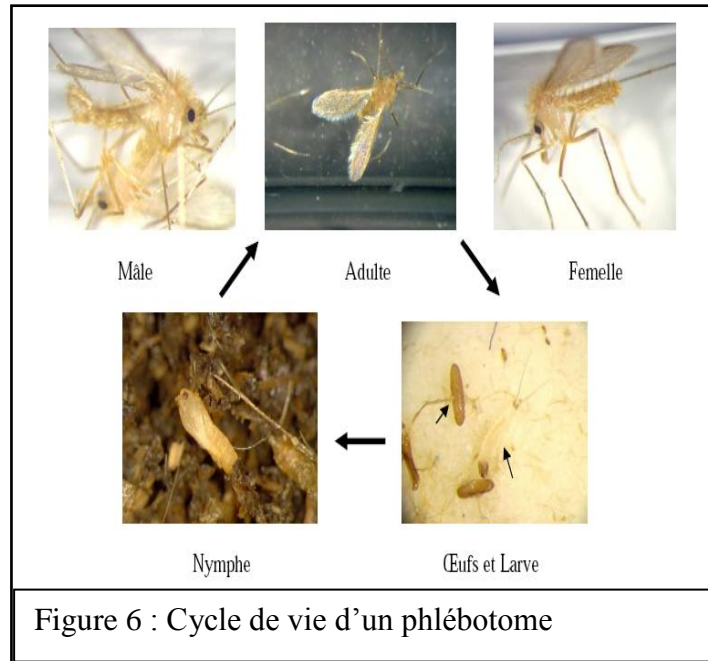


Figure 6 : Cycle de vie d'un phlébotome

Dans le même contexte, les phlébotomes se reproduisaient rapidement en conditions précaires et que leur larves se nourrissaient de débris organiques (OMS, 2002; MS, 2010).

- **L'œuf** : pour son ovogenèse, la femelle prend un repas sanguin pour se procurer les éléments nutritifs nécessaires (OMS, 2010). L'intervalle du temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs dépend de l'espèce et la température ambiante (MS, 2010; OMS, 2010). La période varie de 4 à 8 jours, pour des colonies de laboratoire (Killick-Kendrick, 1999). L'oviposition est stimulée par le contact avec une surface humide. Le nombre d'œufs pondus dépend de l'importance du repas de sang et peut atteindre 200. L'œuf est blanc à la ponte, puis devient brun.

- **La larve** : les œufs se développent en larves sur le sol, dans les terriers, les nids, la poussière des anfractuosités de rochers ou de vieux murs, ainsi que dans les tas de débris végétaux (Vaillant, 1970, Killick-Kendrick, 1999). La larve qui se nourrit de matières organiques en décomposition, est sensible à la dessiccation et se développe en milieu humide. Elle est vermiforme et eucéphale, mesurant au 4ème stade de son évolution 8 mm environs (OMS, 2010).

- **Nymphose** : la larve du 4ème stade atteint le terme de sa croissance, arrive à un endroit faiblement humide et reste immobile avec l'extrémité élevée du corps. Une fissure apparaît sur la face dorsale du thorax par laquelle sort lentement la nymphe. Son corps, mesurant une longueur de 3 mm, comprend un céphalothorax (tête et trois segments thoraciques) et un abdomen comportant neuf segments, dont les deux derniers, habituellement cachés dans la dépouille larvaire résultant de l'ultime mue, lui servent de support et lui permettent de se maintenir fixée, verticalement, au substrat (OMS, 2010).

- **L'émergence** : Par la suite, la nymphe entrera en état de vie ralentie et subira enfin la mue imaginale conduisant à l'adulte. Les mâles émergent avant les femelles (Cadoumi, 1995). Le phlébotome adulte, en vie libre, se repose durant la journée et trouve refuge dans les recoins sombres, chauds et humides, tels que les maisons et les anfractuosités des murs. Il recherche les refuges retirés, constitués de surfaces sèches en atmosphère humide.

- **La diapause** : la diapause des stades immatures reste une étape nécessaire aux phlébotomes afin de survivre pendant la période défavorable. Pour les phlébotomes paléarctiques, la diapause s'effectue pendant le 4ème stade larvaire. Elle concerne aussi bien l'œuf que la larve en région tempérée (Killick-Kendrick, 1983).

e. Les facteurs environnementaux favorisant l'activité des phlébotomes

Le phlébotome se reproduit rapidement lorsque les conditions sanitaires sont mauvaises (OMS, 2002). D'après l'écologie du vecteur, nous pouvons relever comme facteurs environnementaux: Les dépotoirs d'ordures, les anfractuosités des murs, les terriers, l'humidité et les termitières.

Les espaces inoccupés, non aménagés, favorisent le plus souvent la prolifération de décharges sauvages. Les maisons et murs en banco ou en banco amélioré présentent plus d'anfractuosité. Ces facteurs sont liés à l'extension désorganisée des grandes villes avec son cortège de situations précaires, tout spécialement dans les quartiers insalubres qui majorent considérablement le risque de transmission (OMS, 1993). Toutefois, dans d'autres régions d'Amérique du Sud, la déforestation a apparemment conduit à une augmentation de l'incidence de la LC par passage à un cycle péridomestique de transmission. De même le changement climatique dû au

réchauffement général de la planète aurait des conséquences pour la distribution de la maladie (OMS, 2010).

Généralement, plusieurs projets agricoles ou de prospections minières, d'exploitations forestières, d'activités militaires, ainsi que la pression démographique participent au caractère épidémique des leishmanioses pour l'homme. Ces différents facteurs de risque liés au comportement, à l'environnement ou au développement, expliquent en partie, la distribution de la maladie (Desjeux, 1999).

6- Rongeurs

Dans une région donnée, une espèce de leishmanie est volontiers entretenue sur un seul hôte réservoir, même si d'autres mammifères peuvent occasionnellement être trouvés infectés (Ashford, 1989). Un animal est reconnu réservoir s'il représente dans le milieu naturel une source d'infestation pour les phlébotomes et si le nombre des animaux infectés est élevé. Le réservoir est constitué généralement par des rongeurs, des marsupiaux, des mammifères. (Lightburn et al, 2002).

En fonction de l'origine de l'infestation humaine, on peut faire entrer les leishmanioses dans deux grandes catégories : les leishmanioses zoonosiques pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques, et les leishmanioses anthroponosiques pour lesquelles le réservoir est constitué par l'homme.

a. Les sujets humains en tant qu'hôtes réservoirs

En tant que hôte réservoir, l'homme est directement impliqué dans deux formes de la maladie : la LV due à *L. donovani* et la LC due à *L. tropica*. L'homme a également joué le rôle de réservoir dans certaines flambées dues à *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. panamensis*.

En outre, il est possible que l'homme joue le rôle de réservoir dans la leishmaniose due à *L. major* ainsi que dans un certain nombre de formes strictement cutanées dues à *L. infantum*, par suite de l'évolution torpide des lésions.

De même l'homme peut constituer une source occasionnelle d'infestation dans plusieurs formes de leishmaniose cutanée qui sont habituellement zoonosiques (OMS, 2010).

b. Hôtes réservoirs animaux domestiques et péri-domestiques

Les chiens constituent l'un des principaux réservoirs de *L. infantum* (OMS, 2010). Ils sont parfois également parasités par d'autres espèces de leishmanies et leur rôle dans ces infestations est probablement plus qu'accidentel.

i. Hôte sauvage dans l'ancien monde

La grande gerbille, *Rhombomys opimus*, constitue l'hôte réservoir primaire de *L. major* dans les steppes de l'Asie centrale. Les leishmanies qui parasitent *R. opimus* ne sont toutes infectantes pour l'Homme (c'est le cas par exemple, de *L. gerbilli*), donc, il faut identifier avec précaution les parasites dans chaque lieu avant de commencer des opérations de lutte.

En Asie de l'Ouest et en Afrique du Nord, *Psammomys obesus*, le principal réservoir de *L. major*, se nourrit presque exclusivement des feuilles et des tiges de plantes de la famille des chénopodiacées. Dans les zones arides, la plupart des espèces de chénopodiacées sont halophiles et poussent dans les vallées de cours d'eau asséchés. La distribution de *P. obesus* se limite essentiellement à ces biotopes, mais on le trouve également dans les champs de céréales, sur les talus ou des jachères où il se nourrit de chénopodiacées cultivées du genre *Atriplex* (OMS, 2010).

Dans les zones semi-arides du Maghreb, *Meriones shawi* se nourrit de céréales et de légumes. Cette espèce est le principal réservoir de parasites en Afrique du Nord (Rioux *et al.*, 1982; 1986a). Dans les oasis subsahariennes, la même espèce a un comportement tout à fait différent; elle se nourrit de déchets divers et peut même être coprophage lorsqu'elle est en contact étroit (péri-domestique) avec l'homme, ce qui explique que de graves épidémies aient éclaté dans ces régions.

ii. Hôtes réservoirs sauvages du nouveau monde

Le renard crabier (*Cerdocyon thous*) est couramment parasité par *L. infantum*. Cet animal fait souvent des incursions dans des villages où il se contamine au contact des chiens du lieu.

Les paresseux constituent d'importants hôtes réservoirs de différentes espèces de leishmanies. Au Brésil et en Guyane française, *Choloepus didactylus* est un réservoir important de *L. guyanensis*. Cette même espèce est également un hôte réservoir de *L. shawi* dans la région amazonienne. *Choloepus didactylus* est le

réservoir primaire de *L. panamensis* au Brésil, en Colombie, au Costa Rica et au Panama. *Bradypus griseus* est aussi un hôte réservoir de *L. panamensis* au Costa Rica et au Panama.

Petit fourmilier (*Tamandua tetradactyla*) qui est un fourmilier arboricole, joue un rôle important dans le cycle de transmission de *L. guyanensis* au Brésil. On a avancé que cet animal nomade serait responsable de la diffusion du parasite.

Didelphis marsupialis (*Opossums*) est un hôte réservoir secondaire de *L. guyanensis* et de *L. infantum*.

Cet opossum joue également le rôle d'hôte secondaire de *L. amazonensis* et s'est révélé porteur d'une infestation leishmanienne en Colombie, dans un lieu où la LV est endémique. De même, on a constaté au Brésil que *D. albiventris* est infesté par *L. peruviana* et par une leishmanie provisoirement identifiée à *L. infantum* (OMS, 2010).

Pour les rongeurs, *Proechimys guyanensis* et *Proechimys cuvieri* sont des hôtes accidentels de *L. guyanensis* et présentent le réservoir primaire de *L. amazonensis*. Plusieurs espèces de rongeurs comme *Oryzomys*, *Nectomys* et *Dasyprocta* peuvent jouer le rôle d'hôtes secondaires de *L. amazonensis*. De nombreuses espèces de rongeurs terrestres interviennent dans le cycle de transmission de *L. mexicana*.

Heteromys, *Nyctomys* et *Sigmodon* spp. sont des hôtes secondaires. *Leishmania braziliensis* a été isolée sur des rongeurs (*Akodon*, *Bolomys*, *Nectomys*, *Rattus*) et identifiée dans divers États du Brésil par des méthodes moléculaires chez un certain nombre d'autres petits mammifères terrestres, notamment des marsupiaux. Cette observation montre que les sources d'infestation sont constituées d'une mosaïque de petits mammifères (OMS, 2010).

7- Distribution géographique

Les leishmanioses sont présentes dans les cinq continents, dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays, dont 72 pays en développement (PIERE, 2003). On distingue deux grandes situations géographiques, l'ancien monde et le nouveau monde (figure 7). La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions (OMS, 2006) et l'incidence à 2 millions (OMS, 2010). Les cas de LC se produisent jusqu'à hauteur de 90 % en Afghanistan, en Algérie, en Arabie Saoudite, en

République Arabe Syrienne et en République Islamique d'Iran, ainsi qu'en Bolivie, au Brésil, en Colombie, au Nicaragua et au Pérou (OMS, 2010).

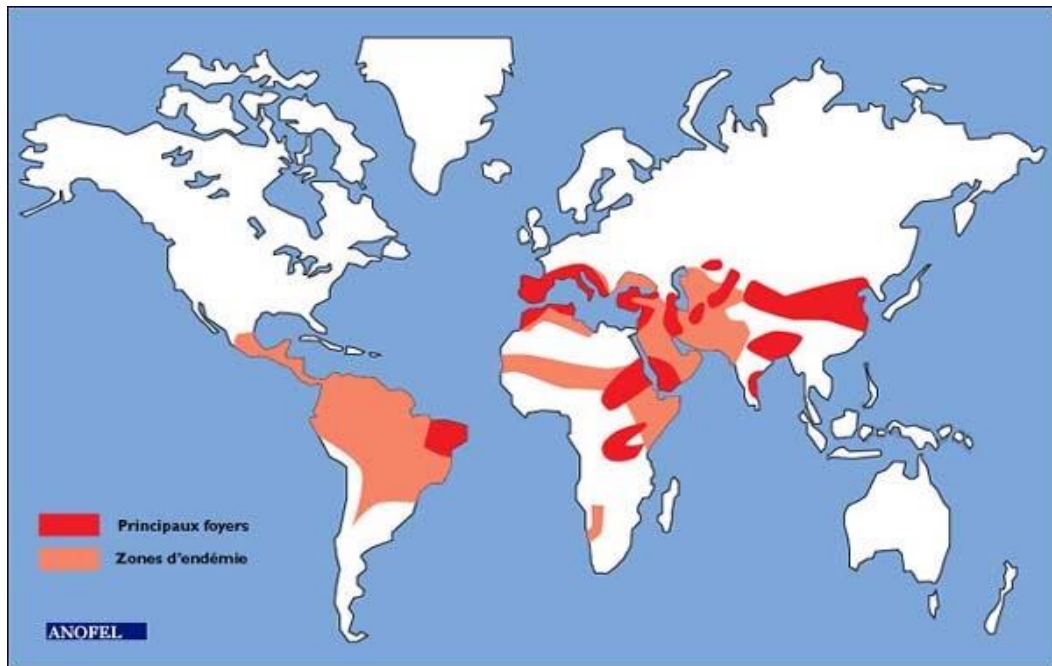


Figure7 : Répartition géographique de la leishmaniose dans le monde (Anofel., 2007).

Selon les estimations de l'OMS en 2006, chaque année on enregistre à travers le monde 1 500 000 cas de LC et 500 000 cas de LV dont 90% au Soudan, Brésil, Inde, Népal et Bangladesh (Anofel. 2007).

La mortalité attribuable à la forme viscérale ne peut pas être estimée, étant donné que dans beaucoup de pays, elle n'est pas soumise à une déclaration obligatoire et le plus souvent, n'est pas diagnostiquée (OMS, 2006).

L'existence des cas non diagnostiqués et infracliniques, la diversité des formes cliniques, ainsi que la non obligation de la déclaration de cette parasitose dans la majorité des pays intéressés, laissent comprendre combien les chiffres avancés ne reflètent pas de la réalité.

Les deux mondes présentent les différentes manifestations cliniques, sauf que ces manifestations ne sont pas causées par les mêmes espèces de parasite d'une part, comme elles sont propagées par différents genres et espèces de vecteurs selon la région d'autre part.

a. La leishmaniose viscérale

L'aire de distribution de la LV se répartie en cinq foyers principaux: foyer Indien, foyer Centre Asiatique, foyer Est-Africain, foyer Méditerranéen et foyer Sud Américain. La maladie est observée au sein de ces foyers, avec des caractères cliniques et épidémiologiques particuliers (Dedet, 1994).

b. La leishmaniose cutanée

La distribution géographique de la LC est sensiblement adjacente à celle de la LV avec, cependant, des foyers importants comme l'Afrique du Nord et de l'Ouest, le Moyen Orient et l'Asie Centrale. Les LC recouvrent l'Amérique Centrale, l'Amérique du Sud et le Nord de la Bolivie jusqu'au Panama. Elles sont provoquées par de multiples espèces appartenant aux deux sous-genres *Leishmania* et *Viannia*, d'abondance variable dans la région des Amériques (OMS, 2010).

La dispersion de la LC est encore plus importante: les principaux foyers de transmission anthroponosique de *L. tropica* qui s'étendent de l'Inde à l'Afrique du Nord via l'Asie Centrale et Occidentale, les foyers de transmission zoonosique de *L. major* qui s'étendent de l'Asie centrale à l'Afrique du Nord en passant par l'Asie occidentale et ceux où sévit la transmission de *L. aethiopica* qui se concentrent en Afrique Orientale (OMS, 2010).

II- Les leishmanioses au Maroc

Depuis les années 1970, la situation leishmanienne au Maroc est devenue préoccupante comme elle continue à l'être jusqu'à nos jours. Comme dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, les leishmanioses constituent un sérieux problème à la santé publique (Mahjour et *al*, 1992; MS, 2010).

La maladie a pris beaucoup plus d'ampleur ces dernières années, avec les pratiques agro-sylvo-pastorales, la surpopulation, les aménagements, les migrations; ce qui a abouti à l'émergence de nouveaux foyers de la leishmaniose. La situation a amené à l'élaboration d'un programme d'étude pour analyser les différents foyers leishmaniens du Rif au Sahara. Selon Rioux en 2001, *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* ont été identifiés comme étant les espèces de parasites responsables des affections signalées au Maroc (figure 8).

Entre 1994 et 1999, en tenant compte des déclarations de cas, faites par les provinces et les préfectures durant cette période, la maladie peut être illustrée en deux entités cliniques : la LC et la LV.

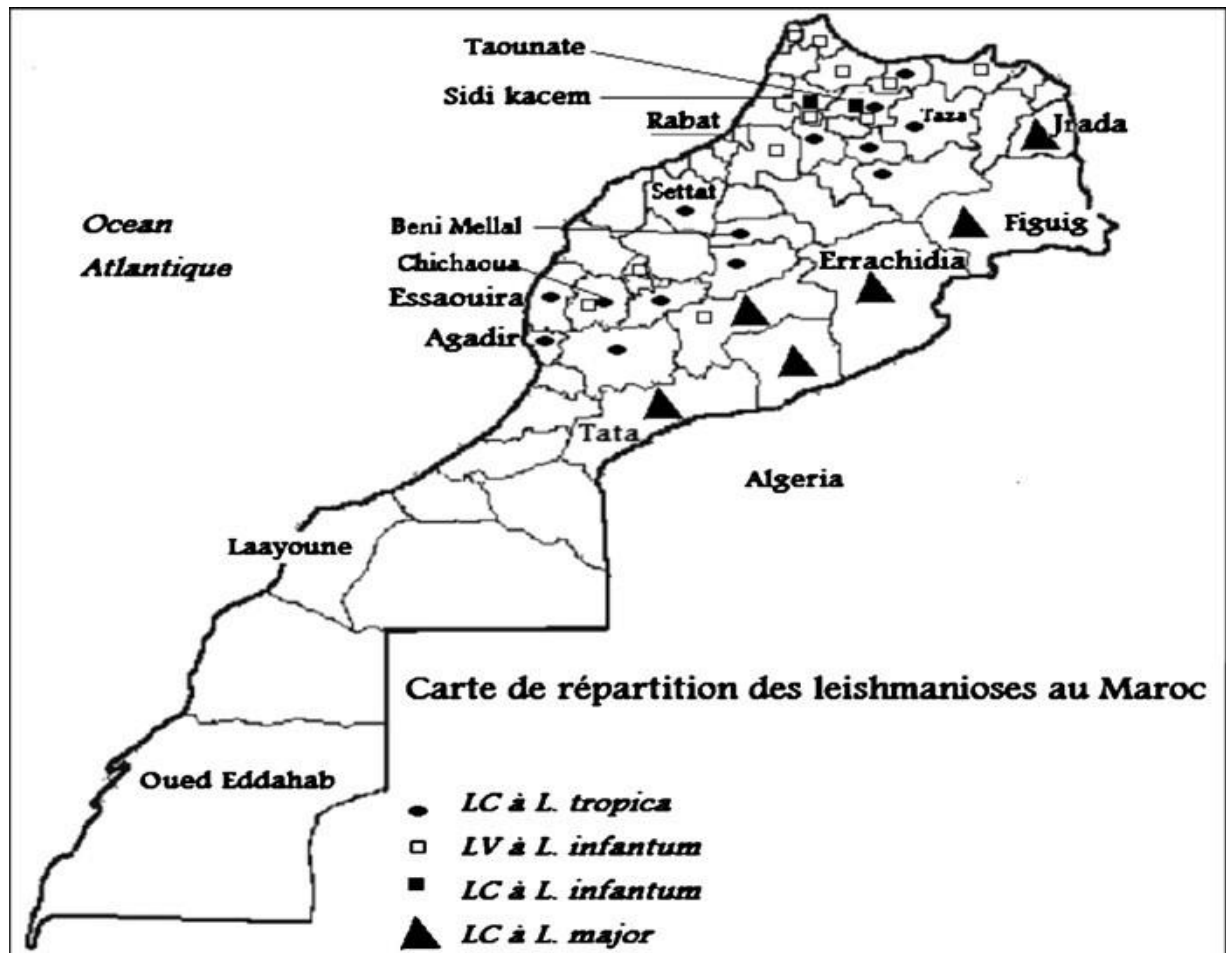


Figure 8 : Distribution de la leishmaniose au Maroc (Rhajaoui et al, 2007)

1- La leishmaniose viscérale

Au Maroc, la première constatation de la LV humaine a été faite en 1921 par Klippel et Monier à Meknès. Par la suite une grande dispersion de l'affection a été observée dans les différentes provinces du territoire national. Les régions du Nord : Tanger (Remlinger, 1921 in Souhail, 1994), Casablanca (Blanc et al., 1934) et Azrou sont fréquemment citées. Actuellement, à travers des études effectuées et l'exploitation des dossiers des malades atteints de LV, le rapport de MS (2010) constate que cette affection d'allure hypoendémique se localise dans les régions du Rif et de pré-Rif (Al Hoceima, Tetouan, Chefchaouen, Taza, Taounate, Sidi Kacem, Fès, Meknès et Nador) sans pour autant exclure d'autres régions du pays. La

maladie est due à *L.infantum*, dont le ou les vecteur(s) suspecté(s) appartient (iennent) au sous-genre *Larrousius* avec le chien comme réservoir du parasite (MS, 1997). Le tableau 2 montre l'évolution des atteintes de LV à *L. infantum* au Maroc entre 2001 et 2010 (MS, 2010). L'incidence la plus élevée est enregistrée au niveau des provinces de Taza, Taounat, Errachidia et Zouagha Moulay Yacoub.

Tableau 2: Répartition des cas de la LV, à *L. infantum* au Maroc, période 2001-2010 (MS, 2010).

Provinces	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Agadir Ida Outanane	1					2				
Al Haouz	1	2	2	3	2	3	1		1	
Al Hocima	12	12	7	14	5	3	5	14	10	16
Assa Zag				1						
Azilal									2	4
Beni Mellal			1	4	2	2	4	1	3	2
Berkane		1	2			1	1		1	
Boulemane		1				2	2			1
Chefchaouen	22	8	11	18	12	24	28	26	17	18
Chichaoua	1	1	1	1	1		1		1	2
Chtoka Ait baha								1	1	1
El hajeb			5		2	6	6	3	2	0
El Jadida		3		3		2	3	4		2
Kelaâ Des Sraghna							1		1	
Errachidia		2	3	28	25	16	18	1		3
Essaouira							1		1	
Fahs Anjra				1						
Fès	5	8	8	13	12	17	1	8	5	7
Ifrane	1									
Guelmim		1								
Jerada	2	1	1			1	1			
Kénitra	2	1		1			4	2		2
Khémisset		1	5			2	3			2
Khénifra	8	4		2	2		1	1		
Khouribga							1	1		
Larache	1	2	2	3			4	2	2	
Marrakech						1	1		1	1
Mdiq Fnideq										1
Meknès	4	2	2	4	2	5	9	4	5	2
MoulayYakoub	10	4	19	19	17	22	9	9	11	8
Nador	5	4	3	2	2	2	3	1	2	3
Ouarzazate	1							1	3	
Oujda								1		
Safi										3
Salé							1			

Sefrou	5	4	6	6	6	13	6	9	9	13
Settat			0	1				2		1
Sidi Kacem	4	5	3	8	3	5	6	5	4	6
Sidi Youssef			1							
Tanger Assilah				1						
Taounate	13	22	16	16	25	25	31	36	21	27
Taourirte				1				1	3	
Taroudant						2		2	1	
Tata	1			1		1				6
Taza	15	12	18	23	21	19	13	16	21	7
Tetouan				3		5	3	4	4	1
Tiznit				1						
Zagoura	1	1	1	2			3	3		3

2- La leishmaniose cutanée

Considérée comme une affection sporadique, la LC est connue au Maroc depuis près d'un siècle. En 1925, Leblanc (in Souhail, 1994) signale des cas de bouton d'Orient à Figuig et à hauteur de l'Atlas marocain (Colonieu, 1931). En parallèle à l'arrêt des opérations d'aspersion au DDT contre le paludisme dans le Sud du pays, elle commence à se développer sur le mode épidémique à partir de 1977. Selon, Rioux et son équipe (1986a), plusieurs poussées épidémiques ont été éclatées au Sud de l'Atlas dans les zones subsahariennes à cause de *L. major*. Au Maroc, trois formes de la LC sont individualisées, distinctes par leurs territoires géographiques et leurs modalités clinico-épidémiologiques: LC à *L.tropica*, LC à *L.infantum* et LC à *L.major* (Laamrani-Idrissi, 2000; MS, 2010).

a. La leishmaniose cutanée à *L.tropica*

Il s'agit d'une anthroponose due à *L. tropica* MON102 (MS, 2010). Le vecteur prouvé dit *phlebotomus sergenti*, alors que le réservoir demeure l'homme lui même (Guilvard et al, 1991; MS, 2010). L'infestation débute au milieu de l'été et atteint son apogée à l'avènement de l'automne. Cette forme de leishmaniose est localisée dans les zones semi-arides du pays allant de la région d'Agadir à l'Ouest au plateau péri- Rifain de Taza à l'Est, en passant par le versant Ouest de la chaîne de l'Atlas touchant des régions au centre (Al Haouz (Ramaoui et al, 2008 ; Boussaa et al, 2009), Béni Mellal, Azilal, Chichaoua, Settat, Meknès et Fès) et au Nord du pays (Taounate, Sidi Kacem, Sefrou et Chefchaouen). Dans ces zones, la maladie

s'observe au sein des douars ruraux situés à des altitudes de 400 à 1000 m (MS, 2010).

Le premier foyer de la LC à *L. tropica* a été signalé à Tanant dans la région d'Azilal par Marty et *al* en 1989, suite au diagnostic de cette parasitose chez une fillette marocaine en déplacement à Nice. De nouveaux foyers comparables à celui de Tanant, ont été découverts à Smimou dans la région d'Essaouira (Pratlong et *al.*, 1991) à Taza (Guessous Idrissi, 1999), à Zouagha My Yacoub dans la région de Fès (Rhajaoui et *al.*, 2004; Fellah et *al.*, 2007) au foyer d'El Haouz (Ramaoui, 2006 ; Ramaoui et *al.*, 2008 ; Boussaa et *al.*, 2009) et à Chichaoua (Guernaoui et *al.*, 2005a, 2006a ; Bacaër et Guernaoui, 2006; Rhajaoui et *al.*, 2012). Actuellement plusieurs foyers de transmission active ont été identifiés, soit dans les agglomérations périurbaines ou dans les localités rurales, où les facteurs de risque persistent (MS, 2010).

Des résultats montrent que *L. tropica* apparaissait plus polymorphique au Maroc par rapport aux autres entités de leishmanioses. En effet, des études biochimiques isoenzymatiques des souches isolées chez l'homme, le chien et le vecteur (*phlébotomus sergenti*) ont montré une diversité inter focale de ces leishmanies. L'analyse du polymorphisme enzymatique de *L. tropica* a révélé l'existence de plusieurs zymodèmes: (*L. tropica* MON 102, MON 107, MON 112, MON 113, MON 122 et MON 123) (Pratlong et *al.*, 1991). Seul le zymodème MON 102 a été détecté chez l'homme (MS, 2010).

Une épidémie à *L. tropica* MON102 s'est déclarée à la province de Zouagha My Yacoub en 2001 (Rhajaoui et *al.* 2004), de même Lemrani et son équipe (2002) ont identifié *L. tropica* MON-279 chez un chien présentant des symptômes de LV canine dans la province d'El Hoceima.

b. La leishmaniose cutanée à *L. infantum*

Un premier cas marocain a été dépisté, dans le Rif Central et précisément à Taounate, par Rioux et ses collaborateurs en 1995. L'identification du parasite a prouvé qu'il s'agit de *L. infantum* MON 24. Deux foyers de la LC humaine sont connus actuellement, d'abord au Sud (Rioux et *al.*, 1996) ensuite au Nord du

royaume (Lemrani et *al*, 1999). Cette forme de leishmaniose sévit aussi au Maroc à la province de Sidi kacem (Rhajaoui et *al*, 2007). Son cycle de transmission reste inconnu.

Les dernières statistiques concernant la distribution géographique de la LC (à *L. tropica* et / ou à *L. infantum*) au Maroc, durant la période 2001-2010 est illustrée dans le tableau 3. Le nombre de cas passe de 2538 en 2007 à 2263 en 2010, et l'incidence la plus élevée est enregistrée au niveau des provinces d'Azilal, Chichaoua, Essaouira, Settat et Taounate.

Tableau 3: Répartition des infections de la leishmaniose cutanée (à *L. tropica* et / ou *L. infantum*), Maroc, 2001 –2010 (MS, 2010).

Provinces	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Agadir Ida Ooutanane	2					1		2		1
Al Haouz	16	60	37	82	66	93	78	52	47	61
Al Hocima	2	4	4	6	1	8	11	11	9	16
Azilal	74	54	78	71	92	193	365	442	621	631
Benslimane						1				
Beni Mellal	4	15	10	7	3	15	51	49	100	100
Berkane	2		0	2	0				1	
Boulemane		5	6	8	4	36	27	17	14	12
Chefchaouen	10	7	11	8	7	18	20	21	14	11
Chichaoua	484	486	469	380	350	328	501	303	238	258
Chtouka Aït Baha	1	1		2				3		1
El jadida						1				
Kelaâ Des Sraghna							4	4	4	5
Errachidia										25
Essaouira	25	16	18	26	22	58	679	90	33	49
El hajeb				1			1	1	3	
Fahs anjra								3	2	1
Fès	17	1	5	14	13	12	9	3	5	5
Fès Medina	43	6	8	0						
Guelmim	15	12	25	8	2	1	5	1	1	1
Inzegane Aït Melloul	7	3								
Khnitra							1	4		1
Khmisset			1	1						4
Khénifra	2		1		2			1	3	2
Larache	1	8	3	3	1	8	12	7	6	10
Marrakech		1								
Mekness	3	2	2	3	3	5	4	2	9	6
Mdiq fnideq										1
MoulayYakoub	585	71	13	1	1	5	6	9	15	21
Nador	5	4	7	20	18	23	11	14	18	16
Ouarzazat										256
Safi									1	
Sefrou	125	145	105	62	62	117	159	64	81	126
Settat							188	185	46	42
Sidi Kacem	51	58	75	50	68	148	213	192	168	238
Tanger Asillah							2	3	3	
Taounate	131	114	67	110	65	62	121	159	99	127
Taroudant	4			58	19	11	21	17	27	27
Taza	57	57	65	66	66	51	49	27	40	202
Tétouan						1		1	4	6
Tiznit	1			1		2				1
Total	1667	1130	1010	990	865	1198	2538	1687	1612	2263

c. La leishmaniose cutanée à *L. major*

L'aire géographique de cette affection 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 de haut et de l'Anti-Atlas à l'Est du Moyen-Atlas en particulier au niveau des provinces d'Errachidia (Ghiss), Figuig (Ghir, Ziz), Jerada, Ouarzazate, Tata et Zagora (MS, 2010).

Le premier foyer est identifié au Sud de l'Anti-Atlas, dans les palmeraies d'Oued Tata, où une importante épidémie de LC s'était manifestée à la fin des années 1970. Après l'épidémie de Tata, deux nouveaux foyers ont été mentionnés : Le premier étant à Ouarzazate et le second à l'Est dans la région d'Oujda (Rioux et *al*, 1986a et b).

L. major Mon 25 est le seul zymodème de cette espèce qui se focalise au Maroc (Maazoun et *al*, 1986). 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).

La LC humaine à *L. major* s'appuie sur la présence des rongeurs commensaux, *Méridiones shawi* grandis, dans des sites de répartition (Rioux et *al.*, 1982; MS, 2010). Ce gerbillidé vit en contact étroit avec l'homme dans les palmeraies. Son développement et sa multiplication sont favorisés par l'amoncellement d'ordures ménagères à proximité des maisons (Rioux et *al*, 1986b ; MS, 2010).

L. major présente une inquiétude pour la santé publique. 4402 cas ont été notifiés au cours de l'année 2009 contre 6444 en 2010 (MS, 2010). La province d'Errachidia présente le nombre de cas le plus élevé du total national. La répartition des atteintes de la LC à *L. Major* période (2000-2010) à l'échelle du royaume est présentée dans le tableau 4. L'incidence la plus élevée est enregistrée au niveau des provinces Errachidia, Ouarzazate et Zagora.

Tableau 4: Répartition des infections de la LC à *L. Major* au Maroc, période 2000-2010 (MS, 2010).

Province	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Boulmane	3	1	1		31	108	54	44	33	110	93
Errachidia	40	56	4	3	4	379	304	337	1333	1624	4128
Figuig	65	29	26	3	63	344	629	353	244	204	225
Jrada	2	3	6	21	273	429	113	54	14	36	75
Ouarzazat	62	210	251	2054	865	679	388	259	380	515	781
Tata	1				2	76	31	1	6	29	8
Zagora	161	60	22	52	103	159	645	304	1421	1882	1134
Total	334	359	310	2143	1341	2174	2164	1352	3431	4402	6444

Il est toujours évident, qu'un bon nombre de cas échappe au diagnostic, surtout dans les zones rurales.

Au Maroc, les leishmanioses sont des maladies diverses et complexes pour plusieurs raisons:

- Les cycles parasitaires sont multiples et complexes : anthroponosique et zoonosique ;
- Les réservoirs de parasites sont variés: des canidés pour *L. infantum* et des rongeurs pour *L. major* ;
- Répartitions géographiques vastes et différentes: *L. tropica* dans les zones semi-arides, *L. major* dans les régions sahariennes, et *L. infantum* au Nord, au sein des régions centrales et sub-humides (figure 8).

Les trois entités nosogéographiques, bien séparées au Maroc, exigent des actions de lutte adaptées à chacune d'elles. La mise en place du programme de lutte et sa généralisation ont permis d'instaurer une multitude de mesures de lutte.

Le suivi de la situation épidémiologique et le degré de réalisation des différentes actions de lutte ont nécessité un système d'information. Malgré l'intensité des activités de dépistage et de traitement des cas humains au niveau des provinces endémiques, la lutte contre le vecteur et le réservoir animal (le rongeur et le chien) demeure restreinte et insuffisante.

III- Les phlébotomes du Maroc

Avant que les leishmanioses présentent un handicap majeur pour la santé publique, les phlébotomes ont suscité plusieurs travaux au Maroc. Après les observations fragmentaires de Delanoé (1916) et Vialatte et Parrot (1920), Ristorcelli (1939, 1940, 1941, 1945, 1947) a publié des notes sur les phlébotomes récoltés au Sud et au niveau du Maroc Oriental. La première étude relative aux phlébotomes du pays est réalisée par Gaud en 1947. Par la suite, Il a fait ressortir une synthèse globale sur la distribution régionale et la fréquence saisonnière de ces vecteurs. Au début, Cette synthèse est élaborée sur l'ensemble du territoire national (Gaud, 1954), avant qu'elle soit réalisée aux alentours de la région de Rabat (Gaud et Laurent, 1952). A Figuig, Parrot et Durand-Delacre (1947) ont fait des recherches approfondies concernant la biologie des phlébotomes dans la zone concernée. Bailly-Choumara et ses collaborateurs (1971) se sont intéressés à une synthèse géographique et bioclimatique des données disponibles sur les phlébotomes du Maroc, en plus de leurs propres recherches déjà entamées de 1965 à 1970. Dès le début des années 1970, les autorités marocaines en collaboration avec Rioux, ont élaboré un programme visant l'analyse des différents foyers (Rioux, 2001). Dans le Nord et le Sud du Maroc, l'équipe de Rioux a ciblé plusieurs objectifs à savoir : l'inventaire de la faune phlébotomienne (Rioux et *al.*, 1975, 1977 et 1986c), l'étude des corrélations vecteur- bioclimat (Rioux et *al.*, 1984), ainsi que les prévisions de la distribution des leishmanioses en fonction des changements climatiques (Rioux et *al.*, 1997).

Phlebotomus Larrousius mariae est signalée sur l'axe de Meknès à Ouarzazate (Rioux et *al.*, 1974), avant que Lambert et son équipe en 1994 retrouvent la même espèce dans le Haut Atlas aux étages semi-arides et sub-humides froides. Depaquit et ses collaborateurs (1998) ont rapporté *P. (Paraphlebotomus) riouxi* au

Maroc. Une étude écologique et systématique menée par Léger et *al* (1974) s'est consacrée aux espèces du complexe *S. (Sergentomyia) antennata* du Sud marocain.

Les données de Rioux dans le Sud-Ouest marocain ont été actualisées dans cette région (Guernaoui et *al.*, 2005b, 2006b; Guernaoui, 2006). De même ces travaux ont permis de réviser la distribution des *Larroussius* d'après les observations de Benabdenni et ses collaborateurs en 1999 dans le Nord marocain. Dans la ville de Marrakech, la mise en évidence de trois espèces vectrices des leishmanies: *P. papatasi*, *P. sergenti* et *P. longicuspis* a été réalisée, suite à des études révélant un statut éco-épidémiologique à haut risque leishmanien (Guernaoui, 2000 et Boussaa, 2003). *Phlebotomus sergenti*, vecteur prouvé de *L. tropica* (Al Zahrani et *al.*, 1988), existe avec abondance dans les foyers marocains. La preuve de son rôle de vecteur au Maroc a été effectuée dans le foyer Tanant (Guilvard et *al.*, 1991).

Au Maroc, le phlébotome est représenté par deux genres: *Phlebotomus* et *Sergentomyia* (MS, 2010). Les résultats montrent que le Maroc contient 22 espèces de phlébotomes (tableau 5): 09 appartiennent au genre *Sergentomyia* et 13 au genre *Phlebotomus*.

Tableau 5 : Les espèces de phlébotomes au Maroc (MS, 1997)

G/ <i>Phlebotomus</i>	G/ <i>Sergentomyia</i>
<i>P. (Phlebotomus) bergeroti</i> Parrot, 1943	<i>S. (Parrotomyia) africana</i> Newstead, 1912
<i>P. (P.) papatasi</i> Scopoli, 1786	<i>S. (P.) lewisi</i> Parrot, 1948
<i>P. (Paraphlebotomus) alexandri</i> Sinton, 1928	<i>S. (Sergentomyia) antennata</i> Newstead, 1912
<i>P. (Para.) chabaudi</i> Croset, Abonnenc et Rioux, 1970	<i>S. (S.) fallax</i> Parrot, 1921
<i>P.(Para.) kazeruni</i> Theodor et Mesghali, 1964	<i>S. (S.) minuta</i> Rondani, 1843
<i>P. (Para.) sergenti</i> Parrot, 1917	<i>S. (S.) schwetzi</i> Adler, Theodor and Parrot, 1929
<i>P. (Larroussius) ariasi</i> Tonnoir, 1921	<i>S. (Sintonius) christophersi</i> Sinton, 1927
<i>P. (L.) chadlii</i> Rioux, Juminer et Gibily 1966	<i>S. (S.) clydei</i> Sinton, 1928
<i>P. (L.) langeroni</i> Nitzulescu, 1930	<i>S. (Grassomyia) dreyfussi</i> Parrot, 1933
<i>P. (L.) longicuspis</i> Nitzulescu, 1930	
<i>P. (L.) mariae</i> Rioux, Croset, Léger et Bailly-Choumara 1974 (femelle inconnue)	
<i>P. (L.) perfiliewi</i> Parrot, 1930	
<i>P. (L.) perniciosus</i> Newstead, 1911	

Les espèces vectrices des leishmanies au Maroc sont représentées dans le tableau 6 :

Tableau 6: Les espèces vectrices des leishmanies au Maroc (MS, 2010)

Phlébotomes	Leishmanies
<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Leishmania tropica</i>
<i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>Phlebotomus perniciosus</i> <i>Phlebotomus longicuspis</i> <i>Phlebotomus ariasi</i>	<i>Leishmania infantum</i>

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I- Présentation de la zone d'étude

1- Localisation géographique de la zone d'étude

La région de Foug Jamaà (Azilal) est l'une des collines du Grand Atlas, se localise à 912 mètres d'altitude au-dessus du niveau de la mer. Elle est située à 56 km à l'Ouest d'Azilal et à 15 km de la route régionale N° 304, reliant Azilal à Demnate. Par rapport à Béni Mellal, Foug Jamaà est à 100 km au Sud de la ville, et à 32 km de la route nationale N°8, reliant Béni Mellal à Marrakech. Les coordonnées Lambert moyennes de la région sont :

$$X= 349\ 779$$

$$Y= 153\ 748$$

$$Z= 912\ \text{m}$$

La figure 9 présente la situation géographique de Foug Jamaà limitée comme suit :

- Au Nord : Bzou
- Au Sud: Tanant
- A l'Ouest: Kalaa Sraghna
- A l'Est : Ait attab

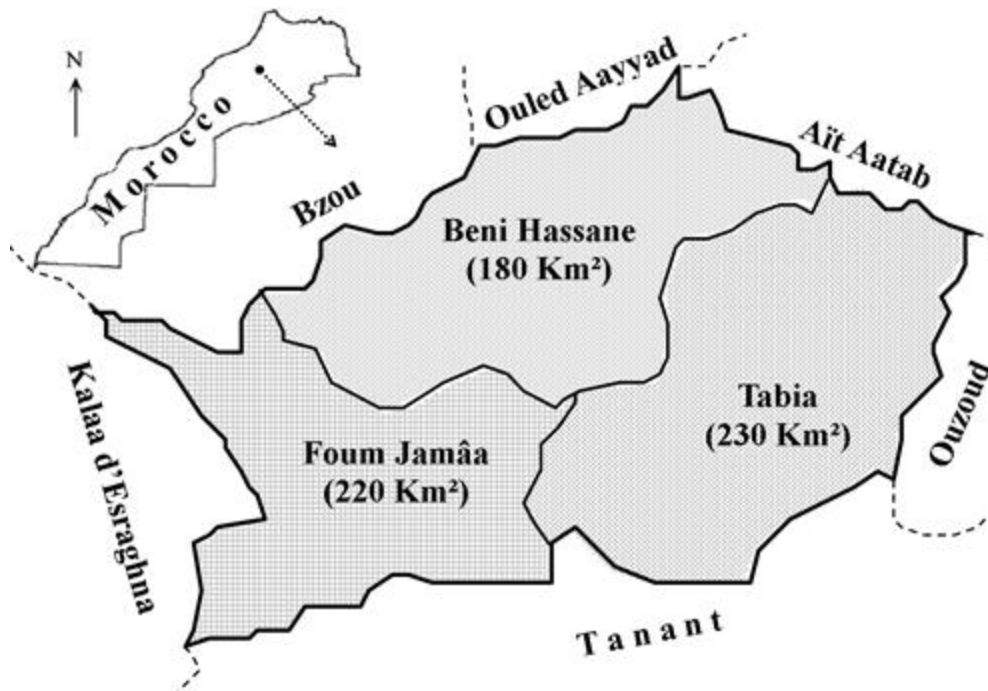


Figure 9: Découpage administratif de la région de Fom Jamaà (commune rurale de Fom Jamaà).

2- Cadre administratif

Fom Jamaà dépend administrativement de Caidat Tanant, Cercle Bzou, la province d'Azilal et fait partie de la région Tadla- Azilal. Fom jamaà s'articule administrativement autour de trois secteurs: Fom Jamaa (FJ), Tabia (T) et Bni hssan (BH); chaque secteur est composé de plusieurs localités.

3- Activités économiques

La région est caractérisée par une activité économique de type rural, basée essentiellement sur la production agricole, l'élevage et même l'exploitation des ressources naturelles, comme le bois de forêt. De façon secondaire, les gens s'adonnent à des activités commerciales, artisanales et de service. Hormis quelques unités des huileries traditionnelles, il n'y a aucune infrastructure industrielle.

a. L'agriculture

Les activités agricoles qui mobilisent 24.32% de la main d'œuvre locale à Fom Jamaà sont de type traditionnel, à dominante cultures céréalières et de

l'arboriculture (principalement l'amandier et l'olivier). Les techniques culturales sont rudimentaires et se basent essentiellement sur l'exploitation pure et simple des potentialités naturelles. Par conséquent, les niveaux de productions et de rendements sont très faibles.

b. L'élevage

A l'échelle de la commune rurale de Foum Jamaà, l'élevage ne peut pas être considéré une activité principale intégrée aux exploitations agricoles. Il est encore de type extensif, avec une main d'œuvre à dominante familiale, un équipement vétuste et des rendements très modestes. Il est surtout lié à la grande superficie. Les animaux d'élevages, se composent essentiellement de moutons, chèvres, volailles et lapins.

c. Activités commerciales et de service

Le commerce mobilise une part importante de la main d'œuvre locale, estimée à environs 29.73%. Les secteurs relatifs à l'administration, aux professions libérales, à l'enseignement et aux services, n'absorbent respectivement que 8.11%; 5.41%; 5.41% et 4.05% de la population active locale, et ont par conséquent un faible impact en terme de mobilisation de la main d'œuvre (données et statistiques de la commune rurale de Foum Jamaà, 2000).

4- Cadre physique

La situation de Foum Jamaà dans la chaîne du haut Atlas calcaire, explique une morphologie générale très accidentée du relief. Les principales composantes de ce relief correspondent à 56% de montagne, 27% comme plateaux, 10% de plaines et 7% de collines. Les altitudes varient en moyenne entre 730 et 900 m. Les sols de Foum Jamàa sont assez hétérogènes. La grande partie des sols présente une sensibilité marquée à l'érosion.

5- Climatologie

Le climat qui règne dans la région de Foum Jamàa est de type semi-aride, avec un froid intense en hiver et un été très chaud. Les précipitations estimées à 200

mm/an environs, sont rares, presque nulles en périodes estivales. L'analyse des données météorologiques fait ressortir que la pluviométrie est irrégulière. Sa répartition annuelle se distingue par une période pluvieuse et une sèche. La première commençant d'Octobre à Mai, présente deux pics : le premier en saison d'automne (Novembre et Décembre) et le second en printemps (Mars et Avril). La période sèche s'étale de Juin, Juillet et Août, avec des orages rares pendant l'été.

La région connaît deux types de vents (de l'Ouest et de l'Est), parfois chauds en été et relativement froids en hiver. Le sens dominant est de direction Nord-est. Les vents « chergui » responsables des grandes chaleurs, s'ils surviennent avant les moissons, causeraient des dégâts sérieux au niveau des céréales.

Quant aux températures, la moyenne mensuelle maximale et minimale des températures est respectivement 40°C au mois d'Août et 13°C au mois de Décembre (données du service local des eaux et forêts, 2000).

En général, le climat est connu par une variabilité apparente de la température et de l'humidité, ainsi que par une pluviométrie relativement faible.

6- Végétation

Le paysage de la région est très diversifié ; la montagne constitue une importante composante du milieu. Le domaine forestier du territoire s'étend sur une superficie de 150 000 ha. Les formations végétales naturelles dominantes sont :

- Des variétés d'arbres forestiers: gommier (*Acacia gummiifera*), Caroubiers (*Cirtonia siliqua*), chêne vert (*Quercus ilex*), Silene cucubalus, Urginée (*Urginea maritima*).

- Des arbres fruitiers : Amandier (*Prunus amygdalus*) et Olivier (*Olea europea*).

- Des formations steppiques distinguées essentiellement par *Euphorbia resinifera* qui constitue la principale composante de la végétation (près de 75% de la superficie forestière totale). Il est associé à une large diversité d'autres espèces : Thymus (*Fumana thymifolia*), *Rhus tripartita*, jujubier (*Zizyphus lotus*) Ricin (*Ricinus communis*).

Beaucoup de formations (*Prunus amygdalus*, *Cirtonia siliqua* et *Acacia gummiifera*)

connaissent une nette dégradation, due aux activités anthropiques et à la succession des périodes de sécheresse. En haute montagne, seules les xérophytes épineuses persistent.

7- Population

La population totale est de 29988 habitants, répartie sur une superficie de 63000 hectare, soit une densité de 0.476 hab/ha. Les habitants de la région se classifient par secteur comme suit :

- 16790 des habitants vivaient au secteur de Tabia (T) sur une superficie de 230 km², l'habitat est dense. 40 patients ont été interrogés ;
- 10790 des habitants occupaient le secteur de Foug Jamaà (FJ) sur une superficie de 220 km². Le secteur est moins dense par rapport au premier. 334 patients ont été interrogés;
- 6220 des habitants résidaient au secteur Bni Hssan (BH) sur une superficie de 180 km², il est absolument le moins dense, 281 patients ont été interrogés.

Pour satisfaire la demande recrudescende en matière de logements devant la poussée démographique, les autorités administratives ont procédé à des aménagements massifs, mais assez sommaires, de terrains à bâtir autour de la région. Ces travaux d'aménagements et les habitats spontanés qui se créent, forment ainsi un environnement propice au développement de certains vecteurs de maladies.

8- Organisation de Foug Jamaà sur le plan sanitaire

La circonscription sanitaire de Foug Jamaà, au même titre que le découpage administratif, est divisée en trois secteurs (FJ), (T) et (BH).

9- Description de l'habitat et du cadre de vie de la région

a. Type d'habitat rencontré

La description de l'habitat s'est faite à partir des observations du terrain, et des enquêtes auprès des ménages. Le ménage est défini comme un ensemble de personnes vivant sous le même toit et dépendant d'un même chef de famille.

En général, il n'y a pas de typologie ou de standing uniforme des ménages dans les différentes localités de la région. A l'exception du secteur de de (FJ), dont on note des maisons à constructions un peu modernes, édifiées de béton, les maisons sont construites à la traditionnelle en semi dur et dur.

b. Mode d'éclairage utilisé

L'électricité est fournie à la quasi-totalité des localités sur une base continue, à travers le réseau principal. Les localités qui ne sont pas encore connectées au réseau électrique, utilisent une lampe à gaz ou des bougies.

c. Le système d'approvisionnement en eau potable

Le système d'approvisionnement en eau potable diffère d'un secteur à autre: les ménages du secteur de (FJ) sont raccordés au réseau d'eau potable de l'ONEP. Dans les deux autres secteurs, généralement le service des eaux n'est pas au niveau désiré; l'approvisionnement en eau potable varie en fonction des localités. Les puits restent la source principale.

d. Animaux dans les ménages

Trois grandes catégories d'animaux caractérisent les ménages de la région:

- les animaux domestiques (chiens, chats);
- les animaux d'élevages;
- les rongeurs avec présence de souris comme constatation soulevée.

Les trois catégories d'animaux sont concentrées surtout dans les secteurs (BH) et (T).

Les écuries et les refuges des animaux, sont construits habituellement à l'intérieur, ou en face de la maison d'habitation. Parfois les habitants gardent leurs animaux à l'extérieur de la maison, mais le plus proche possible, pour qu'ils soient attentivement gardés.

e. Le mode de gestion des eaux usées

Seules quelques localités du secteur de (FJ) profitent des réseaux d'assainissement. Majoritairement, Les eaux usées sont mal gérées: les ménages rejettent les déchets de lessives, de vaisselles et de douches en pleine nature (figure 10). Malheureusement, l'eau du gaspillage n'est pas dirigée vers les noyaux des latrines, mais coure dans les ruelles, formant ainsi de petites flaques d'eau en argile qui attirent les insectes.



Figure 10 : Un rejet des eaux usées (Photo prise à Foum Jamaà)

f. Le mode de gestion des excréta

Les ménages du secteur de (FJ) ont des toilettes internes, soit par connections aux réseaux d'assainissement (chez quelques ménages) ou par l'utilisation des fosses septiques. Concernant les deux autres secteurs, pour la plupart des ménages, les toilettes sont absentes et l'évacuation des excréta se passe dans la nature. Le problème majeur, en l'absence de réseaux d'assainissement, se résume en dégagement de mauvaises odeurs et prolifération des insectes.

g. Le mode de gestion des ordures ménagères

Les ordures ménagères connaissent différents modes de gestion, il s'agit :

- Du système d'abonnement à une filière de collecte: plusieurs volontaires sous forme d'associations et groupements d'intérêt général s'organisent de façon périodique, pour ramasser les ordures des ménages à l'aide de charrettes contre paiement. L'autre partie du secteur jette les ordures dans un Oued traversant la région. Ce dernier présente une menace alarmante à la santé des habitants de la communauté locale;

- Du système de dépotoirs : les ménages ont recours aux décharges sauvages (figure 11 et 12) pour évacuer leurs ordures ménagères; les autres les abandonnent dans des parcelles non viabilisées au voisinage. Pour la plupart des localités surtout celles des secteurs (BH) et (T), l'évacuation des ordures s'effectue au près du foyer; ce qui constitue une cause permanente de contamination et complique d'avantage la situation environnementale.



Figure 11 : Décharges sauvages (Photos prises à Foum Jamaà)



Figure 12: Dépotoirs d'ordures (Photo prise à Foum Jamaà)

h. Système de gestion des eaux de pluie

La région d'étude ne dispose pas de caniveaux d'évacuation des eaux de pluies. Heureusement, elle possède un sol perméable à l'eau, et un relief très accidenté, caractérisé par la présence de deux lignes de crêtes, traversées par un Oued connu sous le nom de "Chaàba"; ce qui confère à la région une protection devant les eaux de ruissellement. Cependant, certaines localités sont inaccessibles suite à un événement pluvieux, car les flaques d'eau de pluies persistent, parfois jusqu'à plus de deux jours après l'arrêt des précipitations (figure 13); ce qui offre les conditions de développement de divers insectes.



Figure 13 : Flaque d'eau pluviale (Photo prise à Foum Jamaà)

Conclusion partielle

Il ressort de la présentation de la zone d'étude que son cadre de vie est très pollué. Cette insalubrité résulte d'une part de l'aménagement de la région, et d'autre part de comportement en matière d'hygiène et d'assainissement des ménages qui affecte l'environnement. Sans un processus de viabilisation mis en place, et sans une politique de restauration des fosses, qui sont devenues de grandes décharges sauvages, l'aménagement a été effectué sommairement. Ces décharges sont utilisées par la population pour le rejet de leurs ordures. Les rues sont inondées après chaque événement pluvieux en l'absence de système d'évacuation des eaux de pluies. Ces flaques d'eau, qui persistent plusieurs jours après la pluie, entraînent la prolifération de divers vecteurs de maladies. De même, la mauvaise gestion des eaux de toilettes, de lessive et de vaisselle qui consiste à les déverser dans la rue, rend l'entourage insalubre et favorable à la pullulation de vecteurs. La situation s'aggrave dans les endroits humides et riches en matières organiques, comme le cas des fosses à ordures autour des parcelles. Ces facteurs s'ajoutent aux problèmes environnementaux, qui sont à l'origine de la recrudescence de certaines maladies.

La présente recherche, réalisée en collaboration avec les services du ministère de la santé et la population locale, a été adoptée selon les axes suivant :

- ❖ Une série d'enquêtes proposant l'analyse des facteurs démographiques, socioéconomiques et environnementaux pouvant être incriminés dans la propagation et le développement de la maladie;
- ❖ Diagnostic microscopique et moléculaire des parasites ;
- ❖ Surveillance entomologique et identification morphologiques des espèces de phlébotomes.

II- Enquêtes épidémiologiques

Dans le cadre de conduire une étude approfondie relative au sujet de la LC et de s'enquérir d'une idée maîtresse, pouvant déboucher sur l'établissement d'un plan général à ce thème, une enquête sur terrain s'impose également au sujet des facteurs de risque d'infestation et de transmission. Le but demeure donc de cerner les causes, et l'évolution de la maladie, ainsi que ses différentes manifestations, afin de dégager les facteurs de risque,

responsables de la distribution de la LC dans la région de Foug Jamàa.

Pour se faire, un certain nombre d'éléments liés au patient et son milieu de vie tels que le statut socio-économique, le niveau d'instruction et l'infrastructure entrent en ligne de compte. Il faut également s'informer sur les connaissances, attitudes et perceptions de la population afin de comprendre comment elle réagit avec la maladie (traitement et leur participation dans les mesures de prévention et de lutte en général). D'où l'importance de notre enquête.

1- Déroulement pratique des enquêtes

Les enquêtes épidémiologiques de base, couvrant la région d'étude sont menées durant quatre ans, de Janvier 2006 à Décembre 2009, 655 personnes ont été interrogées. Ces enquêtes sont axées sur la préparation d'un questionnaire détaillé, avec le maximum d'information sur les sujets malades et leur environnement (fiche d'enquête dans l'annexe).

Les paramètres recherchés lors des enquêtes étaient relatives à des données démographiques, environnementales et socio économiques:

- L'identification du profil socio économique des patients/ ou de la famille: le sexe, l'âge, le niveau de scolarisation, la profession et la durée d'habitation dans le quartier ;

- Des données micro-écologiques (type d'habitat, aération de maison, assainissement, élevage, présence de chiens, mode d'éclairage, système d'approvisionnement en eau potable, évacuation des excréta et des ordures ménagères ...);

- Des éléments cliniques du parasite qui caractérisent la LC chez les individus infectés y compris le temps de manifestation de la maladie, le nombre de lésions et l'efficacité du traitement.....

2- Analyse des données

Après une codification des variables, les données de l'enquête ont été saisies et analysées à l'aide du test de khi ². Pour tous les tests, le niveau de signification était de 0,05.

III- Diagnostic microscopique et moléculaire des leishmanies

La détection de cas de la LC est poursuivie selon deux Types de dépistage : passif ou actif. Le premier se base sur la présentation des malades à l'hôpital pour

subir le test de la leishmaniose, cependant le deuxième, nous l'avons effectué par l'intermédiaire d'une campagne mobile au niveau des écoles et des localités les plus exposées. Le dépistage actif est réalisé en faisant recours aux hauts parleurs de mosquées centrales, afin de chercher et convoquer les cas perdus de vue. Les campagnes de dépistage actif sont réalisées au sein des douars et spécialement chez les écoliers.

1- Prélèvement

Les prélèvements sont réalisés par raclage au niveau du bourrelet inflammatoire périphérique des lésions à l'aide d'un vaccinostyle stérile à usage unique (Bessis, 2007 ; MS, 2010). Dans notre étude, les prélèvements (figure 14) sont effectués pour les cas suspects en présence effective du médecin du centre local de la santé.

2- Le frottis

Les frottis cutanés sont fixés et colorés par la suite au Giemsa, la coloration la plus appropriée pour la détection des *Leishmania* (MS, 2010). Observées au microscope optique (objectif *100), les leishmanies se présentent sous forme d'amastigotes en position intracellulaires. Les macrophages peuvent s'éclater lors de la confection du frottis et les leishmanies se trouvent alors éparpillées sur le frottis.



Figure 14 : Prélèvement d'un frottis cutané des lésions suspectes au niveau du visage et du pied (Photos prises durant notre campagne mobile, Foum Jamaà).

3- Diagnostic parasitologique basé sur l'observation microscopique

Afin de déterminer si les parasites responsables des lésions étaient des leishmanies, les 119 lames sélectionnées de la période entre 2009 et 2010 ont été examinées par le microscope. Pour chaque patient, des informations concernant le profil social (nom, sexe, âge, adresse) et

des éléments cliniques qui caractérisent la lésion (nombre, localisation, date d'apparition....) ont été prises. Les échantillons ont été considérés comme négatifs après au moins deux observations à partir de différentes préparations de la lésion cutanée elle même. Les patients positifs à l'issue du test microscopique suivront des séances de traitement par des injections locales de glucantime (figure 15).



Figure 15 : Injection locale de glucantime chez un patient présentant une lésion faciale (Photo du laboratoire du centre de la santé, Foum Jamaà).

4- Diagnostic moléculaire

Pour identifier l'agent causal, nous avons examiné 81 lames des frottis cutanés provenant des secteurs de Foum Jamaà, ayant enregistré un nombre important de cas de LC. Les lames sélectionnées ont été analysées par PCR-ITS1. La technique permet l'amplification de la région ITS1 (Internal Transcribed spacer region de l'ADN ribosomal).

a. Extraction de l'ADN

Les techniques d'extraction d'ADN visent à séparer le matériel génétique des résidus protéiques. Nous avons utilisé pour cela le principe de la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / protéines) entre deux phases non miscibles. Elle est efficace dans l'élimination de l'hémoglobine, l'un des facteurs d'inhibition de la PCR. C'est une

procédure de purification rigoureuse basée sur la succession d'étapes de lyse, de digestion, d'extraction et de lavage (Meredith et *al.*, 1993; El Tai et *al.*, 2000).

Dans notre étude, les formes amastigotes sont collectées à partir du frottis cutané, après avoir ajouté à chaque lame 250 µl du Tampon de lyse (50 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, PH 7.4, 1% v/v, Triton X-100 et 100 mg de protéinase K par ml). Par la suite, nous avons agité avant d'incuber pendant une nuit à 60 °C. Un volume égal de phénol est ajouté, avant d'agiter doucement au moins 2 à 3 minutes. Le produit est centrifugé à 16 000 g pendant 10 minutes avant d'ajouter un volume égale de mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1, v/v) à la phase aqueuse récupérée, et par la suite mélanger soigneusement puis centrifuger comme auparavant.

La phase aqueuse est récupérée de nouveau et la précipitation d'ADN est effectuée en ajoutant le 1/10ème du volume d'acétate de sodium 3M (2,5V) et d'éthanol absolu 96%. Ensuite, nous avons mélangé doucement avant d'incuber toute la nuit à -20°C. Avant d'enlever le surnageant par aspiration à vide, nous avons procédé à une centrifugation à la vitesse maximale (12000-13000 Tr/min) pendant 10 minutes. Sans remuer ou secouer, nous avons fait deux lavages: un avec l'éthanol absolu et l'autre avec l'éthanol 70%. Par la suite, nous avons centrifugé à la vitesse maximale pendant 15 min à 4°C avant d'enlever le surnageant. Le culot d'ADN est dissous dans 50 µl de tampon TE (PH 8,0) après avoir évaporé l'éthanol. Le dosage d'ADN est réalisé par Nanodrope.

b. Amplification par PCR

Nous avons amplifié la région ITS1 de l'ADN parasitaire chez environ 81 patients, selon la technique décrite par Schonian et collaborateurs (2003). Dans un volume final de 25µl, nous avons ajouté 5µl d'ADN avec 20µl du mix PCR. Ce mix est composé de 0.48 µM de chacune des deux amorces LITSR (5'TGATACCACTTATCGCACTT-3') et L5.8S (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'), 1X tampon de PCR, 1.5mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 0.6µl de DMSO et 1U de Taq polymérase (Invitrogen). L'amplification est obtenue sous les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 2min à 95°C, suivie de 32cycles composés d'une dénaturation à 95°C pendant 20s, une hybridation à 53°C pendant 30s, et une extension à 72°C pendant 1min, enfin une extension finale à 72°C pendant 6min. Le produit amplifié est ensuite digéré par l'enzyme de restriction HaeIII.

Les réactifs sont préparés selon le mode expérimental détaillé dans l'annexe.

c. Digestion enzymatique par HaeIII du produit PCR ITS1

i. Principe

L'identification des espèces de *Leishmania* est réalisée par digestion du produit PCR ITS1 par des endonucléases de restriction (RFLP= Restriction fragment length polymorphisme). Nous avons utilisé HaeIII, enzyme de restriction qui permet de distinguer entre les différentes espèces de *Leishmania* (tableau 7) (Shonian et al., 2003).

Tableau7 : Profil de digestion de la région ITS1 des espèces de *Leishmania* par HaeIII

Espèces	don.	inf.	cha.	aet.	tro.	maj.	tur.	mex.	ama.	bra.	guy.	pan.
Profil de digestion	164	184	184	200	185	203	203	186	186	156	156	156
	75	72	72	72	57	132	57	88	142	143	137	139
	54	55	55	54	53		53	59				
				23	24		24					

don : *donovani*,

inf : *infantum* ,

cha : *chagasi*,

aet : *aethiopica*,

tro : *tropica*,

maj : *major*,

tur: *turanica*,

Mex : *mexicana*,

ama: *amazonensis*,

bra: *braziliensis*,

guy: *guyanensis*,

pan: *panamensis*.

ii. Procédure

Pour un volume final de 20µl, nous avons additionné à 15µl de l'amplicon un mix composé de : Tampon de l'enzyme (1X), 5U de HaeIII (Fermentas) et la quantité suffisante pour 20µl d'eau ultra pure. Les tubes sont incubés dans un bain Marie à 37°C pendant au moins 2 heures, puis les échantillons sont déposés sur le gel d'agarose de 1,5% pour la migration à 60V pendant 30min. Pour comparer leurs profils à ceux des lames collectées, la migration est effectuée en présence de poids moléculaire (ϕ x 174) et les 3 souches de références des trois

espèces, connues comme agents de leishmaniose cutanée au Maroc : *L. major* (MHOM/SU/73/5ASKH), *L.tropica* (MHOM/SU/74/K27) et *L. infantum* (MHOM/TN/80/IPT1).

IV- Surveillance entomologique

L'orientation de la lutte antivectorielle et le choix de la méthode de lutte appropriée, nécessite une collecte des phlébotomes pour délimiter et estimer l'espace et la période à risque. Par conséquent une surveillance entomologique abordant l'inventaire faunistique, la densité et les périodes d'activité des vecteurs s'impose. Dans cet objectif, la présente partie est consacrée à l'étude des populations naturelles récoltées dans différents biotopes de la région de Foum Jamaà. Dans notre étude, la collecte est effectuée par quinzaine durant une année (Janvier à Décembre 2010). La durée de piégeage est de 18h à 08h.

1- Technique d'échantillonnage

On a procédé à la technique des pièges adhésifs. C'est une méthode rentable, plus utilisée au Maroc et permettant la collecte des phlébotomes morts (MS, 2010). Elle est la plus adaptée à l'inventaire des phlébotomes dans la région Méditerranéenne est sans doute, celle connue depuis les importants travaux des épidémiologistes russes Vlazov (1932) et Petscheva (1935) in Croset et ses collaborateurs (1974). Les pièges sont constitués de feuilles de papier blanc mat de format A4 de 21*27 cm (surface globale d'environ 0,0567 m²) imbibées suffisamment d'huile de ricin. Cette dernière possède les avantages d'être très visqueuse, de ne pas être répulsive et enfin d'être soluble dans l'alcool; ce qui facilite par la suite la récupération des insectes. Les pièges adhésifs ont été disposés côte à côte en guirlande et suspendus dans différents biotopes (Fenêtres, fissures des murs, Grottes, poulaillers, végétations...) pouvant servir de gîtes de repos et de lieux de ponte aux phlébotomes (figure 16). La durée de piégeage varie en fonction de l'objectif de l'étude et des conditions climatiques (vent, pluies..). En général, une nuit (de 18h à 08h), est suffisante pour estimer la densité en nombre de spécimens par nuit et par unité de surface.



Figure 16: Pièges adhésifs installés dans différents biotopes (Photos prises à Foum Jamaà)

2- Conservation des phlébotomes

Les phlébotomes capturés par le papier huilé sont récupérés à l'aide d'un pinceau, mis à l'alcool 90°.

3- Traitement des échantillons

Avant l'identification des spécimens, un traitement des spécimens s'impose.

a. Eclaircissement

Les manipulations se font dans une coupelle de cristal dont on verse les phlébotomes. Sans aspirer les phlébotomes, l'alcool est soutiré à l'aide d'une pipette Pasteur, équipée d'une poire en caoutchouc. Par la suite, des bains successifs suivants sont réalisés (Boussa, 2008) :

- Pour les phlébotomes capturés sur papiers huilés lorsque l'huile de ricin est mal solubilisée; on procède à 3 minutes dans l'alcool-éther
- 4 à 8 heures dans la solution de potasse à 10%
- 6 bains de 20 minutes chacun dans l'eau
- 1 heure minimum dans le liquide de Marc-André. Un prolongement des spécimens dans ce liquide n'a pas d'inconvénient.

b. Montages

Deux types de montage sont possibles (Boussa, 2008):

i. Montage rapide dans la gomme au chloral

Dans ce montage on aura une bonne observation microscopique en contraste de phases et une visualisation des spermathèques qui apparaissent très réfringentes. Ce type de milieu est à déconseiller pour une conservation de longue durée, étant donné que la gomme au chloral a tendance à se rétracter après un certain temps; les structures internes tendent à s'effacer et à la longue, l'ensemble de la préparation devient inobservable.

Les phlébotomes sont montés directement dans une goutte de gomme au chloral selon la technique détaillée plus bas après éclaircissement.

ii. Montage permanent dans le baume du Canada

Les bains cités en bas sont effectués pour les spécimens déjà conservés dans le Marc-André:

- 15 minutes dans une solution de fuchsine à 1 pour mille
- 2 minutes dans l'alcool à 70°
- 3 bains de 20 minutes dans l'alcool à 95°
- 1 heure au moins dans la créosote.

Après avoir les déshydratés, les spécimens sont montés sous la loupe binoculaire dans une goutte de baume du Canada diluée dans du xylène jusqu'à consistance fluide. Ce montage fortement recommandé pour la mise en collection des espèces, permet d'avoir des conservations de longue durée.

c. Dissection des phlébotomes

Dans l'un des deux milieux de montage, le phlébotome est déposé en position latérale. A l'aide de fines aiguilles, on sépare la tête du reste du corps. Elle est ensuite orientée face ventrale en position supérieure (*Sergentomyia*) ou en position inférieure (*Phlebotomus*) afin de rendre plus aisée l'observation des armatures cibariale et pharyngienne. Les ailes sont soigneusement étalées du côté dorsal et les pattes du côté ventral.

L'armature génitale chez le mâle est disposée selon son orientation chez l'insecte vivant, en prenant soin de mettre en évidence les différents éléments nécessaires à la diagnose spécifique : édéage, coxite, style,...

Dans le cas d'un spécimen femelle, la dissection du génitalia est parfois nécessaire pour visualiser certaines structures internes utilisées pour la diagnose spécifique comme dans le cas des *Larroussius* (Léger *et al.*, 1983). Cette dissection s'effectue dans le milieu de montage sous la loupe binoculaire. On maintient le thorax à l'aide d'une fine aiguille et on coupe l'abdomen au niveau de l'avant dernier segment, après avoir coupé la tête. On met à part la furca avec les spermathèques en se débarrassant des téguments et des tissus qui l'entourent. Par la suite, la préparation est recouverte d'une lamelle ronde. Une application d'une légère pression permet de mettre à plat les tissus à observer, la meilleure position pour l'observation microscopique (Boussa, 2008).

d. Identification morphologique des spécimens

Selon les paramètres classiques, chaque spécimen est identifié en se référant à la clé de détermination des phlébotomes (MS, 2010):

- Pour les phlébotomes femelles: Anatomie des spermathèques, de l'armature cibariale et pharyngienne.

- pour les phlébotomes mâles: La morphologie externe de l'appareil génital et si nécessaire, anatomie de l'armature cibariale (*Sergentomyia*) ou pharyngienne (*Phlebotomus*).

CHAPITRE III

ETUDE ECO-EPIDIMIOLOGIQUE DE LA MALADIE **ET IDENTIFICATION DU PARASITE**

Partie 1: Etude des facteurs démographiques, socio-économiques et environnementaux liés à la répartition de la leishmaniose cutanée

I- Introduction:

Dans un premier temps nous notons que l'étude épidémiologique de la LC dans la région de Foum Jamaà (province d'Azilal) porte sur les 479 cas positifs parmi 655 suspects, enregistrés entre l'année 2006 et 2009. La région présentant une population totale de 29988, est divisée administrativement en trois secteurs:

- Secteur de Tabia (T) avec 16790 habitants. 40 patients ont été interrogés ;
- Secteur de Foum Jamaà (FJ) avec 10790 habitants. 334 patients ont été interrogés;
- Secteur de Bni Hssan (BH) avec 6220 habitants. 281 patients ont été interrogés.

L'objectif général de cette partie est de contribuer à une meilleure compréhension des facteurs écologiques et socioéconomiques influençant la recrudescence de la LC dans la région de Foum Jamaà, afin de dégager les facteurs de risque.

II- Données cliniques

1- Nombre et localisation des lésions

D'après nos observation sur le terrain, toutes les parties du corps sont concernées: la tête, le tronc, les membres supérieurs et inférieurs, surtout les parties exposées du corps, ce qui suggère une contamination domestique nocturne. Concernant le nombre, les lésions sont

souvent multiples et varient de 1 à 20. Une étude a montré que ce nombre sur le corps variait de 1 à 29 lésions (Nikiema, 2002).

2- Effet du traitement

L'enquête a révélé que 98.5% des patients utilisant le glucantime comme traitement ont guéri. Ce qui concorde avec le rapport de l'OMS (2010) déclarant un taux global de guérison qui dépasse 90%. La même source a signalé que les dérivés de l'antimoine pentavalent: Le stibogluconate de sodium et l'antimoniote de méglumine sont les antileishmaniens de première intention classiques dans la plupart des pays du monde (Dedet, 2001; OMS, 2010). Ce qui témoigne de l'efficacité du traitement, malgré les cicatrices laissées après la guérison. Ces traces sont trouvées gênantes chez quelques malades, surtout pour les jeunes filles. A ce propos, Yiougo et ses collaborateurs (2007) ont montré que La LC cause de nombreux problèmes sociaux pour les patients. Le traitement retardé ne peut que contribuer dans l'apparition des cicatrices.

Les figures 17 à 33 résument le résultat de la répartition des 479 cas positifs en relation avec les paramètres étudiés. Les résultats du test de χ^2 ont été reportés en graphes : lettres a et b indiquent, respectivement que la valeur observée est significativement inférieure ou supérieure à celle attendue selon l'hypothèse nulle d'une répartition égale des 479 cas positifs, entre toutes les modalités pour chaque paramètre. Toutes les valeurs ont été signalées en termes de pourcentage de la totalité des cas positifs.

3- Risque lié au type de dépistage

Les résultats de la répartition des cas malades liée au type de dépistage ont révélé que la majorité des patients (92,50%) se sont dirigés volontairement au centre de la santé (dépistage passif) et seuls 7,5% des cas malades ont nécessité un déplacement de l'équipe sanitaire (dépistage actif) (figure 17). Ces résultats montrent l'efficacité des campagnes d'information et de sensibilisation.

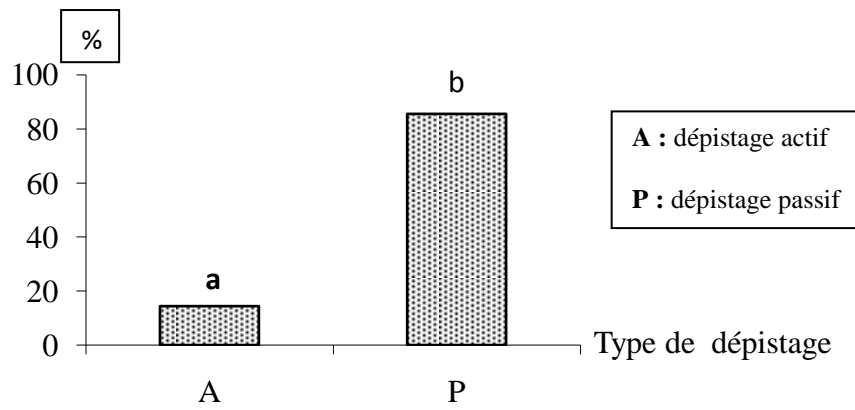


Figure 17: Pourcentage des malades liés au type de dépistage.

Les résultats obtenus n'éliminent pas le rôle essentiel du dépistage actif. Sur le sous-continent indien, la recherche active des cas est un élément essentiel de la stratégie d'élimination de la leishmaniose. Les premières données montrent que le dépistage actif est avantageux sur le plan économique dans les zones où l'incidence de la maladie est forte; la population mal renseignée au sujet de la maladie et dans le cas où les services sanitaires sont peu efficaces (OMS, 2010).

Dans l'État du Bihar en Inde, le dépistage passif des cas ne permet pas une estimation réelle des cas de LV, la sous estimation a été dans la proportion de 1 sur 8 et d'un facteur 40 dans le cas de LC au Guatemala (OMS, 2010).

III- Evolution spatio-temporelle de la maladie au sein de Foum Jamaà

1- Evolution annuelle de la leishmaniose cutanée

Selon la délégation provinciale du ministère de la santé d'Azilal, la LC fût son apparition à Foum Jamaà sous forme de cas éparpillés pendant 2000. Les premiers cas enregistrés officiellement dans le centre de la santé étaient en 2002. A part 2004, où il y a une diminution remarquable des cas malades, le nombre de personnes infectées ne fait qu'augmenter.

Dans notre étude, il ressort que le nombre des cas positifs a connu une augmentation remarquable de 2006 à 2007, légèrement stable entre 2007 et 2008, avant de noter une augmentation significative en 2009 (36.5%, $p \leq 10^{-4}$) (tableau 8).

Tableau 8: Nombre de cas de LC enregistré dans la région entre 2006 et 2009.

Années	2006	2007	2008	2009	Total
Nombre de cas	68	120	115	176	479

2- Evolution saisonnière du nombre de cas de la leishmaniose cutanée

Pour étudier la saisonnalité de la LC, la figure 18 montre les patients enregistrés dans la circonscription sanitaire de la région, durant deux ans successifs 2007-2008.

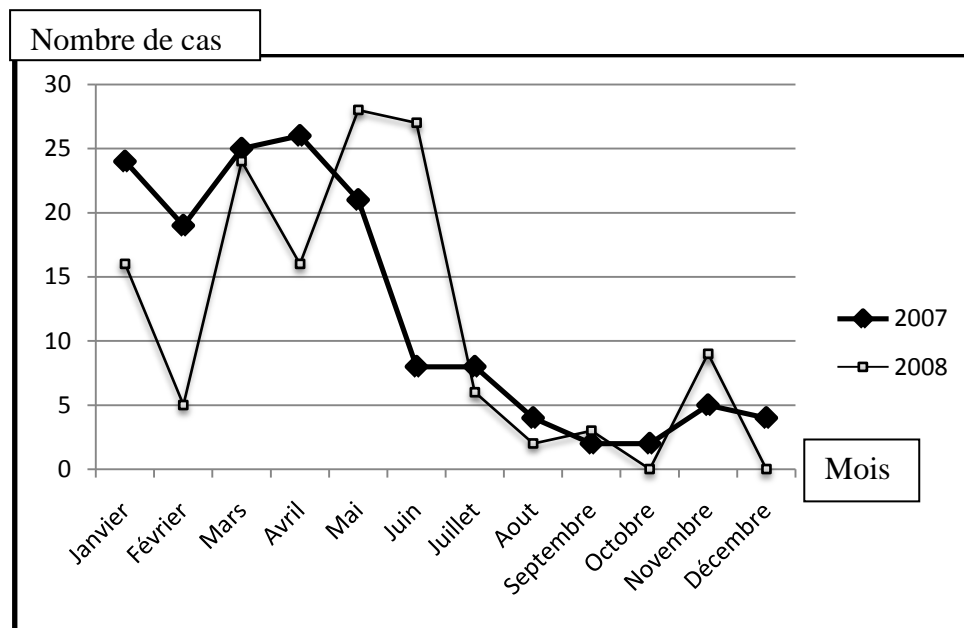


Figure 18: Variation mensuelle du nombre de cas de la LC pendant 2007 et 2008.

L'allure de la courbe montre un pic de Mars à Juin. Il commence en Février et prend fin en Aout. Il correspond à la saison estivale. Il ressort que le caractère saisonnier doit être lié à la dynamique saisonnière des vecteurs, et à la période d'incubation de la maladie.

3- Dynamique de la répartition spatiale de la maladie

a. Distribution des cas à l'échelle des secteurs

Les trois secteurs constituant la région, sont touchés par la maladie. Le nombre de cas de la LC enregistré, lors de l'enquête effectuée sur la base des cas signalés entre 2006 et 2009 variait en fonction de secteur (figure 19).

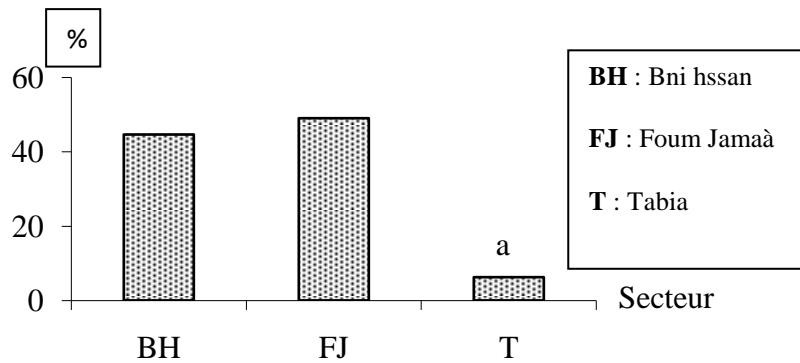


Figure 19 : Pourcentage de malades par secteur

Ainsi, Tabia montre nettement le nombre le plus faible de cas positifs (6,3%, $p \leq 10^{-4}$), et presque pas de différence entre les deux autres secteurs Bni hssan et Foum Jamaà, avec respectivement 44,7% et 49,1%. Le taux d'incidence le plus élevé est enregistré au niveau de FJ avec 0,72%.

La différence observée peut s'expliquer par l'hétérogénéité des conditions écologiques et socio-économiques au sein de la région; ce qui affecte la répartition spatiale de la maladie. La région est un centre très important de point de vue social et économique, ce qui constitue un risque majeur de dissémination du parasite vers les régions voisines. Sur le plan géographique, les localités touchées dans la région sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9: Distribution de la LC au sein des secteurs et des localités de la région de Fougoum de 2006 à 2009

Secteur	Localité	Z (m)	X	Y	Testé	Pos. (%)	
Beni Hssan	Ait abdrhman	664	6° 53' 04	32° 03' 18	17	52,9	
	Ait alikdour	717	6° 59' 38	32° 00' 33	22	68,2	
	Ait bouchaou	808	6° 55' 23	32° 01' 53	14	85,7	
	Ait hmou	716	7° 00' 31	31° 59' 58	14	100,0	
	Ait mkhlouf 1	729	6° 59' 16	32° 00' 08	27	92,6	
	Ait mkhlouf 2	735	6° 58' 53	32° 01' 23	25	68,0	
	Ait mnssor	793	6° 56' 04	32° 02' 17	3	100,0	
	Ait ojaida	749	6° 58' 40	32° 01' 48	68	64,7	
	Asknbr	625	6° 54' 47	32° 03' 41	6	100,0	
	Ichlaone	800	6° 54' 52	32° 00' 38	2	100,0	
	Idaadar	832	6° 55' 20	32° 00' 25	1	100,0	
	Ifrgan	801	6° 55' 48	32° 02' 14	5	100,0	
	Igout	523	6° 54' 30	32° 05' 05	1	100,0	
	Imintalate	774	6° 56' 46	32° 02' 15	5	40,0	
	Maskaon	810	6° 56' 14	32° 00' 06	26	100,0	
	Taorirt	771	6° 57' 56	32° 02' 10	44	54,5	
	Tizi issalen	823	6° 55' 44	32° 00' 53	1	0,0	
		Total testé				281	73,3
	Fougoum	Afrao	735	7° 00' 13	31° 58' 10	10	70,0
Ait alibnsalm		900	6° 59' 24	31° 56' 48	10	80,0	
Ait ameur		965	6° 57' 42	31° 57' 04	10	90,0	
Ait bouaddi		842	6° 58' 55	31° 57' 26	10	20,0	
Ait bousaid 1		950	6° 58' 18	31° 57' 02	3	100,0	
Ait bousaid 2		1086	6° 58' 39	31° 56' 21	2	50,0	
Ait chlha		922	6° 58' 35	31° 57' 11	6	83,3	
Ait foundou		836	6° 58' 50	31° 57' 33	30	80,0	
Ait hmida		879	6° 58' 33	31° 57' 48	24	95,8	
Ait omhyya		788	6° 59' 30	31° 57' 50	5	60,0	
Ait omlaid		1030	6° 57' 04	31° 57' 03	9	77,8	
Ait sos		936	6° 58' 16	31° 57' 12	4	75,0	
Igramm		831	6° 59' 03	31° 57' 35	42	50,0	
Ihjjamn		802	6° 59' 12	31° 57' 47	31	83,9	
Imzoar		816	6° 58' 58	31° 57' 42	37	81,1	
Issalen		978	6° 57' 30	31° 57' 22	6	66,7	
Maadin		780	6° 59' 46	31° 57' 13	4	75,0	
Mkossa		731	7° 01' 34	31° 59' 39	26	65,4	
Mllah		810	6° 59' 13	31° 57' 43	11	63,6	
Tagant		797	6° 57' 31	31° 59' 01	5	60,0	
Tajgagalt		755	7° 00' 40	31° 56' 58	27	81,5	
Tiddarin		847	6° 58' 74	31° 57' 43	8	75,0	
Tirimzi		872	6° 58' 58	31° 57' 15	9	77,8	
Zourz	1035	6° 56' 23	31° 57' 46	5	80,0		
	Total testé				334	73,4	
Tabia	Agmroul	703	6° 51' 12	31° 58' 38	8	87,5	
	Ait sellam	735	6° 49' 11	31° 59' 12	3	33,3	
	Bolfrssi	802	6° 54' 52	32° 00' 37	6	16,7	
	Guimi	811	6° 55' 03	32° 00' 12	4	75,0	
	Imchihn	802	6° 54' 52	32° 00' 37	8	87,5	
	Tarra	805	6° 54' 38	32° 00' 49	2	100,0	
	Tisslit	855	6° 50' 52	31° 57' 29	9	77,8	
	Total testé				40	70,0	
Total global					655	73,1	

b. Répartition des malades en relation avec l'altitude des localités.

L'altitude peut contribuer dans la persistance de la maladie. La répartition des cas positifs selon l'altitude a été très significative ($p \leq 10^{-4}$) (figure 20), la majorité des malades, environ 88,30% vivent dans les localités à des altitudes intermédiaires entre 700 et 900 m.

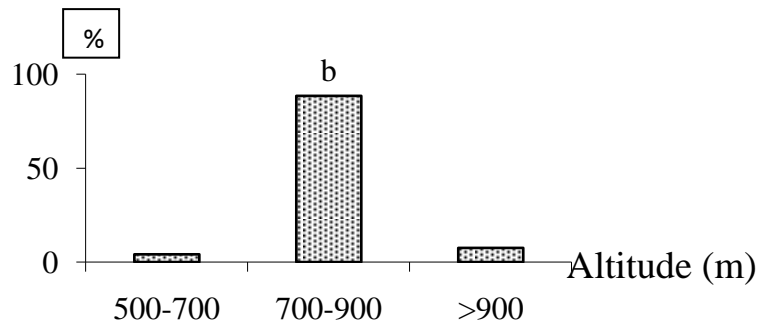


Figure 20 : Pourcentage des malades en fonction d'altitude.

La répartition des malades selon l'altitude dans la région, suggère que la transmission de la maladie soit par une espèce de phlébotome, ayant la préférence de l'altitude entre 700 et 900 m. Cette hypothèse a été soutenue par les données cliniques, montrant la prédominance d'un seul type d'aspect pour les lésions cutanées.

IV- Caractérisation de la population cible

1- Vulnérabilité liée au sexe

Les résultats de l'enquête montrent que les proportions de malades sont respectivement de 56% pour le sexe féminin et 44% pour le sexe masculin (figure 21).

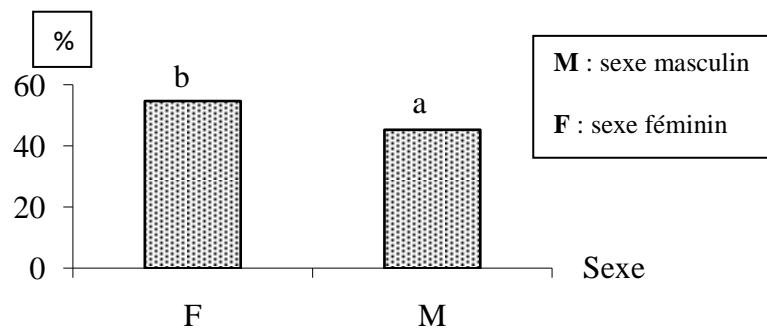


Figure 21: Pourcentage de malades par sexe

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre la survenue de la maladie et le sexe (test de Khi2 avec $p = 0,04$), même si le sexe féminin paraît un peu plus touché. Lors des entretiens avec les agents de la santé, il a été relevé que la maladie touche les deux sexes dans un même degré.

La vulnérabilité de la LC est donc indépendante du sexe, ce qui est en cohérence avec les résultats des études rapportées par ailleurs ([Sharifi et al, 1998] [Yaghoobi et al, 2001] [Yaghoobi et al, 2002] [Yaghoobi et al, 2004] [Sharma et al 2005a] [Fazaelia et al 2009]). La faible différence observée est généralement dû au sex-ratio inégal de la population. La plupart de ces recherches a révélé que le sexe féminin était légèrement plus représenté.

D'autres étude de Chiheb et ses collaborateurs (1999) sur les provinces nordiques du Maroc, montre que les personnes de sexe féminin sont les plus touchées par la LC avec un taux de 56%.

2- Vulnérabilité liée à l'âge

Parmi les personnes enquêtées, la majorité des malades (67%) se situe entre 0 et 9 ans ($p \leq 0.0001$) et 25% entre 10 et 19 ans. Les classes d'âge plus de 20 ans représentent 7,1% des cas positifs, une proportion significativement plus faible (figure 22).

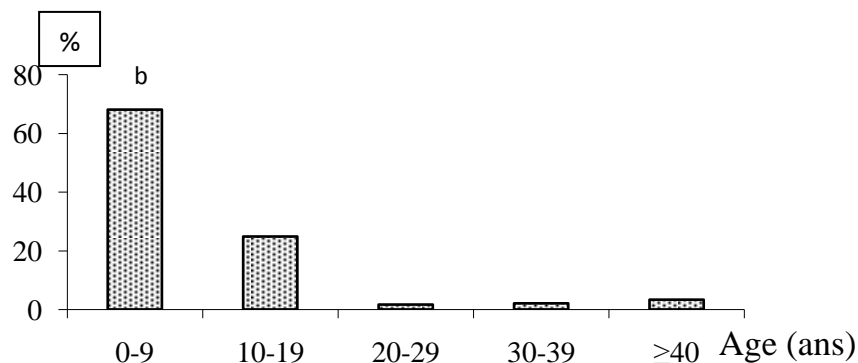


Figure 22 : Répartition des malades par tranche d'âge

La répartition des cas positifs en fonction de l'âge s'accorde avec des résultats antérieurs ([Zare et Baghestani, 2001] [Gurel et al ,2002] [Yaghoobi et al, 2003] [Aytekin et al, 2006] [Fazaelia et al 2009]), en général les personnes de ≤ 10 ans sont les plus touchées. D'autres études ont montré que le groupe d'âge ≤ 20 ans est le plus infecté ([Momeni et Aminjavaheri,

1994] [Sharma et al, 2005b]). Dans le même contexte, le rapport de l’OMS en 2010 a révélé que les lésions touchent principalement les enfants d’âge préscolaire.

Ces résultats s’expliquent par le fait que le système immunitaire des enfants n’est pas encore bien développé, contrairement aux adultes ayant développé une résistance à la maladie, en raison de leur exposition antérieure au parasite. Cette dernière hypothèse peut se confirmer par l’histoire de la maladie à Forum Jamaà; étant donné que les premiers cas détectés de la LC dans la région remonte à 1990.

En conclusion, la maladie est très significativement répandue dans le groupe d’âge de moins de 9 ans ($p \leq 0,0001$).

3- Perception de la maladie à l’échelle de Foun Jamaà

Le pourcentage des personnes disant connaître la LC il y a moins de deux ans est d’environ 56%. Pour 42,80% l’historique de la maladie ne dépasse pas 3 à 4 ans; cependant, la minorité restante (1,7%, $p \leq 10^{-4}$) atteste connaître la maladie, il y a plus de 5 ans (Figure 23).

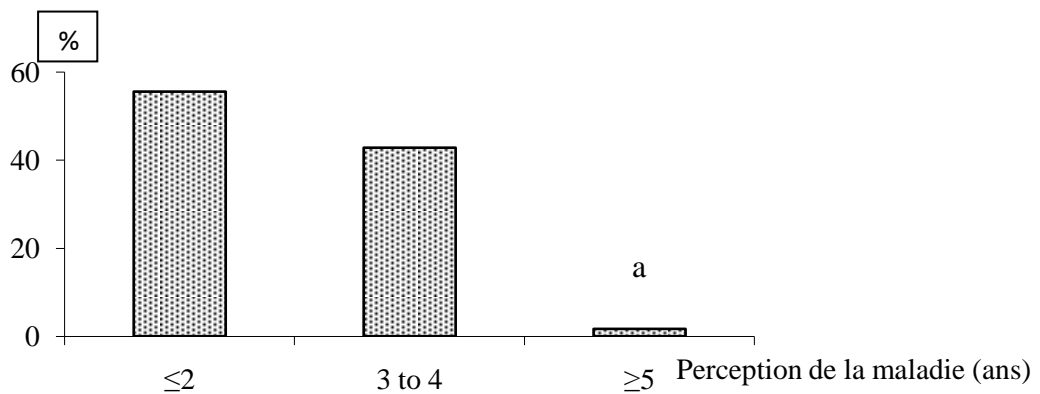


Figure 23 : Répartition des malades selon la perception de la maladie

Les réponses des interrogés sont basées soit sur le fait qu’ils ont déjà été victime de la maladie, soit qu’ils ont déjà vu une personne de leur entourage en souffrir. Les malades et les non malades ignorent les causes réelles de la LC.

V- Paramètres socio-économiques liés à la maladie

1- Vulnérabilité par catégorie socio professionnelle

Dans la région de Foug Jamaà, il n'existe aucune association significative entre la prévalence de la LC et le statut professionnel. Le groupe le plus répandu était celui des personnes de moins de 10 ans et qui ne sont pas encore intégrés dans la vie professionnelle. Comme c'est le cas, on s'est intéressé à la profession des parents : Profession du père et profession de la mère.

De même la profession des pères des malades n'avait pas de relation significative avec les cas positifs: toutes les catégories socio professionnelles rencontrées dans la région sont touchées par la maladie. Le groupe le plus représenté est celui de travaux divers (figure 24). Néanmoins la catégorie des malades dont les mères exercent le travail domestique (femmes de foyers), était très significative (98,5%, figure 25). C'est parce que le nombre de femme au foyer est très important dans la région de Foug Jamaà.

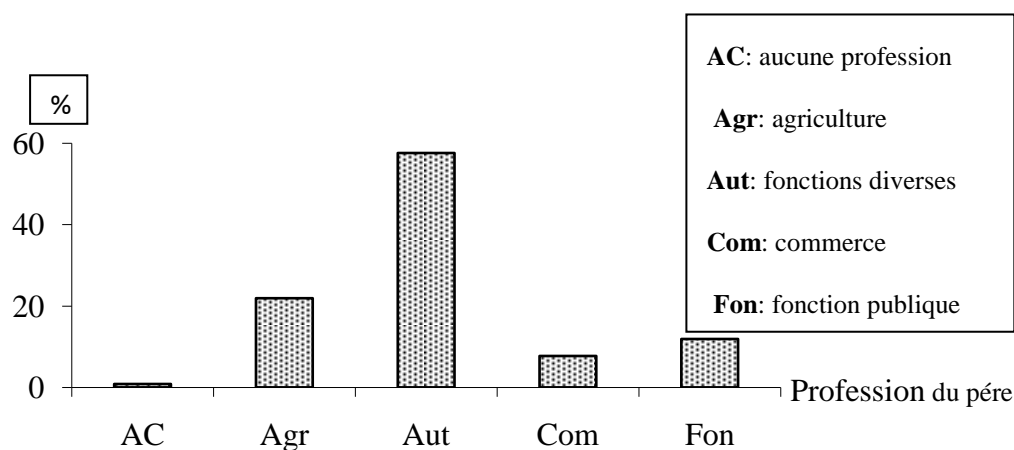


Figure 24: Répartition du nombre total de malades par catégorie professionnelle du père.

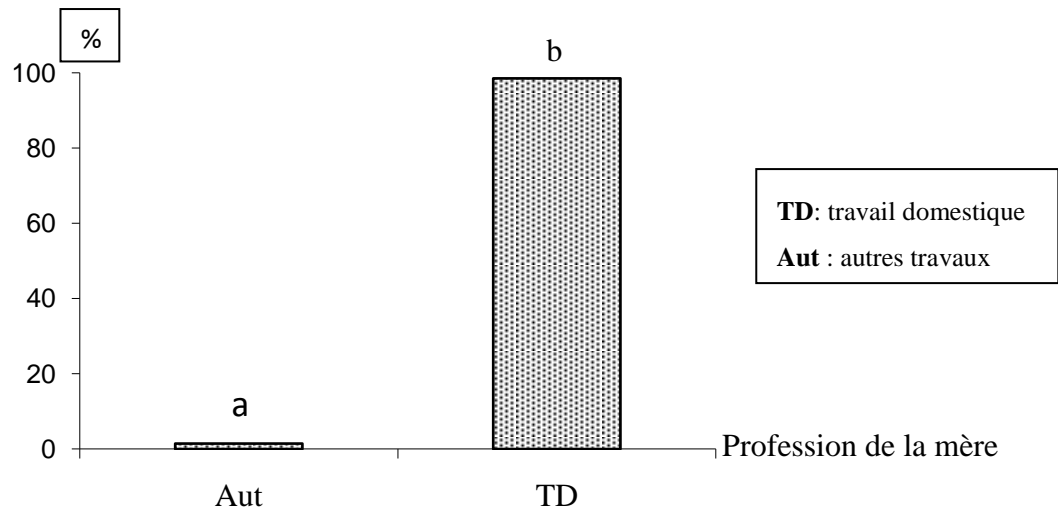


Figure 25: Répartition du nombre total de malades par catégorie professionnelle de la mère.

2- Effet de niveau d’instruction des parents sur la répartition de la maladie

Généralement, l’analphabétisme est largement répandu dans la région de Foug Jamaà, la majorité des parents des malades n’ont aucun niveau scolaire.

Les résultats de l’enquête révèlent que le niveau d’éducation était significativement associé à la prévalence de la LC: les pères de la moitié des malades (43,60%) et les mères de la totalité des malades (86,20%) n’ont jamais fréquenté l’école (figure 26 et 27). Seulement 1,9% et 0,4% des cas positifs, ayant respectivement des pères et des mères qui ont atteint le niveau universitaire.

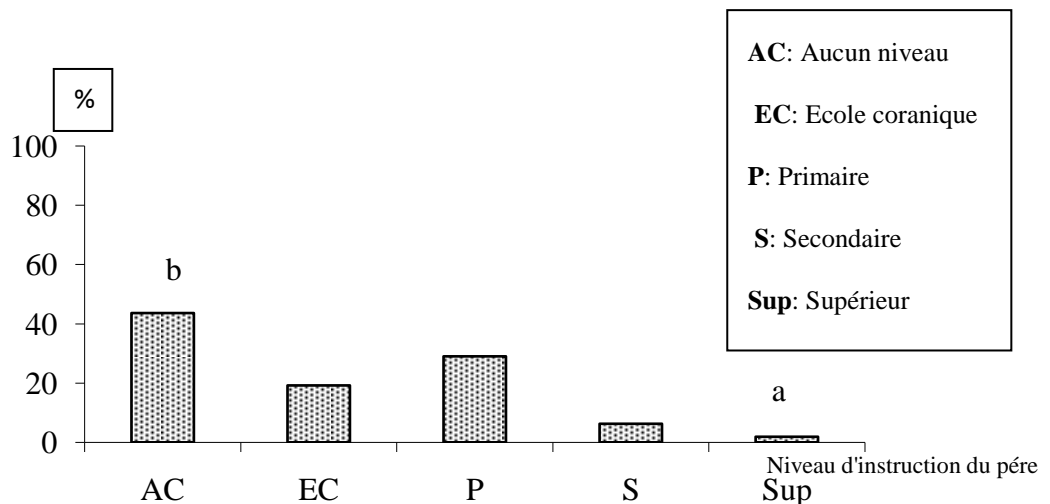


Figure 26: Répartition du nombre total de malades par niveau d’instruction du père.

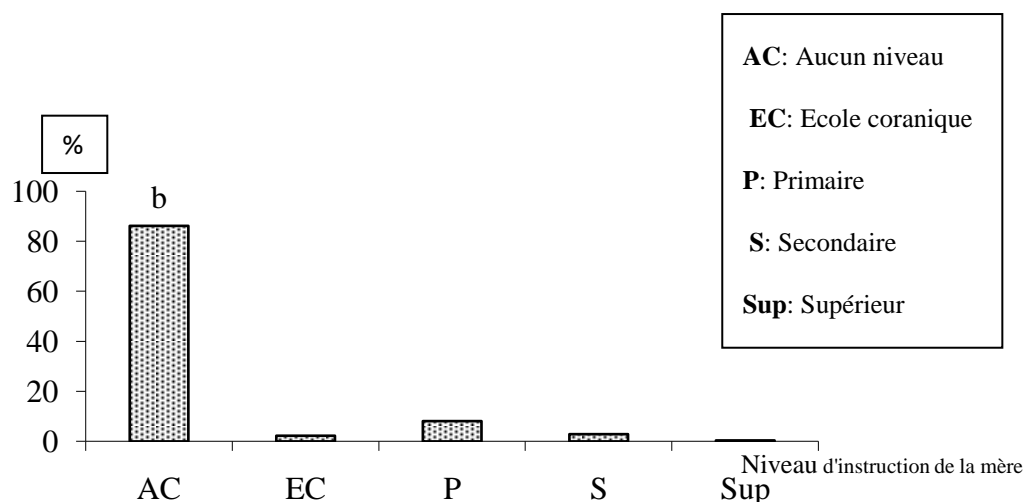


Figure 27: Répartition du nombre total de malades par niveau d'instruction de la mère.

Cet état de fait joue fortement sur la situation sanitaire de la région, car l'école accorde une attention particulière à l'apprentissage des principes élémentaires de l'hygiène environnementale, corporelle et alimentaire.

3- Répartition des malades par rapport au niveau de vie de leurs ménages

Le groupe le plus répandu était celui des personnes moins de 10 ans et qui ne sont pas encore intégrés dans la vie professionnelle. Comme c'est le cas, on s'est intéressé aux au niveau de vie de leur parent.

La majorité des ménages, dont on trouve 97,28% des malades appartient à la catégorie des pauvres.

Généralement, Il y a un lien entre leishmaniose et la pauvreté, car cette maladie frappe «les plus pauvres d'entre les pauvres». Dans les États défavorisés comme l'État du Bihar en Inde, la forme viscérale de la leishmaniose touche des familles qui appartiennent à la couche de population dont le revenu est le plus faible, des gens qui vivent avec moins de 1 US \$ par jour (OMS, 2010).

La pauvreté accroît le risque de la maladie de plusieurs manières. La pauvreté est liée à des facteurs écologiques qui accroissent le risque de maladie par suite de la prolifération des vecteurs ou de la multiplication des contacts entre ces derniers et l'homme (OMS, 2010). De mauvaises conditions de logement et d'hygiène péri-domestique (absence de gestion des déchets, égouts à ciel ouvert) peuvent augmenter le nombre de gîtes larvaires et de lieux de repos pour les phlébotomes, ainsi que leur accès à l'homme. L'entassement d'un grand

nombre de personnes dans un espace limité peut attirer les phlébotomes anthropophiles péridomestiques en constituant une importante biomasse génératrice de repas de sang. Certains cycles de transmission, comme celui de la LV au Brésil, sont désormais concentrés dans les quartiers marginaux des zones périurbaines où le cycle sylvestre peut se rapprocher des habitations humaines (OMS, 2010).

VI- Effet du mode de vie et les caractéristiques du milieu dans la recrudescence de la maladie dans la région.

1- Vulnérabilité par rapport à la durée d'habitation dans la région

Tous les malades sont de nationalité marocaine et la plupart (97,5%, $p \leq 0.0001$) habitent dans la région depuis leur naissance, ce sont des autochtones (figure 28). Ce qui suggère que Foum Jamaà est un foyer endémique.

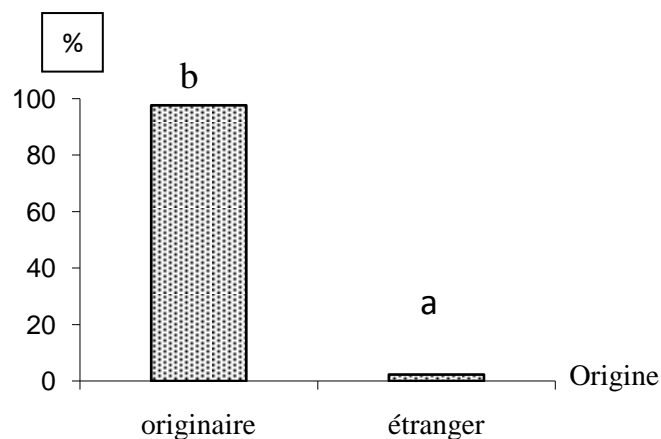


Figure 28: Répartition des malades par rapport à la durée d'habitation dans la région.

2- Risque lié au mode d'éclairage

En général, les insectes notamment les phlébotomes sont attirés par la lumière domestique pendant la nuit, d'où l'un des systèmes de capture qui est la technique des pièges lumineux. L'existence ou l'absence des phlébotomes pendant les différents moments de la journée peut être liée au mode d'éclairage.

Dans notre région d'étude, deux modes d'éclairage sont utilisés avec des pourcentages significativement différents ($p \leq 10^{-4}$).

La majorité des malades (93,5%) vivent dans des maisons utilisant l'électricité comme source de lumière, et seulement 6,50% utilisent les lampes et les bougies (Figure 29).

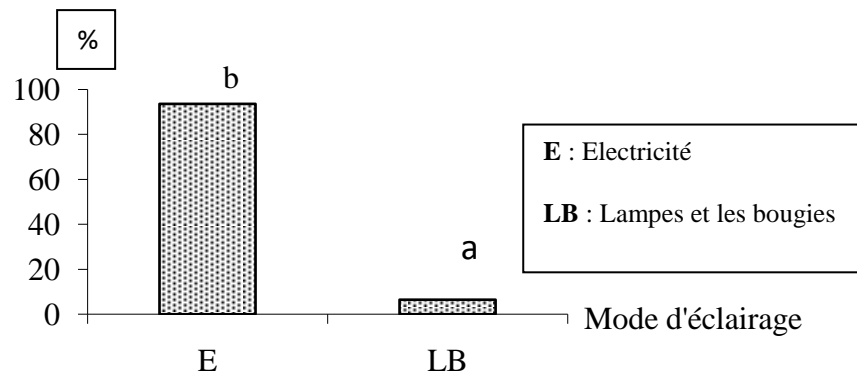


Figure 29: Répartition du nombre total de malades par mode d'éclairage.

Les chambre alimentées en électricité ont plus de lumière intense et sont donc plus attrayantes pour les phlébotomes, par rapport à celles utilisant les lampes et les bougies.

3- Risque lié au mode de gestion des ordures ménagères

Le taux des malades qui vivent dans des ménages abonnés à une filière de collecte est 15.9%. Il n'est que de 0.4% chez ceux qui rejettent les ordures dans les rivières. Cependant la majorité des patients 83,7% vivent dans des foyers qui évacuent leurs ordures dans des décharges sauvages pré du Foyer (fig. 30). Ce pourcentage a été significativement plus élevé ($p \leq 10^{-4}$).

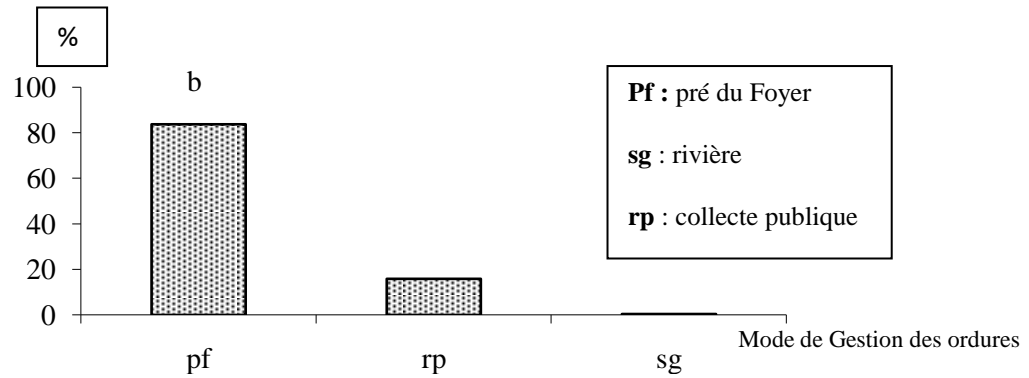


Figure 30: Répartition des malades par mode de gestion des ordures ménagères

Dans les zones d'habitat humain, le fait de ramasser régulièrement les ordures ménagères, les enfouir dans des fosses spéciales et à détruire les terriers avant l'exploitation des terres présente une méthode de lutte efficace contre les gerbilles, réservoirs de la LC à *L.major* (OMS, 2010).

4- Risque lié au mode d'aération

Nous avons distingué trois niveaux d'aération des habitats: bonne (les maisons à toit ouvert), intermédiaire (deux à trois fenêtres) et faible aération (moins de deux fenêtres); le pourcentage des malades sont respectivement 68,5% ; 20,5% et 11,1% (figure 31).

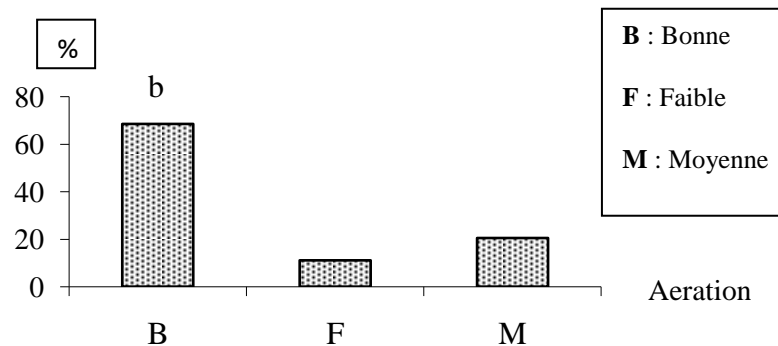


Figure 31 : Pourcentage des malades liés au mode d'aération.

Le nombre d'infection de la LC a été plus important chez les malades qui vivent dans des maisons bien aérées. Statistiquement, la valeur 68,5% était hautement significative ($p \leq 10^{-4}$) par rapport aux autres. L'aération facilite l'entrée et la sortie des moustiques et augmente ainsi le risque des piqûres.

Bien que la bonne aération des maisons augmente le risque de la LC, mais elle évite d'autres maladies causées par les bactéries et les champignons. Parmi les mesures préventives que

nous avons recommandées, l'utilisation des moustiquaires des fenêtres contre les piqûres d'insectes.

5- Vulnérabilité liée au mode d'élevage des animaux

Les gens sont fondamentalement des fermiers, la majorité comptent sur l'élevage des animaux: principalement les moutons, les chèvres, les volailles et quelque fois les bovins.

Les étables et les refuges des animaux sont habituellement construits à l'intérieur, ou à l'extérieur en face de la maison, assez proche pour qu'ils soient gardés attentivement. Selon le mode d'élevage, L'analyse statistique montre que le pourcentage des cas positifs a été significativement le plus faible ($p \leq 10^{-4}$, figure 32) chez les habitants qui gardent leurs animaux à l'extérieur des maisons par rapport au cas où les animaux sont gardés à l'intérieur de l'habitat.

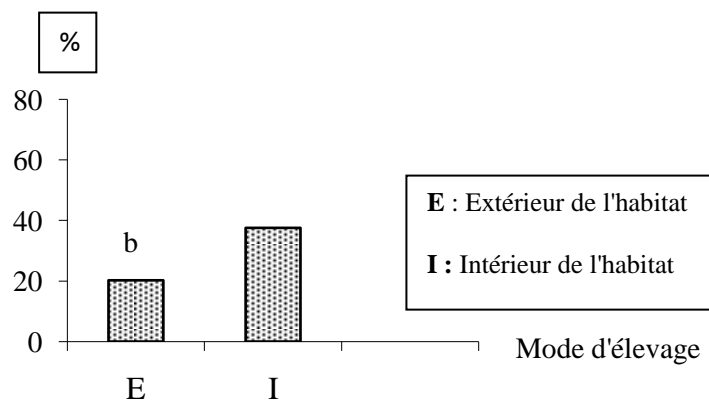


Figure 32 : Pourcentage des malades liés au mode d'élevage des animaux.

6- Risque lié au chien

La région de Foum Jamaà présente le caractère rural dans la plupart de ces localités, surtout aux secteurs (BH) et (T); et donc la plupart des maisons ont au moins un chien. Le déplacement des réservoirs de la maladie (homme, chiens,...) présente une source de propagation de la maladie. Dans la région de Foum Jamaà, le pourcentage des cas positifs était significativement plus élevé (74,1%, $p \leq 10^{-4}$, figure 33) chez les malades abritant des maisons possédant au moins deux chiens.

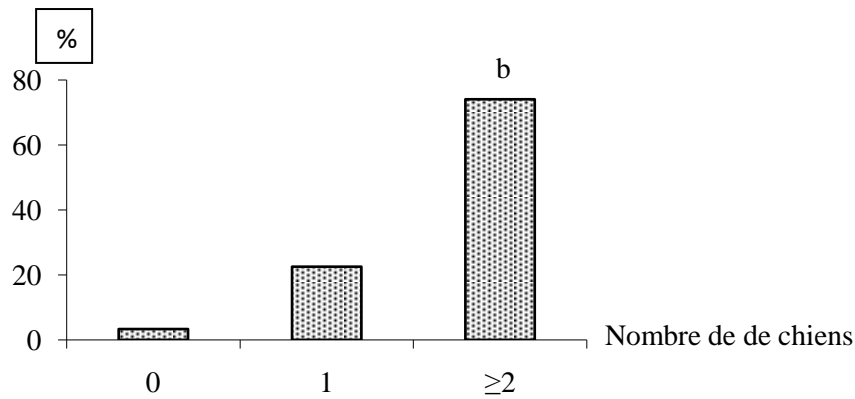


Figure 33: Pourcentage des malades liés au nombre des chiens.

L'étude de Dereure et ses collaborateurs a rapporté une infection cutanée canine due à *L.tropica* en 1991 dans la région de Tanant, à 16 km de Foum Jamaà, ce que laisse penser que probablement les chiens domestiques dans la région peuvent présenter un réservoir de la maladie.

En général, l'élimination des chiens errants ou retournés à l'état sauvage est justifiée pour de nombreuses raisons touchant à la santé, à l'écologie et à la préservation de l'environnement (OMS, 2010).

Conclusion partielle

Le suivi de l'évolution de la maladie durant la période 2006-2009 a montré que tous les secteurs sanitaires de la région sont concernés par la LC; sauf que la majorité des cas ont été enregistrés dans les secteurs (FJ) et (BH). Ceci laisse conclure que ces deux secteurs peuvent présenter des facteurs de vulnérabilité. La tranche d'âge de 0 à 9 ans est la plus touchée. Toutes les catégories socioprofessionnelles et les deux sexes sont concernés par la maladie dans un même degré. Il faut signaler aussi que la majorité des ménages de la région sont des autochtones; ce qui peut classer Foug Jamaà parmi les régions endémiques.

Parmi les facteurs pouvant favoriser la prolifération du phlébotome et donc la propagation de la maladie, l'étude a relevé que les ménages utilisant les décharges sauvages près du foyer comme mode d'évacuation des ordures sont plus atteints par la maladie que les autres.

Partie 2 : Identification de l'agent causal de la maladie dans la région de Foum Jamaà.

L'étude a concerné un nombre total de 119 patients des deux sexes et à différents âge, dans les trois secteurs de la région de Foum Jamaà (Beni hassan (BH), Foum Jamaà (FJ) et Tabia (T)), durant les années 2009 et 2010.

Après une codification des variables, Les données de l'enquête ont été saisies et analysées à l'aide du test de khi ². La répartition des cas positifs en fonction des secteurs (BH: 35.24%; FJ: 31.43 %; T: 33.33 %; p=0.892) et le sexe (Mâle 42.86 %; Femelle 57.14 %; p=0.143) a été non significative. L'âge des patients se situe entre six mois et 70 ans (l'âge médian est de 6,61 ans), le taux de la maladie est très significatif pour la tranche d'âge qui se situe entre 0 et 9 ans (86.67 %; p < 0.05) (Tableau 10). Un grand nombre des patients avaient des lésions faciales (95.89 %) et uniques (67.90 %; p < 0.05).

Tableau 10: Répartition des patients par tranche d'âge à partir des lames positives en 2009 – 2010.

Groupe d'âge (ans)	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	>50	Total
Nombre de cas positif	91	06	02	00	02	04	105

I- Identification du genre

Globalement, parmi des cas suspects, 105 avaient un résultat positif de la LC par examen microscopiques et/ou ITS1- PCR. L'examen microscopique pour 119 cas suspects de la LC a été positif chez 98 patients (82.35%). Le diagnostic par ITS1-PCR a détecté 78 cas positifs parmi 81 patients ayant subi l'analyse moléculaire (96.20%) (Tableau 11). Seul 71 parmi 81 patients avaient des résultats positifs par l'observation microscopique et l'analyse moléculaire. Sept cas négatifs par examen microscopique étaient positifs par ITS1-PCR.

Tableau 11 : Résultats de l'analyse microscopique et moléculaire des lames examinées

Type d'examen	Nombre des lames examinées	Nombre des lames positives	Pourcentage des lames positives
Microscopique et/ou moléculaire	119	105	88.23 %
Microscopique	119	98	82.35 %
Moléculaire	81	78	96.20 %

Le diagnostic moléculaire qui nous a permis l'identification du genre *Leishmania* se base sur l'amplification de la région ITS1. Le résultat positif est traduit par la présence d'une bande de 300 pb correspondant à la région ITS1 amplifiée. Les bandes visualisées sur gel d'agarose correspondant donc au genre *Leishmania* (figure 34).

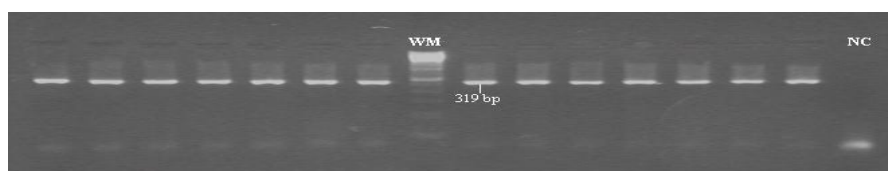


Figure 34: gel d'agarose du produit d'amplification de la PCR ITS1 des lames sélectionnées de Foug Jamaà en 2009-2010. WM: Marqueur de poids moléculaire ; NC: contrôle négatif

II- Identification de l'espèce

Les produits PCR ITS1 ont été ensuite digérés par l'enzyme Hae III. Après leur migration sur gel, tous les échantillons étudiés ont donné deux bandes identiques: une de 185 pb et une autre de 57 pb (figure 35), résultat spécifique pour *L. tropica*, comme décrit précédemment (Schönian et al., 2003). Dans notre étude, tous les échantillons cliniques analysés pour les parasites de *Leishmania* ont été identifiés comme *L. tropica*, l'agent causal de la LC dans la région d'étude.

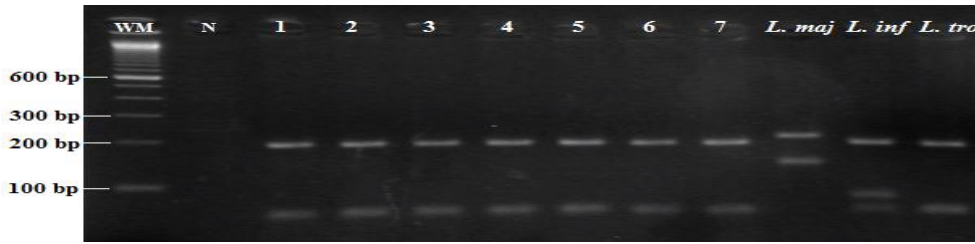


Figure 35: gel d'agarose de la digestion des produits PCR ITS1 par l'enzyme Hae III des lames sélectionnées de Foug Jamaà en 2009-2010. Trois souches de référence utilisées pour la comparaison: *L. inf*= *L. infantum* (MHOM/TN/80/IPT1); *L. maj*= *L. major* (MHOM/SU/73/5ASKH); *L. trop*= *L. tropica* (MHOM/SU/74/K27). WM= marqueur de poids moléculaire. Les autres lignes (1–7) = cas de *L. tropica*

Discussion

L'identification moléculaire de l'espèce de leishmanie responsable des cas de LC dans la région de FJ a été réalisée par la digestion de la région ITS1 amplifiée par PCR (Schönian et al., 2003).

La première étape d'amplification de la région ITS1 qui sert à confirmer la présence du genre *Leishmania* a donné un résultat positif pour toutes les lames provenant des différents secteurs. La PCR ITS1 est une technique qui a également prouvé dans notre étude son efficacité, puisque sept lames déclarées faux négatifs par observation microscopique étaient positives par PCR ITS1. Dans ce contexte, le rapport de l'OMS (2010) note que la recherche de l'ADN parasitaire par la PCR dans le sang offre une sensibilité nettement meilleure que l'examen microscopique.

Par la suite, ces mêmes produits amplifiés ont été digérés par l'enzyme Hae III pour identifier les espèces des leishmanies. Notre étude qui est la première effectuée à Foug Jamaà, a montré qu'il s'agit de *L. tropica*, comme seule espèce existante dans la région, ayant probablement l'homme comme réservoir (Guessous et al., 1997). Foug Jamaà peut être considérée comme foyer ancien et principal de la LC à *L. tropica* dans la province d'Azilal. L'identification des espèces par cette méthode moléculaire présente moins de difficultés et moins de dépenses par rapport à l'étude isoenzymatique. Elle est facilement appliquée dans les zones endémiques, puisqu'elle est capable de détecter et identifier les espèces de *Leishmania* directement à partir des frottis cutanés (Schönian et al., 2003).

La LC affecte les deux sexes dans les différents âges, mais les patients moins de 9 ans sont les plus touchés. Dans la région de Foug Jamaà, les lésions causées par *L. tropica* sont sèches, de petite taille et surtout unique (67,90%), tandis que dans la région de Taza au Nord du Maroc, les patients présentent des lésions graves, de grande taille et sont multiples. Cela pourrait être lié à la virulence du parasite qui est renforcé par l'absence de l'immunité chez les patients de ce nouveau foyer (Guessouss-Idrissi et al., 1997). Les différences observées entre le foyer du Nord et celui du Sud dans les manifestations cliniques et le groupe d'âge touché par *L. tropica*, suggèrent que le parasite était présent à Foug depuis longtemps, mais sa circulation n'était pas importante pour déclencher une épidémie, néanmoins la population autochtone en contact avec le parasite a pu développer une certaine résistance à la maladie

L'origine géographique des parasites est un critère inadéquat dans les zones non endémiques, ainsi que dans les régions d'endémie où de multiples espèces de *Leishmania* peuvent coexister (Rhajaoui, 2009). De même, l'identification des espèces provoquant l'infection, basée sur les symptômes cliniques peut se tromper: d'une part, plusieurs espèces causent à la fois la LV et LC (Schönian et al, 2003; Rhajaoui, 2009), et d'autre part les symptômes peuvent varier et être confondus avec d'autres maladies, ce qui exige un diagnostic pour confirmer l'existence de *Leishmania*.

En outre, il était utile d'identifier le parasite circulant dans la région de Foug Jamaà afin de vérifier si *L. tropica* est le seul agent causal de la LC dans cette région. En effet la caractérisation des espèces de *Leishmania* est importante, car des espèces différentes peuvent exiger des schémas thérapeutiques distincts, d'où la nécessité d'identifier avec certitude l'espèce en question. L'émergence de la LC due à *L. tropica* qui est devenue de plus en plus un problème majeur pour la santé publique est liée à plusieurs facteurs (Rhajaoui, 2009). Les changements écologiques et démographiques sont probablement les plus déterminants (Ashford, 1999). La propagation de la maladie pourrait aussi être facilitée par le processus de l'urbanisation croissante dans les villages, qui sont surpeuplés et favorisent l'apparition des logements insalubres. Le mouvement des réservoirs de la maladie (l'homme, les chiens...) pourraient agir comme un facteur de risque important dans la propagation de la maladie. Ces facteurs auraient pu aussi conduire à l'émergence de la LC dans la région de Foug Jamaà. Notre précédente étude a montré que le taux de la maladie est hautement significatif (74.1%, $p \leq 10^{-4}$) chez les patients qui habitent dans les ménages possédant au moins deux chiens (Arroub et al, 2012a). Donc, on ne peut pas exclure la présence de la LC zoonotique due à *L.*

tropica dans la région. Elle peut co-exister avec celle anthroponosique qui est généralement associée à *L. tropica*. Pratlong et son équipe (1991), étudiant la diversité génétique de *L. tropica* à Tannant (une zone rurale à 16 km de Foug Jamaà) et Smimou, ont trouvé que certaines souches de *L. tropica* se trouvent dans différents versants de la chaîne atlasique. Ils suggèrent alors qu'en absence d'un réservoir animal, la dissémination du parasite est anthropogène. Le cycle épidémiologique est classiquement considéré comme étant anthroponosique, cependant un cas de la LC canine causés par *L. tropica* est signalé à Tanant (Dereure et *al.*, 1991). De même dans d'autres pays à climat aride (cas d'Israël) où le cycle épidémiologique est classiquement considéré comme étant anthroponosique, l'hypothèse d'une zoonose a été suggérée (Jacobson et *al.*, 2003; Schnur et *al.*, 2004).

CHAPITRE IV

LA SURVEILLANCE ENTOMOLOGIQUE DES PHLEBOTOMES

Introduction

Des travaux de biologie fondamentale sont à entreprendre au sujet des vecteurs afin de voir s'il est réaliste de chercher à endiguer la maladie en s'attaquant à ses vecteurs, notamment là où des programmes visant à éliminer ou à juguler la maladie sont en cours (OMS, 2010). Les fluctuations annuelles des populations de vecteurs doivent faire l'objet d'un suivi de longue durée dans des lieux de transmission de la leishmaniose qui soient représentatifs (OMS, 2010). Une espèce suspecte ne pourrait jouer le rôle de vecteur efficace que si elle est suffisamment abondante (Guernaoui, 2006).

Le présent chapitre est réservé à l'inventaire faunistique, présentant les résultats quantitatifs par genre et sous genre des espèces récoltées, en se basant sur l'identification morphologique des phlébotomes, avec un aperçu sur leur intérêt médical; ainsi que la dynamique des populations vectorielles traitant leur distribution spatio-temporelle.

I- Caractérisation morphologique des phlébotomes de la région de Foug Jamaà

Les caractères morphologiques constituent encore le moyen le moins coûteux, le plus utilisé pour distinguer les espèces de phlébotomes. Un grand nombre de mâles, mais pas tous, peuvent être identifiés uniquement d'après leur morphologie, mais il est souvent plus difficile d'identifier les femelles. On est également parvenu à identifier les femelles d'après l'aspect de l'armature de leur atrium génital (OMS, 2010).

1- Phlébotomes du genre *phlebotomus*

a. *Phlebotomus (paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

i. Introduction

Les études de Killick-Kendrick en 1990 ont prouvé que *P. sergenti* est un vecteur de *L. tropica*. Le vecteur en question possède une forte susceptibilité à ce parasite au laboratoire (Killick-Kendrick et al., 1995) et *in natura* (Volf et al., 2002; Svobodova et Votypka 2003). Le vecteur a une vaste aire de répartition dépassant largement celle du parasite (Depaquit et al., 1998). La femelle est décrite au Portugal (França, 1918) après le mâle qui est décrit en Algérie (Parrot, 1917). *P. sergenti* existe dans le Sud et l'Ouest du bassin Méditerranéen. Dans le Nord-Est de la même région, *P. (Paraphlebotomus) similis* tient la place de ce vecteur (Depaquit et al., 2000). Il est mentionné également en quelques stations de la région afro-tropicale, (Abonnenc, 1972).

A l'échelle nationale, le vecteur présente une aire de répartition considérable dans tout le pays (Gaud 1947; Bailly-Choumara et al., 1971; Rioux et al., 1984), avec une large diversité génétique (Yahia et al., 2004). Le rôle du *P. sergenti* dans la transmission de la maladie est prouvé au Maroc (Guilvard et al., 1991).

ii. Critères morphologiques d'identification

L'objectif principal de ce travail est de caractériser les populations de *P. sergenti* de la région de Foug Jamaà en se basant sur des critères morphologiques d'identification. Chez le mâle (Figure 36), le génitalia a un style court et trapu, menu de quatre épines, une terminale et trois autres insérées à des niveaux différents. Le lobe basal du coxite, étroit et court avec des soies courtes; le lobe latéral est plus long que le coxite. Les valves péniennes sont en cône court à extrémité mousse et légèrement recourbée.

La femelle possède des spermathèques avec un corps annelé, portant trois à sept anneaux. Le segment terminal est dilaté. Les conduits sont striés sur toute leur longueur.



Figure 36: Génitalia mâle de *P. sergenti*. (Guernaoui, 2006).

La propagation de la LC à *L. tropica* dans la région de Foug Jamaà est relativement plus facile en tant que la maladie est anthroponose. L'identification du vecteur, ainsi que les mouvements des patients venant des foyers proches (Afourer, Bzou et Marrakech), provoquent largement une épidémie à Foug Jamaà.

b. *P. longicuspis*

i. Morphologie

Dans l'examen morphologique des mâles de *P. longicuspis* nous sommes basés sur l'extrémité du pénis qui a été régulièrement rétrécie avec un nombre de soie sur la coxite soit entre 19 et 21 soit supérieur ou égale 22. *P. longicuspis* présente la morphologie typique de l'espèce.

Pour Les femelles, nous avons examiné la dilatation de la base des conduits des spermathèques. Sur un exemplaire disséqué, un caecum latéral bilobé, s'abouchant largement à la base du conduit.

ii. Répartition géographique

La partie occidentale du bassin Méditerranéen est aussi préférable pour *Phlebotomus longicuspis*. Sa répartition s'étend de la limite Nord du Sahara au Sud de la péninsule ibérique. En 2005, Depaquit et ses collaborateurs ont mentionné pour la première fois des *P. longicuspis* au Sud du Sahara à Ouagadougou.

Au Sud du Maroc, et particulièrement dans la localité de Taghjicht, Ristorcelli (1939) attire l'attention sur la présence de *P. langeroni* var. *longicuspis* pour la première fois. Dans l'enchaînement, Gaud et Laurent (1952) signalent à Rabat la présence de *P. longicuspis* associé à *P. perniciosus*, mais tous les deux en petit nombre. Par la suite, les travaux de Bailly-Choumara et al (1971) ont mis en évidence l'existence de *P. longicuspis* réparti dans les différents étages bioclimatiques (humide, semi-aride, aride et saharien), ainsi que dans la totalité des régions géographiques (Rif, plaines et collines Nord-Atlantiques, plateau central, plaines et plateaux moyen-Atlantiques, plaines moyennes intérieures, Moyen-Atlas, Haut-Atlas, Anti-Atlas, Maroc Oriental, Sud Atlantique et Sud intérieur). Lors de ces captures, *P. longicuspis* n'est jamais signalé comme associé à *P. perniciosus*.

Les travaux de Rioux et son équipe en 1984 ont révélé que *P. longicuspis* préfère l'étage sub-humide à semi-aride. Le facteur altitude est déterminant pour le nombre de l'espèce; selon l'étude réalisée en 2006b par Guernaoui et ses collaborateurs sur les phlébotomes de l'Atlas marocain, *P. longicuspis* vit préférentiellement entre 600 et 800 m d'altitude.

c. *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* Scopoli, 1786

i. Introduction

A cause de sa fréquence et de son importance, il reste parmi les espèces les plus étudiées (Lewis, 1982). Perfiliev (1928) a effectué des études plus complètes sur l'anatomie de l'adulte et de la larve du premier stade.

Après confirmation de *P. papatasi*, vecteur de *L. major* par Killick-Kendrick (1990), l'isolement et le typage du parasite chez ce vecteur a confirmé son rôle épidémiologique dans plusieurs pays: en Arabie Saoudite (Killick-Kendrick et al., 1985), en Tunisie (Ben Ismail et al., 1987) et en Iran (Yaghoobi-Ershadi et al., 1995).

Au Maroc, *P. papatasi* est présente dans tout le pays où elle compte parmi les espèces les plus abondantes (Bailly-Choumara et al., 1971; Rioux et al., 1984; Rioux et al., 1997).

Son rôle vecteur est confirmé (Rioux et *al.*, 1986b). A signaler que L'espèce est décrite pour la première fois au royaume par Delanoë(1916).

ii. Critères morphologiques d'identification

Chez le mâle, le génitalia est bien développé. Le style, long et grêle, porte cinq épines trapues; trois apicales et deux sub-terminales. Le coxite, présente à sa base un petit lobe garni de quelques soies courtes et dans sa partie subterminale une douzaine de soies longues bien différenciées. Le paramère est trilobé. Il comporte :

- un lobe ventral court portant à son extrémité distale une petite épine,
- un lobe médian, digitiforme, plus court que le lobe ventral,
- un lobe dorsal, le plus long, nettement arqué et hérissé de soies sur sa concavité,
- un lobe latéral porte à son extrémité distale deux épines spatulées.

Chez la femelle, les corps des spermathèques sont annelés, sans col, possédant six à dix annulations dont la dernière est de même taille que les précédentes. Le pharynx de *P. papatasi* femelle est orné de denticules larges sur les bords et plus petits au milieu. Le pharynx postérieur est menu d'une plage de dents écailleuses irrégulières dans leur forme et leur implantation. En 2006 Guernaoui a signalé des malformations portant sur les épines insérées sur les lobes latéraux des mâles à partir des exemplaires collectés dans le Sud-Ouest marocain: une ou deux épines surnuméraires, ou une seule épine, sur un ou sur les deux lobes latéraux. Dedet et son équipe (1984) ont mentionné les mêmes malformations en Algérie, ainsi que Adhami (1991) en Albanie. Un examen réalisé en Egypte par Kassem et ses collaborateurs (1988) a montré que 30% des adultes mâles de *P. papatasi*, présentent des génitalia anormaux.

d. *Phlebotomus perniciosus*

i. Morphologie

Les femelles de *P. perniciosus* ont été identifiées morphologiquement en examinant la dilatation de la base des conduits des spermathèques. Un caecum à paroi très épaisse et à lumière droite, en dérivation à la base du conduit de la spermathèque; limite antérieure de l'armature pharygienne imprécise.

Pour les mâles, nous avons examiné la forme des valves péniennes (Figure 37) et nous avons compté le nombre de soies sur le coxite. Nous avons caractérisé *P. perniciosus* par des

valves bifurquées ou par des valves à pointe unique et courbée à l'apex dont le nombre de soie sur la coxite est inférieur ou égal à 18. Contrairement à *P. longicuspis*, on peut dire que *P. perniciosus*, présente une morphologie atypique de l'espèce.

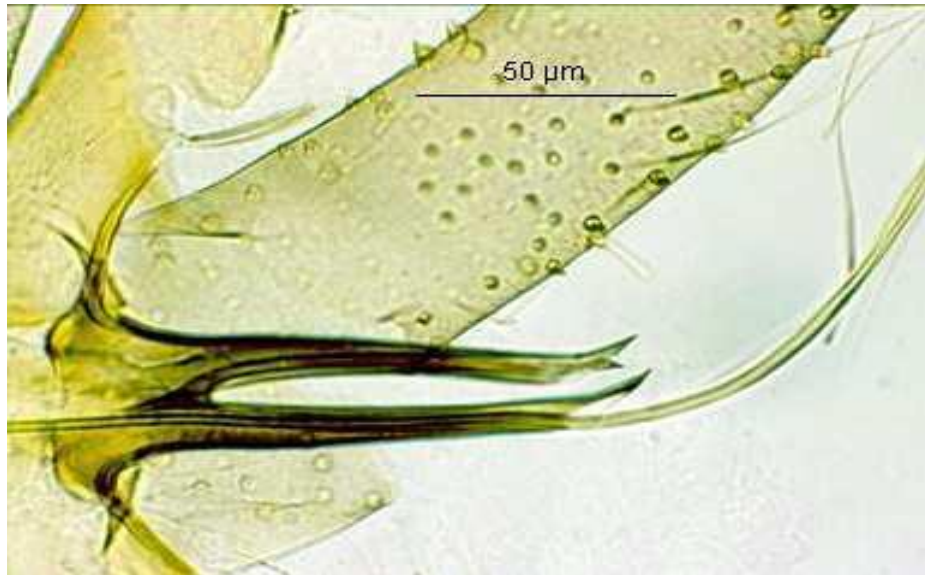


Figure 37 : Valves copulatrices d'un mâle de *P. perniciosus* (Boussaa, 2008)

ii. Répartition géographique

La partie occidentale du bassin Méditerranéen est préférable pour *Phlebotomus perniciosus*. La zone de répartition de l'espèce s'étend du Maghreb à la France et la Croatie. Au Maroc, l'existence de *P. perniciosus* est décrite en 1952 par Gaud et Laurent dans les alentours de Rabat. Les recherches ont continué avec Bailly-Choumara et son équipe (1971) entre 1965 et 1970 qui ont récolté *P. perniciosus* dans diverses régions naturelles: plaines et collines Nord-Atlantique (Rabat), plateau central, plaines moyennes intérieures, Haut-Atlas (Tizi-n-Test), Anti-Atlas (Tafraout) et Maroc Oriental. La quasi totalité des sites sont focalisées dans les étages semi-arides et au Nord du Maroc. Les trois stations trouvées plus au Sud sont en altitude: Itzer (1650 m), Tafraout (1050 m) et Tizi-n-Test (2100 m). *P. perniciosus* a toujours été capturé en petit nombre, non associé aux autres espèces. La rareté des captures de *P. perniciosus* a été signalée par Rioux et ses collaborateurs en 1973 et 1975; ce qui peut justifier l'inexistence de la LV dans ces régions. Les travaux de Rioux et son équipe en 1984 ont révélé que l'espèce s'adapte à une aire bioclimatique bien définie. Ainsi, *P. perniciosus* se localise dans les étages subhumides. Le facteur altitude semble avoir aussi un effet sur le nombre de l'espèce. Elle se trouve majoritairement entre 1000 et 1200 m.

e. *Phlebotomus chabaudi*

Elle est répandue dans toute l'Afrique du Nord. L'espèce a été signalée au Maroc (Rioux et *al.*, 1975), après sa découverte en Tunisie (Croset et *al.*, 1970). Elle se localise souvent dans les biotopes rocheux à l'orifice de cavités et d'anfractuosités creusées dans des falaises rocheuses. *Phlebotomus chabaudi* évolue dans les écosystèmes où interviennent à la fois des rongeurs et des animaux à sang froid (Dedet, 1984).

Dans notre étude sur le terrain, elle est très rare: un seul individu durant toute la collecte d'une année. Les préférences trophiques de cette espèce ne sont pas connues, pas plus que son rôle pathogène éventuel. Les principaux critères d'identification morphologiques selon la clé d'identification du ministère de santé se résument ainsi :

Chez le male le style possède quatre épines et l'apex du pénis est effilé en forme de dogue. Pour la femelle, le réservoir présente plus de trois segments. Le dernier segment de la spermathèque est en forme d'entonnoir, relié au précédent par un pédoncule long et grêle.

2- Phlébotomes du genre *Sergentomyia*

a. Introduction

Se nourrissant généralement sur les reptiles, les phlébotomes du genre *Sergentomyia* sont connus depuis longtemps. Dans l'ancien monde, ces vecteurs sont responsables de la transmission de *Sauroleishmania*, Trypanosomatidés de reptiles. D'après Lane en 1993, Ils ne présentent pas alors une menace épidémiologique pour l'homme, bien que certaines espèces puissent se nourrir sur l'homme (Hoogstraal et *al.*, 1962). Plusieurs virus ont été isolés chez des phlébotomes du genre *Sergentomyia* comme le virus Saboya (Ba et *al.*, 1999) et les virus ArD 95737 et ArD111740 (Charrel et *al.*, 2006).

De nombreuses espèces et sous-espèces de *Sergentomyia* ont été signalées. Benabdennbi et collaborateurs notent en 1996 que le statut comme le regroupement de ces espèces et sous espèces en sous-genres et groupes restent source de controverse.

Neuf espèces du genre *Sergentomyia* sont décrites au Maroc selon le ministère de la santé publique (MS, 1997).

L'étude des espèces du genre *Sergentomyia* et les autres espèces de Fom Jamaà a l'objectif d'établir l'inventaire des espèces et de comparer leurs répartitions entre les secteurs et les biotopes de la région.

b. Critères d'identifications du genre *Sergentomyia* et de l'espèce *S. minuta*

En 1991, Artemiev décrit jusqu'à 12 sous-genres appartenant au genre *Sergentomyia*. Les caractères morphologiques de la diagnose de ce genre sont: soies des segments 2-6 abdominaux inclinées; ascoïdes des segments antennaires simples chez les mâles et pairs chez les femelles; un cibarium armé et d'une plage pigmentée. L'appareil génital mâle est formé d'un style avec quatre épines terminales et une courte soie ventrale. Les lobes latéraux sont inermes. L'appareil génital femelle interne est composé de deux spermathèques non segmentées dont les conduits sont partiellement réunis.

Les spécimens de *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani, 1843, du Nord et du Sud marocain se caractérisent selon le sexe.

Le mâle se distingue par un style court et trapu avec quatre épines terminales groupées et une soie non caduque insérée au niveau du tiers apical. Les valves, arrondies à l'apex péniennes sont épaisses et digitiformes.

Chez la femelle, les spermathèques sont lisses, sans réservoir différencié. Le pharynx est menu de très fins denticules acérés. L'armature cibariale est très développée.

II- Ecologie des phlébotomes dans la région de Foug Jamaà

Dans la partie réservée à l'écologie des vecteurs de la région d'étude, on discutera l'impact des facteurs mésologiques sur l'abondance et la distribution des phlébotomes, après avoir présenté les résultats quantitatifs. A noter que l'enquête entomologique a été menée durant l'année 2010 au secteur de Foug Jamaà (FJ) et dans deux sous secteur de Bni hssane (BH) : BH1 et BH2. Les coordonnées des stations sont :

FJ: (31° 57' 43 N, 6° 59' 13 W; 810 m)

BH1: (32° 03' 41 N, 6° 54' 47 W; 625 m)

BH 2: (32° 00' 08 N, 6° 59' 16 W; 729 m).

1- Sex-ratio

Les résultats globaux de la collection (tableau 12) montrent clairement, que pour toutes les espèces, le sex-ratio est en faveur des mâles avec un taux de 3 : 1 (886 mâles/266 femelles). Il varie en fonction de l'espèce concernée, mais généralement, le nombre des mâles collectés a été plus important par rapport à celui des femelles pour toutes les espèces.

Tableau 12. Effectif et abondance relatifs aux phlébotomes collectés.

Espèces	Mâle	Femelle	Total	%
<i>P. papatasi</i>	51	24	75	7
<i>P. sergenti</i>	486	176	662	57
<i>P. longicuspis</i>	229	31	260	23
<i>P. perniciosus</i>	48	1	49	4
<i>S. minuta</i>	71	34	105	9
<i>P. chabaudi</i>	1	0	1	0
Total	886	266	1152	100

2- Effectif et abondance relatifs aux espèces capturées

L'inventaire de la faune phlébotomienne dans la région de Foug Jamaà durant l'année 2010 (Arroub et al., 2012b) a révélé l'existence de deux vecteurs prouvés de la LC:

Phlebotomus (Paraphlebotmus) sergenti vecteur de *L. tropica* et *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* vecteur de *Leishmania major*. En plus de ces deux espèces, on a noté la présence de *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis*, *P. (Para.) chabaudi* Croset, et *P. (L.) perniciosus* Newstead. Seule une espèce du genre *Sergentomyia* a été capturée : *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta*.

La collecte a permis de capturer 1152 spécimens à l'aide de 2442 pièges adhésifs. Le tableau 15 résume l'effectif et l'abondance relatifs par espèce. Le genre *Phlebotomus*, contenant les vecteurs prouvés et suspectés des leishmanioses dans l'ancien monde, présente plus que 80% des collectes. De façon générale, *P. sergenti* semble être l'espèce vectrice majeure. Elle constitue 57% des espèces inventoriées, suivi par *P. longicuspis* (23%), *P. papatasi* (7%) et *P. perniciosus* (4%). Le genre *Sergentomyia* qui est représenté par 105 spécimens, est représenté par une seule espèce : *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* Rondani; collectée avec une faible densité (9 % des phlébotomes capturés). A signaler que l'abondance relative des espèces varie de façon importante en fonction du biotope et la période de piégeage.

3- Fréquence et répartition des espèces dans la région d'étude

La distribution et la fréquence des espèces dans les secteurs prospectés (tableau 13, figure 38), montre que BH2 présente le nombre le plus élevé des espèces capturées 677 (59%), suivi de BH1 avec 365 (32%). Le nombre le plus faible 110 (10%) des phlébotomes inventoriés est enregistré au secteur de FJ. Cela est pour toutes les espèces sauf *S. minuta*, qui présente un nombre supérieur en BH1 que BH2; tandis qu'elle est absente au secteur de FJ dans cette collection.

Tableau 13. La distribution spatiale des phlébotomes collectés et leurs diversités dans la région de Foug Jamâa.

Secteurs	Pièges récupérés			Phlébotomes collectés			NS/NP	Indice de Shannon	
	NP	%	Moyenne*	NS	%	Moyenne**		Moyenne	SE
FJ	1129	46	5,48a	110	10	0,51a	0,10	0,16	0,06
BH1	642	26	5,58a	365	32	3,15b	0,57	0,33	0,07
BH2	671	27	5,89a	677	59	5,94c	1,01	0,41	0,10
Total	2442	100	5.61	1152	100	2.63	0,47	0,30	0,05

NP: Nombre de pièges; NS: Nombre de phlébotomes; pour chaque colonne, les différentes lettres a, b et c indiquent que les moyennes sont significativement différentes.*p=0.06; **p≤0.01.

La comparaison entre les secteurs en nombre de phlébotomes capturés, doit tenir compte du nombre de pièges récupérés dans chaque secteur.

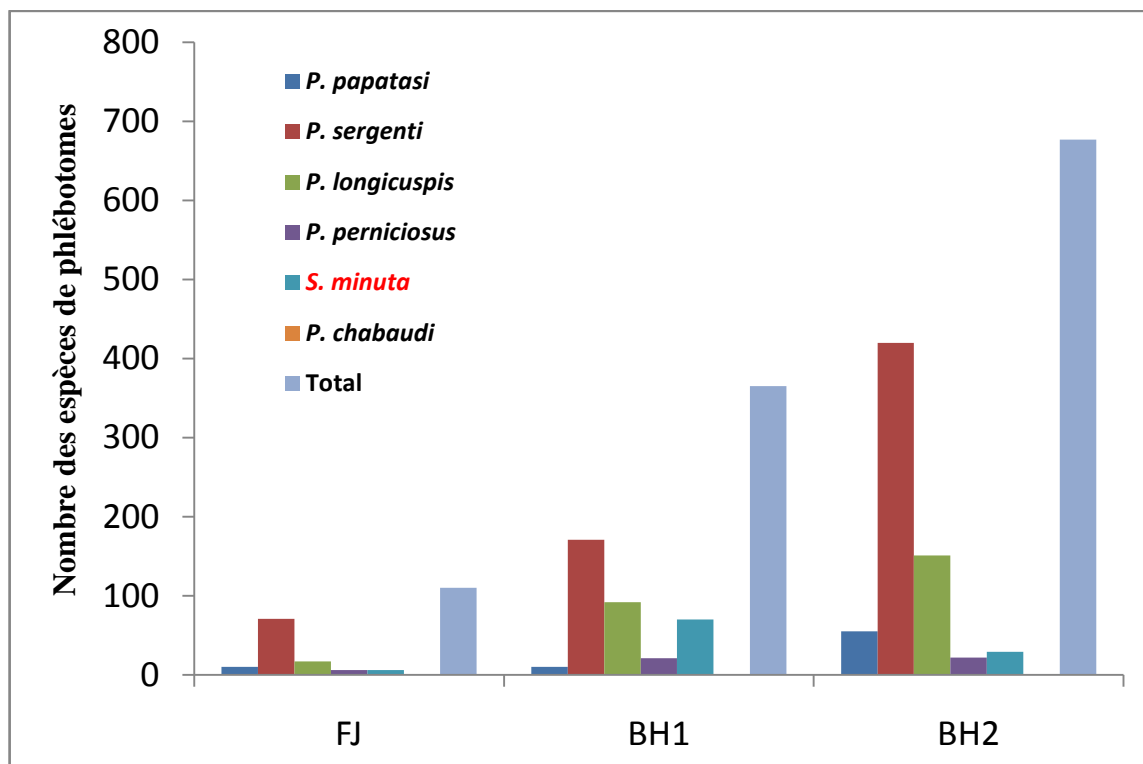


Figure 38: Distribution des phlébotomes dans les secteurs de Foug Jamâa.

L'analyse des résultats montre que le nombre moyen des pièges n'est pas significatif entre les secteurs prospectés. Pour capturer un phlébotome, il faut un nombre de piège de 10-2-1 respectivement pour FJ-BH1-BH2.

Généralement il n'y a pas de relation étroite entre secteur et espèce, sauf pour *P.chabaudi*, présent avec un seul individu au BH1. Les espèces capturées sont alors constantes, présentes dans tous les secteurs. L'indice de shannon tenant compte à la fois l'abondance et la richesse en espèces indique la plus grande diversité au niveau du BH2.

Afin de déterminer les périodes à risque des vecteurs dans la région de Foug Jamàa, nous avons procédé à un suivi de la fluctuation saisonnière des phlébotomes durant une année d'étude, du mois Janvier au mois décembre 2010. La densité mensuelle est présentée dans la figure 39.

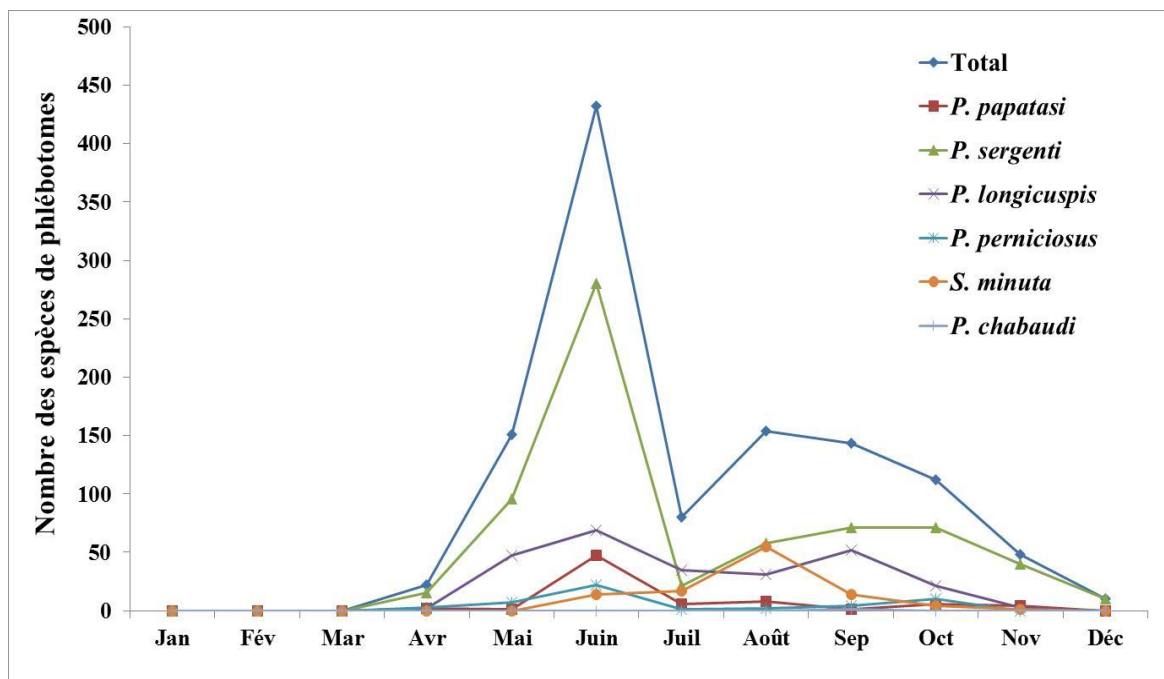


Figure 39: Distribution mensuelle des espèces à Foug Jamaà durant l'année 2010.

Le test ANOVA montre que la répartition des pièges durant les douze mois de surveillance est non significative ($P=0,08$). La fluctuation temporaire des phlébotomes est en relation avec la saisonnalité. Globalement, la grande activité des vecteurs est notée durant deux périodes: la première commence fin Mars avec un pic au mois de Juin, pour toutes les espèces, sauf pour *S. minuta* qui atteint le pic en Juillet, le moment où le nombre des autres espèces arrive au minimum. La deuxième période d'activité est signalée durant Août-Octobre-

Novembre selon les espèces. La chute totale de l'activité est marquée vers la fin du mois de Novembre. Nous avons noté l'absence totale des phlébotomes pendant la période Décembre - Mars.

Pour comprendre cette répartition, nous avons collecté tout au long de l'année d'étude les données climatiques (températures et précipitations) relatives à chaque mois (figure 40). La température maximale moyenne dans la région d'étude est en environ 29 °C durant le mois de Juillet, celle minimale moyenne est environ 10 °C signalée au mois de Décembre. Les précipitations sont relativement faibles avec deux pics: le premier est noté en Automne avec 70 mm au mois d'Octobre; l'autre en hivers au mois de Janvier avec 123 mm environ.

Les facteurs du milieu, notamment les facteurs climatiques jouent un rôle déterminant dans l'activité des phlébotomes. C'est ainsi que l'activité importante coïncide bien avec la période sèche, dont la température oscille entre 20 et 29°C, alors que la pluviométrie est presque nulle. Les mois les plus humides de la période sèche (Mai-Juin) sont caractérisés par des pics de la densité. La richesse spécifique est maximale au mois de Juin où la température journalière varie de 15 à 28°C et presque pas de précipitation. En général, la température peut être une barrière limitant pour les phlébotomes dans la région. Dans notre étude, une corrélation de la densité de *P. sergenti* et les variations de température montre que la température optimale pour l'activité de cette espèce dans cette région est entre 20 et 26°C. Cependant, l'activité diminue avec la diminution de la température (au dessous de 14°C) ainsi qu'avec une température élevée (au dessus de 30°C).

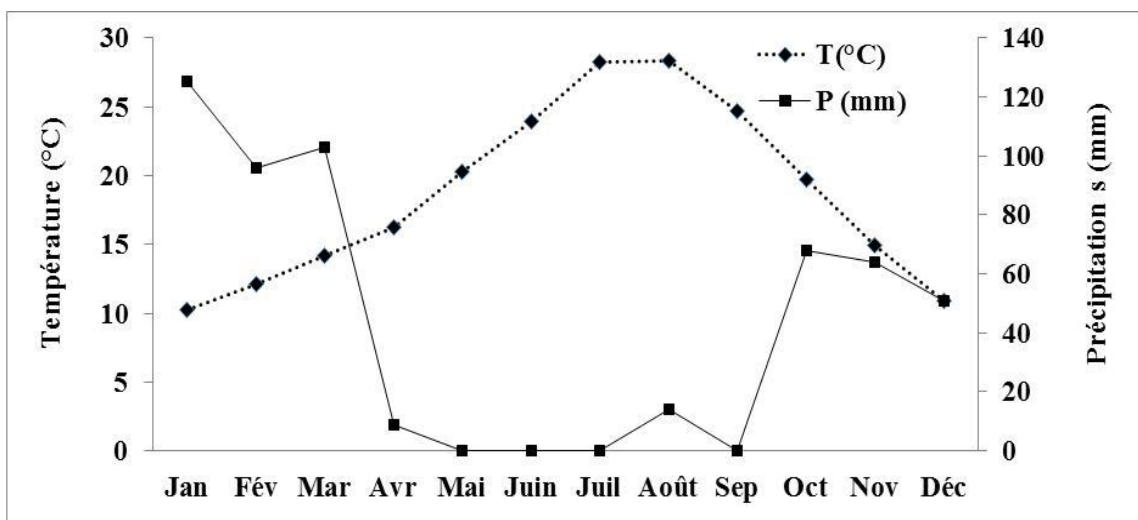


Figure 40: les moyennes mensuelles des températures T (°C) et les précipitations P (mm) durant l'année 2010 dans la région de Foug Jamaà.

4- Association des espèces à différents biotopes

L'abondance relative des différentes espèces a été comparée entre les milieux domestiques (intérieur des habitations humaines), péri-domestique (au voisinage des maisons, dans les étables et les poulaillers) et extradomestique (site loin des habitations humaines). La répartition des phlébotomes est illustrée dans la figure 41. Le nombre le plus élevé des phlébotomes capturés est noté au niveau de l'étable avec 648 individus (56%) suivi par des maisons, caves et étable-poulaillers, avec environ 14 jusqu'à 10% pour chaque biotope. Les biotopes fenêtre, pont, maison en ruine et poulailler marquent le minimum des espèces collectées (< 25 individus), environ 2% pour chaque biotope. Cette distribution est valable pour toutes les espèces, sauf *S. minuta* qui préfère la cave qu'à l'étable et à la maison. Le facteur biotope influence la distribution spatiale des phlébotomes.

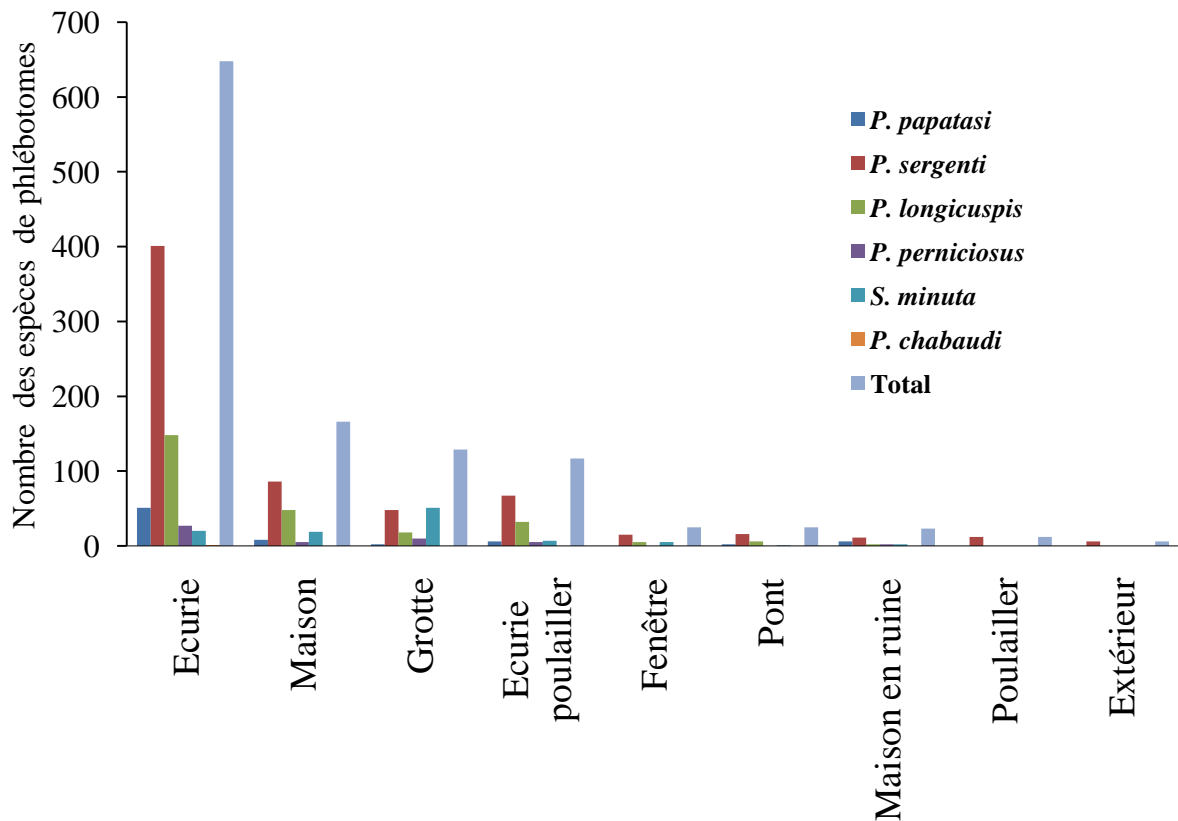


Figure 41: la distribution des espèces dans les différents biotopes durant l'année 2010.

La figure 42 explique que la maison est plus attractive pour les phlébotomes, ce biotope peut atteindre deux fois ce qui est capturé dans un autre biotope (test student's t tests, $p=0,0013$). L'étable, cave et étable-poulailler viennent après la maison en deuxième position.

Les autres biotopes (fenêtre, pont, maison en ruine, poulailler et l'extérieur de maison) ont enregistré la plus faible valeur en nombre de phlébotomes capturés.

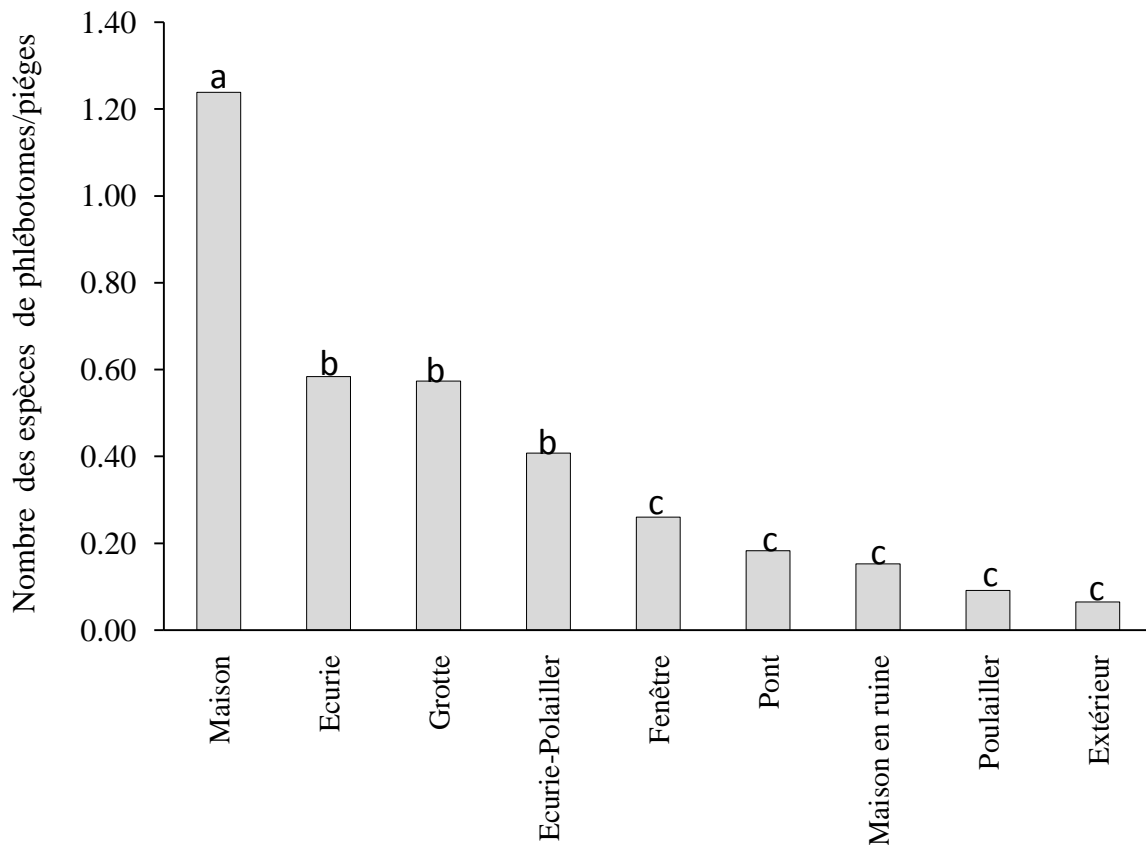


Figure 42: nombre de phlébotomes collectés par pièges installés dans les différents biotopes de la région durant l'année 2010.

Discussion

Il s'agit de la première étude traitant la composition taxonomique et la répartition spatio-temporelle des phlébotomes dans la région de Foug Jamàa (Azilal).

L'incidence et la répartition de la LC sont liées à l'activité humaine et les variations de l'environnement ayant une influence directe sur le vecteur et le réservoir de la maladie.

Le manque des données concernant la surveillance entomologique dans la région, ne permet pas de mettre en place une stratégie contre le vecteur.

La surveillance entomologique a révélé l'existence de six espèces de phlébotomes à Foum Jamàa.

Les altitudes des secteurs désignés par la prospection dans la région varient de 652 à 810 m. Il est probable que toutes les espèces collectées existent dans cet intervalle de hauteur. Ce qui concorde avec les travaux de Guernaoui et ses collaborateurs (2006b), qui ont trouvé que la richesse et la diversité des espèces étaient plus élevées au niveau 800 m environ. Du point de vue abondance, *P. sergenti* présente 57% des espèces récoltées. Ce vecteur est responsable de la LC anthroponotique dans l'ancien monde (Killick-Kendrick 1990, Schnur et al. 2004). D'après Yahia et son équipe (2004), la zone est connue par une grande diversité génétique de cette espèce. Bien que d'autres espèces peuvent jouer le même rôle, *P. sergenti* est connu responsable de la LC à *L. tropica* au Maroc (Al-Zahrani et al. 1988; Svobodova et al. 2006). L'homme reste le réservoir de la maladie (Guilvard et al. 1991). En deuxième position vient *P. longicuspis* avec un taux de 23% des vecteurs capturés. Parmi les phlébotomes collectés, *P. papatasi* est connu par sa large répartition dans le monde (Lewis and Ward 1987). Cette espèce cause la LC due à *L. major* (Killick-Kendrick, 1990). De même *P. chabaudi* est suspect dans la transmission de *L. tropica* (Bounamous et al. 2008).

Plusieurs types de pièges de collecte des phlébotomes ont été décrits (Vieira et al. 1999, Casanova 2001). Certains sont adaptés à des objectifs précis.

Les pièges adhésifs sont considérés parmi les moyens de capture de phlébotomes, présentant moins de risque aux collecteurs d'être affecté de la LC. Cependant, ils ont de faibles prises (Hogsette et al. 2008). Foum Jamàa pourrait avoir donc une densité supérieure à celle récoltée dans notre étude. Maroli et ses collaborateurs (2009) ont utilisé différents pièges, avant de se baser sur les données des pièges adhésifs pour discuter l'activité saisonnière des phlébotomes. Dans notre étude, la technique des pièges adhésifs a collecté un nombre des mâles supérieur à celui des femelles; ce qui concorde avec d'autres études utilisant le même type de piège (Boussaa et al. 2007). Dans le même contexte, Feliciangeli et son équipe (2006) ont trouvé un nombre double des mâles par rapport à celui des femelles. Kravchenko et ses collaborateurs ont capturé un taux de 79% des mâles en utilisant CDC lumineux. Müller et Schlein (2011) ayant utilisé des pièges lumineux n'ont pas trouvé de différence significative entre le nombre de mâles et celui de femelles. D'autres études ont collecté un nombre élevé des femelles par rapport à celui des mâles (Kline et al. 2011; Junnila et al. 2011). Notre résultat peut s'expliquer par le type des pièges, que par la disportion de sexe ratio naturel des espèces, dans la région de Foum Jamàa.

Les mâles sont moins dispersés que les femelles (Yuval et *al.* 1988), étant donné que les femelles cherchent le repas sanguin pour la maturation des œufs (Killick-Kendrick 1999). Les phlébotomes ont en général un vol très limité, restant ainsi autour de leurs sites de reproduction (Killick-Kendrick 1990). Par conséquent, le nombre élevé de mâles collectés prouve la présence des sites de reproduction des phlébotomes autour des habitations humaines, où la récolte des femelles est souhaitable, pour contrôler le vecteur de la maladie.

Foum Jamàa présente une grande biodiversité, avec six espèces appartenant à la liste des 22 vecteurs identifiés au Maroc (MS, 1997). Tenant compte du nombre des espèces et leurs fréquence, l'indice de shannon donne une idée significative sur la diversité dans chaque secteur; ce qui a révélé clairement, une grande diversité en termes d'abondance et de richesse au niveau de BH2. Du fait que généralement, la diversité diminue en allant des sites d'origines aux sites colonisés, le sous secteur BH2 peut être le réservoir de la population source. Par conséquent, les actions préventives du programme national du ministère de la santé doivent en tenir compte. A l'exception de *P. papatasi* qui présente une activité monophasique, l'analyse des résultats par espèce laisse conclure que toutes les espèces montrent une activité biphasique, avec deux pics : un au mois de Juin et le deuxième vers la fin d'Aout. Ce profil bimodal semble être le même dans d'autres études faites au sein des autres régions du monde: en Syrie pour *P.sergenti* et *P.papatasi* (Maroli et *al* 2009); Au Maroc pour *P.papatasi*, *S.minuta* et *S.falax* (Boussaa et *al.* 2005).

Nous avons noté une absence totale des phlébotomes durant la période Janvier-Mars et Décembre, cela pourrait être expliqué par les conditions sévères régnant dans la région pendant cette période. L'été de 2010 était très chaud dans l'ensemble du territoire national; ce qui peut justifier la faible densité des phlébotomes collectés durant cette phase de temps à Foum Jamàa. Dans ce sens, Galvez et son équipe (2010) ont signalé que les mois dont la température est maximale, mentionne la faible densité des phlébotomes. D'après Kuhn (1999), la température est parmi les facteurs déterminants pour la propagation de la maladie dans le Nord de l'Europe.

Une interprétation générale des résultats révèle deux périodes annuelles à haut risque leishmanien à Foum Jamàa: Avril-Mai-juin et Aout- Septembre-Octobre. Ces deux périodes sont caractérisées par une densité totale élevée qui peut arriver jusqu'à 450 spécimens au mois de Juin et 150 spécimens au mois d'Aout. Durant cette enquête entomologique, nous avons constaté que *P. sergenti* prédomine toutes les collectes, avec une activité continue sur toute l'année sauf la période qui s'étale du mois Janvier au mois de Mars. L'espèce montre deux

pics de densité correspondant bien aux deux pics de densité totale, le premier pic de 280 spécimens en été et le deuxième est de 60 spécimens en automne. Ces résultats concordent avec des études réalisées au sein de deux régions du Maroc Tanant (à 16 km de la région d'étude) et Taza. Dans ces foyers, *P. sergenti* présente deux pics d'activité; le premier en Juin et le deuxième, qu'est le plus important, en Septembre (Guilvard et *al.*, 1991 ; Guessous Idrissi et *al.*, 1997). Le suivi de l'infestation intravectorielle à Tanant a montré qu'elle atteint son maximum en Septembre. Une précision de ces périodes donne l'efficacité à toute intervention anti-vectorielle.

Contrairement à d'autres études faites au Maroc, exemple celle réalisée par Boussaa et ses collaborateurs en 2005 à Marrakech montrant une activité de *P.papatasi* sur toute l'année, aucune de six espèces collectées à Foum jamàa, ne présente une activité continue durant toute l'année. Quate (1964) classe les phlébotomes en deux catégories: des phlébotomes n'apparaissant qu'en période sèche et une autre catégorie indépendante de la saison (existe durant toute l'année).

La maison constitue le biotope préféré, au moins pour *P.sergenti* et *P.longicuspis*. Cependant le nombre limité des captures ne montre pas clairement les biotopes préférés pour les autres espèces. *P.papatasi* se montre endophile, vue que ce vecteur est capturé largement dans ou à l'entourage des maisons (Orshan et *al.* 2010). Il présente des piqûres agressives (Lewis et Ward, 1987). Dans les régions arides, cette espèce se trouve rarement loin des terriers des rongeurs et les habitats humains (Schlein and Yuval 1987; Yuval et *al.* 1988; wasserberg et *al.* 2002). *P.longicuspis* est aussi anthropophile, et préfère des biotopes à végétation dense, colonisés par des habitats humains (Guernaoui et Boumezzough, 2009).

En plus du caractère endophile, l'attraction des végétations comme le cas de Cactus (Junnila et *al.* 2011), ainsi que le style rural, augmentent la probabilité d'avoir des sites de repos et de reproduction des phlébotomes autour des maisons humaines. Au Maroc, la répartition des phlébotomes est liée à certains types de constructions habitables (en terre ou en béton) (Guernaoui, 2006). En effet, la même étude note l'abondance des vecteurs, seulement dans les quartiers où les constructions faites en terre. Dans la région d'étude, La description de l'habitat qui s'est faite à partir des observations du terrain, et des enquêtes auprès des ménages peut expliquer le nombre élevé des phlébotomes au niveau des deux secteurs BH1 et BH2, dont on note des maisons construites à la traditionnelle en terre et se caractérisent par un habitat de type anarchique et insalubre.

Les programmes de lutte antivectorielle ont pour but de réduire ou d'interrompre la transmission de la maladie. Une stratégie efficace pour faire reculer la leishmaniose humaine consiste à éliminer les phlébotomes qui en sont les vecteurs, en particulier dans les habitats où existe une transmission domestique et péri-domestique. On dispose d'un certain nombre de mesures de lutte, notamment à l'aide de produits chimiques, par l'aménagement de l'environnement ou encore des moyens de protection individuelle (OMS, 2010). En matière de lutte contre les phlébotomes, la stratégie à mettre en œuvre va dépendre du comportement du vecteur visé, qui peut être essentiellement endophile, péri-domestique ou sylvestre.

Pour lutter contre les phlébotomes, plusieurs procédures n'ont pas cessé d'éviter le contact homme-vecteur. Les phlébotomes sont hautement sensibles aux insecticides (Alexander et Maroli 2003, Orshan et al. 2006). La principale méthode de lutte chimique contre les phlébotomes consiste à effectuer des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à effet rémanent, à traiter les lieux de repos des espèces sylvestres ou encore à utiliser des matériaux imprégnés d'insecticides: moustiquaires (OMS, 2010).

Parmi les moyens utilisés, les résidus des insecticides peuvent lutter contre les espèces endophiles, en pratiquant des aspersion contre les murs des maisons (Vieira et Coelho 1998). Dans le même contexte, le rapport de l'OMS (2010) note qu'on peut s'attaquer aux espèces endophiles en pulvérisant des insecticides sur les murs intérieurs. S'il s'agit d'espèces péri-domestiques, il faut également traiter les murs extérieurs et les abris pour animaux.

En ce qui concerne la LC à *L. tropica*, ces opérations peuvent participer au contrôle des épidémies en réduisant la densité des phlébotomes et arrêtant la transmission de la maladie (MS, 2010).

En France, une procédure est basée sur l'aspersion à 400 m par des insecticides, mais cela cause des problèmes environnementaux (Alexander et Maroli 2003).

En Afghanistan, en République islamique d'Iran et en République arabe Syrienne, on a constaté que l'usage de moustiquaires et autres matériaux imprégnés d'insecticide assurait une protection non négligeable contre la LC anthroponosique. Selon une analyse rétrospective effectuée au Soudan au sujet de la distribution massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide, l'effet protecteur est appréciable. Sur le sous-continent indien, des pulvérisations intradomiciliaires d'insecticides à effet rémanent effectuées dans les années 1950 et 1960 pour lutter contre le paludisme ont eu pour conséquence de faire fortement

reculer l'incidence de la LV; il n'y a toutefois pas eu de publication au sujet de l'effet obtenu (OMS, 2010).

L'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes la nuit pourrait procurer une protection quasi-totale (MS, 2010). Elles constituent une méthode de lutte efficace, relativement bon marché et durable pour lutter contre les phlébotomes; il en existe deux modèles : la moustiquaire que l'on doit réimprégner périodiquement et celle plus durable, dans laquelle l'insecticide est incorporé à la fibre ou la recouvre et qui reste efficace pendant 2 à 3 ans (OMS, 2010).

Pour surmonter le problème de résistance chez les phlébotomes, il faut s'appuyer aussi sur la lutte physique par gestion des déchets, aménagement de l'environnement et séparation des habitats humains...

Un autre moyen de réduire le risque d'infestation des zones de peuplement s'effectue en coupant les arbres et en débroussaillant le terrain tout autour des habitations dans un rayon d'au moins 1 km (OMS, 2010).

Globalement, il est essentiel de maintenir un taux de couverture élevé pour que la lutte ait un effet durable et cela nécessite un programme bien organisé, avec des directives techniques indiquant la marche à suivre, avec une direction, une logistique efficaces, un bon encadrement et un dispositif de suivi-évaluation des résultats. Le non respect des directives opérationnelles conduit au gaspillage des ressources financières et peut également porter atteinte à l'environnement (OMS, 2010).

Des investigations approfondies s'avèrent nécessaire dans la région d'étude sur les lieux de repos et de reproduction des phlébotomes, afin d'arrêter la problématique des vecteurs à l'extérieur ou loin de leur gîtes.

L'identification de *L. tropica* comme le seul agent causal de la LC à Foug Jamaà trouve une justification dans notre étude précédente consacrée à la surveillance entomologique pendant une année. Dans cette étude, nous avons montré que *P. sergenti* est l'espèce la plus abondante (57%) dans les phlébotomes capturés au sein de la région de Foug Jamaà (Arroub et al., 2012b). *P. sergenti* est confirmé vecteur de *L. tropica* au Moyen-Orient, au Maroc (Guilvard et al., 1991), ainsi que dans l'Arabie Saoudite (Al-Zahrani et al., 1988), et à Afghanistan (Killick-Kendrick et al., 1995). Cependant, Dans une région connue endémique de la LC, la collecte d'une année a besoin d'une démonstration, pour confirmer le

rôle des vecteurs dans la transmission de la maladie, au moins pour *P. sergenti* et *P. longicuspis*. Par conséquent, des travaux concernant l'isolement des souches de parasites sont aussi nécessaires pour visualiser le risque de transmission lié aux vecteurs, une tâche en perspective pour notre groupe.

CONCLUSION GENERALE ET

RECOMMANDATIONS

La leishmaniose est une maladie parasitaire présentant une menace pour la santé publique. Le rôle des phlébotomes dans la transmission des parasites a été signalé par Killick- Kendrick et Ward en 1981. Une étude épidémiologique et des informations préalables sur le vecteur et le parasite s'avèrent nécessaire pour réussir un programme de lutte contre les leishmanioses. Dans ce contexte, le présent travail comporte une étude des relations possibles entre les paramètres écologiques et socio-économiques de la région de Foum Jamaà et la recrudescence de la maladie; l'identification moléculaire du parasite et enfin l'évolution saisonnière des phlébotomes dans la région.

L'analyse rétrospective des cas de la leishmaniose humaine a montré que la maladie est indépendante du sexe et les enfants constituent, une bonne partie de la population à risque.

Les éléments (nombre de chiens, altitude, déchets ...) sont considérés des facteurs de risque pour la propagation de la maladie dans la région de Foum Jamaà. Les ordures déposées près des foyers et qui sont signalées chez la majorité des habitations humaines, présentent un biotope favorable pour la transmission de la maladie. En effet, les activités humaines créent des biotopes très favorables à la pullulation des vecteurs. Le sol de ces biotopes est très riche en matière organique et l'humidité relative y est élevée. Ces facteurs favorisent l'abondance des vecteurs (Wasserberg et *al.*, 2003). La situation dans les zones arides et semi arides est plus délicate car ces habitats se trouvent au voisinage des habitations humaines, ce qui augmente le contact homme-vecteur et par conséquent le risque leishmanien.

La maladie s'est révélée indépendante du mode de vie de la famille et l'environnement individuel du patient, mais dépend du mode de vie collectif, étant donné que les limites de la dispersion passive des espèces vectrices sont trop grandes par rapport à la distance géographique entre les maisons. Dans la région d'étude, nous avons noté un environnement hétérogène où coexiste le mode de vie moderne et traditionnel; Cette étape, qui se montre comme phase de transition entre la vie

rurale et la ville, a créé un environnement instable. Généralement l'urbanisation non planifiée contribue à la persistance de la leishmaniose et à l'extension des foyers ruraux vers les villes (OMS, 2002). Au Maroc, la LC anthroponosique est liée au milieu rural. Elle est apparue dans certains sites périurbains comme le cas de Zouagha Moulay Yaagoub (Fès) (Rahjaoui et *al.*, 2004) et de Taza (Guessouss-Idrissi et *al.*, 1997).

Les changements et les modifications de l'environnement bouleversent l'équilibre naturel, ce qui favorise l'installation de l'insecte vecteur et/ou le réservoir et par conséquent l'augmentation de la transmission des leishmanies (OMS, 1990). Rodhain (2000) précise que les conditions environnementales sont fortement liées à la distribution géographique des phlébotomes.

L'aménagement et la gestion de l'environnement s'avèrent nécessaire, étant donné que la qualité de l'environnement est un déterminant direct ou indirect important de la santé humaine. Certes, sa dégradation provoque une mauvaise qualité de vie qui compromet le développement durable.

La mauvaise gestion des ressources naturelles, la production excessive de déchets et les situations écologiques qui en résultent ont des retombées négatives sur la santé en général, notamment sur la distribution de la leishmaniose.

Les populations pauvres vivant dans les zones rurales et périurbaines comme le cas de Fom Jamaà, sont les plus concernées par la dégradation de l'environnement. Les effets cumulés des mauvaises conditions de logement, d'hygiène, l'absence d'approvisionnement en eau et d'assainissement, ont un lourd impact sur la santé des gens.

Dans le volet du parasite, l'isolement et l'identification des espèces de leishmanies sont essentiels pour l'efficacité thérapeutique chez les patients et la lutte contre la maladie. Dans cette optique, nous avons procédé à un diagnostic microscopique et moléculaire à partir des lames de frottis cutanés. Le premier qui est basé sur l'observation microscopique, nous a permis de déterminer les cas positifs parmi 119 patients suspects, cependant l'étude moléculaire est consacrée à l'identification de l'agent causal de la LC dans la région. En effet, l'analyse RFLP des produits PCR ITS1 par l'enzyme Hae III a prouvé sa grande efficacité pour identifier *L. tropica*, seule espèce circulante dans la région d'étude.

L'élaboration de stratégies destinées à prévenir et à combattre les leishmanioses, nécessite une bonne connaissance de l'interaction entre l'évolution de l'environnement rural et les phlébotomes vecteurs (OMS, 2002). Donc, s'informer préalablement sur le vecteur dans son milieu naturel présente un intérêt capital pour proposer un programme anti-vectoriel efficace. Cela permet de préciser les biotopes et les périodes d'intervention, ainsi que les conditions biotiques et abiotiques qui favorisent la pullulation du vecteur. Pour se faire, nous avons procédé à une étude systématique de la distribution spatio-temporelle, de l'abondance et la fréquence des phlébotomes à travers la région d'étude, au niveau des (grottes, décharges sauvages, écuries.....) avant de proposer quelques moyens de lutte.

L'identification morphologique des phlébotomes de Foum Jamaà a montré l'existence de trois espèces vectrices des espèces de leishmanies causant des leishmanioses dans les foyers marocains: *Phlebotomus sergenti*/L. *tropica*, *P. papatasi*/L. *major*, *P. longicuspis*/L. *infantum*. Ces trois espèces sont ubiquistes au Maroc (Bailly-Choumara et al., 1971 ; Rioux et al., 1984). Dans le même genre nous avons collecté *P. perniciosus* et *P. chabaudi*. Le genre *Sergentomyia* est représenté par une seule espèce *S. minuta*.

Le suivi de l'activité saisonnière des espèces collectées à Foum Jamaà a révélé deux pics de densité totale des phlébotomes: pic du mois Aout et pic de Juin, avec abondance de l'espèce *P. Sergenti*. Cette espèce présente deux pics de densité: un pic en automne (Septembre) et l'autre pic en été (Juin). Un traitement par insecticide au niveau de la région au début de ces pics peut être une méthode de lutte très efficace.

L'analyse de la fluctuation saisonnière de la faune phlébotomienne à Foum Jamaà en fonction des habitats, a montré une condensation qualitative et quantitative des phlébotomes dans les maisons où il y a l'élevage des animaux domestiques (bétail, volailles...).

Dans ces milieux, l'environnement offre une richesse en matière organique, des conditions favorables aux vecteurs. La matière organique joue le rôle des gîtes larvaires aux phlébotomes et présente un milieu idéal pour la ponte (OMS, 2002).

Le présent travail a donné de nombreuses recommandations à prendre en considération dans la planification d'un programme de contrôle plus précis, qui

pourra compléter le programme national de lutte contre la leishmaniose supervisé par le ministère marocain de la santé.

En fait, chaque programme de lutte et sa généralisation doit tenir compte d'une multitude de mesures résumées dans la sensibilisation des ménages sur les modes de transmission de la maladie et la lutte contre le complexe de la maladie (parasite, vecteur et réservoir). Pour ceci nous recommandons:

A/ Volet information, sensibilisation des ménages sur la LC et formation des agents de la santé. Cette activité pourra se dérouler en plusieurs axes:

D'abord, on doit procéder à une information, puis sensibilisation sous forme d'émission radiophonique, où un environnementaliste spécialisé dans les questions de la santé liées à l'environnement, un médecin spécialiste en dermatologie et un sociologue seront invités à parler de la maladie.

Accoté des services sanitaires, tous les intervenants (la population, les associations civiles et les autorités locales....) devraient être impliqués dans un tel réseau de surveillance de la maladie. Une collaboration efficace nécessite des séances périodiques d'information et d'éducation, surtout au sein des établissements scolaires, en s'intéressant de plus aux élèves, des intermédiaires pour sensibiliser les parents. Des théâtres forum viendront compléter cette sensibilisation. Ces rencontres seront l'occasion d'attirer l'attention de la population à l'importance d'utilisation des moustiquaires au moment du sommeil, usage correct et adéquat pour se protéger contre les piqûres de phlébotome.

Pour une meilleure prise en charge des cas de la leishmaniose, le laboratoire central à son tour doit renforcer la stratégie adoptée, en réalisant plus fréquemment, des supervisions des dispensaires installés dans les périphéries, un recyclage et une formation continue et une sensibilisation des techniciens d'hygiène et microscopistes. De cette manière, et dans le rural surtout, Les structures sanitaires concernées seront capables de dépister, diagnostiquer et traiter précocement les patients atteints avec couverture des lésions sur place et éviter les problèmes de retard.

B/ Volet parasite

L'analyse moléculaire du parasite laisse conclure, que chaque programme de lutte (physique, biologique et chimique) doit être renforcé contre *L. tropica*. Certainement sur l'espèce *P. Sergenti* (vecteur de *L. tropica*) que doit porter en priorité les campagnes de surveillance entomologique dans le cadre de la lutte contre les leishmanioses dans cette région. L'opération sera rentable au niveau des maisons, écuries et les vieux murs.

C/ Volet lutte anti vectorielle

Il est très intéressant de diminuer la taille de la population de vecteur. D'ailleurs, la lutte anti-vectorielle reste toujours la méthode de lutte la plus rentable (Alexander et Maroli, 2003). Le traitement actif et précoce des cas et la lutte contre le réservoir diminuent le nombre de nouveau cas infectés, mais sans pouvoir stopper l'épidémie. Il suffirait que quelques cas restent sans traitement, dans un milieu où la population de vecteur est importante, pour que la transmission du parasite s'éclatera et de façon épidémique. Dans le cas d'une anthroponose, les cas qui échappent au traitement constituent des réservoirs qui vont assurer la dissémination du parasite (Desjeux, 2002). La méthode de lutte la plus adoptée par le ministère de santé au Maroc est le traitement des cas, offert gratuitement pour tous les malades. Le fait de traiter tout le monde est irréalisable, sur le plan pratique. Donc, il est indispensable de conjuguer cette méthode à la lutte anti-vectorielle qui serait orientée si l'on veut arrêter la propagation et prévoir l'émergence de la maladie dans des régions limitrophes à Fom Jamaà.

La lutte se fait à l'aide de produits répulsifs appliqués par des campagnes de la pulvérisation d'insecticides autorisés à effet rémanent, à l'intérieur et autour des maisons et dans tous les refuges probables des phlébotomes (écuries étables, poulaillers, décharges sauvages...). L'opération évitera de nombreux gîtes larvaires c'est-à-dire une suppression de leurs sources de prolifération. La protection peut être individuelle par l'utilisation des moustiquaires imprégnées de pyréthrinolide qui irritent ou tuent les phlébotomes. Il convient d'inciter les régions endémiques à se doter d'une gestion intégrée de la lutte antivectorielle afin d'utiliser au mieux les insecticides et autres moyens de lutte (OMS, 2010).

Afin d'appuyer une stratégie de lutte contre la maladie et la rendre plus efficace, il faut y joindre des efforts dans le renforcement de la collaboration intersectorielle avec le ministère de l'intérieur, cela permet l'élimination des ordures ménagères qui est le biotope favorable pour la pullulation des phlébotomes, ainsi que la restauration des vieux murs de la région, afin de réduire la densité du vecteur. Il faut dans ce sens s'efforcer d'améliorer les conditions d'hygiène pour des populations qui vivent dans les zones d'endémie pour faire reculer la transmission (OMS, 2010).

L'urbanisation maîtrisée avec la destruction des habitats des vecteurs et des réservoirs, l'amélioration de la qualité de l'habitat humain et le traitement des déchets et des ordures sont des moyens qui devraient permettre de réduire la densité des phlébotomes et, par conséquent, limiter le risque leishmanien.

En résumé, la présente recherche est une contribution dans la connaissance de la faune phlébotomienne de la région de Foug Jamàa. Elle a montré une diversité importante de cette faune qui peut s'expliquer par la diversité des gîtes et des hôtes (hommes et animaux domestiques) disponibles.

Nos recherches moléculaires et entomologiques classent Foug Jamàa comme un foyer typique de *L. tropica* et que *P. sergenti* peut être le vecteur probable, responsable de la transmission de la leishmaniose (présence de l'espèce avec un taux dépassant 50% des vecteurs capturés). Ce vecteur dont le rôle épidémiologique est bien établi au Maroc doit être confirmé par l'isolement et la caractérisation du parasite chez ce vecteur dans la région d'étude.

L'étude a mis aussi en évidence, le rôle de plusieurs facteurs mésologiques sur les phlébotomes et les leishmanioses dans ces régions.

Le climat est un facteur très important, puisqu'il retrace les grandes lignes de la distribution spatiale des vecteurs et gère directement leurs activités saisonnière et même journalière.

Malgré l'intensité des activités de dépistage et de traitement des cas humains au niveau de la région, les actions réalisées demeurent restreintes et insuffisantes. Bien que le secteur de la santé déploie des efforts pour apporter les soins, la racine du mal reste ailleurs.

Au terme de notre étude sur les facteurs environnementaux contribuant dans la propagation de la LC dans la zone d'étude, nous avons conclu que les responsabilités sont partagées. D'une part la population elle-même et d'autre part les gestionnaires de la région. Pour rentabiliser l'intervention, seule une coordination pluridisciplinaire entre les services de la santé et les autres secteurs concernés peuvent lutter efficacement contre les menaces de la leishmaniose, selon des travaux complémentaires.

Les données acquises dans ce travail ne doivent pas rester limitées à un cadre de recherche universitaire et doivent être exploitées pour l'établissement d'une stratégie de prévention et de lutte efficace contre la maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abonnenc, E. 1972. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera: Phlebotomidae). *Mémoire de l'ORSTOM*. 55 pp: 1-289.
- Adhami, J. 1991. Anomalies morphologiques des phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Albanie. *Parassitologia*. 33 pp: 169-173.
- Adler, S. et Ber, M. 1941. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *P. papatasi*. *Znd. J. med. Res.* 29 pp: 803-809.
- 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. et Taylor, M.F.J.R. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52 pp: 399-451.
- Akalay, O. 1999. 1er Trimestre. Bulletin épidémiologique, direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Ministère de la santé. Rabat. Maroc, N° 37.p.2.
- Al Jawabreh, A., Schnur, L. F., Nasereddin, A., Schwenkenbecher, J.M., Abdeen, Z., Barghuthy, F., Khanfar, H., Presber, W. et Schönian, G. 2004. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Trop. Med. Int. Health* 9(7) pp: 812-6
- Al Zahrani, M.A., Peters, W., Evans, D.A., Chin, C., Smith, V. et Lane, R.P. 1988. *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82 : 416p.
- Alexander, B. et Maroli, M. 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 17 pp: 1-18.
- Alvarez, F., Robello, C. et Vignali, M. 1994. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol. Biol. Evol.* 11(5) pp: 790-802.

- Andresen, K., Gaafar, A., El Hassan, A.M., Ismail, A., Dafalla, M., Theander, T.G. et Kharazmi, A. 1996. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* Vol. 90, Issue 2 pp: 133-135.
- Anofel. 2007. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie médicales, parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. *Ed. Elsevier Masson* pp: 78-88.
- Arroub, H., Alaoui, A., Lemrani, M. et Habbari K. 2012a. Cutaneous leishmaniasis in Fom Jamâa (Azilal, Morocco): microenvironmental and socio-economical risk factors, *J. Agric. Soc. Sci*; 8 pp: 10–16.
- Arroub, H., Alaoui, A., El Miri, H., Lemrani, M. et Habbari, K., 2012b. Spatiotemporal Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Focus of Cutaneous leishmaniasis in Fom Jamâa (Azilal, Atlas of Morocco), *J. of Life Sci.* 6 pp: 454-459.
- Artemiev, M.M. 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia.* 33pp: 69-78.
- Ashford, R.W. 1989. New strategies for control forum: reservoir control. Nato ASI on leishmaniosis (Ed. D. T. Hart), *Plenum Publishing Corp., New York*, pp: 827-831.
- Ashford, R.W. 1999. Cutaneous leishmaniasis control: strategies for prevention. *Clinics in Dermatol.* 17 pp: 327-332.
- Ashford, R.W. 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30 pp: 1269-1281.
- Aytekin, S., Ertem, M., Yađđýran, O. et Aytekin, N. 2006 Clinicoepidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Diyarbakir Turkey. *Dermatol. Online J.* 30 (14): 6p.
- Ba, Y., Trouillet, J., Thonnon, J. and Fontenille, D. 1999. *Phlebotomus* of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 92 pp: 131–135.

- Bacaër, N. et Guernaoui, S. 2006. The epidemic threshold of a simple seasonal model of cutaneous leishmaniasis. *J. Math. Biol.* 53 pp: 421–436.
- Bailly-Chaumara, H., Abonnec, E. et Pastre, J. 1971. Contribution à l'étude des phlébotomes du Maroc (Diptera: Psychodidae). Données faunistiques et écologiques. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasitol.* IX, 4 pp : 431-460.
- Baldet, T. 2004. Biologie et contrôle des maladies vectorielles émergentes CIRAD/EMVT.
- Belazzoug, S., Ammary-Khodja, A., Riox, J.A. et pratlong, F. 1986. Forme chronique de leishmaniose cutanée humaine à *leishmania major* Yakimoff et Schokhor. 1914. L'homme réservoir éventuel. In : *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. *J.A. Rioux ed., Imeee, Montpellier* pp: 459-461.
- Benabdennbi, I., Bombard, S., Braverman, Y. et Pesson, B. 1996. Differentiation of Females in *Sergentomyia* sensu stricto (Diptera: Psychodidae) using scanning electron microscopy of pharyngeal armatures. *J. Med. Entomol.* 33pp : 265-268.
- Benabdennbi, I., 1998. Contribution à l'étude de la biodiversité chez les *Larroussius* (Diptera: Psychodidae) du bassin méditerranéen. Apports de l'analyse isoenzymatique. *Thèse, Univ Strasbourg I*, 152 p.
- Ben Ismail, R., Gramiccia, M., Gradoni, L., Helal, H. et Ben Rachid M. S. 1987- Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 749p.
- Ben Ismail, R. et Ben Rachid M S. 1989. Epidémiologie des leishmanioses en Tunisie. Maladies tropicales transmissibles. Ed. AUPELF-UREF. *John Libbey Eurotext. Paris* pp: 73-80.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F. et al. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J. of clinical microbio* pp: 1435–1439.
- Bessis, D. 2007. Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques: dermatologie et médecine. *1ère édition, vol. 2* : 352 p.
- Blanc, G. et Pietri, A. 1934. Nouveau cas de leishmaniose viscérale infantile au Maroc. *Maroc méd.* 146 pp: 327-329.

- Bodaghi, B. and Lehoang, P. 2009. *Uvéite, France, 1 vol. (XVII) : 394 p.*
- 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. *J. of Clinical Microbio*, Vol. 41, No. 11pp: 5080-5084.
- Bounameas, A., Boudabous, R., Jouet, D., Augot, D., Ferté, H., Babba, H., Berchi, S. et Depaquit, J. 2008. Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnec & Rioux, 1970 et *Phlebotomus riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998, *Parasite* 15 pp : 565–571.
- Bourrée, P., Martin, P. 1984. Le kala-Azar ou leishmaniose viscérale. *Vie Méd.*, 1 pp: 493-504.
- Boussaa, S. 2003. Contribution à l'étude de la dynamique de vol de la faune phlébotomienne dans les zones arides et semi-arides: cas de Marrakech et ses marges. DES. Univ. Cadi Ayyad, Marrakech : 45pp.
- Boussaa, S., Guernaoui, S., Pesson, B. et Boumezzough, A. 2005. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Tropica*. 95 pp: 86-91.
- Boussaa, S., Pesson, B. et Boumezzough, A. 2007. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco, *Annals of Tropical Medicine & Parasitol*. 101(8) pp: 715-724.
- Boussaa, S. 2008. Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc. Effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. DES. fac. Sci. Semlalia Univ. Cadi Ayyad, Marrakech: 217pp.
- Boussaa, S., Pesson, B. and Boumezzough, A. 2009. Faunistic study of the sandflies (Diptera: Psychodidae) in an emerging focus of cutaneous leishmaniasis in Al Houz province, Morocco. *Annal of Tropical Medicine et parasitology*, Vol.103, No. 1 pp : 73-83.
- Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C. Pages M., Dedet J.P. et al. 1998. Conserved linkage groups associated with large scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Genes*. 222 pp: 107-117.

- Cadoumi, M.T. 1995. Phlebotomine Sandflies in Jordan : laboratory colonisation and role in transmission of *Leishmania*. Master of Sci, Yarmouk Univ. 156pp.
- Casanova, C. 2001. A soil emergence trap for collections of Phlebotomine sandflies, *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 96 pp: 273-275.
- Castilho, T. M., Shaw, J. J. et Floeter-Winter, L. M. 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 41 pp:540–546.
- Charrel, R.N., Izri, A., Temmam, S., Lamballerie, X. et Parola, P. 2006. Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerging infectious diseases.* 12(8) pp: 1299–1300.
- Chiheb, S., Guessous-Idrissi, N., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M. et Hamdani, S. 1999. *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in an emerging focus in North Morocco: new clinical forms. *Ann Dermatol Venereol.* 126 pp: 419-22.
- Chuchana, P. 1992. Réactions de polymérisation en chaîne: Méthodologie générale. *Ann. Biol. Clin.* 50 pp: 703-708.
- Colonieu, L. 1931 Sur un de boutons d'Orient multiples contractés dans l'Atlas marocain. *Archs. Inst. Pasteur Algerie*, 9 pp: 13-14.
- Croset, H., Abonnenc, Rioux, J.A. 1970. *Phlebotomus chabaudi* n.sp. (Diptera-Psychodidae). *Ann.Parasito. Hum. Comp.*, 45 pp : 863-873.
- Croset, H., Rioux, J.A., Léger, N., Houin, R., Cadi Soussi, M., Benmansour, N. et Maistre, M. 1974. Les méthodes d'échantillonnage des populations de phlébotomes en région méditerranéenne. In: Rioux, J.A. (Ed.), *Ecologie des leishmanioses.* CNRS, Paris pp: 139-151.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, JR H. et Beverley, S. M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73 pp:145–155.
- Danis, M., Datry, A. et Nozais, J.P. 1996. *Traité de parasitologie médicale, éditions pradel paris* pp: 213-235.

- Dedet, JP., Addadi, K. et Belazzoug S. 1984. Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae) d'Algérie. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Paradol.*, XXI-I, 2 pp: 99-127.
- Dedet, JP. 1986: les leishmanioses *Encycl. Med. Chir, maladies infectieuses et parasitaires*. 8094 A 10.4-8P.
- Dedet, JP. 1994. Epidémiologie mondiale de la leishmaniose viscérale. *Méd. Mal. Infect.* 24 pp: 562-655.
- Dedet, JP. 1999. Les leishmanioses. *Edition Ellipses* : 253 p.
- Dedet, JP. 2001. Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses, 8-506-A-10* : 11 p.
- Delanoë, P. 1916. Existence de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) à Mazagan. *Bull. Soc. Path. Exot.* 9, 762p.
- Delmont, J. 1983. Les leishmanioses. *Gaz. Méd. France*, 90 (29) pp: 2857-2868.
- Depaquit, J., Léger, N. et Killick-Kendrick, R. 1998. Description de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi* n. sp (Diptera-Psychodidae) d'Afrique du Nord. *Parasite*. 5 pp: 151-158.
- Depaquit, J., Ferté, H. et Léger, N. 2000. Révision du sous-genre *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus*- *Phlebotominae*-*Psychodidae*-*Diptera*). Approches morphologiques et moléculaires. *Ann. Pharm. Fr.* 58 pp: 333-340.
- Depaquit, J., Muller, F., Gantier, J.C., Léger, N., Ferté, H., Ready, P. et Niang, A.A. 2005. Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus (Larrousius) longicuspis* south of the Sahara. *Med. Vet. Entomol.* 19 pp: 322-325.
- Dereure, J., Rioux, JP., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J. et al. 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 595p.
- Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14 pp: 417- 423.

- Desjeux, P. 1999. Les leishmanioses. Aspect de santé publique et lutte. *Edition Ellipses*: 253p.
- Desjeux, P. 2002. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. WHO. *Mediterr. Zoon. Control Cent.* 55p.
- Desjeux, P. et Alvar, J. 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97(Supp. 1) pp: 3-15.
- Dmbele, S. 1992. La leishmaniose cutanée: intérêt d'un traitement par le 4-4 diamino-diphenyl sulfone (à propos de 20 cas à l'institut Marchoux) thèse médecine, Bamako., N°19 pp: 44-46.
- Dolmatoua, A.V. et Demina, A.A. 1971. Les phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. Pages 103, 116 - 117.
- Dujardin, JC., Victoir, K., De Doncker, S., Guerbouj, S., Arevalo, J., Le Ray, D. 2002. Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 Suppl 1:S81-6.
- Duriez, T., Dujardin, L. et Afchain, D. 2002. Cours de parasitologie. Laboratoire de Parasitologie Fac. de Pharmacie Lille.
- El Tai, NO., Osman, OF., El Fari, M., Presber, W. et Schönian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 pp: 575-579.
- Fazaelia, A., Fouladic, B. et Sharifid, I. 2009. Emergence of cutaneous leishmaniasis in a border area at south-east of Iran: an epidemiological survey. *J. Vector Borne Dis.* 46 pp: 36-42.
- Feliciangeli, D.M., Delgado, O., Suarez, B., Bravo, A. 2006. *Leishmania* and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela, *Tropical Medicine and International Health.* 11(12) pp: 1785-1791.

- Fellah, H., Rhajaoui, M., Ouahabi, S., Belghiti, D. et Lyagoubi, M. 2007. Occurrence of human cutaneous leishmaniasis in Zougha My Yacoub province (Morocco). *Int. J. of Agric. & Biol.* 1 pp:197-8.
- Forget, G. 2004. Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. Doctorat en microbiologie-immunologie. Fac. Médecine, Univ. Laval, Québec : 274p.
- Galati. 2003. E.A.B. Galati, Classificação de Phlebotominae. In: Flebotomíneos do Brasil, sous la direction de E.F. Rangel et R.Lainson, Fiocruz, Rio de Janeiro pp: 23-51.
- Galvez, R., Descalzo, M.A., Miro, G., Jimenez, M.I., Martin, O., Dos Santos- Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R. 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain, *Acta Trop.* 115 pp: 95-112.
- Garnham, P. C. C. 1987. Global ecology of the leishmaniasis. Introductory remarks. *Coll. Int. CNRS.*, n°239 pp: 17-18.
- Gaud, J. 1947- Phlébotomes du Maroc. *Bull. Soc. Nat. Maroc.* 27 pp: 207-212.
- Gaud, J. et Laurent, J. 1952. Observations sur les phlébotomes de la région de Rabat. *Bull. Soc. Scs. Nat. Maroc.* XXVII pp : 207-212.
- Gaud, J. 1954. Phlébotomes du Maroc. *Bull. Instit. Hyg. Maroc.* 14 pp: 91-107.
- Gentilini, M., Duflo, B. et al. 1986. Les leishmanioses. In: médecine *Tropicale; Paris: Editions Flammarion* pp: 125-133.
- Gil Collado, J. 1977. Phlebotomes et leishmanioses en Espagne. In : écologie des leishmanioses. *Coll. Int ; CNRS, N° 239, Montpellier* pp: 177-190.
- Gott, J.M., 2003. Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(19) pp: 10583-4.
- Guernaoui S. 2000. Contribution à l'étude des phlébotomes vecteurs potentiels des leishmanioses dans la région de Marrakech. DES. Univ. Cadi Ayyad, Marrakech : 40p.

- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Pesson, B. et Pichon, G. 2005a. Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *J. Med Entomol.* 42 pp: 697–701.
- Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A. et Pichon, G. 2005b. Distribution of phlebotomine sand flies, of the *subgenus Larroussius*, in Morocco. *Med. Vet. Entomol.* 19 pp: 111–115.
- Guernaoui, S. 2006. Les leishmanioses dans les zones arides et semi-arides du sud-ouest marocain. Ecologie, épidémiologie, modélisation et aide à la décision pour la lutte antivectorielle. Doctorat. Fac. Sci. Semlalia, Marrakech : 166p.
- Guernaoui, S., Boussaa, S., Pesson, B. et Boumezzough, A. 2006a. Nocturnal activity of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in Chichaoua, Morocco. *Parasitol. Res.* 98 pp: 184–188.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A. et Laamrani, A. 2006b. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Trop.* 97 pp: 346–351.
- Guernaoui, S. et Boumezzough, A. 2009. Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco, *J. Med. Entomol.* 46 pp: 1187-1194.
- Guessous-Idrissi, N., Chiheb, S., Hamdani ,A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S. et Krimech, A. 1997. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91 pp: 660–663.
- Guessous-Idrissi, N. 1999. La leishmaniose cutanée à Taza. Recherche Nationale, les Cahiers du Médecin. *Tome II- N° 19* pp: 37-40.
- Guilvard, E., Rioux, J.P., Gallego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martinezorlega, E., Dereure, J., Saddiki, A. et Martini, A. 1991. *Leishmania tropica* au Maroc III. Rôle de *Phlebotomus sergenti*. A propos de 89 isolats1. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66 pp: 96-99.
- Gurel, MS., Ulukanligil, M. et Ozbilge, H. 2002. Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997–2000). *Int. J. Dermatol.* 41 pp: 32–37.

- Hogsette, J.A., Hanafi, H.A., Bernier, U.R., Kline, D.L., Fawaz, E.F., Furman, B.F., et al. 2008. Discovery of diurnal resting sites of phlebotomine sand flies in a village in southern Egypt, *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 24 pp: 601-603.
- Hoogstraal, H., Dietlein, D.R. et Heyneman, D. 1962. Leishmaniasis in the Sudan Republic. 4. Preliminary observations on man-biting sandflies (Psychodidae: *Phlebotomus*) in certain Upper Nile endemic Nile endemic areas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56 pp : 411-422.
- Jacobson, R. L., Eisenberger, C. L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., El Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J. P., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L. F., Jaffe, C. L. et Warburg, A. 2003. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Northern Israel. *J. Infec. Dis.*, 188 pp: 1065-1073.
- Jarry, D.M. 1999. Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. In Dedet J-P., *Les Leishmanioses, Ellipses Ed., Paris* pp: 89-108.
- Junnila, A., Müller, G.C. et Schlein, Y. 2011. Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field, *J. of Vector Ecology* 36(1) pp: 206-211.
- Kabb, A. L., Opegard, L. M., Mckenzie, B. A. et Connell, G.J., 2001. mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplastid Editing. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 12 pp: 2575–2580.
- Kamhawi, S., Modi, GB., Pimenta, PF., Rowton, E. et Sacks, DL. 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycanmediated midgut attachment. *Parasitol.* 121 pp: 25–33.
- Kassem, H.A., Abdel Sattar, S., Shehata, M.G. et El Sawaf B.M. 1988. Abnormalities in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae) of Egypt. *J. Egypt. Public. Health Assoc.* (3, 4) pp: 209-213.
- Killick-Kendrick, R. et Ward, R.D. 1981. *Ecology of Leishmania Parasitol.* 82 pp: 143-152.
- Killick-Kendrick, R. 1983. Investigation of Phlebotomine Sandflies vectors of leishmaniasis, *Indo-UK Workshop on Leishmaniasis* pp: 72-83.

- Killick-Kendrick, R. 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 78 pp: 747–55.
- Killick-Kendrick R., Leaney, A.L., Peters, W., Rioux, J.A. et Bray, R.S. 1985. Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: The incrimination of *Phlebotomus papatasi* as the vector in the Al-Hassa oasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79 pp: 252-5.
- Killick-Kendrick, R. 1990. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4 pp: 1-24.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y. 1995. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kaboul, Afganistan: the high susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 89: 477p.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin. Dermatol.* 17 pp: 279-289.
- Kline, D.L., Müller, G.C. et Hogsette, J.A. 2011. Evaluation of propane combustion traps for the collection of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) in southern Israel, *J. of Vector Ecology* 36(1) pp: 166-171.
- Klippel, A. et Monier, V. 1921. Un cas de Kala-Azar d'origine marocaine. *Société Méd. Hôp. Paris*, 8 juillet pp : 1037- 1038.
- Kuhn, K.G. Global. 1999. Warming and leishmaniasis in Italy, *Bull. Trop. Med. Int. Health* 7 pp: 1-2.
- 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.
- Lainson, R. et Shaw, J-J. 1987: Evolution, classification and geographical distribution. In: the leishmaniasis in biology and Medecine. Peters W and Killick-Kendrick R. Ed. *Academic Press, London*, 1, pp : 1-120.
- Lambert, M., Rioux, J.A., Mahjour, J. et Saddik A. 1994. Nouvelles stations de *Phlebotomus mariae* Rioux, Croset, Léger & Bailly Choumara, 1974 au Maroc. *Parasite.* 1: 93p.

- Lane, R.P. 1986. The sandflies of Egypt (Diptera : Psychodidae). *Bull. Brit. Museum (natural history). Entomol. Series.*, 52 (1) pp: 1-35.
- Lane, R.P. 1993. Sand flies. In: medical insects and arachnids (ed. by R. P. Lane & R. W. Crosskey). *Chapman and Hall, London*, pp : 78-119.
- Latyshev, N.I. et Krjukova, A.P. 1941. On the epidemiology of the cutaneous leishmaniasis as cutaneous zoonotic disease of wild rodents in Turkmenia. *Trudy Voennomedskaya Akad. Krasnoi Armii*. 25 pp: 229-242.
- Laugier, J.C., Témime, P. 1973. Un cas de leishmaniose cutanée autochtone de la région de Salon. *Bull. Soc. Fr. Derm. Syph.*, 79 pp : 361- 362.
- Léger, N., Rioux, J.A., Croset, H., Cadi, Soussi, M. et Benmansour, N. 1974. Le « complexe » *Sergentomyia (Sergentomyia) antennata* (Newstead, 1912). Remarques systématiques et écologiques, à propos de 948 exemplaires récoltés dans le Sud-marocain. *Ann. Parasit.* 149, n° 5 pp: 577- 591.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G. et Abonnenc, E. 1983. Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius Nitzulescu*, 1931 (Diptera, Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58 pp: 611-623.
- Leger, N. et Depaquit. 1999: Les phlébotomes. In: Dedet J-P éd. Les leishmanioses. *Paris: Ellipses*, pp : 89-108.
- Lemrani, M., Nejjar, N. et Benslimane, A. 1999. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Northern Morocco. *G. Ital. Med. Trop.* 4 pp: 3-4.
- Lemrani, M., Nejjar, R. et Pratlong, F. 2002. A new *Leishmania tropica* zymodeme-causative agent of canine visceral leishmaniasis in Northern Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96 pp: 637-638.
- 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. et Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the *Protozoa*. *J. Protozool.* 27 pp: 37-58.

- Lewis D.J., Young D.G., Fairchild G.B. et Minter D.M. 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Ent.* 2 pp: 319-332.
- Lewis, D.J. 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. British museum of natural history (entomology series)*. 45 pp: 121-209.
- Lewis, DJ. et Ward, R.D. 1987. Transmission, vectors. In: the leishmaniasis in biology and medicine, W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds.) *academic press, London*, 1 551.
- Lightburn, E. et al. 2002. Surveillance épidémiologique des leishmanioses tégumentaires en Guyane – synthèse de données militaires sur 10 ans. *Médecine tropicale* 2002; 62 pp: 545-553.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. et Darnell, J. 2000. Other mechanisms of post-transcriptional control (11.5). *Molecular cell biology, 4th edition*.
- Maazoun, R., Pratlong, F., Lanotte, G. et 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*, pp : 129-137.
- Mahdy M., Al-Mekhlafi, HM., Al-Mekhlafi, AM., YAL, L. et al. 2010. Molecular characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen. *PLoS ONE* 5(9): e12879. doi:10.1371/journal.pone.0012879.
- Mahjour, J., Akalay, O. et Saddiki, A. 1992. Les leishmanioses au Maroc de l'analyse éco-épidémiologie à la prévention. *DEPS Bul. Epidém. Supp.* N°7.
- Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H. P. et Felger, I. (2003). Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCRRFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46 pp:115–124.
- Maroli, M., Jalouk, L., AlAhmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C. et Gradoni, L. 2009. Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria, *medical and veterinary entomol.* 23 pp: 148-154.

- Marthy, P., Le Fichoux, Y., Pratlong, F., Rioux, J.A., Rostain, G. et Lacour J.P. 1989. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a young Moroccan child observed in Nice, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83(4): 510p.
- Meredith, S.E., Zijlstra, E.E., Schoone, G.J., Kroon, C.C., Van Eys, G.J., Schaeffer, K.U., El-Hassan, A.M. et Lawyer PG. 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(3-4) pp:419-31.
- Ministère marocain de la Santé (MS). 1997. Lutte contre les leishmanioses. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Rabat, Maroc.
- MS. 2001. Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Ministère de la Santé, Rabat, Maroc.
- MS. 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, Rabat, Maroc, pp: 34-49.
- MS. 2010. Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies, Guide des activités: Lutte contre les leishmanioses. Rabat, Maroc.
- Momeni, AZ., Aminjavaheri, M. 1994. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *Int. J. Dermatol.* 33 pp: 260-5.
- Müller, G.C. et Schlein, Y. 2011. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*, *J. of Vector Ecology* 36(1) pp: 64-70.
- Myler, P.J., Sisk, E., Mcdonagh, P.D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S.M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A. et Stuart, K. 2000. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.* 28(5) pp: 527-31.
- Nikiema, L. 2002. La leishmaniose tégumentaire: Aspects cliniques, biologiques, évolutifs sous traitement par le glucantime, et particularités chez le sujet immunodéprimé dans la ville d'Ouagadougou. Pages 3, 8, 14.

- Organisation mondiale de la santé (OMS). 1990. Control of leishmaniasis. *Technical Report Series 793. WHO, Geneva, Switzerland*, 1–158.
- OMS. 1993. La lutte contre les maladies tropicales: Les leishmanioses, pp : 10–12.
- OMS. 1999. Normes recommandées par l'OMS pour la surveillance, *deuxième édition, Genève. Relevé épidémiologique hebdomadaire* : 74(34) pp: 281-288.
- OMS. 2002. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record*. 77(44) pp: 365-372.
- OMS. 2006. Lutte contre la leishmaniose. Rapport du Secrétariat. *Conseil exécutif du 11 Mai*.
- OMS. 2010. Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, *Genève, Série de rapports techniques; no. 949*.
- Orshan, L., Szekely, D., Schnur, H., Wilamowski, A., Galer, Y., Bitton, S., et Schlein, Y. 2006. Attempts to control sandflies by insecticide-sprayed strips along the periphery of a village, *J. Vector Ecol.* 31 pp: 113-117.
- Orshan, L., Szekely, D., Khalifa, Z., Bitton, S. 2010. Distribution and seasonality of *Phlebotomus* sand flies in cutaneous leishmaniasis foci, Judean Desert, Israel, *J. Med. Entomol.* 47, pp : 319-328.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S. and Papadopoulou, B. 2003. Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. Page 2. *Médecine/Sciences*, octobre, 2003 ; 19 (10) pp: 900-909. *URI: <http://id.erudit.org/iderudit/007158ar>*.
- Palit, A., Bhattacharya, S.K. et Kundu, S.N. 2005. Host preference of *Phlebotomus argentipes* and *Phlebotomus papatasi* in different biotopes of West Bengal, India. *Inter. J. Enviro. Heal. Res.* 15 pp: 449-454.
- Parrot, L. et Durand-Delacré, R. 1947. Notes sur les phlébotomes LVI. –Phlébotomes de Beni Ounif-de-Figuig. *Arch. Instit. Past. D'Algérie.* 25 pp: 77-86.
- Perfiliev, P.P. 1928. Sur l'anatomie des Phlébotomes. *Bull. Soc. Path. exot.* 21 pp: 159-171; pp : 254-257.

- Piere, A. 2003. Leishmanioses: Actualités 2002. *Médecine tropicale*.
- Pimenta, PF., Saraiva, EM., Rowton, E., Modi, GB., Garraway, LA. et Beverley, SM. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 pp: 9155–6.
- Pinto, M.C., Campbell-Lendrum, D.H., Lozovei, A.L., Teodoro, U. et Davies, C.R. 2001. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med. Vet. Entomol.* 15 pp: 132-139.
- Pizzuto, M., Piazza, M., Senese, D. et al. 2001. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol.*; 39(1) pp: 357–361.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Dereure, J., Mahjour, J., Gallego, M., Guilvard, E., Lanotte, G., Périères, J., Martini, A. et Saddiki, A. 1991. *Leishmania tropica* au Maroc. IV. Diversité isozymique intrafocale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66 pp: 100–104.
- Quate, L.W. 1964. *Phlebotomus* sandflies of the Paloich Area in the Sudan (Diptera, Psychodidae), *J. Med. Entomol.* 1 pp: 213-268.
- Ramaoui, K. 2006. Contribution à l'étude des Phlébotomes (vecteurs de la leishmaniose) et du réservoir canidé dans les foyers Sud-ouest et partie centrale du Maroc. DES. Univ.Cadi Ayyad, Marrakech : 47p.
- Ramaoui, K.,Guernaoui, S et Boumezzough, A. 2008. Entomological and epidemiological study of new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Parasitol Res.* 103 pp: 859-863.
- Raoult, D. 1998. Dictionnaire de maladies infectieuses: diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. *Elsevier Masson, Paris* : 1162 p.
- Ravel, C., Wincker, P. et Blaineau, C. 1999. Biologie moléculaire de *Leishmania*. In: Dedet JP éd. Les leishmanioses. *Paris: Ellipses* pp: 59-62.

- Ready, PD. 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. Climate change: impact on the epidemiology and control of animal diseases. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz De la Roque S.* 27pp: 399-412.
- Reithinger, R. et Dujardin, J.C. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. of clinical microbiol.* pp : 21–25.
- Rhajaoui, M., Fellah, H., Pralong, F., Dedet, JP. et Lyagoubi, M. 2004. Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98 pp: 299–301.
- Rhajaoui, M., Nasereddin, A., Fellah, H., Azmi, K., Amarir, F., Al-Jawabreh, A., Ereqa, T S., Planer, J et Abdeen, Z. 2007. New clinico-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis, Morocco. N°9, Septembre.
- Rhajaoui, M. 2009. Human leishmaniasis in Morocco: a nosogeographical diversity. *Pathol Biol, Paris*; 59 pp: 226–229.
- Rhajaoui, M., Sebti, F., Fellah, H., Alam, M.Z., Nasereddin, A., Abbasi, I. et Schönian, G. 2012. Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco. *Parasite.* 19(1) pp: 81-4.
- Richard, ML. 1995. Leishmanioses. In: Harrisin Médecine interne. Paris : Editions Arnette; pp : 896-899.
- Rioux, J.A., Croset, H., Léger, N. et Bailly-Choumara, H. 1974. *Phlebotomus (Larrousius) mariae* n. sp. (Diptera: Psychodidae). *Ann. Parasitol.* 49 pp: 91-101.
- Rioux, J.A., Croset, H., Léger, N., Ben Mansour, N. et Cadi Soussi, M. 1975. Présence of *Phlebotomus bergeroti*, *Phlebotomus chabaudi*, *Phlebotomus chadlii* and *Sergentomyia christophersi* in Morocco. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 50 pp: 493-506.
- Rioux, J.A., Croset, H., Léger, N. et Rosin, G. 1977. Présence au Maroc de *Phlebotomus perfiliewi* Parrot 1930. *Ann. Parasitol.* 52 pp: 377-380.
- Rioux, J.A., Petter, F., Akalay, O., Lanotte, G., Ouazani, A., Seguignes, M. et 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 pp: 515–517.
- Rioux, J.A., Rispaïl, P., Lanotte, G. et Lepart, J. 1984. Relations phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 131 : 549–557.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Petter, F., Dereure, J., Akalay, O., Pratlong, F., Velez, G., Fikri, N.B., Maazoun, R., Denial, M., Jarry, D.M., Zahaf, A., Ashford, R.W., Cadi Soussi, M., Killick-Kendrick, R., Benmansour, N., Moreno, G., Périères, J., Guilvard, E., Zribi, M., Kennou, M. F., Rispaïl, P., Knechtli, R. et Serres, E. 1986a. Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental: de l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique, l'exemple de trois 'foyers' tunisien, marocain et français. In *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications, écoépidémiologiques, ed. Rioux, J. A. Montpellier, France: Institut Méditerranéen d'Etudes épidémiologiques et Ecologiques pp: 365–395.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Dereure, J., Lanotte, G., Denial, M., Pratlong, F., Serres, E. et Belmonte, A. 1986b. Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25. A propos de 28 souches isolées dans un foyer du Sud marocain. In: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications écoépidémiologiques. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984), IMEEE, Montpellier, France pp: 471–480.
- Rioux, J.A., Velez, I.D., Denial, M., Dereure, J., Périères, J., Lanotte, G. et El Mellouki, W. 1986c. Presence in Morocco of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) kazeruni* Theodor and Mesghali, 1964. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61 pp: 473-81.
- Rioux, J.A., Mahjour, J., Gallego, M., Dereure, J., Périères, J., Laamrani, A., Riera, C., Saddiki, A. et Mouki, B. 1996. Leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania infantum* MON-24 au Maroc. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 14 pp: 179-183.
- Rioux, J.A., Akalay, O., Périères, J., Dereure, J., Mahjour, J., Le Houérou, H.N., Léger, N., Desjeux P., Gallego, M., Saddiki, A., Barkia, A. et Nachi, H. 1997. L'évolution éco-épidémiologique du risque leishmanien au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation 'phlébotomes bioclimats'. *Ecol. Mediterr.* 23 pp: 73–92.

- Rioux, J.A. 2001. Trente ans de coopération franco-marocaine sur les leishmanioses: dépistage et analyse des foyers. Facteurs de risque. Changements climatiques et dynamiques noso géographiques. Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, 168 pp: 90–101.
- Ristorcelli, A. 1939. Contribution à l'étude des phlébotomes du Maroc. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 17 pp: 364–365.
- Ristorcelli, A. 1940. Sur les phlébotomes du Maroc. *Arch. Inst. Pasteur du Maroc.* 2 pp: 367-381.
- Ristorcelli, A. 1941. Sur les phlébotomes du Maroc (2° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc.* 2 pp: 521-533.
- Ristorcelli, A. 1945- Sur les phlébotomes du Maroc (3° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc.* 3 pp: 105-109.
- Ristorcelli, A. 1947. Sur les phlébotomes du Maroc (4° note). *Arch. Inst. Pasteur du Maroc.* 3pp: 487-488.
- Roberts, L.S. et Janovy, J.J. 2000. Gerald, D. Schmidt, & Larry, S. Roberts' *Foundations of Parasitology. McGraw-Hill Higher Education, Boston.*
- Rodhain, F., et Pererz, C. 1985. *Précis d'entomologie Médicale et Vétérinaire. Ed Maloine.* 458 P.
- Rodhain, F. 2000. Impacts sur la santé: le cas des maladies à vecteurs. In: Impacts potentiels du changement climatique en France au XXIe siècle, Mission interministérielle de l'effet de serre, Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, Paris, pp : 122-127.
- Rondani, C. 1843. Species italicae generis hebotomi, Rndn ex insectis dipteris: *fragmentum septimum ad inveniendam dipterologiam italicam.* *Am. Soc. Ent. Fr.*, 2 pp: 263-267.
- Sabri, M. 1994. Leishmanioses humaines: diagnostic séro-immunologique et identification enzymatique des agents pathogènes. DES. Fac. Sci Semlalia Univ. Cadi Ayyad, Marrakech.

- Schlein, Y. et Yuval, B. 1987. Leishmaniasis in the Jordan Valley. IV. Attraction of *phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to plants in the field. *J. Med. Entomol.*, 24 pp: 87-90.
- Schnur, L. F., Nasereddin, A., Eisenberger, C. L., Jaffe, C. L., El Fari, M., Azmi, K., Anders, G., Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., Dedet, J.P., Pratlong, F., Kanaan, M., Grossman, T., Jacobson, R. L., Schonian, G. et Warburg, A., 2004. Multivarious characterization of *Leishmania tropica* from a judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70 pp: 364-372.
- Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N. et al. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47 pp: 349–358.
- Seaton, R.A. 1999. Out-patient parenteral antimicrobial therapy—a viable option for the management of cutaneous leishmaniasis. *Q. J. Med.* 92(11) pp: 659-67.
- Sharifi, I., Fekri, AR., Aflatonian, MR., Nadim, A., Nikian, Y. et Kamesipour, A. 1998. Cutaneous leishmaniasis in primary school children in the south-eastern Iranian city of Bam, 1994–95. *Bull WHO* 76 pp: 289–93.
- Sharma, NL., Mahajan, VK. et Negi, AK. 2005a. Epidemiology of a new focus of localized cutaneous leishmaniasis in Himachal Pradesh. *J. Commun. Dis.* 37 pp: 275–9.
- Sharma, NL., Mahajan, VK., Kanga, A., Sood, A., Katoch, VM. et Mauricio, I. 2005b. Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in Himachal Pradesh, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72 pp: 819–24.
- Simonet, P. 1951. Remarques épidémiologiques sur six cas de bouton d’orient observées à Beni-Abbés (Sahara Oranais) en 1951. *Archs. Inst. Pasteur Algerie*, 29 pp: 222-224.
- Singh, K.V. 1999. Studies on the role of climatological factors in the distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in semi-arid areas of Rajasthan, India. *J. Arid Environ.* 42 pp: 43–48.

- Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., Basu, D., De Bruijn, M.H., Adhya, S., Mallik, K.K. et Barker, D.C. 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania kinetoplast* DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, 105 pp: 183-192.
- Souhail, M. 1994. La leishmaniose viscérale (revue de littérature nationale et internationale). Doctorat en Médecine, Fac. Médecine, Casablanca. Maroc. 90 p.
- Srinivasan, R., Panicker, K.N. et Dhanda, V. 1993. Population dynamics of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae) in Pondicherry, India. *Acta Trop.* 54 pp: 125-130.
- Svobodova, M. et Votypka, J. 2003. Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti*. *Microb. Infect.*, 5 pp: 471-474.
- Svobodova, M., Votypka, J., Peckova, J., Dvorak, V., Abedelmajeed, N., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L., Volf, P. et Wartburg, A. 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, Northern Israel, *Emerg. Infect. Dis.* 12 : 1860-1868.
- Unaids. 1998. *Leishmania* & HIV in gridlock. Division of control of tropical diseases & world health organisation: 29 p.
- Vaillant, F., 1970. Les exigences écologiques des larves de diptère psychodidae. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 95 (2) pp: 305-314.
- Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C. et Ebeling, S.B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 51(1) pp:133-42.
- Vialatte, C.H. & Parrot, L. 1920. Phlébotomes du Maroc. *Annales de l'Institut Pasteur de Tunisie*, 34 : 566 pp.
- Victoir, K., De Doncker, S., Cabrera, L., Alvarez, E., Arevalo, J., Llanoscentas, A., Le Ray, D., et Dujardin, J. C., 2003. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97 pp:80–87.
- Vieira, J.B. et Coelho, G.E. 1998. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 pp: 85-92.

- Vieria, V.P., Ferreira, A.L., Falqueto, A. 1999. Pesquisa do criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar (LT) no Estado do Espírito Santo, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 pp: 31-32.
- Volf, P., Ozbel, Y., Akkafa, F., Svobodova, M., Votypka, J. et Chang K.P. 2002. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J. Med. Entomol.* 39 pp: 12-15.
- Wasserberg, G., Abramsky, Z., Anders, G., El-Fari, M., Schoenian, G., Schnur, L., Kotler, B.P., Kabalo, I., et Warburg, A. 2002. The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host, and epidemiological implications, *Intl. J. Parasitol.* 32 pp: 133-143.
- Wasserberg, G., Yarom, I. et Warburg, A. 2003. Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts. *Med. Vet. Entomol.* 17 pp: 452–456.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J.P. et al. 1996. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucl. Acids* .24 pp: 1688-1694.
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., Javadian, E. et Tahvildare-Bidruni, G.H. 1995. *Leishmania major* MON-26 isolated from naturally infected *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Isfahan Province, Iran. *Acta Trop.* 59 pp: 279-282.
- Yaghoobi-Ershadi, MR., Hanafi-Bojd, AA., Akhavan, AA., Zahraei-Ramazani, AR., et Mohebbali, M. 2001. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Ardestan town, central Iran. *Acta Trop.* 79 pp: 115–21.
- Yaghoobi-Ershadi, MR., Hanafi-Bojd, AA., Javadian, E., Jafari, R., Zahraei-Ramazani, AR., et Mohebbali, M. 2002. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi Med. J.* 23 pp: 291–4.
- Yaghoobi-Ershadi., MR., Akhavan, AA., Zahraei-Ramazani, AV., Abai, MR., Ebrahimi, B., Vafaei-Nezhad, R. 2003. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health.* J. 9 pp: 816–26.

- Yaghoobi-Ershadi, MR., Jafari, R., et Hanafi-Bojd, AA. 2004. A new epidemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Ann. Saudi. Med.* 24 pp: 98–101.
- Yahia, H., Ready, P.D., Hamdani, A., Testa, J.M. et Guessous Idrissi, N. 2004. Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite.* 11 pp: 189-199.
- Yiougo, L., Sanon, T., et Ouedraogo, WS. 2007. Facteurs de recrudescence de la leishmaniose cutanée et ses conséquences socio économiques et sanitaires dans le secteur 30 de la ville de Ouagadougou. *Rapport de recherche de l'Institut International d'ingénierie de l'Eau et de l'Environnement.* 103p.
- Yuval, B., Warburg, A., et Schlein, Y. 1988. Leishmaniasis in the Jordan Valley, V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*, *Med. Vet. Entomol.* 2 pp: 391-395.
- Zare, S., et Baghestani, S. 2001. Cutaneous leishmaniasis in Hormozgan, Iran. *Int. J. Dermatol.* 40 (10) pp: 629-31.

ANNEXES

Fiche d'Enquête De La Leishmaniose

- Nom prénom :
- Ville/village/secteur :
- Age:..... - Sexe : M F
- Prof du père : AC AG COM FONC AUT
- Prof de la mère TD TA AUT
- Niveau d'instr du père AC EC P S SUP
- Niv d'instr de la mère AC EC P S SUP
- Avoir idée sur leish N O
- L'appar de leis 1an 2 3 4 >4
- Habitat DUR S DUR AUT
- Source d'elcr BG LP ELCTE
- Le malade hab l'endroit 1an 2 3 4 >4
- Dere ann lieu Date..... Durée.....
- Cas Suspect Maison... Entourage
- Pres d'anim à la Maison N O
- INT EXT (Nbr.....)
- Exist de chien à la Maison N O
- Ds la localité N O (Nbr.....)
- Exist de terr ds loc /entrage N O
- ACT (nbre...) PASS (nbre.....)
- Aspersion en maison N O
- Au douar N O
- Infection 1ére Rechute (Récidive)
- Origine de l'infec Auto Introd
- Import
- Dépenses par semaine.....
- Statut d'occup : PROP LOCAT
- PRET AUT

- Type d'évacuation des ordures -Exist de daya acoté de la maison N O

- P.FOYER P COLL RAM PUB SEGUIA

- Distance <50m <100 <200 >200 -Moustiq N O IND MAIS
- I/M

- Toilette ABSC PRIV COLLECTIVE -Etable N O INT EXT

- Réseau d'assiniss Innex Ciel Ouvert F.Septiq -Etat d'aération N O

- La maison aerée Faibl Moy Bonne -Sommeil en été M A.L C N.C

- T.de prélèvement F.Cut Serol F.De La Moelle -Vêtement en été court long

- BP NFS -L'mpact de leish ASTH ↘APET

- Maladie en coïncidence. ↘Activite AUT (.....)

- Résultat Positif Négatif - T de dépistage Act Pass AUT

- Aspect de la lésion Rouge AUT (.....) -Eloig des insec N O (Résultat : N O

- Localisation V M P AUT (.....) -Fac limitant l'accès au ttt TRSPRT DIST

- Diamètre de la lésion..... Imprt D Rout TTT Diffi AUT (.....)

- Nombre 1 2 3 4 >4 -Période de piqure ETE AUT PRIN

- Date Début De Traitement..... HV NC

- Date Fin Traitement..... -Moment de piqûre MATIN MIDI SOIR

- Nbr D Séance D'inj 1 2 3 AUT (...) - Cas de Leish /tot Maison.....Entourage...

Annexe : Préparation des réactifs

❖ Tampon de lyse:

On mélange 1, 46 g NaCl (Cf =50 mM/l), 10 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) (Cf =10 mM/l) avec 25 ml Tris.HCl (1 M, pH 7.4). On complète le volume à 500 ml avec H₂O distillée. Par la suite, on autoclave, avant de Stocker et garder la solution stérile à 4 °C.

❖ 5 M NaCl

Dissoudre 292 g de NaCl dans 800 ml d'H₂O, puis Ajuster le volume à un litre avec H₂O et Stocker la solution NaCl à température ambiante.

❖ Phénol

Le Phénol est commercialisé pour la séparation DNA/RNA avec spécification biologie moléculaire. Il est saturé avec le tampon Tris EDTA (10mM Tris pH 7.5-8.0; 1mM EDTA-Na₂. et stocké à 4 °C.

❖ 10% SDS

Dissoudre 10 g SDS conçu pour électrophorèse dans 90 ml d'H₂O et maintenir à 68 °C plus agitation pour permettre la dissolution. Si nécessaire, ajustez le pH à 7.2 en ajoutant des gouttes de HCl. Ajustez le volume à 100 ml avant de Stoker à température ambiante.

❖ Acétate de sodium (pH 5.2)

Na-Acétate PM= 24,60 g (88x3= 246g pour 1litre). Dissoudre 24,6 g (3* m. wt) de Na-Acétate dans 50-60 ml d'H₂O et ajuster le pH à 5.2 avec le concentré d'acide acétique glacial avant d'ajuster le volume à 100 ml avec l' H₂O. On procède à une autoclave et on garde à 4°c jusqu'à un an.

❖ 1M Tris- HCl

Dissoudre 121.1 g (m.wt) du **Tris base** dans 800 ml d'H₂O, et ajuster le pH à la valeur désirée en additionnant le HCl concentré.

PH HCL

7.4 70 ml

7.6 60 ml

8.0 42 ml

Ajustez le volume de la solution à 1 litre avec H₂O avant de procéder à un autoclavage.



Full Length Article

Cutaneous Leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Morocco): Micro-Environmental and Socio-Economical Risk Factors

HASSAN ARROUB, ABDELAZIZ ALAOUI¹, MERYEM LEMRANI[†] AND KHALID HABBARI

Laboratory of Management and Valorization of Natural Resources, FST, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco

[†]Laboratory of Leishmaniasis, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

¹Corresponding author's e-mail: alaouiabd2000@yahoo.fr

ABSTRACT

The region of Foug Jamâa (province of Azilal in the Atlas of Morocco) has become an endemic for Cutaneous Leishmaniasis (CL). This study reports the micro-environmental and socio-economical factors that may act as a risk factor of recrudescence of this parasitic disease. These epidemiological assessments were conducted from January 2006 to December 2009 on a total of 655 patients. Among CL positives cases, free distribution tests were used to analyze the effect of each factor. No association between gender and the rate of Leishmaniasis was observed, while the highest rate of positive lesions was found in the age group of 10 years or under. The distribution of positive cases was more significantly influenced by environmental factors common to each sector (Altitude, Sewerage, Garbage, etc.) than by individual specific lifestyle (Habitat type, Lighting, Toilet, etc.). The survey yielded many recommendations to be made in planning a more accurate program of Leishmaniasis Control and many preventive actions to be undertaken to tone down the drawbacks of urbanization. © 2011 Friends Science Publishers

Key Words: Cutaneous leishmaniasis; Risk factor; Foug jamâa

INTRODUCTION

Leishmaniasis are parasitic diseases with a wide range of clinical symptoms and currently threaten 350 million persons in 88 countries (OMS, 2006). Cutaneous Leishmaniasis (CL) are caused by three clinically important *Leishmania* species (*L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*), a flagellate protozoa of the family Trypanosomatidae. In 2001, the Moroccan Ministry of Health (MMH) reported 2028 CL cases caused by *L. major* and *L. tropica* (Boussaa *et al.*, 2005). *L. tropica* has the largest geographic distribution and is considered a public health threat by the MMH. *L. tropica* CL has been reported in many areas of Morocco including the province of Azilal (Marty *et al.*, 1989; Guessous-Idrissi *et al.*, 1997; Chiheb *et al.*, 1999; Rhajaoui *et al.*, 2004; Guernaoui *et al.*, 2005). *Leishmania* infection is transmitted to human host as a result of a bite by an infected female sand fly of the genus *Phlebotomus* on exposed parts of the human body. In the Mediterranean countries, *P. papatasi*, and *P. sergenti* are the most common vectors for the spread of, respectively *L. major* and *L. tropica* (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000).

It seems obvious that Foug Jamâa (FJ) was free from CL before 1990; the first cases that have been

recorded by the provincial delegation of health goes back to 1996 and 1997 in Tanant, at 16 km from Foug Jamâa. Early in 2000, several provincial centers declared some scattered cases in Foug Jamâa. Several years later (2004-2007), the region saw a higher predominance of CL with a rate of impact of 0.06-0.45% in 2007. Geographically and socio-economically, Foug Jamâa constitutes a crossroads of several human daily activities in the province of Azilal; therefore, the area initially rural becomes more and more urban. The efforts done by the MMH between 2006 and 2009 have stabilized the number of new cases in the region (Arroub *et al.*, 2010); nevertheless, the disease is still persistent and may pickup at any time.

Actually, like many towns in the Atlas of Morocco, the FJ region has known an important evolution; development mechanisms (industry, population growth, transport activities) exert an increasing pressure on this environment; therefore, this latter undergoes a rapid transformation and it is feared that the CL may recur with renewed intensity (Ready, 2008). In addition to the high economic cost of the disease treatment, CL causes many social problems for patients (Yiougou *et al.*, 2007) and sometimes even after recovery, when it leaves undesirable scars on the face. Preventive actions and elimination of risk factors are the most appropriate strategies against CL.

We questioned on the actual environmental and socio-economical factors that may incubate the inoculums and/or enhance the spreading of newly introduced cases into the FJ area (Azilal).

MATERIALS AND METHODS

Study area: Studies were conducted in 3 adjacent sectors in Foum Jamâa region, the province of Azilal, Atlas of Morocco (Fig. 1). The three sectors are Beni Hassan (BH), Foum Jamâa (FJ) and Tabia (T), they comprise 48 localities (Table I) with a total area of about 63000 ha. The maximum and minimum mean monthly temperatures were respectively 45°C (August) and 10°C (December), and the rainfall is relatively low with two peaks; one in autumn (November to December) and the second in Spring (March & April).

Sampling: Total population in the three sectors is about 30.000. The survey was conducted with the collaboration of the MMH provincial centers, new CL cases includes passive case and active case detection during epidemiological assessments from January 2006 to December 2009. The total number of patients was 655.

Diagnosis of CL: From each patient, smears (Giemsa-stained slides) were prepared from scrapings of the edge of skin lesions. Direct microscopic examination ($G \times 1000$) was used for the detection of *Leishmania* amastigotes, which indicates the positive skin lesion, and the samples were considered to be negative after at least two observations from different preparations of the same skin lesion.

Epidemiological survey: For each patient, a questionnaire has been filled, in which we have recorded all information about:

- patient and/or family, (date, name, age, gender...),
- socio-economical conditions (job, weekly expenditure, grade...),
- micro-ecological data (habitat type, source of light, house aeration, sewerage, toilet, breeding, dogs,...).

Statistical analysis: Data were analyzed using non-parametric χ^2 tests because sometimes the number of samples (or class) was small, and there was no certainty that the data were normally distributed. For χ^2 test of independence between two variables and for χ^2 test between observed and expected values of each variable, the null hypothesis was respectively the independence between variables and the equal distribution of positive cases between the classes of each variable. For all test, the significance level was 0.05.

RESULTS

From the three major sectors of Foum Jamâa area (Beni Hassan, Foum Jamâa & Tabia), a total of 655 patients of both sexes and different age groups were

included in the study, they came from 48 localities (Table I). The patients included 295 (45%) males with 213 (82.1%) positive lesions and 360 (55%) females with 266 (73.4%) positive CL (Table II).

Statistical analysis showed a weak significant differences in the CL prevalence between the two genders ($p = 0.04$), 56 and 44% of females and males, respectively (Table II), this may be relevant further to the natural sex ratio than gender. The disease has been found very significantly prevalent in the age group of 9 years or under ($p \leq 0.0001$), followed by the group of 10 to 19 years (Table II).

From 2006 to 2008, temporal evolution of the number of new CL positive cases was relatively stable, but a significant increase was detected in 2009 (36.5%, $p \leq 10^{-4}$). Most patients (97.5%) are originally from Foum Jamâa, and all of them are Moroccans (Table III). A few positive cases (1,7%, $p \leq 10^{-4}$) reported that the first occurrence of CL goes back to 5 years or above, 56% of patients, the date of onset of lesions did not exceed 2 years, for the others it was between 3 to 4 years.

The Fig. 2 and 3 summarize the result of repartition of the 479 positive cases according to studied parameters. Results of non parametric χ^2 test was reported on graphs, letters a and b indicate, respectively that the observed value is significantly lower or greater than that expected according to the null hypothesis of equal distribution of the 479 positives cases between all modalities of each parameter, all values were reported in terms of percentage of the total positive cases.

Among the three sectors of FJ region, Tabia shows significantly the lowest number of positive cases (6.3%, $p \leq 10^{-4}$), and there is almost no difference between the two other sectors (BH & FJ) with respectively 44.7% and 49.1% [Fig. 2(1)]. The repartition of the positive cases according to altitude [Fig. 2(2)] was very significant ($p \leq 10^{-4}$), the highest number of positive cases (88.3%) was recorded at intermediate elevation (between 700 to 900 m). Percent of positive cases was significantly lower (25.3%, $p = 7.10^{-4}$) when precipitation didn't exceed 300 mm [Fig. 2(3)]. χ^2 test of independence has shown that the independence between sector and rainfall was not significant ($p = 0.98$), which is accepted given the variation of rainfall in the whole region, but independence between sector and Altitude was strongly significant ($p \leq 10^{-4}$).

Micro-environmental factors around patients' houses seem to have direct impact on CL infection. Among the three modes of household refuse evacuation, namely: private focus (pf), public garbage collection (rp) and throw away in the river (sg), 83.7% of the patients declared that their family had a private focus of garbage [Fig. 3(1)], this percent was significantly higher ($p \leq 10^{-4}$). Distance from the focus was about 50 m for 80% of positive cases, this proportion was too significant [$p \leq 10^{-4}$, Fig. 3(2)], and was nearly the same as those of families disposed of private focus. The presence or absence of the

Table I: Cutaneous Leishmaniasis in three sectors and localities of the Foum Jamâa area (Azilal, Morocco) and from 2006 to 2009

Sector	Locality	Z (m)	X	Y	Tested	Pos. (%)
Beni Hssan	Ait abdrhman	664	6° 53' 04	32° 03' 18	17	52,9
	Ait alikdour	717	6° 59' 38	32° 00' 33	22	68,2
	Ait bouchaou	808	6° 55' 23	32° 01' 53	14	85,7
	Ait hmou	716	7° 00' 31	31° 59' 58	14	100,0
	Ait mkhlouf 1	729	6° 59' 16	32° 00' 08	27	92,6
	Ait mkhlouf 2	735	6° 58' 53	32° 01' 23	25	68,0
	Ait mnssor	793	6° 56' 04	32° 02' 17	3	100,0
	Ait ojaïda	749	6° 58' 40	32° 01' 48	68	64,7
	Asknbr	625	6° 54' 47	32° 03' 41	6	100,0
	Ichlaone	800	6° 54' 52	32° 00' 38	2	100,0
	Idaadar	832	6° 55' 20	32° 00' 25	1	100,0
	Ifrgan	801	6° 55' 48	32° 02' 14	5	100,0
	Igout	523	6° 54' 30	32° 05' 05	1	100,0
	Imintalate	774	6° 56' 46	32° 02' 15	5	40,0
	Maskaon	810	6° 56' 14	32° 00' 06	26	100,0
	Taorirt	771	6° 57' 56	32° 02' 10	44	54,5
	Tizi issalen	823	6° 55' 44	32° 00' 53	1	0,0
	Sub-total tested				281	73,3
Foum Jamâa	Afrao	735	7° 00' 13	31° 58' 10	10	70,0
	Ait alibnsalm	900	6° 59' 24	31° 56' 48	10	80,0
	Ait ameur	965	6° 57' 42	31° 57' 04	10	90,0
	Ait bouaddi	842	6° 58' 55	31° 57' 26	10	20,0
	Ait bousaid 1	950	6° 58' 18	31° 57' 02	3	100,0
	Ait bousaid 2	1086	6° 58' 39	31° 56' 21	2	50,0
	Ait chlha	922	6° 58' 35	31° 57' 11	6	83,3
	Ait foundou	836	6° 58' 50	31° 57' 33	30	80,0
	Ait hmïda	879	6° 58' 33	31° 57' 48	24	95,8
	Ait omhyya	788	6° 59' 30	31° 57' 50	5	60,0
	Ait omlaid	1030	6° 57' 04	31° 57' 03	9	77,8
	Ait sos	936	6° 58' 16	31° 57' 12	4	75,0
	Igramm	831	6° 59' 03	31° 57' 35	42	50,0
	Ihjjam	802	6° 59' 12	31° 57' 47	31	83,9
	Imzoar	816	6° 58' 58	31° 57' 42	37	81,1
	Issalen	978	6° 57' 30	31° 57' 22	6	66,7
	Maadin	780	6° 59' 46	31° 57' 13	4	75,0
	Mkossa	731	7° 01' 34	31° 59' 39	26	65,4
	Mllah	810	6° 59' 13	31° 57' 43	11	63,6
	Tagant	797	6° 57' 31	31° 59' 01	5	60,0
Tajgagalt	755	7° 00' 40	31° 56' 58	27	81,5	
Tiddarin	847	6° 58' 74	31° 57' 43	8	75,0	
Tirimzi	872	6° 58' 58	31° 57' 15	9	77,8	
Zourz	1035	6° 56' 23	31° 57' 46	5	80,0	
	Sub-total tested				334	73,4
Tabia	Agmroul	703	6° 51' 12	31° 58' 38	8	87,5
	Ait sellam	735	6° 49' 11	31° 59' 12	3	33,3
	Bolfrissi	802	6° 54' 52	32° 00' 37	6	16,7
	Guimi	811	6° 55' 03	32° 00' 12	4	75,0
	Imchihh	802	6° 54' 52	32° 00' 37	8	87,5
	Tarra	805	6° 54' 38	32° 00' 49	2	100,0
	Tisslit	855	6° 50' 52	31° 57' 29	9	77,8
	Sub-total tested				40	70,0
Grand Total					655	73,1

toilet didn't have significant effect ($p=0.061$) on positive cases repartition [Fig. 3(3)].

In the houses with sewerage services, the percent of CL positive cases was significantly lower (22.3% , $p\leq 10^{-4}$), the absence of this infrastructure in the houses coincided with the higher percent of positive cases (77.7% , $p\leq 10^{-4}$, Fig. 3(4)). The habitat type was represented by two main types of home construction with equal frequency as concluded from our field observations.

The traditional method uses local materials (mixture of soil & straw) and the recent construction using concrete, so the house was qualified as permanent structure. The percent of positive cases was significantly (24.6% , $p\leq 10^{-4}$) lower in the first type while it was significantly important (75.4% , $p\leq 10^{-4}$) in permanent structure [Fig. 3(5)].

According to the source of light, positives cases were divided into two groups with significantly different

Table II: The prevalence of Cutaneous Leishmaniasis by age and sex in Foum Jamâa region (Azilal, Morocco) recorded from 2006 to 2009. PP: proportion in the 479 positives cases. *(p = 0.04); ** (p ≤ 0.0001)

Age group (years)	Sex						Total	PP(%)**		
	Female			Male						
	n	Positive	(%)	n	Positive	(%)				
0-9	246	178	72,4	201	144	71,6	447	322	72,0	67
10_19	84	67	79,8	76	54	71,1	160	121	75,6	25
20-29	8	8	100,0	5	5	100,0	13	13	100,0	3
30-39	9	3	33,3	6	3	50,0	15	6	40,0	1
40-49	8	6	75,0	3	3	100,0	11	9	81,8	2
50 & above	5	4	80,0	4	4	100,0	9	8	88,9	2
Total	360	266	73,4	295	213	82,1	655	479	73,1	100
PP(%)*		56			44					

Table III: Positive Cutaneous Leishmaniasis by years of study and patient origin in Foum Jamâa region (Azilal, Morocco) recorded from 2006 to 2009. PP: proportion in the 479 positives cases. *(p ≤ 0.0001)

Years	Originaire			Foreign			Total			PP(%)*
	n	Positive	(%)	n	Positive	(%)	n	Positive	(%)	
2006	93	66	71	3	2	67	96	68	71	14,2
2007	151	118	78	2	2	100	153	120	78	25,1
2008	163	114	70	2	1	50	165	115	70	24,0
2009	232	169	73	9	7	78	241	176	73	36,7
Total	639	467	73	16	12	74	655	479	73,1	
PP(%)*		97,5			2,5				73,00	100,0

percent [$p \leq 10^{-4}$, Fig. 3(6)], 93.5% of positive cases was from houses using electricity as a source of light, and only 6.5% among those using lamps and/or candles.

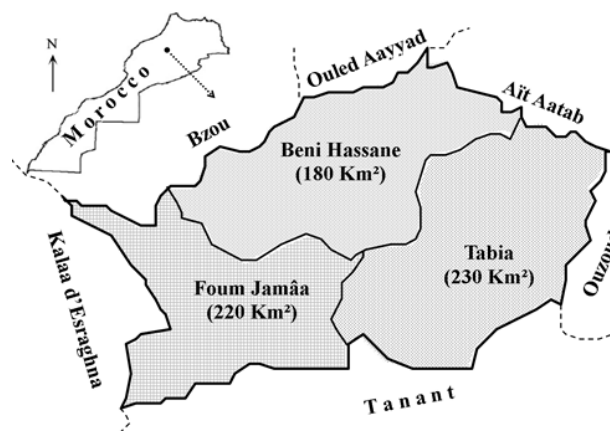
House aeration, animal breeding, and number of dogs around the house were also subjects of this investigation. For the first factor, we distinguished between three levels of habitat aeration: good, intermediate and poorly aerated. The percent of positive cases are respectively 68.5%, 20.5% and 11.1% [Fig. 3(7)]. The number of CL infection was more important with increasing aeration and the value 68.5% was statistically highly significant ($p \leq 10^{-4}$) than the two others.

According to animal breeding, the lowest statistically significant percentage of positive cases (20.3%, $p \leq 10^{-4}$) was found among farmers with livestock outside the house [Fig. 3(8)]. While there was no significant difference between the two states of animal breeding inside habitat and absence of breeding, respectively 37.6% and 42.2%. The factor of the number of dogs, both domestic and stray dogs, was apparently more linked to positivity. The percent of positive cases was significantly higher [74.1%, $p \leq 10^{-4}$, Fig. 3(9)], where 2 or more dogs were present.

DISCUSSION

For the first time, an epidemiological study of CL in FJ region, province of Azilal, has been carried out based on cases reported between 2006 and 2009. The region is administratively divided into three sectors of nearly equal surface (Beni Hssan, Foum Jamâa *sensu stricto* & Tabia). Fieldwork observation highlights a strong heterogeneity

Fig. 1: Position of the Foum Jamâa region (province of Azilal) indicated by red spot in Moroccan map, the surfaces of the three sectors (Beni Hssan, Foum Jamâa, Tabia) are indicated in between bracket below each corresponding sectors name



in the ecological, socio-economical conditions in FJ area and this affects the spatial distribution of the CL disease.

In addition to differences between sectors owing to population density, altitude may contribute to the persistence of CL. Distribution of positives cases according to altitude suggests a transmission by one species of *Phlebotomus* in the region, which has preference of altitude between 700 to 900 m above sea level, this hypothesis was supported by clinical data given the predominance of one skin lesion aspect. Different species vectors will transmit with specificity different parasites species, and consequently each case must get specific treatment. According to Rioux *et al.* (1986),

Leishmania major was the parasite responsible of zoonotic leishmaniasis localized in South of Atlas Mountains of Morocco. According to Dedet (2001), the geographical distribution of Leishmaniasis was related to environmental conditions that can influence the distribution and density of both the sandfly vector and the mammalian reservoir host.

Fig. 2: Repartition of the Cutaneous Leishmaniasis positive cases (%CLPC) detected from 2006 to 2009 in Foum Jamâa region (province of Azilal, Morocco)

According to: 1: Sector (BH: Beni Hssan; FJ: Foum Jamâa; T: Tabia) ($p \leq 10^{-4}$), 2: Altitude (m) ($p \leq 10^{-4}$), 3: Precipitation (mm^3) ($p = 7.10^{-4}$). Letters a and b indicate a significant statistical difference between classes, respectively lower and greater, and p-value was indicated in between bracket for each factor

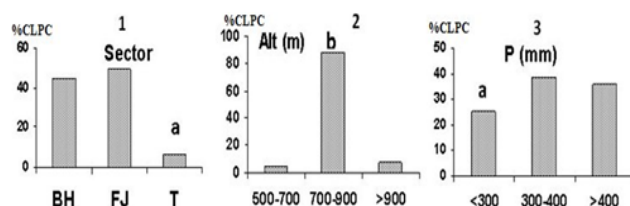
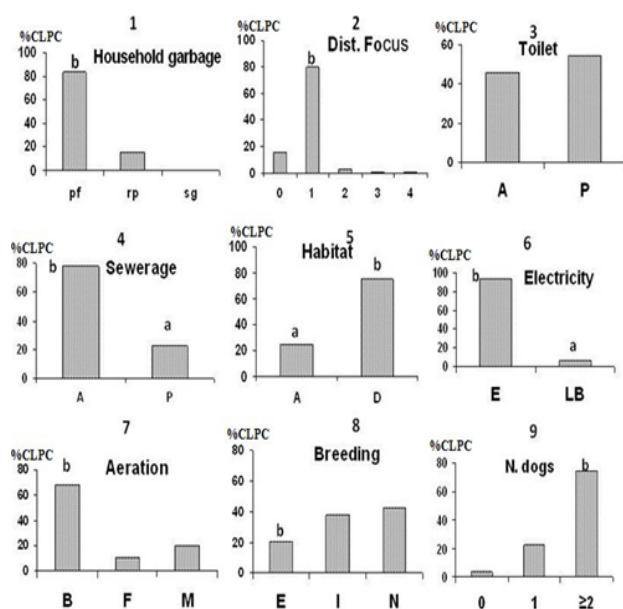


Fig. 3: Influence of micro-ecological factors on the repartition of Cutaneous Leishmaniasis positive cases (%CLPC) between 2006 and 2009 in the Foum Jamâa region (province of Azilal, Morocco)

1: household garbage (pf: private focus, rp: public garbage collection, sg: river) ($p \leq 10^{-4}$). 2: Distance to focus (0: no focus because of public garbage collection 1: <50m, 2: <100m, 3: <200m 4: >200) ($p \leq 10^{-4}$). 3: Toilet (A: absent, P: present) ($p = 0.061$). 4: Sewerage (A: absent, P: present) ($p \leq 10^{-4}$). 5: Habitat type (A: traditional, D: modern) ($p \leq 10^{-4}$). 6: Lighting source (E: electricity, LB: lamps and/or candles) ($p \leq 10^{-4}$). 7: Aeration of house (B: good, F: low, M: intermediate) ($p \leq 10^{-4}$). 8: Breeding (E: extern livestock, I: intern livestock, N: no breeding) ($p \leq 10^{-4}$). 9: Number of dogs around both domestic and stray dogs ($p \leq 10^{-4}$). Letters a and b indicate a significant statistical difference between classes, respectively lower and greater, and p-value was indicated in between bracket for each factor



Vulnerability of CL was independent to sex, indicating that both genders were equally affected, which is in consistency with the results of studies reported elsewhere (Sharifi *et al.*, 1998; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 2001; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 2002; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005a; Fazaelia *et al.*, 2009). While the weak observed difference was usually due to the unequal sex-ratio in the population, and most of these researches found that feminine sex was slightly more represented. Repartition of CL positive cases according to age was also in agreement with previous findings (Zare & Baghestani, 2001; Gurel *et al.*, 2002; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 2003; Aytakin *et al.*, 2006; Fazaelia *et al.*, 2009), that's in general CL affect more children of ≤ 10 than adult. Other studies showed that most highly infected age group with CL is person of ≤ 20 years old (Momeni & Aminjavaheri, 1994; Sharma *et al.*, 2005b). Two hypotheses can explain this; the first is that immunity system of children is still not well developed resulting inability of the body to fight CL infection and children tissues are too sensitive. The second is that adults have developed resistance to CL due to their previous exposure to the parasite, this last one may indicate the history of CL disease in the FJ region; positive cases belonging to age classes of more than 20 years old represent 7.1%, this significantly lower proportion may confirm that the first detection of CL in FJ region goes back up to earlier 1990.

Socioeconomic factors (job, education level, weekly expenditure) were also investigated in this study (data not shown). In FJ region there is no significant association between CL prevalence and occupation, the most prevalent group was children who are not yet involved with job, and occupation group of their father was also not significant because the most represented group has various types of work; nevertheless, their mothers' occupation was highly significant. The group of housework mothers represents 98.5% of CL positivity. Education level was significantly associated to CL prevalence, 43.6% and 86.2% was the percent of positive cases, respectively in the groups of patients' fathers and mothers that declared never been to school, and only 1.9% and 0.4% have attained university level. In this rural area, the illiteracy was widespread and actually an intense national program of reeducation surveyed by the Moroccan Ministry of Education is undertaken. Our inquiry also was itself a series of important awareness campaigns during the four years study. Finally we should note that the economic level (as indicated by weekly expenditure of each family) in the FJ region was too low to pay for CL treatment, but this parameter is not as important as the public consciousness raising, because of the agreement of MMH to bear full medical costs.

In the ancient country, household refuse were easily and quickly recyclable by nature, but in the emerging town, waste and industrial material pile up day after day, and an appropriate strategy of sewerage treatment does

not take place only rather late. The house aeration is a significant factor on CL propagation. Although good house aeration increases the risk, it will control many other diseases caused by bacteria and fungus. Among the preventive actions that we recommended was the use of mesh for windows to avoid insect bites. Houses supplied with electricity have more intense light and so are more attractive to sandfly than those using faint light of lamps or candles, but family members of this last case usually gather in one room when it's getting dark; therefore, the risk of local transmission between them becomes important.

The number of dogs was a significant risk factor. Stray and domestic dogs were equally frequent; domestic dogs are not properly maintained; therefore, both are the main reservoir host of zoonosis in the FJ region, indeed the domestic dog was the main reservoir host of Leishmaniasis (Ready, 2008). This disease threatens a large number of dogs in endemic areas, and it is difficult to control since no efficient vaccine exists and the chemotherapeutic agents have a limited efficacy and a high cost (Dedet & Pratlong, 2009).

Because of the growing urbanization, the following elements (sewerage, number of dogs, breeding, garbage), have strongly become factors of risk to the public health in FJ region. Thus, positivity is not only dependent on family lifestyle and the patient's environment since the limits of passive dispersion of vector species are too large than the relative geographic distance between localities. In FJ region, a heterogeneous environment in which, the coexistence of modern and traditional lifestyle is noticed. This transitory step between rural and city life created an unstable environment. The present study is designed to determine the epidemiological measures in FJ area and yielded many recommendations to be made in planning a more accurate control program by the National Program of Leishmaniasis Control supervised by the MMH.

Acknowledgement: The authors thank the Moroccan Ministry of Health (MMH) especially Doctors and nurses of provincial centres of Azilal, who helped in patients' identification and sampling. The authors are also very grateful to the English teacher Mr. Rahhal Ajbilou (Oued Alabid High School) for linguistic correction.

REFERENCES

Arroub, H., A. Alaoui and K. Habbari, 2010. *Etude Eco-Epidémiologique de la Leishmaniose Cutanée dans la Région de Foum Jamāa (Azilal, Maroc)*. Le Premier Colloque International sur les Changements Climatiques et Environnement, Faculté des Sciences, Rabat, Maroc

Aytekin, S., M. Ertem, O. Yağdıran and N. Aytekin, 2006. Clinicoepidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Diyarbakir Turkey. *Dermatol Online J.*, 30: 6

Boussaa, S., S. Guernaoui, B. Pesson and A. Boumezzough, 2005. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Tropica*, 95: 86–91

Chiheb, S., N. Guessous-Idrissi, A. Hamdani, M. Riyad, M. Bichichi and S. Hamdani, 1999. *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in an emerging focus in North Morocco: new clinical forms [in French]. *Annl. Dermatol. Venereol.*, 126: 419–422

Dedet, J.P., 2001. Répartition géographique des leishmanioses. *Méd. Mal. Infect.*, 31: 178–183

Dedet, J.P. and F. Pratlong, 2009. Leishmaniasis. *Manson's Tropical Diseases* London: Saunders Cook GC. *Zumla AL*, 22: 1341–1365

Fazaeli, A., B. Fouladi and I. Sharifi, 2009. Emergence of cutaneous leishmaniasis in a border area at south-east of Iran: an epidemiological survey. *J. Vector Borne Dis.*, 46: 36–42

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

Guessous-Idrissi, N., S. Chiheb, A. Hamdani, M. Riyad, M. Bichichi, S. Hamdani and A. Krimech, 1997. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 91: 660–663

Gurel, M.S., M. Ulukanligil and H. Ozbilge, 2002. Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997–2000). *Int. J. Dermatol.*, 41: 32–37

Kamhawi, S., G.B. Modi, P.F. Pimenta, E. Rowton, D.L. Sacks, 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, 121: 25–33

Marty, P., Y. Le Fichoux, F. Pratlong, J.A. Rioux, G. Rostain and J.P. Lacour, 1989. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a young Moroccan child observed in Nice, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83: 510

Momeni, A.Z. and M. Aminjavaheri, 1994. Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. *Int. J. Dermatol.*, 33: 260–265

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2006 *Lutte Contre La Leishmaniose*. Rapport du Secrétariat, Conseil exécutif du 11 Mai.

Pimenta, P.F., E.M. Saraiva, E. Rowton, G.B. Modi, L.A. Garraway and S.M. Beverley, 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 9155–9156

Ready, P.D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Climate change: impact on the epidemiology and control of animal diseases. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. De La Roque S.*, 27: 399–412

Rhajaoui, M., H. Fellah, F. Pratlong, J.P. Dedet and M. Lyagoubi, 2004. Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Transactions of the Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98: 299–301

Rioux, J.A., E. Guilvard, J. Derreure, G. Lanotte, E. Serres and A. Belmonte, 1986. Infestation naturelle du *P. papatasi* par *L. major* Mon. *Coll. Int CNRS/INSERM*, 25: 471–480

Sharifi, I., A.R. Fekri, M.R. Aflatonian, A. Nadim, Y. Nikian and A. Kamesipour, 1998. Cutaneous leishmaniasis in primary school children in the south-eastern Iranian city of Bam, 1994–1995. *Bull. WHO*, 76: 289–293

Sharma, N.L., V.K. Mahajan and A.K. Negi, 2005a. Epidemiology of a new focus of localized cutaneous leishmaniasis in Himachal Pradesh. *J. Commun. Dis.*, 37: 275–279

Sharma, N.L., V.K. Mahajan, A. Kanga, A. Sood, V.M. Katoch and I. Mauricio, 2005b. Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in Himachal Pradesh, India. *American J. Trop. Med. Hyg.*, 72: 819–824

Yaghoobi-Ershadi, M.R., A.A. Akhavan, A.V. Zahraei-Ramazani, M.R. Abai, B. Ebrahimi and R. Vafaei-Nezhad, 2003. Epidemiological study in a new focus of cutaneous Leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health. J.*, 9: 816–826

- Yaghoobi-Ershadi, M.R., A.A. Hanafi-Bojd, A.A. Akhavan, A.R. Zahrai-Ramazani and M. Mohebbali, 2001. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Ardestan town, central Iran. *Acta Trop.*, 79: 115–121
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., A.A. Hanafi-Bojd, E. Javadian, R. Jafari, A.R. Zahraei-Ramazani and M. Mohebbali, 2002. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania Tropica*. *Saudi Med. J.*, 23: 291–294
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., R. Jafari and A.A. Hanafi-Bojd, 2004. A new epidemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Annl. Saudi. Med.*, 24: 98–101
- Yiougo, L., T. Sanon and W.S. Ouedraogo, 2007. *Facteurs de Recrudescence de la Leishmaniose Cutanée et Ses Conséquences Socio Economiques et Sanitaires Dans le Secteur 30 de la Ville de Ouagadougou*, p: 103. Rapport de recherche de l'Institut International d'ingénierie de l'Eau et de l'Environnement
- Zare, S. and S. Baghestani, 2001. Cutaneous leishmaniasis in Hormozgan, Iran. *Int. J. Dermatol.*, 40: 629–631

(Received 11 October 2011; Accepted 17 October 2011)

Spatiotemporal distribution of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Atlas of Morocco)

Running title: Phlebotomine sand flies in Foug Jamâa

Hassan Arroub^{1*}, Abdelaaziz Alaoui¹, Hicham El Miri², Meryem Lemrani³ and Khalid Habbari¹

1. Laboratory of Management and Valorization of Natural Resources, FST, Sultan Moulay Slimane University, M'GHILA Route de Fes, B.P. 523, Beni Mellal 23000, Morocco.

2. Université Mohamed V Agdal, Faculté des Sciences Agdal, Rabat 10000, Morocco.

3. Laboratory of Leishmaniasis, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca 20000, Morocco.

*Corresponding author e-mail: olditahr@gmail.com

Abstract: An entomological survey of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) was carried out in three sectors of Foug Jamâa region (province of Azilal, Morocco) during the year 2010. Morphological identification was performed on a total of 1152 sand flies (23% females and 77% males) collected by sticky paper traps. 80% of the total collected flies were identified as *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* (Parrot) (57%) and *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* (Nitzulescu) (23%). In addition to these dominant species, four other species were found, *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* (Scopoli), *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani), *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (Newstead) and *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi* (Croset). Overall, the population dynamics show a yearly bimodal pattern related to rainfall and temperature, and with high density around human dwellings. The spatiotemporal distribution of sand fly species was helpful to discuss strategies that might be useful in controlling cutaneous leishmaniasis transmission in this endemic focus.

Key words: Phlebotomine sand flies, cutaneous leishmaniasis, temporal and spatial distribution, Foug Jamâa, Morocco.

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in large parts of Morocco and is caused by transmission of the parasite *Leishmania* through the bite of infected female Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae, *Phlebotomus*) [1, 2]. From a public health perspective, this is one of the most important emerging infectious diseases and was included in the list of notifiable diseases in Morocco. The total CL cases reported in 2008 were 5128 against 655 cases in 1998, showing a clear tendency for an increase in the last ten years [3]. In Morocco, CL caused by *Leishmania major* has been reported since 1914 [4], whereas, the first case due to *Leishmania tropica* has been reported in 1989 [5], more recent studies have incriminated *L. infantum* as causative agent of CL [6]. In the review of Kimutai et al. [7], the authors recommended the need for additional epidemiologic and ecologic studies of CL in conjunction with species identification.

In the province of Azilal, Fougues de la Méditerranée (FJ) region has become an epidemic focal point for CL. In our previous work focused on the eco-epidemiological and socioeconomic study the CL consists of a rural domestic form, which is characterized as affecting the whole family nucleus, without distinction in sex, due to the fact that dwellings are located near the natural focus of transmission; thus propitiating the vector's arrival in the house [8]. Geographically and socio-economically, FJ region constitutes a crossroads of several human daily activities in the province of Azilal and a bridge between two of the main towns of Morocco (Beni Mellal and Marrakech). During 4 years (2006 to 2009), we registered about 500 cases of CL in this region [8].

In Morocco as in many other countries; Saudi Arabia, Ethiopia, Turkey and Israel, *Phlebotomus sergenti* Parrot has been shown to transmit *L. tropica* [2, 9-12]. In addition, *Phlebotomus papatasi* Scopoli was proven to be a vector of *L. major* in Morocco [4]. The distribution of sand flies is due, in great part, to the bioclimate [13]; the effect of altitude factor was demonstrated [14]. In many parts of the world, it is suspected that the reemergence of the CL, in the last few decades, is associated indirectly to human activities that cause environmental changes, favorable to both the reservoir and the vector [15-16]. In FJ region Rapidly changing environmental conditions caused by habitat destruction, such as that associated with deforestation/urbanization processes could have an enormous influence on vector populations and consequently on disease transmission. There was no previous study on the diversity and the abundance of sand flies species within this region; while some CL vector species may disappear, others may become more abundant, additionally, vector species that hitherto had no presence in these zones can arrive, adapting to anthropogenic environmental conditions.

All of the above makes it necessary to evaluate the sand fly fauna and their distribution, to elucidate vector behavioral habits, population's densities, seasonal dynamics, feeding preferences or insecticide susceptibility patterns, which are the most important aspects for disease control. The lack of data on the sand flies diversity in this endemic region led us to initiate this study, which aims as a first step, to carry out a yearly entomological survey to determine; 1: the taxonomic composition of sand fly species vector; 2: the spatial and temporal distribution of the CL vector. The location selected for collections was the same one in which the first study on CL had been done. This allowed us

to shed more light on the cycle of the vector and designating factors responsible for the transmission of such disease as CL, both specific to the region studied. Results should help us to elaborate an effective program with more specific preventive actions such as the period of the year appropriate for insecticide treatment and the biotope that should be targeted during treatment.

2. Materials & Methods

Study sites

Study was conducted in Foug Jamâa region, the province of Azilal, Atlas of Morocco (Figure 1). The area was subdivided into 3 adjacent sectors, namely, Foug Jamâa (FJ), Beni Hassan1 (BH1) and Beni Hassan2 (BH2), overall cover about 400 square kilometers. This region is located near the Western High Atlas National Park (32° 08' N, - 6° 60' W) at different altitude from 523 to 1086 m. The agriculture remains the primary source of income and is mainly based on the production of wheat, almond, olive and lentils; domestic animals include rearing of chicken, sheep, cattle and horses. In addition, most homes have at least one dog. The villages are surrounded by mountains with some natural water sources and cactus, which serve as refuge for rodents and sugar source for sand flies. Excepting the sector of FJ, in which some modern houses exist, traditional constructions are the main type of habitat in the study area.

Monitoring sand flies

Sand flies monitoring were conducted on a total of 17 stations representing 8 main different biotopes in the region of FJ (henhouse, stable, cave, ruined house, dwelling, bridge, windows, outdoor) and regularly distributed to cover all supervised area. A one year

(2010) collections were made biweekly using sticky paper traps (21 cm × 27,3) impregnated with grapes oil. The same number of traps (6 traps) were installed for each station; they were recovered after one night of survey (between 6.p.m and 8.am). Collected sand flies were placed in glass vials containing 70% ethanol. After sex determination, all collected sand flies were mounted on glass slides, using Canada balsam, and were identified by morphological taxonomic keys according to Boussaa et al. [17]. Both preparation and identification of specimens were made individually. Monthly temperatures and rainfall were provided by the regional department of Moroccan national meteorology.

Statistical analysis

Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) in order to determine the significance of differences of total collected sand flies between sectors, months and biotopes. Shannon information index based on the matrix of presence/absence of each sandfly species was used to compare species diversity between sectors, calculated as: $H = -\sum_{i=1}^S (p_i \ln(p_i))$. With n_i : the number of individuals in species **i** or the **abundance of species i**. S The number of species, also called **species richness**. N The total number of all individuals. p_i The relative abundance of each species, calculated as the proportion of individuals of a given species to the total number of individuals in the community: n_i/N . This parameter allowed as to compare between sectors by a single diversity index which take into account even species abundance and species richness.

3. Results

3.1. Sandfly species diversity

In this study, a total of 1152 sand flies were collected using 2442 sticky traps from FJ region throughout the years 2010. Overall, six species were identified, consisting of five *Phlebotomus* spp. and one *Sergentomyia* (Table 1). The most dominant species was *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Parrot) (57%), followed by *P. (Larroussius) longicuspis* (Nitzulescu) (23%). These two abundant species constituted 80% of the total collected flies. *P. chabaudi* was the rarest species represented by one individual. The sex-ratio indicated that more males were collected than females for all species. The overall male/female ratio was 3.3:1. These traps also collected large numbers of non-target organisms, including non-biting flies and Lepidoptera.

3.2. Spatial distribution of sand flies

Occurrence of sand flies species in the three sectors of FJ was reported in Figure 2 and Table 2. One factor ANOVA indicates a significant difference ($p \leq 0.01$) between the three sectors. BH2 was the most infested sector ($n=677$, 59%), followed by BH1 ($n=365$, 32%) and FJ ($n=110$, 10%) was the lowest colonized. This was valid for all sand flies species except *S. minuta* which was more abundant in BH1 than in BH2. More accurate comparison of sectors in terms of number of sand flies collected must take into account the number of traps recuperated from each sector. The mean number of sticky traps was not significant between the three sector ($p=0.06$; Table 2). To catch one sandfly, in the same above experimental conditions, we have to put respectively 10, 2 and 1 traps within each of the sectors: FJ, BH1 and BH2. In general no dependence between species and sector, except for *P. chabaudi* that was represented by one individual in the sector BH1. All sand

flies species were present in the three sectors, Shannon information index, varied from 0.16 to 0.41, indicates that the BH2 sector was the most diverse (Table 2).

3.3. Temporal distribution of sand flies

Monthly monitoring of sand flies vector activity during the 1-year-study is shown in Figure 3. A total of 1152 sand flies were collected from January to December 2010. ANOVA has showed that the number of recovered traps between the twelve months was not significant ($p=0.08$), and the temporal fluctuation of population density was due to the seasonality. Sand flies flight activity of total population was strongly marked during two periods: the most important one, started in the end of March and reached a peak in June for all sand flies species except *S. minuta* which peaked during July, while the activity of the others species decreased to a minimum during this month. The second period of intense sand flies activity corresponds to August-October-November depending on sand flies species and fall to low levels in the end of November. During the months January to March and December no sand flies were captured. To understand the conditions that determine this temporal distribution of sand flies, we collected data of rainfall and temperature in the region of FJ, during 2010. The figure 4 shows the monthly cumulative rainfall (mm) and the mean monthly temperatures in this region. The maximum and minimum mean monthly temperatures were respectively 45°C (July) and 10°C (December), and the rainfall was relatively low with two peaks; one in autumn (60mm) (October to December) and the second in spring (100mm) (March and April).

3.4. Sand flies occurrence according to biotope

The distribution of the collected total number of sand flies according to biotope was shown in Fig. 5. The highest number of sand flies captured was observed in the stable with a value of 648 (56%) followed by dwelling, cave and stable-henhouse with about 14 to 10%, then windows, bridge, ruined house, henhouse and outdoor with less than 25 (2%) sand flies for each one. These results were valid for all sand flies species except for *S. minuta* which prefers the cave than stable and dwelling. Before interpreting these results, one should take into account the result of the one-way ANOVA applied for variable number of traps and number of sand flies. The number of recovered traps according to biotope factor was highly significant ($p \leq 10^{-4}$) and the mean number of sand flies collected was also highly significant ($p=0.0013$). The effect of biotope, although it interferes with the number of recovered sticky traps, was a significant factor that influences spatial distribution of sand flies. The stable biotope even had the significantly greater number of recovered traps however did not have the greater number of captured Sand flies. The figure 6 shows the number of Sand flies collected per biotope and explains more clearly that the dwelling was the first preferred biotope with population Sand flies density that might reach two folds of the other biotope (Student's t test, $p=0.0013$). The second group of favorite biotopes were stable, cave and stable-henhouse, and significantly a lower number of captured Sand flies were registered in the others biotopes (Windows, Bridge, Ruined house, Henhouse and Outdoor).

4. Discussion

Sandfly species diversity in FJ region

This study is the first one to deal with the taxonomic composition and the spatiotemporal distribution of Sand flies at the micro-geographical level in FJ region. The distribution and incidence of leishmaniasis are both influenced by human behavior and environmental variables affecting the vector and the reservoir populations. In FJ, the poor surveillance of the vector complicates the planning and implementation of control strategies.

During a single year, twice a month, in an altitude ranging between 532 and 1086m, the study of the sandfly fauna in FJ region identified six species. All of them are included in the list of 22 phlebotomine species existing in Morocco [18]. In order of abundance, *P. sergenti* comes the first with 57%, this is usually a dominant sandfly species in foci of anthroponotic CL in the Old World [19-20] and the study area is known to contain the highest genetic diversity of this species [21]. *Phlebotomus sergenti* is a main vector of *L. tropica* in Morocco, although in some specific areas (Saudi Arabia; Palestinian Territories) other Sand flies can play a role in *L. tropica* transmission [9, 12]. The second more abundant species was *P. longicuspis* representing 23% of the total capture. Among the six species, *P. papatasi* is known to be widely distributed throughout the world and often abundant [22] and was proven to be a vector of CL due to *L. major* [19]. *Phlebotomus chabaudi* was also suspected as vector of *L. tropica* [23].

Several types of traps are described in the literature [24-25], and most traps are adapted to very specific questions. Sticky papers are one of the standard surveillance techniques that have been used to collect adult phlebotomin Sand flies. Collectors are less exposed to the risk of leishmania infection. However, these traps often yield small or no

catches [26], so FJ region could include a greater density than that observed in our study. [27] used sticky traps, hand aspiration and CDC traps, and they choose to analyze sticky paper data to determine the seasonal trends in the sandfly density.

Sand flies collection with sticky traps caught more males than females, this confirms data obtained elsewhere using the same type of traps [28], also Feliciangeli *et al.* [29] found that males were almost twice abundant as females, while using CDC light traps [30] found that males sand flies account for 79% of the catch. Whereas, there were no significant differences between the number of males and females caught by light traps [31], several other studies used traps (different combinations of visual and chemical attractive features) that captured significantly more females than males [32-33]. Our results could be explained by the type of traps used rather than the disproportion in the natural sex-ratio of sand flies captured in FJ region. In addition, since the dispersion capacity is reduced for males than for females [34] due to the fact that females need blood meals for egg production every few days [35], and sand flies are generally considered to be poor fliers, not traveling from their breeding and resting sites [19]; therefore, the high number of captured males provides evidence of the presence of sand flies breeding sites around human habitations in FJ region, and that females-specific traps would be desirable for the control of sand flies around houses.

FJ region shows high biodiversity of phlebotomine fauna, with six species among 22 identified in Morocco [18]. Shannon information index takes into account the number of species and their frequency, so this index expresses more correctly the diversity of each sector. It was concluded clearly that the BH2 sector was the most diverse. The general

theories stipulated that diversity usually is reduced gradually from population origin to newly colonized areas. It appears that BH2 contains the reservoir of the population source. Preventive actions undertaken by the national program of leishmaniasis control, supervised by the Moroccan Ministry of Health, should be more focused in these zones.

Temporal distribution of sand flies

Sand fly seasonal trends in density expressed as the number of sand flies collected has showed two peaks, one in June and another late in August. This bimodal profile was nearly the same as those observed in other previous studies in different parts of the world; in Syria for *P. sergenti* and *P. papatasi* [27] and in Morocco for *P. papatasi*, *S. minuta* and *S. fallax* [36]. During the months January to March and December no sand flies were captured, due to severe weather conditions, which occurred in the region of FJ. The summer of 2010 in Moroccan was very hot, maximal temperature recorded in July reached 50°C and above; this explains the fall of population density of sand flies. When extreme temperatures were registered during the survey days or the month prior to sampling, vector activity and thus vector captures were limited [37]. The temperature is one of the main factors preventing the spread of leishmaniasis to Northern Europe [38]. Quate [39] classified the sand flies of the southern Sudan into two groups: “seasonal species” that appear only during the dry season, and “non-seasonal species” that exist throughout the whole year. Unlike the profile of seasonal occurrence of sand flies obtained in other parts of Morocco, in the urban area of Marrakech, for example, *P. papatasi* is active throughout the year [36]; no one of the six species identified in FJ region was active throughout the year 2010.

Sand flies occurrence according to biotope

Sand flies occurrence according to biotope shows that the dwelling was the favorite biotope at least for *P. sergenti* and *P. longicuspis*, the limited number of catch does not allow to clarify the preferred biotope of the other species. *Phlebotomus papatasi* has an endophilic distribution; it is largely found in domestic and peri-domestic habitats [40] and is an aggressive man biter [22]. In arid environments, this species is rarely found far from rodent burrows or human habitations [41]. *P. longicuspis* is also an anthropophilic species that prefers biotopes characterized by dense vegetation, close to human dwellings [42].

5. Conclusions

Based on the monthly collections of sand flies over one year in the FJ region where CL is known to be endemic, we suspect the incrimination of at least *P. sergenti* and *P. longicuspis* in the CL transmission in FJ. In addition to the endophilic character, the presence of attractive vegetation, such as cactus [33], and the rural lifestyle enhance the presence of the resting and the breeding sites of the vector sand flies around the human dwelling.

Since most control efforts against sand flies are aimed at interrupting contact between female sand flies and human, several methods were used to accomplish this goal. Sand flies generally are highly susceptible to insecticides but it depends on the manner of exposure and contact [43]. Residual insecticide house-spraying has been used successfully against endophilic species [44]. Insecticide-impregnated curtains, bed nets, or bed covers were also used but with limited success against sand flies [45]. Barriers may be useful to stop incoming sand flies; In French Guiana, clearing the forest around a village, and fogging with insecticide to a radius of 400 m, reduced the sand fly density and the

incidence of leishmaniasis significantly, but it is not an acceptable method since it causes considerable damage to the environment [46]. In the region of study ,further knowledge on resting and breeding sites of sand flies are required to elaborate a plan to attack the adults or immature stages at outdoor sites. Also further investigations on isolating leishmania strains from vectors are needed to clarify the CL transmission risk, and to confirm the role of *P. sergenti* and probably the involving of *P. longicuspis* in the transmission of Leishmania in this CL focus. These well be the prospect aim in our group.

Acknowledgments

The authors are very grateful to the communities and the health district authorities of Fougues de la Rivière for their support of this study. We also thank the English teacher Mr. Rahhal Ajbilou (Oued Alabid High School) for linguistic correction.

REFERENCES

- [1] P. Desjeux, L. Waroquy, J.P. Dedet, Human cutaneous leishmaniasis in western Africa, *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 74 (1981) 414-425.
- [2] E. Guilvard, J.P. Rioux, G.M. Allego, F. Pratlong, J. Mahjour, E. Martinezorlega, J. Dereure, A. Saddiki, A. Martini, *Leishmania tropica* au Maroc III- Rôle de *Phlebotomus sergenti*, A propos de 89 isolats¹, *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66 (1991) 96-99.
- [3] Ministère Marocain de la Santé (MMS), Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies, Rapport annuel d'activités: Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires (2008).
- [4] J.A. Rioux, E. Guilvard, J. Dereure, G. Lanotte, M. Denial, F. Pratlong, E. Serres, A. Belmonte, Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25, A propos de 28 souches isolées dans un foyer du Sud Marocain, In: *Leishmania, Taxinomie et Phylogénèse, Applications éco-épidémiologiques*, (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984), IMEEE, Montpellier, France, (1986) 471-480.
- [5] P. Marty, Y. Le Fichoux, F. Pratlong, J.A. Rioux, G. Rostain, J.P. Lacour, Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a young Moroccan child observed in Nice, France, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83 (1989) 510.
- [6] M. Lemrani, R. Nejjar, A. Benslimane, A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmani infantum* in northern Morocco, *Giornale Italiano di Medicina Tropicale* 4 (1999) 3-4.
- [7] A. Kimutai, P.K. Ngure, W.K. Tonui, M.M. Gicheru, L.B. Nyamwamu, Leishmaniasis in northern and western africa: a review, *Afr. J. Infect. Dis.* 3(1) (2009) 14-25.
- [8] H. Arroub, A. Alaoui, M. Lemrani, K. Habbari, Cutaneous leishmaniasis in foug jamâa (Azilal, Morocco): microenvironmental and socio-economical risk factors, *J. Agric. Soc. Sci.* 8 (2012) 10–16.

- [9] M.A. Al Zahrani, W. Peters, D.A. Evans, C. Chin, V. Smith, R.P. Lane, *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82 (1988) 416.
- [10] T. Gebre-Michael, M. Balkew, A. Ali, A. Ludovisi, M. Gramiccia, The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopia* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (2004) 64-70.
- [11] A. Pazarbasi, D. Alptekin, H.U. Luleyap, M. Kasap, H. Kasap, Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of natural leishmania infections in phlebotomine sandflies from southeastern Turkey, *Journal of Medical Entomology* 43 (2006) 248-251.
- [12] M. Svobodova, J. Votypka, J. Peckova, V. Dvorak, N. Abdelmajeed, G. Baneth, J. Sztern, V. Kravchenko, A. Orr, D. Meir, L. Schnur, P. Volf, A. Warburg, Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1860-1868.
- [13] J.A. Rioux, S. de La Rocque, Climats, leishmanioses et trypanosomiasés. Changements climatiques, maladies infectieuses et allergiques, *Ann. Inst. Past.* 16 (2003) 41-62.
- [14] S. Guernaoui, B. Pesson, A. Boumezzough, G. Pichon, Distribution of phlebotomine sand flies, of the subgenus *Larroussius*, in Morocco, *Med. Vet. Entomol.* 19 (2005) 111-115.
- [15] G. Wasserberg, Z. Abramsky, B.P. Kotler, R.S. Ostfeld, A. Warburg, Anthropogenic disturbances enhance occurrence of cutaneous leishmaniasis in Israel deserts, *Ecol. Appl.* 13 (2003a) 868-881.
- [16] G. Wasserberg, I. Yarom, A. Warburg, Seasonal abundance patterns of the sand fly *Phlebotomus papatasi* in climatically distinct foci of cutaneous leishmaniasis in Israeli deserts, *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003b) 452-456.
- [17] S. Boussaa, A. Boumezzough, P.E. Remy, N. Glasser, B. Pesson, Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus*

- longicuspis (Diptera: Psychodidae) in Southern Morocco Acta Trop, 106 (2008) 184-189.
- [18] Anon, Lutte contre les leishmanioses, Guide des activités, Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies, Service des Maladies parasitaires, Ministère de la Santé, Maroc, 1997.
- [19] R. Killick-Kendrick, Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review, Med. Vet. Entomol. 4 (1990) 1-24.
- [20] L.F. Schnur, A. Nasereddin, C.L. Eisenberger, C.L. Jaffe, M. El Fari, K. Azmi, G. Anders, M. Killick-Kendrick, R. Killick-Kendrick, J.P. Dedet, F. Pratlong, M. Kanaan, T. Grossman, R.L. Jacobson, G. Schoenian, A. Wartburg, Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a Judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector, Am. J. Trop. Med. Hyg. 69 (2004) 364-372.
- [21] H. Yahia, P.D. Ready, A. Hamrami, J.M. Testa, N. Guessous-Idrissi, Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*, Parasite 11 (2004) 189-199.
- [22] D.J. Lewis, R.D. Ward, Transmission, Vectors. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds.) Academic Press, London, 1 (1987) 551.
- [23] A. Bounamous, R. Boudabous, D. Jouet, D. Augot, H. Ferté, H. Babba, S. Berchi, J. Depaquit, Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnec & Rioux, 1970 et *Phlebotomus riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998, Parasite 15 (2008) 565–571.
- [24] C. Casanova, A soil emergence trap for collections of Phlebotomine sandflies, Mem. Instit. Oswaldo Cruz 96 (2001) 273-275.
- [25] V.P. Viera, A.L. Ferreira, A. Falqueto, Pesquisa do criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar (LT) no Estado do Espírito Santo, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32 (1999) 31-32.

- [26] J.A. Hogsette, H.A. Hanafi, U.R. Bernier, D.L. Kline, E.F. Fawaz, B.F. Furman, B.F. and D.F. Hoel, Discovery of diurnal resting sites of phlebotomine sand flies in a village in southern Egypt, *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 24 (2008) 601-603.
- [27] M. Maroli, L. Jalouk, M. AlAhmed, R. Bianchi, G. Bongiorno, C. Khoury, L. Gradoni, Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria, *Medical and Veterinary Entomology* 23 (2009) 148-154.
- [28] S. Boussaa, B. Pesson, A. Boumezzough, Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 101(8) (2007) 715-724.
- [29] D.M. Feliciangeli, O. Delgado, B. Suarez, A. Bravo, Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela, *Tropical Medicine and International Health* 11(12) (2006) 1785-1791.
- [30] V. Kravchenko, G. Wasserberg, A. Warburg, Bionomics of phlebotomine sandflies in the Galilee focus of cutaneous leishmaniasis in northern Israel, *Med. Vet. Entomol.* 18 (2004) 418-428.
- [31] G.C. Müller, Y. Schlein, Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*, *Journal of Vector Ecology* 36(1) (2011) 64-70.
- [32] D.L Kline, G.C Müller, J.A. Hogsette, Evaluation of propane combustion traps for the collection of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) in southern Israel, *Journal of Vector Ecology* 36(1) (2011) 166-171.
- [33] A. Junnila, G.C Müller, Y. Schlein, Attraction of *Phlebotomus papatasi* to common fruit in the field, *Journal of Vector Ecology* 36(1) (2011) 206-211.
- [34] B. Yuval, A. Warburg, Y. Schlein, Leishmaniasis in the Jordan Valley, V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*, *Med. Vet. Entomol.* 2 (1988) 391-395.
- [35] R. Killick-Kendrick, The biology and control of phlebotomine sand flies, *Clin. Dermatol.* 17 (1999) 279-289.

- [36] S. Boussaa, S. Guernaoui, B. Pesson, A. Boumezzough, Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco, *Acta Tropica*, 95 (2005) 86-91.
- [37] R. Galvez, M.A. Descalzo, G. Miro, M.I. Jimenez, O. Martin, F. Dos Santos-Brandao, I. Guerrero, E. Cubero, R. Molina, Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain, *Acta Trop.* 115 (2010) 95-112.
- [38] K.G. Kuhn, Global warming and leishmaniasis in Italy, *Bull. Trop. Med. Int. Health* 7 (1999) 1-2.
- [39] L.W. Quate, *Phlebotomus* sandflies of the Paloich Area in the Sudan (Diptera, Psychodidae), *J. Med. Entomol.* 1 (1964) 213-268.
- [40] L. Orshan, D. Szekely, Z. Khalfa, S. Bitton, Distribution and seasonality of *Phlebotomus* sand flies in cutaneous leishmaniasis foci, Judean Desert, Israel, *J. Med. Entomol.* 47 (2010) 319-328.
- [41] G. Wasserberg, Z. Abramsky, G. Anders, M. El-Fari, G. Schoenian, L. Schnur, B.P. Kotler, I. Kabalo, A. Warburg, The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host, and epidemiological implications, *Intl. J. Parasitol.* 32 (2002) 133-143.
- [42] S. Guernaoui, A. Boumezzough, Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco, *J. Med. Entomol.* 46 (2009) 1187-1194.
- [43] L. Orshan, D. Szekely, H. Schnur, A. Wilamowski, Y. Galer, S. Bitton, Y. Schlein, Attempts to control sandflies by insecticide-sprayed strips along the periphery of a village, *J. Vector Ecol.* 31 (2006) 113-117.
- [44] J.B. Vieira, G.E. Coelho, Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (1998) 85-92.
- [45] O. Courtenay, K. Gillingwater, P.A. Gomes, L.M. Garcez, C.R. Davies, Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households, *Med. Vet. Entomol.* 21 (2007) 168-176.

- [46] B. Alexander, M. Maroli, Control of phlebotomine sand flies, *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003) 1-18.

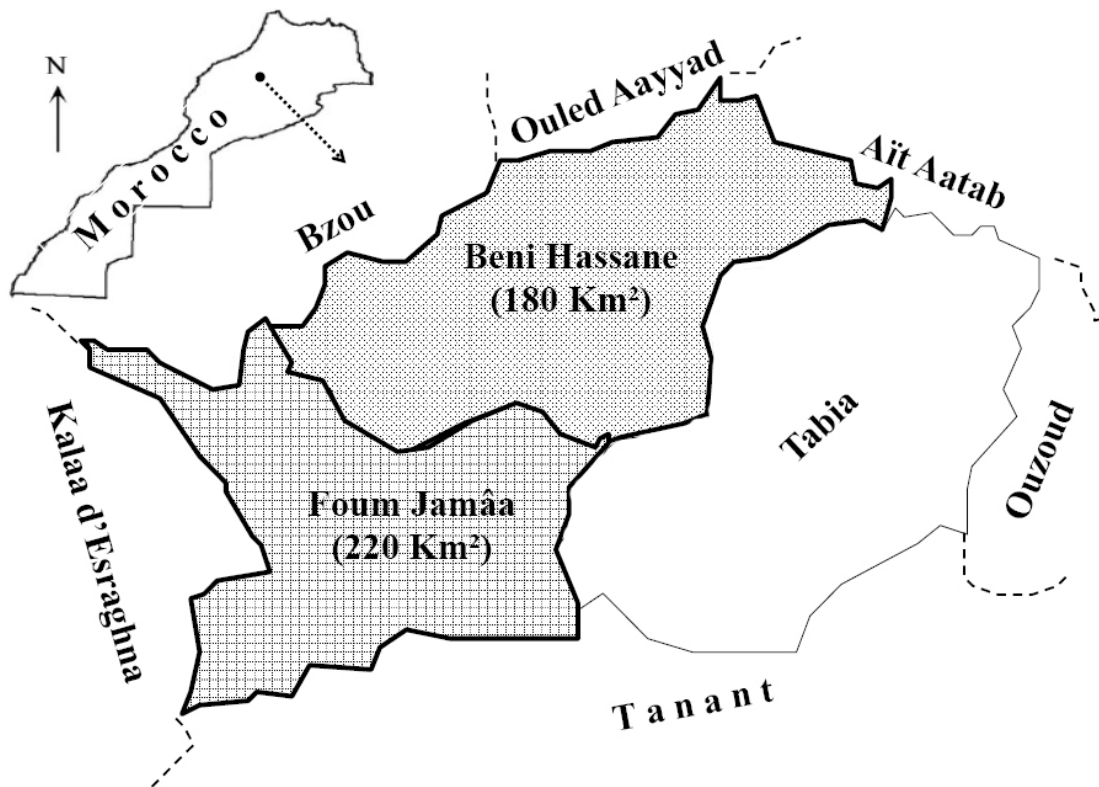


Figure 1. Map of the study area showing the position of the Foug Jamâa region (province of Azilal) in Moroccan map, the surfaces of the sectors (Beni Hssan, Foug Jamâa) are indicated in between bracket below each corresponding sectors name.

Table 1. Sand fly species collected in Foug Jamâa region (Azilal, Atlas of Morocco) and their relative abundance.

Sand fly species	Male	Femelle	Total	%
<i>P. papatassi</i>	51	24	75	7
<i>P. sergenti</i>	486	176	662	57
<i>P. longicuspis</i>	229	31	260	23
<i>P. perniciosus</i>	48	1	49	4
<i>S. minuta</i>	71	34	105	9
<i>P. chabaudi</i>	1	0	1	0
<i>Total</i>	886	266	1152	100

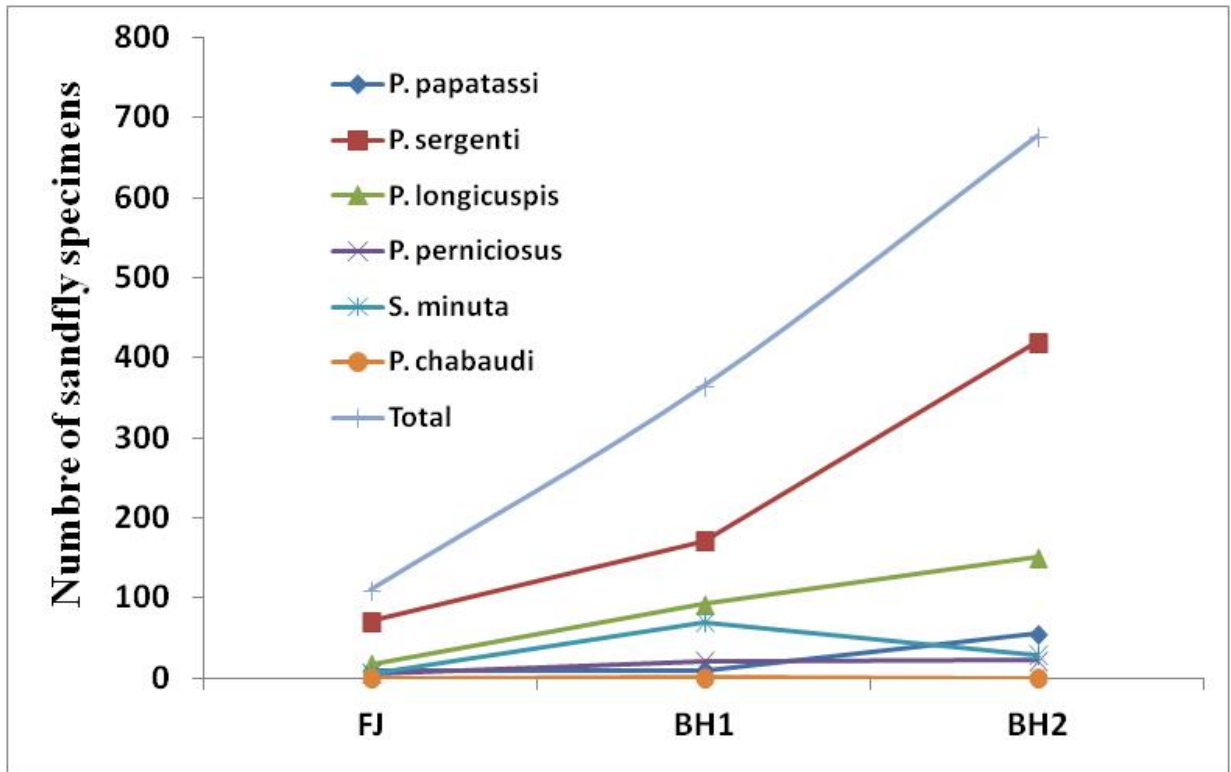


Figure 2. Sand fly species collected in the three sectors of Foug Jamâa region, Azilal, Atlas of Morocco. FJ: Foug Jamâa; BH1: Beni Hassan sector 1; BH2: Beni Hassan sector 2.

Table 2. Spatial distribution and diversity of sand flies collected from three sector of Foug Jamâa region (Azilal, Atlas of Morocco).

Sector	Traps recovered			Collected sand flies			NS/NT	Shannon Index	
	NT	%	Mean*	NS	%	Mean**		Mean	SE
FJ	1129	46	5,48a	110	10	0,51a	0,10	0,16	0,06
BH1	642	26	5,58a	365	32	3,15b	0,57	0,33	0,07
BH2	671	27	5,89a	677	59	5,94c	1,01	0,41	0,10
Total	2442	100	5.61	1152	100	2.63	0,47	0,30	0,05

NT: Number of traps; NS: Number of sand flies; for each column, different letters a, b and c indicate that the means are significantly different. * $p=0.06$; ** $p\leq 0.01$. FJ: Foug Jamâa; BH1: Beni Hassan sector 1; BH2: Beni Hassan sector 2.

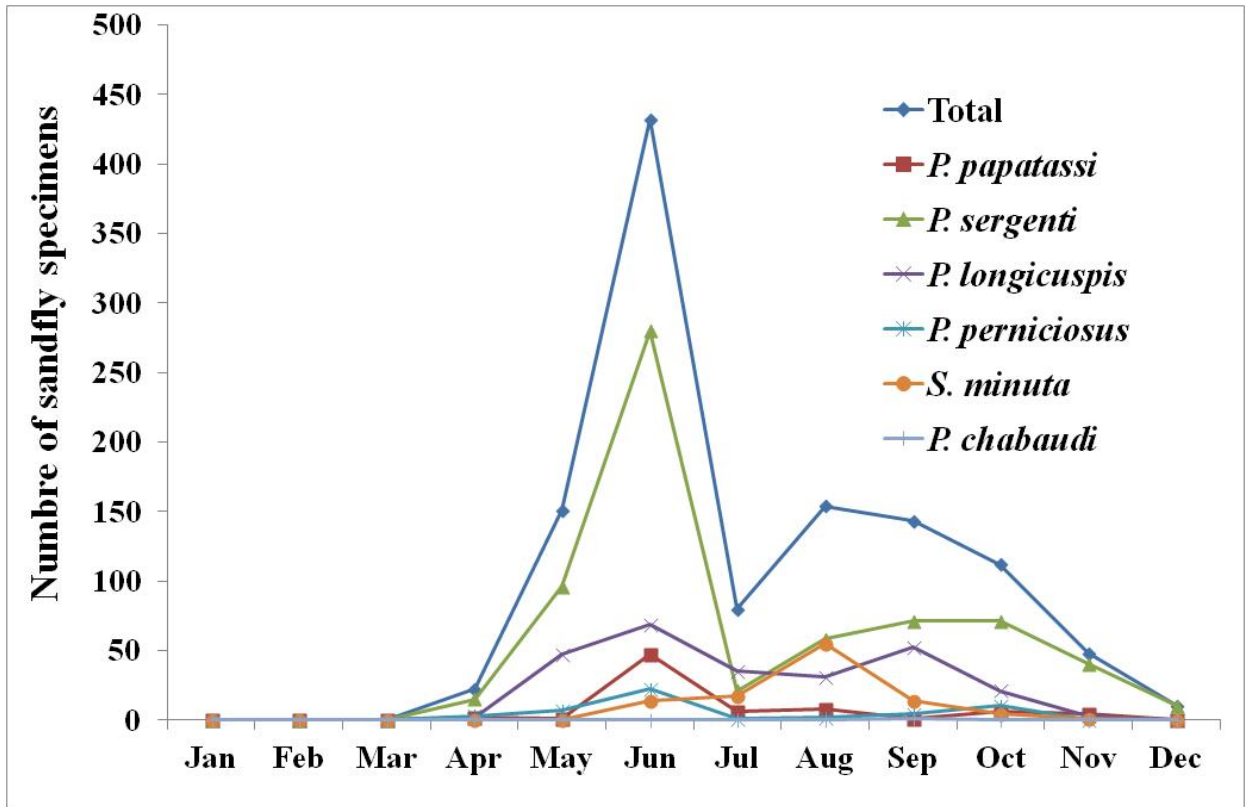


Figure 3. Monthly temporal patterns of sand flies species in Fom Jamâa region (province of Azilal, Atlas of Morocco) during the years 2010.

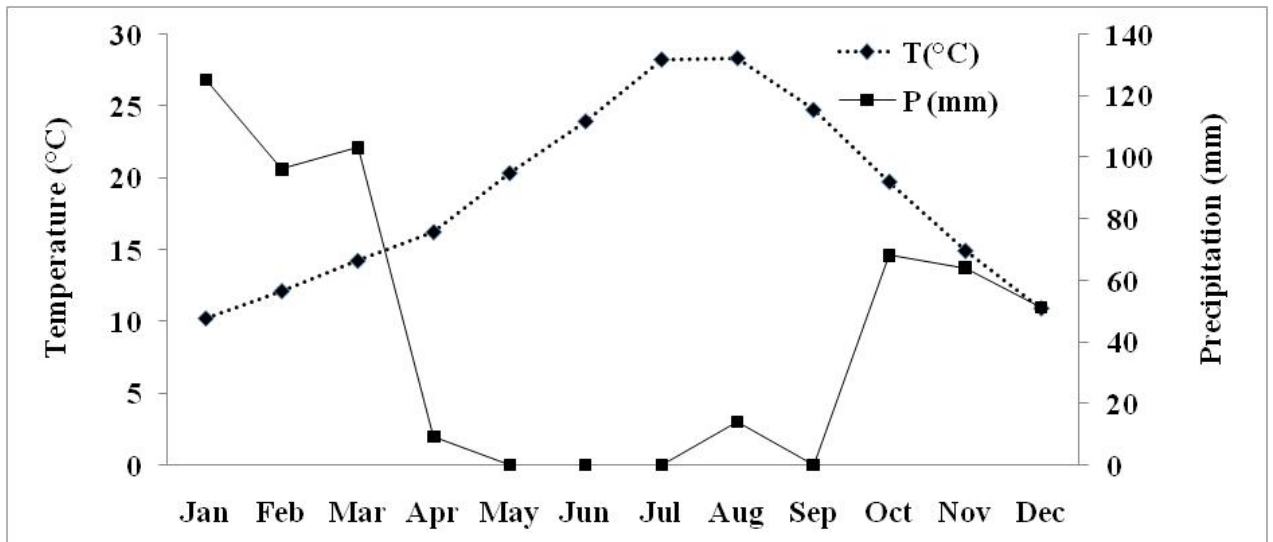


Figure 4. Mean monthly temperature $T(^{\circ}\text{C})$ and rainfall $P(\text{mm})$ during 2010 around the study area of Foum Jamâa, province of Azilal, Atlas of Morocco.

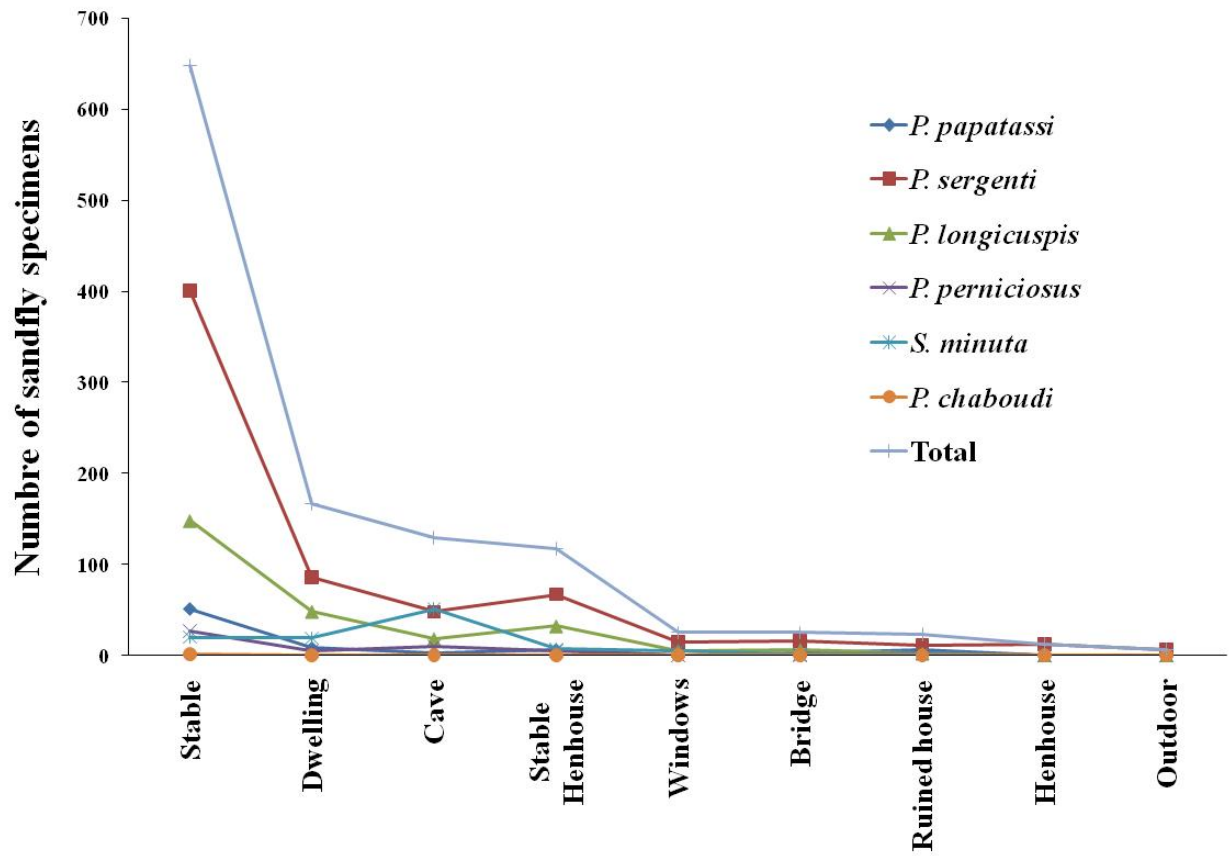


Figure 5. Sand flies species distribution according to different biotope of Fom Jamâa region (province of Azilal, Atlas of Morocco) during the years 2010.

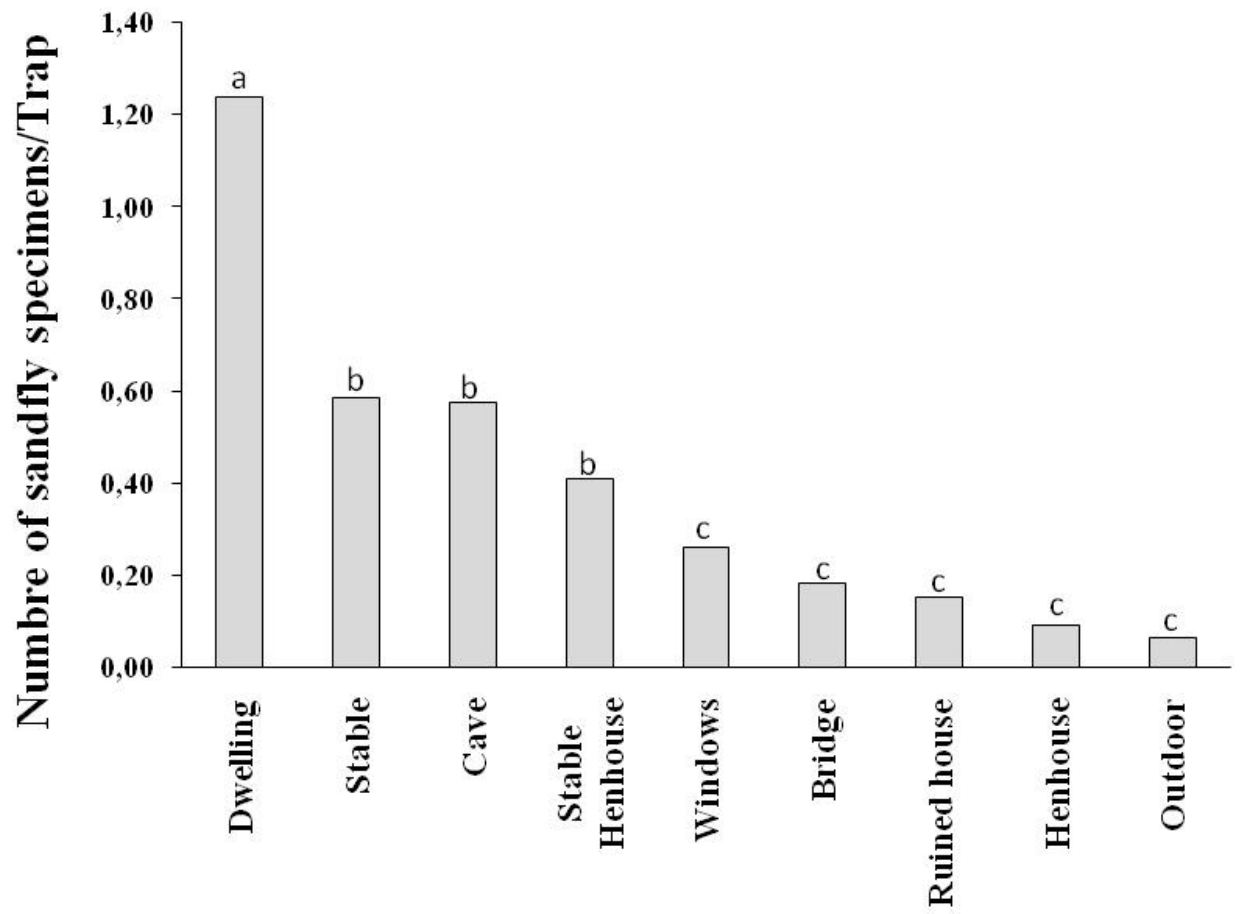
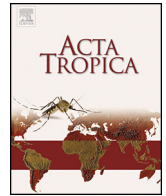


Figure 6. Number of collected sand flies per sticky trap installed in different biotopes during 2010 in the region of Foug Jamâa, province of Azilal, Atlas of Morocco.



Epidemiologic study and molecular detection of *Leishmania* and sand fly species responsible of cutaneous leishmaniasis in Foug Jamâa (Azilal, Atlas of Morocco)



Hassan Arroub^a, Salsabil Hamdi^b, Malika Ajaoud^b, Khalid Habbari^a, Meryem Lemrani^{b,*}

^a Laboratory of Management and Valorization of Natural Resources, FST, Sultan Moulay, Slimane University, M'GHILA Route de Fes, B.P. 523, Beni Mellal 23000, Morocco

^b Laboratoire de Parasitologie et Maladies Vectorielles, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2012
Received in revised form 25 February 2013
Accepted 10 March 2013
Available online xxx

Keywords:

Cutaneous leishmaniasis
ITS1-PCR
Leishmania tropica
Phlebotomus sergenti
Morocco

ABSTRACT

The region of Foug Jamâa (province of Azilal) has become endemic for cutaneous leishmaniasis (CL) since 2006. The objective of this study was to investigate molecular identification of the etiological agent of CL in this region; we also carried out an entomological survey of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in this focus to study the sand fly fauna, species composition, and the monthly prevalence of sand flies during 1 year. In the period between 2009 and 2010, skin scrapings spotted on glass slides were collected from 119 patients, aged from 9 months to 70 years old, who came from 43 localities distributed in 3 sectors in Foug Jamâa (FJ). The ITS1 PCR-RFLP was used to identify the *Leishmania* parasite responsible for the recent cases of CL in FJ. Our results revealed that the disease is caused by *L. tropica*. No significant association was observed between gender and the rate of CL in presenting patients, while the highest rate of positive lesions was found in the age group of 9 years old or under (86.67%). In this study, we found also that *L. tropica* infection mostly caused single lesions (67.90%) that were located in the face (96.30%). Morphological identification was performed on a total of 1152 sand flies (23% females and 77% males) collected by sticky paper traps. 57% of the total collected flies were identified as *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* (Parrot).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In Morocco, three species of *Leishmania* are endemic, causing human cutaneous leishmaniasis (CL). *L. major* is responsible of zoonotic CL and is localized in areas south of the Atlas Mountains (Rioux et al., 1986) where regular epidemics, with more than 2000 cases are reported (Ministry of Health, 2008). In the North of the country, some sporadic cases of CL due to *L. infantum* were observed (Lemrani et al., 1999; Rhajaoui, 2009). *L. tropica* has the largest geographic distribution and is considered a major public health threat (Ministry of Health, 2008); this form was reported for the first time in 1989 (Marty et al., 1989), since this first case a large eco-epidemiological study led to the detection of a large focus in central and southern areas of the country. Recently, Morocco is known for the emergence of several new foci in the north Guessous-Idrissi (Guessous-Idrissi et al., 1997; Rhajaoui et al., 2004, 2007) and *L.*

tropica has been found in some regions previously known for transmission of *L. major* (Rhajaoui, 2009). *L. tropica* is considered to be purely anthroponotic, however, more recently it has become clear that in some cases *L. tropica* could be zoonotic (Guessous-Idrissi et al., 1997).

In the province of Azilal, FJ region has become an epidemic focal point for CL.

It seems obvious that FJ was free from CL before 1990; the first cases recorded by the provincial delegation of health go back to 1986 and 1987 in Tanant, at 16 km from FJ. Early in 2000, several provincial centers declared some scattered cases in FJ. During the period 2006–2009, we registered about 500 cases of CL in this region (Arroub et al., 2012), the efforts done by the Ministry of Health between 2006 and 2009 have stabilized the number of cases in the region, nevertheless, the disease is still persistent and the number of cases can increase at any time.

In our previous work focused on the eco-epidemiological and socioeconomic study, we have described CL in FJ as a rural domestic form, characterized by affecting the whole family nucleus, due to the fact that dwellings are located near the natural focus of transmission; thus propitiating the vector's arrival in the house (Arroub et al., 2012). Based on clinical symptoms, we suggested that the

* Corresponding author at: Institut Pasteur du Maroc, 1 Place Louis Pasteur Casablanca Maroc, Morocco. Tel.: +212 661 46 48 18; fax: +212 522 26 09 57.

E-mail addresses: meryem.lemrani@pasteur.ma, meryem.lemrani@gmail.com (M. Lemrani).

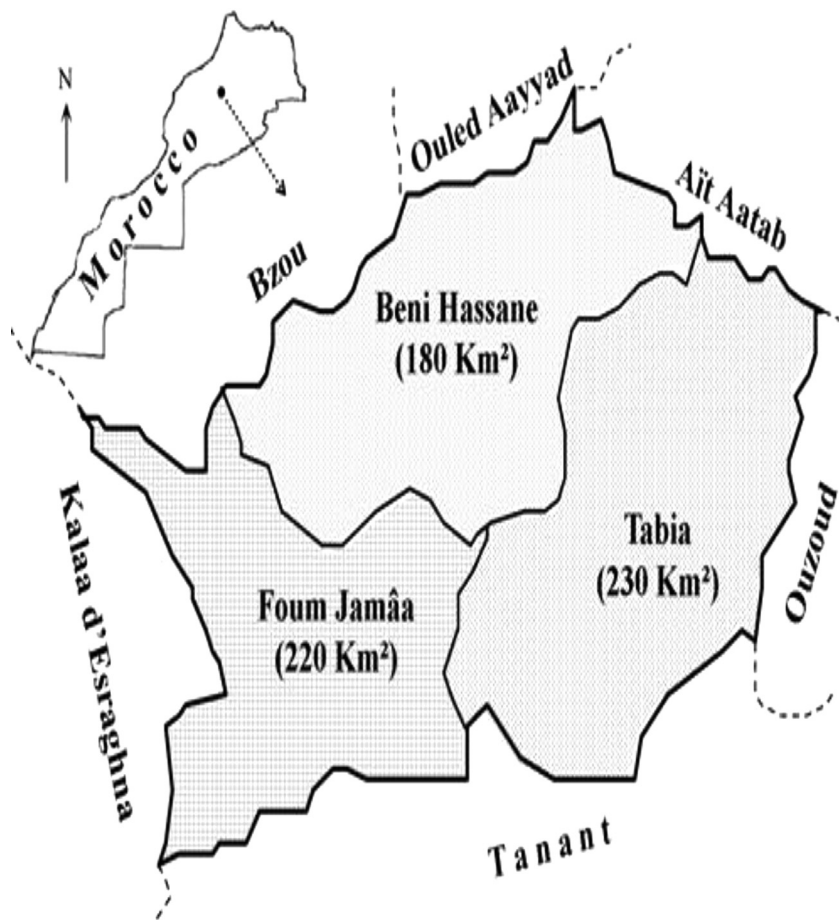


Fig. 1. The location of sampling zones, the surfaces of the three sectors (Beni Hssan, Foum Jamâa, Tabia) are indicated in between bracket below each corresponding sectors name.

disease may be caused by *L. tropica*; however, accurate identification of parasite and sand fly species is crucial to enable adequate treatment and appropriate public health control measures. Accepted standard diagnosis involves isolation of parasites either microscopically, or by culture, but *Leishmania* species are similar and their morphological species identification is not possible (Shahbazi et al., 2008). Currently, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) is the gold standard technique for the identification and classification of isolates of *Leishmania*; however, this method is quite slow, laborious, and costly because it requires culturing and obtaining the profile of 10–20 different enzymes. Lately, several PCR-based methods have proven to be highly sensitive and specific, as compared to standard methods, and are considered valuable for diagnosis (Akhavan et al., 2010; Azizi et al., 2006; Parvizi and Ready, 2008). These molecular methods are particularly useful for identification of *Leishmania* species directly on clinical samples without the need for prior cultivation (Schonian et al., 2003; Vega-Lopez, 2003). The PCR targets include the kDNA minicircles, the small subunit rRNA, the spliced leader sequence, or the minixon gene. Typing methods, such as restriction analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region (Cupolillo et al., 1995), PCR using non-specific primers (Noyes et al., 1996), and direct DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism analysis, have been employed.

ITS1 sequences have been extensively studied in *Leishmania* because of their high sensitivity to detect *Leishmania* in clinical samples and their adequately polymorphic to differentiate strains at least to the species level (Schonian et al., 2001). In the present study, we selected the ITS1-PCR method for detecting *Leishmania* in skin scrapings spotted on glass slides; the ITS1 PCR-RFLP was

used to identify the *Leishmania* parasite responsible for the recent cases of CL in FJ. Considering the importance of the vector in the transmission of the CL cycle, an entomological survey was carried out in this focus to study the sand fly fauna, species composition, and the monthly prevalence of sand flies during 1 year.

2. Materials and methods

2.1. Study sites

Studies were conducted in 3 adjacent sectors in FJ region, the province of Azilal, High Atlas of Morocco (Fig. 1). The three sectors are Beni Hassan, Foum Jamâa and Tabia, they comprise 43 localities with a total area of about 63,000 ha. It has a population of 30,000 persons. This region is located near the Western High Atlas National Park (32°08' N, –6°60' W) at different altitude from 523 to 1086 m. The maximum and minimum mean monthly temperatures were respectively 45 °C (August) and 10 °C (December), and the rainfall is relatively low with two peaks; one in autumn (November to December) and the second in spring (March and April). The vegetation is rare and mainly dominated by cactus, jujube plant, lentils, olive, and almond trees.

2.2. Collection and identification of sand flies

The collections were carried out during 1 year on 17 stations, representing 8 main different biotopes in the region of FJ (hen-house, stable, stable henhouse, cave, ruined house, dwelling, bridge, windows, outdoor) and regularly distributed to cover all

supervised area. Sand flies were collected bi-weekly using sticky paper (21 × 27.3) impregnated with grapes oil. The traps installed after sunset were collected before sunrise in the catching sites. Collected sand flies were placed in glass vials containing 70% ethanol. After sex determination, all collected sand flies were mounted on glass slides, using Canada balsam, and were identified by morphological taxonomic keys according to Boussaa (2008).

2.3. Sampling and diagnosis

Tissue samples were taken from 119 patients with suspected CL, who had consulted the health centers in Fom Jamaa during 2009–2010. Before sampling and for each patient we filled a questionnaire with information about the patient (name, age, gender, address) and the lesion (number, localization and date of apparition). From the edge of lesions, smears were prepared, fixed with absolute methanol, and then stained with Giemsa. The whole slide was analyzed with a 100× immersion objective. All of the slides were examined twice before confirming or determining a negative result. A total of 81 slides were subjected to DNA extraction and molecular identification of the causative *Leishmania* species.

Informed written consent was obtained from patients or from parents if patient is minor. Approval for the study was provided by the Ethical Committee of Institut Pasteur of Morocco.

2.4. DNA extraction and PCR analysis

DNA was extracted from stained slides. To each slide, we added 250 µl lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.4, 1% v/v, Triton X-100 and 100 mg of proteinase K per ml). Cell lysis was accomplished after incubation overnight at 60 °C. Lysates were then subjected to phenol–chloroform extraction, as described by Van Eys et al. (1992). DNA was purified by Qiagen kit according to the instructions of the manufacturer. A final volume of 30 µl obtained were kept at –20 °C until used.

A PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) approach was applied for the detection and identification of the *Leishmania* parasites. The ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) was amplified using the primer pair L5.8S and LITSR (Schonian et al., 2003). Amplicons were analyzed on 1.5% agarose gels by electrophoresis and visualized by UV light. A reaction was considered positive when a band of the correct sizes (300- to 350-bp) was observed. A negative and positive control containing distilled water and DNA of *L. infantum*, respectively, were included during PCR to ensure reliability, validity and to check for possible contaminations of the amplification reactions. PCR product was digested with the restriction endonuclease *HaeIII* (Invitrogen). The resultant fragments were separated by electrophoresis on 3% agarose gels and compared with those of WHO reference strains of *L. major* (MHOM/SU/73/5ASKH), *L. tropica* (MHOM/SU/74/K27) and *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1).

3. Results

3.1. Entomological survey

During January–December 2010, 886 males (76.91%) and 226 female (23.09%) sand flies were collected in 1152 phlebotomine specimens. The sex-ratio indicated that more males were collected than females; the male/female ratio was 3.3:1. Overall, six species were identified, consisting of five *Phlebotomus* spp. and one *Sergentomyia* (Table 1). The most dominant species was *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Parrot) (57%), followed by *P. (Larrousius) longicuspis* (Nitzulescu) (23%). The changes in seasonal prevalence of *P. sergenti* are shown in Fig. 2. The population build-up of *P. sergenti* was started in March–April and reached a low level in December

Table 1

Sand fly species collected in Fom Jamâa region (Azilal, Atlas of Morocco) and their relative abundance.

Sandfly species	Male	Female	Total	%
<i>P. sergenti</i>	486	176	662	57
<i>P. longicuspis</i>	229	31	260	23
<i>P. papatasi</i>	51	24	75	7
<i>P. perniciosus</i>	48	01	49	4
<i>P. chabaudi</i>	01	00	01	0
<i>S. minuta</i>	71	34	105	9
Total	886	266	1152	100

(due to the severe weather conditions) with two peaks in June and September. During 2010, the climate conditions in this area were very hot in the summer. The mean maximum and minimum monthly temperatures were 45 °C in August and 10 °C in December, respectively, and the rainfall was relatively low with two peaks; one in autumn (60 mm) (October–December) and the second in spring (100 mm) (March and April).

3.2. Active cases survey

From the three major sectors of FJ area Beni Hassan (BH), Fom Jamâa (FJ) and Tabia (T), a total of 119 patients of both sexes and different age groups were included in the study.

Data was analyzed with the non parametric χ^2 test. The repartition of positives cases according to both the sector (BH: 35.24%; FJ: 31.43%; T: 33.33%; $p=0.892$) and the sex (Male 42.86%; Female 57.14%; $p=0.143$) was not significant. The age distribution at illness onset ranged from 9 months to 70 years (median age 6.61 years), the disease has been found very significantly prevalent in the age group of 9 years (86.67%; $p<0.05$) or under (Table 2). Cutaneous lesions were mostly single (67.90%; $p<0.05$) and located on the face (95.89%).

Overall, CL diagnosis was confirmed in 105 out of 119 suspected cases by microscopic examination and/or ITS1-PCR. *Leishmania* amastigotes were identified in 98 out of 119 skin smears (82.35%). *Leishmania* DNA was detected in 78 of 81 samples examined by ITS1-PCR (96.20%). Only 71 out of 81 samples amplified by PCR were also positive by microscopic examination, seven patients who were negative by microscopic analysis were proven to be positive by the molecular assay.

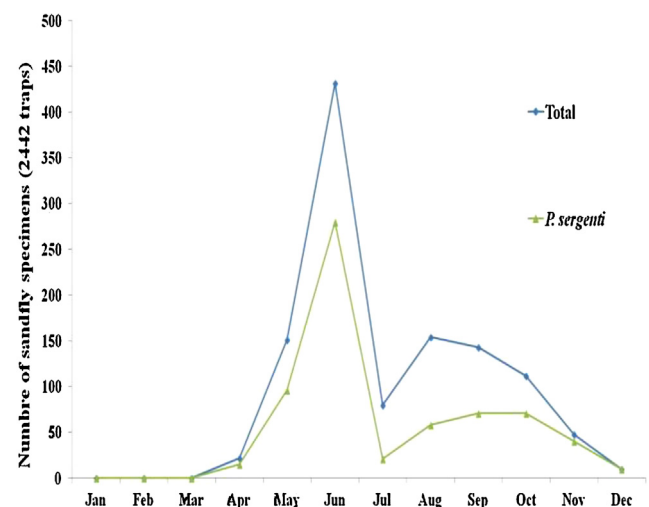


Fig. 2. Seasonal prevalence of sand flies species in Fom Jamâa region (province of Azilal, Atlas of Morocco).

Table 2

The number of positive cutaneous leishmaniasis cases (positive smears and/or+ITS1-PCR) by age in Foum Jamaà region (Azilal, Morocco) recorded from 2009 to 2010.

Age group (years)	Number of positive cases
0–9	91
10–19	06
20–29	02
30–39	00
40–49	02
50 & above	04
Total	105

The significance of bold values is the age group 0–9 years represents the most recorded number of cases of CL in this study.

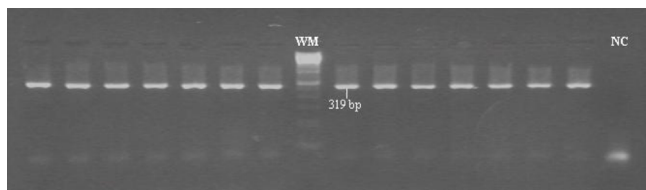


Fig. 3. The results of PCR-based amplification of DNA extracted from Giemsa-stained lesion smears from Foum jamaà in 2009–2010. The bands shown on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. WM = size marker, NC = negative control. All other lanes correspond to clinical materials from patients.

The *Leishmania* parasites in 78 clinical samples amplified by PCR were identified as *L. tropica* by their typical restriction profiles (Fig. 3). ITS1-PCR produced one single band, which was 300-bp in size. The RFLP analysis revealed two fragments (185- and 57-bp) (Fig. 4), specific for *L. tropica*.

4. Discussion

This is the first report on molecular identification of *L. tropica* as the causative agent of CL in the FJ region. Frequently, *Leishmania* species are identified based on their geographical distribution and on clinical manifestations of the resulting disease. Nevertheless, in endemic regions which may have co-existence of multiple species of *Leishmania*, geographical origin is not an adequate criterion (Rhajaoui, 2009), the characterization of the infecting species based on clinical symptoms is not crucial, since clinical spectrum of CL is broad, symptoms can vary and may be confused with other etiologic agents. On the other hand, the characterization of *Leishmania* species in clinical infections is important, as different species may require distinct treatment regimens, hence the necessity to identify *Leishmania* parasite with certainty.

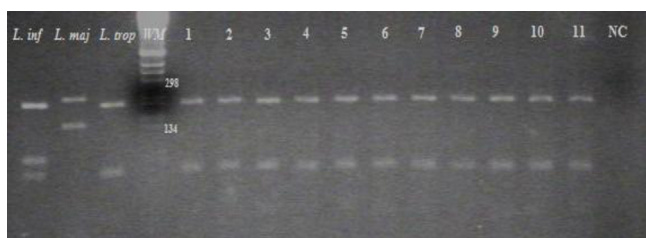


Fig. 4. Molecular identification of causative CL species. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the amplified internal transcribed spacer 1 region (ITS1) digested with restriction enzyme *HaeIII* and analyzed by electrophoresis on 2.5% agarose gel. Three reference strains were used for comparison: *L. inf* = *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1); *L. maj* = *L. major* (MHOM/SU/73/5ASKH); *L. trop* = *L. tropica* (MHOM/SU/74/K27). WM = molecular size marker; NC = negative control. All other lanes show digested PCR product from clinical materials; lanes 1–11 = *L. tropica*.

ITS1-PCR-RFLP used in this study enables easy species identification in all PCR-positive cases. Species identification by this molecular method is clearly less laborious and less costly than that by isoenzyme typing. The ITS1-PCR-RFLP is easily applied in endemic areas, since it is sufficiently sensitive to detect *Leishmania* directly in stained smears and is able to identify all medically relevant species groups (Schonian et al., 2003).

CL in FJ affects both male and female and all age groups, even if the disease was more frequent in young people (9 years or less). The lesions caused by *L. tropica* were dry, small and mainly single (67.90%), while in Taza a northern Moroccan focus, patients exhibited severe, large and multiple lesions, which could be related to the virulence of the parasite having been enhanced by the lack of immunity of the people in this new focus (Guessous-Idrissi et al., 1997). The difference on the clinical manifestations and the age group affected by *L. tropica*, in the northern focus, and the southern one suggest that in FJ the parasite had been present before the outbreak of CL cases; the circulation of the parasite had not been so important to trigger an epidemic, but people living for long time in the area could develop resistance due to their exposure to the parasite.

The appearance of CL due to *L. tropica* has become increasingly important due to many factors. The ecological and demographic changes are probably the most important ones (Ashford, 1999). The increasing urbanization processes in the settlements which have poor housing conditions and sanitation and which are usually over-crowded may facilitate the expansion of the disease. The movement of human and dog population may also act as an important risk factor in the spread of the disease; this might be the cause of the appearance of CL in FJ where the first outbreak appeared in 2006. Previous studies on leishmaniasis in this area have described settlements close to many suitable sources of food for potential animal reservoirs such as dogs. The percentage of positive cases was significantly higher [74.1%, $p \leq 10^{-4}$], where 2 or more dogs were present (Arroub et al., 2012), so that a zoonotic situation should not be excluded, perhaps co-existing with the anthroponotic transmission usually associated with CL due to *L. tropica*. In 1991, Dereure (Dereure et al., 1991) reported canine cutaneous infection due to *L. tropica* in Tanant, a rural area 16 km far from FJ.

We have also demonstrated that *P. sergenti* is the most abundant sand fly species in FJ (57%). *P. sergenti* is the putative vector of *L. tropica* throughout the Middle East and is a proven vector in Morocco (Guilvard et al., 1991), as well as in Saudi Arabia (al-Zahrani et al., 1988) and Afghanistan (Killick-Kendrick et al., 1995).

Researches should be continued to find out if the disease in this region is due to a single or a variety of *L. tropica* genotypes. The disease control requires local stakeholders and health authorities interference.

Conflicts of interest

None.

Funding

This work was supported by EMRO – COMSTECHE grant; RAB & GH 10-11/09.

Acknowledgements

The authors thank the Moroccan Ministry of Health (MMH) especially Doctors and nurses of provincial centres of Azilal, who helped in patients sampling. The authors are also very grateful to Dr Lynn Soong for correction of article.

References

- Akhavan, A.A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M.H., Rassi, Y., Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Arandian, M.H., Abdoli, H., Jalali-zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M., Yaghoobi-Ershadi, M.R., 2010. *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp. Parasitol.* 126, 552–556.
- al-Zahrani, M.A., Peters, W., Evans, D.A., Chin, C., Smith, V., Lane, R.P., 1988. *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 416.
- Arroub, H., Alaoui, A., Lemrani, M., Habbari, K., 2012. Cutaneous leishmaniasis in four jamâa (Azilal, Morocco): microenvironmental and socio-economical risk factors. *J. Agric. Soc. Sci.* 8, 10–16.
- Ashford, R.W., 1999. Cutaneous leishmaniasis: strategies for prevention. *Clin. Dermatol.* 17, 327–332.
- Azizi, K., Rassi, Y., Javadian, E., Motazedian, M.H., Rafizadeh, S., Yaghoobi Ershadi, M.R., Mohebbali, M., 2006. *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) alexandri: a probable vector of *Leishmania infantum* in Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100, 63–68.
- Boussaa, S., 2008. Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc: effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. Doctorat d'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Cupolillo, E., Grimaldi Junior, G., Momen, H., Beverley, S.M., 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 145–155.
- Dereure, J., Rioux, J.A., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H., 1991. *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 595.
- Guessous-Idrissi, N., Chiheb, S., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S., Krimech, A., 1997. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 660–663.
- Guilvard, E., Rioux, J.A., Gallego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martinez-Ortega, E., Dereure, J., Saddiki, A., Martini, A., 1991. *Leishmania tropica* in Morocco. III. The vector of *Phlebotomus sergenti*. A propos of 89 isolates. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 96–99.
- Ministry of Health, 2008. Rapport annuel d'activité. Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les maladies, Maroc.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y., 1995. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: the high susceptibility of *Phlebotomus sergenti* to *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 477.
- Lemrani, M., Nejjar, R., Benslimane, A., 1999. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmani infantum* in northern Morocco. *Giornale Ital. Med. Trop.* 4, 3–4.
- Marty, P., Le Fichoux, Y., Pratlong, F., Rioux, J.A., Rostain, G., Lacour, J.P., 1989. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in a young Moroccan child observed in Nice, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 510.
- Noyes, H.A., Belli, A.A., Maingon, R., 1996. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 98–105.
- Parvizi, P., Ready, P.D., 2008. Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three *Leishmania* species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 13, 1159–1171.
- Rhajaoui, M., 2009. Human leishmaniasis in Morocco: a nosogeographical diversity. *Pathol. Biol. (Paris)* 59, 226–229.
- Rhajaoui, M., Fellah, H., Pratlong, F., Dedet, J.P., Lyagoubi, M., 2004. Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 299–301.
- Rhajaoui, M., Nasereddin, A., Fellah, H., Azmi, K., Amarir, F., Al-Jawabreh, A., Eraqat, S., Planer, J., Abdeen, Z., 2007. New clinico-epidemiologic profile of cutaneous leishmaniasis, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1358–1360.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Dereure, J., Lanotte, G., Denial, M., Pratlong, F., 1986. Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25, A propos de 28 souches isolées dans un foyer du Sud Marocain. In: *Leishmania*, Taxinomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques. In: Coll. Int. CNRS/INSERM 1984 IMEEE, Montpellier, France, pp. 471–480.
- Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.
- Schonian, G., Schnur, L., el Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A.A., Sokolowska-Kohler, W., Presber, W., 2001. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 217–224.
- Shahbazi, F., Shahabi, S., Kazemi, B., Mohebbali, M., Abadi, A.R., Zare, Z., 2008. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol. Res.* 103, 1159–1162.
- Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N.C., Ebeling, S.B., 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 133–142.
- Vega-Lopez, F., 2003. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 97–101.