

# THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

**Centre de Recherche:** Biotechnologie Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BioBio)

**Structure de Recherche:** Laboratoire De Biodiversité, Écologie Et Génome(BGCG)

**Discipline:** Biologie

**Spécialité:** Parasitologie, Épidémiologie et Biotechnologie

Présentée et soutenue le : 11/02/2021 par :

**Meryem MNIOUIL**

## Étude Séro-moléculaire et Épidémiologie de la Leishmaniose Viscérale Symptomatique et Asymptomatique dans la province de Taounate

### JURY

<i>Badr Eddine LMIMOUNI</i>	<i>PES, Université Mohamed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat</i>	<i>Président</i>
<i>Mohammed BOUSLIKHANE</i>	<i>PES, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat</i>	<i>Rapporteur/ Examineur</i>
<i>Hocein BAZAIRI</i>	<i>PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences Rabat</i>	<i>Rapporteur/ Examineur</i>
<i>Bouabid BADAoui</i>	<i>PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences Rabat</i>	<i>Rapporteur/ Examineur</i>
<i>Pierre MARTY</i>	<i>PES, Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice</i>	<i>Examineur</i>
<i>Hajiba FELLAH</i>	<i>Dr, Institut National d'Hygiène, Rabat</i>	<i>Coencadrante</i>
<i>Fatima AMARIR</i>	<i>PA, Université Hassan II, Faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca</i>	<i>Coencadrante</i>
<i>Abderrahim SADAK</i>	<i>PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences Rabat</i>	<i>Directeur de Thèse</i>

Année Universitaire : 2021/2022

## **DEDICACES**

*Je dédie cette thèse ...*

*À Allah le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail*

*A mes chers parents que Dieu leur accorde longue vie*

*A mes frères pour leurs encouragements*

*A mon cher mari pour son soutien*

*A mon fils Ziad et ma futur fille*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis.*

## **AVANT-PROPOS**

*Ce travail de thèse est le fruit de la collaboration effectuée entre la Faculté des Sciences de Rabat, l'Institut National de l'Hygiène, le Laboratoire de Mycologie et de Parasitologie du CHU de Nice-France, le service pédiatrique au CHU de Fès et le service de Parasitologie au CHU de Rabat.*

*Grâce à l'échange des idées et des compétences, les différents membres du projet ont pu atteindre les objectifs de ce travail.*

## **Remerciements**

*Je remercie, pour cette fin, en premier lieu mon directeur de thèse Monsieur le Professeur **Abderrahim SADEK**, pour sa confiance, sa patience, son dévouement et ses conseils prodigués.*

*Je tiens à remercier également Monsieur Docteur **Mohamed RHAJAOU**, directeur de l'INH, d'avoir mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires afin de mener à bien cette étude.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Madame Docteur **Hajiba FELLAH**, pour m'avoir fait confiance, pour son suivi perpétuel au fil des années et sa disponibilité permanente. Votre détermination au quotidien nous prouve que tout point de vue mérite attention. Merci pour votre aide précieuse dans mes recherches, pour vos conseils et suggestions et l'atmosphère de travail que vous m'aviez assurée. Je lui suis très reconnaissante pour tous les efforts qu'elle a déployés pour mener à bien cette thèse. Qu'elle soit assurée de toute mon estime et ma profonde gratitude.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame le Professeur **Fatima AMARIR**, pour avoir très aimablement accepté de diriger cette thèse. Votre collaboration et votre apport scientifique m'ont beaucoup aidé à la réalisation de ce travail, en apportant leur grande expertise en la matière en me permettant de structurer au mieux ma réponse à la problématique de cette thèse.*

*J'adresse une reconnaissance spéciale au Professeur **Pierre MARTY** et toute son équipe (**Pascal DELAUNAY**, **Karine LEPLUS**, **Rachid MAHMUD**, **Christelle POMARES** et **Carine CHALVET**) pour leur hospitalité, leurs qualités humaines et professionnelles, leur générosité, de m'avoir bien accueillie en assurant mon logement pendant mon séjour à Nice et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour mener à bien mon stage.*

*Je tiens à remercier Monsieur Docteur **Grégory MICHEL** pour son grand intérêt, son suivi précieux, ses encouragements ainsi que sa collaboration.*

*Je voudrais également exprimer mes vifs remerciements à Madame Docteur **Aurélien SCHWING** qui m'a apportée une aide précieuse au Laboratoire à Nice afin de surmonter la contrainte temporelle à laquelle j'ai été confrontée pour finaliser toutes les manipulations programmées.*

*Je ne manque pas de remercier Monsieur le professeur **Mohamed EL YAAGOUBI** et Madame Docteur **Aziza MOUSTACHI** du département de parasitologie du CHU Ibn Sina de Rabat, ainsi que le professeur **Mustapha HIDA** et Madame Docteur **Fatima Zahra TASSOU***

*du CHU de Fès d'avoir accepté de mettre à notre disposition les échantillons pour l'étude de l'évaluation du test rapide rk39.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le professeur **Badr Eddine LMIMOUNI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse malgré ses nombreuses obligations. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et ma respectueuse considération.*

*Monsieur Le Professeur **Mohamed BOUSLIKHANE**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, Je vous remercie du grand honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma gratitude, ma profonde reconnaissance, mon admiration et ma grande considération.*

*Monsieur le Professeur **Hocein BAZAIRI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, vous nous faites un grand honneur en acceptant d'évaluer notre travail. Veuillez trouver ici, chère professeur, l'expression de notre reconnaissance et de nos sincères remerciements.*

*Monsieur le professeur **Bouabid BADAQUI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, Vous nous faites l'honneur en faisant partie des membres de jury de ma thèse. Veuillez accepter mes vifs remerciements.*

*Vous avez tous accepté de prendre de votre temps pour juger cette thèse. C'est une grande joie de vous avoir comme membres du jury.*

*Nous tenons aussi à remercier le **personnel** du service des maladies parasitaires de DELM, et de la délégation de santé de la ville de Taounate, ainsi que les autorités locales, pour leur coopération et aide précieuse.*

*Je ne pourrais remercier assez le **personnel** du Laboratoire National de Référence des Leishmanioses de l'INH (Dr Faïza Sebti, Dr Bouchra Delouane, Mme Bouchra El Mansouri et Mr Adlaoui El Bachir) qui est une équipe soudée et bienveillante qui a contribué beaucoup à ma formation, mon intégration et à l'élaboration de ce travail.*

*Je remercie mes collègues du Laboratoire de Biodiversité, Écologie et Génome (BEG) à la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V, ceux du laboratoire de Parasitologie et Mycologie de CHU de Nice-France, notamment **Lamine ZEREG** qui m'a servi de guide, le moins que je puisse dire c'est que sans lui j'aurais mis beaucoup de temps à me retrouver à Nice et même au sein de CHU.*

*A mes collègues du Laboratoire National de Référence des Leishmanioses pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble, merci d'agrèer ma profonde gratitude.*

***A tous ceux qui**, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Qu'ils veuillent accepter ma sincère reconnaissance.*

*Enfin, un grand merci à mes proches qui ont su, tout au long de ces dernières années, m'encourager et, surtout, être là lorsque j'en avais besoin. Merci en particulier à cette femme de fer que j'aime tant, ma mère, qui depuis 34 ans, s'occupe de presque tout pour me rendre la vie agréable et plus facile. Un profond merci à mon père pour son écoute et son amour inconditionnel. Je sais qu'il éprouve beaucoup de fierté pour sa fille. Je remercie mes frères de m'avoir toujours poussée de l'avant. Je remercie mon cher époux, de me soutenir, m'encourager et m'apporter sérénité et stabilité, je le remercie d'être un père juste fantastique pour notre bout de chou Ziad. Je remercie toute ma famille pour leur grand soutien et leurs vœux de réussite. A toi, Hanane, très grande amie. Indispensable confidente, toujours là lors des moments difficiles, merci pour les longues heures où je t'ai retenue au téléphone pour te parler de mon travail, de mes études et de mes nombreuses folies. Je te souhaite Hanane tout le bonheur. Finalement, je remercie mes chère amies Kenza Yasmine et Amina, tout en admirant leur esprit altruiste, d'être serviables et attentionnées et je lui souhaite courage et réussite, et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Production scientifique

### Publications : Articles publiés:

- **Meryem Mniouil**, Fella Hajiba, Amarir Fatima, Et-touys Abdeslam, Bekhti Khadija, Adlaoui El Bachir, Bakri Youssef, Nhammi Haddou, Sadak Abderrahim, Sebti Faiza: Epidemiological characteristics of Visceral Leishmaniasis in Morocco (1990–2014): An Update. *Acta tropica* 10/2016; 170., DOI:10.1016/j.actatropica.2016.10.016
- **Meryem Mniouil**, Hajiba Fella, Fatima Amarira, Abderrahim Sadak., Abdeslam Et-touys, Youssef Bakri, Aziza Moustachi, Mostapha Hida, Yaagoubi M., Rhajaoui M, Faiza Sebti. Evaluation of rK39 rapid test and soluble antigen ELISA and IFAT for the Sero-diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Morocco. *Acta tropica*.
- Et-Touys A, Bouyahya A, Fella H, **Mniouil M**, El Boury H, Dakka N, Sadak A, Bakri Y (2017). Antileishmanial activity of medicinal plants from Africa: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2017; 7(12): 826-840.
- Abdeslam Et-Touys, Hajiba Fella, **Meryem Mniouil**, Abdelhakim Bouyahya, Nadia Dakka, Hassane Abdennebi, Abderrahim Sadak, Youssef Bakri: Screening of Antioxidant, Antibacterial and Antileishmanial Activities of *Salvia officinalis* L. Extracts from Morocco. *British Microbiology Research Journal*. DOI:10.9734/BMRJ/2016/28307
- Abdeslam Et-Touys, Hajiba Fella, Faiza Sebti, **Meryem Mniouil**, Mhammed Aneb, Houria Elboury, Ahmed Talbaoui, Nadia Dakka, Abderrahim Sadak, Youssef Bakri: In vitro Antileishmanial Activity of Extracts from Endemic Moroccan Medicinal Plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (*S. clandestina* Batt. non L). *British Microbiology Research Journal*. DOI:10.9734/EJMP/2016/27891

### Article Soumis

- Meryem Mniouil., Hajiba Fella., Fatima Amarir., Grégory Michel., Pascal Delaunay., Mohamed Rhajaoui., Abderrahim Sadak., Pierre Marty., Prevalence of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using Western Blot and Real-Time PCR in an endemic area in Morocco. **2022**. *Acta tropica*.

## Communications scientifiques (orales et posters)

- **Meryem Mniouil.**, Hajiba Fellah., Fatima Amarir., Abderrahim Sadak., Abdeslam Et-touys., Youssef Bakri., Aziza Moustachi., Fatima Zahra Tassou., Mostapha Hida., Mohammed Lyagoubi., Faiza Sebti., Evaluation du Test de Diagnostic Rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale au Maroc. Congrès franco-marocain de Parasitologie-Mycologie. Du 1er au 3 Février (2018). Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.
- **Mniouil M.**, Fellah H., Amarir F., Grégory M., Delaunay P., Rhajaoui M., Sdak A., Marty P. Prevalence of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot and real-time PCR an endemic area in Morocco. 25 Février (2017) Marrakech.
- **Mniouil M.**, Fellah H., Amarir F., Et-touys A., Sdak A., Moustashi A., Lyagoubi M., Rhajaoui M., Adlaoui B., Tassou FZ., Hida M., Sebti F., Evaluation du test de diagnostic rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale au Maroc. 25 Février (2017) Marrakech.
- **Mniouil M.**, Fellah H., Amarir F., Et-touys A., Bekhti K., Adlaoui EB., Bakri Y., Nhammi H., Sadak A., Sebti F., Epidemiological characteristics of Visceral Leishmaniasis in Morocco (1990-2014): An Update. 5ème édition des doctorales FSR 2016 «Recherche Scientifiques Eco-Innovatrice : Acquisition du Savoir et Perfectionnement des Compétences ». Du 9 au 11 Mars (2016). Faculté des Sciences de Rabat, Maroc.
- **Mniouil M.**, Amarir F., Fellah H., Sadak A., Et-touys A., Michel G., Delaunay P., Marty P., Etude Séro-moléculaire et épidémiologie de la Leishmaniose Viscérale Symptomatique et Asymptomatique au Maroc. le 15 Novembre (2016). Centre Hospitalier de Nice, France.
- **Mniouil M.**, Fellah H., Amarir F., Et-touys A., Bekhti K., Adlaoui EB., Habbari K., Bakri Y., Haddou N., Sadak A., Sebti F. Étude épidémiologique de la leishmaniose viscérale au Maroc et identification de l'espèce circulante. Congrès Internationale de Biotechnologie au Service de la Société "BioSeS 2015". du 22 au 24 Octobre (2015). Faculté des Sciences et Techniques Fès, Maroc.
- **Mniouil M.**, Fellah H., Amarir F., Sadak A., Et-touys A., Adlaoui EB., Bakri Y., Nhammi H., Sebti F., Evolution moléculaire et épidémiologique de la leishmaniose viscérale au Maroc (1921-2014). 3ème Edition de la journée Internationale de

Biotechnologie Médicale. le 17 Décembre (2015). Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

- Et-Touys A., Fellah H., Sebti F., **Mniouil M.**, Talbaoui A., Sadak A., Bakri Y., In vitro antileishmanial activity of extracts from Moroccan medicinal plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. *Ssp verbenaca Maire (S. clandestina Batt. non L)*. 5ème édition des doctoriales FSR 2016 « Recherche Scientifiques Eco-Innovatrice : Acquisition du Savoir et Perfectionnement des Compétences ». Du 9 au 11 Mars (2016). Faculté des Sciences de Rabat, Maroc.
- Tassou FZ., **Mniouil M.**, Fellah H., Sebti F., Atmani S., Chaouki S., Hida M., Evaluation du test de diagnostic rapide pour la leishmaniose viscérale. 4ème Congrès National SOMIPEV. Du 25 au 27 Mars (2016). Hôtel Les Jardins d'Agdal Marrakech, Maroc.
- Tassou FZ., **Mniouil M.**, Fellah H., Sebti F., Atmani S., Chaouki S., Idrissi Lakhdar M., Hida M. Evaluation du test de diagnostic rapide dans la leishmaniose viscérale infantile. Les 17èmes journées de pédiatrie de Fès. Du 4 au 6 Mars (2016). Faculté de médecine et de pharmacie de Fès, Maroc.
- Mengad R., **Mniouil M.**, Belbacha I., Bennani O., Elharti E., Fellah H., Sebti F., El Mansouri B., Oumzil H., Western blot reactivity to HIV antibodies in patients suspected of visceral leishmaniasis in Morocco. 17th IUSTI world congress. Du 9 au 12 Mai (2016). Marrakech.
- Et-Touys A., Fellah H., Sebti F., **Mniouil M.**, Talbaoui A., Sadak A., Bakri Y., *L'activité anti-leishmania sp de l'extrait de Salviaverbenaca (l.) Briq. Sspverbenaca maire (L). Clandestinabatt. Non l)*. Forum International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales : Valorisation et Innovation. *Du Maroc*. du 26 au 28 Novembre (2015). Faculté des Sciences et Techniques Fès, Maroc.

## **Résumé**

Au Maroc la leishmaniose viscérale est une infection grave voire mortelle si elle n'est pas diagnostiquée et prise en charge précocement. L'agent incriminé est *Leishmania infantum* zymodème MON-1, ayant comme réservoir le chien et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus*. Le taux d'incidence annuel moyen de la LV entre 1990 et 2019 est de 0,4 cas/100 000 habitants. Il s'agit d'une maladie infantile qui commence à toucher l'adulte, avec une répartition localisée au préalable au Nord du Maroc pendant les années 90 puis étendue vers le centre et le sud du Maroc depuis l'année 2000. La PCR-Lei70 confirme que *Leishmania infantum* est l'agent causal de la LV au Maroc.

L'évaluation de l'ICT rk39 a montré une sensibilité de 98,5% et une spécificité de 100% soit un potentiel de diagnostic plus élevé que les méthodes classiques. C'est un outil de diagnostic non-invasif, simple, fiable et adapté au terrain.

L'étude de la prévalence au niveau du secteur Galaz était relativement élevée avec 71,2% et 60,5 % par la qPCR et par le WB respectivement, par rapport à celle trouvée à Bouadel qui était respectivement de 28,8% et 39,5% par la qPCR et le WB. On déduit que la prévalence du portage asymptomatique sur les 177 échantillons collectés varie selon la localité d'étude et la méthode de diagnostic utilisée.

**Mots clés :** Leishmaniose viscérale, Epidémiologie, *Leishmania. Infantum*, PCR en temps réel, immunochromatographie rk39, portage asymptomatique, sang périphérique, Western Blot, Maroc, Taounate.

## ***Abstract***

In Morocco, visceral leishmaniasis is a serious and even fatal infection if not diagnosed and treated early. The causative agent is *Leishmania infantum* zymodeme MON-1, with dogs as reservoir and *Phlebotomus perniciosus* as main vector. The average annual incidence rate of VL between 1990 and 2019 is 0.4 cases/100,000 population. It is a childhood disease that is beginning to affect adults, with a localized distribution in the north of Morocco during the 1990s and then spread to central and southern Morocco since 2000. PCR-Lei70 confirms that *Leishmania infantum* is the causative agent of VL in Morocco.

Evaluation of the rk39 TBI showed a sensitivity of 98.5% and a specificity of 100%, which is a higher diagnostic potential than conventional methods. It is a non-invasive diagnostic tool, simple, reliable and adapted to the field.

The prevalence study in Galaz sector was relatively high with 71.2% and 60.5% by qPCR and WB respectively, compared to that found in Bouadel which was 28.8% and 39.5% by qPCR and WB respectively. It is inferred that the prevalence of asymptomatic carriage in the 177 samples collected varies according to the study locality and the diagnostic method used.

**Key words** : Visceral leishmaniasis, Epidemiology, *Leishmania. Infantum*, Real time PCR, immunochromatography rk39, asymptomatic carriage, peripheral blood, Western blot, Morocco, Taounate.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>.....</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>.....</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>.....</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Données bibliographiques.....</b>	<b>4</b>
<b>I. La leishmaniose viscérale .....</b>	<b>5</b>
I.1. Définition et importance .....	5
I.2. Historique.....	6
<b>II. Agent pathogène : <i>L. infantum</i> .....</b>	<b>7</b>
II. 1. Définition et taxonomie des leishmanies .....	7
II.2. Morphologie .....	9
II.3. Biologie.....	10
<b>III. Cycle évolutif du parasite.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. Vecteurs de la leishmaniose viscérale.....</b>	<b>12</b>
IV.1. Espèces vecteurs.....	12
IV.2. Phlébotome au Maroc .....	13
IV.3. Cycle de vie des phlébotomes .....	15
<b>V. Réservoirs de la leishmaniose viscérale .....</b>	<b>16</b>
<b>VI. Répartition géographique de la leishmaniose viscérale dans le monde et le Maroc..</b>	<b>17</b>
<b>VII. Différents modes de contamination .....</b>	<b>19</b>
<b>VIII. Facteurs de risque de la leishmaniose viscérale .....</b>	<b>20</b>
<b>IX. Réponse immune au cours de la leishmaniose viscérale.....</b>	<b>21</b>
<b>X. Diagnostic de la leishmaniose viscérale .....</b>	<b>24</b>
X.1. Diagnostic de présomption .....	25
X.2. Diagnostic de certitude .....	26
X.2.1. Recherche du parasite .....	26
X.2.2. Examen microscopique direct .....	28

X.2.3. La culture .....	28
X.2.4. Leucocytoconcentration (LCC).....	29
X.2.5. Inoculation à l’animal .....	29
X.2.6. Biologie moléculaire .....	30
X.2.7. Typage enzymatique .....	31
X.3. Sérologie.....	31
X.3.1. Recherche d’anticorps circulants .....	31
X.3.2. Recherche d’antigènes .....	34
X.3.3. Autres arguments immunologiques.....	34
<b>XI. Traitement de la leishmaniose .....</b>	<b>35</b>
<b>Hypothèse et objectifs du travail.....</b>	<b>38</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>39</b>
<b>I. Situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès (1990-2019).....</b>	<b>40</b>
I.1. Zone d’étude .....	40
I.2. Collecte de données .....	41
I.3. Echantillonnage et diagnostic .....	42
I.4. Typage des souches par PCR-Lei70 .....	42
I.5. Analyse statistique .....	44
I.6. Déclaration d’éthique.....	44
<b>II. Etude des performances du test immunochromatographique rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale.....</b>	<b>44</b>
II.1. Echantillonnage : Critères d’inclusion.....	44
II.2. Test de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographie rk39 .....	45
II.3. Enzyme Linked-Immuno-Sorbant Assay(ELISA) (dosage immuno-enzymatique) .....	46
II.4. Immunofluorescence indirecte(IFI).....	47
II. 5. Examen direct .....	48
II.6. Extraction d'ADN et analyse PCR-Lei70 .....	49

II.7. Traitement.....	49
II.8. Analyse statistique .....	49
II.9. Reproductibilité .....	50
<b>III. Étude de la prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate.....</b>	<b>50</b>
III.1. Caractéristiques de la région d'étude .....	51
III.2. Sites d'étude .....	52
III.4. Travaux réalisée .....	53
III.4.1. Au niveau du terrain.....	53
III.4.2. Au laboratoire .....	53
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>58</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>58</b>
<b>I. Situation épidémiologiques de la leishmaniose viscérale dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès (1990-2019).....</b>	<b>59</b>
I.1. Au Maroc .....	59
I.1.1. Extension spatial de la LV au Maroc.....	59
I.1.2. Répartition de la LV selon les provinces de 1990 à 2019 .....	61
I.2. Région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès.....	62
I.2.1. Répartition temporelle de la LV .....	62
I.2.2. Répartition des cas de LV à <i>L.infantum</i> par province .....	62
I.2.3. Répartition géographique des cas de LV à <i>L.infantum</i> .....	63
I.2.4. Répartition de la LV en fonction de l'âge et du sexe de 2009 à 2019 .....	65
I.3. Typage moléculaire de <i>Leishmania</i> .....	66
<b>II. Etude des performances du test immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale par rapport à l'ED, la PCR, L'ELISA et l'IF... 67</b>	<b>67</b>
II.1. Parasitologie et caractéristiques des patients.....	67
II.1.2. Reproductibilité .....	67
II. 3. Sérologie.....	68

II.4. Sensibilité et spécificité.....	68
<b>III. Étude de la Prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate.....</b>	<b>69</b>
III. 1. Enquêtes en vue d'évaluer les connaissances de la population sur la maladie et de déterminer les facteurs de risque et de transmission de celle-ci .....	69
III.2. Enquête sérologique et moléculaire .....	73
II.2.1. Prévalence du portage asymptomatique .....	73
<b>Discussion.....</b>	<b>76</b>
<b>I. Étude épidémiologique de la leishmaniose viscérale au Maroc (1990-2019) : Actualisation .....</b>	<b>76</b>
<b>II. Etude des performance du test immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale par rapport à l'ED, la PCR, L'ELISA et l'IFI..</b>	<b>80</b>
<b>III. Étude de la Prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate.....</b>	<b>82</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>85</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>88</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>104</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Enfant souffrant de la leishmaniose viscérale à <i>L. infantum</i> .....	5
<b>Figure 2:</b> Forme promastigote de <i>L. infantum</i> .....	9
<b>Figure 3:</b> Forme amastigote de <i>L. infantum</i> . .....	9
<b>Figure 4:</b> Cycle évolutif de <i>L. infantum</i> . .....	11
<b>Figure 5:</b> Morphologie générale d'un phlébotome adulte.....	12
<b>Figure 6:</b> Carte de la répartition des phlébotomes au Maroc .....	13
<b>Figure 7:</b> Cycle de vie d'un phlébotome .....	15
<b>Figure 8:</b> Répartition de la leishmaniose viscérale dans le monde .....	17
<b>Figure 9:</b> Évolution du nombre de cas de LV enregistré au Maroc durant la période de 1995 à 2016.....	18
<b>Figure 10:</b> Répartition, par région, du nombre de cas de LV enregistré au Maroc durant la période de 2011 à 2016. ....	19
<b>Figure 11:</b> Nouveau cycle de transmission de <i>L. infantum</i> . .....	20
<b>Figure 12:</b> Interactions entre le macrophage et la leishmanie (promastigote) via leurs molécules de surface et des protéines solubles. ....	22
<b>Figure 13 :</b> Les paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T CD4+. ....	23
<b>Figure 14:</b> Leishmaniose gastrique : plusieurs amas de formes amastigotes.....	28
<b>Figure 15:</b> Résultats de diagnostic de LV par le western blot.....	33
<b>Figure 16:</b> Interprétation des résultats du test rapide rk 39. ....	33
<b>Figure 17:</b> IntraDermoRéaction à la leishmanine positive.....	34
<b>Figure 18:</b> Zone d'étude.....	41
<b>Figure 19:</b> Bandelettes du test rapide rk 39 (IT leish) (Institut national d'hygiène Rabat) (photo originale).....	45
<b>Figure 20:</b> Carte de la province de Taounate. ....	51
<b>Figure 21:</b> Cas de LV humaine au Maroc entre 1996 et 2001 .....	59
<b>Figure 22:</b> Cas de LV humaine au Maroc entre 1990 et 1995 .....	59
<b>Figure 23:</b> Cas de LV humaine au Maroc entre 2008 et 2013 .....	60
<b>Figure 24:</b> Cas de LV humaine au Maroc 2002 entre et 2007 .....	60
<b>Figure 25:</b> Cas de LV humaine au Maroc entre 2014 et 2019 .....	60
<b>Figure 26:</b> Évolution annuelle des cas de la LV dans la Tanger-Tétouan-Al Hoceïma et la région.....	62
<b>Figure 27:</b> Répartition des cas de LV entre 1990 et 2019 dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceïma et la région Fès-Meknès .....	63

<b>Figure 28:</b> Distribution géographique des cas de LV dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès de 1990 à 2019 .....	63
<b>Figure 29:</b> Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 1996 et 2001 .....	64
<b>Figure 30:</b> Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 1990 et 1995 .....	64
<b>Figure 31:</b> Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2008 et 2013 .....	64
<b>Figure 32:</b> Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2002 et 2007 .....	64
<b>Figure 33:</b> Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2014 et 2019 .....	65
<b>Figure 34:</b> Répartition des cas de LV en fonction de l'âge et du sexe de 2009 à 2019.....	65
<b>Figure 35:</b> Électrophorèse sur gel d'agarose montrant les produits de PCR en utilisant.....	67
<b>Figure 36:</b> Répartition des cas selon les conditions socio-économiques .....	69
<b>Figure 37:</b> Connaissance su la leishmaniose dans la région d'étude. ....	70
<b>Figure 38:</b> Service des chiens chez les personnes interrogées .....	71
<b>Figure 39:</b> Existence des chiens sans propriétaire dans les localités d'enquête.....	71
<b>Figure 40:</b> Présence d'insectes piqueurs la nuit. ....	72
<b>Figure 41:</b> Période durant laquelle les insectes piqueurs sont les plus fréquents.....	72

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Position systématique du genre <i>Leishmania</i> .	7
<b>Tableau 2:</b> Classification des différentes espèces de leishmanies.	8
<b>Tableau 3:</b> Nombre de l'échantillon pour chaque secteur.	53
<b>Tableau 4:</b> Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR en temps réel ..	56
<b>Tableau 5:</b> Plan de plaque.	57
<b>Tableau 6:</b> Evolution des cas de la LV dans certaines régions et en fonction des années (1990 et 2019).	61
<b>Tableau 7:</b> Résultats de l'examen microscopique des lames du secteur le plus touché au Maroc.	66
<b>Tableau 8:</b> Comparaison entre les résultats de l'antigène ICT rK39, IFAT et ELISA.	68
<b>Tableau 9:</b> Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), et valeur prédictive négative (VPN) des méthodes de diagnostic sérologique de la leishmaniose viscérale évaluées au Maroc	68
<b>Tableau 10:</b> Nombre de personnes interrogées par secteur.	69
<b>Tableau 11:</b> Répartitions des cas selon le sexe et l'âge.	70
<b>Tableau 12:</b> Résultats de la PCR en temps réel et du WB dans les deux secteurs d'étude .....	73
<b>Tableau 13:</b> La prévalence du portage asymptomatique dans les deux secteurs de la zone d'étude	73
<b>Tableau 14:</b> Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), et valeur prédictive négative (VPN) du WB dans la détection des cas asymptomatiques	74
<b>Tableau 15:</b> Composition du Mix pour l'amplification Lei-70	108
<b>Tableau 16:</b> Programme du thermocycleur pour Lei70	108
<b>Tableau 17:</b> Composition du Mix pour l'analyse de restriction.	112

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>LV</b>	: Leishmaniose Viscérale
<b>L.</b>	: <i>Leishmania</i>
<b>P.</b>	: <i>Phlebotomus</i>
<b>MON</b>	: Montpellier
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>IFI</b>	: Immunofluorescence Indirecte
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>LNRL</b>	: Laboratoire National de Référence des Leishmanioses
<b>INH</b>	: Institut National d'Hygiène
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalier Universitaire
<b>ICT</b>	: Immunochromatographie
<b>SPM</b>	: Système des phagocytes mononuclées
<b>MO</b>	: Moelle osseuse
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	: Acides ribonucléiques
<b>VIH</b>	: Virus d'Immunodéficience Humaine
<b>SIDA</b>	: Syndrome d'immunodéficience acquise
<b>HCV</b>	: Virus de l'hépatite C
<b>HLA</b>	: Antigènes des leucocytes humains
<b>IL</b>	: Interleukine
<b>INF</b>	: Interféron
<b>TNF</b>	: Facteur de nécrose tissulaire
<b>NO</b>	: Oxyde Nitrique
<b>CTL</b>	: Cellules T cytotoxiques
<b>VS</b>	: vitesse de sédimentation
<b>CRP</b>	: Protéine C réactive
<b>Ig</b>	: Immunoglobulines
<b>DAT</b>	: Agglutination directe
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>MGG</b>	: May Grünwald Giemsa
<b>NNN</b>	: Novy-McNeal Nicolle
<b>LCC</b>	: Leucocytoconcentration

**PMO** : Ponction de la moelle osseuse  
**WB** : Western Blot  
**IDR** : Intradermo-réaction  
**DAP** : Dérivés de l'antimoine pentavalents  
**DELM** : Direction d'épidémiologie et de lutte contre les maladies  
**TDR** : Test de diagnostic rapide  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**UI** : Unité international  
**UV** : Ultra-violets  
**VPP** : Valeur prédictive positive  
**VPN** : Valeur prédictive négative  
**SAU** : Surface agricole utile

# **Introduction générale**

La leishmaniose viscérale (LV) est une parasitose due à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* (*L.*). Sa transmission à l'homme est assurée par la piqûre d'un insecte vecteur qui est le phlébotome. C'est la forme la plus grave de la leishmaniose, mortelle en l'absence de traitement (Desjeux, 2004 ; Dujardin, 2008). La plupart des cas sont enregistrés au Brésil, en Afrique de l'Est et Asie du Sud-Est. Selon les estimations, 50 000 à 90 000 nouveaux cas de LV surviennent chaque année. En 2015, plus de 90% des cas notifiés à l'OMS se sont produits dans 7 pays : Brésil, Éthiopie, Inde, Kenya, Somalie, Soudan et Soudan du Sud (OMS, 2020).

La LV est une zoonose parasitaire qui sévit à l'état endémique au Maroc. Elle est causée par un protozoaire flagellé *L. infantum* MON-1 (Rioux *et al.*, 1993 ; Lakhdar Idrissi *et al.*, 2007), est transmise par la piqûre d'un insecte-vecteur. Les vecteurs de la leishmaniose à *L. infantum* appartiennent au sous genre *Larrousius* (*P. perniciosus*, *P. longicuspis* et *P. ariasi*) (Aoun *et al.*, 2013). Le chien représente le principal réservoir de la maladie (Dujardin *et al.*, 2008, Michel *et al.*, 2011).

Au Maroc la LV est largement prédominante dans les régions du Rif et du pré-Rif (Chefchaoun, Taounate, Taza, Fès, My Yaacoub, Meknès, Séfrou, Al Hoceima et Sidi Kacem) (Amaro *et al.*, 2013). Plus de 150 cas humains sont enregistrés chaque année (DELM, 2013) dont environ 75% sont des enfants en-dessous de l'âge de 10 ans. La malnutrition, la quantité de parasites inoculée, la virulence de la souche et une immunodépression, due notamment à l'infection par le VIH ou autre facteur, agissent sur la résistance ou le développement de la maladie (Marty, 2010). En général, chez les enfants la phase d'incubation dure de 1 à 6 mois, parfois plus, puis des symptômes généraux vont apparaître, dominés notamment par une fièvre irrégulière et prolongée (37,8-38,5°C), un amaigrissement, une hépatomégalie, une splénomégalie dépassant l'ombilic et une anémie. Bien que fréquente chez l'enfant, la LV peut toucher l'adulte (OMS, 2010) et elle se caractérise par l'inconstance de certains symptômes majeurs de la maladie comme la fièvre et la splénomégalie, ou encore sans même présenter de symptômes, ce qui rend le tableau clinique incomplet et le diagnostic peu évident. On rapporte également des formes subcliniques, mais surtout une proportion très importante de porteurs asymptomatiques dans la population méditerranéenne qui correspond à la partie émergée de l'iceberg de tous les individus infectés (Michel *et al.*, 2011). Ces sujets contacts, voire porteurs asymptomatiques de leishmanies, sont nombreux et la maladie peut survenir en cas d'immunodépression suite à l'épidémie du Sida ou l'utilisation de certaines thérapies immunosuppressives (Le Fichoux,

1999 ; Kubar, 1998). D'après l'exploitation des enquêtes épidémiologiques au Maroc, les cas d'infection par *L. infantum*, ne sont identifiés qu'après la manifestation des signes cliniques. Le dépistage tardif des cas de LV au Maroc augmente le coût des hospitalisations et la prise en charge. En outre, les sujets infectés et asymptomatiques peuvent tout de même transmettre la maladie lors de la réutilisation de seringues par voie intraveineuse, à l'occasion d'une transfusion sanguine et de la mère à l'enfant (transmission congénitale). Une étude menée par [Fakhar et al., \(2008\)](#) et [Lima et al., \(2012\)](#) suggère que les humains asymptomatiques peuvent être des sources de parasite pour les phlébotomes vecteurs. [Deane \(1962\)](#) a montré que les patients atteints de la LV active pourraient infecter les phlébotomes. [Costa et al., \(2000, 2002\)](#) ont confirmé la possibilité que les porteurs humains asymptomatiques peuvent être des hôtes réservoirs. Par conséquent, il est primordial d'adapter des techniques normatives de diagnostic précoce de la maladie chez les sujets asymptomatiques dans les régions endémiques. En effet, durant les périodes de transmission, on note une forte abondance et une large distribution des vecteurs *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* ([Rioux et al., 1978](#)), *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* ([Berchiet et al., 2017](#)), *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* ([Berchiet et al., 2017](#)), responsables de la maladie ([Talbi et al., 2015](#)), d'où l'importance de promouvoir les recherches sur l'extension géographique de la maladie, les proportions relatives entre parasitose-infestation et parasitose-maladie, et l'identification des souches circulantes. Les sujets atteints de la LV habitent généralement des régions lointaines, démunies et difficilement accessibles, par conséquent ils ne bénéficient pas du diagnostic biologique et ils sont pris en charge tardivement. Le diagnostic sérologique, réalisé au Maroc par l'IFI, l'ELISA et autres, nécessite un laboratoire équipé, du matériel spécialisé et un personnel qualifié. En outre, l'emplacement des laboratoires spécialisés dans les grandes villes, ne leur permet pas de couvrir la totalité des provinces. Or un test rapide, simple (ne nécessite pas d'équipement), sensible et spécifique s'avère indispensable pour le diagnostic et le dépistage de masse dans les régions lointaines et démunies. Le test sérologique rapide (immunochromatographique) détectant des anticorps dirigés contre l'antigène rk39, semble répondre à ces exigences. Son évaluation sur les sérums positifs de l'Inde, Népal, Bangladesh, Soudan, Kenya (*L. donovani*), Brésil, Tunisie (*L. infantum*) et en Ethiopie, a montré qu'il est hautement sensible (92%), spécifique (92-98%) et reproductible ([OMS, 2010](#)). Cependant, aucune étude n'est réalisée au Maroc pour évaluer ses performances dans la détection des cas cliniques et asymptomatiques ([OMS, 2010](#)).

L'objectif de ce travail est donc de mettre au point une synthèse globale des données actuelles concernant la leishmaniose viscérale en particulier, tout en discutant son profil épidémiologique ainsi que les importantes avancées enregistrées ces dernières années, tant sur le plan diagnostique que physiopathologique.

Ce document est composé de trois parties. Il est réalisé dans un cadre universitaire en collaboration avec le Laboratoire de Biodiversité, Écologie et Génome (BEG) à la Faculté des Sciences Université Mohammed V de Rabat, le Laboratoire National de Référence des Leishmanioses (LNRL) de l'INH à Rabat, le laboratoire de Parasitologie et Mycologie de CHU de Nice-France, le Département de Parasitologie au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ibn Sina de Rabat, et le service de pédiatrie de CHU Hassan II de Fès.

La Première partie porte sur les généralités des leishmanioses. Nous tracerons le portrait de la maladie et décrirons la situation épidémiologique de la LV au Maroc, dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès. Après un rappel des méthodes existantes de diagnostics, nous traiterons de la problématique de l'extension de la LV.

La deuxième partie présente une évaluation des performances de l'immunochromatographie (ICT) rk39 comme test de diagnostic rapide de la maladie, après le diagnostic établi par des examens directs et sérologiques.

La troisième partie se focalise sur la détermination de la prévalence du portage asymptomatique au Maroc et de proposer une approche diagnostique par PCR en temps réel à partir du sang total.

# **Données bibliographiques**

## I. La leishmaniose viscérale

### I.1. Définition et importance

La leishmaniose viscérale est une maladie infectieuse liée au développement et à la multiplication dans les cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM) d'un flagellé : *L. infantum* dans l'ancien monde et à *L. chagasi* dans le nouveau monde, transmis par la piqûre d'un Psychodidé, insecte Diptère Nématocère appartenant au genre *Phlebotomus* (Meunier, 2007; Lukes *et al.*, 2007). Ce parasite est responsable d'une affection caractérisée cliniquement par une atteinte viscérale et cutanéomuqueuse et, sur le plan lésionnel, par une atteinte de tous les organes et tissus contenant des cellules macrophagiques (Chapuis *et al.*, 2007; Pernot, 2005). C'est une maladie chronique, évoluant sur plusieurs mois, difficile à traiter, fréquemment sujette à des rechutes, et donc de pronostic réservé. Il s'agit de plus d'une zoonose dont le chien est la source du parasite pour les phlébotomes qui peuvent transmettre ensuite la maladie à l'homme par piqûre. Le chien constitue le réservoir principal de la leishmaniose viscérale humaine.

La LV se traduit cliniquement par trois symptômes majeurs :

- Fièvre anarchique et prolongée de 38°C qui atteignent parfois 40,5 °C
- Pâleur expliquée par l'anémie
- Organomégalie : le plus souvent splénomégalie et des fois accompagnée d'une hépatomégalie (**Figure1**).



**Figure 1:** Enfant souffrant de la leishmaniose viscérale à *L. infantum* (Guide de lutte contre les leishmanioses, 2010)

L'importance de la LV est due à son incidence relativement élevée en zone d'endémie. L'importance médicale tient au fait qu'il s'agit d'une cause fréquente de consultations due aux rechutes très courantes. L'importance économique est liée au coût des consultations, des

traitements (souvent à vie) et des méthodes de prophylaxie. L'importance sanitaire est due au caractère zoonotique de la maladie qui, bien que rarement exprimé, reste non négligeable (Bourdoiseau et Denerolle, 2000).

## I.2. Historique

En 1900, Sir William Leishman a découvert l'agent de la maladie dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde (Lagardere B *et al.*, 1983). Les résultats de cette découverte n'ont été publiés qu'en 1903.

La même année, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Ce parasite fut nommé *L. Donovanii*.

En 1909, Nicolle décrit *L. infantum* en Afrique du Nord et en 1913 Chagas identifia la maladie, tandis que Migone retrouva le parasite, appelé *L. chagasi*, en Amérique du Sud. Les analyses génétiques indiquent que *L. chagasi* et *L. infantum* sont étroitement liés et certains ont suggéré qu'il s'agissait de la même espèce (Maurício *et al.*, 2000).

La transmission par le phlébotome a été découverte en Inde en 1924 par les frères Sargent pour *L. donovani* et au Maghreb en 1926 par Parrot et Donatien pour *L. infantum*. Ces deux derniers ont démontré les huit années suivantes le rôle des chiens dans le cycle de *L. infantum* (Lagardere *et al.*, 1983).

Au Maroc, Remlinger rapportera la première observation de leishmaniose infantile en 1913 et la publia en 1921. D'autres observations ont été rapportées à :

- Meknès par Klippel et Monier-Vinard en 1922.
- Ouazzane par Fabien Luengo en 1929.
- Kalâat Sraghna par Blanc en 1933 (Agoumi *et al.*, 1991).

Gaud (1935) et Blanc (1940) ont remarqué l'extrême rareté de la LV au Maroc et se demandaient s'il s'agissait d'une rareté ou d'une méconnaissance de la maladie.

A partir de 1957, plusieurs travaux ont été réalisés. En effet, Cadi Soussi *et al.* (2001) ont étudié la répartition géographique de la leishmaniose viscérale et cutanée au Maroc. Un nombre croissant de leishmaniose viscérale humaine a été observé de 1957 à 1994 (Nejjar *et al.*, 1998). De ce fait, Agoumi *et al.*, 1991 ont proposé une mise au point sur le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale humaine au Maroc pendant la période 1975-

1989. En 1995, elle a été classée parmi les maladies à déclaration obligatoire (Guessous-Idrissi *et al.*, 1997).

## II. Agent pathogène : *L. infantum*

### II. 1. Définition et taxonomie des leishmanies

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania*. La position de ce genre dans la classification de Levine *et al.*, (1980) est la suivante :

**Tableau 1:** Position systématique du genre *Leishmania* (Levine *et al.*, 1980).

<b>Règne</b>	<i>Protista</i>	<b>Haeckel, 1866</b>
<b>Sous-règne</b>	<i>Protozoa</i>	Siebold 1845.
<b>Embranchement</b>	<i>Sarcomastigophora</i>	Honigberg et Balamuth, 1963
<b>Sous-embranchement</b>	<i>Mastigophora</i>	Diesing, 1866
<b>Classe</b>	<i>Zoomastigophora</i>	Calkins, 1909
<b>Ordre Honigberg, 1963</b>	<i>Kinetoplastida</i>	Honigberg, 1963
<b>Sous-ordre</b>	<i>Trypanosomatina</i>	Kent, 1880
<b>Famille</b>	<i>Trypanosomatidae</i>	Dolfein, 1901
<b>Genre</b>	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903

Le genre *Leishmania* comprend 2 sous-genres (Akhoundi *et al.*, 2017) :

- ✓ Le sous-genre *Leishmania*, dont la multiplication des promastigotes est limitée chez l'insecte à l'intestin moyen.
- ✓ Le sous-genre *Viannia*, dont cette multiplication concerne l'intestin moyen et l'intestin postérieur.

L'identification des différentes espèces de leishmanies fait appel à des techniques d'étude du profil enzymatique (zymodème). Leur classification est présentée dans le **tableau 2**.

On se limitera ici au sous-genre *Leishmania*, auquel appartient l'espèce qui intéresse la présente étude, notamment sur *L. infantum*.

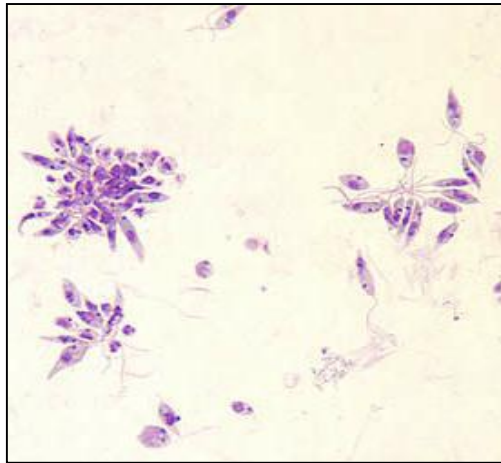
**Tableau 2:** Classification des différentes espèces de leishmanies (Roberts *et al.*, 2000).

Espèce	Nombre de zymodèmes	Localisation	Maladie
<b>Sous-genre <i>Leishmania</i> (Ross, 1903)</b>			
<i>Leishmania de l'Ancien Monde transmis par Phlebotomus</i>			
<i>L. donovani</i> (Laveran et Mesnil, 1903)	13	Inde, Chine, Bangladesh	Leishmaniose viscérale anthroponosique
<i>L. archibaldi</i> (Castellani et Chalmers, 1919)		Soudan, Ethiopie	
<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)	18	Centre nord de l'Asie, nord-ouest de la Chine, Moyen-Orient, sud de l'Europe, nord-ouest de l'Afrique	Leishmaniose viscérale zoonosique
syn <i>L. chagasi</i> (Cunha et Chagas, 1937)		Amérique latine	
<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)	28	ex-URSS	Leishmaniose cutanée sèche anthroponotique
<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986)		Tunisie	
<i>L. major</i>	12	Turkistan URSS, Afrique, Moyen-Orient	Leishmaniose cutanée humide zoonotique
<i>L. aethiopica</i> (Ashford et Bray, 1973)	3	Ethiopie, Kenya	Leishmaniosetégument aïrediffuse
<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu et Guan, 1973)		Chine, Mongolie	
<i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari et Evans, 1986)		Arabie saoudite	
<i>Leishmania du Nouveau Monde transmis par Lutzomyia</i>			
<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953)	3	Mexique, Belize, Guatemala, centre sud des Etats-Unis	Ulcère des chicleros
<i>L. amazonensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)		Brésil, Bassin amazonien	Leishmaniose cutanée diffuse incurable
<i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)		Vénézuéla	Leishmaniose cutanée Localisée
<i>L. enrietti</i> (Muniz et Medina, 1948)		Brésil	
<i>L. hertigi</i> (Herrer, 1971)		Panama, Costa Rica	
<i>L. deanei</i> (Lainson et Shaw, 1977)		Brésil	
<b>Sous-genre <i>Viannia</i> (Lainson et Shaw, 1987)</b>			
<i>L. braziliensis</i> (Viannia, 1911)	2	Brésil	Espundia
<i>L. peruviana</i> (Velez, 1913)		Pérou ; ouest des Andes	Uta
<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954)	5	Guyane, Guyane Française, Surinam	Pian Bois (forme sèche ou humide)
<i>L. panamensis</i> (Lainson et Shaw, 1972)		Panama, Costa Rica	Leishmaniose cutanée localisée

## II.2. Morphologie

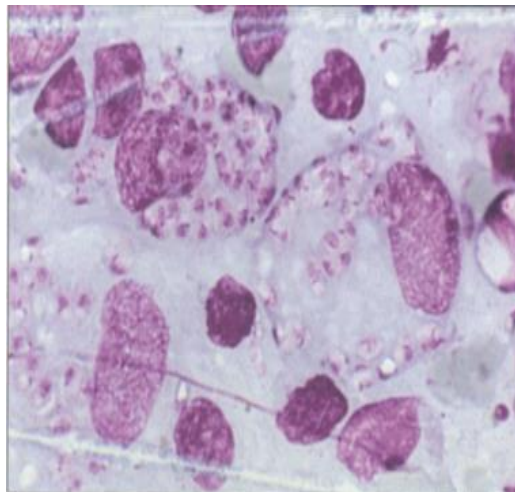
Les leishmanies se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques principaux : les promastigotes et les amastigotes (Bourdoiseau, 2000) :

La forme promastigote : allongée et fusiforme mesurant de 15 à 20  $\mu\text{m}$ , munie d'un long flagelle qui lui permet de se déplacer (**Figure 2**). C'est la forme libre et mobile, rencontrée chez le vecteur et en culture.



**Figure 2:** Forme promastigote de *L. infantum* (LNRL, 2013).  
(Gr : x1 00, coloration au Giemsa)

La forme amastigote: cette forme est arrondie ou ovoïde, immobile, mesurant 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre (**Figure 3**). C'est la forme intracellulaire rencontrée chez l'homme et les mammifères.



**Figure 3:** Forme amastigote de *L. infantum* (LNRL, 2014).  
(Frottis de moelle osseuse, coloré au May Grund Giemsa, observé au grossissement x400)

### II.3. Biologie

- **Répartition dans l'organisme**

Chez les vertébrés, les leishmanies sont des parasites intracellulaires situés dans des vacuoles parasitophores au sein des cellules du SPM : macrophages de divers tissus, histiocytes dermiques, cellules de Küpffer du foie et monocytes sanguins ([Bourdoiseau, 2000](#)).

Chez l'Homme en particulier, les leishmanies sont observables dans le derme, les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse (MO), la rate, le foie, le produit de lavage broncho-alvéolaire, le produit de la ponction du liquide céphalorachidien...etc. Cette très large diffusion est d'ailleurs à l'origine du caractère polymorphe de la maladie ([Raquin, 2010](#)).

Dans ces cellules, les leishmanies sont rassemblées par dizaines, dans une vacuole parasitophore (le phagosome). Contrairement à ce qui est le cas pour d'autres parasites intracellulaires, les leishmanies n'empêchent pas la fusion phagosome-lysosome. Elles résistent aux enzymes lysosomales parce qu'elles sont enveloppées d'une couche protéique qui les protège contre les processus oxydatifs qui les détruiraient et contre l'activation des lysosomes.

- **Nutrition et métabolisme**

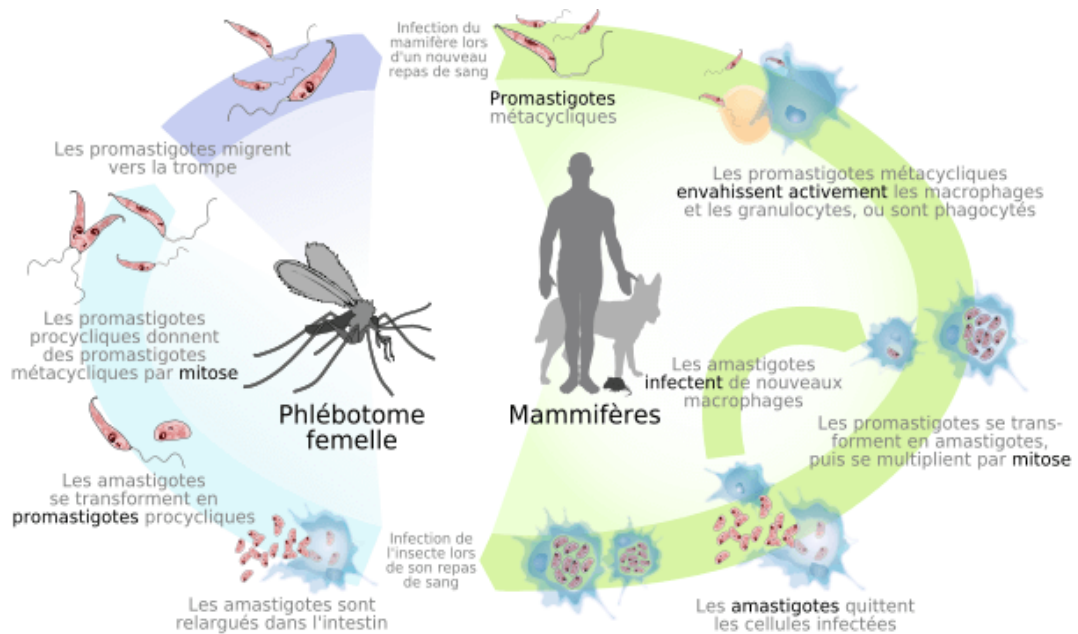
Les leishmanies utilisent les protéines des cellules-hôtes. Leur ADN est synthétisé à partir des précurseurs de l'ARN de ces cellules, notamment la purine qu'elles ne peuvent pas synthétiser et qui leur est fournie par leur hôte ([Bourdoiseau, 2000](#)).

- **Multiplication et reproduction**

La multiplication des leishmanies se fait par scissiparité longitudinale aussi bien pour les formes promastigotes, en culture et chez le vecteur, que pour les formes amastigotes dans la vacuole parasitophore de la cellule qui les abrite. Ainsi, chez le chien, qui est un animal sensible, les leishmanies persistent dans le SPM et se multiplient dans les cellules comme les macrophages, en utilisant des mécanismes d'échappement à l'action du système immunitaire ([Raquin, 2010](#)). La reproduction sexuée n'est pas connue mais fortement suspectée.

### III. Cycle évolutif du parasite

Le cycle parasitaire (**Figure 4**) est de type dixène et dure 2 à 3 semaines, il met en jeu un hôte vertébré (l'Homme dans le cas présent), et un vecteur biologique (le phlébotome). Il débute par le repas sanguin du phlébotome sur un chien leishmanien.



**Figure 4:** Cycle évolutif de *L. infantum* (Harhay *et al.*, 2011).

L'insecte va ingérer par la même occasion de la lymphe dermique, où se trouvent des macrophages parasités par des leishmanies (forme amastigote). Les amastigotes évoluent en promastigotes procycliques qui s'échappent de la membrane péritrophique (enveloppant le repas sanguin) et se multiplient dans la lumière de l'intestin moyen de l'insecte. Par la suite, les parasites se dirigent vers l'intestin antérieur de l'insecte, où, devenant des promastigotes métacycliques, ils acquièrent leur virulence. Les leishmanies se fixent alors au cardia du phlébotome. La durée pendant laquelle les leishmanies se développent au sein du phlébotome dépend des espèces en jeu, mais est en moyenne de 5 jours. Le phlébotome pourra transmettre des promastigotes infectants à ce terme, et cela, durant toute sa vie, qui peut durer plusieurs mois (Bourdoiseau, 2000).

A l'occasion d'un repas, le phlébotome va inoculer les leishmanies aux vertébrés grâce à un phénomène de défaillance du cardia causé par les parasites. Celui-ci n'empêchera plus la régurgitation des parasites. Les leishmanies promastigotes ainsi inoculées seront phagocytées par des macrophages chez le vertébré. Elles s'y transformeront en forme amastigote qui se multiplieront dans la vacuole parasitophore. Le macrophage sera lysé à cause d'un trop grand nombre de parasites et les leishmanies iront alors coloniser de nouveaux macrophages, permettant l'extension de la maladie (Ntsama, 2010).

Les leishmanies ont par conséquent un double mode de vie pour un double habitat. Elles sont intracellulaires chez le chien et extracellulaires chez le vecteur. La forme amastigote ingérée

par le vecteur se transforme en leishmanie promastigote, qui se multiplie et sera inoculée au chien (Ntsama, 2010).

## IV. Vecteurs de la leishmaniose viscérale

### IV.1. Espèces vectrices

Le vecteur de la LV est un insecte diptère, nématocère, de la famille des Phlébotomidés : le phlébotome.

Les phlébotomidés sont divisés en trois sous-familles. Seuls deux sous-familles jouent un rôle en matière de leishmaniose : les Phlébotominés, de l'Ancien Monde, et les Lutzomynés, du Nouveau Monde.

On distingue différentes espèces de phlébotomes, dont l'importance dans la transmission de la leishmaniose canine varie selon la région autant à l'échelle mondiale que nationale (Marty et Le Fichoux, 1988). *L. infantum* est transmis par les phlébotomes appartenant au sous-genre Larrousius. *P. ariasi* et *P. perniciosus* sont les vecteurs dans les pays méditerranéens (Kahime et al., 2014), tandis que *P. longicuspis* est suspecté (Kahime et al., 2014).

#### ✚ Morphologie

Le phlébotome (Figures 5) est un insecte de petite taille, environ 2 à 4 mm, très velu, lancéolé, bossu et de couleur jaunâtre.



Figure 5: Morphologie générale d'un phlébotome adulte (Niang., 2000).

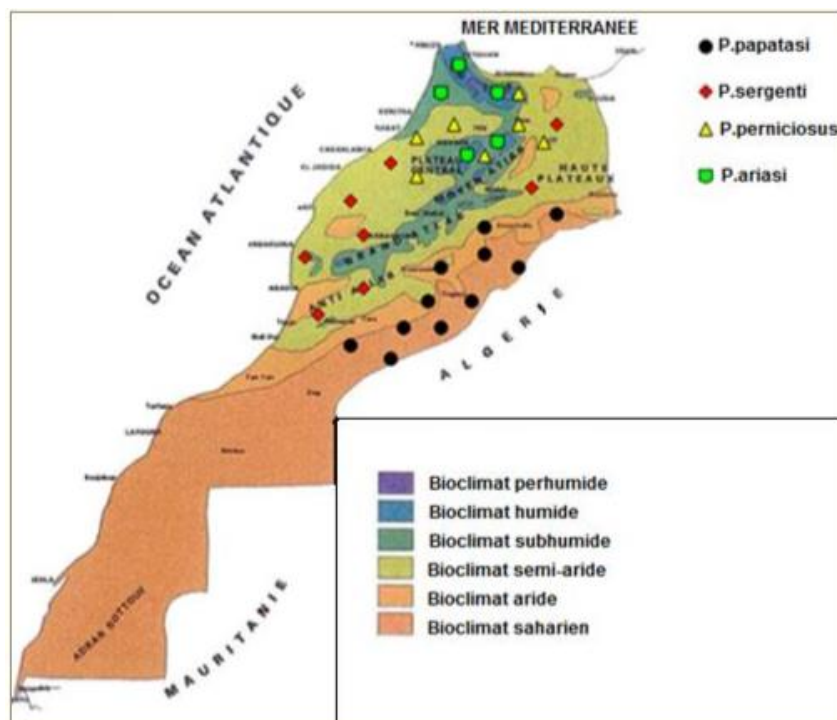
Ses ailes sont aussi très velues dressées en forme de V au repos (Bourdoiseau, 2000). Sa faible dimension, sa pâleur et son vol silencieux fait qu'il est rarement remarqué (Marty et al., 2009).

- La tête : forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue.
- Les antennes : formées de 16 articles et très longues.
- Les pièces buccales : une trompe formée de plusieurs pièces buccales.
- Thorax : le prothorax est très réduit, le reste est très développé et convexe.
- Les pâtes : très longues (fémur-tibia-tarse constitué de 5 articles).
- Abdomen : formé de 10 segments dont les deux derniers sont modifiés et constituent les armatures génitales chez les deux sexes. Il est arrondi chez la femelle alors que chez le mâle il a un aspect tronqué à cause de la présence de l'hypopygium (armature génitale) qui est très développé et saillant (Berchi *et al.*, 2007).

#### IV.2. Phlébotome au Maroc

Les phlébotomes ont suscité plusieurs travaux au Maroc avant même que les leishmanioses ne soient considérées comme un problème majeur de santé publique.

Actuellement, la liste des phlébotomes du Maroc contient 22 espèces, réparties en 13 espèces du genre *Phlebotomus* et 09 espèces du genre *Sergentomyia* (Boussaa, 2008). Les espèces les plus incriminées comme vecteurs sont (**Figure 6**):



**Figure 6:** Carte de la répartition des phlébotomes au Maroc (Barrot., 2011)

#### Sous genre *Larroussius*:

Constituent un sous-genre bien individualisé au sein du genre *Phlebotomus* tant par leur morphologie que par leur rôle épidémiologique.

***P. ariasi*** : cette espèce a une répartition limitée au Nord du Maroc. Elle est prédominante dans les étages subhumide et semi-aride, à des altitudes entre 1000 et 1400m. Dans ce secteur on trouve comme végétation les chênes mixtes (Lasri, 2009). Cette espèce est plus abondante en juillet.

*P. longicuspis* et *P. perniciosus* vivent dans la partie occidentale du bassin méditerranéen. Ces deux espèces vivent en sympathie sur la presque totalité de la zone de distribution (Boussaa, 2008).

***P. perniciosus***: au Maroc, la présence de *P. perniciosus* a été notée depuis 1920 dans la région de Marrakech et de Tissa (Lasri, 2009). Ils sont localisés dans le nord du Maroc, en étages humides et semi-arides, dans diverses régions : plaines et collines Nord Atlantique (Rabat), plateau central, plaines moyennes intérieures, Haut-Atlas (Tiznit), Anti-Atlas (Tafraout) et Maroc oriental (Boussaa et al., 2008).

Guernaoui et al., 2006 ont rapporté la présence de *P. perniciosus* dans le Sud-Ouest du Maroc. D'autres résultats ont confirmé ces données et ont démontré que cette espèce est répandu au Sud du Maroc, dans les secteurs montagneux caractérisés par un climat humide (Boussaa et al., 2008).

***P. longicuspis*** : cette espèce est présente 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) (Guernaoui et al., 2006). *P. longicuspis* est un vecteur suspecté dans la transmission de *L. infantum* (Sharma et Singh, 2008).

*P. longicuspis* et *P. perniciosus* ont des préférences bioclimatiques bien définies. De même, l'altitude semble avoir une influence sur leur abondance. Dans une étude sur les phlébotomes de l'Atlas Guernaoui et al., 2006 ont montré que *P. longicuspis* vit préférentiellement entre 600 et 800 m d'altitude alors que *P. perniciosus* se trouve majoritairement entre 1000 et 1200 m.

#### **Sous genre *Phlebotomus***

***P. papatasi*** : cette espèce a une large répartition dans tout le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, prolongée vers l'Est en Asie centrale et en Inde. On la retrouve aussi en Arabie Saoudite, au Soudan, en Somalie et en Ethiopie. C'est un vecteur dont le rôle épidémiologique est bien établi au Maroc. Ce phlébotome est récolté dans tout le pays, où il compte parmi les espèces les plus abondantes, et tout particulièrement dans les ceintures bioclimatiques arides et principalement sahariennes (Rispaïl et al., 2002).

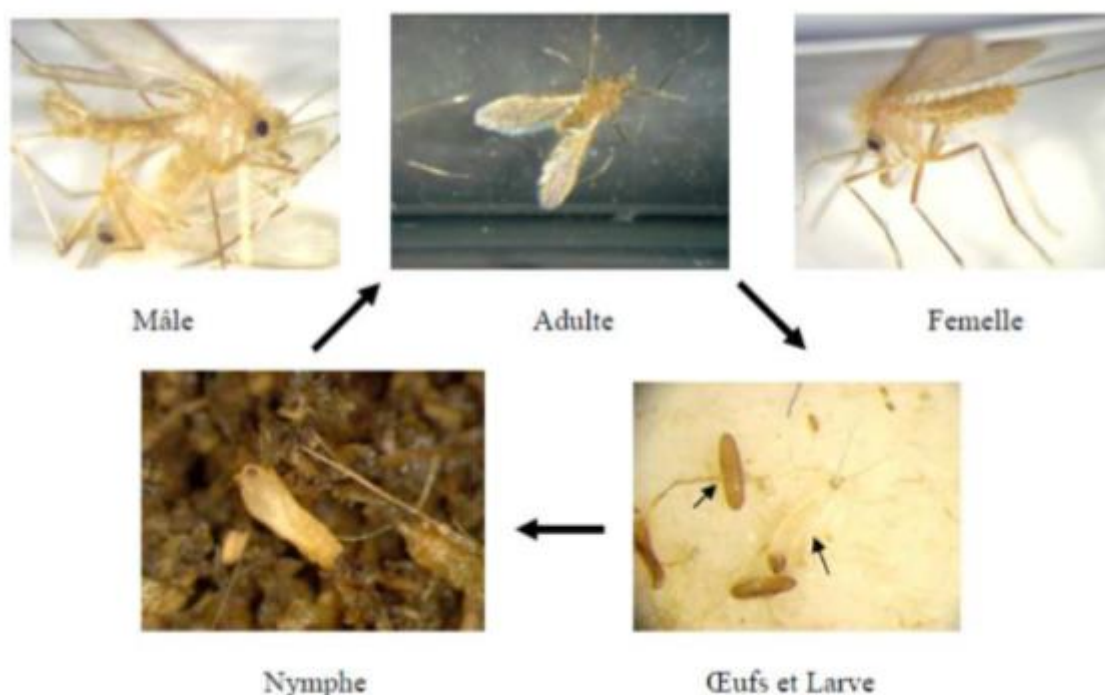
*P. papatasi* est le vecteur majeur de la leishmaniose cutanée à *L. major*.

#### Sous genre *Paraphlebotomus*

*P. sergenti* : cette espèce existe dans tout le bassin méditerranéen où elle est le vecteur naturel de *L. tropica*. Au Maroc, cette espèce est présente dans les étages semi-arides et arides caractérisés par l'Arar et les Genévriers comme végétation (Rispaïl *et al.*, 2002).

#### IV.3. Cycle de vie des phlébotomes

Ils présentent un cycle de vie holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe et l'imago (Figure 7).



**Figure 7:** Cycle de vie d'un phlébotome (Boussaa, 2008)

Les phlébotomes ont une activité nocturne et crépusculaire et ils sont sensibles aux courants d'air. La journée, ils se cachent dans les endroits obscurs et abrités. Dans les régions tropicales ils sont actifs toute l'année, alors que dans les régions tempérées, ils disparaissent l'hiver, la pérennité de l'espèce étant assurée par les larves. Leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition varient suivant la latitude, l'altitude, la saison et l'espèce (Killick-Kendrick, 1999).

Pour son ovogenèse, la femelle prend un repas sanguin afin de se procurer les éléments nutritifs nécessaires. Le temps entre un repas sanguin et la maturation des œufs est fonction de l'espèce, de la vitesse de digestion et de la température ambiante.

Les femelles déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent les conditions optimales pour les stades pré-imaginaux. Leurs œufs se développeront en larves sur le sol, dans les terriers, les nids, la poussière des anfractuosités de rochers ou de vieux murs, les tas de débris végétaux. La nymphe entrera ensuite en état de vie ralentie et subira enfin la mue imaginale conduisant à l'adulte.

Les phlébotomes adultes séjournent durant la journée dans des endroits retirés sombres et relativement humides (terriers, étables, clapiers, niches, et même dans les maisons) ; les horaires de sortie et de rentrée varient suivant l'espèce et les conditions des milieux (étage bioclimatique, période de l'année...).

Ils ne commencent à s'agiter qu'à la tombée du jour si la température est suffisamment élevée (19-20°C), en l'absence de vent. Une faible température ou une température trop élevée constituent autant de facteurs limitant pour l'activité des phlébotomes ([Killick-Kendrick, 1999](#) ; [Wasserberg et al., 2003](#)).

Les mâles se nourrissent exclusivement de jus sucrés également indispensables aux femelles. La femelle, seule hématophage, prendra ses repas nécessaires au développement des œufs sur des mammifères, oiseaux, reptiles ou batraciens. Il faut 30 secondes à 5 minutes pour que l'estomac d'un phlébotome soit rempli. En effet, lorsqu'un phlébotome est dérangé au cours de son repas, il peut le compléter soit en piquant aussitôt le même hôte (ce qui explique certaines lésions multiples de leishmanioses cutanées) soit en piquant un autre hôte.

## **V. Réservoirs de la leishmaniose viscérale**

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées. Ces mammifères appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates ou périssodactyles ([Dedet, 2009](#)).

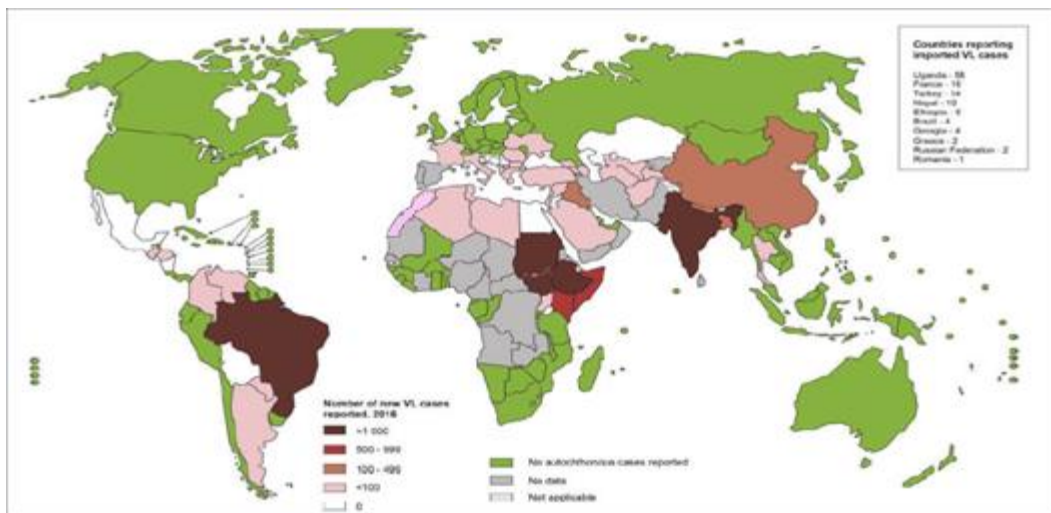
Mise à part l'Inde, où l'homme est l'unique réservoir de l'infection, la LV est une zoonose domestique et/ou sauvage. Ses réservoirs animaux les plus courants sont représentés par divers canidés : chien (*Canis familiaris*) à peu près partout, chacal (*Canis aureus*) en Asie Centrale, divers renards (*Vulpes vulpes* dans le Sud de l'Europe ; *Lycalopex vetulus* et *Cerdocyon thous* en Amérique du Sud), chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*) en Chine. D'autres mammifères, principalement des félidés (*Felis catus* ; *Genetta genetta*) mais aussi des rongeurs (*Rattus rattus*, *Arvicanthis niloticus*) ont pu être trouvés spontanément infectés et peuvent être impliqués dans les cycles sauvages de LV ([Dedet, 1994](#)).

La leishmaniose canine est très largement répandue dans le monde, depuis la Chine jusqu'en Amérique du Sud, en passant par l'Asie Centrale, le Bassin Méditerranéen, l'Afrique (de l'Est et de l'Ouest). Dans tous ces foyers l'enzootie a une prévalence nettement supérieure à la maladie humaine (Dedet, 1994). Il est à noter que le lièvre ibérique (*Lepus granatensis*) et un lapin sauvage (*Oryctolagus cuniculis*) ont été récemment impliqués comme réservoir de la LV à *L. infantum* en Espagne (Bastienet et Lachaud, 2016). Au Maroc, le réservoir de la leishmaniose viscérale est principalement le chien qu'il soit malade ou porteur sain. Il assure la conservation du parasite et sa transmission par le vecteur (Rhajaoui, 2011).

## VI. Répartition géographique de la leishmaniose viscérale dans le monde et le Maroc

### 🌍 Dans le monde

La leishmaniose viscérale est endémique dans plus de 60 pays à travers le monde (Figure 8).



**Figure 8:** Répartition de la leishmaniose viscérale dans le monde (WHO, 2019)

En 2015, plus de 90% de tous les cas de LV documentés provenaient des sept pays suivants : Brésil, Éthiopie, Inde, Kenya, Somalie, Soudan du Sud et Soudan (Burza *et al.*, 2018). L'incidence mondiale est actuellement en baisse. Environ 200 000 à 400 000 nouveaux cas sont survenus dans le monde en 2012, de 50 000 à 90 000 en 2017. Cependant, l'incidence fluctue sous une forme cyclique avec des pics d'incidence tous les 8 à 15 ans. Une augmentation cyclique de l'incidence semble donc probable, d'autant plus que les facteurs de risque de maladies (par exemple le VIH / SIDA et la migration de personnes non immunisées dans les zones d'endémie) persistent (Burza *et al.*, 2018). En Europe, les régions rurales de tous les pays méditerranéens sont touchées. Au total, 75% des cas en Europe peuvent être observés en Italie, en Espagne, en Albanie et en Géorgie (WHO, 2019).

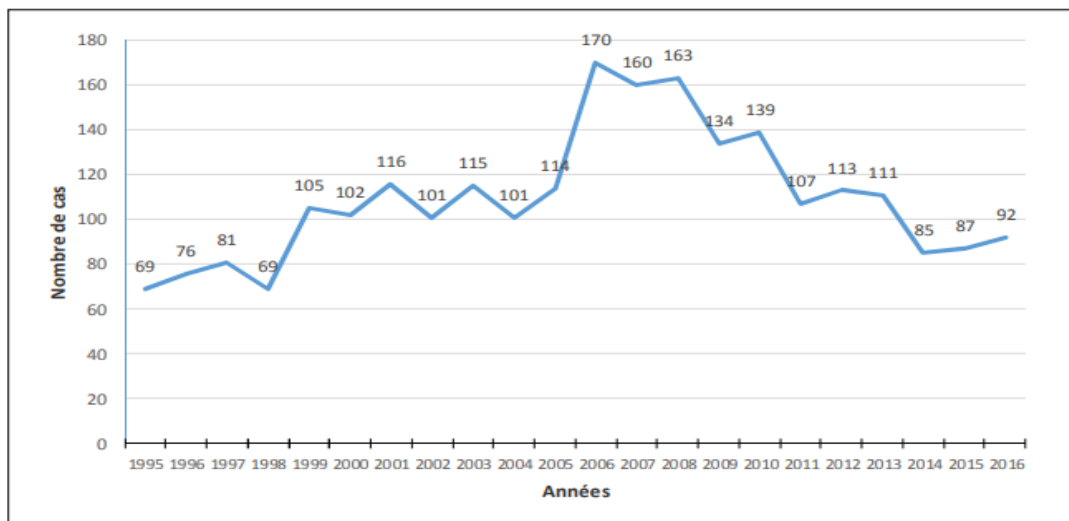
## ✚ Au Maroc

Au Maroc, comme dans la plupart des pays méditerranéens, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. Qu'elles soient zoonotiques ou anthroponotiques, cutanées ou viscérales, ces infestations y sont largement représentées depuis les montagnes du Rif jusqu'aux palmeraies péri-arides des piémonts de l'Anti-Atlas (OMS, 2010).

Depuis le 31 mars 1995, les leishmanioses sont devenues des maladies à déclaration obligatoire au Maroc (Guessous-Idrissi et al., 1997). Ce qui a permis une estimation plus objective de leur incidence et une mise en place du profil épidémiologique de la maladie au Maroc.

La LV au Maroc est surtout localisée dans le Nord du pays, mais des cas sporadiques ont été observés dans d'autres régions, notamment au Sud, le parasite responsable est *L. infantum*, dont le zymodème MON 1 est le plus commun sur le pourtour méditerranéen (Benbella et al., 2018).

Selon les données recueillies auprès de la Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies, le nombre de cas enregistrés de la LV dans les quatre premières années était entre 69 et 81 (1995-1998). Mais à partir de 1999, une nette augmentation de l'incidence annuelle est notée avec une centaine de cas nouveau jusqu'en 2006 qui a connu un maximum de cas recensés de 170. Ce nombre s'est inscrit ensuite en baisse dans la décennie qui suit pour se stabiliser autour de 80 cas annuel (Figure 9).



**Figure 9:** Évolution du nombre de cas de LV enregistré au Maroc durant la période de 1995 à 2016 (DELM, 2016).

La leishmaniose viscérale au Maroc a connu une évolution de l'endémicité dans le temps, l'augmentation de l'incidence dans les premières années s'expliquerait en grande partie par l'amélioration de la déclaration et de la prise en charge des malades.

La baisse constatée ces dernières années serait le résultat de l'action préventive engagée par les autorités sanitaires. Sur un autre plan et au niveau de la dispersion géographique de la maladie, on note que les régions les plus touchées sur la période allant de 2011 à 2016 sont restées les mêmes à savoir les régions appartenant au nord du Maroc (**Figure 10**).

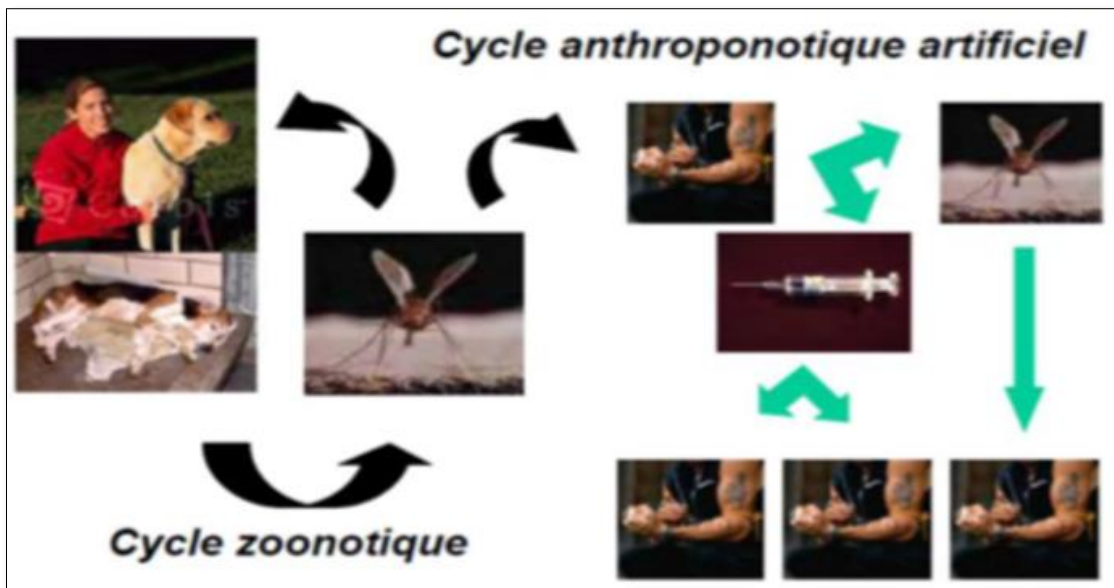
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
Oued Eddahab Lagouira	0	0	0	0	0	0	0
Laayoune Sakia Lhamra Boujdour	0	0	0	0	0	0	0
Guelmim Es Semara	0	0	1	2	3	0	6
Souss Massa	2	1	3	0	3	8	17
Rabat Salé Zemmour Zaer	10	11	12	10	14	12	69
Marrakech Safi	4	1	10	7	8	9	39
Oriental	8	8	9	4	6	4	39
Béni-Mellal Khénifra	2	3	1	1	6	4	17
Draâ Tafilalet	2	1	5	2	5	10	25
Fès Meknès	9	21	9	12	3	18	72
Casablanca Settat	46	35	41	33	29	2	186
Tanger Tétouan	24	20	20	14	10	25	113
Région non déterminée	0	12	0	0	0		12
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>113</b>	<b>111</b>	<b>85</b>	<b>87</b>	<b>92</b>	<b>595</b>

**Figure 10:** Répartition, par région, du nombre de cas de LV enregistré au Maroc durant la période de 2011 à 2016 (DELM, 2016).

## VII. Différents modes de contamination

La piqûre infestante du phlébotome femelle représente le mode habituel de contamination. Des cas exceptionnels de transmission directe par voie transplacentaire, par voie vénérienne et par transfusion sanguine ont été rapportés dans la littérature. Ce dernier mode de transmission (l'échange de seringue usagée) est incriminé pour expliquer l'atteinte élevée des toxicomanes au cours de la co-infection leishmaniose/Virus de l'immunodéficience acquise (VIH) (Dedet, 2009 ; Najma, 2008).

C'est dans ce cadre qu'un nouveau cycle de transmission a été décrit entre toxicomanes via les seringues, avec une transmission conjointe du VIH, du HCV et de la leishmaniose (**Figure11**) (Gangneux *et al.*, 2015).



**Figure 11:** Nouveau cycle de transmission de *L. infantum* (Marty, 2005).

### VIII. Facteurs de risque associé à la leishmaniose viscérale

Autrefois, on pensait que la plupart des formes de LV étaient symptomatiques. Cependant, des études de dépistages réalisées sur des dons de sang, ont révélé que le nombre de porteurs asymptomatiques était bien plus élevé qu'on ne le pensait.

Il semble désormais que l'homme infecté développe rarement la maladie. Les cas humains concernent essentiellement les sujets aux défenses immunologiques amoindries. La relation hôte-parasite est complexe. Elle dépend de :

- la virulence du parasite (quantité de parasites inoculée, espèce en cause, acquisition de résistance...);
- la susceptibilité génétique de l'hôte (HLA, gènes de cytokines impliqués...);
- la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui explique que les enfants, les personnes dénutries et immunodéprimées soient les plus touchés.

Certains facteurs peuvent accroître la susceptibilité de l'hôte :

- l'âge : jusqu'à la fin des années 1970, la LV était majoritaire chez le jeune enfant de 1 à 3 ans dans le sud de l'Europe. Ceci est toujours vrai dans le Maghreb (Maroc, Tunisie, Algérie) où 95% des cas pédiatriques (avant cinq ans) réalisant le classique Kala-azar méditerranéen infantile. L'épithète spécifique «*infantum*» vient d'ailleurs du fait qu'elle touchait essentiellement les enfants;

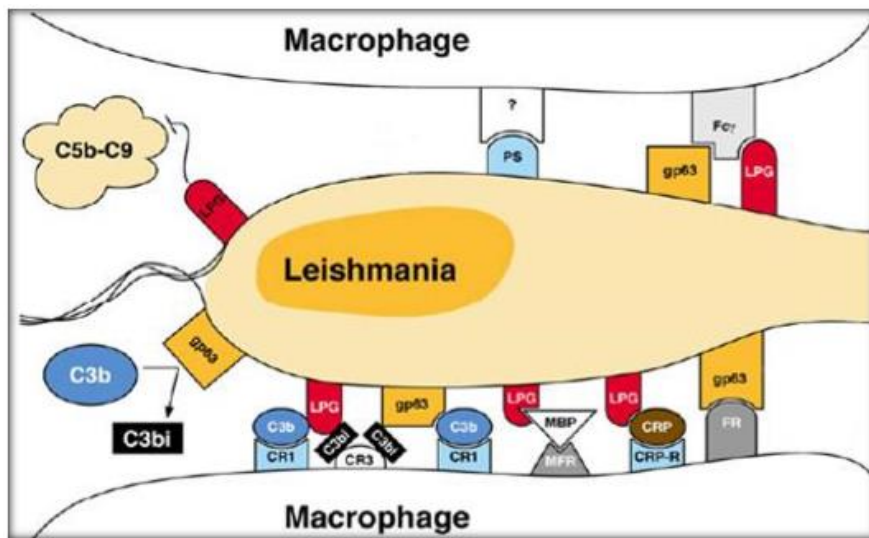
- le sexe: il n'existe pas de réelle différence en fonction du sexe, en dehors du foyer indien où la prédominance masculine s'explique plutôt par une plus grande exposition des hommes aux piqûres (moins couverts) que par une sensibilité particulière;
- la dénutrition et pauvreté : la dénutrition participe à l'affaiblissement du système immunitaire, ce qui favorise l'infection. Tout particulièrement, certaines études épidémiologiques ont souligné que les femmes et les enfants principalement touchés en Asie et en Afrique, avaient des régimes pauvres en protéines, en fer, en zinc et en vitamine A ;
- de plus, dans les régions les plus pauvres comme en Asie, les familles des personnes atteintes sont obligées de vendre les biens (bétails, outils, rizière,...) pour acheter les traitements et se retrouvent alors dans le cercle vicieux de la maladie, la pauvreté, la dénutrition, ce qui participe encore davantage à l'extension de l'infection ;
- l'immunodépression (acquise ou iatrogène): des cas de plus en plus nombreux sont observés depuis les années 1980 chez des sujets adultes immunodéprimés. En effet, la défense contre le parasite, qui est intracellulaire, nécessite une parfaite coopération cellulaire entre le système monocytes-macrophages et les lymphocytes, particulièrement les lymphocytes CD4+, ce qui explique que les patients atteints par le VIH et les patients sous traitement immunodépresseur soient des cibles privilégiées ;
- les hémopathies, les néoplasies peuvent aussi induire une immunodépression cellulaire et favoriser les manifestations de la maladie. Dans certains cas, une leishmaniose viscérale a même permis de révéler un cancer sous-jacent ;
- les personnes âgées représentent aussi des cibles potentielles. Tout d'abord parce que leurs défenses immunitaires sont physiologiquement amoindries et en plus, parce qu'elles reçoivent bien souvent des traitements au long cours, comme des corticoïdes, qui peuvent aussi fragiliser leurs systèmes de défense ;
- la grossesse : impose un certain état de «tolérance» du système immunitaire envers le fœtus et implique donc un état immunitaire assez particulier (Carré *et al.*, 2010).

## **IX. Réponse immune au cours de la leishmaniose viscérale**

L'étude des réponses immunitaires dirigées contre le parasite est nécessaire afin de mieux comprendre l'immunité de l'hôte face à l'organisme pathogène et de pouvoir alors développer des vaccins contre cette maladie. L'infection de l'Homme par *Leishmania* ne se manifeste pas nécessairement par l'expression de la maladie. On distingue ainsi, au sein des sujets infectés, des sujets symptomatiques et d'autres asymptomatiques. Cette dualité peut suggérer une différence dans la réponse immunitaire (Michel *et al.*, 2011).

## ✚ Invasion des macrophages par les leishmanies

Une fois injectés, les promastigotes sont confrontés à une première barrière : les protéines du complément ce qui déclenche une réaction inflammatoire et entraîne l'activation des protéines du complément par la voie classique et la fixation du C3 sur la membrane du parasite et son clivage en C3b. Toutefois, les promastigotes utilisent des stratagèmes qui leur permettent de résister à la lyse par le complément grâce à la gp63 et aux protéines kinases au niveau de leur membrane plasmique (Filippi *et al.*, 2001). La phagocytose des promastigotes est mise en route par l'engagement des récepteurs CR1 et CR3 avec les protéines C3b et C3bi fixées à la surface des promastigotes (Rosenthal *et al.*, 1996) (Figure 12).



**Figure 12:** Interactions entre le macrophage et la leishmanie (promastigote) via leurs molécules de surface et des protéines solubles (Nadau, 2005).

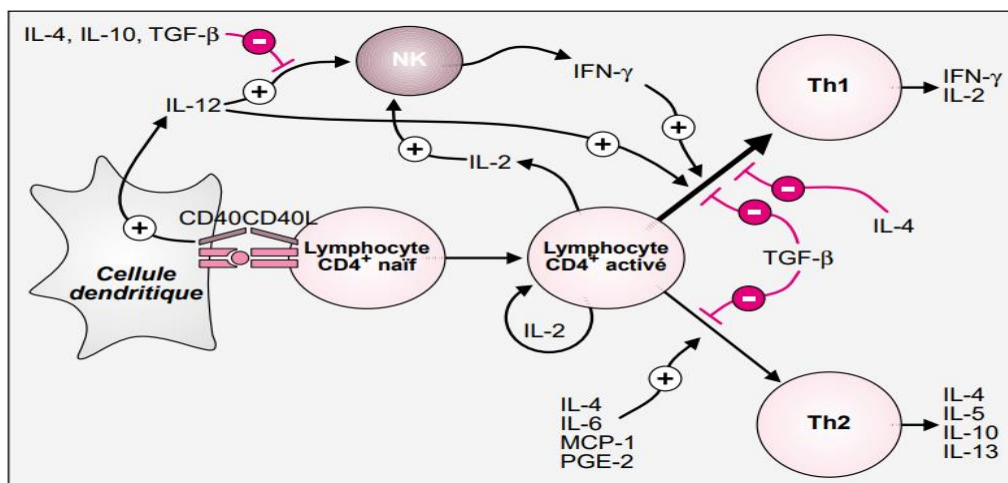
PS: Phosphatidylsérine, MBP: Mannose binding protein, MFR: Mannose fucose receptor, CRP: C-reactive protein, CRP-R: C-reactive protein receptor, FR: fibronectine receptor.

À cause de la résistance du parasite, les macrophages infectés par les leishmanies ne produisent que peu ou pas d'interleukine (IL-12) (Belkaid *et al.*, 1998), une cytokine pourtant déterminante dans le développement d'une immunité protectrice.

Dans le cas des leishmanies les récepteurs concernés sont le TLR2, le TLR4, le TLR7, le TLR8 et le TLR9 (Wojtkowiak, 2007). L'activation des TLRs par les PAMPS présents chez les leishmanies conduit généralement à la production de cytokines pro-inflammatoires et plus généralement à des réponses immunitaires antimicrobiennes. La nature de cet environnement cytokinique associée à différents facteurs comme la présence d'hormones, la nature et la dose des antigènes parasitaires et le nombre de lymphocytes T spécifiques (Spellberg and Edwards, 2001) conditionnent largement le type de réponse immunitaire adaptative.

## ✚ Réponse immunitaire adaptative

Le contrôle de la multiplication parasitaire exercé par le système de l'immunité adaptative a été largement étudié dans le modèle murin d'infection à *L. major* (Mosmann *et al.*, 2005) avec la mise en évidence du rôle fonctionnel des sous populations de lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> Th1 et Th2. Si les lymphocytes B et les anticorps produits démontrent plutôt un effet délétère pour l'hôte, lors d'une infection par des leishmanies (Smelt *et al.*, 2000; Sacks and Noben-Trauth, 2002), les lymphocytes T sont les principaux responsables de l'immunité anti-leishmanie. Même si les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont montré un rôle important dans le contrôle de l'infection (Filippi, 2001), une réponse CD4<sup>+</sup> inadéquate peut permettre d'instaurer une forte infection chez les souris sensibles. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, présents en grande quantité chez les souris résistantes (Shankaret *et al.*, 1995), semblent jouer un rôle important dans la résistance lors de la ré-infection en augmentant la production d'IFN- $\gamma$  (Ehrchen *et al.*, 2010). Les souris résistantes à *L. major* (C57Black6 C3HJ) développent en présence d'IL-12 (issue de la réponse immunitaire innée et/ou produite par la cellule présentatrice) une réponse de type Th1 protectrice caractérisée par la production d'IFN  $\gamma$  et de lymphotoxine  $\alpha$  stimulant la phagocytose et la destruction des parasites par le NO et les radicaux libres oxygénés. Les souris sensibles à *L. major* (BALB/c) développent en présence d'IL-4 (issue de l'immunité innée et/ou des cellules présentatrices) une réponse de type Th2 non protectrice caractérisée par la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et une production élevée d'anticorps (Figure 13).



**Figure 13 :** Les paramètres influençant la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Filipi C *et al.*, 2001).

L'activation des lymphocytes T naifs dépend de l'interaction entre le RcT exprimé à la surface de ces cellules et le ligand peptide/CMH présenté par les cellules dendritiques. La fixation de CD40L à son récepteur CD40 induit la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. L'IL-12 stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et favorise la différenciation des lymphocytes T naifs en cellules Th1. Le schéma met également en évidence la polarisation préférentielle des lymphocytes T naifs en cellules de type Th1 et le rôle de différentes cytokines dans l'orientation de cette polarisation.

Les immunités de type 1 et de type 2 ne sont pas strictement synonymes d'immunité à médiation cellulaire et d'immunité à médiation humorale, car les cellules Th1 stimulent une production modérée d'anticorps alors que les cellules Th2 inhibent activement la phagocytose. D'une manière générale, le développement préférentiel de la voie Th1 tend à inhiber la voie Th2 et vice versa, aboutissant tout du moins dans le modèle murin d'infection à *L. major* à des réponses relativement polarisées. Cependant, la polarisation n'est pas un phénomène irréversible et peut être dirigée vers une voie ou l'autre (Sacks and Noben-Trauth, 2002).

La réponse immunitaire adaptative conduit également à la génération de cellules T régulatrices produisant notamment de l'IL-10 à activité anti-inflammatoire limitant les effets délétères et des cellules T mémoires (centrales ou effectrices). Si les cellules T mémoire centrales peuvent être maintenues relativement facilement, le maintien d'un pool de cellules effectrices au long cours semble nécessiter la présence de parasites vivants (Scott *et al.*, 2004).

Il est important de mentionner que dans le cas des leishmanioses viscérales (*L. donovani*, *L. infantum*), même si l'immunité protectrice est corrélée à la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1, la réponse de l'immunité adaptative est nettement moins polarisée. En effet, que ce soit dans le modèle murin (Rousseau *et al.*, 2001) ou chez l'individu guéri (Peruhype-Magalhaes *et al.*, 2006), une réponse mixte (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13) est généralement observée avec de manière surprenante un effet promoteur de l'IL-4 de la réponse protectrice.

## **X. Diagnostic de la leishmaniose viscérale**

Le diagnostic de la leishmaniose est mené avec deux objectifs majeurs :

- ✓ confirmer la « maladie », c'est-à-dire établir si un sujet présentant des signes cliniques ou des anomalies para-cliniques compatibles avec la leishmaniose est effectivement malade à cause de l'infection par ce parasite.
- ✓ étudier la prévalence de l'infection des sujets cliniquement sains lors d'études épidémiologiques spécialement dans des zones endémiques (action de dépistage), afin de prévenir la transmission à partir de portages asymptomatiques par transfusion sanguine, éviter l'introduction de sujets infectés dans des régions non-endémiques ou encore pour suivre la réponse au traitement médicamenteux mis en place.

Ces deux buts soulignent d'une part, l'importance de mettre en œuvre des techniques de diagnostic différentes et adaptées à chaque situation et d'autre part, confirme qu'il est essentiel de dissocier la maladie et l'infection.

Le diagnostic des leishmanioses est orienté par le tableau clinique et des notions épidémiologiques, conforté par des données biologiques non spécifiques ou sérologiques, repose sur des arguments parasitologiques complétés, et plus récemment, par des techniques de biologie moléculaire. Parmi les leishmanioses, seule la forme viscérale est généralisée aux organes hématopoïétiques et voit les parasites se multiplier dans le sang et la moelle. Le diagnostic est évoqué à partir d'arguments de présomption et de certitude.

### **X.1. Diagnostic de présomption**

#### **✚ Arguments épidémiologiques**

L'origine géographique du malade et la notion de séjour dans des zones endémiques sont à prendre en considération par un interrogatoire soigneux, tout comme les notions éventuelles d'immunodépression, de co-infection avec le VIH notamment ou de toxicomanie.

#### **✚ Arguments cliniques**

Associés à la classique triade symptomatologique, fièvre, splénomégalie et pâleur cutanéomuqueuse, qui constitue un argument de forte présomption de la LV surtout chez l'enfant, mais ce n'est pas toujours le cas chez l'adulte, car il existe des porteurs asymptomatiques, ou d'autres cas présentant des formes atypiques de la maladie. Devant un tableau clinique complet ou incomplet et des données épidémiologiques évocateurs de LV, différents examens vont être réalisés afin de poser le diagnostic.

La démarche diagnostique va reposer sur des arguments biologiques non spécifiques, parasitologiques et immunologiques.

#### **✚ Arguments biologiques**

##### **➤ Examen hématologique**

L'hémogramme met en évidence une insuffisance médullaire :

- ✓ Une anémie normochrome normocytaire arégénérative, très fréquente, apparaît d'abord ([Moncef et al., 2011](#)), modérée au début puis s'aggrave progressivement au cours de l'évolution, pour atteindre dans les cas extrêmes des taux d'hémoglobine inférieurs à 4g/dl ([Ministère de la Santé, 2010](#) ; [Amrani Hassani., 2011](#)), parfois nécessitant des transfusions sanguines ([Zait et al., 2012](#)).
- ✓ Une leucopénie est régulièrement observée, avec souvent moins de 2 000 leucocytes/mm<sup>3</sup> ([Ministère de la Santé, 2010](#)), et une neutropénie parfois importante voire une véritable agranulocytose aiguë, favorisant le développement d'infections

intercurrentes. Les nombres de lymphocytes et de monocytes sont cependant normaux ou légèrement augmentés (Amrani Hassani, 2011).

- ✓ Une thrombopénie reste longtemps modérée. En fin d'évolution de la maladie, celle-ci devient majeure et s'associe parfois à une altération dans la synthèse des facteurs de coagulation par le foie, ce qui provoque des hémorragies pouvant être graves, voire mortelles (Essabbah Aghuir *et al.*, 2013).

### ➤ Examens biochimiques

- ✓ La vitesse de sédimentation (VS) est toujours augmentée dépassant 100 mm à la première heure, ou idem pour la CRP (Bourée *et al.*, 2014). La VS reste un bon élément d'orientation dans le diagnostic de la LV, retrouvé dans toutes les séries publiées (Zougaghi *et al.*, 2009).
- ✓ La protidémie totale est très variable, elle peut être normale, ou abaissée, ou plutôt élevée surtout chez l'adulte (Amrani Hassani, 2011).
- ✓ L'électrophorèse des protides est très perturbée de façon quasi constante (Amrani Hassani, 2011), on trouve une hypergammaglobulinémie polyclonale (Marty, 2008) touchant les IgG et s'accompagne souvent d'hypoalbuminémie (Ministère de la Santé, 2010) avec un rapport albumine/globulines souvent inversé témoignant d'un processus inflammatoire (Essabbah Aghuir *et al.*, 2013).
- ✓ L'analyse des urines révèle une protéinurie (Elbaroudi, 2014).
- ✓ Parfois une augmentation significative des enzymes hépatiques est retrouvée (Nozzi, 2014).

## X.2. Diagnostic de certitude

### X.2.1. Recherche du parasite

C'est l'argument de certitude pour le diagnostic de la LV, il repose essentiellement sur la recherche et la mise en évidence des leishmanies par l'examen direct de différents prélèvements.

#### Prélèvements

Tous les prélèvements doivent être recueillis sur un tube citrate pour permettre au laboratoire de réaliser les frottis et les cultures (Rosenthal et Marty, 2009).

➤ **Prélèvement de la moelle osseuse**

C'est le matériel le plus utilisé pour le diagnostic de la LV, sa sensibilité varie entre 76-85%. Elle se fait par ponction du sternum ou de la crête iliaque chez le jeune enfant. Une partie du matériel est destinée à la culture et l'autre à la confection du frottis. En cas de difficultés d'obtention d'un prélèvement une biopsie osseuse peut être utile.

➤ **Ponction splénique**

Elle est considérée comme la plus performante puisqu'elle est douée d'une grande sensibilité >94%, mais elle est peu pratiquée en raison des risques qu'elle présente en cas de troubles d'hémostase.

➤ **Prélèvement de sang périphérique**

Le sang périphérique est utilisé pour la préparation de frottis sanguins et de cultures. On étudie alors les leucocytes, après hémolyse, rinçage et leucocytocentrifugation de l'échantillon de sang.

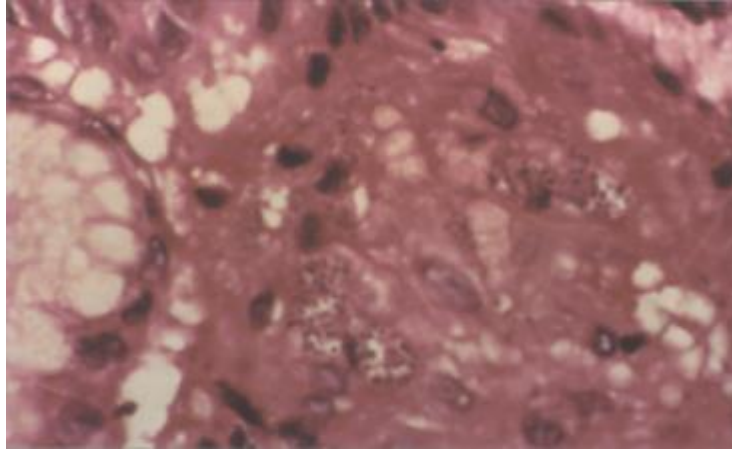
Ce prélèvement est très utilisé dans le diagnostic de leishmaniose viscérale chez les immunodéprimés, notamment dans le cas d'une co-infection par le VIH. Il peut également être réalisé en 1<sup>ère</sup> intention chez l'immunocompétent, mais les prélèvements de moelle osseuse restent la référence ([ANOFEL, 2014](#)).

➤ **Prélèvement urinaire**

Les parasites peuvent être retrouvés dans les urines lors des leishmanioses viscérales en phase active, à cause des lésions rénales. Ainsi, on peut rechercher dans les urines les anticorps dirigés contre les leishmanies par méthodes sérologiques (Elisa et DAT), les antigènes parasitaires par la technique KATEX, ou directement le génome du parasite par PCR (polymerase chain reaction) ([ANOFEL, 2014](#)).

➤ **Autres prélèvements**

La LV peut être aussi recherchée au niveau de la ponction ganglionnaire ou hépatique. La mise en évidence des leishmanies est possible aussi dans des prélèvements de biopsies digestives sur coupes histologiques (**Figure 14**) ou dans des lavages broncho-alvéolaires. Dans ces cas, le myélogramme confirme le diagnostic de LV disséminée ([Zait et al., 2012](#)).



**Figure 14:** Leishmaniose gastrique : plusieurs amas de formes amastigotes (hematoxyline-éosine – x400)(Zait *et al.*, 2012).

### **X.2.2. Examen microscopique direct**

La réalisation minutieuse de l'examen microscopique direct est primordiale pour avoir des arguments diagnostiques positifs rapides. Les frottis de la moelle osseuse sont fixés et colorés par la méthode de May Grünwald Giemsa (MGG). Les leishmanies sont recherchées au microscope optique (objectif 100), et généralement observés après une recherche longue et orientée. Ils se présentent sous forme amastigote ou micromastigote qui sont des éléments immobiles strictement intracellulaires « intramacrophagique » (Ministère de la Santé, 2010). Lors de la confection du frottis, les cellules macrophagiques hôtes peuvent éclater et les leishmanies s'en trouvent éparpillées sur le frottis (Ministère de la Santé, 2010). Ce sont des éléments ronds ou ovoïdes de petite taille (2 à 6 $\mu$  de diamètre). Le cytoplasme est bleu contenant 2 punctuations rouges : l'une est grosse excentrée, rouge violacée correspondant au noyau, l'autre est bacilliforme rouge vermeil correspondant au blépharoplaste (Rosenthal et Marty, 2009 ; Ministère de la Santé, 2010).

### **X.2.3. La culture**

La technique de culture est une étape indispensable pour ce diagnostic parce qu'elle le rend plus sensible et permet d'identifier les différentes souches de leishmanies comme elle permet aussi de tester leur sensibilité aux médicaments. Le milieu le plus classiquement utilisé est celui de Novy-Mc Neal Nicolle (NNN).

Elle est effectuée à partir des prélèvements de sang ou des produits de ponction de différents organes permettant ainsi d'augmenter la sensibilité du diagnostic (Marty, 2010). La culture reste délicate et exige plusieurs repiquages. Malgré la profusion des milieux proposés pour la culture des leishmanies, le milieu NNN reste 100 années après sa mise au point le plus utilisé en pratique courante. C'est un milieu bi-phasique constitué de la gélose au sang frais de lapin

décomplémenté ou non ([Ministère de la Santé, 2010](#)). Par ailleurs, d'autres milieux peuvent être utilisés comme le milieu de Schneider ou RPMI ([Bourée, 2010](#) ; [ANOFEL, 2014](#)). Le prélèvement est incubé entre 24 °C et 28 °C. La culture est lente et peut nécessiter trois repiquages à une semaine d'intervalle avant de conclure à une négativité. Le parasite en culture est sous forme promastigote flagellée mobile et libre ([ANOFEL, 2014](#) ; [Ministère de la Santé, 2010](#)). La micro culture semble être plus rapide ([Van Griensven, 2014](#)).

- Une identification d'espèce ou de souche de leishmanie en cause, avec typage isoenzymatique, n'est pas obligatoire pour confirmer le diagnostic, mais a un grand intérêt épidémiologique ([Essabbah Aghuir, 2013](#) ; [Ministère de la Santé, 2010](#)).

#### **X.2.4. Leucocytoconcentration (LCC)**

Le principe de la leucoconcentration consiste à concentrer les parasites sanguins sur la plus petite surface possible d'une lame porte-objet en éliminant les globules rouges et les plaquettes. Cette concentration est réalisée en plusieurs étapes ([Peace, 2014](#)):

- ✓ Calcul du volume de sang à utiliser :  $\text{Volume (ml)} = 1\ 250 / \text{nombre de leucocytes par mm}^3$ .
- ✓ Hémolyse : l'hémolyse parfaite est obtenue en 10 à 20 mn lorsque le sang prend un aspect «laqué».
- ✓ Leuco concentration : concentrer les leucocytes et les parasites par une première centrifugation de 10 minutes à 2 500 tours par mn.
- ✓ Étalement des frottis sur lame porte-objet.
- ✓ Coloration.
- ✓ Résultats : l'hémolyse, la concentration et la coloration par le Giemsa, permettent d'obtenir un étalement uniforme des leucocytes dont les noyaux apparaissent en rouge sur un fond blanc. Les parasites sont aisément repérés et identifiés. Les Leishmanies sont identifiées grâce à leurs noyaux volumineux et leur kinétoplastes rouges dans un cytoplasme bleu clair ([Benyahia, 2009](#)).

#### **X.2.5. Inoculation à l'animal**

La technique d'inoculation à l'animal exige une animalerie et une compétence particulière, l'animal de choix est le Hamster doré syrien. Elle consiste à injecter en intra-péritonéal quelques gouttes à 0,5 ml de la ponction de la moelle osseuse diluée dans du sérum physiologique stérile. Ces animaux sont très sensibles à l'infection par les leishmanies, et développent en quelques semaines à plusieurs mois une véritable leishmaniose. L'inoculation

à l'animal est sensible et permet d'isoler sans risque la souche de leishmanies (Jabourri, 2013).

### **X.2.6. La biologie moléculaire**

Le diagnostic moléculaire est basé sur la détection et l'analyse des acides nucléiques du parasite dans le sang ou la ponction de la moelle osseuse (PMO) même si le prélèvement est plus pauvre. Il complète les approches parasitologiques et sérologiques dans le cadre du diagnostic initial (Rosenthal et Marty, 2009). La PCR permet le diagnostic d'espèce, voire la souche parasitaire directement sur le prélèvement. Diverses cibles moléculaires sont utilisées, selon les équipes et l'espèce de parasite en cause. Elle permet également d'identifier l'origine de la contamination notamment en cas de séjours multiples en zone d'endémie, grâce à l'analyse des microsatellites, renseignant sur la filiation du parasite (Faucher et Piarroux, 2011 ; Hé *et al.*, 2009). En dépit du fait que la technique ne soit pas standardisée et les couples d'amorces utilisés sont nombreux, plusieurs études ont montré la supériorité de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale par rapport aux autres méthodes classiques (Minodier *et al.*, 2009). La PCR détecte des parasitemies inférieures à un parasite par microlitre (Van Griensven, 2014). Sa sensibilité dans un prélèvement médullaire approche 100%. Cette dernière est similaire sur prélèvements sanguins. La spécificité est excellente (Faucher et Piarroux, 2011) aussi bien chez les malades infectés que chez les non infectés par le VIH (Essabbah Aghuir, 2013) et permet de révéler d'avantage des infestations asymptomatiques (OMS, 2010). De plus, l'intérêt de la PCR est tout particulier dans le suivi évolutif des sujets traités et comme marqueur précoce de rechute chez l'immunodéprimé, dans le suivi post-thérapeutique et les études épidémiologiques sur le portage asymptomatique (Marty, 2010). Encore que la pratique de cet examen soit actuellement réservée aux hôpitaux de dernier recours et aux centres de recherche. Un certain nombre de formes de PCR, faciles à interpréter et ne nécessitant pas un équipement de pointe, sont actuellement en cours de mise au point en vue d'une utilisation plus étendue. La PCR peut donner des résultats positifs dans quelques cas de splénomégalie fébrile non due à une leishmaniose viscérale. La PCR offre l'avantage de la réalisation d'un diagnostic non invasif de la maladie grâce à l'utilisation de sang périphérique comme modèle. En outre, des essais de PCR quantitatives permettent la mesure de la charge parasitaire de sang *in vivo*, qui est un marqueur utile de substitution de l'activité de la maladie, la réponse au traitement spécifique et le suivi de la récurrence de la maladie. Pour ces raisons, la PCR quantitative doit être recommandée comme la méthode de choix pour le diagnostic et suivi des LV chez les greffés (Boucekoua, 2014). Même si non

révélateur, le ciblage PCR des séquences conservées dans le kinétoplaste *Leishmania* ou le gène de l'ARNr, qui peut être effectué sur le tissu osseux, la rate, les frottis des nœuds lymphatiques ou le sang périphérique pourrait permettre le diagnostic, en particulier dans la co-infection VIH où la charge parasitaire peut parfois être basse (Peace, 2014).

### **X.2.7. Typage enzymatique**

Constitue la technique de référence permettant l'identification des espèces et du zymodème en cause de l'infection. Elle est basée sur le principe que chaque profil enzymatique est rattaché au complexe d'une espèce *Leishmania*. Le typage enzymatique consiste à développer à partir d'un isolat de parasites, une culture de masse, puis à en étudier la constitution en enzymes. L'intérêt épidémiologique de cette méthode est d'adapter les méthodes de lutte au réservoir de parasites qui diffère d'une espèce à l'autre (Ministère de la santé, 2010).

## **X.3. Sérologie**

La leishmaniose viscérale s'accompagne d'une réponse immunitaire humorale, avec apparition de titres élevés d'anticorps sériques, qui peuvent toutefois faire défaut chez l'immunodéprimé. Les méthodes sérologiques sont extrêmement sensibles et non envahissantes, ce qui les rend très utiles pour le diagnostic de la LV dans les régions endémiques. Ces méthodes sont basées sur la détection des anticorps ou des antigènes. Certains ont un grand intérêt dans les enquêtes épidémiologiques de masse sur le terrain (Marty, 2010).

### **X.3.1. Recherche d'anticorps circulants**

Elle peut se faire par plusieurs techniques qui utilisent des préparations antigéniques contenant soit des parasites entiers, obtenus à partir de promastigotes de culture, soit des extraits de parasites.

#### **X.3.1.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)**

L'immunofluorescence indirecte reste le moyen de diagnostic le plus utilisé à côté du myélogramme. Elle a une sensibilité supérieure à 90% ; les faux positifs sont rares et le seuil de positivité est de 1/100 (Lakhdar Idrissi, 2007).

Cette technique utilise les antigènes figurés qui sont habituellement constitués de promastigotes et le conjugué est une antiglobuline anti-IgG. La réaction sur les amastigotes aurait une sensibilité moindre. Les résultats seraient meilleurs avec les antigènes les plus proches de l'espèce sévissant dans la zone de contamination. Cette technique peut avoir certaines interférences en cas de trypanosomiasis.

Elle reste une technique non adaptée au terrain, dépendante de l'observateur et exige un microscope doté d'une source d'ultra-violet (UV) (Singh *et al.*, 2006).

#### **X.3.1.2. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

La technique ELISA est maintenant employée en tant qu'outil de sérodiagnostic pour la LV. Bien que cette technique soit extrêmement sensible, sa spécificité dépend de l'antigène utilisé (Singh *et al.*, 2006).

Les antigènes cytoplasmiques solubles (CSA) : Ils sont obtenus après des cycles (4 à 6 cycles) congélation/décongélation d'une suspension de promastigotes dans un tampon de phosphates. Après centrifugation à froid, le surnageant obtenu contient des antigènes solubles qu'on va utiliser pour remplir les puits d'ELISA (100 à 5000 ng CSA/ml). Avec ces concentrations la sensibilité est évaluée de 80 à 100% (Sundar et Rai, 2002). Des réactions croisées avec d'autres maladies infectieuses qui imitent les symptômes également ont été rapportées (Singh *et al.*, 2006).

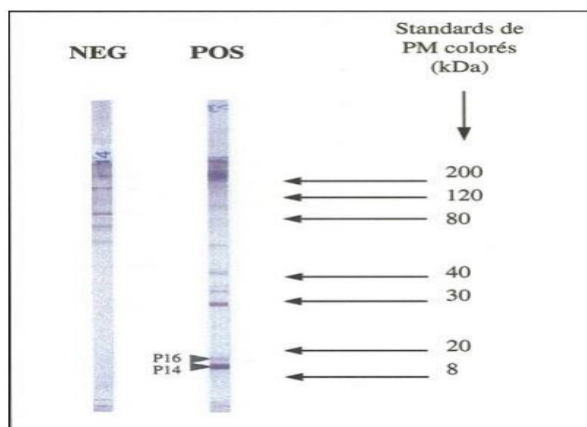
#### **X.3.1.3. Western Blot (WB)**

Constitue la technique de choix la plus sensible (Michel *et al.*, 2011).

C'est un test qualitatif utilisant les antigènes de *L. infantum* après séparation électrophorétique, il est destiné :

- ✓ à la confirmation des sérologies réalisées avec une technique classique de dépistage de la leishmaniose (IFI, DAT, ELISA, Latex).
- ✓ au dépistage sérologique de la LV chez les patients immunodéprimés,
- ✓ au dépistage des patients porteurs asymptomatiques du parasite (études épidémiologiques) (Marty, 2010 ; Michel *et al.*, 2011).

La présence des bandes 14 kDa et 16 kDa (**Figure 15**), bien visibles au bas de la bandelette, est spécifique de la leishmaniose. Elle permet d'interpréter le test comme positif et de conclure à la présence d'anticorps IgG anti-*Leishmania* dans l'échantillon testé. Ainsi, les bandes 14 et/ou 16-18 kDa sont présentes dans la leishmaniose à *L. infantum* (Izri., 1996).



**Figure 15:** Résultats de diagnostic de LV par le Western Blot (Dedet *et al.*, 2013)

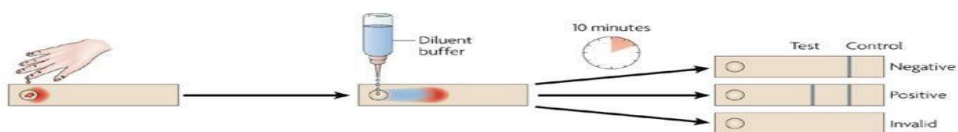
#### X.3.1.4. Test d'agglutination direct (DAT)

Dans ce test, les promastigotes sont trypsinés, fixés au formol puis colorés au bleu brillant de Coomassie. Ensuite, on leur ajoute du sérum ou du sang total dilué dans le 2-mercapto-éтанол à 0,8%. L'agglutination se voit après 18h ou une nuit d'incubation. Cette méthode doit respecter la chaîne de froid pour le transport et la conservation de l'Antigène.

Plusieurs études ont trouvé une sensibilité de 91 à 100% et une spécificité de 72 à 100 % (DELM, 2012 ; Harrat, 1992).

#### X.3.1.5. Immunochromatographiques (dipstick)

Les tests immunochromatographiques basés sur l'antigène rk39 ont été spécialement élaborés en vue d'une utilisation sur terrain et se sont montrés d'une bonne précision diagnostique dans la plupart des zones d'endémie (OMS, 2010). Ces tests sont faciles à conduire, rapides et permettent d'obtenir un résultat en une vingtaine de minutes (Essabbah, 2013) en cas de positivité, une bande est visible à l'œil nu (Bourrée et Ensaf, 2008) (Figure 16).



**Figure 16:** Interprétation des résultats du test rapide rk39 (Dedet, 2000).

Le dipstick utilise des bandelettes sensibilisées par une protéine antigénique recombinante; rK39. Il était le premier test commercialisé, mais récemment d'autres Ag recombinants : rk26, rk9 et rkE16 ont été commercialisés.

Pour la leishmaniose viscérale, le choix du réactif doit tenir compte des souches circulantes dans la région considérée, un mauvais choix pouvant entraîner un sous-diagnostic considérable (Ronat et Gueguen, 2014).

### X.3.2. Recherche d'antigènes

La recherche d'antigène dans le sang est le meilleur moyen de diagnostic en cas d'activité de la parasitose. Pourtant, sa détection est compliquée par la présence de hauts titres d'anticorps, de complexes immuns et des auto-anticorps.

En 1995, De Colmenares *et al.* ont détecté deux peptides de 72-75 kDa, par immunoempreinte, dans les urines de 14 patients (sur 15) atteints de leishmaniose viscérale ; ces antigènes disparaissent assez rapidement sous traitement (De Colmenares *et al.*, 1995 ; Zahidul *et al.*, 2004). Récemment, un test d'agglutination sur Latex (KATEX®) a été conçu à la recherche d'antigènes leishmaniens dans les urines des malades. Il offre une spécificité de 100% et une sensibilité entre 68% à 100%. Un tel moyen aurait un intérêt dans le diagnostic des cas asymptomatiques d'une part et dans le monitoring du traitement d'autre part (Zahidul *et al.*, 2004 ; Attar *et al.*, 2001).

### X.3.3. Autres arguments immunologiques

#### ✚ L'intradermo-réaction (IDR) de Montenegro

Généralement négative au cours de la maladie, par contre celle-ci est positive dans les cas subcliniques et après guérison (Ministère de la Santé, 2010). C'est une injection intradermique d'une suspension de promastigotes tués, elle mesure les réactions d'hypersensibilité retardée. La lecture se fait après 48h. Une réaction positive se manifeste par un nodule induré entouré d'un érythème de diamètre supérieur à 5 mm ou une surface supérieure à 1.2 ou 2cm<sup>2</sup> (Saporito *et al.*, 2013) (Figure 17).



**Figure 17:** I Intradermo-réaction à la leishmanine positive (Marty., 2010)

Cette technique semble être importante pour détecter les infections à *Leishmania* asymptomatiques. Cependant, certaines limites de ce test, liées à une mauvaise standardisation d'antigène, la variabilité de la sensibilité et de la spécificité d'un antigène à l'autre, et la perte de la puissance de l'antigène au fil du temps, ont favorisé le développement de nouveaux moyens de dépistage.

Récemment, des tests in vitro, basés sur la mesure de l'IFN $\gamma$  libéré par les cellules T activées stimulées avec les antigènes spécifiques de la leishmaniose, ont été développés pour détecter les cellules à médiation immunitaire à *L. infantum*, avec des résultats prometteurs ([Saporito et al., 2013](#)).

## **XI. Traitement de la leishmaniose**

D'une manière générale, l'option thérapeutique est conditionnée par l'importance de l'infection, mais aussi par l'espèce de *Leishmania* en cause, et notamment son caractère anthroponotique ou zoonotique.

Il faut rappeler que la LV est une affection mortelle en l'absence de traitement. Aussi le diagnostic doit-il être posé dans les meilleurs délais. Etant donné la toxicité des molécules administrées, le traitement sous surveillance médicale ne devrait être administré que lorsque le diagnostic a été confirmé, notamment par les examens parasitologiques. Néanmoins, le praticien peut se trouver dans la situation où les examens biologiques n'ont pas confirmé son diagnostic clinique, et il sera donc obligé de traiter le patient en l'absence de preuve biologique d'une infection par *Leishmania* (traitement d'épreuve).

La thérapeutique de la LV est dominée depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle par les dérivés stibiés qui demeurent encore de nos jours les médicaments de première intention. Toutefois, au cours de la co-infection *Leishmania*-VIH ou dans le cas de résistance fréquente aux antimoniés, l'amphotéricine B tend à s'imposer en première intention. Même si le domaine de recherche de nouveaux protocoles thérapeutiques est en développement, mais les produits disponibles restent toujours peu nombreux, fréquemment toxiques, et pour certains coûteux. Par ailleurs, la prescription d'un traitement anti-leishmanien est complexe, car il ne se base pas seulement sur le choix de la molécule, mais aussi sur la présentation clinique de la maladie, le terrain sous-jacent, et l'espèce infectante présumée (du fait d'une sensibilité variable des différentes espèces de *Leishmania* aux agents anti-leishmaniens) ([Buffet et al., 2011](#)).

Depuis les années 1940, le traitement de première intention de la leishmaniose viscérale dans la plupart des régions du monde est les dérivés de l'antimoine pentavalents (DAP) ([Carréet al., 2010](#)).

L'amphotéricine B est un puissant agent anti-leishmaniens utilisé en cas de résistance mais sa toxicité limite son utilisation. La forme liposomale d'amphotéricine B (Ambisome<sup>®</sup>) semble être mieux tolérée que les autres formulations lipidiques (Amphocil<sup>®</sup>, Amphotec<sup>®</sup>) et la toxicité se trouve réduite mais l'activité anti leishmanienne est conservée. Cette présentation

de l'amphotéricine B deviendra peut-être le traitement de première intention de la LV quand les doses efficaces minimales en seront mieux établies ([Minodier et al., 2003](#)).

Parmi les dérivés pentavalents de l'antimoine, deux sont commercialisés :

- ✚ **L'antimoniote de méglumine** (Glucantime®, Aventis, Paris, France) à une concentration en antimoine pentavalent ( $Sb^V$ ) de 85 mg  $Sb^V$ /ml.
- ✚ **Le stibogluconate de sodium** (Pentostam®, GSK, Marly-le-Roi, France) à une concentration de 100 mg  $Sb^V$ .

Administrable par voie parentérale exclusivement, les dérivés pentavalents de l'antimoine ont une élimination rénale rapide, mais ils s'accumulent dans les cellules du système réticulo-endothélial où ils sont transformés en dérivés actifs trivalents.

La tolérance du traitement est habituellement médiocre chez l'enfant. On distingue classiquement la stibio-intolérance, bénigne, qui se produit en début de traitement, de la stibio-intoxication qui peut être plus sévère. Celle-ci peut causer des troubles cardiaques, rénaux, pancréatiques ou hépatiques.

De fait, la nécessité d'un mois de traitement et la mauvaise tolérance sont des facteurs limitant l'utilisation des dérivés antimonies en pédiatrie, d'autant plus que ces médicaments ne sont pas toujours efficaces in vivo.

Les échecs du traitement : c'est-à-dire la persistance de symptômes et la présence de parasites dans la moelle osseuse deux semaines après la fin du traitement et des rechutes : définies comme la réapparition, après une bonne réponse initiale, de signes cliniques et de parasites dans la moelle osseuse.

Au Maroc le médicament utilisé pour le traitement de la leishmaniose est sous forme d'une injection intra-lésionnelle ou une injection intramusculaire profonde de Glucantime. Ce médicament est pris en charge par l'état ([Ministère de la Santé, 2010](#)).

#### ● L'amphotéricine B et ses formulations lipidiques

L'amphotéricine B, qui appartient à la classe des macrolides polyène, est le plus puissant des agents anti-leishmaniens connus. Elle est considérée comme 200 à 400 fois plus active que l'antimoine dans les modèles animaux de LV ([Berman et al., 1987](#)). Par son affinité particulière pour l'épisterol des membranes parasitaires, l'amphotéricine B est capable de

s'inclure dans celles-ci et d'y former des pores ([Azas et al., 2001](#)). Ainsi, les leishmanies ne sont plus capables de réguler leurs flux ioniques transmembranaires (fuite de cations monovalents, notamment du potassium), ce qui entraîne la mort du microorganisme.

Administrée par voie intraveineuse, l'amphotéricine B circule dans le compartiment vasculaire sous forme liée aux protéines, puis se concentre préférentiellement dans le foie, la rate, le poumon et le rein. C'est au niveau de ce dernier organe que la toxicité de l'amphotéricine B est la plus marquée.

L'amphotéricine B désoxycholate (Fungizone®, Bristol-Myers-Squibb, Puteaux, France) se présente sous forme de micelles, ce qui permet à la molécule d'être préférentiellement captée par les macrophages, sièges de l'infection parasitaire.

Le caractère lipophile de l'amphotéricine B a, par la suite, conduit à l'administrer avec des lipides, notamment sous forme liposomale. En effet, les liposomes ont spécifiquement pour cible le système réticulo-endothélial. En ne délivrant la molécule encapsulée qu'au niveau du site effecteur, les liposomes permettent ainsi de réduire la toxicité du produit. Son efficacité est meilleure et sa toxicité moindre que l'amphotéricine B dans les modèles animaux.

#### ● Sitamaquine

La sitamaquine (anciennement nommée WR 6026) est une amino-8 quinoleine orale développée depuis le début des années 1980 par le Walter Reed Army Institute. Ce produit a été utilisé en prophylaxie de l'infection à *Pneumocystis carinii* chez le sujet infecté par le VIH. Les essais de phase II sur un petit nombre de patients atteints de LV ([Sherwood et al., 1994](#)), ont montré une certaine efficacité avec des doses de 0,75 à 1 mg/kg/jr pendant quatre semaines avec une guérison ou une réduction de la charge parasitaire. Les effets secondaires constatés ont été des troubles digestifs, et des céphalées.

## **Hypothèse et objectifs du travail**

- **Hypothèse de travail**

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

- Connaitre le profil épidémiologique de l'exposition à la LV permettrait de mieux cerner les facteurs à l'origine de l'émergence de la maladie.
- Introduire des techniques de diagnostic rapide et performantes à partir de prélèvements non invasifs contribuerait à la mise en route rapide du traitement spécifique et à l'amélioration du pronostic de la maladie.
- Sensibiliser la population sur la gravité des signes cliniques contribuerait à la réduction du délai d'hospitalisation (durée entre l'apparition des signes cliniques et l'hospitalisation) et par conséquent à une prise en charge précoce des malades.
- Identifier la prévalence du portage asymptomatique de LV permettrait d'évaluer le risque de transmission de la maladie.

- **Objectifs de l'étude**

Les objectifs assignés à cette recherche sont :

- Etablir le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale au Maroc et dans les régions les plus touchées.
- Evaluer les performances de l'immunochromatographie rk39 comme test de diagnostic rapide de la LV après diagnostic établi par des examens directs (microscopie et PCR) et sérologiques (Elisa et IFI).
- Estimer la prévalence de LV dans la province de Taounate et proposer une approche diagnostique par PCR en temps réel à partir du sang total, prélèvement non invasif.

# **Matériel et Méthodes**

## **I. Situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès (1990-2019)**

La LV au Maroc a connu une évolution de l'endémicité dans le temps. En effet, l'augmentation de l'incidence dans les premières années s'expliquerait en grande partie par l'amélioration de la déclaration et de la prise en charge des malades.

Devant l'importance cruciale du problème des leishmanioses au Maroc, il nous a paru opportun de nous intéresser à cette parasitose, afin de donner un aperçu global et de préciser l'évolution de ses caractéristiques épidémiologiques.

Une étude rétrospective et analytique a concerné tout le Maroc (1990-2014), a fait l'objet de l'article intitulé « **Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Morocco (1990–2014): an update** » a été publié en 2017 (**Annexe 1**). Elle a démontré qu'au Maroc, la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès sont les plus touchées par la LV.

L'étude s'est effectivement focalisée sur les dites régions et s'est étalée sur une période de 29 années de 1990 à 2019.

Pour établir cette étude, il faut évidemment avoir une image de la répartition géographique actuelle de cette maladie, mais également en étudier la répartition historique. Cela, de façon à voir les modifications épidémiologiques ayant eu lieu et à pouvoir tenter de prédire les futures. D'où l'importance de réaliser un travail rétrospectif avant d'entreprendre un travail prospectif.

### **I.1. Zone d'étude**

Cette étude a été établie essentiellement dans deux régions situées dans l'extrême nord et le centre nord du Maroc (**Figure 18**):



**Figure 18:** Zone d'étude

- **La région Tanger –Tétouan – Al Hoceima** : se trouve à la pointe nord-ouest du Maroc, dans la chaîne montagneuse du Rif. Elle se compose de deux préfectures Tanger-Assilah et M'Diq-Fnideq et six provinces: Al Hoceima, Chefchaouen, Fahs-Anjra, Larache, Ouezzane et Tétouan.
- **La région Fès-Meknès** : Située au Centre Nord du Maroc. Elle comprend deux préfectures (Fès et Meknès) et sept provinces (Séfrou, Boulemane, Moulay Yacoub, Ifrane, El hajeb, Taza et Taounate).

Le choix de ces deux régions était basé essentiellement sur les statistiques effectuées par la direction d'épidémiologie et de lutte contre les maladies (DELM) qui ont été repris dans l'article «**Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Morocco (1990–2014): an update**», qui montrent que l'incidence des cas de LV humaine est plus élevée dans ces deux régions par rapport aux autres foyers (DELM, 2014).

## **I.2. Collecte de données**

Il s'agit d'une étude rétrospective rassemblant tous les cas de la LV recensés au Maroc, dans la région Tanger –Tétouan – Al Hoceima et la région Fès-Meknès (1990-2019).

Les renseignements qui ont servi pour réaliser ce travail ont été recueillis à partir des données des rapports annuels des maladies parasitaires de la Direction d'Epidémiologie et de Lutte

contre les Maladies (DELM) du ministère de la santé.

La base de données contient toutes les données sur les patients, y compris le sexe, l'âge, la résidence et l'heure d'hospitalisation.

Un formulaire standard (**Annexe 2**) a été utilisé dans cette étude pour extraire les données épidémiologiques entre janvier 1990 et février 2015. Les données concernant la répartition des cas de leishmanioses en fonction du sexe et la tranche d'âge avant l'année 2009 n'ont pas pu être exploitées sur les bulletins. Seuls les cas déclarés de 2009 à 2019 ont pu être étudiés dans le présent travail.

### **I.3. Echantillonnage et diagnostic**

Pour l'identification de l'agent responsable de la maladie, des échantillons médullaires ont été prélevés sur des patients atteints de LV, qui avaient consulté les CHU des différentes provinces marocaines.

Des formulaires individuels ont été complétés pour chaque patient : date d'admission / notification, résidence, sexe, âge, signes cliniques.

Les lames ont été examinées au microscope pour la détection des amastigotes de *Leishmania* par le laboratoire provincial et envoyées au LNRL de l'INH pour contrôle et confirmation. Un examen moléculaire a été effectué pour toutes les lames reçues par l'Institut national d'hygiène (INH).

### **I.4. Typage des souches par PCR-Lei70**

Pour l'identification du genre *Leishmania*, notre choix est porté sur l'utilisation de la méthode PCR Lei70 qui cible la région du gène SSU ARN ribosomale.

Les étapes de cette partie se résument en l'extraction de l'ADN, suivie par une amplification de la région SSU ARN ribosomale et une visualisation de l'ADN du genre par une électrophorèse sur gel d'agarose et une digestion enzymatique pour identifier les espèces.

## **Méthode**

### ➤ **Observation microscopique**

Avant d'utiliser les frottis médullaires pour le diagnostic par PCR et pour mesurer leur charge parasitaire une observation microscopique a été effectuée.

Les corps des leishmanies sont recherchés au microscope optique (objectif 100) avec de l'huile à immersion. Les lames sont considérées :

- ❖ très riche, si le nombre des amastigotes est supérieur à 100 (>100),
- ❖ riche, si le nombre des amastigotes est supérieur à 10 (>10),

- ❖ moyennement riche, si le nombre des amastigotes est entre 5 et 10,
- ❖ pauvre, si le nombre des amastigotes est inférieure à 5 (<5).

➤ **Extraction d'ADN à partir des frottis médullaires par le kit High Pure PCR template preparation**

Le Kit permet une purification rapide et facile de l'ADN total des frottis médullaires.

L'ADN purifié est de haute qualité et bien adapté à une utilisation en PCR et d'autres réactions enzymatiques en aval. La procédure d'utilisation d'une colonne de purification donne un ADN pur et prêt à être utilisé directement.

Pour l'extraction, on racle les corps de leishmanies qui se trouvent sur la lame par un tampon de lyse (tissue lysis buffer). Le liquide obtenu est mis dans un tube collecteur avec colonne à filtrer (fournie avec le kit). Le tampon binding buffer et l'isopropanol sont rajoutés, l'ensemble est centrifugé. Cette étape est suivie par 2 lavages successifs avec une solution de lavage (washing buffer). Ensuite, on centrifuge à une vitesse maximale pour enlever le reste du tampon de lavage. On ajoute à la dernière étape le tampon d'élution (elution buffer) pour éluer les acides nucléiques et obtenir l'extrait d'ADN purifié.

➤ **Amplification par PCR Lei 70**

La région Lei70 est amplifiée par PCR selon le protocole décrit par [Kallel et al., 2007](#). Le mode opératoire est détaillé en **Annexe 3**.

Cette PCR a pour cible la région du gène SSU ARN ribosomale (ssu-ARNr), polymorphe chez les différentes espèces de *Leishmania*. Cette région sera amplifiée en utilisant l'extrait d'ADN des lames sélectionnées.

➤ **Electrophorèse**

L'étape de l'électrophorèse consiste à séparer les fragments d'ADN qui seront détectés par intercalation avec le bromure d'éthidium et visualisé via les rayons d'ultra-violets (UV) sous forme de bandes. La séparation des fragments d'ADN s'effectue en fonction de la différence du poids moléculaire et de charge par le biais d'un courant électrique. Le mode opératoire est décrit en **Annexe 4**.

➤ **Digestion du produit PCR ITSI par l'analyse de Restriction Fragment Length Polymorphisme (RFLP)**

Pour la digestion, on a utilisé l'enzyme Rsa I qui ne permet que la digestion de *Leishmania infantum* et donne deux bandes : 210 pb et 101 pb. *L. tropica*, et *L. major* ne sont pas digérées par cette enzyme. Le mode opératoire est décrit en **Annexe 5**.

### **I.5. Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS22 et analysée par le test Chi2 de Pearson pour la comparaison des proportions. Pour tous les tests, le seuil de signification était de 0,05.

### **I.6. Déclaration d'éthique**

Selon l'approbation éthique de cette étude rétrospective, tous les échantillons ont été anonymisés.

Pour l'enquête hospitalière, les données ont été extraites des dossiers des patients par le clinicien responsable dans un format de questionnaire individuel, sans copier d'identifiant personnel permettant l'identification de patients individuels. La conception et les procédures de l'étude ont été révisées et approuvées par le comité d'éthique de la faculté de médecine et de pharmacie, à Rabat, au Maroc (**Annexe 6**).

## **II. Etude des performances du test immunochromatographique rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale**

Afin d'évaluer les performances du test immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale nous avons procédé à la comparaison des résultats de test ICT rk39 avec ceux obtenus par l'IFI, l'ELISA, la PCR et l'ED. Cette comparaison a été suivie d'une analyse statistique des paramètres de performance du test ICT rk 39, à savoir la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité, la VPP et la VPN.

Ainsi, l'étude de l'évaluation des performances du test ICT rk39, se réalise pour la première fois au Maroc. Cette étude a fait l'objet de l'article intitulé « **Comparative Evaluation of Immunochromatographic Dipstick Test (ICT) rk39, Soluble Antigen ELISA and IFAT for the Sero-diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Morocco** » a été publié en 2018 (**Annexe 7**).

### **II.1. Echantillonnage : Critères d'inclusion**

Nous avons retenu comme critères d'inclusion tout patient hospitalisé aux CHU de Rabat et de Fès pour un tableau clinique évocateur de leishmaniose viscérale, ayant des antécédents de fièvre accompagnés d'au moins d'un des signes cliniques (splénomégalie, hépatomégalie, anémie, leucopénie ou thrombocytopénie).

Un patient est considéré comme un cas positif lorsqu'il présente les symptômes et signes mentionnés ci-dessus et a un diagnostic de LV confirmé par des méthodes parasitologiques

(groupe LV).

Un non-cas était défini en tant que patient présentant un tableau clinique évocateur de LV, et ayant un diagnostic parasitologique négatif et un diagnostic confirmé d'une autre maladie (groupe NI).

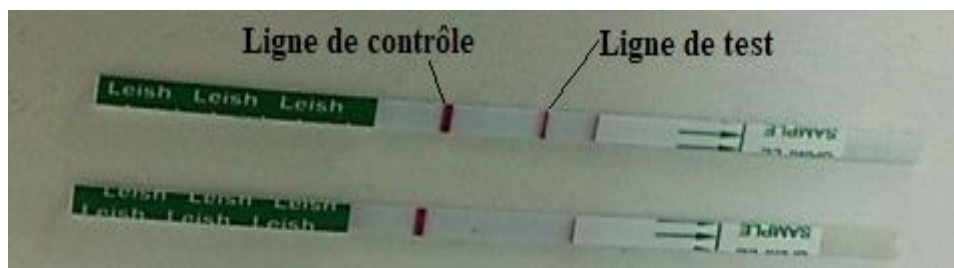
## II.2. Test de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographie rk39

Les sérums ont été analysés à l'aide du kit Kalazar Detect ® (rk39 dipstick test) conformément aux recommandations du fabricant (InBios International, Inc., Seattle, USA).

### + Principe

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

Si les anticorps spécifiques sont présents dans le sérum, la liaison Ag-Ac se traduira par l'apparition sur la bandelette d'un trait rouge dans la zone de la ligne de test (**Figure 19**).



**Figure 19:** Bandelettes du test rapide rk 39 (IT leish) (Institut national d'hygiène Rabat)  
(photo originale)

### + Méthode

Les étapes suivantes sont respectées :

- Laisser les échantillons et les bandes tests à température ambiante avant l'essai ;
- Retirer la bandelette de sa pochette;
- Identifier les bandelettes avec le numéro d'identification du sérum ;
- Ajouter 20-30 microlitres d'échantillon à la bandelette de test dans la zone située sous la flèche ;
- La bandelette peut être placée dans un tube à essai, de sorte que le sens des flèches soit vers le haut. Toutefois dans notre cas, la bandelette reposait à plat sur une table en parfaite équilibre;

- Ajouter 150 microlitres de la solution tampon fournie avec ce kit de test (en pratique, 2 ou 3 gouttes) ;
- Lire les résultats dans les 10 min qui suivent. Il est impératif que la pièce soit dotée d'un très bon éclairage afin que la lecture des tests se fasse dans des conditions optimales et pour réduire les risques d'erreur d'interprétation. D'autre part, l'interprétation des bandelettes doit être réalisée dans les 10 minutes.

### **II.3. ELISA (dosage immuno-enzymatique)**

La présence d'anticorps contre *L. infantum* a également été déterminée par un test *Leishmania* IgM+IgG ELISA (Vircell SL Granada, Espagne) disponible dans le commerce selon les instructions du fabricant.

#### **Principe**

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

#### **Méthode**

- Régler l'étuve ou le bain marie à la température de 37°C.
- Ramener tous les réactifs à température ambiante environ 1h avant utilisation en maintenant la microplaque dans son enveloppe.
- Bien agiter tous les réactifs.
- Sortir la microplaque de son enveloppe. Déterminer le nombre de puits à utiliser en prévoyant 4 puits pour les contrôles : 2 puits pour les sérums seuil, 1 puits pour le contrôle négatif et 1 puits pour le contrôle positif.
- Ajouter 200µl de diluant de sérum dans chaque des tubes à essai ; puis 10µl de chaque échantillon, 10 µl de contrôle positif, 10µl de contrôle négatif, 10 µl de sérum seuil (sérum seuil en double) dans chaque tube respectivement. Homogénéiser avec la pipette et verser ensuite 105 µl de chaque échantillon dilué dans les puits.
- Couvrir la microplaque avec un film et incuber à 37±°C pendant 45 min.
- Enlever le film, éliminer le liquide de tous les puits et laver 5 fois avec 300 µl de solution de lavage par puits. Eliminer tout le liquide de lavage résiduel.
- Ajouter immédiatement 100µl de conjugué dans chaque puits.
- Couvrir la microplaque avec un film et incuber à 37±1°C pendant 30 min.

- Enlever le film, éliminer le liquide de tous les puits et laver 5 fois avec 300 µl de solution de lavage par puits. Éliminer tout le liquide de lavage résiduel.
- Ajouter immédiatement 100µl de substrat dans chaque puits.
- Incuber à température ambiante pendant 20 min à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans tous les puits.
- Effectuer la lecture avec le lecteur de microplaque à 450/620 nm dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.

#### **II.4. Test immunofluorescence indirect (IFI)**

L'IFI a été réalisée à l'aide de promastigotes provenant de stocks locaux du LNRL de *L. infantum* MON-1 obtenus par culture de masse dans RPMI-1640 contenant 10% de FCS.

##### **Principe**

La technique d'IFI est basée sur la réaction Ag-Ac révélée par l'adjonction d'un conjugué (anti-immunoglobuline humaine marquée à l'isothionate de fluorescéine) sous la lumière UV. Le principe du protocole employé est le suivant : les antigènes correspondant aux formes promastigotes sont fixés sur une lame à spots, les Ig humaines anti *L. infantum* se fixent au Ag, les éléments non fixés sont éliminés par lavage, des Ig de chèvre anti-Ig humaines marquées à la fluorescéine révèlent cette fixation, la lecture de la réaction se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence.

##### **Méthode**

###### **Préparation des lames siliconées**

- Déposer 15 µl de la suspension d'antigène préparée (promastigotes) dans chaque puits des lames siliconées.
- Laisser sécher les lames à l'étuve à 37°C, entre 2 et 3 heures jusqu'à séchage complet.
- Les lames préparées et non utilisées le jour même peuvent se conserver 06 mois à moins 20°C dans une boîte fermée hermétiquement.
- Au moment de l'emploi, sortir du congélateur le nombre suffisant de lames préparées; les sécher pendant 5 mn à 37°C.

###### **Incubation des sérums**

- Diluer les sérums à tester dans le tampon PBS. Les dilutions sont les suivantes:  
1/25 (20 µl sérum + 480 µl PBS); 1/50 (100µl de la solution 1/25 + 100 µl PBS); 1/100 (100 µl de la solution 1/50 + 100 µl PBS); 1/200; 1/400.

- Déposer 30 µl des différentes dilutions des sérums à tester sur les puits des lames déjà sensibilisées et numérotées.
- Placer les lames en atmosphère humide à 37°C pendant 30 mn.
- Rincer les lames 3 fois dans 3 bains de PBS (5minutes pour chaque bain).
- Sécher les lames à l'air libre en position verticale sur du papier buvard.

### **Préparation de l'anti-sérum fluorescent**

- Préparer une solution de Bleu Evans à 2% (2g de Bleu Evans dans 100 ml PBS).
- Diluer cette solution au 1/5ème (125 µl solution à 2% + 1000 µl PBS); dilution finale=1/250ème
- Préparer extemporanément la concentration du conjugué fluorescent à utiliser en définissant au préalable la dilution optimale pour obtenir le maximum de fluorescence. (voir réactifs et matériel)
- Déposer 30 µl du conjugué par puits.
- Placer à nouveau les lames en atmosphère humide.
- Laver 3 fois dans des bains de PBS.
- Sécher les lames à l'air libre en position verticale sur du papier buvard.

### **Observation au microscope**

- Déposer 1 à 2 gouttes de glycérine tamponnée diluée dans un 1 ml de PBS sur les lames
- Placer les lamelles

Lecture au microscope à fluorescence en lumière UV au grossissement 40.

Résultat négatif : corps entièrement rouge ou fluorescence monopolaire ou bipolaire ou très faible liseré fluorescent discontinu.

Résultat positif: fluorescence jaune verdâtre à la périphérie des parasites. La partie centrale peut être colorée ou non en rouge.

## **II. 5. Examen direct**

Les lames de moelle osseuse ont été colorées avec Giemsa et examinées au microscope à un grossissement de × 100 avec de l'huile d'immersion.

### **Principe**

Le GIEMSA est une combinaison de deux colorants: de méthylène basique bleu et l'éosine acide, donnent une large gamme de couleurs des constituants cellulaires ce qui permet de différencier les parasites intracellulaires des cellules hématologiques.

## Méthode

- Colorer avec la solution de Giemsa diluée à 3% dans une solution physiologique tamponnée à pH 6,8, en cas de manque utiliser de l'eau distillée à pH 6,8 pendant 15 à 20 minutes
- Laver à l'eau distillée ou l'eau du robinet (débit faible) pour enlever l'excès du colorant.
- Sécher les lames en les posant verticalement sur un portoir.
- Lire les lames au microscope à l'objectif 100 à l'huile à immersion.
- Balayer toute la lame en zigzag horizontalement ou verticalement.

Chaque échantillon a été examiné au moins deux fois à chaque fois par deux biologistes avant de confirmer ou de déterminer les résultats négatifs ou positifs.

### **II.6. Extraction d'ADN et analyse PCR-Lei70**

(Confère paragraphe précédent : I.3. Typage des souches par PCR-Lei70).

### **II.7. Traitement**

Tous les cas de LV positifs (frottis médullaire ou PCR positifs) ont été traités à l'antimoniote de méglumine par administration intraveineuse de 18 à 25 mg Sbv/kg/jour pendant 3 semaines, selon les recommandations du Ministère de la Santé marocain ([Ministère de la Santé, 2010](#)).

### **II.8. Analyse statistique**

Les données ont été traitées avec SPSS version 10.0.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL). L'analyse statistique des résultats des tests a été effectuée en termes de sensibilité et de spécificité.

La sensibilité (c.-à-d. la probabilité que le test soit positif lorsque l'infection est présente) et la spécificité (c.-à-d. la probabilité que le test soit négatif lorsque l'infection est absente) ont été calculées en utilisant les formules suivantes:

$$\text{Sensibilité} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN}) \times 100\%$$

$$\text{Spécificité} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP}) \times 100\%.$$

(VN vrais négatifs, VP vrais positifs, FN faux négatifs et FP faux positifs).

Les sensibilités, les spécificités, les valeurs prédictives positives (VPP) et les valeurs prédictives négatives (VPN) de trois techniques : ELISA, IFAT et ICT rk39 ont été comparées en utilisant le test chi2 à un niveau significatif de 0,05.

Valeur prédictive positive (VPP) : correspond à la probabilité qu'un sujet soit réellement malade lorsque le test est positif.

$$\text{VPP} (\%) = \text{VP} \times 100 / \text{VP} + \text{FP}$$

La valeur prédictive négative (VPN): correspond à la probabilité qu'un sujet soit vraiment non-malade quand le test est négatif.

$$VPN (\%) = \frac{VN \times 100}{VN + FN}$$

La sensibilité a été estimée par la méthode classique de validation. L'examen microscopique et la PCR ont été considérés comme le test de référence dans le tableau de contingence 2 x 2.

Un patient avec un prélèvement positif de la moelle osseuse et/ou une PCR positive a été considéré comme un cas LV.

## II.9. Reproductibilité

Deux observateurs lisent indépendamment les résultats d'ICT rk39, ELISA, IFAT, PCR et de l'examen direct et leurs résultats sont comparés après chaque service. Dans le cas où l'interprétation des résultats de l'un des tests utilisés était différente de celle des deux observateurs, l'échantillon a été retesté dans le test approprié. Dans le cas où les résultats de tous les tests différaient les uns des autres, l'échantillon a été réanalysé dans tous les tests pour confirmer les résultats des tests.

## III. Étude de la prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate

L'infection par *L. infantum* ou *L. donovani* pourrait évoluer vers une leishmaniose viscérale éventuellement mortelle en l'absence du traitement adéquat, ou, elle peut se manifester par des formes subcliniques caractérisées par des symptômes modérés et transitoires, voire demeurer silencieuse et exempte de symptômes. En effet, pendant les dernières décennies de nombreuses études menées dans les zones endémiques, montrent chez l'Homme et le chien que les formes subcliniques et asymptomatiques sont plus fréquentes que la forme symptomatique (Michel *et al.*, 2011).

Afin de mieux comprendre l'évolution de l'infection / maladie chez l'Homme, nous nous sommes proposés de déterminer la prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate, en ayant recours à une approche diagnostique par WB et PCR en temps réel à partir du sang total. Il s'agit d'un prélèvement non invasif.

Cette étude a fait l'objet de l'article intitulé « **Prevalence of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using Western Blot and Real-Time PCR in an endemic area in Morocco** » article soumis en 2021.

### III.1. Caractéristiques de la région d'étude

La province de Taounate vaste de 5616 Km<sup>2</sup> est encadrée par les provinces de Taza, El Hoceima, Chaouen, Sidi Kacem et la Wilaya de Fès (**Figure 20**). Elle est divisée en deux parties bien distinctes:



**Figure 20:** Carte de la province de Taounate (ONSSA, 2013).

- La partie nord à relief montagneux couvre environ 40% de la superficie totale de la province, ses altitudes varient de 100 m à 1800 m .Elle est traversée par six grands oueds (rivières) constituent les principaux affluents de l'Oued Ouergha.
- La partie sud à relief vallonné couvre une superficie de 3300 km<sup>2</sup> environ. Les altitudes varient de 1000 m au jbel Zeddour à 150 m le long de l'oued Inaoun.

Elle se divise administrativement en 5 pachtaliks (Taher souk, Rhafsai, Karia, Tissa et Taounate. Ce dernier est constitué de deux annexes administratives) et 4 cercles qui se subdivisent en 15 caïdats. Par ailleurs, la Province de Taounate est découpée en 5 Municipalités et 44 Communes Rurales.

Sa population totale s'élève à 668.232 habitants dont 600.290 des ruraux. La densité de la population est de l'ordre de 119 hab/Km<sup>2</sup>. Son habitat est dispersé à travers plus de 1600 douars. Son économie est basée essentiellement sur l'agriculture et l'élevage.

#### Agriculture

L'économie de région est basée essentiellement sur l'agriculture et l'élevage. La province, comporte une Surface Agricole Utile (SAU) de 371 000 ha soit près de 4% de la SAU nationale et 54 000 ha de forêts soit 1% de la superficie forestière nationale.

39 000 ha sont irrigués soit 1% de la SAU ce qui correspond à 6 ha/1000 hab alors que la moyenne nationale est de 33 ha/1000 hab. Cette superficie irriguée est située principalement sur les berges de Sebou et Ourgha et est dominée par l'agrumiculture.

Les principales cultures sont : la céréaliculture, l'olivier, les légumineuses, le tournesol et les cultures fourragères.

### **L'élevage**

Se plaçant après le secteur de l'agriculture, l'élevage présente les caractéristiques suivantes:

Le cheptel de la province compte environ 620.000 têtes réparties comme suit:

- 380.000 ovins.
- 105.000 bovins.
- 45.000 caprins.
- 90.000 équidés.

### **Climat**

La situation géographique de la province dans sa partie sud à proximité de la plaine de saïss et le préif dans sa partie nord engendre des écarts de température et influe sur le climat d'une façon générale. Le climat est de type continental très chaud en été et assez froid en hiver. Les températures oscillent entre 45°C en été et 2°C en hiver.

Pour la pluviométrie, on distingue dans la province deux niveaux : dans la partie nord de la province les précipitations enregistrées sont comprises entre 600 et 800 mm. La partie sud est moins arrosée que la première avec des précipitations allant de 400 à 500 mm par an.

## **III.2. Les sites d'étude**

Les observations et enquêtes de terrain ont eu lieu durant le mois de mai 2016 en collaboration entre l'INH et la délégation de la santé de la province de Taounate et ont concerné deux localités de la province de Taounate, notamment Galaz et Bouadel.

## **III.3. Population cible**

La population d'étude a inclus toutes les personnes volontaires des secteurs de Galaz et Bouadel ayant accepté de participer à l'enquête. Il faut préciser que pour l'ensemble de notre échantillonnage, les prélèvements n'ont pas été spécifiés ni par sexe ni par tranche d'âge. On a réalisé ainsi les prélèvements chez tous les sujets qui ont répondu à notre appel et dont la totalité était cliniquement saine.

Dans le **tableau 3** suivant, nous présenterons le nombre de l'échantillon pour chaque localité et pour l'ensemble des localités.

**Tableau 3:** Nombre de l'échantillon pour chaque secteur.

Secteur	Population
Bouadel	46
Galaz	122
Bouarouss	1
Ghafsai	1
Timzgana	7
Total	177

### III.4. Les travaux réalisés

#### III.4.1. Au niveau du terrain

##### Questionnaire

Avant d'entamer les prélèvements, on a établi un questionnaire qui s'enquiert d'un ensemble de renseignements exhaustifs sur la triade : chien (réservoir), homme (hôte) et phlébotome (vecteur). Cela afin de faire le point sur la situation épidémiologique de la leishmaniose dans les communes étudiées et d'évaluer les connaissances de la population sur les leishmanioses humaine, ainsi que les facteurs de risque qui favorisent la transmission de la maladie à l'Homme (cf **questionnaire annexe 8**).

##### Prélèvement sanguin

Après avoir obtenu le consentement (**Annexe 9**) écrit de la population ciblée, des prélèvements sanguins sur tube sec et tube EDTA (3 à 5 ml/tube) étiquetés ont été réalisés pour l'ensemble des sujets inclus dans cette étude.

Par la suite, on laisse les tubes à température ambiante puis on procède à la séparation du sérum et du caillot sanguin le jour même, sinon le sang est gardé réfrigéré pas plus de 24 heures. Chaque sérum prélevé à l'aide d'une pipette est stocké dans un microtube portant le numéro d'identification inscrit sur le tube d'où il a été prélevé. Ce même numéro doit correspondre à celui de la fiche de prélèvement du sujet. Les microtubes et les tubes EDTA sont par la suite conservées au froid à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de leur utilisation.

#### III.4.2. Au laboratoire

Les échantillons ont été transportés par la société Biocorp spécialisée dans la logistique des matières de type B vers le laboratoire de parasitologie et mycologie de CHU de Nice en France où les analyses biologiques ont été menées.

Le diagnostic de la LV chez les sujets asymptomatiques a été réalisé par Western Blot et le test moléculaire la PCR en temps réel.

#### III.4.2.1. Western blot

Tous les sérums collectés ont été soumis à une recherche d'anticorps anti-*Leishmania* par western blot.

##### Principe

Les antigènes (promastigotes de *L.infantum*), après separation électrophorétique ont été fixés par électro-transfert à la surface d'une feuille de nitrocellulose (appelée le transfer) découpée en 24 bandelettes identifiées de 1 à 24.

Les bandelettes sont fabriquées au niveau du laboratoire (**Annexe 10**). Elles sont numérotées et prédécoupées mais attachées par leur extrémité supérieure à la souche.

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

##### Méthode

- Distribuer 1, 2ml de tampon échantillon (**R2**) dans chacun des puits,
- Agiter doucement la cuve,
- A l'aide d'un scalpel de taille n°11, découper les bandelettes nécessaires dans l'ordre en partant de la 24 vers la 1 et les déposer dans les rigoles contenant le tampon,
- Incuber 5 min sur agitateur orbital pour plaque,
- Distribuer 25 µl de serum et agiter doucement la cuve,
- Incuber la bandelette pendant 90 mn sur agitateur tridimensionnel,
- Laver 3 fois avec le tampon de lavage dilué au 1/10 (**R3**)
- Distribuer 1, 2 ml de conjugué anti-IgG humaine (**R4**), agiter doucement la cuve
- Incuber 60 mn sur l'agitateur tridimensionnel
- Laver 3 fois avec le tampon de lavage dilué 1/10
- Distribuer 1, 2 ml de substrat (**R6**) et agiter doucement la cuve
- Incuber 30 mn sur l'agitateur tridimensionnel
- Arrêter la réaction par 2 lavages à l'eau distillée
- Transférer la bandelette sur un papier filtre. Laisser sécher à l'air pendant 15 mn

#### III.4.2.2. PCR en temps réel

Cette technique a concerné les ADN extraits à partir des échantillons de sang total, prélèvement non invasif.

## **Principe**

La PCR quantitative en temps réel est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu « en temps réel » le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés.

Le profil d'une réaction PCR classique peut se décomposer en 3 étapes:

1. La phase de bruit de fond s'achève lorsque le nombre de produits PCR néo formés dépasse la valeur seuil de la technique de détection utilisée.
2. Puis, on assiste durant la phase exponentielle au doublement du nombre de produits PCR à chaque cycle.
3. Enfin, la phase de plateau débute lorsque les constituants de la PCR (en particulier la Taq polymérase) deviennent limitants.

## **Méthode**

### ➤ **Extraction d'ADN à partir du sang total par le kit QIAamp**

Une extraction de l'ADN parasitaire a été faite à partir du sang périphérique prélevé sur tube EDTA par le kit QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAamp DNA Tissue Kit, Qiagen, Germany), selon les recommandations du fabricant.

Mode opératoire et détail en (**annexe 11**).

### ➤ **Amplification**

#### - **Préparation du Mix**

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

Les produits du Mix et leurs volumes sont représentés dans le **tableau 4** et les séquences des amorces et de la sonde utilisées sont indiquées dans le **tableau 5**.

**NB:** Utilisation des amorces et de la sonde conservés à -20°C et préalablement reconstitués et dilués.

**Tableau 4:** Produits du Mix et leurs volumes pour la réalisation d'une PCR en temps reel

Réactif	Volume en réactif / 1 réaction	Nombre de réaction	Volume par Manip
Taqman Fast Universal PCR Master Mix X2	5	110	550
20 X Taqman Assay Mix	0,5		55
H2O	2		220
Total	7,5		825

- **Préparation des échantillons**

- Tracer un plan de plaque (tableau IV)
- Répartir le Mix dans les cupules de la plaque à raison de 7,5µl par cupule sous une hotte
- Répartir 2,5 µl d'ADN dans chaque puits à l'exception de ceux des deux témoins négatifs places dans les deux dernières cupules

- **Programmation du thermocycleur**

- Dénaturation initiale: 95°C pendant 5 mn
  - Dénaturation: 95°C pendant 30s
  - Annealing et elongation : 60°C pendant 60 s
- } X45

**Tableau 5:** Plan de plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-1}$		2		$2 \cdot 10^1$		$2 \cdot 10^2$			
B	$2 \cdot 10^3$									Eau		
C												
D												
E												
F												
G												
H												

## **Résultats et Discussion**

## Résultats

### I. Situation épidémiologiques de la leishmaniose viscérale dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès (1990-2019)

#### I.1. Au Maroc

##### I.1.1. Extension spatiale de la LV au Maroc

Au Maroc, la LV a tout d'abord été localisée au Nord du pays dans les années 1990 : se localisant principalement dans les régions de Nador, d'Al Hoceima, de Tétouan, de Taza, de Fès et de Meknès. La province de Taounate est la plus vieille zone à risque connue de LV.

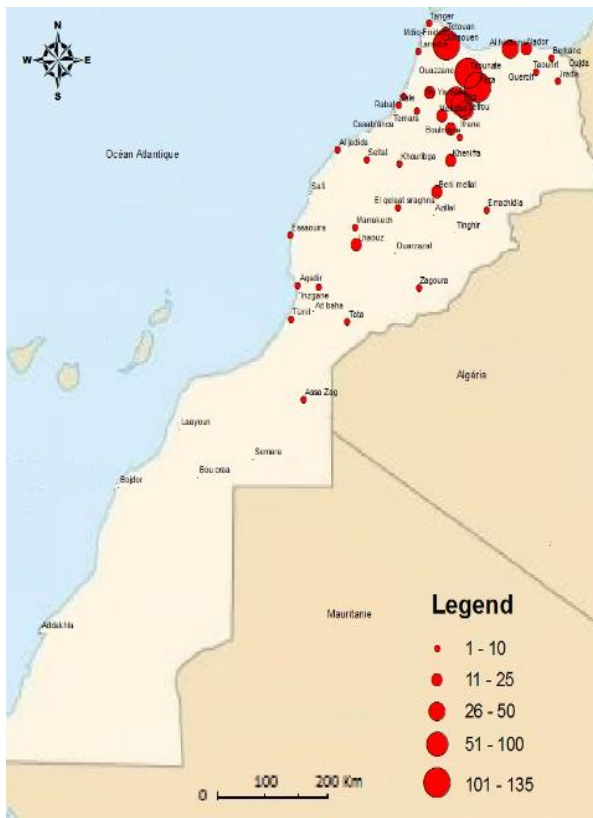
Entre 1990 et 2019, les provinces les plus touchées étaient Taounate (387 cas), Taza (320 cas), Chefchaouen (328 cas), Moulay Yacoub (232 cas), Al Hoceima (194 cas) Fès (145 cas) Séfrou (128 cas) et Nador (120 cas). L'évolution historique est illustrée par les figures cartographiques réalisées à l'aide des systèmes d'information géographique (SIG) A-GIS 9.3 (Figure 21, 22, 23, 24 et 25).



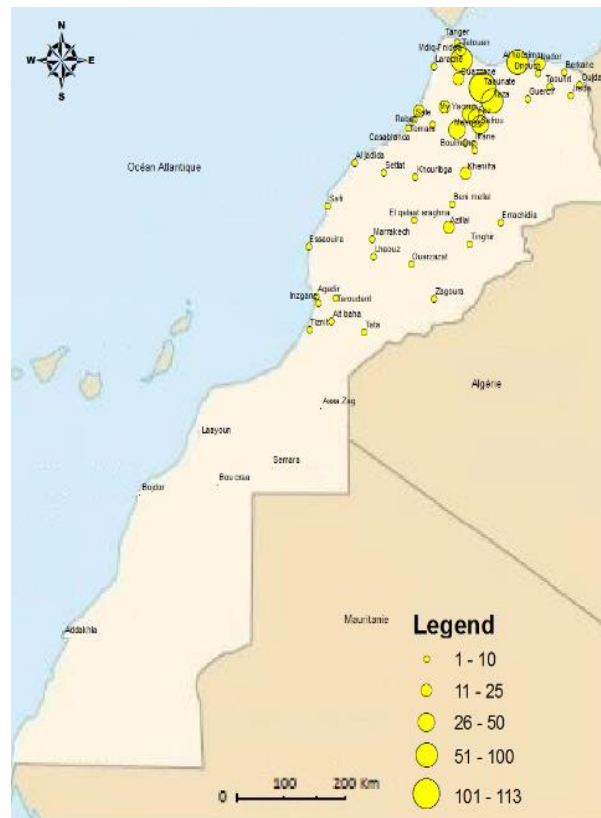
**Figure 21:** Cas de LV humaine au Maroc entre 1990 et 1995



**Figure 22:** Cas de LV humaine au Maroc entre 1996 et 2001



**Figure 23:** Cas de LV humaine au Maroc 2002 entre et 2007



**Figure 21:** Cas de LV humaine au Maroc entre 2008 et 2013



**Figure 22:** Cas de LV humaine au Maroc entre 2014 et 2019

### I.1.2. Répartition de la LV selon les provinces de 1990 à 2019

Le **tableau 6** ci-après retrace l'évolution annuelle des cas de LV à *L. infantum* en fonction des régions.

**Tableau 6:** Evolution des cas de la LV dans certaines régions et en fonction des années (1990 et 2019)

Province	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Tot.	Perc.
Al Haouz	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	2	3	2	3	1	0	1	0	1	1	4	1	3	1	9	2	3	43	1,48%
Al Hoceima	0	0	0	2	6	3	5	9	4	5	12	12	12	7	14	5	3	5	14	10	16	6	7	11	7	6	2	4	3	4	194	6,68%
Beni Mellal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	4	2	2	4	1	3	2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	28	0,96%
Chefchaouen	0	0	0	2	1	4	12	3	7	10	18	22	8	11	18	12	24	28	26	17	18	16	12	9	6	2	17	12	6	7	328	11,29%
El Hajeb	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	0	1	5	1	2	6	6	3	2	0	1	2	2	2	0	0	1	2	0	42	1,45%
El Kelaâ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	2	1	6	0	4	3	24	0,83%
Fes	0	0	0	0	0	2	6	5	3	13	5	5	8	8	13	12	17	1	8	5	7	4	8	2	4	1	0	2	3	3	145	4,99%
Kénitra	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	1	0	0	4	2	0	2	3	7	3	2	6	3	1	3	4	47	1,62%
Khémisset	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	1	5	0	0	2	3	0	0	2	0	2	0	0	2	1	1	2	0	30	1,03%
Khénifra	0	0	0	1	0	0	2	3	2	3	2	8	4	0	2	2	0	5	10	2	2	0	0	1	3	2	2	0	0	0	56	1,93%
Larache	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	1	2	2	3	0	0	4	2	2		2	2	1	2	1	1	2	1	3	39	1,34%
Meknès	1	0	1	3	2	2	2	6	3	2	1	4	2	2	4	2	5	9	4	5	2	3	6	1	2	0	0	5	3	4	86	2,96%
Mly Yacoub	0	0	4	0	8	9	10	6	6	13	5	10	4	19	19	17	22	9	9	11	8	6	4	8	3	3	1	10	5	3	232	7,98%
Nador	8	4	5	7	4	8	3	8	7	9	7	5	4	3	2	2	2	3	1	2	3	3	3	4	1	5	2	1	4	0	120	4,13%
Ouazzane	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	5	2	3	1	3	6	2	29	1,00%
Ouarzazate	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	1	1	0	2	1	3	0	2	20	0,69%
Séfrou	0	0	1	0	0	1	7	3	2	7	2	5	4	6	6	6	13	6	9	9	13	5	4	4	2	1	3	2	3	4	128	4,40%
Sidi Kacem	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	1	4	5	3	8	3	5	6	5	4	6	5	2	2	1	0	0	1	5	0	75	2,58%
Taounate	0	0	1	4	4	9	3	5	8	8	8	13	22	16	16	25	25	31	36	21	27	17	9	13	12	8	11	14	10	11	387	13,32%
Tata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	6	0	0	1	2	3	5	2	5	2	30	1,03%
Taza	2	2	13	4	1	10	6	13	8	12	26	15	12	18	23	21	19	13	16	21	7	11	9	3	6	10	3	4	4	8	320	11,01%
Tétouan	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	3	0	5	3	4	4	1	1	2	5	2	2	3	1	1	5	46	1,58%
Zagora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0	3	3	0	0	1	1	2	2	4	3	7	7	14	8	61	2,10%
Autres*	3	4	8	14	18	21	25	4	6	5	4	5	8	4	11	1	13	15	12	11	16	17	26	26	19	22	21	20	20	16	395	13,60%
Tot.	14	10	33	37	44	69	81	76	69	105	102	115	101	114	154	114	170	160	163	134	139	107	113	111	86	87	92	106	107	92	2905	

(\*) Régions dont le nombre de cas est moins de 10 cas.

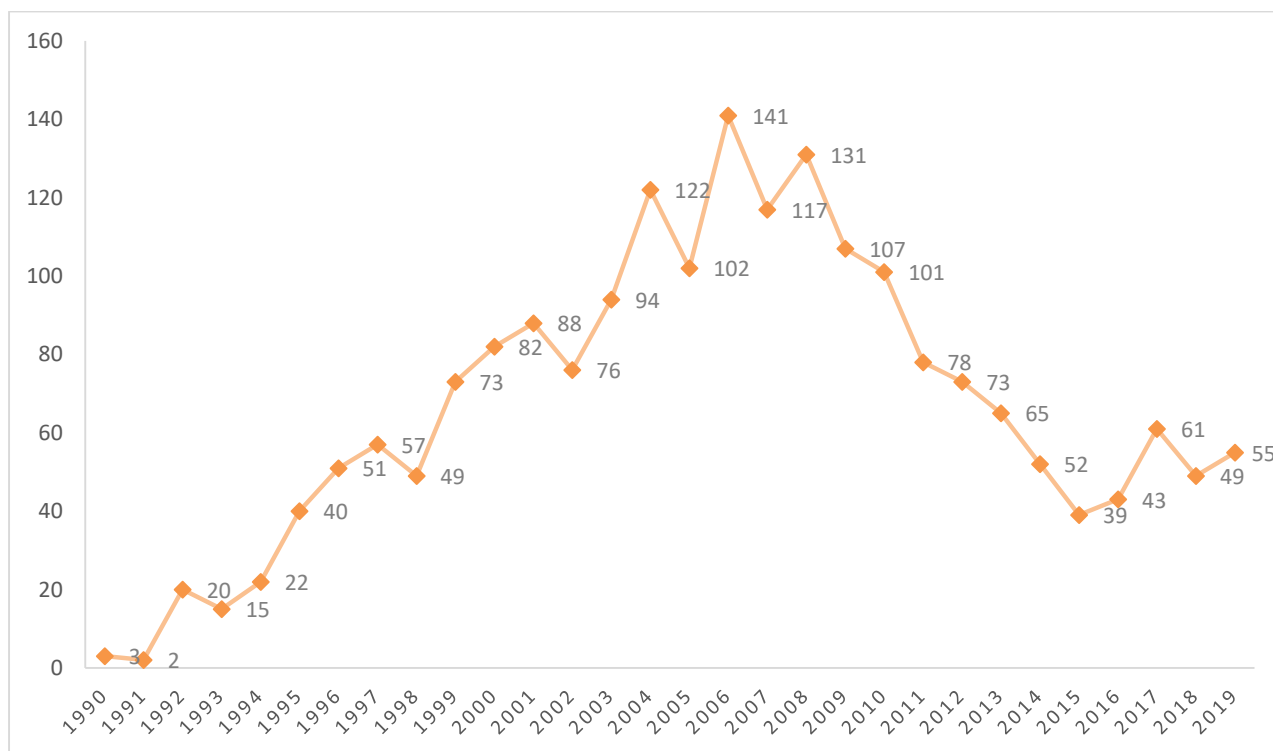
Deux mille neuf cent cinq (2905) cas de LV ont été signalés au département d'épidémiologie du ministère de la santé durant la période allant de 1990 au 2019 (**Tableau 6**).

Pendant la période 1999-2019, le nombre annuel moyen de cas est de 145 cas par an.

## I.2. Région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès

### I.2.1. Répartition temporelle de la LV

La variation annuelle des cas de leishmanioses viscérales dans la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès depuis 1990 jusqu'à l'année 2019 est représentée sur l'histogramme de la (**Figure 26**).



**Figure 23:** Évolution annuelle des cas de la LV dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès

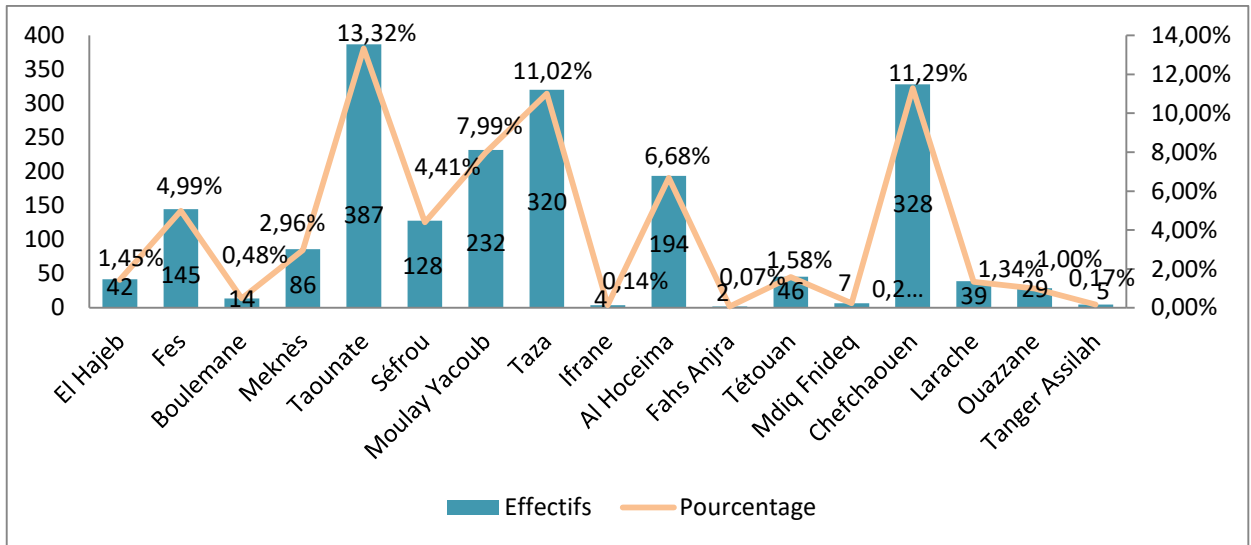
La moyenne des cas de LV entre 1990 et 2019 était de  $67 \pm 37$  avec des extrêmes allant de 2 cas en 1991 à 141 cas en 2006. La répartition des cas de LV varie au cours des années. Elle était faible avant 1995, avec une moyenne de  $12 \pm 9$  cas. A partir de 1999, une nette recrudescence est notée. Au cours des dix dernières années (2010-2019), la moyenne des cas était de  $62 \pm 19$ .

Sur la totalité des cas, 30,86% ont été enregistrés entre 2010 et 2019, 56,42% entre 1999 et 2009 et 12,90% entre 1990 et 1998.

### I.2.2. Répartition des cas de LV à *L. infantum* par province

La province de Taounate est la plus touchée durant ces 29 années d'étude avec 387 des cas soit 13,3% suivie de Chefchaouen avec 328 cas soit 11,2%, Taza avec 320 cas soit 11%, Moulay Yacoub avec 232

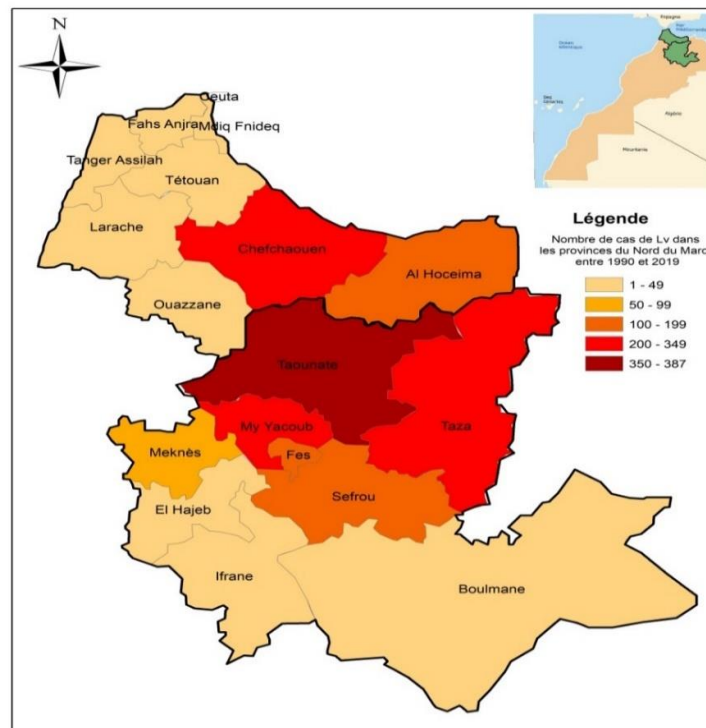
cas soit 7,9%, Al Hoceima avec 194 cas soit 6,6%, Séfrou avec 128 cas soit 4,4% et Fès avec 125 cas soit 4,9% (**Figure 27**).



**Figure 24:** Répartition des cas de LV entre 1990 et 2019 dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès

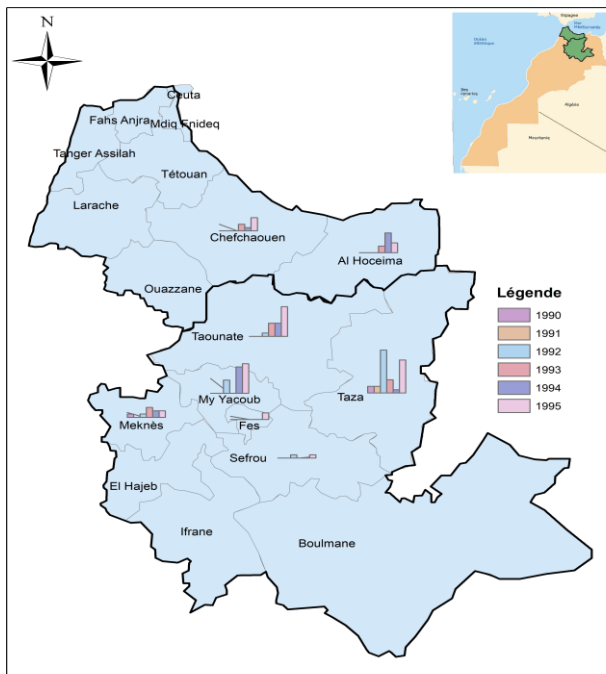
### I.2.3. Répartition géographique des cas de LV à *L. infantum*

Selon le Ministère de la santé, entre 1990 et 2019, parmi le total déclaré 2905 de cas de LV ont été localisés dans la région de Fès-Meknès et la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima, soit 46,7% (n=1358/2905) et 22,4% (n=650/2905) respectivement (**Figure 28**).

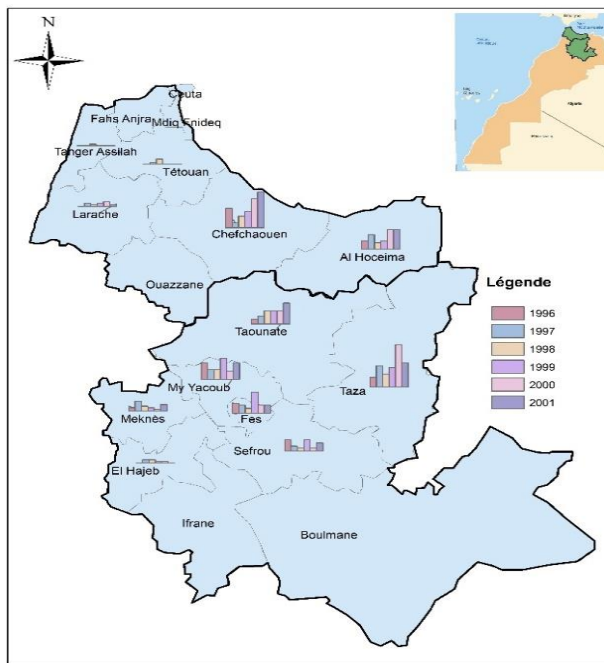


**Figure 25:** Distribution géographique des cas de LV dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès de 1990 à 2019

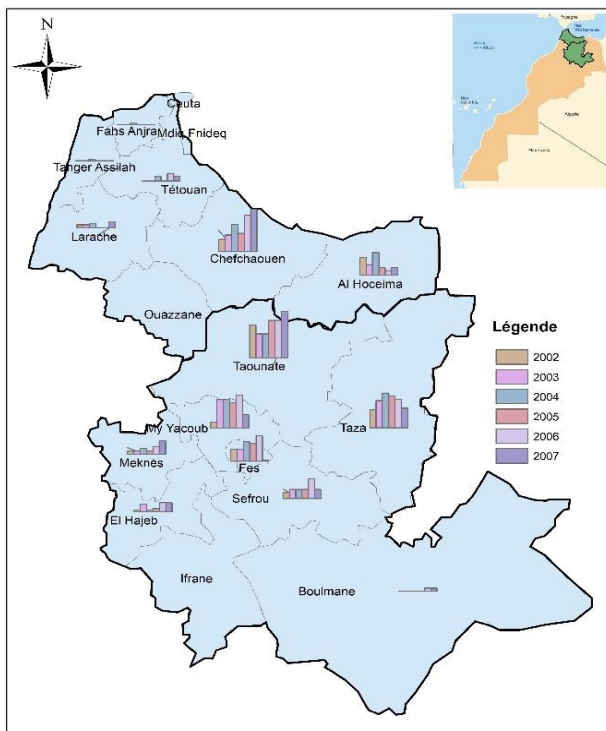
Environ 70% du total des cas de LV (2008/2905=69,1%) ont été enregistrés dans ces deux régions. L'évolution historique est illustrée par les figures cartographiques réalisées à l'aide de système d'information géographique (SIG) A-GIS 9.3 (Figure 29, 30, 31, 32 et 33).



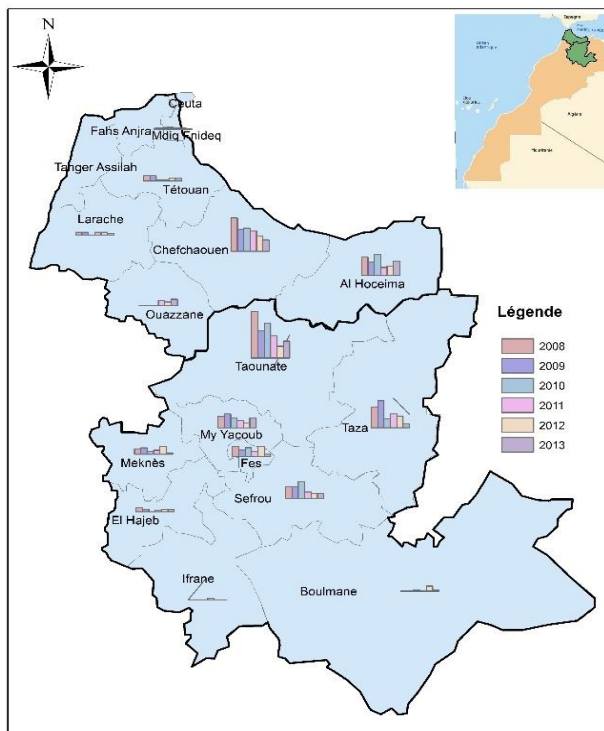
**Figure 29:** Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 1990 et 1995



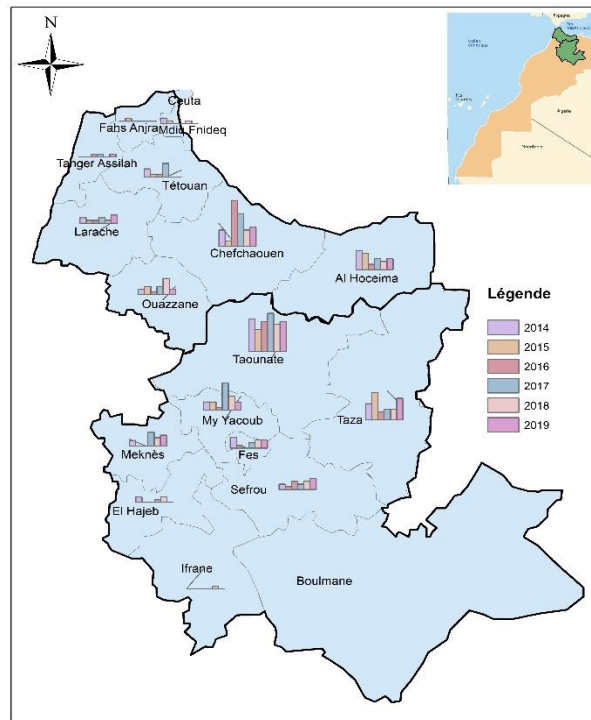
**Figure 30:** Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 1996 et 2001



**Figure 31 :** Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2002 et 2007



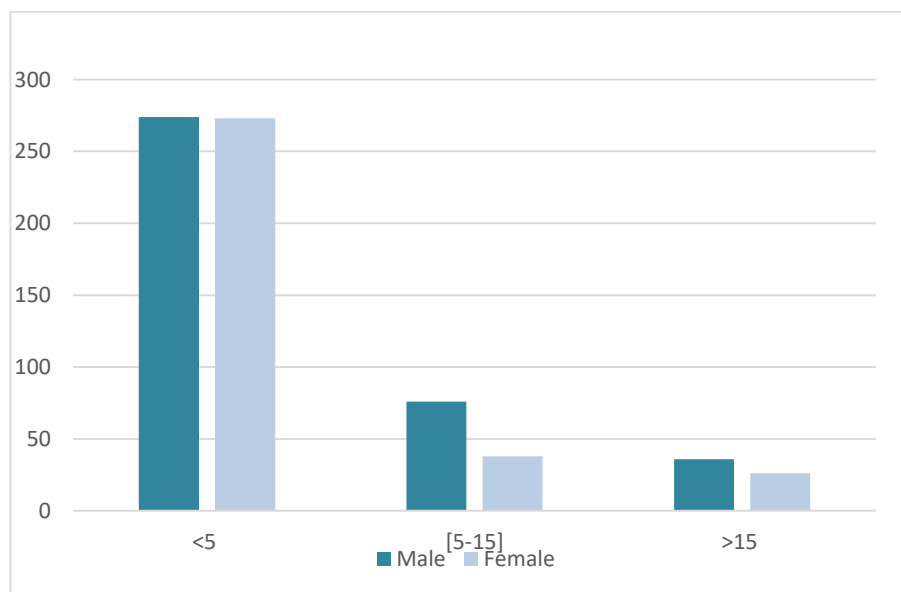
**Figure 32:** Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2008 et 2013



**Figure 26:** Cas de LV humaine dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région Fès-Meknès entre 2014 et 2019

#### I.2.4. Répartition de la LV en fonction de l'âge et du sexe de 2009 à 2019

Un total de 723 de cas de LV déclarés dans les deux régions a été analysé selon l'âge et le sexe. D'après les résultats, la LV à *L. infantum* touche toutes les tranches d'âge, avec 661 cas chez les enfants (91,4%), contre 62 adultes (8,6%). Les enfants dont l'âge varie entre 1 et 4 ans sont les plus touchés avec 547 (75,7%) des cas (**Figure 34**).



**Figure 27:** Répartition des cas de LV en fonction de l'âge et du sexe de 2009 à 2019

La répartition des 723 cas de LV selon le sexe, montre que les deux sexes sont touchés par la LV. Les cas ont été plus fréquents dans le sexe masculin 386 (53, 4 %) que féminin 337 (46, 6 %) (**Figure 34**). Le sexe ratio M / F est de 1,14.

La comparaison du sexe selon les tranches d'âge a montré une différence statistiquement significative ( $Chi^2=11$ ,  $df=2$ ,  $p=0,004$ ).

### I.3. Typage moléculaire de *Leishmania*

Un total de 27 frottis médullaires, reçu au LNRL au cours de l'année 2013 et 2014 ont été diagnostiqués positifs par examen microscopique (**Tableau 7**).

**Tableau 7:**Résultats de l'examen microscopique des lames du secteur le plus touché au Maroc.

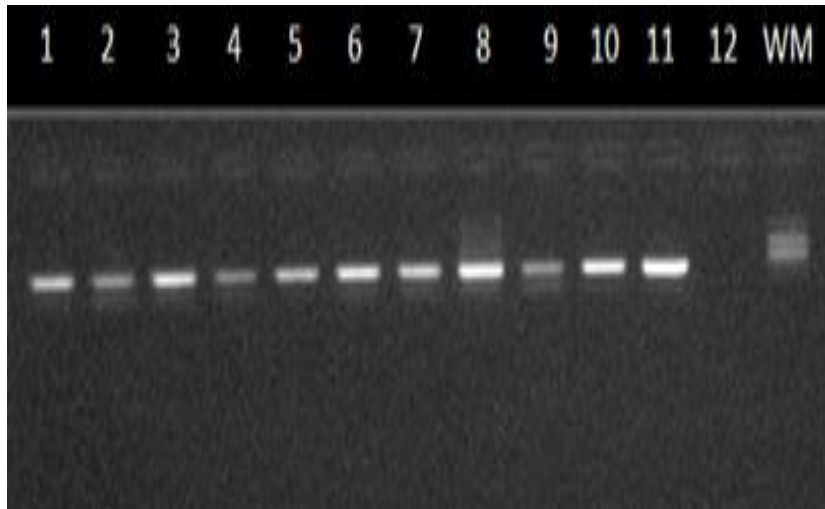
Province	Commune	Results of Lei70-PCR	Results of RFLP par RSaI
Mly Yakoub	Mly Yakoub	+	<i>L. infantum</i>
Fès	Fès elbali	+	<i>L. infantum</i>
	Ouledtaib	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
Séfrou	Imouzar	+	<i>L. infantum</i>
	Sidi abdeslam	+	<i>L. infantum</i>
	Lhyayna	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
Taounate	Hjer maebed	+	<i>L. infantum</i>
	Drmederghass	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	Karia Ba Mohammed	+	<i>L. infantum</i>
Taza	Tahla	+	<i>L. infantum</i>
	Ajdir	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
Al-Hoceima	Douar Assama	+	<i>L. infantum</i>
	Ait Ziane	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
Tétouan		+	<i>L. infantum</i>
Tanger	-	+	<i>L. infantum</i>
	-	+	<i>L. infantum</i>
Ouazzane	-	+	<i>L. infantum</i>

L'analyse moléculaire est utilisée pour confirmer notre diagnostic et identifier les espèces de *Leishmania* circulantes. L'amplification de la région ARNr-ssu des 27 échantillons s'est confirmée positive, le résultat positif se traduit par la présence d'une bande de 354 pb correspondant au genre *Leishmania*. L'analyse du polymorphisme de longueur de fragment de restriction a révélé des fragments spécifiques de 82 pb et de 122 pb spécifiques de *L. infantum*.

## II. Étude des performances du test immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale par rapport à l'ED, la PCR, L'ELISA et l'IF

### II.1. Parasitologie et caractéristiques des patients

Sur les 49 participants, le ratio garçon/fille est de 0,8. L'âge moyen des participants est de  $6,08 \pm 1,51$  an (pas de différence entre les sexes). Un total de 24 des 49 échantillons (48,9%) se sont révélés positifs par les deux tests de référence, microscopie et PCR (**Figure 35**).



**Figure 28:** Électrophorèse sur gel d'agarose montrant les produits de PCR en utilisant les amorces Lei70L et Lei70R.

Lignes 1-10: échantillons, ligne 11: contrôle positif (*L. infantum*), ligne 12: contrôle négatif, WM: marqueur de poids 100 pb (Invitrogen).

Les 49 patients sont regroupés selon leur âge en cinq groupes : le groupe 1 (<12 mois) comprend 3 patients soit (6,1%), le groupe 2 (1-4 ans) comprend 33 patients soit (67,3%), le groupe 3 (5-9 ans) comprend 6 patients soit (12,2%), le groupe 4 (10-15 ans) comprend 2 patients soit (4,1%) et le groupe 5 (>15 ans) comprend 5 patients soit (10,2%).

L'âge médian des 24 patients atteints d'une LV confirmée est de 2 ans (de 6 mois à 62 ans), et 19 (79,1%) ont moins de 15 ans. Le sex-ratio est de 0,6.

#### II.1.2. Reproductibilité

Aucun des tests n'a dû être répété en raison d'incohérences entre les lectures microscopiques des biologistes. Un accord à 100% dans la lecture de l'ICT rk39 et des autres tests a été trouvé entre les deux microscopistes. Néanmoins, un seul échantillon a montré un examen direct de la moelle osseuse positif et un test rapide ICT rK39 négatif. Les manipulations sont refaites et le résultat obtenu a été le même que celui obtenu initialement.

### II. 3. Sérologie

Les résultats des tests sérologiques : ELISA, IFAT et ICT rK39 sont répertoriés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8:** Comparaison entre les résultats de l'antigène ICT rK39, IFI et ELISA

Patient	Parasitology*	PCR*	ICT rk39	IFI	ELISA
<b>Cas positifs</b>	24 (49%)	24 (49%)	23 (46.9%)	22 (44.9%)	20 (40.8%)
<b>Cas Négatifs</b>	25 (51%)	25 (51%)	26 (53.1%)	27 (55.1%)	29 (59.2%)

\* L'examen direct et la PCR à l'aide sont considérés les méthodes de référence pour le diagnostic de la LV

L'ICT rK39 est positif chez 23 (46, 9%) des 24 patients atteints de LV, 25 des 26 sérums négatifs proviennent des enfants et un sérum provient d'un patient adulte. L'IFI est positif chez 22 (44,7%) des patients et négatif chez 27 (55,1%) d'entre eux. Ainsi, des anticorps anti-*Leishmania* ont été détectés dans 20 (40, 8%) des 49 échantillons de sérum par ELISA.

### II.4. Sensibilité et spécificité

Le **tableau 9** montre les taux de sensibilité et de spécificité obtenus avec les trois tests sérologiques ELISA, ICT rk39 et IFI. Les taux de sensibilité varient de 75% à 95,8%.

**Tableau 9:** Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), et valeur prédictive négative (VPN) des méthodes de diagnostic sérologique de la leishmaniose viscérale évaluées au Maroc

	Examen direct		PCR		Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
	Pos	Neg	Pos	Neg				
<b>rK39 dipstick test</b>								
Pos	23	0	23	0	95,8	100	100	96,2
Neg	1	25	1	25				
<b>IFI</b>								
Pos	21	1	21	1	87,5	95,8	95,5	88,9
Neg	3	24	3	24				
<b>ELISA</b>								
Pos	18	1	18	1	75	95,8	94,7	80
Neg	6	24	6	24				

La sensibilité des ICT rk39 et IFI a été estimée à 95,8% et 87,5%, respectivement. Avec ELISA, deux sérums présentent des résultats faussement négatifs, conférant une sensibilité de 75%. Les valeurs de spécificité observées pour l'ensemble du groupe témoin sont de 100% pour ICT rk39, 95,8% pour IFI et 95,8% pour ELISA. La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) du test ICT rK39 sont respectivement de 100% et 96,2%, tandis que la VPP et la VPN de l'IFAT et du test ELISA sont respectivement de 95,5%, 88,9%, 94,7% et 80%. Les comparaisons statistiques sont très significatives entre la VPP et la VPN pour tous les tests : ICT rk39 (test du chi2 de Pearson :  $\chi^2 = 45\ 152$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,0001$ ), IFAT (test du chi2 de Pearson :  $\chi^2 = 34\ 509$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,0001$ ), ELISA (test du chi2 de Pearson :  $\chi^2 = 26\ 001$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,0001$ ).

### III. Étude de la prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate

#### III. 1. Evaluation des connaissances de la population sur la maladie et identification des facteurs de risque associés

##### ✚ Population d'étude

L'enquête a concerné 177 personnes résidant dans 2 secteurs de la province de Taounate : Galaz, et Bouadel. La répartition de ces personnes, selon leurs douars, figure dans le **tableau 10**.

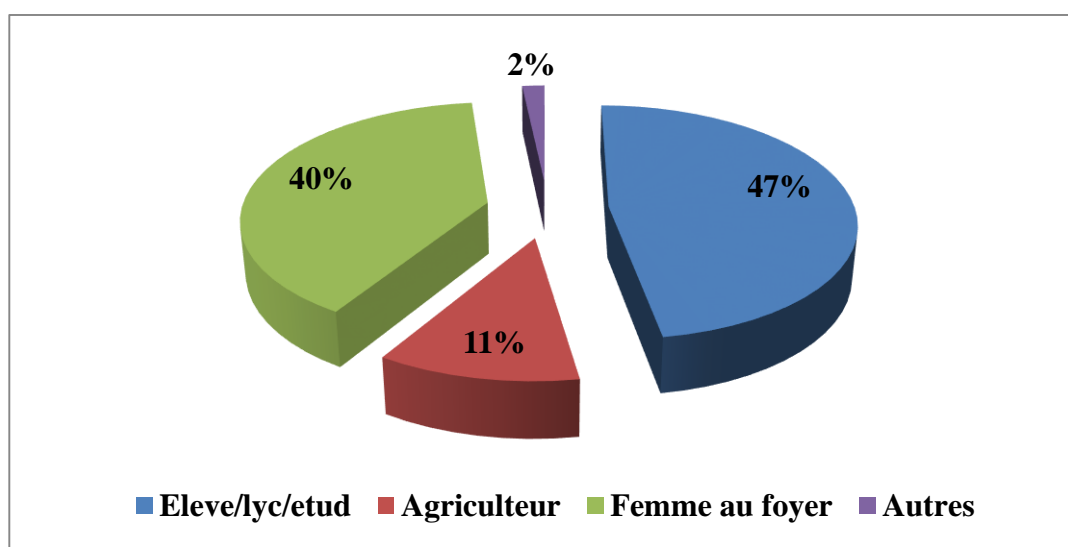
**Tableau 10:** Distribution des personnes enquêtées par secteur.

Secteur	Nombre de personnes enquêtées	Pourcentage (%)
Bouadel	55	31,0
Galaz	122	69,0
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>100</b>

La distribution des habitants enquêtés par secteur est variable d'un secteur à l'autre, avec une étendue de 31,0% pour Bouadel à 69,0% pour Galaz.

##### ✚ Répartition de la population d'étude selon le niveau socio-économique

D'une manière générale, nous relevons que parmi les 177 personnes interrogées, 84 (47%) sont des élèves, 20 (11%) sont des agriculteurs, 70 (40%) sont des femmes au foyer, et 3 (2%) ont d'autres activités (chauffeur, retraité,...) (**Figure 36**). Plus de la moitié des cas sont issus d'un bas niveau socio-économique.



**Figure 29:** Répartition des cas selon les conditions socio-économiques

### ✚ Répartition des sujets selon le sexe et l'âge

L'âge moyen de la population étudiée était de  $22,87 \pm 20,34$  ans avec des extrêmes de 4,5 et 90 ans; l'âge médian était de 22,5 ans [11,00-40,75]; 125 femmes (70%) et 52 hommes (30%).

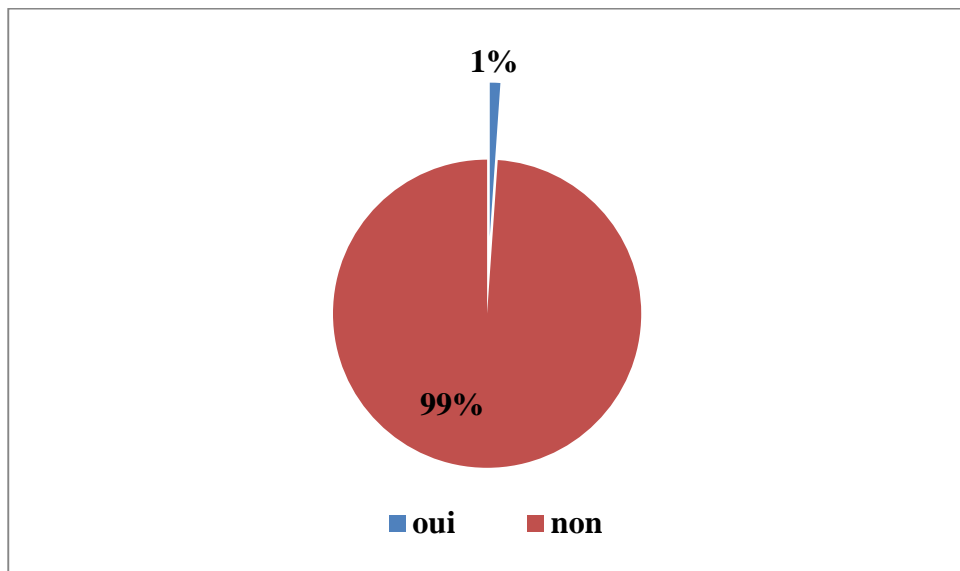
La tranche d'âge  $\geq 15$  ans était prédominante avec 56% des cas (**Tableau 11**).

**Tableau 11:** Répartitions des cas selon le sexe et l'âge.

Âge (an)	Hommes		Femmes		Total	Pourcentage
	Effectifs	Pourcentage	Effectifs	Pourcentage		
<8	2	3,8%	2	1,6%	4	2,2%
8-15	26	50,0%	48	38,4%	74	41,8%
$\geq 15$	24	46,2%	75	60,0%	99	56%
<b>Total</b>	52	30,0%	125	70,0%	177	100%

### ✚ Connaissance de la population sur la leishmaniose

Les réponses à cette question sont négatives en majorité (99%). Il est tout de même à noter que 2 personnes ont déclaré connaître la maladie (1%). Une d'elle se trouve à Galaz, et l'autre à Bouadel (**Figure 37**).



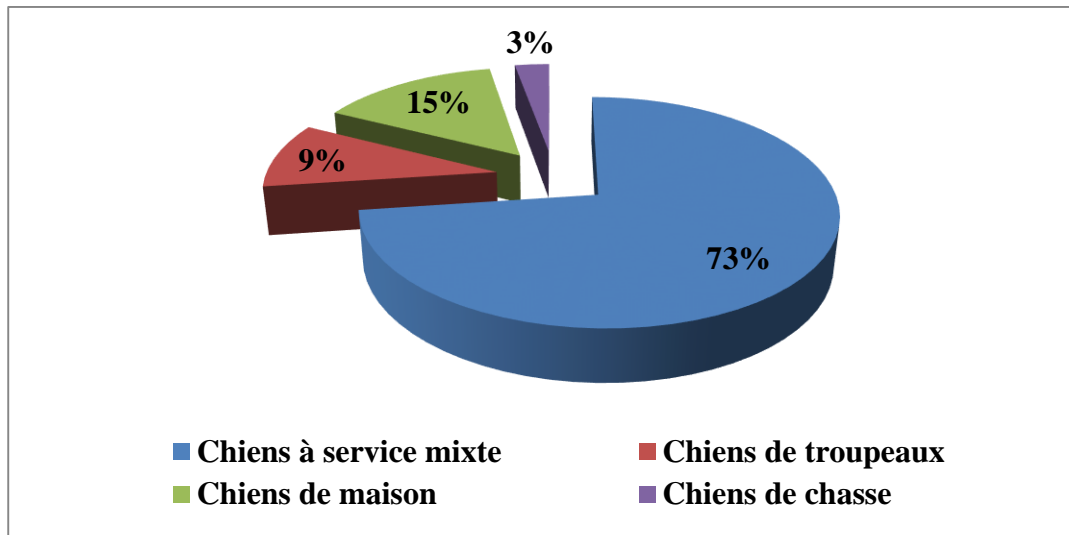
**Figure 30:** Connaissance sur la leishmaniose dans la région d'étude.

Les deux personnes connaissant la leishmaniose, l'appellent « bouton » (« Hboub »).

D'autre part, une des deux personnes l'a connue grâce aux cas observés dans son douar et l'autre à travers la télévision.

### ✚ Rôle des chiens dans le foyer

Parmi les personnes interrogées, 129 (72,9%) affirment que la principale fonction du chien réside dans le gardiennage du foyer et la garde du troupeau, 17 (9,6%) des foyers possèdent des chiens de garde pour les troupeaux, 26 (14,7%) affirment que leurs chiens n'assurent que le gardiennage du foyer, alors que seulement 5 (2,8%) sont des chiens de chasse (**Figure 38**).

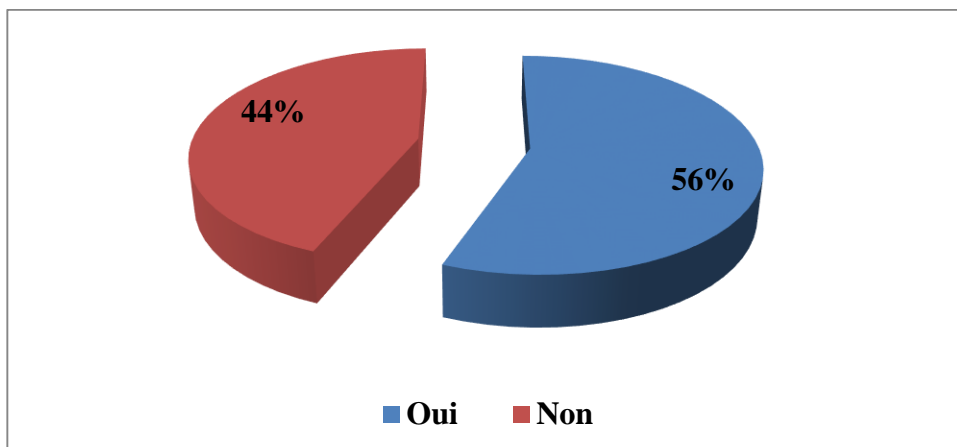


**Figure 31:** Rôle des chiens dans les foyers selon les personnes interrogées

La majorité des personnes 169 (95,5%) confirment que le chien passe la nuit en dehors de la maison, soit attaché soit en liberté, alors que 8 (4,5%) rapportent que le chien passe la nuit à l'intérieur de la maison.

### ✚ Chiens sans propriétaire

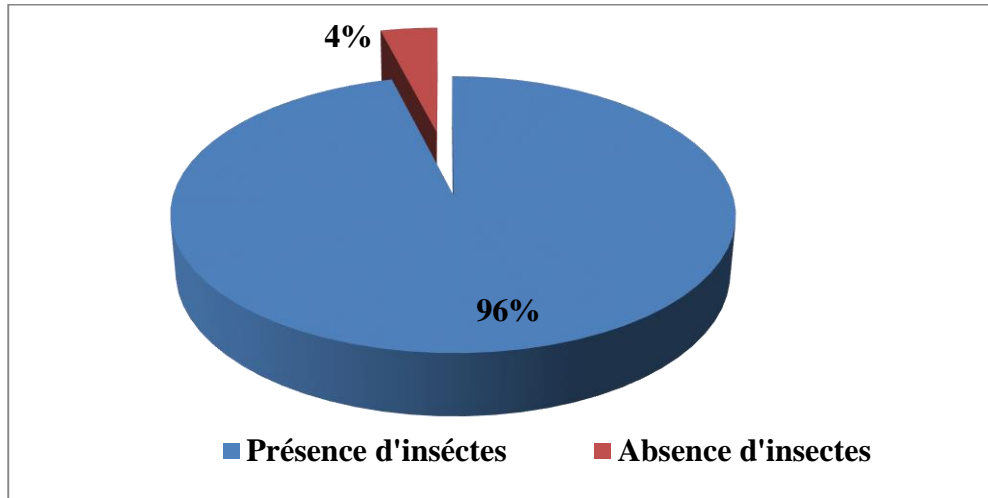
Dans la région d'étude, 99 des 177 personnes interrogées (56%) confirment l'existence de chiens errants dans leurs douars (**Figure 39**).



**Figure 32:** Existence des chiens sans propriétaire dans les localités d'enquête.

### ✚ Existence d'insectes piqueurs la nuit

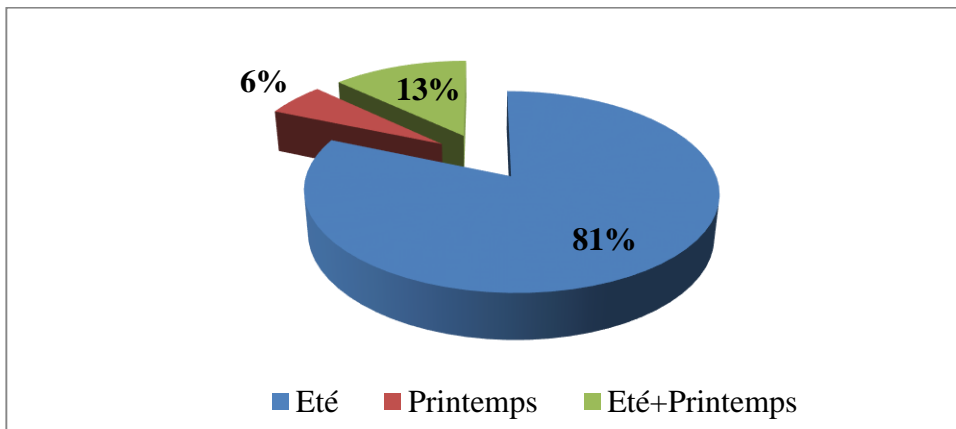
Selon les résultats de l'enquête, 177 des personnes interrogées (96%) déclarent la présence d'insectes piqueurs la nuit (**Figure 40**).



**Figure 33:** Présence d'insectes piqueurs la nuit.

La majorité des enquêtés (82,8%) leur donnent le nom de "Cheniouela" et (17,2%) ont indiqué aussi l'existence d'autres insectes qu'ils appellent "namousse" qui ne sont pas des insectes piqueurs, à la différence de "cheniouela".

Concernant la période de l'année durant laquelle ces insectes sont plus fréquents, c'est l'été selon 144 (81,4%) des personnes interrogées, tandis que 10 (5,6%) de celles-ci ont mentionné le printemps, et d'autres avec un pourcentage de 23 (13%), pensent qu'il s'agit de ces deux saisons (**Figure 41**).



**Figure 34:** Période durant laquelle les insectes piqueurs sont les plus fréquents.

### ✚ Rôle des insectes piqueurs dans la transmission de la maladie

Presque la totalité des personnes 175 (98,9%) pensent que ces insectes ne transmettent aucune maladie, alors que seulement 2 (1,1%) personnes ont répondu positivement.

### III.2. Enquête sérologique et moléculaire

#### II.2.1. Prévalence du portage asymptomatique

Notre étude sur la prévalence du portage asymptomatique de LV s'est intéressée à la région de Taounate. Les 177 échantillons recueillis ont été testés par une méthode sérologique Western Blot (WB) et une méthode moléculaire PCR en temps réel (qPCR).

Les résultats obtenus sont présentés dans **les tableaux 12** :

**Tableau 12:** Résultats de la PCR en temps réel et du WB dans les deux secteurs d'étude

Secteur	qPCR	WB	Nombre de cas	Fréquence (%)
<b>Galaz</b>	+	+	39	32,0%
	-	+	13	10,6%
	+	-	35	28,7%
	-	-	35	28,7%
	<b>Total</b>		122	100,0%

Secteur	qPCR	WB	Nombre de cas	Fréquence (%)
<b>Bouadel</b>	+	+	16	29,1%
	-	+	18	32,7%
	+	-	14	25,5%
	-	-	7	12,7%
<b>Total</b>		55	100,0%	

Sur les 177 échantillons examinés, 104 se sont révélés positifs par la qPCR et 86 sont positifs par le WB (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** La prévalence du portage asymptomatique dans les deux secteurs de la zone d'étude

Secteur	Nombre des échantillons testés	Cas positifs			
		qPCR*	Prévalence	WB	Prévalence
<b>Galaz</b>	122	74	71,2%	52	60,5%
<b>Bouadel</b>	55	30	28,8%	34	39,5%
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>104</b>	<b>58,5%</b>	<b>86</b>	<b>48,6%</b>

\* La qPCR est considérée la méthode de référence pour le diagnostic de la LV asymptomatique

Ainsi les prévalences du portage asymptomatique dans les deux zones d'étude sont réparties comme suit :

- Galaz avec une prévalence relativement élevée avec 71,2% et 60,5% par la qPCR et par le WB respectivement.
- Bouadel présente une prévalence faible par rapport à Galaz avec 28,8% et 39,5% par la qPCR et le WB respectivement.

Les performances de la technique sérologique WB et l'évaluation de son concordance avec la qPCR sont indiquées dans **le tableau 14**:

**Tableau 14:** Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), et valeur prédictive négative (VPN) du WB dans la détection des cas asymptomatiques

	qPCR		Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Kappa	P
	Pos	Neg						
<b>WB</b>			52,9	57,5	64	46	0,1	0,17
Pos	55	31						
Neg	49	42						

La sensibilité du WB a été estimée à 52,9% et la spécificité pour l'ensemble du groupe est de 57,5%. La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) du test WB sont respectivement de 64 % et 46 %. Les comparaisons statistiques ne sont pas significatives entre la VPP et la VPN pour le WB et la qPCR (test du chi2 de Pearson :  $\chi^2 = 1,864$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0,0001$ ).

Selon la valeur du test Kappa (Kappa=0,17) un mauvais accord est obtenu avec l'appariement des deux tests : WB et qPCR. Il n'existe pas une concordance entre ces tests lors de leur application.

# Discussion

## Discussion

### I. Situation épidémiologique de la LV dans la région Tanger-Tétouan-Al Hoceima et la région de Fès-Meknès (1990-2019)

La LV humaine représente un problème majeur de santé publique au Maroc. Une augmentation de l'incidence de cette maladie a été observée ces dernières années, avec l'émergence de nouveaux foyers leishmaniens et une propagation de plus en plus large.

De 1990 à 2019, 56 provinces sur les 75 ont signalé au moins un cas de la LV. Géographiquement, la LV est répandue dans tout le pays. Elle est plus fréquente dans la partie nord avec des cas sporadiques, observés dans d'autres régions, notamment dans le Sud ([Rhajaoui, 2011](#)). Actuellement, la situation de la LV est restée quasi statique depuis 1999, avec des centaines de cas signalés chaque année. Presque tous ces cas proviennent de foyers traditionnels du Nord, où cette maladie est sporadique ([Ministère de la Santé, 2010](#)). Par conséquent, la LV reste une maladie des régions humides et sub-humides du Nord du Maroc. En effet, (79,14%) des cas de la LV sont distribués dans le Nord du Maroc avec (70%) des cas dans la région Fès-Meknès et la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima.

Selon le ministère marocain de la santé, entre 1990 et 2019, parmi un total déclaré de 2905 cas de LV, 46,7% (n=1358/2905) et 22,4% (n=650/2905) ont été localisés dans la région de Fès-Meknès et la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima respectivement.

Les résultats de cette étude rétrospective ont montré que la majorité des cas de LV ont été enregistrés dans les provinces de Taounate et de Chefchaouen, suivies dans l'ordre décroissant de Taza, Moulay Yacoub, Al Hoceima, Sefrou, Fés, Meknès, Tetouan, El Hajeb, Larache, Ouazzane, Boulemane, Tanger-Assilah, M'diq-Fnideq, Ifrane et Fahs-Anjra. Quant à la province de Taounate, elle est connue par son passé épidémique en ce qui concerne la LV ([Guessous-Idrissi et al., 1997](#)).

Néanmoins, le nombre de cas à Taounate ; la province endémique la plus touchée par la LV dans la région de Fès-Meknès, est passé d'un total de 50 cas (années 1990-2000) à un total de 232 cas (années 2001-2010) et a diminué à un total de 105 cas (années 2011-2019). La situation épidémiologique de la LV dans la province de Taounate a été largement documentée par les chercheurs, qui ont suggéré que le nombre élevé de cas peut s'expliquer par le fait que le parasite a pu être présent dans les localités rurales et lorsqu'il a été introduit dans les zones périurbaines, il a trouvé des conditions propices à une épidémie, notamment des changements environnementaux associés à un développement rapide et non planifié, une augmentation de la densité de l'homme et du phlébotome, et une diminution de l'immunité des populations ([Kahime et al., 2014](#)). Ainsi, cette évolution s'explique principalement par le dépistage actif entrepris à la suite de la mise en œuvre du plan d'action de riposte qui a couvert la période de 2010 à 2012. Ce plan avait pour objectif, d'une part, la prise en charge de 100% de cas de leishmaniose viscérale

et cutanée et d'autre part la réduction de l'incidence des LC de 50% à la fin de 2012 au niveau des 16 principaux foyers épidémiques dont Taounate. En effet, depuis le début du recensement des cas de LV en 1997, une forte déclaration de cas a été enregistrée notamment dans les provinces de chefchaouen (328 cas) et d'Al Hoceima (194 cas). Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'augmentation du nombre de cas dans les provinces de l'extrême nord. D'une part, le voisinage de ces provinces avec plusieurs foyers de LC et de LV, tels que Sidi Kacem, Ouazzane, Taounate et Taza. D'autre part, par les activités de la population et leur déplacement vers des zones indemnes (OMS, 2010). Il est à noter qu'un nombre relativement plus élevé de cas de LV a été observé entre 1999 et 2010 dans la région d'étude.

En effet, l'évolution de la LV dans la région de Fès-Meknès et la région de Tanger-Tétouan-AL Hoceima est principalement induite par la mobilisation massive des ressources en eau dans les zones semi-arides et arides pour le développement de l'irrigation et de l'agriculture (Motoie *et al.*, 2013). Les modifications radicales qui en ont résulté ont été favorables à la transmission de *L. infantum*, en augmentant le nombre de chiens et la dissémination de *P. perniciosus*.

La densité des chiens a également été favorisée par les nouvelles implantations rurales et de l'élevage (Ready, 2008). L'effet similaire du développement agricole sur la propagation de la LV a également été signalé dans d'autres zones endémiques (Franke *et al.*, 2002).

Outre le changement global constaté, des facteurs socio-économiques tels que la pauvreté, le manque d'infrastructures, le mode de vie et les facteurs influençant l'environnement, semblent figurer parmi les principaux déterminants sous-jacents de la leishmaniose (Amaro *et al.*, 2013 ; OMS, 2019).

Concernant les facteurs environnementaux, la leishmaniose est fortement affectée par les variations de précipitations, de température et l'humidité. Le réchauffement climatique et la dégradation des sols ont un impact commun sur l'épidémiologie de la leishmaniose (OMS, 2019). En effet, le cycle de vie de la leishmaniose est sensible aux changements de température, de précipitations et d'humidité.

Parmi les facteurs climatiques, la température constitue le principal facteur influençant la propagation de la leishmaniose. En effet, même les plus petites variations de température peuvent avoir un impact profond sur le cycle de développement des promastigotes de *Leishmania* chez les phlébotomes et sur leur pouvoir d'infestation (Rioux *et al.*, 1978) ce qui permet au parasite d'être transmis là où la maladie n'était pas endémique auparavant (OMS, 2019).

Un autre facteur qui peut influencer la propagation de cette parasitose est la végétation qui joue également un rôle important dans le processus de prolifération et de croissance des phlébotomes et donc dans les épidémies de leishmaniose (Oryan *et al.*, 2016). La forme viscérale se produit généralement dans les zones où la végétation abondante (OMS, 2019). En effet, Ready a signalé que la déforestation entraîne une augmentation de la leishmaniose (Ready, 2008).

Concernant notre étude, aux niveaux des provinces les plus fortement affectées par la LV, l'origine rurale était fortement associée à l'incidence de la maladie. Selon l'OMS la transmission de la leishmaniose se produit généralement en milieu rural (Kahime *et al.*, 2014), où elle pourrait être liée au comportement humain par la présence d'animaux et l'accumulation de leurs déchets à proximité des habitats (Nunes WDS *et al.*, 2010). L'étude menée par Moral *et al.*, 2002 confirme que les zones rurales offrent les conditions favorables à la circulation et la pullulation de l'insecte parasite : les chiens, utiles pour la garde des foyers ruraux, des champs et des troupeaux, sont très nombreux au même titre que les mouches des sables (phlébotomes) ; qui trouvent de nombreuses sources de repas sanguins pour les femelles (bovins et chiens), de matière organique nécessaire au développement larvaire, de nids et de repos protégés du vent comme en témoignent les abris pour animaux, la végétation et les fissures des murs non couvertes des habitations. En outre, le déplacement des populations des foyers ruraux voisins vers les zones périurbaines peut avoir un impact sur l'épidémiologie de la maladie en raison de la mauvaise qualité de vie et du statut socio-économique (Reithinger *et al.*, 2010 ; Ghatee *et al.* 2013). Ces facteurs constituent des conditions favorables à la propagation des hôtes réservoirs et des vecteurs, et donc à la propagation de la maladie (Reithinger *et al.*, 2010).

Concernant l'étude clinique, la répartition des cas de LV selon l'âge a montré que la tranche d'âge la plus touchée est celle de 1 à 4 ans avec 75,7% du total des cas. Cette prédominance pourrait s'expliquer par la fragilité et l'immaturation de leur système immunitaire et donc par leur incapacité à se protéger contre l'infection. En outre, cela peut également être dû aux habitudes des enfants qui jouent souvent près des sites de gîtes larvaires, ce qui les rend sujets aux piqûres d'insectes (Arroub *et al.*, 2012). Cette nette prédominance de la LV infantile est conforme aux données de la littérature soulignant que la LV de l'enfant est majoritairement diagnostiquée chez de très jeunes individus. Au Maroc, la LV apparaît comme une maladie de l'enfant dont l'âge est inférieur à 15 ans (Lakhdar Idrissi, 2007). En Tunisie, l'atteinte de l'enfant en bas âge, reste prédominante dans tous les foyers connus, elle représente près de 80% des cas recensés (Skouri *et al.*, 1994). En Algérie la LV reste une affection du jeune enfant avec 92,7% dont la tranche d'âge est comprise entre 0 et 5 ans (Harrat *et al.*, 1992).

De plus, cette étude a également montré une prédominance du sexe masculin. Cela s'explique principalement par le caractère rural des provinces où les activités de la population dépendent étroitement de l'élevage généralement pratiqué par les hommes. Le milieu dans lequel s'exerce ce type d'activité présente une quantité suffisante de matière organique favorisant la multiplication des larves de phlébotomes (Lahouiti *et al.*, 2014). En outre, cette prédominance pourrait également être liée au caractère étiologique de l'espèce *P. perniciosus* qui est connue pour être exophile (IRMA, 2017).

Les résultats de l'identification moléculaire par *Lei70*-PCR avec l'enzyme *RsaI* montrent que la LV est toujours due à *L. infantum* dans les 27 échantillons testés. Ces échantillons ont été prélevés dans les provinces les plus infectées, prouvant que *L. infantum* est l'espèce responsable de la LV dans la région de Fès-Meknès et la région de Tanger-Tétouan-Al Hoceima. Ceci confirme les résultats obtenus par [Amaro et al.,\(2013\)](#); [Rhajaoui et al.,\(2011\)](#) ; [Guessous et al.,\(1997\)](#) ; et [Moncef et al.,\(2011\)](#).

Enfin, de grands efforts ont été déployés pour lutter contre la LV par la formation du personnel au diagnostic microscopique et sérologique, l'élimination des vecteurs et des réservoirs (chiens). Cependant, plusieurs difficultés ont été relevées, telles que le fonctionnement discontinu des microscopes UV dans toutes les provinces, la ponction médullaire douloureuse, la résistance de certains enfants au traitement, la grande discussion sur l'élimination et le traitement des chiens contaminés, l'exigence du dépistage rapide de la LV dans les zones rurales démunies.

## II. Etude des performances du test immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale par rapport à l'ED, la PCR, L'ELISA et l'IFI

Au Maroc, le diagnostic précis de la LV repose généralement sur l'examen microscopique de la moelle osseuse ou la biologie moléculaire. Le prélèvement de la moelle osseuse est invasif et s'avère un acte médical nécessitant une hospitalisation. De plus, l'identification des amastigotes exige une expertise dans le diagnostic différentiel et, de ce fait, sa sensibilité et sa spécificité dépend des compétences du laborantin ou du biologiste. D'autre part, les techniques parasitologiques moléculaires sont lourdes, prennent du temps et exigent de l'expertise et des équipements coûteux, ce qui limite considérablement leur utilisation dans la pratique paraclinique des laboratoires de recherche médicale (Schallig *et al.*, 2001 ; Sundar *et al.*, 2002). Ces limites mentionnées des méthodes de diagnostic direct font de la sérologie l'outil le plus pratique de diagnostic et du dépistage en laboratoire de la LV (Schallig *et al.*, 2001 ; Sundar *et al.*, 2002 ; Kumari *et al.*, 2002 ; Boelaert, 2004). Par conséquent, l'utilisation d'outils de diagnostic précis est cruciale pour établir et mettre en œuvre des mesures de contrôle efficaces. Notre étude, dans laquelle nous avons utilisé le test Kalazar Detect d'InBios, est à notre connaissance la première à évaluer les performances du test rapide ICT rK39 sur des patients marocains atteints de LV. Bien que les bandelettes "Onsite LeishmaniaAb Rapid Test" aient été commercialisées dans le monde entier, il n'existe aucun rapport dans la littérature actuelle sur leur efficacité dans le diagnostic des cas actifs de leishmaniose viscérale au Maroc. Des études multicentriques sur diverses méthodes utilisées pour le diagnostic de la LV révèlent une grande variation dans leur sensibilité et leur spécificité selon leur localisation géographique (Boelaert *et al.*, 2008). Il est donc très important d'effectuer une évaluation avant qu'un nouvel outil de diagnostic ne soit utilisé par le programme national. Il a été recommandé qu'un test de dépistage LV idéal pour la détection des cas ait une sensibilité  $\geq 95\%$  et une spécificité  $\geq 98\%$  (Boelaert *et al.*, 2007). En effet, la performance du test rK39 a déjà été évaluée chez des patients présentant une LV parasitologiquement confirmée en Inde (Caryn *et al.*, 2000) et ailleurs dans le monde. Les valeurs prédictives des deux tests dépendent de la prévalence de la LV dans la population (Zijlstra *et al.*, 1991 ; Badaro *et al.*, 1996 ; Zijlstra *et al.*, 1998).

Dans le cadre de cette enquête, la comparaison des performances de ICT rk39, IFI et ELISA sur des échantillons de sérums de cas LV suspects du CHU Hassan II et du CHU Ibn Sina montre que les tests IFAT et ELISA se sont révélés moins sensibles et moins spécifiques que le test ICT rk39. Le diagnostic de LV a été confirmé par la microscopie et la biologie moléculaire chez 24 (40,7%) des 49 suspects.

La sensibilité du test ELISA est de 75%. Cette valeur est inférieure à celle précédemment rapportée par plusieurs autres chercheurs (Srivastava *et al.*, 1989 ; Alam *et al.*, 1996), qui ont rapporté des sensibilités ELISA variant entre 97 et 100%. La sensibilité de l'IFI dans la présente étude est en accord avec la littérature (Garcez *et al.*, 1996 ; Mbatl *et al.*, 1999).

Elle est d'une valeur de 87,5%, alors que l'ICT rk39 a montré une sensibilité et une spécificité élevées avec des valeurs de 95,8% et 100%, respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Carvalho *et al.* au Brésil, où la sensibilité est estimée à 90% et la spécificité à 100% (Carvalho *et al.*, 2003) et dans la région méditerranéenne, la sensibilité et la spécificité sont estimées à environ 100% (Brandonsio *et al.*, 2002). Cette sensibilité est également en accord avec celle observée par (Marty, 2007) et M. Gulam et al (Gulam., 2010) au Bangladesh, qui sont respectivement de 97% et 95%. En revanche, il est supérieur à celui trouvé dans le Sud de la France par le test Distpik, qui est de l'ordre de 81,8%. En Inde, le test a révélé une sensibilité de 100% et une spécificité de 93% à 98% (Sundar *et al.*, 1998 ; Gao *et al.*, 2015).

La sensibilité et la spécificité de l'ICT rK39 sont variables à l'intérieur de différentes populations présentant des zones de LV indifférentes. Au Soudan, cependant, la sensibilité (69,2-85,6%) des tests en bande a été faible comparativement au Kenya (78,6-89,8), à l'Inde (98,4-100) et au Népal (92,1-99,2) (Srivastava *et al.*, 2011). Pour des raisons qui restent encore obscures, les patients soudanais semblent développer des titres d'anticorps contre rK39 plus faibles que les patients indiens (Chappuis *et al.*, 2006). De plus, nos données suggèrent que l'ICT rK39 peut être plus spécifique que l'IFI et l'ELISA dans les milieux où la LV est endémique et serait un test de confirmation utile pour la LV chez les patients présentant une maladie cliniquement confirmée. Le test ICT rK39 présente plusieurs avantages majeurs par rapport à IFI et ELISA sur le terrain : il est très simple, rapide et facile à conduire et ne nécessite aucun équipement spécial. Il peut être conservé à température ambiante. La lecture des résultats est aussi facile et l'interprétation est très simple. En fait, le test semble être la meilleure méthode pour le diagnostic des LV dans des régions fortement endémiques. La facilité et la rapidité d'utilisation d'ICT rK39 sont particulièrement importantes dans un environnement tel que le Maroc rural, où les prélèvements de moelle osseuse ne peuvent être effectués que par quelques praticiens. Peu de laboratoires peuvent effectuer l'IFI et/ou l'ELISA, et les déplacements vers un centre de référence sont difficiles. En outre, nos données suggèrent que l'ICT rK39 pourrait être plus spécifique que les IFI et ELISA. Finalement, le test ICT rk39 est une innovation importante dans le diagnostic de la LV car il permet un diagnostic rapide, simple et peu coûteux.

En conclusion, la performance globale du test rk39 à jauge rapide a obtenu des résultats supérieurs à ceux des tests ELISA et IFAT avec une sensibilité et une spécificité de (95,8%) et (100%) respectivement. En outre, le test immunochromatographique à bandelette rk39 est un test de diagnostic non invasif, rapide, facile à réaliser et peu coûteux à utiliser dans les établissements de santé éloignés. La détection précoce des cas suivie d'un traitement adéquat est également essentielle au contrôle de la LV, ce qui aura un impact économique important, et ce, en réduisant le coût et la durée de l'hospitalisation. Toutefois, les résultats négatifs chez les patients très soupçonnés sont contrôlés par un autre test de diagnostic direct.

### III. Étude de la prévalence du portage asymptomatique dans la province de Taounate

Au Maroc, peu d'études ont été menées auparavant pour déterminer la présence et la prévalence des cas de LV asymptomatiques, malgré l'importance de ces données pour compléter le tableau épidémiologique et comprendre l'histoire naturelle de la maladie.

Taounate, est l'une des zones urbaines du Maroc où la population risque de développer une LV. Il est fortement recommandé d'adapter un suivi régulier afin d'identifier les individus asymptomatiques infectés par *L. infantum*. Cette approche permettrait d'évaluer la force de transmission de la maladie et l'immunité du portage asymptomatique, ainsi de déterminer les faux positifs pour d'autres maladies.

Dans cette étude, nous avons déterminé la prévalence du portage asymptomatique par l'utilisation de deux méthodes de diagnostic la qPCR et le WB, ainsi que l'évaluation des performances de ces deux techniques.

Les résultats de cette étude ont confirmé l'existence des cas asymptomatique de LV avec une prévalence de 48,6% par la méthode WB et de 58,5% par la qPCR. Ces résultats sont en concordance avec ceux menés par (Papadopoulou *et al.*, 2005; Mary *et al.*, 2006) qui ont montrés que dans le cas de *L. infantum*, le portage asymptomatique chez l'Homme représente selon les études de 0,5 à 58% dans le Bassin Méditerranéen, et de 0,05 à 73,4% en Amérique du Sud (Passos *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2010). Dans le Sud de la France, la prévalence du portage asymptomatique est évaluée à 16% par des méthodes sérologiques mais atteint 58% par PCR (Mary *et al.*, 2006).

La prévalence du portage asymptomatique de la LV n'a montré aucune différence significative entre les sexes. Ces résultats sont conforme aux études menées au Brésil par Moreno *et al.*, 2006 et de Oliveira *et al.*, 2008. De même, aucune association significative avec l'âge n'a été trouvée. En Turquie, Sakru *et al.*, 2007 ont constaté qu'environ 83 % des infections asymptomatiques concernaient des personnes adultes. Cependant, une étude menée par Romero *et al.*, 2009, et Topno *et al.*, 2010 a trouvé une corrélation positive entre l'âge et la prévalence du VL asymptomatique. Cela est principalement dû au fait qu'une plus longue période d'exposition dans la zone endémique augmente les chances de contracter cette infection (Romero *et al.*, 2009).

Selon notre étude, la prévalence au niveau du secteur Galaz était nettement élevée avec, 71,2% et 60,5% par la qPCR et par le WB respectivement, comparativement à celle trouvée à Bouadel, qui était respectivement de 28,8% et 39,5% par la qPCR et le WB. On déduit que la prévalence du portage asymptomatique varie selon la localité d'étude et la méthode de diagnostic utilisée. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Bhattarai *et al.*, 2009 ; Hasker *et al.*, 2013 qui ont montré que dans le cas de

*L. donovani*, l'existence d'un portage asymptomatique d'une fréquence allant de 6,2 à 20,8% variant selon les régions étudiées et les outils employés (Bhattarai *et al.*, 2009 ; Hasker *et al.*, 2013).

La proportion de porteurs asymptomatiques dépend donc des zones géographiques considérées, mais aussi des tests de détection employés.

Nous avons constaté que la qPCR est plus efficace dans l'identification des cas infectés par rapport au test sérologique WB car sur un total de 177 des participants en bonne santé, seulement 86 (48,6%) étaient positifs avec le WB, contre 104 (58,5%) positifs par qPCR.

En général, l'amplification de l'ADN kinétoplastique et la détection d'anticorps spécifiques par Western Blot sont plus sensibles que les autres méthodes de détection, telles que l'intradermo-réaction à la leishmanine ou les tests d'immuno-fluorescence (Michel *et al.*, 2011). Ainsi, afin d'évaluer la fréquence du portage asymptomatique on a eu recours à des méthodes plus sophistiquées d'ordre moléculaire. Néanmoins, l'importance du portage asymptomatique resterait sous-estimée dans de nombreuses zones endémiques.

Suite à une première infection asymptomatique ou une leishmaniose viscérale guérie, les leishmanies persisteraient en catimini du système immunitaire de l'hôte. Cela expliquerait, entre, autres, la résistance à la ré-infection chez les sujets asymptomatiques. En effet, la présence de quelques leishmanies vivantes conduirait à une stimulation continue du système immunitaire inné et adaptatif, et pourrait contribuer au maintien de cellules T CD4+ et CD8+ mémoires protectrices (Bogdan, 2008).

Cependant, la persistance parasitaire et le portage asymptomatique peuvent également s'avérer fortement néfastes. En effet, la souche de leishmanies incriminée ainsi que les prédispositions génétiques des sujets conditionnent partiellement l'expression de la maladie, leur âge et leur statut immunologique. Ainsi, lorsque le statut immunologique des porteurs asymptomatiques évolue, ceux-ci peuvent développer une forme patente ultérieure parfois jusqu'à 5 ans après un séjour en zone endémique (Rosenthal *et al.*, 2000), ou une rechute après une leishmaniose viscérale guérie (Mary *et al.*, 2006; Bourgeois *et al.*, 2008).

Parmi les facteurs de risque les plus fréquentes de réactivation parasitaire on note :

- L'immunodéficience induite par le VIH occasionne l'apparition de formes patentes ou de formes chroniques actives, parfois associée à une localisation inhabituelle des leishmanies (Peters *et al.*, 1990; Kubar *et al.*, 1998; Desjeux et Alvar, 2003; Colomba *et al.*, 2009; Bourgeois *et al.*, 2010).
- Les traitements immunosuppresseurs administrés dans le cas de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïdes (Pittalis *et al.*, 2006; Molto *et al.*, 2010) ou une immunosuppression iatrogène dans le cadre d'une greffe d'organe (Basset *et al.*, 2005; Xynos *et al.*, 2009). En conséquence, il est recommandé dans ce dernier cas, de rechercher un portage asymptomatique possible des leishmanies, à la fois chez le donneur et le receveur d'organe, afin d'éviter le risque de réactivation chez le receveur, ainsi

que le risque d'une primo-infection par le greffon infecté du donneur (Basset *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2012).

- La pauvreté et la malnutrition sont également des facteurs de risque de réactivation des leishmanies (Alvar *et al.*, 2008; Boelaert *et al.*, 2009), ce qui pourrait expliquer en partie les flambées épidémiques de kalaazar durant les épisodes de famine et de guerre civile. Par contre, il arrive occasionnellement que des réactivations parasitaires surviennent chez des sujets apparemment immunocompétents (Colomba *et al.*, 2004; Lagadinou *et al.*, 2013). Sur une cohorte de sujets asymptomatiques suivis en Inde, 69 % ont présenté un kalaazar dans l'année suivant leur recrutement. Une prophylaxie des leishmanioses latentes a donc été proposée comme une piste pour l'éradication de la leishmaniose viscérale (Singh *et al.*, 2002).

Le portage asymptomatique des leishmanies n'est donc pas l'épiphénomène autrefois soupçonné, et il semble aujourd'hui important de contrôler la fréquence des porteurs asymptomatiques, qui constituent des sujets à hauts risques pour l'apparition d'une leishmaniose viscérale patente, mais également un réservoir potentiel de leishmanies (Michel *et al.*, 2011).

L'évaluation des connaissances de la population en termes de la maladie de LV et de sa transmission, a montré que la majorité des personnes ne semble avoir aucune connaissance sur le mode de transmission de cette maladie. En effet, deux personnes seulement sur 177 ont déclaré qu'il s'agit de piqûres d'insectes ressemblant à des moustiques. Cependant, tout en ignorant comment le chien intervient dans la transmission de la maladie. Cela, indique que les connaissances sont très limitées à ce sujet.

Il ressort des résultats de l'étude que le rôle principal des chiens réside dans le gardiennage des foyers et du troupeau. Ce service explique le fait que le chien est considéré dans la majorité des cas comme indispensable dans le foyer. La présence de ces chiens constitue un facteur important dans la propagation des maladies dans la région d'étude. Cependant, des travaux effectués au Maroc ont montré que les vrais chiens errants ne représentent en fait qu'une faible proportion de la population canine totale et que la grande majorité des chiens à propriétaires sont en divagation pendant la majeure partie de la journée (Ministère d'Agriculture, 1994). Le rôle des chiens errants dans la transmission de la leishmaniose a été rapporté par Cortes *et al.* (2012), Miro *et al.* (2007), et Martin-Sanchez *et al.* (2009).

L'existence d'insectes piqueurs la nuit est jugée comme un vrai problème pour les personnes interrogées. Cette abondance d'insectes piqueurs la nuit est en partie liée à l'existence des Oueds dans la région concernée par notre enquête. D'autant plus que le caractère agricole de la région (importance de l'irrigation) et la nature de l'habitat offrent un milieu favorable à la reproduction des phlébotomes. Ces insectes sont plus nombreux pendant la période sèche de l'année, c'est à dire durant l'été.

La LV est méconnue de la part de la population, d'où le grand intérêt de mener des campagnes de sensibilisation par tous les média (documentaires, journaux, revues, réseaux sociaux...), également, en

intégrant la lutte contre les épidémies telles la leishmaniose dans le programme scolaire. Ceci est un chantier de grandes potentialités pour les différentes ONG.

## **Conclusion générale et perspectives**

La LV humaine évolue à bas bruit dans la majorité des pays du pourtour méditerranéen. Au Maroc, la LV est une zoonose connue depuis 1913, c'est une parasitose à déclaration obligatoire depuis 1921 et constitue un réel problème de santé publique.

Les résultats de l'étude des aspects épidémiologique de la LV pendant la période 1990 à 2019, publiés en partie en 2017, montrent que la LV sévit au nord du Maroc sous sa forme méditerranéenne infantile. La majorité des enfants atteints avaient moins de cinq ans et provenaient de zones démunies. Nous avons constaté une légère baisse des cas recensés de leishmaniose viscérale au Maroc et cela, grâce au programme national de lutte contre les leishmanioses établi par le Ministère de la Santé et dont le support technique et le LNLL de l'INH. Ce LNLL a permis l'instauration et la codification des différentes actions de lutte et d'un système d'information permettant le suivi de la situation épidémiologique et en particulier le degré de réalisation des différentes actions de lutte. Malgré les résultats obtenus avec ce programme, il faut encourager les différents participants afin de maintenir et renforcer d'avantage l'éradication de ce fléau. L'identification de l'espèce responsable de cette maladie par PCR-Lei 70 montre qu'il s'agit toujours du *L. infantum*.

Pour une meilleure surveillance épidémiologique de cette zoonose et une bonne prise en charge des malades, une collaboration intersectorielle doit être envisagée entre les différents intervenants: ministère d'intérieur, ministère de la santé et ministère de l'agriculture.

Bien qu'invasive la recherche du parasite par l'examen direct de la moelle osseuse, reste un moyen de diagnostic de certitude de cette affection, d'où la nécessité d'introduire une méthode alternative.

Notre étude, la première menée au Maroc et dont les résultats ont fait l'objet d'une publication, à évaluer les performances du TDR immunochromatographie rk39 par rapport aux méthodes existantes dans un but de diagnostic précoce des cas de la LV. Les résultats obtenus et comparés à ceux de la littérature montrent l'intérêt de l'application de ce test sérologique comme outil de diagnostic. C'est un test facile à manipuler, rapide, peu coûteux et dont les résultats sont reproductibles. Le réactif peut être conservé à température ambiante et utilisé même dans les conditions de terrain constituant ainsi un test de diagnostic de première ligne en zone rurale. Son protocole est simple et ne nécessite aucune formation préalable de l'opérateur.

L'étude de prévalence dans la province de Taounate a montré l'existence du portage asymptomatique avec une proportion très importante qui peut atteindre 71,2 % dans certaine localité. Cela montre que le portage asymptomatique est la forme clinique de leishmaniose la plus fréquemment retrouvée. Selon les

techniques de dépistages utilisées, la prévalence peut aller de 28,8% à 71,2%. Malgré cette forte prévalence très peu d'étude ont été menées dans ce sens.

Les connaissances des habitants sur la leishmaniose restent faibles et limitées à deux personnes qui ont déjà entendu parler de la maladie ou l'ayant constaté de vue. Cela montre que la leishmaniose est méconnue dans les douars étudiés. Une meilleure connaissance de la maladie, de la transmission et de la dissémination du parasite ainsi que de sa survie chez l'hôte s'avère nécessaire.

Les recommandations que nous pouvons proposer à l'issue de notre travail sont :

- Continuer l'étude épidémiologique afin de mieux comprendre la situation et de délimiter avec plus de précision, les foyers de la leishmaniose viscérale en vue d'optimiser le programme de lutte en renforçant les actions de dépistage et de lutte.

- poursuivre l'étude de l'évaluation des performances de l'immunochromatographie en testant un grand nombre des échantillons sériques,

- renforcer l'équipement des centres de santé dans les zones à haut risque en moyens de diagnostic de la leishmaniose pour permettre une prise en charge précoce de la maladie,

- utiliser l'immunochromatographie rapide rk39 dans le diagnostic précoce de la leishmaniose viscérale dans les zones rurales démunies,

- élargir l'étude de la prévalence du portage asymptomatique aux autres communes de la province de Taounate et aux autres provinces à risque,

- de suivre les sujets asymptomatiques, et de séquencer le génome complet du parasite à partir de l'ADN des cas positifs, afin de l'identifier.

- isolation des souches issues des porteurs asymptomatiques.

- sensibiliser et informer la population du danger de la LV que représentent le chien et le phlébotome dans la transmission de la leishmaniose, et par la même occasion, dans celles d'autres entités pathologiques graves comme la rage et l'hydatidose,

## **Références bibliographiques**

- Adel A, Boughoufalah A, Saegerman C, De Deken R, Bouchene Z, Soukehal A, Berkvens D, Boelaert M.**, (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. PLoS One 9 (6):0099207.
- Agoumi A, Rouichi M, Lahrech T.**, (1991) : Mise au point sur le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale humaine au Maroc (1957-1989). Maroc Med. XIII, 1, 5-10.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D.**, (2017). *Leishmania* Infections: Molecular Targets and Diagnosis. Molecular Aspects of Medicine 57 :1-29.
- Alam MJ, Rahman KM, Asna SM, Muazzam N, Ahmed I, Chowdhury MZ.**, (1996). Comparative studies on IFAT, ELISA and DAT for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Bangladesh. Bangladesh Med Res Counc Bull. 22: 27-32.
- Amrani Hassani M, Lahlou H, Alami M, Filali Baba A, El Youssfi G, Ismaili L, Chaouki S, Atmani S, Hida M.**, (2011). Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile. Elsevier Masson SAS, Revue Francophone des Laboratoires 429 :55-60.
- Amro A, Hamdi S, Lemrani M, Mouna I, Mohammed H, Mostafa S, Rhajaoui M, Hamarsheh O, Schönian G.**, (2013). Moroccan *Leishmania infantum*: genetic diversity and population structure as revealed by multi-locus microsatellite typing. PLoS One.8 (10): e77778.
- Aoun K, Ben Abda I, Habboul Z, Lemrani M, Harrat Z, Bouratbine A.**, (2013). Visceral leishmaniasis in north african countries. PUJ 6 (1):35–38.
- Aoun K, Bouratbine A.**, (2014). Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. EDP Sciences 21: 14
- Arroub H, Alaoui A, Lemrani M, Habbarin K.**, (2012). Cutaneous leishmaniasis in founjamaa (Azilal, Morocco): micro-environmental and socio-economical risk factors, Journal of Agriculture, Forestry and the Social Sciences, vol. 8, pp. 10–16.
- Attar ZJ, Chance ML, Safi S, Carney J, Azazy A, El Hadi M, Dourado C, Hommel M.**, (2001). Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral Leishmaniasis. Acta Trop 78:11-16
- Azas N, Di Giorgio C, Delmas F, Gasquet M, Timon-David P.**, (2001). No evidence of oxidant events in amphotericin B cytotoxicity versus *L. Infantum* promastigotes. Parasite (4) : 335–341. doi:10.1051/parasite/2001084335.
- Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio, D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR., Reed SG.**, (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis 173: 758–761.
- Barrot AH.**, (2011). Les leishmanioses au Maroc : Eco-Epidémiologique, évaluation et facteur de risque.

- Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, Lachaud L, Bastien P, Dedet JP.**, (2005). Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect* 7:1370–1375.
- Basset D, Pratlong F, Ravel C, Dereure J, Dedet JP.**, (2001–2003). Les leishmanioses en France: synthèse des données recueillies de 2001 à 2003 au Centre national de référence des *Leishmania*, Autres zoonoses et encéphalopathies subaiguës spongiformes, Surveillance nationale des maladies infectieuses, 1–4.
- Bastien P, Lachaud L.**, (2016). Leishmanioses : biologie, clinique, et thérapeutique, EMC maladies infectieuses vol 13N°3.
- Bautista G, Ramos A, Gil S.**, (2012). Visceral leishmaniasis in hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int* 25:e83-85.
- Belkaid Y, Butcher B, Sachs DL.**, (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur. J. Immunol* 28: 1389-1400.
- Benbella I, Aich A, Elkhiyat M, Khalki H, Khermach A, Bergui A, Tlemçani I, Amrani Hassani M.**, (2016). La leishmaniose viscérale chez l'adulte à propos de douze cas (*Pan Afr Med J* 23: 194
- Benyahia D.**, (2008). Mise au point de la leucocytoconcentration et son application dans le diagnostic de la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale humaine, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale.
- Berchi S, Bounamous A, Louadi K, Pesson B.**, (2007). Différenciation morphologique de deux espèces sympatriques: *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911 et *Phlebotomus longicuspis Nitzulescu* 1930 (diptera : Psychodidae). *Ann. Soc. entomol. Fr. (n.s)*, 43 (2): 201-203.
- Berman JD, Gallalee JV, Best JM.**, (1987). Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid  $\beta$ -oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*, 36:197-201.
- Bhattarai NR, Van der Auwera G, Khanal B, De Doncker S, Rijal S, Das ML, Uranw S, Ostyn B, Praet N, Speybroeck N, Picado A, Davies C, Boelaert M, Dujardin JC.**, (2009). PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 14(4):404-11.
- Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Peeling RW.**, (2007). Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology* 5 (11):3039.
- Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Aseffa A, Mbui J, Menten J, Desjeux P, Peeling RW.**, (2008). Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the

freeze-dried DAT, rK39 strip test and KATex in East Africa and the Indian subcontinent. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102:32–40.

**Boelaert M, Meheus F, Sanchez A, Singh SP, Vanlerberghe V, Picado A, Meessen B, Sundar S.,**(2009). The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. Trop Med Int Health 14:639-644.

**Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Le Ray D, Koirala S, Van der Stuyft P.,** (2004). A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1: 72-7.

**Bogdan C.,** (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cellular Microbiology 10(6) :1221–1234.

**Boucekoua M, Trabelsi S, Ben Abdallah T, Khaled S.,** (2014). Visceral leishmaniasis after kidney transplantation: Report of a new case and a review of the literature. Elsevier Inc, Transplantation Reviews 28:32–35.

**Bourdoiseau G, Denerolle PH.,** (2000). Traitement de la leishmaniose canine Actualités. Revue Méd. Vét., 151: 395-400.

**Bourdoiseau G.,** (2000). Maladies parasitaires disséminées, la leishmaniose. InParasitologie clinique du chien, Ed. NEVA, Créteil, 325-362.

**Bourée P, Bisaro F,Alireza E.,** (2014). Les leishmanioses : zoonose aux multiples aspects. Option Bio 502 : 16-19.

**Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L.,** (2010). ‘Active chronic visceral leishmaniasis’ in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. HIV Med 11:670–3.

**Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P.,** (2008). Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. J Acquir Immune Defic Syndr 48: 13–19.

**Bourrée P, Ensaf A.,** (2008). De nouveaux tests simples de diagnostic des leishmanioses. Option bio 397:1-2.

**Boussaa S, Boumezzough A, Remy PE, Glasser N, Pesson B.,** (2008). Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Southern Morocco. Acta Tropica 106(3):184-189.

**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. Thèse Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l’université Louis Pasteur Strasbourg I.

- Brandonsio O, Fumarola L, Maggi P, Cavalerfe R, Spinelli R, Pastore G.,** (2002). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.* 21(6): 461-4.
- Buffet PA, Rosenthal E, Gangneux J.P, Lightburne E, Couppié P, Morizot G, Lachaud L, Marty P, Dedet JP.,** (2011). Traitement des leishmanioses en France: proposition d'un référentiel consensuel. Elsevier Masson SAS, Presse Med Tome 40 n°2:173–184.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M.,** (2018). Leishmaniasis. *Lancet*392:951–970
- Cadi Soussi M, Sabri M.,** (2001). Apport de l'identification enzymatique dans les leishmanioses au Maroc : à propos de 33 isolats. *Les Cahiers du Médecin* 4, 47-49.
- Carré N, Collot M, Guillard P, Horellou M, Gangneux JP.,** (2010). La leishmaniose viscérale Épidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *J Pharm Clin* 29 (3) : 121-48.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R.,** (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 68: 321–324.
- Caryn B, Shambhu NJ, Anand BJ, Thakur GD, Mahendra BB.,** (2000). Use of the recombinant k39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 63(3, 4): 153–157
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M.,** (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 333(7571):723.
- Chapuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M.,** (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control *Nature Publishing Group,* 5: 873-882.
- Colomba C, Saporito L, Vitale F, Reale S, Vitale G, Gasuccio A, Tolomeo M, Maranto D, Rubino R, Di Carlo P, Titone L.,** (2009). Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infect. Dis* 9:199
- Colomba C, Scarlata F, Salsa L, Frasca Polara V, Titone L.,**(2004). Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Report of two cases relapsed after specific therapy]. *Infez Med* 12:139-143.
- Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L.,**(2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet. Parasitol* 189:189–196.
- Costa CH, Gomes RB, Silva MR, Garcez LM, Ramos PK, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH.,** (2000). Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182(3):997-1000. 38.

- Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ.**, (2002) Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 66(4):334-7.
- De Colmenares M, Portus M, Riera C, Gallego M, Aisa MJ, Torras S, Munoz C.**, (1995). Detection of 72-75KD fractions of leishmania antigen in urine of patients with visceral Leishmaniasis. Short report. Am.J.Trop.Med.Hyg.52:427-428.
- Deane LM, Deane MP.**, (1962). Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop São Paulo 4(3):198-212
- Dedet JI.**, (1994). Epidémiologie mondiale de la leishmaniose viscérale Médecine et Maladies infectieuses, 24,62-65.
- Dedet JP, Carme B, Desbois N, Bourdoiseau G, Lachaud L, Pratlong F.**, (2013). Epidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. Presse médicale 42 : 1469-1481
- Dedet JP.**, (2000). Les leishmanioses : actualités. La Presse Médicale 2000 ; 18 :1019-26.
- Dedet JP.**, (2009). Leishmanies, leishmanioses : Biologie, clinique et thérapeutique. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladie infectieuse 8 :506-A-10,
- DELM.**, (2010). Lutte contre les leishmanioses Guide des activités, Programme de lutte contre les leishmanioses. Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies. Ministère de la santé.
- DELM.**, (2010). Moroccan Ministry of Health, 2010. Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires, Direction épidémiologique de lutte contre les maladies, Rabat, Maroc, 34–49.
- DELM.**, (2012). Santé en chiffre 2012, Programme de lutte contre les leishmanioses 4-6.Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies.
- DELM.**, (2013). Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. Santé en chiffre 2013, Programme de lutte contre les leishmanioses, Année2013 ; 7-9.
- DELM.**, Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies-Rabat : Santé en chiffre maladies parasitaires 2011-2016.
- De Oliveira AL, Paniago AM, Sanches MA, Dorval ME, Oshiro ET, et al.** (2008). Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Cad Saude Publica 24: 2827-2833.
- Desjeux P, Alvar J.**, (2003) Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol 97(1): 3–15.
- Desjeux P.**, (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect 27:305–18.

- Dujardin JC, Campino L, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M.** (2008). Spread of vectorborne diseases and neglect of Leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 14(7):1013-8.
- Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Munck NA, Viemann D, Varga G, Muller-Tidow C, Schuberth HJ, Roth J, Sunderkotter C.** (2010). Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 6:e1000871.
- Elbaroudi H.** (2014). *Eco-épidémiologie de la leishmaniose viscérale au Maroc. Thèse de pharmacie n°26 Rabat.*
- Essabbah Aghuir N, Toumi A, Loussaif C, Gorcii M, M'rad S, Ben Brahim H, Chakroun M, Babba H.** (2013). La leishmaniose viscérale de l'adulte immunocompétent. A propos de six cas. *Pathologie biologie* 61:54-58.
- Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebbali M.** (2008). Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 102(7):577-583.
- Faucher B, Piarroux R.** (2011). Actualités sur les leishmanioses viscérales. *La revue de médecine interne* 32:544-551.
- Filippi C, Malherbe L, Julia V, Glaichenhaus N.** (2001). L'immunité contre les leishmanies *médecine/sciences*, 17: 1120-1128.
- Franke CR, Staubach C, Ziller M, Schlüter H.** (2002). Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96:236-241.
- Gangneux JP, Belaz S, Robert-Gangneux F.** (2015). Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. Elsevier Masson SAS, *Journal des Anti-infectieux* 17:25-28.
- Gao CH, Yang YT, Shi F, Wang JY, Steverding D, Wang X.** (2015). Development of an immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis based on detection of a circulating antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 9(6): e0003902.
- Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT.** (1996). Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Para. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 165-80.
- Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A.** (2006). Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission *Acta. Tropica* 97(3):346-351.
- Guessous-Idrissi N, Hamdani A, Rhalem A, Riyad M, Sahibi H, Dehbi F, Bichichi M, Essari A, Berrag B.** (1997). Epidemiology of human visceral leishmaniasis in Taounate, a northern province of Morocco. *Parasite* 2, 181-185.

- Ghatee MA, Sharifi I, Haghdoost A, Kanannejad Z, Taabody Z, Hatam Z, Abdollahipanah A.,**(2013). Spatial correlations of population and ecological factors with distribution of visceral leishmaniasis cases in southwestern Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, vol. 50, no. 3, pp. 179–87.
- Gulam MD.,** (2010). Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. *Parasites & Vectors*. 3:114.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN.,** (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology* 27(9), 403–409.
- Harrat Z, Addadi K, Belkaid M, Tabet-Derraz O.,** (1992). La leishmaniose viscérale en Algérie : Recensement des de leishmaniose viscérale (Période 1985-1990). *Bulletin de la société de pathologie exotique* 85 : 296-301.
- Hasker E, Kansal S, Malaviya P, Gidwani K, Picado A, Singh RP, Chourasia A, Singh AK, Shankar R, Menten J, Wilson ME, Boelaert M, Sundar S.,** (2013). Latent Infection with *Leishmania donovani* in Highly Endemic Villages in Bihar, India. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(2):e2053.
- Hé S, Roux X, Morand C, Soullié B, Koeck JL.,** (2009). Leishmaniose viscérale et PCR: de la confirmation diagnostique à l'origine du lieu de contamination. *La Revue de médecine interne* 30S S433.
- IRMA.,** (2017). Information Resources Management Association, Public Health and Welfare: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications, IGI Global, Pennsylvania, PA, USA.
- Izri MA, Deniau M, Briere C, Rivollet D, Petithory JC, Houin R, et Rousset JJ.,** (1996). Leishmaniasis in AIDS patients: results of Leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnostic. *Bulletin of the World Health Organisation* 74(1): 91-93.
- Jabourri Y.,** (2013). Profil épidémiologique, thérapeutique et évolutif de la leishmaniose cutanée (à propos de 52 cas).
- Kahime K, Boussaa S, Bounoua L, Fouad O, Messouli M, Boumezzough A.,** (2014). Leishmaniasis in Morocco: diseases and vectors. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4:S530–S534.
- Killick-Kendrick R.,** (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology* 17:279-289.
- Kubar J, Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, Staccini P, Caroli-Bosc C, Le Fichoux Y.,** (1998). Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD41 T lymphocytes counts. *AIDS* 12:2147–2153.
- Kumari S, Ram VJ.,** (2002). Visceral leishmaniasis: clinical features, pathology, diagnosis and chemotherapeutic developments. *Drug News Perspect* 15: 417-31.

- Lahouiti K, Alami AEO, Hmamouch A, Bekhti K.**, (2014). Phototropism of sand flies species (diptera: psychodidae) collected in a rural locality in Central Morocco,” Journal of Parasitology and Vector Biology, vol. 6, no. 5, pp. 66–74.
- Lagadinou M, Dimitropoulou D, Assimakopoulos SF, Davoulos G, Marangos M.**,(2013). Recurrent visceral leishmaniasis in an immunocompetent patient: a case report. J Med Case Rep 7:68.
- Lagardere B.**, (2010). Les Difficultés diagnostiques du Kala-Azar en France Rev. Prat. 1983, 33, 1249-1251. Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement, service de parasitologie-mycologie, hôpital l’Archet et faculté de médecine, Nice.
- Lakhdar Idrissi M, El Ouardi M, Atmani S, Elarqam L, Bouharrou A, Hida M.**, (2007). La leishmaniose viscérale infantile : à propos de 209 cas. Journal de pédiatrie et de puériculture 20:136–41.
- Lasri F.**, (2009). Contribution à l’étude de l’épidémiologie de la leishmaniose canine dans la province de Sidi Kacem (Cercles de Ouezzane et de HadKourt), Thèse pour l’obtention du doctorat vétérinaire, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat.
- Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J.**, (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. J Clin Microbiol 37, 1953–1957
- Levine ND, Corliss JO, Cox FFG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Avra J, Wallace FG.**, (1980). A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool 27: 37-58.
- Lima de VMF, Fattori KR, de Souza F, Eugênio FR, Santos dos PSP, Rozza DB, Machado GF.**, (2012). Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. Vet. Parasitol. 184:147–153.
- Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Oborni MK, Hora KA, Ayala F, Miles FA.**, (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. PNAS 104 (22): 9375–9380.
- Martin-Sanchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sanchez C, Baron S, Diaz V, Morillas-Marquez F.**,(2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg. Infect. Dis 15:795–798.
- Marty P, Le Fichoux Y.**, (1988). Epidémiologie de la leishmaniose dans le Sud de la France. Prat. Méd. Chir. Anim. Cie. Numéro spéciale leishmaniose, 5, 11-15.
- Marty P, Pomares-Estran C, Hasseine L, Delaunay P, Haas H, Rosenthal E.**, (2009). Actualités sur les leishmanioses en France. Archives de pédiatrie 16:96-100.

- Marty P.**, (2005). Les Leishmanioses viscérales : Epidémiologie et Diagnostic. Equipe de Recherche sur les Leishmanioses (ERLEISH).Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis et Centre Hospitalier Universitaire de Nice. <http://www.infectiologie>.
- Marty P.**, (2007). La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum*, mise au point Intérêt des tests de diagnostic rapide : IT Leish et ID-PAGIA Leishmaniasis®. *Med Trop* 67: 79-85
- Marty P.**, (2008). Quelle procédure diagnostique pour quelle leishmaniose.
- Marty P.**, (2010). Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement. *La Lettre de l'Infectiologue* Tome XXV - n° 5 - septembre-octobre 1-5.
- Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H.**, (2006). Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 75:858–863
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA.**, (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
- Mbati PA, Githure JI, Kagai JM, Kirigi G, Kibati F, Wasunna K, Koech DK.**, (1999). Evaluation of a standardized direct agglutination test (DAT) for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Ann Trop Med Parasitol* 93:703-10.
- Meunier A.**, (2007). Etude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l'influence des facteurs environnementaux (*en France depuis 1965, dans le sud-ouest en 2006*). Thèse Méd. Vét., Lyon, 106p.
- Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P.**, (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop* 119(2-3):69-75
- Ministère de la Santé.**, (2010). Direction de l'épidémiologie et de lutte contre les maladies. *Etat d'avancement des programmes de lutte contre les maladies parasitaires*. Rabat, Maroc. <http://www.sante.gov.ma/departements/delm/index-delm.htm>
- Minodier P, Piarroux R, Garnier J-M, Unal D.**, (1999). Leishmaniose viscérale méditerranéenne : physiopathologie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Presse Med* 28: 33-9
- Miro G, Montoya A.**, (2008). Evaluation of the efficacy of topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology* 143:375-379.
- Moreno EC, Melo MN, Lambertucci JR, Serufo JC, Andrade AS, et al.** (2006). Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 421-427.
- Molto A, Mateo L, Lloveras N, Olivé A, Minguez S.**, (2010). Visceral leishmaniasis and macrophagic activation syndrome in a patient with rheumatoid arthritis under treatment with adalimumab. *Joint Bone Spine* 77:271–273.

- Moncef AH, Lahlou H, Alami M, Filali Baba A, El Youssfi G, Ismaili L, Chaouki S, Atmani S, Hida M.** Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile: À propos de 31 cas diagnostiqués sur 10 mois au laboratoire d'hématologie du CHU Hassan II de Fès (Maroc), Volume 2011, Issue 429 :55-60.
- Moral L, Rubio ME, Moya M.,** (2002). A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti Region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 96:129–132.
- Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chiocola VL.,** (2013). Spatial Distribution and Population Genetics of *Leishmania infantum* Genotypes in São Paulo State Brazil, Employing multilocus Microsatellite Typing Directly in Dog Infected Tissues 18:48–59.
- Nadau Q.,** (2005). Étude préliminaire de l'utilisation de la protéine lack dans le test d'intra-dermoréaction de la leishmaniose canine. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France. 22p
- Najma S.,** (2008). La leishmaniose viscérale (Epidémiologie et actualité thérapeutique) Thèse de pharmacie n°32 Rabat.
- Nejjar R, Lemrani M, Malki A, Ibrahimi S, Amarouch H, Benslimane A.,** (1998). Canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* MON-1 in northern Morocco. Parasite 5, 325-330.
- Niang AA, Geoffroy B, Angel G, Trouillet J, Killik-Kendrick R, Hervy J-P, Brunhes J.,** (2000). Les phlébotomes de l'Afrique de l'Ouest. Logiciel d'identification et d'enseignement, IRD édition.
- Nozzi M, Del Torto M, Chiarelli F, Breda L.,** (2014). Leishmaniasis and autoimmune diseases in pediatric age. Elsevier Inc, Cellular Immunology 292:9–13
- Nozzi M, Del Torto M, Chiarelli F, Breda L.,** (2014). Leishmaniasis and autoimmune diseases in pediatric age. Elsevier Inc, Cellular Immunology 292:9–13.
- Ntsama Abah FA.,** (2010). Leishmaniose canine : revue bibliographique générale et étude épidémiologique dans la province de Sidi Kacem. Thèse pour l'obtention du doctorat vétérinaire, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat.
- Nunes WDS, Araújo SR, Calheiros CML.,** (2010). Epidemiological profile of leishmaniasis at a reference service in the state of Alagoas, Brazil, from January 2000 to September 2008," Brazilian Journal of Infectious Diseases, vol. 14, no. 4, pp. 342–345.
- OMS.,** (2010). Série de rapports techniques N° 949. La lutte contre les leishmanioses, Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses.
- OMS.,** (2010). Série de rapports techniques N° 949. La lutte contre les leishmanioses, Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses.

- OMS.**, (2010). Technical report series, no. 949. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010, E World Health Organization, 2010, WHO Press, Switzerland. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf) (accessed on 23/05/2012).
- OMS.**, (2014) Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région de la Méditerranée orientale
- OMS.**, (2019). [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/246166/Fact-sheet-Leishmaniasis-Eng:06](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/246166/Fact-sheet-Leishmaniasis-Eng:06). Juni 2019
- Oryan and M. Akbari.**, (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, vol. 9, no. 10, pp. 925–932.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G.**, (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. J. Infect 50:53–60.
- Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM.**, (2005). Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol 12:1164–1167.
- Peace D.**, (2014). Leishmaniasis. Department of Paediatrics, Mater Dei Hospital, Tal-Qroqq Msida MSD 2090, Malta ; Journal of Infection 69, S10eS18.
- Pernot M.**, (2005) Les anticorps anti-β2 GP1 au cours de la leishmaniose. Thèse Méd. Vét., Lyon, n°17, 109p.
- Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimaraes-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R.**, (2006). Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol 146:124-132.
- Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson ADM, Pinching AJ.**, (1990). Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. Q. J. Med. New Ser 283:1101–1111.
- Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, Narciso P.**, (2006). *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid-treated patients. BMC Infect. Dis. 6, 177.
- Raquin E.**, (2010). Etude rétrospective de cas de leishmaniose canine à l'ENVA de 2000 à 2009. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France.

- Ready PD.**, (2008). *Leishmania* manipulates sandfly feeding to enhance its transmission. Trends Parasitol., 24 (2), in press.
- Reithinger R, Mohsen M, Leslie T.**,(2010). Risk factors for anthroponotic cutaneous leishmaniasis at the household level in Kabul, Afghanistan,” PLoS Neglected Tropical Diseases , vol. 4, no. 3, p. e639.
- Rhajaoui M.**, (2011). Les leishmanioses humaines au Maroc : une diversité nosogéographique, Pathologie Biologie 59:226–229.
- Rioux JA, Lanotte G, Croset H, Dedet JP.**, (1987). Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de leishmaniose canine vis-à-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Ann. Parasitol. Hum. Comp 47, 413-419.
- Rioux JA, Lanotte G.**, (1993). Apport de la cladistique à l’analyse de genre *Leishmania* Ross, 1903 Kinetoplastida-Trypanosomatidae. Corollaires éco-épidémiologiques Biosystema 8:79–90.
- Rioux JA.**, (2001). Trente ans de coopération Franco-marocaine sur les leishmanioses: Dépistage et analyse des foyers, facteurs de risque. Changements climatiques et dynamique noso-géographique. AAEIP 168, 90–101.
- Rispail P, Dereure J, Jarry D.**, (2002)., Risk Zones of Human Leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. Correlations between Vector Sand Flies, Bioclimatology and Phytosociology. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.103 97(4) : 477-483.
- Roberts LJ, Handman E, Foote SJ.**, (2000). Science, medicine, and future: leishmaniasis British Medical Journal. 321: 801-804.
- Romero HD, Silva Lde A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, et al.** (2009). Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. Am J Trop Med Hyg 81: 27-33.
- Ronat JB, Gueguen M.**, (2014). Journée de la Société de pathologie exotique du 28 mai 2014, Institut Pasteur, Paris. Tests de diagnostic rapide (TDR) en infectiologie tropicale. Quels besoins ? Quelles disponibilités ? Quelles bonnes pratiques ?. Bull. Soc. Pathol. Exot 1-6.
- Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA, Fichoux YL, Cassuto JP.**, (2000). HIV and leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of leishmania. Clin. Infect. Dis. 31:1093–1095.
- Rosenthal E, Marty P.**, (2009). Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. La revue de médecine interne 30: S24-S28
- Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME, Mosser DM.**, (1996). *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. Infect Immun 64: 2206-2215.

- Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuere F, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J.,** (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. BMC Microbiol 1:17.
- Sacks D, Noben-Trauth N.,** (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol. 2, 845–858
- Saporito L, M. Giammanco G, De Grazia S, Colomba C.,** (2013). Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. Elsevier Ltd, International Journal of Infectious Diseases 17:e572–e576.
- Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H.,** (2001). Development and application of ‘simple’ diagnostic tools for visceral leishmaniasis. Med Microbio Immunol. 190: 69–71.
- Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C.,** (2004) The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. Immunol Rev 201: 318–338.
- Sendino A, Barbado FJ, Mostaza JM, Fernández-Martin J, Larrauri J, Vázquez Rodríguez JJ.,** (1990). Visceral leishmaniasis with malabsorption syndrome in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med 89:673–675.
- Shankar AH, Titus EG.,** (1995). T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. J Exp Med 181 : 845-55.
- Sharma U, Singh S.,** (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J. Vector. Borne. Dis. 45: 255–272.
- Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, Wasunna KMA, Were JBO, Kasili SK, Mbugua JM, Kirigi G, Schaefer KU, Oster CN, Fleckenstein LL, Berman JD, Brewer TG, Roberts CR, Johnson AJ, Schuster BG.,** (1994). Phase 2 efficacy trial of an oral aminoquinolone (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases 19:1034-1039
- Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE.,** (2010). A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg 104:529–535.
- Singh S, Kumari V, Singh N.,** (2002). Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. Clin Diagn Lab Immunol 9:568-572.
- Singh S.,** (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis Indian J Med Res 123:311-330
- Skouri H, Ben Said M, El Omri H, Khelif A, Korbi S, Ennabli S.,** (1994). Kala-azar méditerranéen de l’adulte: A propos de quatre observations tunisiennes. Med. Med. Infect 24: 1165–1168.

- Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM.,** (2000). B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 164:3681-3688.
- Spellberg B, Edwards JE.,** (2001). Type1/type2 immunity and infectious diseases. *Clin. Infect. Dis* 32:76–102.
- Srivastava L.,** (1989). Comparative evaluation of serological tests in diagnosis of kala-azar. *Indian J Med Res.* 89: 265- 70.
- Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S.,** (2011). Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PloS One* 6: e19304.
- Sundar S, Rai M.,** (2002). Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis: clinical and diagnostic. *Laboratory Immunology* 951-958.
- Talbi FZ, El Ouali Lalami A, Janati Idrissi A, Sebti F, Faraj C.,** (2015). Leishmaniasis in Central Morocco: Seasonal Fluctuations of Phlebotomine Sand Fly in Aichoun Locality, from Sefrou Province. *Pathol Res Int*2015:1–4. doi:10.1155/2015/438749.
- Topno RK, Das VN, Ranjan A, Pandey K, Singh D, et al.** (2010). Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 83: 502-506.
- UMVF.,** (2014). Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)1-16.
- Van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J.,** (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 286–299.
- Van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J.,** (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 286–299.
- Wasserberg G, Abramsky Z, Kotler BP, Ostfeld RS, Yarom I, Warburg A.,** (2003). Anthropogenic disturbances enhance occurrence of cutaneous leishmaniasis in Israel deserts: Patterns and mechanisms. *Ecol Appl* 13:868–881.
- Wojtkowiak A.,** (2007). The investigations of the role of toll-like receptors (TLR) in host response to parasitic infection on the current background regarding TLR in mammals and the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Wiadomosci Parazytologiczne*53(3):203-211
- Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas NV.,** (2012). Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis* 15:956e9
- Zahidul Islam M, Itoh M, Mirza R, Ahmed I, Saifuddin Ekram ARM, Sader AH, Shamuzzaman SM, Hashiguchi Y, Kimura E.,** (2004). Direct agglutination test with urine samples for diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Am.J.Trop* 70(1):78-82.

**Zait H, Ferhani Y, Achir I, Hamrioui B.**, (2012). Étude de 71 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009. Elsevier Masson SAS, Médecine et maladies infectieuses 42 :119–125.

**Zijlstra E, Daifalla N, Kager P, Khalil E, El-Hassan A, Reed S, Ghalib H.**, (1998). rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Leishmania donovani infection. ClinDiagnLab Immunol 5:717–720.

**Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA.**, (1991). Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg. 85:474–476.

**Zougaghi L, Moutaj R, Chabaa L, Agoumi A.**, (2009). Leishmaniose viscérale infantile : profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. Elsevier Masson SAS, Archives de pédiatrie 16:1513–1518.

# **Annexes**

**Annexe 1 : Article 1** : Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis  
in Morocco (1990–2014): an update



## Epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Morocco (1990–2014): an update



Meryem Mniouil<sup>a,b,1</sup>, Hajiba Fellah<sup>a,b,1</sup>, Fatima Amarir<sup>c</sup>, Abdeslamd Et-touys<sup>d</sup>, Khadija Bekhti<sup>e</sup>, El Bachir Adlaoui<sup>a</sup>, Youssef Bakri<sup>d</sup>, Haddou Nhammi<sup>f</sup>, Abderrahim Sadak<sup>b</sup>, Faiza Sebti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> National Reference Laboratory of Leishmaniasis, Parasitology Department, National Institute of Hygiene, Rabat, Morocco

<sup>b</sup> Laboratory of Zoology and General Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Mohammed V University, Rabat, Agdal, Morocco

<sup>c</sup> Laboratory of parasitology and mycology, Institute of Nursing Professions and Health Techniques, Casablanca, Morocco

<sup>d</sup> Laboratory of Biochemistry and Immunology, Department of Biology, Faculty of Science, Mohammed V University, Rabat, Morocco

<sup>e</sup> Moroccan Ministry of Health, Epidemiological Direction of Fight Against Diseases, Parasitic Diseases Service, Rabat, Morocco

<sup>f</sup> Morocco Laboratory of Microbial Biotechnology, Sciences and Techniques Faculty, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fes, Morocco

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 July 2016

Received in revised form 21 October 2016

Accepted 22 October 2016

Available online 26 October 2016

#### Keywords:

Visceral leishmaniasis

*L. infantum*

Epidemiology

PCR- Lei70

Morocco

Phlebotomine sand flies

### ABSTRACT

Leishmaniases are parasitic diseases frequent in the Mediterranean Basin. Visceral leishmaniasis (VL) is a notifiable parasitic disease that increased in incidence in Morocco over the past few years and has recently emerged in several new foci, causing a public health problem in Morocco. The aim of this study is to describe the spatio-temporal distribution of VL in Morocco between 1990 and 2014 period in order to highlight important features and trends of VL and its epidemiology and to assess whether the activity of the unit reflects the situation of the disease at the national level and whether it could constitute an indicator of public health relevance. Two thousand four hundred and twenty one cases were reported in Morocco between 1990 and 2014 with an average annual reported incidence rate of 0.4 cases per 100,000 inhabitants. Before 1996 the average annual incidence of VL was 50 cases on average. After this date the number of cases increased and then remained stable with around 100–150 cases per year. Children whose age varies between 1 and 4 years old are the most affected with 1327 (74%) of total cases; nevertheless the adult starts to be affected by the disease. In 2000, 65% of positive cases of VL are concentrated at both northern regions: Taza-Al Hoceima- Taounate with 45% of cases, Tanger- Tetouan mainly represented by Chefchaoun with 20% of cases. The Fez-Boulemane region located in the center recorded 12% of cases. Throughout the years the map VL distribution has been progressively changed and spatial spread of the disease to the center is noted in 2007. 2014 has been marked by an even greater extension of the disease to the center and south of Morocco. Nationally in 2014, 34 of 75 provinces and prefectures are affected compared to 2000, when 22 out of 82 provinces and prefectures were affected. *Leishmania infantum* was identified the causative agent based on species- specific PCR-Lei70 assay. VL remains a sporadically endemic parasitic disease in Morocco with a progressive extension of its range of distribution. Such a situation would relate to the geographical succession of Phlebotomine sand fly vectors, the difficulty of actions against the canine population reservoirs of *L. infantum* and unfavorable socio-economic factors.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

**Annexe 2 : DOSSIER MEDICAL : Leishmaniose Viscérale Infantile (LVI)**

<b><u>1. Identité :</u></b>			
Nom et Prénom.....	N°-IP.....		
Date de naissance (âge).....	Sexe      F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>		
Origine.....	Tél.....		
Ville de résidence.....	Milieu      U <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/>		
Adresse.....			
Dated'hospitalisation.....	Délai 1 <sup>er</sup> signe-Hospitalisation.....		
Durée d'hospitalisation.....	Délai Hospitalisation-diagnostic.....		
Référé de : Non <input type="checkbox"/>		Autre hôpital <input type="checkbox"/> Privé <input type="checkbox"/>	
Oui <input type="checkbox"/> : Centre de santé <input type="checkbox"/>			
<b><u>2. Motif de consultation :</u></b>			
Syndrome fébrile <input type="checkbox"/>	Anorexie <input type="checkbox"/>	Asthénie <input type="checkbox"/>	
Augmentation du volume abdominal <input type="checkbox"/>	Pâleur <input type="checkbox"/>	Autres <input type="checkbox"/>	
<b><u>3. Examen physique :</u></b>			
Fièvre <input type="checkbox"/>	Pâleur <input type="checkbox"/>	Poids <input type="checkbox"/>	Lésions cutanées <input type="checkbox"/>
Splénomégalie <input type="checkbox"/>	Hépatomégalie <input type="checkbox"/>	Adénopathie <input type="checkbox"/>	Autres <input type="checkbox"/>
<b><u>4. Examen de laboratoire :</u></b>			
VS.....			
NFS : GR/mm <sup>3</sup> .....	; GB/mm <sup>3</sup> .....	; Hb/dl.....	
VGM.....	; PLT/mm <sup>3</sup> .....	; CCMH.....	
Protidémie..... g/l			
Medullogramme: Non fait <input type="checkbox"/>	Fait <input type="checkbox"/>	Sifait : P <input type="checkbox"/>	N <input type="checkbox"/>
Sérologie:			
Autres : SGOT <input type="checkbox"/>	SGPT <input type="checkbox"/>		
<b><u>5. Radiologie</u></b>			
R <sup>x</sup> Pulmonaire: N <input type="checkbox"/>	AN <input type="checkbox"/>		
Echo.Abdominale : NF <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>		
SiF : SPM <input type="checkbox"/>	HPM <input type="checkbox"/>	Ascite <input type="checkbox"/>	Autre <input type="checkbox"/>
ECG.....			
<b><u>6. Traitement (Glucantime) :</u></b>			
Dose pleine <input type="checkbox"/>		Dose progressive <input type="checkbox"/>	
Dose de traitement en jours: 1 <sup>ère</sup> cure <input type="checkbox"/>		2 <sup>ème</sup> cure <input type="checkbox"/>	
Nombre totale d'injections.....			
Délai entre les deux cures.....			
Autres.....			
<b><u>7. Evolution</u></b>			
Favorable <input type="checkbox"/>		Défavorable <input type="checkbox"/>	

### Annexe 3 : Amplification par PCR Lei 70

Cette PCR a pour cible la région du gène SSU ARN ribosomale (ssu-ARNr), polymorphe chez les différentes espèces de *Leishmania*. Cette région sera amplifiée en utilisant l'extrait d'ADN des lames sélectionnées.

#### Matériel d'étude:

##### ➤ Echantillons:

- Extrait de l'ADN à partir de lames positives.
- Les contrôles positifs des trois espèces : *L. major* (MHOM / MA / 2009 / LCER19-09), *L. tropica* (MHOM / MA / 2010 / LCTIOK-4), *L. infantum* (MHOM / MA / 1998 / LVTA), issus du LNRL de l'INH de Rabat.
- Le contrôle négatif (eau distillée).

##### ➤ Tampons et solutions:

➔ Les couples d'amorces Lei70 sont :

Amorce sens: Lei-70R (20pmol/μl) 5'-CGCAACCTCGGTTCGGTGTG-3'

Amorce anti-sens : Lei-70L (20pmol/μl) 5'-CGCGGTGCTGGACACAGGGTA-3'

- Eau distillée.

##### ➤ Equipements et consommables:

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

##### ➤ Technique d'amplification :

- Préparation du Mix.

**Tableau 15:** Composition du Mix pour l'amplification Lei-70

N°	Mix pour une réaction de volume totale 20 µl	
	Composants	Quantité pour un échantillon. µl
		PCR Lei-70
1	Eau distillée	18
2	Primer, Forward, (20pmol/µl)	1
3	Primer, réverse, (20pmol/µl)	1
Volume total du Mix		20

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

- A chaque tube ready mix, est ajouté 20 µl du Mix et 5µl d'ADN des échantillons et des contrôles (positif et négatif). L'ensemble est vortexé.
- L'amplification des acides nucléiques est lancée dans le thermocycleur selon les paramètres décrits dans le tableau ci dessous.

**Tableau 16:** Programme du thermocycleur pour Lei70

Nombre du cycle	Dénaturation	Elongation	Polymérisation
<b>Cycle initial</b>	5 min.94°C	0	0
<b>40 cycles</b>	1 min.94°C	1 min.65°C	1 min30s.72°C
<b>Cycle final</b>	0	0	10 min.72°C

## **Annexe 4 : Electrophorèse**

L'étape de l'électrophorèse consiste à séparer les fragments d'ADN qui seront détectés par intercalation avec le bromure d'éthidium et visualisé via les rayons d'ultra-violet (UV) sous forme de bandes. La séparation des fragments d'ADN s'effectue en fonction de la différence du poids moléculaire et de charge par le biais d'un courant électrique.

### **Matériels d'étude**

#### ➤ **Echantillons**

- Les produits d'amplification PCR (Lei 70).
- Marqueur de taille (100pb DNA ladder).

#### ➤ **Tampons et solutions**

- Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) buffer (x1).
- Colorant de charge (loading dye).
- Bromure d'éthidium (BET).
- Transilluminateur lié à un logiciel Gel smart, équipé d'une caméra –photo pour la visualisation et la capture des photos de gel.

### **Méthode**

5 µl du produit de PCR sont déposés dans chaque puit formé plus un puit avec 5µl de marqueur de taille (on lui ajoute avant 2µl du tampon charge (colorant) pour le visualiser sur le gel après migration).

Le générateur est réglé à 80 V/ 80 mA et la migration se produit.

### **Technique d'électrophorèse:**

- Une quantité suffisante de tampon d'électrophorèse pour remplir la cuve et pour préparer le gel (tampon 1xTAE) est préparée.
- Un gel d'agarose à 2,5% est préparé avec le tampon 1X TAE contenant du bromure d'éthidium pour avoir une concentration 0.2µg/ml.
- Le mélange, dont la température est de 50 à 60 °C, est versé sur la plaque d'électrophorèse horizontale jusqu'à solidification (20 min).
- Dans la cuve de migration, couverte de tampon TAE on place le gel.
- Les puits du gel d'électrophorèse sont chargés en déposant les 5 µl des échantillons et des témoins mélangés au tampon de charge (loading dye) (1µl), et en déposant également les 5 µl du marqueur de taille (DNA Ladder).
- La cuve est fermée et branchée à 220V. Le voltage de la cuve est réglé à une tension de 90V. L'ADN doit migrer vers l'anode positive.

- Pour la lecture de la plaque, on la place dans le transilluminateur sous UV, le TAE s'intercale entre les brins d'ADN émettant une radiation fluorescente. L'emplacement des fragments d'ADN apparaît sous la forme de bandes.

## **Annexe 5: Digestion du produit PCR ITSI par l'analyse de Restriction Fragment Length Polymorphisme (RFLP)**

Pour la digestion, on a utilisé l'enzyme Rsa I qui ne permet que la digestion de *Leishmania infantum* et donne deux bandes : 210 pb et 101 pb. *L. tropica*, et *L. major* ne sont pas digérées par cette enzyme

### **Matériel d'étude:**

#### ➤ **Echantillons:**

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

#### ➤ **Tampons et solutions:**

- 10xtampon enzyme de restriction.
- Enzyme de restriction Rsa1.
- Sérum albumine du bovin (BSA).
- Eau ultra pure stérile.
- L'agarose à 2,5%.

#### ➤ **Equipements et consommables:**

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

### **Technique de digestion:**

#### ❖ Préparation du produit PCR pour la digestion :

- Introduire la totalité du produit PCR dans un tube eppendorf stérile.

#### ❖ Digestion enzymatique :

- Préparer le Mix pour l'analyse de restriction :

**Tableau 17:** Composition du Mix pour l'analyse de restriction.

Composants	Quantité en $\mu$ l
10xtampon Buffer	2
Enzyme Rsa1	2
H2O	4
Volume total	8

L'enzyme est additionnée à la dernière minute.

- Le Mix est vortexé et centrifugé afin de décanter toutes les gouttelettes déposées sur les bords.
- À chaque tube PCR ITSI est rajouté 8  $\mu$ l du Mix. Après vortex et centrifugation pendant quelques secondes les tubes sont incubés dans un bain-marie pendant 2 heures.

Les produits de digestion sont ensuite déposés sur gel d'agarose de 2,5%. Les bandes caractérisant chaque espèce seront visualisées sous UV.

## Annexe6 : Avis comité d'éthique



COMITÉ D'ETHIQUE POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE  
UNIVERSITÉ MOHAMMED V – RABAT  
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE RABAT  
FACULTÉ DE MÉDECINE DENTAIRE DE RABAT

Rabat, le 03/03/2015

**KTIOUET Jamal Eddine**

Président  
Psychologie Médicale

**ABDALLAOUI Faïza**

Recherche Médecine Dentaire

**ABOUQAL Redouane**

Recherche Médecine

**BIHI El Habib**

Droit

**CHERKAOUI Mustapha**

Paramédical

**CHERRAH Yahia**

Sciences Pharmaceutiques

**DADSI BOUTALEB Fatima**

Société Civile

**GHARBI Mohamed El Hassan**

Religion

**HAIMEUR Charki**

Recherche Médecine

**HAJJAJ – HASSOUNI Najia**

Recherche Médecine

**HARMOUCHE Hicham**

Recherche Médecine

**M'RABET Mustapha**

Santé Publique

**RIDA Sana**

Recherche Médecine Dentaire

**SLIMANI Saïf El Islam**

Société Civile

**TAMOIRO Abdessamad**

Philosophie

**ZEGGWAGH Amine Ali**

Recherche Médecine

Secrétariat Administratif

**GUEDIRA Khaoula**

Faculté de Médecine et

de Pharmacie de Rabat

+ 212 537 77 35 60

cerb.rabat@gmail.com

Départ IV=222  
du : 20/03/2015

**Docteur Hajiba FELLAH**  
Labo National de référence des  
leishmanioses  
Institut National d'Hygiène

### Titre et références

Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat a été saisi le 25/11/2014 d'une demande d'avis pour le projet de recherche intitulé : « **Etude séro-moléculaire et épidémiologie de la Leishmaniose viscérale symptomatique et asymptomatique dans la province de Taounate.** »

Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat a examiné le protocole et tous les documents constituant le dossier lors de sa séance du **03/03/2015**.

### Documents examinés

- Lettre de soumission
- Protocole de l'étude
- Cahier d'observation
- Note d'information et formulaire de consentement éclairé du patient (version française)
- Note d'information et formulaire de consentement éclairé du patient (version française)
- Liste des investigateurs et CVs

### Délibérations

Ont participé à la délibération :

**KTIOUET Jamal Eddine**  
Président  
Psychologie Médicale

**ABDALLAOUI Faïza**  
Médecine Dentaire

**ABOUQAL Redouane**  
Recherche Médecine

**BIHI El Habib**  
Droit

**CHERKAOUI Mustapha**  
Paramédical

**GHARBI Mohamed El Hassan**  
Religion

**HAIMEUR Charqi**  
Recherche Médecine

**HARMOUCHE Hicham**  
Médecine

**SLIMANI Saïf El Islam**  
Société Civile

**TAMOIRO Abdessamad**  
Philosophie

**ZEGGWAGH Amine Ali**  
Recherche Médecine

**Annexe 7 : Article 2 :** Comparative Evaluation of Immunochromatographic Dipstick Test (ICT) rk39, Soluble Antigen ELISA and IFAT for the Sero-diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Morocco

Accepted Manuscript

Title: Comparative Evaluation of Immunochromatographic Dipstick Test (ICT) rk39, Soluble Antigen ELISA and IFAT for the Sero-diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Morocco

Authors: Meryem Mniouil, Hajiba Fella, Fatima Amarir, Abderrahim Sadak, Abdeslam Et-touys, Youssef Bakri, Aziza Moustachi, Fatima Zahraa Tassou, Mostapha Hida, Mohamed Lyagoubi, El Bachir Adlaoui, Mohamed Rhajaoui, Faiza Sebti



PII: S0001-706X(18)30003-2  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.007>  
Reference: ACTROP 4608

To appear in: *Acta Tropica*

Received date: 2-1-2018  
Revised date: 4-3-2018  
Accepted date: 10-3-2018

Please cite this article as: Mniouil, Meryem, Fella, Hajiba, Amarir, Fatima, Sadak, Abderrahim, Et-touys, Abdeslam, Bakri, Youssef, Moustachi, Aziza, Tassou, Fatima Zahraa, Hida, Mostapha, Lyagoubi, Mohamed, Adlaoui, El Bachir, Rhajaoui, Mohamed, Sebti, Faiza, Comparative Evaluation of Immunochromatographic Dipstick Test (ICT) rk39, Soluble Antigen ELISA and IFAT for the Sero-diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Morocco. *Acta Tropica* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.007>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Annexe 8:** Enquête d'évaluation des connaissances de la population sur la LV humaine  
ainsi que les facteurs de risque

Date de l'enquête..... Nom de l'enquêteur.....

Fiche d'enquête N°.....

Nom et Prénom:.....		Profession:.....	
Sexe	: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Poids	:
Secteur:.....		Commune :.....	
Localité	:.....	Milieu	R <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
<b>Homme/ Connaissances sur la maladie</b>			
1. Connaissez-vous la leishmaniose viscérale chez l'homme? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			
Si oui, comment nommez-vous cette maladie?.....			
2. Y a-t-il des cas: Dans votre entourage? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			
Si oui, combien ?.....			
3. Y a-t-il des cas : Dans le douar ? Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>			
Si oui, combien ?.....			
4. Comment se transmet la maladie?.....			
Ne sait pas <input type="checkbox"/>			
5. Historique (Evolution dans le temps) : du (des) signes cliniques éventuellement.....			
.....			
<b>Etat sanitaire de l'individu</b>			
6. Etat général	Fièvre <input type="checkbox"/>	Pâleur <input type="checkbox"/>	SPM <input type="checkbox"/> HPM <input type="checkbox"/>
	Amaigrissement <input type="checkbox"/>	Présence de ganglions <input type="checkbox"/>	
Si présence de fièvre, combien?.....			
Autres.....			
<b>Prélèvements et diagnostic</b>			
7. Prélèvement	Sanguin <input type="checkbox"/>	MO <input type="checkbox"/>	
8. Résultats de diagnostic	P.S {	rk39	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
		IFI	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
		ELISA	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
		WB	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
		PCR	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
	P.M {	Culture	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
		EM	P <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>

<b>Phlébotomes/ Piqûre et transmission de la maladie</b>			
9. Y a-t-il des insectes piqueurs la nuit?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, comment les appelle-t-on?.....			
A quelle période de l'année sont-ils nombreux?.....			
10. Quels types de personnes sont les plus fréquemment piqués?	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	
11. Quels sont les parties les plus fréquemment piquées?.....			
.....			
12. Ces insectes transmettent-ils des maladies ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, lesquelles ?.....			
13. Quel est l'aspect de la lésion après piqûre ?.....			
Disparition en 24 à 48 heures <input type="checkbox"/>			
Développement d'un ulcère <input type="checkbox"/>			
14. Y-a-t-il développement d'une réaction ganglionnaire?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, combien de temps après la piqûre ? .....			
15. Y-a-t-il eu des maladies ayant nécessité une consultation après une piqûre d'insectes ?			
Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Ne sait pas <input type="checkbox"/>	
Si oui, décrire la maladie (ou nom):.....			
.....			
16. Evolution de la maladie après traitement :			
.....			
.....			
17. Y a-t-il des périodes de démoustications?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, à quelles périodes de l'année ? .....			
<b>Chiens/ Réservoir et transmission de la maladie</b>			
18. Y a-t-il des chiens dans le foyer?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, combien ?.....			
19. Y a-t-il des chiens sans propriétaires dans le douar?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, combien ?.....			
20. Le chien constitue-t-il un danger pour l'homme ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, dans quel cas ?.....			
21. Le chien joue-t-il un rôle dans cette transmission ?	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	
Si oui, dans quel cas ?.....			
22. Service ou rôle de chien:	Troupeau <input type="checkbox"/>	Maison <input type="checkbox"/>	Chasse <input type="checkbox"/>
23. Habitat et déplacement.....			

1. Avez-vous déjà diagnostiqué un cas de leishmaniose viscérale?      Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui, quel nom lui donnez-vous couramment?.....
2. Quels sont les symptômes les plus fréquemment observés?.....
3. Quels sont les méthodes de diagnostics utilisés?
Clinique <input type="checkbox"/> Epidémiologique <input type="checkbox"/> Laboratoire <input type="checkbox"/>
Autres.....
4. Les patients malades appartiennent à quel type de population?      U <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/>
5. Quelle tranche d'âge est la plus touchée?      Bébé et nourrissons <input type="checkbox"/> Enfants <input type="checkbox"/>
Adolescents <input type="checkbox"/> Jeunes adultes <input type="checkbox"/> Adultes <input type="checkbox"/>
Autres .....
6. Quel est le protocole utilisé pour le traitement ?.....
7. Les médicaments prescrits sont-ils accessibles à tout le monde ?      Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
8. Quel est le pourcentage (estimation) des patients qui décèdent des suites de la maladie?....
9. L'immunodépression y est-elle souvent pour quelque chose?      Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Comment?.....
10. Informez-vous souvent les propriétaires des dangers que représentent le chien et le phlébotome dans le maintien et la propagation de la maladie?      Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui, comment réagissent-ils?.....
11. Utilisez-vous de la médecine traditionnelle pour le traitement ?      Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/>
Si oui, qu'utilisez-vous?.....

**Annexe 9: Demande de consentement**

Le ...../...../.....

**Demande de consentement pour la prélevation d'un échantillon sanguin**

**Objet :** « Etude séro-moléculaire et épidémiologie de la Leishmaniose viscérale symptomatique et asymptomatique dans la province de Taounate »

Je, soussigné, Monsieur/ Madame .....,  
portant le code d'identité national....., ayant lu et approuvé la fiche  
des données relative au projet de recherche scientifique mentionné ci-haut, de l'Institut  
National d'Hygiène.

Avoir accepté, consciemment, de participer à ce projet de recherche, en donnant 10 ml de  
mon sang, pour le soumettre aux analyses citées dans la fiche ci-jointe.

A condition que mes informations personnelles seront traitées en toute confidentialité, tout en  
ayant le droit de les consulter auprès des responsables du projet.

Signature du Participant :

Signature du responsable :

## الموافقة من اجل المشاركة بعينة دم

**الموضوع:** «دراسة مصلية-جزيئية و وبائية اللشمانيات الحشوية البيئة والغير  
بيئة الأعراض في إقليم تاونات.»

انا الموقع اسفله.....الحامل للبطاقة الوطنية

رقم.....وبعد اطلاعي على بطاقة المعلومات المتعلقة بالبحث المذكور

اعلاه، الذي يشرف عليه المعهد الوطني للصحة،و إمامي بمضمونه وفوائده الهادفة.

أوافق، عن وعي، على مساهمتي في هذا البحث بالمشاركة بعينة من الدم قدرها 10 مل، وذلك من اجل

إخضاعها للفحوصات المبينة في بطاقة المعلومات المرافقة.

شرط أن تستعمل المعلومات الخاصة بي بطريقة سرية، وأن يخول لي حق الإطلاع عليها لدى  
المسؤولين بالبحث.

إمضاء المسؤول:

إمضاء المتطوع:

## **Annexe 10 : Sensibilisation des nitrocelluloses pour la Leishmanie**

### **Principe :**

Migration d'antigènes de *L. infantum* par électrophorèse sur gel pour séparation en fonction du poids moléculaire. Puis transfert de ces antigènes sur feuille de nitrocellulose.

### **PREPARATION DE L'ANTIGENE**

Pour commencer cette technique il est nécessaire d'avoir au préalable des antigènes de *Leishmania* qui sont préparés au laboratoire.

### **Matériel à prévoir**

Une centrifugeuse réfrigérée, de l'eau  $\sigma$  à 4 °C, des tubes falcons, du SDS à 10%.

### **Protocole**

Transvaser la culture dans des tubes falcons de 50 ml

Centrifuger 2500 t x 15'

Lavage : re-suspendre le culot dans quelque ml d'eau  $\sigma$ . Vortexer. Récupérer tous les culots (si plusieurs tubes falcons) et les transvaser un tube falcon de 15 ml. Rajouter l'eau  $\sigma$  pour remplir le tube et centrifuger (2500 t x 15')

Faire 3 lavages de cette façon

Jeter le surnageant en ne conservant au-dessus du culot qu'un volume de surnageant approximativement égal à celui du culot (tube à fond conique : plus facile)

Bien re-suspendre le culot dans ce reste de surnageant : vortexer

Rajouter à cette suspension un volume égal d'une solution de SDS à 10% (1g de poudre SDS pour 10 ml d'eau distillée) préalablement mélangée par retournement. Vortexer

Transvaser dans un tube en verre. Chauffer 4 minutes à 100 °C. Vortexer

Doser les protéines en biochimie (dosage des protéines totales par un dosage au biuret).  
Conserver éventuellement 50  $\mu$ l à -20 °C pour un test dot ultérieur

Diluer dans le SDS à 10% X pour obtenir une concentration finale de 2 mg/ml. Puis rajouter du tampon échantillon 2X à raison d'un volume 2 fois inférieur à celui obtenu. (Ex : pour 5 ml d'antigène à 2 mg/ml rajouter 2,5 ml de tampon échantillon)

Préparer des aliquots de 200 µl et les congeler à -20 °C

Une fois s'être assuré de la présence d'aliquot d'antigène, passé à la réalisation de nitrocellulose sensibilisée. Pour cela, il est nécessaire de faire migrer ces antigènes par électrophorèse sur des gels

## **GELS**

### **Montage du matériel**

Laver les plaques à l'eau chaude, et frotter avec du fiber pad (grattoir éponge). Rincer à l'eau distillée, sécher puis laver à l'alcool 70°

Monter les plaques (bien propres et sans traces) avec un espaceur de 1 mm sur les portoirs.

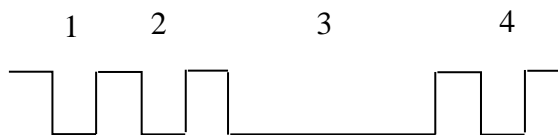
Bien vérifier l'horizontalité du bord inférieur des plaques de verre

Vérifier l'absence de fuite en mettant à la place du gel de l'eau distillée. Vérifier que l'eau forme une belle ligne horizontale. Si non, cela signifie que les vitres ne sont pas propres et refaire l'étape de lavage

Si celle-ci ne fuit pas, l'enlever (en renversant le montage) et bien sécher l'espace entre les plaques avec du papier wattman

Une fois le montage réalisé, fabriquer deux gels : un de tassement et un de séparation

**Remarque :** lors de la réalisation du gel de tassement il faut utiliser du gel de tassement il faut utiliser les peignes de 0,75 mm d'épaisseur avec 2 épaisseurs de scotch de sorte à obtenir des « dents » comme ci-dessous afin d'avoir deux petits puits (1 et 2 sur le schéma) suivi d'un grand (3) et d'un petit (4)



Il sera nécessaire de remettre régulièrement du scotch sur tout le longeur car il s'enlève rapidement, surtout sur les petites dents. Du gel peut s'infiltrer entre les dents et modifier l'épaisseur du peigne.

Les peignes doivent être prêts avant de couler le gel de tassement.

### Gel de séparation (à 15%)

Dans une crachette mélanger les réactifs comme ci-dessous :

	2 gels	1 gel
H2O distillée (en ml)	1,25	0,62
Tris SDS (en ml)	5	2,5
Acryl 40 % (en ml)	3,75	1,88
APS 10 % (en µl)	150	75
TEMED (en µl)	20	10

ATTENTION : après ajout de l'APS et du Temed le gel peut vite polymériser. Il faut donc le couler rapidement. C'est pourquoi on ne coule pas plus de deux gels à la fois.

Mélanger en faisant des allers-retours avec une pipette de 10 ml, couler entre les plaques un volume d'environ 4 ml de gel

Puis rajouter de l'eau distillée jusqu'en haut des plaques pour éviter au gel de sécher

Ne pas jeter la crachette avec le fond de gel, cela permet de vérifier lorsque le gel est polymérisé (environ 30 min)

**Remarque** : une fois l'APS décongelé, ne pas le recongeler mais le conserver à +4°C.

### Gel de tassement (à 4%)

**Remarque** : vérifier avant de couler le gel de tassement que le premier gel à bien polymérisé dans la crachette et qu'il n'y a pas d'anomalies : bulles d'air, zones mal polymérisées.

Jeter l'eau au-dessus du gel. Essuyer la paroi avec du papier watman SANS TOUCHER LE GEL.

Dans une crachette, mélanger les réactifs comme ci-dessous :

	1 gel	2 gels
Mix (en ml)	3	6
APS 10% (en µl)	100	200
TEMED (en µl)	20	40

Mélanger avec la pipette de 5 ml. Couler le gel rapidement jusqu'au bord de la petite plaque, puis ajouter le peigne. Mettre le peigne légèrement incliné vers un côté et ne pas l'enfoncé à fond dans le gel pour éviter la formation de bulles.

**ATTENTION** : le gel polymérise **TRES VITE**. Mieux vaut, au début, couler les gels un par un. Car si le gel commence à solidifier lorsque l'on enfonce le peigne cela va forcer sur le gel de séparation qui se décolle de la paroi. La migration sera alors ratée.

Laisser polymériser environ 10 minutes. Vérifier que le gel a bien pris en masse soit avec le reste dans la crachette soit avec le gel ayant débordé.

Retirer délicatement le peigne en le tirant d'abord vers soi pour faire pénétrer de l'air puis ensuite tirer délicatement verticalement vers le haut.

Réaliser le « broissage des dents » du gel en mettant de l'eau distillée entre les dents et retirer à l'aide d'une pipette plume l'excès de gel.

Une fois les gels réalisés on peut procéder à l'électrophorèse.

## **ELECTROPHORESE**

### **Tampon migration**

Pour faire migrer l'antigène il faut réaliser un tampon de migration.

Pour cela, peser dans une crachette :

- Glycine            14,5 g/L
- Tris                3 g/L
- SDS                1 g/L

Puis dissoudre dans une bouteille d'un litre d'eau distillée.

### **Montage**

Mettre les gels sur le portoir à électrophorèse. La petite plaque en verre doit se retrouver vers l'intérieur pour les deux gels. Remplir l'espace entre les deux gels de tampon d'électrophorèse jusqu'au bord de la grande plaque en verre. Le tampon d'électrophorèse doit pénétrer dans les puits formés par le peigne.

Vérifier qu'il n'y a pas de fuite du tampon et que le niveau ne baisse pas. Puis ajouter le tampon au fond du bac comme indiqué sur le bac (en fonction du nombre de gels réalisés).

### **Dépôt des échantillons**

Il faut TOUJOURS que le tampon d'électrophorèse soit mis dans l'appareil avant de déposer les échantillons

Pour les dépôts, utiliser une pointe de pipette souple et fine, genre pipette plume. Pour s'aider, marquer la pointe de la pipette avec un marqueur indélébile.

Pour chaque gel déposer :

- 20 µl de marqueurs EUROMEDEX (marqueur de poids moléculaire coloré) dans le puit 1
- 25 µl du marqueur Bio Rad (préalablement dilué au 1/20<sup>ème</sup> dans du tampon échantillon) dans les puits 2 et 4
- Puis déposer lentement 190 µl d'antigène dans le grand puit 3 en déplaçant la pipette sur toute la longueur

### **Migration**

Une fois le bleu stabilisé après quelques secondes, vérifié que l'échantillon est bien réparti sur toute la longueur du puit 3. Si ce n'est pas le cas, avec une nouvelle pointe de pipette, homogénéiser très délicatement l'antigène.

ATTENTION : il ne faut pas que l'antigène sorte du puit.

Régler le générateur à **160 V**, et **80 mA** (0, 80 A) pour 2 gels et **200 mA** pour 4 gels. Après mise en route, vérifier que le voltage se stabilise sur 160V et que le courant passe normalement (l'ampérage va progressivement varier). Si ce n'est pas le cas arrêter la migration et faire progressivement monter l'ampérage de sorte que le voltage reste stable.

Laisser migrer jusqu'à ce que le marqueur vert du poids moléculaire EUROMEDEX soit sorti du gel. Laisser le front bleu d'antigène de leishmanies sortir du gel. Ne se fier qu'au marqueur vert.

ATTENTION : il faut stopper la migration dès que le marqueur vert n'est plus visible. Car si la migration dure trop longtemps, il y a perte d'un des antigènes important pour identification de la pathologie, « la bande 14 ».

S'il ya une petite fuite du tampon d'électrophorèse pendant la migration : attendre que le bleu ait entièrement pénétré dans le gel de tassement avant de rajouter du tampon. Et le rajouter au centre du portoir, pas sur le gel.

**Remarque :** si le niveau du tampon n'est pas plus haut que le bord supérieur de la petite plaque, le courant ne passe pas.

Une fois l'électrophorèse terminée, passé au transfert de ces antigènes séparés sur une feuille de nitrocellulose.

## **TRANSFERT**

### **Tampon transfert**

Pour réaliser le transfert il est nécessaire de faire un tampon

Pour cela, peser dans une crachette :

- Glycine            11,6 g/L
- Tris                2,4 g/L

Dissoudre dans **800 ml** d'eau distillée. Puis ajouter **200 ml** de méthanol de bonne pureté.

### **Au préalable**

Avant le transfert, s'assurer que le bac blanc contient bien de l'eau congelée

Verser du tampon de transfert jusqu'à 1/3 d'un bac où se fera le montage

Pour un gel :

- Découper une feuille de nitrocellulose au format du gel (9x6 cm)
- 2 feuilles de papiers blot (10x7 cm)
- 2 fiber pads (grattoir éponge)

Placer toutes ces feuilles dans le bac rempli de tampon de transfert et les laisser s'imprégner. Bien les immerger.

### **Montage**

Retirer de l'appareil les 2 plaques de verre contenant le gel. A l'aide de la « spatule », faire doucement levier pour séparer les plaques en verre. Le gel reste sur une des plaques. Retirer le gel de tassement à l'aide de la spatule.

Le montage doit se faire en **TOTALE** pour éviter les bulles.

Pour cela remplir un bac de tampon de transfert. Déposer ensuite les éléments dans l'ordre suivant :

- Un fiber pad
- Une feuille de papier blot
- Le gel avec le marqueur coloré sur la droite, le reste éventuel de marqueur vert en bas
- Une feuille de nitrocellulose. Essayer de plaquer le plus parallèlement possible au gel. Faire attention à ce qu'il n'y ait pas de bulles qui se forment entre la nitro et le gel
- Une feuille de papier blot
- Un fiber pad

Placer ce montage sur la cassette porte gel (sur la grille **NOIRE** négative, la grille blanche vers le haut). Attention lors du transfert à ne pas tourner le montage. Le côté avec le marqueur coloré du gel doit rester à droite.

Fermer la cassette, la placer dans l'appareil.

Mettre aussi le bac blanc contenant de la glace.

Remplir la cuve de tampon en le faisant couler à côté des cassettes pour que le niveau dans les cassettes monte à partir du fond, ce qui évite les bulles dans les fiber pads.

### **Transfert**

Régler le générateur à **60V, 500mA** : 1 heure. Après mise en route, vérifier que le voltage se stabilise sur 60V et que le courant passe (l'ampérage va changer au cours du transfert mais ça n'interfère pas dans le transfert).

**!!!!!!!!!!Une fois le montage fini, réaliser le lavage des plaques en verre pour ne pas que le gel se solidifie sur les plaques et provoque des problèmes de migration !!!!!!!!!!**

**Remarque** : si impossibilité de les laver tout de suite, les mettre dans un bac avec de l'eau chaude pour que le gel ne solidifie pas. Mais les plaques doivent impérativement être lavées le jour même.

Une fois le transfert fini, retirer les cassettes. Jeter le papier filtre et le gel. Ne récupérer que la nitrocellulose sensibilisée et les fiber pads.

## PREPARATION DE LA NITROCELLULOSE SENSIBILISEE

### Révélation

Une fois le transfert fini, récupérer la feuille de nitrocellulose sensibilisée et la faire sécher dans une feuille de papier filtre.

Lorsqu'elle est sèche, incuber 5 minutes toute la feuille de nitrocellulose sensibilisée dans du rouge Ponceau (0,1 % de rouge ponceau en poudre, 5% acide acétique, eau UHQ (conserver à 4 °C)).

Décolorer le fond par plusieurs rinçages rapides d'une dizaine de secondes dans de l'eau distillée.

Vérifier la présence des marqueurs Bio Rad et aussi celle des antigènes sur la marge.

Laisser sécher toute la nuit.

### Collage

Une fois l'enregistrement terminé prendre la nitrocellulose sensibilisée et la feuille de WB *leishmania* correspondante.

**Remarque :** mettre des gants pour éviter de laisser des empreintes de doigts sur la nitrocellulose sensibilisée.

Dans l'encadrement prévu à cet effet, déposer la nitrocellulose sensibilisée le plus parallèlement possible au bord du cadre. Avec une règle, tracer un trait au stylo un peu au-dessus de la première bande du marqueur coloré. Ce trait doit être parallèle à l'encadrement de la nitrocellulose sensibilisée et cela même si la migration n'est pas droite.

Faire dépasser le trait tracé de chaque côté de la nitrocellulose sensibilisée pour avoir des marques. Retirer la nitrocellulose sensibilisée puis, à l'aide des deux marques laissées, tracer un trait sur la feuille de papier.

Prendre la nitrocellulose sensibilisée à l'aide d'une règle et d'un scalpel découper les marqueurs à gauche de la nitrocellulose sensibilisée (le marqueur coloré et le marqueur Bio Rad) jusqu'au bord des antigènes (visible grâce à la coloration du rouge ponceau). Les coller sur la feuille de WB *Leishmania* dans l'encadrement prévu en faisant bien attention que le trait de la nitrocellulose sensibilisée correspond au trait tracé sur le papier.

Puis de la même façon, couper le marqueur se trouvant à droite de la nitrocellulose sensibilisée et le collé en laissant à peu près le même espacement que le bout de nitrocellulose sensibilisée et le collé en laissant à peu près le même espacement que le bout de nitrocellulose sensibilisée qu'il reste avec les antigènes.

Mettre le reste de la nitrocellulose sensibilisée dans le bloc en notant « son nom ». Exemple :  
A du 11/11/11 .

### **Annex 11** : Extraction d'ADN à partir du sang périphérique

L'ADN est obtenu par l'utilisation d'un kit Qiagen GmbH (QIAamp DNA Tissue Kit, Qiagen, Germany). L'extraction s'est déroulée comme suit :

- Centrifuger  $2.10^8$  parasites
- Récupérer le culot avec 1ml de PBS
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm
- Récupérer le culot avec 180  $\mu$ l de tampon ATL par tube.
- Ajouter 20  $\mu$ l de protéinase K par tube.
- Attendre 20-30 minutes à 56°C
- centrifuger brièvement une impulsion à 8000 rpm
- 200  $\mu$ l AL, vortexer 15 secondes
- Incuber les tubes à 70°C (bain sec) pendant 10 minutes (arrêt de la protéinase).
- Centrifuger brièvement (1 impulsion à 8000 rpm)
- Ajouter 200 $\mu$ l d'ethanol absolue (lot réservé pour l'extraction qPCR).
- Vortexer pendant 15 sec chaque tube.
- Centrifuger brièvement (1 impulsion à 8000 rpm).
- Mettre l'intégralité (culot compris) du liquide de chaque tube dans une colonne QIAamp mini spin (attention de ne pas dépasser 600 $\mu$ l par colonne, sinon mettre le volume en plusieurs fois).
- Centrifuger les colonnes à 8000 rpm pendant 1 minute, Changer le tube collecteur des colonnes.
- Ajouter 500  $\mu$ l de tampon AW1.
- Centrifuger les colonnes à 8000 rpm pendant 1 minute, Changer le tube collecteur des colonnes.
- Ajouter 500  $\mu$ l de tampon AW2.
- Centrifuger les colonnes à 14000 rpm pendant 3 minutes.
- Placer les colonnes sur un nouveau tube eppendorf 1,5 ml.
- Ajouter 100  $\mu$ l de tampon AE et laisser incuber 5 minutes à TA.
- Centrifuger les colonnes à 8000 rpm pendant 1 minute.
- Prendre la DO à 260 et 280 nm et le rapport 260/280 pour chaque échantillon.

### Résumé

Au Maroc la leishmaniose viscérale est une infection grave voire mortelle si elle n'est pas diagnostiquée et prise en charge précocement. L'agent incriminé est *Leishmania infantum* zymodème MON-1, ayant comme réservoir le chien et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus*.

Le taux d'incidence annuel moyen de la LV entre 1990 et 2019 est de 0,4 cas/100 000 habitants. Il s'agit d'une maladie infantile qui commence à toucher l'adulte, avec une répartition localisée au préalable au Nord du Maroc pendant les années 90 puis étendue vers le centre et le sud du Maroc depuis l'année 2000. La PCR-Lei70 confirme que *Leishmania infantum* est l'agent causal de la LV au Maroc. L'évaluation de l'ICT rk39 a montré une sensibilité de 98,5 % et une spécificité de 100% soit un potentiel de diagnostic plus élevé que les méthodes classiques. C'est un outil de diagnostic non-invasif, simple, fiable et adapté au terrain. L'étude de la prévalence au niveau du secteur Galaz était relativement élevée avec 71,2 % et 60,5 % par la qPCR et par le WB respectivement, par rapport à celle trouvée à Bouadel qui était respectivement de 28,8 % et 39,5 % par la qPCR et le WB. On déduit que la prévalence du portage asymptomatique sur les 177 échantillons collectés varie selon la localité d'étude et la méthode de diagnostic utilisée.

**Mots-clés :** Leishmaniose viscérale – Epidémiologie – *Leishmania. infantum* – PCR en temps réel – immunochromatographie rk39 – portage asymptomatique – sang périphérique – Western Blot Maroc – Taounate.

### Abstract

In Morocco, visceral leishmaniasis is a serious and even fatal infection if not diagnosed and treated early. The causative agent is *Leishmania infantum* zymodeme MON-1, with dogs as reservoir and *Phlebotomus perniciosus* as main vector.

The average annual incidence rate of VL between 1990 and 2019 is 0.4 cases/100,000 population. It is a childhood disease that is beginning to affect adults, with a localized distribution in the north of Morocco during the 1990s and then spread to central and southern Morocco since 2000. PCR-Lei70 confirms that *Leishmania infantum* is the causative agent of VL in Morocco. Evaluation of the rk39 TBI showed a sensitivity of 98.5% and a specificity of 100%, which is a higher diagnostic potential than conventional methods. It is a non-invasive diagnostic tool, simple, reliable and adapted to the field. The prevalence study in Galaz sector was relatively high with 71.2% and 60.5% by qPCR and WB respectively, compared to that found in Bouadel which was 28.8% and 39.5% by qPCR and WB respectively. It is inferred that the prevalence of asymptomatic carriage in the 177 samples collected varies according to the study locality and the diagnostic method used.

**Key Words :** Visceral leishmaniasis – epidemiology – *Leishmania. infantum* – Real time PCR immunochromatography rk39 – asymptomatic carriage - peripheral blood - Western Blot – Morocco - Taounate.