

MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE ET SUPERIEUR

SECRETARIAT GENERAL

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO

ECOLE DOCTORALE DES
SCIENCES DE LA SANTE (ED- SDS)

FORMATION DOCTORALE EN
PARASITOLOGIE MEDICALE



BURKINA FASO
Unité-Progrès-Justice

Année académique 2014-2015

Mémoire N° 012

Investigation sur le réservoir canin de *Leishmania infantum*, agent de la leishmaniose viscérale humaine, dans la ville de Bobo-Dioulasso.

MEMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le 02 Février 2015

**Pour l'obtention du diplôme de Master en Parasitologie-
Entomologie-Mycologie médicales**

Par

Diakourga Arthur DJIBOUGOU

Directeur de Mémoire:

M. Roch K. DABIRE, Directeur de Recherche

Co-Directeur:

M. Ibrahim SANGARE, Assistant

JURY

Président:

M. Tinga Robert GUIGUEMDE, Professeur Titulaire

Membres:

M. Adrien Marie Gaston BELEM, Professeur Titulaire

M. Ibrahim SANGARE, Assistant

SOMMAIRE

SOMMAIRE

DEDICACES	iii
REMERCIEMENTS.....	v
SIGLES ET ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	ix
RESUME	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION.....	1
I. GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES	4
I.1. Définition des leishmanioses , importance en santé publique et aires de répartition ..	4
I.2. La leishmaniose viscérale	7
I.2.1. Agent pathogène	7
I.2.2. Vecteur	10
I.2.3. Réservoirs principaux de la leishmaniose viscérale.....	11
I.2.4. Transmission et cycle évolutif des leishmanies.	11
I.2.5. Manifestations cliniques de la leishmaniose canine et viscérale humaine.....	13
I.2.6. Diagnostic de la leishmaniose canine et viscérale	16
I.2.7. Traitement	17
I.2.8. Méthodes de lutte	17
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	19
II.1. OBJECTIF GENERAL	19
II.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES.....	19
III. MATERIEL ET METHODES	21
III.1.Site d'étude.....	21
III.2. Type et période d'étude.....	22
III.3. Techniques de collecte des données.....	22
III.4. Analyse statistique des données	24
III.5.Aspects éthiques	24
IV. RESULTATS.....	26
IV.1. Caractéristiques de la population d'étude.....	26

IV.2. Sérologie de la leishmaniose à <i>L. infantum</i> dans la population canine des sites d'étude	26
IV.3. Répartition des chiens séropositifs selon le signe clinique	27
IV.4. Résultats du diagnostic moléculaire des espèces de leishmanies responsables de la leishmaniose canine à Bobo-Dioulasso.	28
V. DISCUSSION.....	31
V.1. De la présence de <i>Leishmania infantum</i> au Burkina Faso	31
V.2. Des implications épidémiologiques.	31
V.3. De l'identification des symptômes chez les cas positifs.	32
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	35
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37
VIII. ANNEXES	42
Annexe 1 : Demande d'autorisation de collecte des données	A
Annexe 2 : Lettre d'autorisation de collecte des données.....	B
Annexe 3 : Fiche de collecte des données.	C
Annexe 4 : Formulaire d'information du propriétaire de chien.....	E
Annexe 5 : Fiche de consentement éclairé du représentant légal du chien.....	G
Annexe 6: Extraction de l'ADN kinétoplastique selon le kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissue kit® » (Qiagen, Valencia, CA; Janvier 2011).....	H

DEDICACES

A Notre Maman **LANKOANDE Namoussa** (*in memorium*). Repose en paix.

A nos Grands-Mères maternelle et paternelle **LANKOANDE Langnoassipoa et LANKOANDE Tampala** (*in memorium*). Merci pour n'avoir ménagé aucun effort pour notre éducation infantile et à l'école. Vous avez toujours répondu présentes dans les besoins afférant à notre éducation scolaire. Reposez en paix.

A notre **Papa** et ses **frères**. Merci à vous pour les valeurs morales et culturelles inculquées depuis l'enfance à maintenant.

A nos frères, sœurs, cousins et cousines. Soyons toujours unis.

A MON FILS ET MA CHERIE. Je me bats pour vous, merci de croire à mes convictions.

A notre ami le Docteur **Roman DECK et sa famille**: Nous vous remercions pour le soutien financier à la formation de ce programme de Master.

Au **Professeur Alain BOUGOUMA**. Nous n'avons pas assez de mots pour vous traduire notre gratitude. Simplement merci pour tout le soutien.

A notre Ami **Alexis KAFANDO**. Notre relation amicale est très forte et devrait servir de modèle pour les esprits progressistes.

A nos amis le Docteur **Zakaria GANAME, Abdoulaye NIANG, Paul SONDO**. Vous êtes plus que des amis pour nous, merci pour tous car nous avons appris beaucoup de choses avec vous. Continuons le combat.

A nos chers amis de la **Jeune Chambre Internationale (JCI) du Burkina**, en particulier de la **JCI-Orodara Verger (notre OLM)** et du président de la **Jeune Chambre de Mont Royal Jérôme LANKOANDE**. Une vision un défi tel est en résumé le motif de notre regroupement pour la culture du leadership au sein des jeunes que nous sommes.

Aux Docteurs **Clément Z. MEDA, Lassina KONATE, Paulin K. SOMDA**. Nous n'oublierons jamais notre bonne et franche collaboration à Orodara qui a porté beaucoup de fruits. Alors que nous étions Technicien de Laboratoire, vous avez toujours eu confiance en nous en nous confiant des tâches, et vous n'avez ménagé aucun effort pour nous accompagner dans notre vision de continuer les études. Que Dieu vous bénisse.

Aux Docteurs **Dramane BAYANE, Boukary CONGO, et Yacouba TRAORE**. Merci pour la collaboration et l'amitié partagées à Orodara.

A nos meilleurs amis: **Oscar NAVARRO, Gabriel YAMEOGO, Tahirou BARRY** et son épouse **Jen, Susan GAGLIARDI, Fernando De PERALTA**, (**PAROU Jean De Dieu, Basile KONE** *j'ose croire que vous avez mis la Nicotine dans la mer de l'oubli!*), **Marcel KIENTEGA, Samuel GUITANGA, Charles KAMBOU, Clément LANKOANDE, Mahamadi SAWADOGO, Mamoudou MAIGA, Moussa TRAORE, Hampougini TINDANO, François OUEDRAOGO, Issouf OUEDRAOGO, Jonas B. YOULOU, Moussa HARO** dit «*LAMA*», **Tampouor DA, Mme Henriette OUEDRAOGO, Souleymane LY**. Grand merci à vous pour tous les soutiens multiformes.

Aux **Familles DIABOUGA** à Sarfalao et **OUEDRAOGO** à Ouaga. Merci pour le soutien affectueux dans les temps difficiles.

Aux camarades étudiants de la **3^{ème} Promotion du MASTER**. «*Ouuhh*» beaucoup d'entre nous ont voulu replier à cause de la rigueur et la dureté de la formation, rendons grâce à Dieu pour avoir pu tenir, aujourd'hui tous joyeux car nous sortons grands gagnants et tenons bon pour la suite!

Aux camarades étudiants de l'**Unité de Recherche Paludisme et Maladies Tropicales Négligées** du Centre MURAZ. En thèse de PhD (**NIANG, MAIGA** *petit fou, BILGO, SOMDA, EPOPA, SISSAO,...*) et en Master (**SOMA, PODA, les MILLOGO, OUATTARA, SANOU,...). Le combat continue.**

A tous les collègues du Centre MURAZ, en particulier **Kobo GNADA, Eli KABRE, Alidou ZANGO, Ali OUARI, Michel MOUKORO, Roger SANOU, Sibiri YARGA, Ali NANA, Aboubakar SOMA, Mamoudou OUEDRAOGO**. Merci pour vos soutiens multiformes.

REMERCIEMENTS

Au **Professeur Tinga Robert GUIGUEMDE**. Cher maître vous êtes Professeur titulaire de Parasitologie du C.A.M.E.S, Directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Santé (ED-SDS), Président de l'Académie des Sciences du Burkina, Docteur *Honoris Causa* de l'Université de Bordeaux II, chercheur au centre MURAZ. Président de la Société Africaine de Parasitologie médicale. Internationalement reconnu et apprécié pour vos connaissances scientifiques, vous êtes une référence mondiale en matière de Parasitologie médicale. Nous sommes très fier d'avoir bénéficié de vos enseignements. Que Dieu vous bénisse.

Au **Professeur Adrien Marie Gaston BELEM**. Vous êtes Professeur titulaire de Parasitologie à l'U.P.B. Cher Maître, malgré vos multiples préoccupations vous avez accepté de siéger dans notre jury. Recevez nos sincères remerciements.

Au **Docteur Jean-Bosco OUEDRAOGO**, Directeur de Recherche, Directeur Régional de la Recherche et de l'Innovation Technologique des Hauts Bassins et Directeur Régional de l'Ouest de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé. Merci pour nous avoir accueilli dans sa structure pour cette étude.

Au **Maître de Conférences Agrégé Nicolas MEDA**, Directeur Général du Centre MURAZ. Merci pour nous avoir permis de poursuivre cette formation. Cette opportunité offerte à nous professionnels permet sans doute le renforcement des capacités des ressources humaines de l'institution.

Au **Docteur Roch Kounbobr DABIRE**, Directeur de Recherche à l'I.R.S.S/C.N.R.S.T, Chef du Département des maladies transmissibles au Centre MURAZ. Cher maître vous êtes Président de la Société Burkinabé de Parasitologie, Chevalier des Palmes académiques et Membre du Comité Pédagogique de l'Ecole Doctorale en Sciences de la Santé de l'U.P.B. Vous avez dirigé ce travail d'une main de maître et vous avez forcé notre admiration par votre souci permanent de la perfection. Votre disponibilité permanente tout au long de ce travail nous est allée droit au cœur. Nous ne vous remercierons jamais assez pour le sacrifice que vous avez consenti à notre faveur. Que Dieu vous bénisse. Notre prochain défi en ligne de mire est le Master International d'Entomologie ou autre formation équivalente et nous comptons encore beaucoup sur vous cher Maître.

Au **Docteur Ibrahim SANGARE**. Vous êtes Assistant à l'IN.S.SA, ancien interne des hôpitaux du Burkina, docteur en Pharmacie, docteur en Parasitologie médicale. Chacune des pages de ce travail porte en elle vos empreintes. Vos précieux conseils nous ont servi de

repère et de guide. Puisse Dieu accorder sa grâce abondante et sa bénédiction à toute votre famille. Toute notre gratitude !

Au **Maître de Conférences Agrégé Sanata BAMBA**. Cher maître vous êtes maître de conférences agrégée de Parasitologie médicale, docteur en Pharmacie, docteur en Parasitologie médicale. Et le responsable pédagogique du Master1 à l'IN.S.S.A. Nous vous sommes très reconnaissant pour l'encadrement et les conseils donnés durant cette formation. Merci pour tout, cher Maître.

Au **Docteur Halidou TINTO**. Cher maître vous êtes docteur en Pharmacie, docteur en Parasitologie médicale et Maître de Recherche à l'I.R.S.S/C.N.R.S.T. Chevalier des Palmes académiques. Vous êtes le responsable pédagogique du Master 2. A jamais nous ne regretterons de vous avoir eu comme encadreur. Tant d'étudiants souhaiteraient bénéficier des legs de vos connaissances scientifiques. Merci pour tout, cher Maître.

A tous les autres enseignants et le personnel de la scolarité. Les **Docteurs Abdoulaye DIABATE, Hama DIALLO, Mamoudou CISSE, Léon SAWADOGO, Leonard BERE, Hermann SORGHO, Maxime DRABO**, et l'Inspecteur **Djakalia CISSE**.

Au **Docteur Aly DRABO**. Chef de l'Unité de Biologie Clinique pour ses conseils et sa compréhension durant cette formation.

Aux **Docteurs Alain HIEN, Francis HIEN, Moussa NAMOUNTOUGOU, Seydou YARO, Mesdames Thérèse KAGONE et Antoinette KABORE**. Merci pour tous vos conseils durant cette formation.

Au **Directeur provincial** des ressources animales et halieutiques, **Monsieur Dofinita KOURA** pour sa disponibilité et son accompagnement durant notre étude.

Aux **agents de santé communautaire** pour nous avoir servi d'intermédiaires avec les propriétaires, toute chose qui a facilité l'accès aux chiens.

Au Laboratoire Mixte International sur les Maladies à Vecteurs en Afrique de l'ouest (**LAMIVECT**) qui nous a appuyé financièrement pour la réalisation de cette étude.

A **Monsieur Bienvenue YAMEOGO**. Merci pour l'encadrement durant notre stage pratique à l'I.R.S.S. Vous nous avez transmis les procédures techniques de la PCR nichée appliquées aux leishmanies. Que Dieu vous bénisse.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADNk	: Acide Désoxyribonucléique kinétoplastique
ANOFEL	: Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie
BET	: Bromure d'éthidium
C.A.M.E.S	: Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur
C.N.R.S.T	: Centre National de Recherche Scientifique et Technologique
°C	: degree Celcius
DAT	: Direct Agglutination Test
dNTPs	: Désoxyribo nucléotides triphosphates
D.P.R.A.H	: Direction Provinciale des Ressources Animales et Halieutiques.
EDTA	: Ethyl Diamine Tétra Acétique.
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESCAPP	: European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
IC	: Intervalle de Confiance
IDA	: Immuno-Diffusion Assay
IFD	: Immuno Fluorescence Directe
IFAT	: Indirect Immunofluorescent Antibody Test
Ig	: Immunoglobuline
INFg	: Interféron gamma
IN.S.SA	: Institut Supérieur des Sciences de la Santé
I.R.S.S	: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
LAMIVECT	: Laboratoire Mixte International sur les Maladies à Vecteurs
LDPKA	: Leishmaniose dermique post-kala-azar
LV	: Leishmaniose viscérale
LVA	: Leishmaniose viscérale anthroponotique
LVH	: Leishmaniose viscérale humaine
LVZ	: Leishmaniose viscérale zoonotique
LVZA	: La leishmaniose viscérale zoonotique de l'adulte
LVZE	: Leishmaniose viscérale zoonotique classique de l'enfant
NNN	: Novy-Mc Neal-Nicolle
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé

Pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PVVIH	: Personne vivant avec le VIH
RPMI	: Rosewell Park Memorial Institute
TDR	: Test de Diagnostic Rapide
U.P.B	: Université Polytechnique de Bobo
U.S.A	: United States of America
µm	: Micromètre
VIH	: Virus d'Immuno - Déficience Humaine
spp	: <i>sensus pro parte</i>
TBE	: Trizma acid-Boric EDTA
WHO	: World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition géographique des leishmanioses dans le monde.....	5
Figure 2: Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde.	6
Figure 3: Coexistence de la leishmaniose viscérale humaine et canine.....	6
Figure 4: Les deux stades morphologiques de <i>Leishmania spp</i>	9
Figure 5 : Cycle de vie et de transmission des leishmanies	13
Figure 6 : Cas de leishmanioses canines	14
Figure 7 : Cas de leishmanioses viscérales anthroponotiques ou Kala azar.	15
Figure 8 : Cas de Leishmaniose Dermique Post-Kala-azar (LDPKA).....	16
Figure 9: Position géographique des sites d'échantillonnage dans la ville de Bobo-Dioulasso.	21
Figure 10 : Photo de gel d'agarose à 1,5% montrant les fragments d'ADN issus de biopsie cutanée et de culot leucocytaire après amplification.....	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Distribution géographique des espèces de <i>Leishmania</i> infectant les chiens et leurs vecteurs	8
Tableau II : Répartition des résultats de la sérologie des chiens par quartier	26
Tableau III: Répartition des chiens séropositifs par tranche d'âge	27
Tableau IV: Répartition des résultats de la sérologie en fonction du sexe	27
Tableau V: Répartition des signes rencontrés chez les cas séropositifs.....	28
Tableau VI: Analyses moléculaires des espèces de leishmanies en fonction des specimen biologiques	28

RESUME/ABSTRACT

RESUME

Investigation sur le réservoir canin de *Leishmania infantum*, agent de la leishmaniose viscérale humaine (LVH).

La leishmaniose viscérale chez l'Homme est une parasitose systémique potentiellement mortelle due à un protozoaire du genre *Leishmania*. Elle est rarement rencontrée en Afrique de l'Ouest. Au Burkina Faso, aucun cas de leishmaniose viscérale (LVH) n'a été rapporté à ce jour. Les chiens domestiques sont connus pour jouer un rôle de réservoirs de *Leishmania infantum*, agent causal de la LVH. Notre étude avait pour but d'investiguer sur la circulation de ce parasite dans la population canine de la ville de Bobo-Dioulasso. Nous avons effectué un enrôlement actif de chiens dans six (6) secteurs (Belle-Ville, Kodeni, Kwa, Nieneta, Sarfalao, Sakaby) situés au centre et en périphérie de la ville, de juillet à décembre 2013.

Le test rapide DiaMed-IT LEISH® et la PCR ont permis respectivement de faire un diagnostic sérologique et de déterminer l'espèce de leishmanie responsable de la maladie. Sur un total de 89 chiens testés, cinq (5) étaient séropositifs, soit un taux de séropositivité de 5,61%. Ce taux ne variait pas significativement en fonction de l'âge et du sexe. Sur 4 biopsies et 5 échantillons de culot leucocytaire testés en PCR, respectivement 3/4 (75%) et 1/5 (20%) ont confirmé que *L. infantum* était l'espèce en cause. Tous les cinq (5) cas présentaient des symptômes et/ou des lésions (lésions cutanées, dermatite exfoliative, alopecie et amaigrissement).

Notre enquête a permis de montrer pour la première fois que *L. infantum* circule chez les chiens au Burkina Faso. Ceux-ci pourraient constituer les réservoirs avec la possibilité de l'existence des cas de LVH qui ne seraient diagnostiqués. Vu que c'est une maladie à transmission vectorielle, il serait nécessaire de mener des enquêtes entomologiques pour identifier les vecteurs potentiels impliqués dans le cycle de la transmission, afin de mettre en place une stratégie de lutte anti-vectorielle. Cette perspective de lutte se baserait sur le concept *One Health* qui associe santé animale et humaine.

Mots clés : *L. infantum*, chiens, sérologie, PCR, Bobo-Dioulasso.

ABSTRACT

Investigation on canine reservoir of *Leishmania infantum*, agent of human visceral leishmaniasis (HVL).

Human visceral leishmaniasis is a systemic and potentially lethal disease caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus. That disease is rarely found in West Africa. Any case has been yet reported in Burkina Faso. Domestic dogs act as the main reservoir hosts of *Leishmania infantum*, causative agent of HVL. Our study was intended to investigate on the dogs in Bobo-Dioulasso city, the presence of *L. infantum*, agent of human visceral leishmaniasis. An enrollment of domestic dogs was carried out in six (6) areas (Belle-Ville, Koden, Kwa, Nieneta, Sarfalao, Sakaby) in the center and suburb of the city from July to December 2013.

The rapid diagnostic test DiaMed-IT LEISH®, and PCR allowed respectively determining the serological status for canine visceral leishmaniasis and the species of *Leishmania* responsible for the disease. Out of 89 dogs sampled, five (5) dogs were seropositive with a seropositivity rate evaluated at 5.61%. No statistically significant change in seropositivity was observed according to age and gender. On 4 cutaneous biopsies and 5 buffy coats samples from seropositive dogs, PCR confirmed in respectively 3/4 (75%) and 1/5 (20%), the presence of *L. infantum*. So all the five cases presented symptoms and/or (cutaneous lesions, exfoliative dermatitis, alopecia and lost weight).

Our survey indicates that *L. infantum* is now circulating within canine populations in Bobo-Dioulasso. That means they could be reservoir hosts and that human visceral leishmaniasis cases would exist but are not diagnosed. As a vector born disease, entomological surveys must be carried out, in order to identify the main vector which is acting to favor the transmission cycle, and to enable the implementation of a vector control strategy. This perspective of struggle would be based on the *One Health* approach that involves human and animal health.

Keywords: *L. infantum*, dogs, serology, PCR, Bobo-Dioulasso.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, transmis de mammifère à mammifère par piqûre d'un diptère vecteur, le phlébotome femelle infecté. Il s'agit d'un groupe de maladies extrêmement divers tant sur le plan clinique qu'épidémiologique. On distingue la leishmaniose viscérale (fièvre de Dum Dum ou le Kala-azar), la leishmaniose cutanéomuqueuse (Espundia ou Pian-bois ou ulcère de chichéros) et la leishmaniose cutanée (Bouton d'Orient).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le poids des leishmanioses reste considérable. En effet, 88 pays sont concernés dont 72 pays en développement. Les zones d'endémie sont l'Europe du Sud et de nombreux pays d'Afrique de l'Est, d'Asie du Sud, d'Amérique du Sud. On note une augmentation de l'incidence des leishmanioses dans le monde. Trois cent cinquante (350) millions de personnes sont exposées et environ 2 millions de nouveaux cas humains sont répertoriés chaque année (1,5 millions concernant la forme cutanée, et 0,5 million la forme viscérale). La mortalité due à cette pathologie est estimée à 60 000 cas par an (1). Les enfants et les immunodéprimés constituent les groupes les plus vulnérables. Au Burkina Faso, une étude réalisée par Guiguemdé et al montrait en 2003 une vulnérabilité de 13,3% chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) (2). La leishmaniose a été donc considérée par l'OMS comme une priorité dans son programme de recherche sur les Maladies Tropicales Négligées.

Contrairement à la leishmaniose cutanée ou muco-cutanée qui peut se guérir, la forme viscérale mérite une attention particulière car en l'absence de traitement elle est mortelle. Elle est présente dans 33 pays mais six pays recensent 90% des cas : Inde, Bangladesh, Népal, Soudan, Soudan du sud et Brésil. En Afrique, la leishmaniose viscérale est causée par les espèces *Leishmania infantum* et *L. donovani* (3-5) et *L. donovani* en Afrique de l'Est (5, 6). Cependant dans la partie ouest du continent cette forme est considérée rare, et seuls quelques cas isolés ont été rapportés, en Gambie, au Togo, au Nigeria, au Niger, en Côte d'Ivoire et au Sénégal (7-10). Au Burkina Faso aucun cas confirmé de leishmaniose viscérale n'a encore été rapporté (11). Mais des vecteurs potentiels susceptibles de transmettre la leishmaniose viscérale ont été identifiés au Burkina et aussi au Niger (12-14). Par ailleurs, le chien connu pour être un réservoir canin dans le cycle de la leishmaniose viscérale, a été suspecté infecté à Bobo-Dioulasso. La promiscuité de l'homme avec le chien est considérée comme un facteur de risque important de transmission (10). De même des études récentes avaient rapporté la présence de vecteurs potentiels d'agents de la leishmaniose viscérale à Bobo-Dioulasso(14).

Ainsi même si aucun cas de LVH n'a été rapporté au Burkina, il s'est avéré nécessaire de vérifier la présence de *L. infantum* dans la population canine suspectée être le principal réservoir de ce parasite à Bobo-Dioulasso. Notre étude qui n'a pas la prétention d'aborder toutes les composantes de cette parasitose, a eu donc pour objectif principal de mettre en évidence du réservoir canin de la leishmaniose viscérale dans la ville de Bobo-Dioulasso. Les objectifs spécifiques étaient de :

- rechercher la présence du parasite chez des chiens en fonction de leur zone géographique,
- déterminer la présence du parasite selon l'âge, le sexe des chiens,
- vérifier si la présence du parasite était accompagnée de signes cliniques.

GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES

I. GENERALITES SUR LES LEISHMANIOSES

I.1. Définition des leishmanioses , importance en santé publique et aires de répartition

I.1.1. Définition des leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires du genre *Leishmania*. Parasites essentiellement zoonotiques, ils sont transmis à l'homme à travers son système de phagocytes mononucléaires par un diptère, le phlébotome femelle infecté. Il existe plus d'une vingtaine d'espèces pathogènes pour l'homme, chez qui ils déterminent trois (03) tableaux cliniques différents (6). Ces formes cliniques sont fonction de la localisation du parasite chez l'homme. Ainsi, on a la leishmaniose cutanée, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose cutanéomuqueuse.

I.1.2. Importance en santé publique

La leishmaniose est la deuxième cause de mortalité due à un parasite derrière le paludisme. Du point de vue morbidité, la leishmaniose constitue la troisième maladie parasitaire vectorielle après le paludisme et les filarioses lymphatiques (15). On estime qu'à travers le monde, 14 000 000 de personnes sont atteintes de la leishmaniose, avec environ deux millions de nouveaux cas par an, et que seulement le tiers des cas est déclaré officiellement. Elle est présente dans tous les continents excepté l'Océanie et est endémique dans 88 pays dont 22 principalement en Amérique latine et 66 en Europe, en Afrique et en Asie. Cependant les données dont on dispose sur la prévalence et l'incidence pour évaluer pleinement l'impact de la leishmaniose ne sont pas fiables. Elle n'est à déclaration obligatoire que dans 33 des 88 pays d'endémie. La leishmaniose est devenue dans certains pays un problème sanitaire d'urgence et le nombre de cas devrait continuer d'augmenter dans les années à venir car il semblerait que les cas ne soient plus confinés aux zones d'endémie. Les coinfections *Leishmania*/VIH sont considérées comme une réelle menace, en particulier dans le sud-ouest de l'Europe. En effet, 1440 des 1700 premiers cas notifiés par l'OMS dans 33 pays du monde jusqu'en 1998, provenaient de cette partie de l'Europe. Dans les Amériques, la majorité des coinfections sont signalées au Brésil, où l'incidence est passée de 0,8 cas pour 100 000 habitants en 1986 à 10,5 pour 100 000 en 1996 (OMS, 2010). Au Burkina Faso, jusque-là seules des lésions cutanées à *Leishmania major* (zymodème MON-74) ont été

rapportées et suivant un mode endémique (2, 16-18) . Le principal vecteur suspecté au Burkina Faso est *Phlebotomus duboscqi* (13, 19).

I.1.3. Aires de répartition

La répartition géographique des leishmanioses dépend de celle des phlébotomes vecteurs et des mammifères réservoirs. À chaque aire géographique d'endémicité correspond généralement un cycle biologique particulier de leishmanie. Les cartes ci-dessous (**figures 1, 2 et 3**) décrivent les différentes aires de répartition des leishmanioses dans le monde.

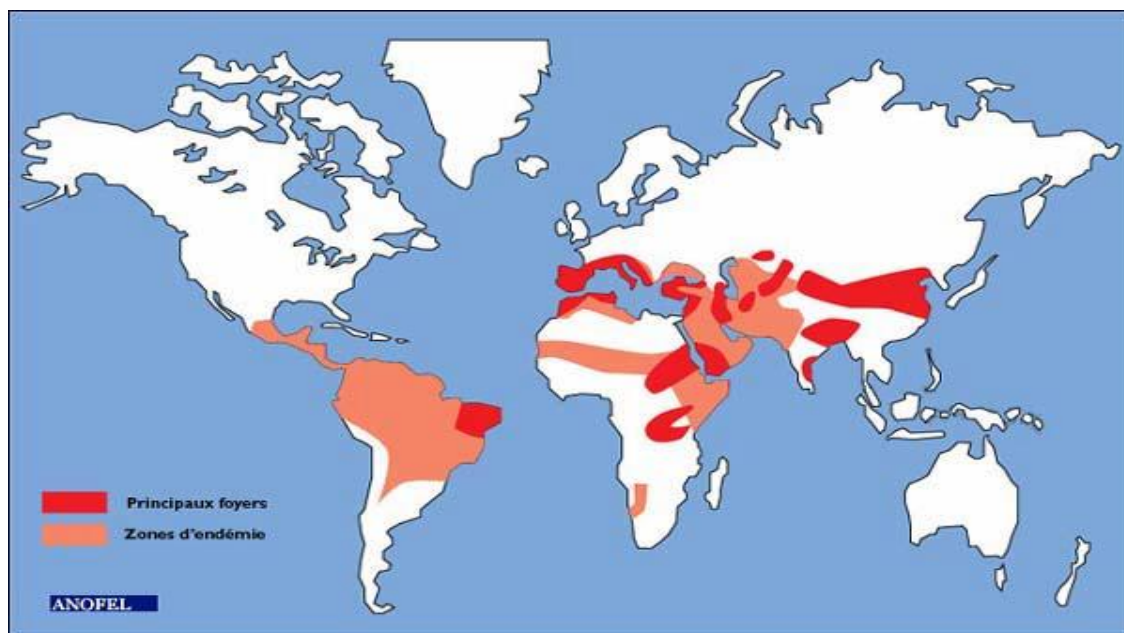


Figure 1 : Répartition géographique des leishmanioses dans le monde.

Source: www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-parasitologie/cycle2/poly/0700fra.asp consulté le 19/10/2013 à 11h57

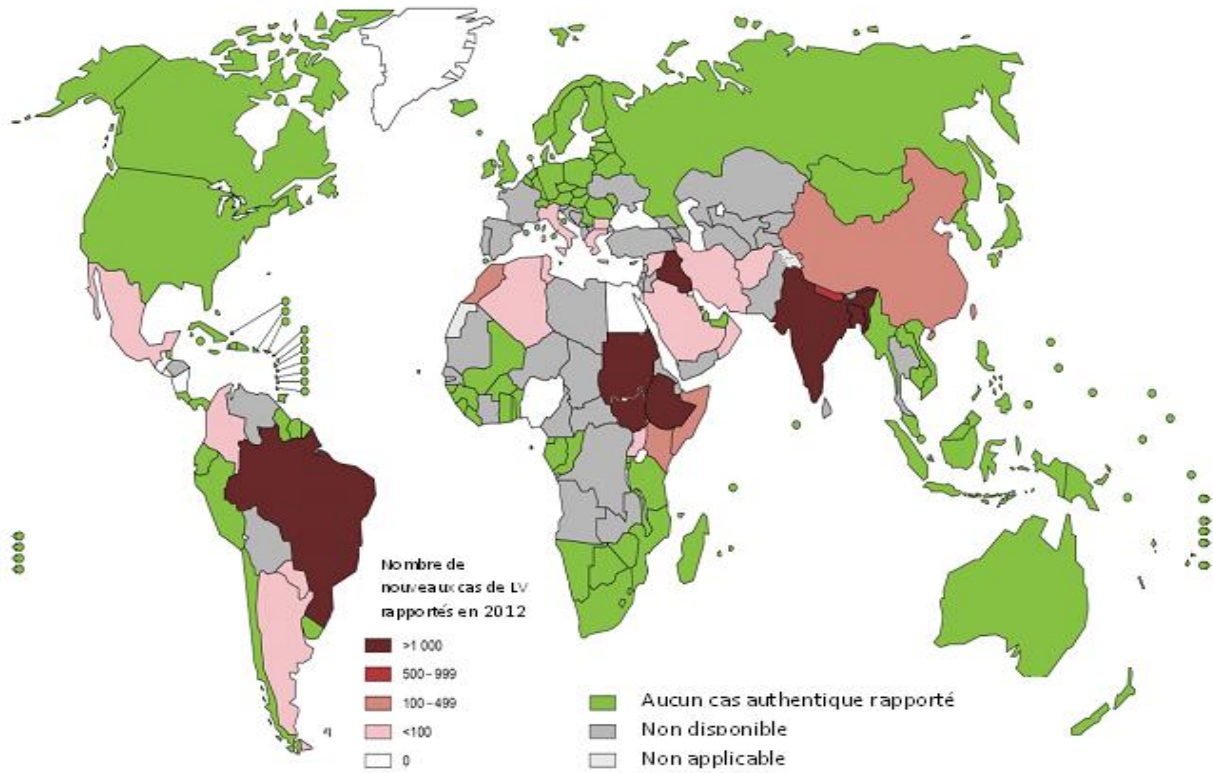


Figure 2: Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde.

Source: http://gamapservet.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png

Site consulté le 21/12/2014 à 13h 25

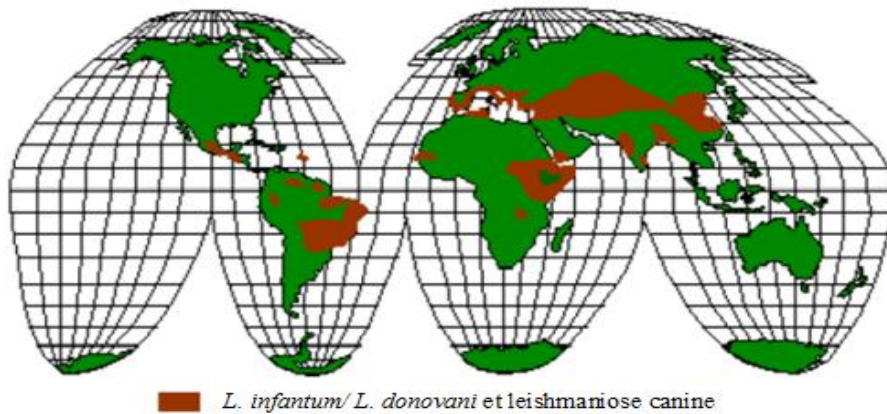


Figure 3: Coexistence de la leishmaniose viscérale humaine et canine.

Source: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/leishmap.gif> consulté le 19/10/2013 à 12h15

I.2. La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) est une infection généralisée atteignant les organes profonds du système de phagocytes mononucléés en particulier la rate, le foie et les ganglions lymphatiques. Connue sous le nom de fièvre noire, Kala-Azar (20), elle constitue la forme la plus grave des leishmanioses. Sans traitement, elle est mortelle. La LV est présente dans plus de 47 pays dans le monde avec une incidence annuelle moyenne estimée à environ 500 000 nouveaux cas. Il y a principalement cinq foyers : indien, méditerranéen, chinois, américain (Brésil), africain (5). Elle est principalement causée par deux espèces, *L. donovani* et *L. infantum*. *Leishmania. donovani* est responsable de la LV anthroponotique (LVA) alors que *L. infantum* (synonyme: *L. chagasi* en Amérique du Sud) est responsable de la LV zoonotique (LVZ) (1) .

I.2.1. Agent pathogène

I.2.1.1. Taxonomie

Les leishmanies appartiennent au

Règne: *Protista* (Heackel 1866)

Sous-Règne: *Protozoa* (Goldfuss 1817, Emend Siebold 1848)

Embranchement: *Sarcomastigophora* (Honigberg et Balamuth 1963)

Classe: *Zoomastigophorea* (Calkins 1909)

Ordre: *Kinetoplastida* (Honigberg 1963, Emend Vichekrman 1976)

Famille: *Trypanosomatidae* (Dolffin 1901, Emend Grabben 1905)

Genre: *Leishmania* (Ross 1903).

Le genre *Leishmania* est subdivisé en deux sous-genres, selon que le parasite se développe dans la partie centrale ou postérieure de l'intestin du vecteur, respectivement : le sous-genre *Leishmania* (Ross, 1903) et le sous-genre *Vianna* (Lainson et Shaw, 1987).

Pour la leishmaniose viscérale, les complexes à tropisme viscéral sont : le **complexe *L. donovani***: *L. donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), *L. archibaldi* (Castellani et Chalmers, 1919) et le **complexe *L. infantum***: *L. infantum* (Nicolle, 1908), *L. chagasi* (Cunha et Chagas, 1937) (21).

Les complexes à tropisme non viscéral concernent les agents des complexes de la leishmaniose cutanée et ceux des complexes de la leishmaniose cutanéomuqueuse.

De ces parasites, seule une vingtaine d'entre eux sont considérés comme pathogènes pour l'homme et dix ont été isolées chez les chiens à savoir : *L. infantum* (ou *chagasi* dans le « Nouveau Monde »), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* et *L. colombiensis* (22). (Tableau I)

Tableau I: Distribution géographique des espèces de *Leishmania* infectant les chiens et leurs vecteurs (23).

Espèces de Leishmanies	Distribution géographique	Vecteurs prouvés	Vecteurs suspectés
<i>L. infantum</i>	Bassin Méditerranéen Moyen Orient	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiixi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobbi</i> , <i>P. kandelakii</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , etc.
	Asie du Sud, Iran, Arménie, Afghanistan	<i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , etc <i>P. smirnovi</i> , <i>P. transcaucasicus</i> , <i>P. Longiductus</i>
	Asie centrale, Chine		
<i>L. infantum</i> = <i>L. chagasi</i>	Amérique centrale et du sud	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>L. olmeca olmeca</i> .	<i>L. antunesi</i> , <i>L. shannoni</i>
<i>L. donovani</i>	Afrique de l'est	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	Afrique du Nord	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Amérique centrale et du sud	<i>L. wellcomei</i> , <i>L. spinicrassa</i> , <i>L. whitmani</i> , <i>L. yucumensis</i> , <i>L. carrerai carrerai</i> , <i>L. llanosmartinsi</i> , <i>L. ovallesi</i> , <i>L. intermedia</i> , <i>L. gomesi</i> , <i>L. trapedoi</i> , <i>L. ylephiletor</i> , <i>L. umbratilis</i> ,	
<i>L. peruviana</i>	Andes péruviennes	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i> , <i>L. ayacuchensis</i>	<i>L. noguchii</i> , <i>L. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	Amérique centrale	<i>L. trapedoi</i> , <i>L. ylephiletor</i> , <i>L. gomesi</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. hartmanni</i>	<i>L. shannoni</i> , <i>L. ovallesi</i> , etc.

I.2.1.2. Morphologie

Les leishmanies se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques distincts: les promastigotes et les amastigotes.

Les promastigotes: ce sont les formes *Leptomonas*. Formes mobiles, elles sont présentes dans le tube digestif du phlébotome femelle et mesurent 15-25 μm de long sur 1,5-3,5 μm de large. Le noyau est central, un kinétoplaste antérieur. Les promastigotes ont une extrémité antérieure arrondie avec un flagelle libre long 15-28 μm ; (**figure 4A**).

Les amastigotes: Ils sont dits formes *Leishmania*. Ils sont immobiles, présents chez l'hôte vertébré (homme, animal réservoir). Ils y sont parasites intracellulaires obligatoires des cellules du système des phagocytes mononucléés. Ils sont ronds ovoïdes de 2-6 μm de diamètre (**figure 4B**)

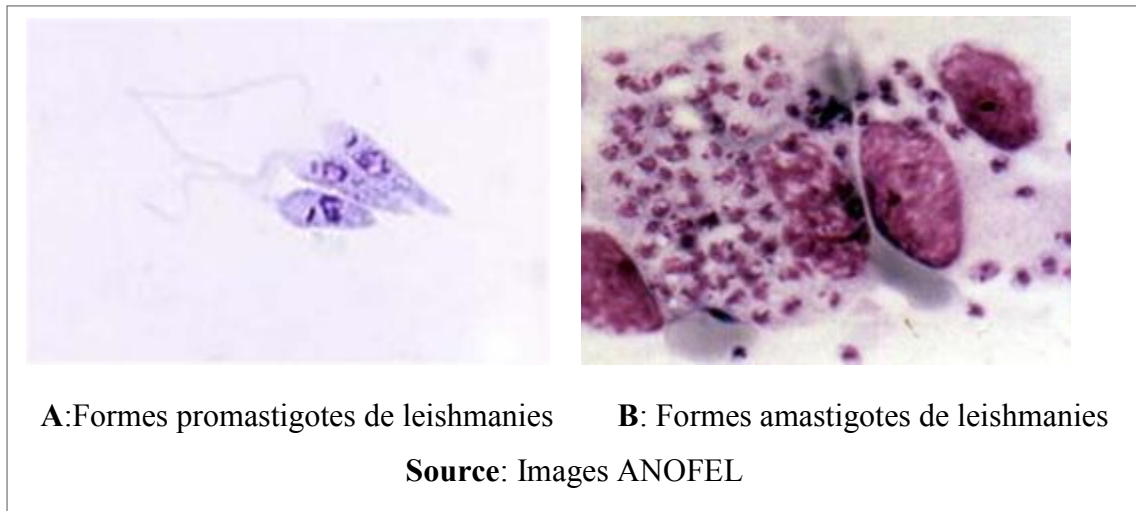


Figure 4: Les deux stades morphologiques de *Leishmania spp*

I.2.1.3. Biologie

Les leishmanies évoluent successivement chez deux hôtes: chez l'hôte définitif constitué par des vertébrés mammifères (Homme, chien,...) et chez l'hôte intermédiaire invertébré un arthropode qui est le phlébotome femelle. Le glucose, la proline et les nucléosides sont utilisés par les parasites comme source d'énergie métabolique par pinocytose. Par sa taille et sa polarité, le parasite peut passer à travers les membranes cellulaires par simple diffusion et nécessite donc des systèmes de transport spécifiques. Les leishmanies se reproduisent par scissiparité dans l'intestin du phlébotome et au niveau des cellules du système de phagocytes mononucléés.

I.2.2. Vecteur

Les vecteurs des leishmanies sont les phlébotomes qui sont des diptères nématocères de petite taille, mesurant 2 à 3 mm et sont parfois confondus avec des petits moustiques. Ils appartiennent à la famille des *Psychodidae* Bigot, 1854 et à la sous-famille des *Phlebotominae* Kertész, 1904. Ils sont de couleur claire, jaune pâle à brune, à peine visible à l'œil nu. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent pendant la saison chaude (mai à Octobre) en zones tempérées, quand la température est élevée (20°C et plus), en absence de vent (limite : 1 kilomètre par seconde) et en présence d'une humidité relative supérieure à 45%. Seule la femelle est hématophage; elle s'alimente par telmophagie de sang et de lymphe. Les mâles et les femelles (en dehors de la période de reproduction) se nourrissent de sucs végétaux. Contrairement à d'autres diptères comme les moustiques, les phlébotomes sont de mauvais voiliers. Ils se déplacent par vols courts avec des arrêts fréquents ; leur rayon maximum de déplacement varie selon les espèces et estimé d'environ 1 kilomètre.

Ils ont une grande importance médicale du fait de leur rôle vecteur dans plusieurs affections humaines et animales. Ils peuvent en effet, inoculer à l'homme de germes responsables de la leishmaniose, de la bartonellose ou maladie de Carrion en Amérique du Sud, de la fièvre de trois jours ou fièvre à Papataci en Afrique du Nord et dans une partie de l'Asie et les arboviroses à phlébovirus dans la région méditerranéenne (13, 24, 25) .

On recenserait 133 espèces de phlébotomes en Afrique de l'Ouest dont 32 au Burkina Faso (26). En 2009 à Bobo Dioulasso, 153 phlébotomes ont été capturés appartenant principalement aux genres *Sergentomyia* et *Phlebotomus* (27).

Les vecteurs majeurs de la leishmaniose viscérale varient en fonction des régions (**Tableau I**) ci-dessus. Dans l'Ancien Monde, *L. donovani* est transmise par *Phlebotomus alexandri*, *P. martini*, *P. argentipes*, *P. orientalis* tandis que *L. infantum* est transmise par *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. langeroni*, *P. chinensis*, *P. halepensis*, *P. simici*, *P. brevis*, *P. Longiductus*, *P. longicuspis*, *P. kyreniae*, *S. schwetzi*, *S.dubia*. Dans le Nouveau Monde, *L. chagasi* équivalente de *L. infantum* est transmise essentiellement par *Lutzomyia longipalpis*, *L. evansi*, *L. olmeca olmeca* (6, 23, 28).

I.2.3. Réservoirs principaux de la leishmaniose viscérale

I.2.3.1. Réservoirs anthroponotiques

Le cycle parasitaire de *L. donovani* est actuellement considéré comme strictement anthroponotique. En effet l'Homme est le seul mammifère directement retrouvé infesté en zone d'endémie (1, 6).

I.2.3.2. Réservoirs zoonotiques

L'existence de vecteurs susceptibles et de réservoirs parasités détermine la présence de *L. infantum* et le maintien de son cycle biologique. A cause de sa domestication, le chien (*Canis familiaris*) est considéré comme le réservoir principal de *L. infantum* et chez qui l'infection devient généralement chronique (29, 30). Il participe ainsi activement dans le cycle parasitaire dans le nouveau et ancien monde (15).

D'autres carnivores notamment ceux sauvages ont été trouvés infectés par *L. infantum* : le renard rouge patéarétique (*Vulpes vulpes*), plusieurs espèces de chacals (*Canis spp*), le loup (*Canis lupus*), le fennec (*Fennecus zerba*) et le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*) (6).

Le rat de l'espèce *Rattus rattus* péri-domestique présent dans de nombreux pays, est fortement soupçonné de constituer un hôte réservoir secondaire de *L. infantum* (5).

I.2.4. Transmission et cycle évolutif des leishmanies.

I.2.4.1. Transmission des leishmanies.

La transmission est essentiellement assurée par la piqûre de phlébotomes femelles infectés. Mais le rôle potentiel d'autres ectoparasites hématophages comme les tiques ou les puces (*Rhipicephalus sanguineus* ou *Ctenocephalides felis*) dans la transmission de ces protozoaires a été rapporté (31). La transmission par contact direct avec les sécrétions nasales et oculaires du chien ou avec les lésions est également possible (32). L'inoculation parentérale accidentelle est possible au laboratoire. La transmission congénitale de la mère à l'enfant est possible dans la leishmaniose viscérale. La transmission par transfusion sanguine est possible (33). La transmission sexuelle a été également rapportée (34). La transmission par transplantation d'organes a été notifiée en zone d'endémie (35).

I.2.4.2. Cycle évolutif de *Leishmania spp*

Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes avec un dimorphisme marqué selon l'hôte. Chez l'Homme et les autres mammifères on retrouve le stade amastigote, intracellulaire, tandis que chez le phlébotome il se présente sous la forme extracellulaire promastigote (**figure 5**).

Chez l'hôte invertébré (Arthropode : Phlébotome)

Il s'infeste après un repas sanguin contenant des formes amastigotes de leishmanies. Dans le tube digestif du phlébotome, ces parasites se différencient en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et mobiles, appelés nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des stades métacycliques vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis. Après une semaine environ, ces parasites sont transmis aux mammifères lors du repas sanguin (36).

Chez l'hôte vertébré (réservoirs /hôte définitif de parasites)

Chez l'hôte vertébré, les leishmanies survivent et se multiplient par scissiparité sous forme amastigote à l'intérieur des phagolysosomes des cellules du système des phagocytes mononucléés (macrophages, histiocytes, cellules réticulaires de la rate, des ganglions, de la moelle osseuse, cellules de Küppfer du foie, monocytes). La prolifération des parasites entraîne l'éclatement des cellules infestées, les amastigotes ainsi libérés vont être phagocytés par des macrophages avoisinants ce qui entraîne la généralisation de l'infection dans l'organisme de l'hôte. Ce cycle est complété quand le phlébotome femelle pique de nouveau le mammifère infecté ingérant ainsi les macrophages contenant les parasites et en produisant les formes métacycliques infestantes (37).

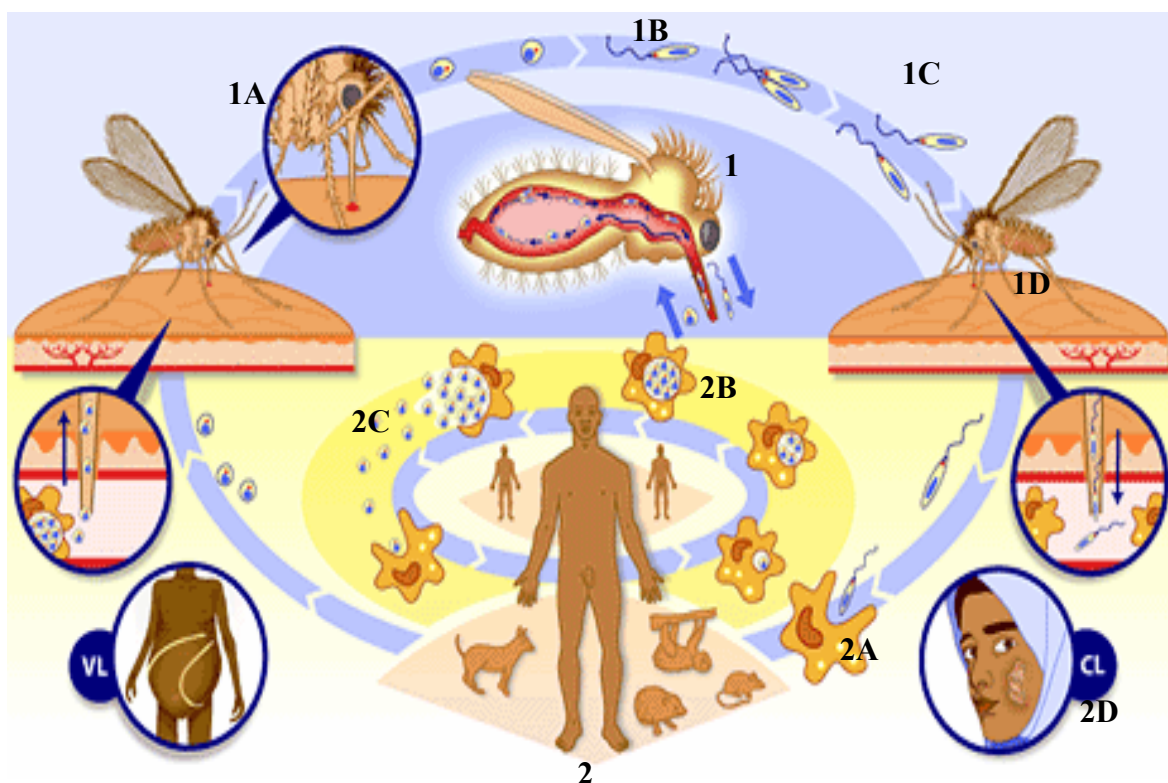


Figure 5 : Cycle de vie et de transmission des leishmanies

Source : <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/> site consulté le 20/10/2013 à 11h23

Légende:

1: Hôte intermédiaire (Phlébotome femelle);1A: Prise de sang contenant les formes amastigotes; **1B:**Formation de promastigotes procycliques; **1C :** Promastigotes métacycliques infectantes; **1D:**Transmission des stades 1C à l'hôte définitif

2: Hôtes vertébrés (Homme, canidés, rongeurs,...) : **2A:** Envahissement des cellules du système de phagocytes mononucléés; **2B:** Formation d'amastigotes intracellulaires; **2C:** Destruction des cellules infectées et envahissement des cellules voisines; **2D:** Forme clinique possible en fonction de l'espèce de leishmanie.

I.2.5. Manifestations cliniques de la leishmaniose canine et viscérale humaine

I.2.5.1. La Leishmaniose canine

La leishmaniose du chien est due à la présence et à la multiplication dans les cellules du système de phagocytes mononucléés, de protozoaires flagellés appartenant à l'espèce *Leishmania infantum*. Le délai d'incubation peut être très long et se situe entre 3 mois et 7 ans avant l'apparition des signes. La pathologie se traduit par un polymorphisme clinique (38). Le

premier signe observé, avant même la dissémination des leishmanies dans l'organisme, est en général une lésion cutanée transitoire due à la piqûre du phlébotome infectant.

Les manifestations surtout cliniques sont d'ordre cutanéomuqueux (lésions cutanées auriculaire, alopecie, dermatite exfoliative, épistaxis,...) (**figure 6**) et viscéral (hépatomégalie, splénomégalie,...) ; sur le plan lésionnel, tous les organes et les tissus contenant des cellules macrophagiques peuvent être atteints (39, 40).

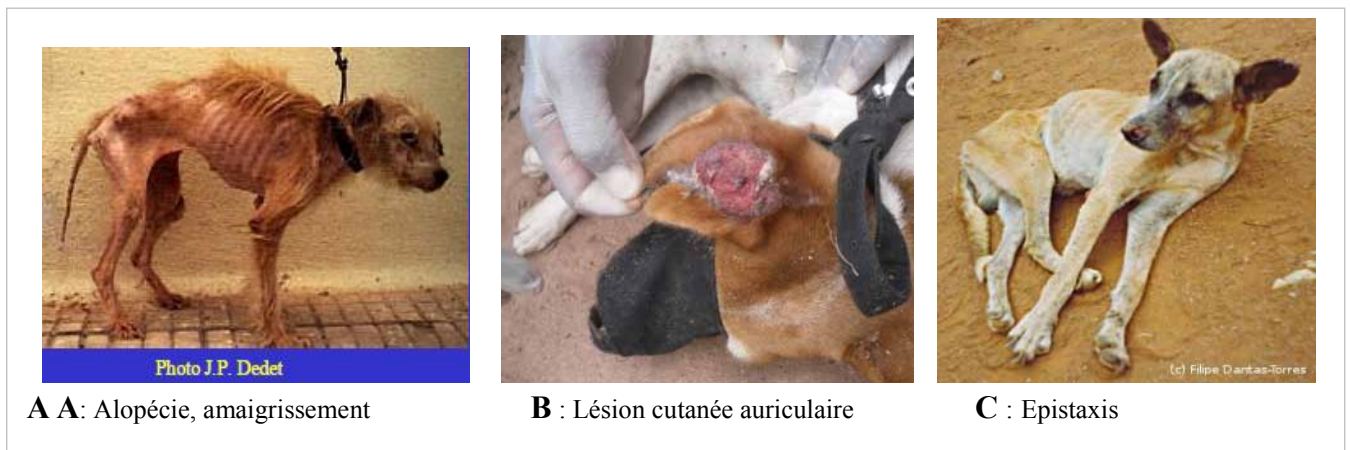


Figure 6 : Cas de leishmanioses canines

Le chien atteint constitue ainsi un réservoir de *L. infantum*, dont la présence chez l'homme susceptible (immunodéprimé, malnutri,...) se traduit par la leishmaniose viscérale humaine.

1.2.5.2. La Leishmaniose viscérale humaine

La leishmaniose viscérale zoonotique classique chez l'enfant (LVZE)

Elle se caractérise par une fièvre irrégulière, une pâleur, une splénomégalie. Elle est fatale dans sa forme évolutive. Dans les régions où la leishmaniose viscérale est endémique, la maladie tend généralement vers la chronicité et fait ses principales victimes chez les enfants de la tranche d'âge de 1 à 4 ans avec *L. infantum* comme agent principal (1). En effet les enfants les plus jeunes sont considérés comme les plus sensibles, en particulier lorsqu'ils souffrent de malnutrition (41).

La leishmaniose viscérale zoonotique de l'adulte (LVZA)

On note aussi une triade clinique (fièvre-pâleur-splénomégalie) mais moins constante et l'immunodépression est permanente dans un cas sur deux. L'anémie est le signe le plus fréquent, mais est souvent discrète. Il existe fréquemment de porteurs asymptomatiques (5).

La leishmaniose viscérale anthroponotique (LVA)

Cliniquement, la triade est quasi constante avec des adénopathies et des macules noirâtres ou bistres appelées Kala azar (**figure 7**). Des formes aiguës sont possibles et la mortalité est habituellement élevée. Elle est due à *L. donovani*, dans plus de 90% des cas mondiaux avec l'Homme comme réservoir. Elle s'observe à tout âge sauf ceux qui ont acquis une immunité lors d'une épidémie antérieure (1).



Figure 7 : Cas de leishmanioses viscérales anthroponotiques ou Kala azar.

La Leishmaniose dermique post-kala-azar (LDPKA)

La LDPKA est une séquelle de la leishmaniose viscérale. Elle se manifeste par une éruption maculaire, papuleuse ou nodulaire localisée sur le visage, la partie supérieure du bras, le tronc et d'autres parties du corps (**figure 8**). La LDPKA survient généralement 6 mois, un an ou plusieurs années après la guérison apparente du kala-azar, mais elle peut également se déclarer avant. Les personnes qui en souffrent sont considérées comme une source potentielle du Kala-azar (42).



Figure 8 : Cas de Leishmaniose Dermique Post-Kala-azar (LDPKA)

Source : http://www.imea.fr/imea-fichiersjoints/cours_DIU_medecine_sante/diutrop-leishmanioses-Marty.pdf site consulté le 20/10/2013 à 12h21

I.2.6. Diagnostic de la leishmaniose canine et viscérale

I.2.6.1. Arguments d'orientation

Les signes biologiques d'orientation sont une pancytopénie plus ou moins prononcée associant anémie, neutropénie et thrombopénie ainsi qu'un syndrome inflammatoire : vitesse de sédimentation très accélérée, une hyperprotidémie associée à une hypergammaglobulinémie polyclonale (40, 43).

Toutefois des techniques de diagnostic existent et sont énumérées ci-dessous. Elles peuvent s'appliquer aux cas humains que canins selon la forme clinique.

I.2.6.2. Diagnostic biologique direct

Il existe des tests sérologiques performants, mais le diagnostic de certitude est fait par la mise en évidence du parasite dans un prélèvement de moelle osseuse. Il se fait grâce à différentes techniques dont les plus utilisées sont : la **cytologie parasitologique** après coloration au May Grünwald Giemsa (**MGG**) ou spécifique, l'**histologie**, la **culture** sur milieu NNN, Schneider, M1991, RPMI, de Grace, la Polymerase Chain Reaction (**PCR**) (PCR classique, PCR dite nichée, PCR en Temps réel), l'Immuno Fluorescence Directe (**IFD**), le **Xénodiagnostic** (32).

I.2.6.3. Diagnostic biologique indirect

Les techniques importantes utilisées sont entre autres : l'Immunofluorescent Antibody Test (**IFAT**), l'Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (**ELISA**), les Tests de Diagnostic Rapide (**TDR**), la **Contre-immunoélectrophorèse**, l'Immuno-Diffusion Assay (**IDA**), le Direct Agglutination Test (**DAT**), la **Cytométrie de flux** (détection de lymphocytes B portant

à leur surface des anticorps anti-*Leishmania*), l'**Évaluation de la réponse immunitaire cellulaire** (Test de Montenegro, le test de prolifération des lymphocytes, l'Effet cytopathique de l'INFG et Bio-test d'inhibiton) (32).

I.2.7. Traitement

I.2.7.1. Traitement de la leishmaniose canine

L'association Glucantime pendant 28jours + Zyloric(allopurinol) à vie constitue le protocole thérapeutique le plus couramment utilisé dans le cas de la leishmaniose canine. La posologie consiste à 100 mg/kg /jour de Glucantime, par voie sous-cutanée, pendant une période de 20 à 30 jours, plus du Zyloric à dose de 30 mg/kg/jour per os, à vie (36, 40).

I.2.7.2. Traitement de la leishmaniose viscérale humaine

Les médicaments indiqués sont : le Glucantime (antimoniote de méglumine), Amphotéricine B déxosycolate, AmBisome. La posologie thérapeutique en fonction du médicament est le suivant: 20 mg/Kg/J pendant 30 jours en IM pour le Glucantime; 1 mg/Kg/J, 1 jour sur 2 pendant 30 jours (15 doses) en perfusion pour l'Amphotéricine B déxosycolate, et 2 mg/Kg/J, 1 jour sur 2 pendant 10 jours en perfusion pour AmBisome (5, 43).

I.2.8. Méthodes de lutte

Les principes de la lutte contre les leishmanioses sont dictés par la nécessité de prendre des mesures contre l'agent étiologique, le vecteur (le phlébotome) et l'hôte réservoir.

Les actions sur l'agent pathogène, consistent à la prise en charge des cas par le traitement médicamenteux, la chirurgie réparatrice et la cryothérapie (1).

Les mesures sur le réservoir intègrent le dépistage, le traitement des chiens atteints et la vaccination anti-leishmaniose. Il existe actuellement deux vaccins, le Canileish® et la Leishmune® qui pourraient contribuer à enrayer la progression de la leishmaniose canine, voire de mener à son éradication (39).

Les actions sur le vecteur consistent à l'usage des formes spécifiques insecticides, de la famille des pyréthrynoïdes : deltaméthrine (collier SCALIBOR®), perméthrine (spot-on ADVANTIX® et spray DUOWIN®). Ces molécules ont un effet létal par simple contact du phlébotome. Leur usage en prophylaxie canine permettrait une diminution de la prévalence de la leishmaniose en limitant la transmission intra et interspécifique (39, 40).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

II.1. OBJECTIF GENERAL

Mettre en évidence le réservoir canin de la leishmaniose viscérale humaine dans la ville de Bobo-Dioulasso.

II.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

1. rechercher la présence du parasite chez des chiens en fonction de leur zone géographique,
2. déterminer la présence du parasite selon l'âge, le sexe des chiens,
3. vérifier si la présence du parasite était accompagnée de signes cliniques.

MATERIEL ET METHODES

III. MATERIEL ET METHODES

III.1.Site d'étude

Notre étude a été réalisée à Bobo-Dioulasso (11°10'42"N; 4°17'35"W), chef-lieu de la province du Houet, ville carrefour située à l'Ouest du pays. La pluviométrie annuelle moyenne est de 1000 à 1300 mm avec une température moyenne annuelle de 28,2 °C qui varie de 16 à 45° C. La collecte des échantillons a été effectuée dans six (06) quartiers de la ville en fonction de leur situation géographique.

- Belle ville (secteur 21): quartier périphérique, lisière ouest de la ville.

-Kôdeni (secteur 20): quartier situé en périphérie, lisière sud de la ville.

-Nieneta-Clinique DPRAH (secteur 12): quartier situé au centre de la ville.

-Sakabi (secteur 13): quartier situé en périphérie, lisière nord de la ville.

-Sarfalao (Secteur 17) : quartier périphérique situé à l'Est de la ville.

-Kwa (Secteur 24) : quartier périphérique situé à l'Est de la ville.

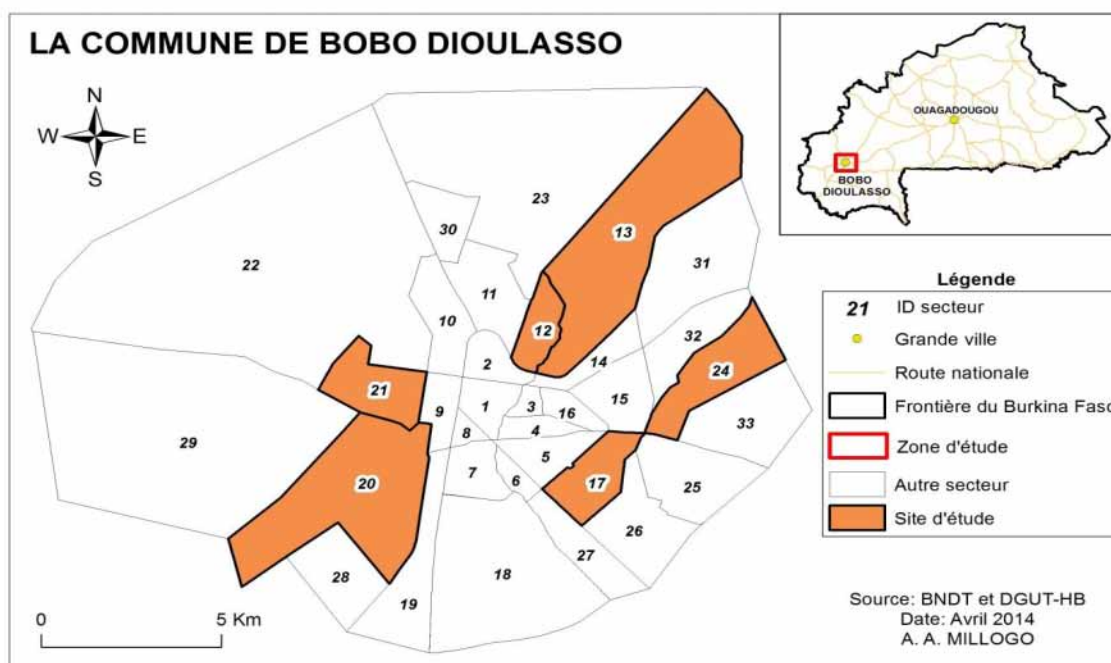


Figure 9 : Position géographique des sites d'échantillonnage dans la ville de Bobo-Dioulasso.

III.2. Type et période d'étude.

Notre travail a consisté en une étude descriptive transversale qui s'est déroulée de Juillet à Décembre 2013 dans les 6 quartiers ci-dessus indiqués de la ville de Bobo-Dioulasso. Notre échantillonnage a porté sur des chiens (réservoirs supposés de leishmanies) et a pris en compte tout chien présentant des lésions ou non, résidant dans nos sites et dont le propriétaire a donné son accord pour l'étude.

III.3. Techniques de collecte des données.

Un examen clinique détaillé a été réalisé sur chaque animal par un agent vétérinaire. A l'issue de la consultation vétérinaire, un prélèvement sanguin de 2-5mL au niveau de la veine saphène postérieure est fait sur tube avec anticoagulant EDTA. Les échantillons ont été transportés dans un porte-vaccin contenant des ice-packs et jusqu'au laboratoire de l'IRSS où ils ont été conservés à +4°C et -20°C en cas de tests différés. Des biopsies cutanées ont été également réalisées et conservées dans les mêmes conditions.

Un questionnaire a été administré à chaque propriétaire au terme de chaque prélèvement.

III.3.1. Analyses des échantillons.

Les échantillons ont été centrifugés à 1800 tours/minute pendant 20 minutes. Les plasmas ont été recueillis sur tube Eppendorf pour la sérologie et le culot leucocytaire obtenu pour la PCR. Les culots leucocytaires, les plasmas et les biopsies ont été conservés à -20°C pour les analyses ultérieures .

III.3.1.2. Réalisation de la sérologie

Nous avons utilisé le réactif DiaMed-IT LEISH® (Cressier sur Morat; SUISSE) qui est un TDR immuno-chromatographique. Le principe du test consiste à détecter les immunoglobulines (Ig) totales anti-*Leishmania spp* au moyen d'une bandelette revêtue d'antigène recombinant K39 à partir du plasma. Les paramètres de performance de ce test sont de 99% pour la sensibilité et de 100% pour la spécificité. Ce test nous a permis de connaître le statut sérologique des chiens de notre étude, suivant le mode opératoire du fabricant.

Si ces Ig sont présents dans le plasma, celles capturées par le conjugué réagissent avec l'antigène spécifique rK39 sur la bandelette.

Les réactions sont indiquées par l'apparition de bandes de couleur violet foncé sur la bandelette. Ainsi la présence de deux bandes (C et L) indique un résultat positif ou présence

d'Ig anti-*Leishmania*. Le résultat est négatif quand seule la bande de contrôle (C) est visible ce qui confirme donc l'absence d'Ig anti-*Leishmania*. L'absence d'aucune bande surtout celle de contrôle confère un résultat non valide.

III.3.1.3. Analyses moléculaires chez les chiens séropositifs par la PCR nichée.

Le principe appliqué aux leishmanies.

La technique selon le protocole Noyes et *al.* (1998) a été utilisée (44). Elle permet l'amplification de la région des minicercles de l'ADN kinétoplastique des leishmanies. Elle consiste à une série de deux PCR au moyen de deux paires différentes d'amorces. Les fragments d'ADN amplifiés au cours de la première PCR contiennent les séquences qui seront appariées avec la deuxième paire d'amorces. Cette deuxième amplification dite «nichée» renforce la sensibilité de la technique.

Extraction de l'ADN kinétoplastique.

L'ADN_k des cas séropositifs a été extrait à partir des biopsies et ou du culot leucocytaire à l'aide du kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissue kit® » (Qiagen, Valencia, CA ; Janvier 2011) selon les indications du fabricant (**Annexe 6**).

Identification moléculaire des espèces de leishmanies.

En suivant le protocole de Noyes et *al.* (1998), l'ADN_k a été alors soumis à une réaction PCR en deux temps (PCR1 et PCR2). La **PCR1**: utilise une paire d'amorces que sont: **CSB2XF10_μM [5'CGAGTAGCAGAAACTCCCGTTCA3']** **CSB1XR10_μM [5'ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG 3']**. La Taq polymérase synthétise à partir des dNTPs, des brins d'ADN dont le nombre de paires de bases est spécifiques. Ainsi, 3_μL d'ADN_k pur, extrait à partir des culots leucocytaires et des biopsies ont été ajoutés dans 27,0 _μL de milieu réactionnel mixte contenant 17,8 _μL d'eau pure, 6,0 _μL de tampon Buffer 5X, 1,0 _μL de dNTPs 5mM, 1,0 _μL de chacune des deux amorces et 0,2 _μL de Taq Polymérase 5UI; le tout dans un tube de 0,25mL pour chaque échantillon. En plus des extraits d'ADN de terrain, nous avons ajouté des témoins positifs de *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*. Les tubes ont été placés dans le thermocycler (Eppendorf, MASTERCYCLER GRADIENT) qui est mis en marche selon le programme d'amplification suivant: 2 minutes à 94°C pour la dénaturation initiale de l'ADN, suivies de 45 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94°C, 1 minute pour l'hybridation des amorces à 54°C, 1 minute

pour l'élongation à 72°C. Cette étape du dernier cycle a été prolongée par 72°C d'élongation finale pendant 10 minutes et maintenue à 15°C pour la prochaine étape qu'est la PCR2. Pour la **PCR2**, les produits d'amplification de la PCR1 ont été chacun distribué dans un mixte réactionnel contenant les mêmes éléments aux mêmes concentrations que la PCR1 sauf que cette fois-ci la paire d'amorces a été remplacée par **13Z 10µM [5'ACTGGGGGTTGGTGTAATAATAG 3']** et **LIR 10µM [5' TCGCAGAACGCCCCT 3']**. L'amplification de la PCR2 a suivi les mêmes étapes que la PCR1. A la fin de cette amplification, les produits de la PCR2 ont été soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1,5 % avec 5 µL de BET. La taille attendue des fragments d'ADN visualisés sous UV était respectivement de 680 pb pour *L. infantum*, 560 pb pour *L. major*, et 750 pb pour *L. tropica*.

III.4. Analyse statistique des données

Les données ont été saisies sur le logiciel Epidata dans sa version 3.1 et analysées à l'aide du logiciel Stata dans sa version 12.1 (**College station, Texas 77845 USA**). Le test exact de Fisher et de χ^2 corrigé de Yates ont été utilisés. Les résultats ont été jugés statistiquement significatifs au seuil de $p < 0,05$.

III.5.Aspects éthiques

Nous avons reçu une autorisation des autorités provinciales du Ministère des Ressources Animales et Halieutiques (référence **N°2013-230/MRAH/RHBS/DRRAH/DPRAH-HUE** en **annexe 2**) pour mettre en place notre étude dans les différents quartiers de Bobo-Dioulasso.

Un formulaire de consentement éclairé a été rempli par les propriétaires ayant accepté l'inclusion de leurs chiens dans l'étude (**annexe 5**). Ils ont reçu toutes les informations concernant la participation de leurs chiens à l'étude (**annexe 4**).

RESULTATS

IV. RESULTATS

IV.1. Caractéristiques de la population d'étude

Au total 89 chiens ont été échantillonnés dans 6 quartiers de Bobo Dioulasso. L'âge moyen des chiens était de $3,27 \pm 2,47$ ans (3mois- 10ans) avec un ratio M/F de 0,97(44/45).

IV.2. Sérologie de la leishmaniose à *L. infantum* dans la population canine des sites d'étude

Cinq (05) chiens ont présenté une réaction positive contre 84 chiens en réaction négative au TDR DiaMed-IT LEISH® (Cressier sur Morat; SUISSE) soit un taux de séropositivité de 5,61 % avec un IC 95% (2.4-12.5). Les cas positifs ont été trouvés dans les quartiers Belle-ville, Sakaby et Sarfalao (quartiers périphériques). Aucun cas n'a été enregistré dans les autres sites de collecte (**Tableau II**).

Tableau II : Répartition des résultats de la sérologie des chiens par quartier

Site de collecte	Belle ville	Sakaby	Sarfalao	Kodéni	Niéneta	Kwa	Total
Nombre de chiens inclus	9	40	23	4	12	1	89
Nombre de chiens séropositifs (Proportion en %)	1 (11,11%)	3 (7,50%)	1 (4,34%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (5,61%)

Tableau III: Répartition des chiens séropositifs par tranche d'âge

Classe d'âge	Effectif	Nombre de chiens séropositifs	Proportion (%)
< 3 ans	53	1	1,88
3-5 ans	21	2	9,52
≥5 ans	15	2	13,33
Total	89	5	5,61

L'âge moyen des chiens séropositifs était de 5,2 ±2,949, IC 95% (1,54-8,86). On constate que toutes les tranches d'âge sont concernées avec une séropositivité relativement plus élevée dans celles de 3-5 et ≥ 5 ans (**Tableau III**). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée ($\chi^2= 3.679$, $p=0,099$) suggérant donc que l'âge du chien n'a pas d'influence sur son statut d'infectieux.

Aucune différence significative n'a été observée sur la séropositivité des chiens en fonction de leur sexe ($\chi^2= 0,236$; $p= 0,677$) quoiqu'une légère prédominance a été notée chez les mâles (6,81% *versus* 4,44%) (**Tableau IV**).

Tableau IV: Répartition des résultats de la sérologie en fonction du sexe

Sexe	Effectif	Sérologie positive	Proportion (%)
Male	44	3	6,81
Femelle	45	2	4,44
Total	89	5	5,61

IV.3. Répartition des chiens séropositifs selon le signe clinique

En procédant à la description des signes les plus rencontrés (**Tableau V**), il ressort que tous les cinq (5) cas ont présenté des lésions cutanées au niveau des oreilles. Trois (3) ont montré des symptômes de dermatite exfoliative et d'amaigrissement. L'alopécie a été observée chez deux (2) des cas. D'autres signes patents en cas de leishmaniose, tels l'onichogryphose, l'épistaxis, l'adénopathie, l'hépto-splénomégalie, l'anémie clinique n'ont pas été constatés.

Tableau V: Répartition des signes rencontrés chez les cas séropositifs

Signes cliniques	Effectif n=5
Lésions cutanées auriculaires	5
Dermatite exfoliative	3
Amaigrissement	3
Alopécie	2

IV.4. Résultats du diagnostic moléculaire des espèces de leishmanies responsables de la leishmaniose canine à Bobo-Dioulasso.

Nos résultats montrent qu'une seule espèce de leishmanie en l'occurrence *L. infantum* a été trouvée dans la population canine analysée, dans la ville de Bobo-Dioulasso. Par ailleurs la méthode d'identification du parasite est beaucoup plus sensible dans les biopsies que les culots leucocytaires (**Tableau VI**). En effet la performance du diagnostic au niveau des biopsies cutanées (3/4 soit 75%) était supérieure que celle obtenue avec le sang (1/5 soit 20%).

Tableau VI: Analyses moléculaires des espèces de leishmanies en fonction des specimen biologiques

Specimen biologique	PCR positive			%	PCR négative	
	<i>L.infantum</i>	<i>L.major</i>	<i>L.tropica</i>			%
Biopsie n= 4	3	0	0	75	1	25
Culot leucocytaire. n= 5	1	0	0	20	4	80

L. i L. m L. t

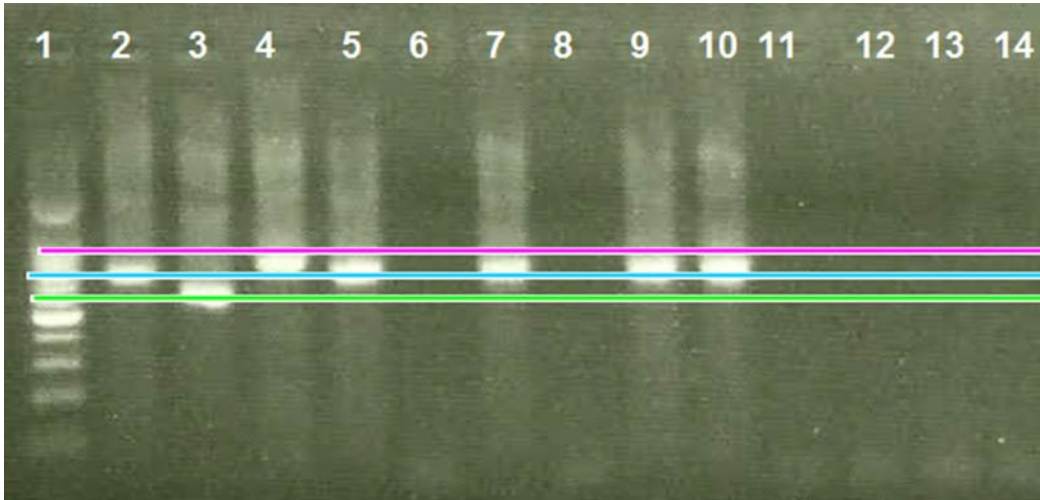


Figure 10 : Photo de gel d'agarose à 1,5% montrant les fragments d'ADN issus de biopsie cutanée et de culot leucocytaire après amplification.

1: Marqueur de poids moléculaire (100pb); **2:** Contrôle positif pour *L. infantum* (680 pb); **3:** Contrôle positif pour *L. major* (560 pb); **4:** Contrôle positif pour *L. tropica* (750pb); **5:** Biopsie cutanée; **6:** couche leucocytaire; **7:** Biopsie cutanée; **8:** couche leucocytaire; **9:** Biopsie cutanée; **10:** couche leucocytaire; **11:** Biopsie cutanée; **12:** couche leucocytaire; **13:** couche leucocytaire; **14:** Contrôle négatif.

Ligne bleue = *L. infantum*, **Ligne verte** = *L. major*; **Ligne violette** = *L. tropica*

DISCUSSION

V. DISCUSSION

V.1. De la présence de *Leishmania infantum* au Burkina Faso

Notre étude a mis en évidence la présence de *L. infantum* agent de la LVZ, pour la première fois au Burkina Faso. En effet nous avons trouvé un taux de séropositivité de 5,61% chez 5/89 chiens domestiques issus des quartiers périphériques de la ville de Bobo-Dioulasso. D'autres auteurs en Afrique, trouvaient des taux supérieurs comparativement aux nôtres. C'est le cas en Algérie dans la région du Kabylie où Mouloua trouvait une séropositivité égale à 9,95% (N=603) (39) ; au Maroc Hajiba et al. (2014) la trouvaient à 9,83% (N=61) (45); au Sénégal Faye et al. (2010) la trouvaient encore plus élevée à 46,3% (N=160) (46) et en Tunisie où Bouratbine et al. (2005) l'évaluaient à 93 % (N=40) (47). L'explication probable serait la différence de performances des techniques utilisées ou du fait du caractère endémique de la LVZ dans ces zones.

Le parasite a été retrouvé chez des chiens d'âge moyen de $5,2 \pm 2,94$ montrant ainsi que l'âge du chien n'a pas d'influence sur le risque d'infection. Des résultats similaires ($p > 0,05$) ont été trouvés par Sideris et al. (1996) en Grèce (48), Almeida et al. (2012) au Brésil (49) et Mostafavi et al. (2014) en Iran (50). Ceci serait dû à l'errance des chiens et à leur environnement qui les exposent davantage aux piqûres des vecteurs infectés. Le parasite était aussi bien chez les chiens mâles que femelles (3 versus 2). En effet des résultats comparables aux nôtres ont été trouvés par d'autres auteurs au Brésil et en Iran (49, 50). Nous expliquons cela par le fait que le vecteur infecté transmettant les promastigotes, n'aurait pas de préférence trophique pour le sexe. Par ailleurs il y a eu plus de cas de *L. infantum* dans les biopsies cutanées (75% soit 3/4) que dans le sang (20% soit 1/5). Cet écart de fréquence semble révéler une répartition inégale du parasite dans l'organisme de l'hôte infecté. Toutefois ce résultat est à relativiser du fait de la taille très faible de notre échantillon. Malgré tout, nos résultats étaient similaires à ceux d'études antérieures qui ont rapporté qu'il y avait plus de chance de trouver le parasite préférentiellement d'abord dans le foie, ensuite dans la rate, dans les ganglions, au niveau de la peau et enfin dans le sang (51, 52).

V.2. Des implications épidémiologiques.

Notre étude a révélé la présence de *L. infantum* chez un réservoir canin (chiens) , à une fréquence de 5,61%. Ce taux suggère d'énormes inquiétudes car évoque un risque de propagation du parasite. En effet en 1937 au Sénégal, Curasson et al. (1937) avaient rapporté un taux de 6,02% (53). Plus tard, Faye et al. (2010) le trouvaient élevé soit 46,3% (46). Toute

chose qui suggère que la présence zoonotique et la densité phlébotomienne paraissent liées (28, 54), ce qui insinue que le parasite peut circuler quand ces conditions sont réunies. En effet les experts s'accordent à dire que la présence de 1,5 à 2% de chiens infectés ou, seulement une densité minimale de 10-15 phlébotomes/m² suffit pour le maintien de l'enzootie (55). Notre investigation n'a pas pu identifier les phlébotomes infectés ni la circulation des parasites chez l'homme. Néanmoins des études antérieures avaient signalé la présence de vecteurs tels *Phlebotomus longicuspis*, *Sergentomyia dubia*, *S. schwetzi*, susceptibles à *L. infantum*, au Burkina Faso (13, 14). Ainsi, un risque de transmission pourrait exister, même si jusque-là aucun cas de LVH à *L. infantum*, ni de vecteur potentiel infecté n'ont été rapportés. Des études menées au Brésil, en Iran, au Sénégal, au Mexique ont rapporté que la présence de *L. infantum* chez le réservoir constitue un risque important d'émergence chez l'homme (10, 56, 57). A cela s'ajoute le fait que la virulence du parasite chez l'homme s'accroît en cas d'immunodépression, de prédispositions génétiques, ou de malnutrition (58, 59). Il est donc important de surveiller tous les éléments de la chaîne épidémiologique pour éviter cette zoonose chez l'homme. Ceci en encourageant le diagnostic rapide de la LVZ et en intensifiant la lutte anti-vectorielle.

V.3. De l'identification des symptômes chez les cas positifs.

Nos résultats ont montré que tous les chiens séropositifs ont au moins un signe clinique. En effet les signes cutanés auriculaires et la dermatite exfoliative venaient respectivement en premier lieu. Briffod, (2011) rapportait des résultats similaires aux nôtres avec des fréquences allant de 80-90% pour les lésions cutanées et de 53-73% pour la dermatite exfoliative (32). Cela pourrait expliquer que l'agent vecteur préfère piquer la partie cutanée, surtout les parties peu poilues. D'autre part *L. infantum* aurait une capacité de dissémination dans l'organisme par phénomène d'échappement aux macrophages (15) ce qui pourrait avoir pour corollaire la dermatite exfoliative et une perte progressive des poils. L'amaigrissement et l'alopécie observés dans notre étude pourraient s'expliquer par le processus de fonte musculaire progressive qu'induit l'infection à *L. infantum* et aussi l'existence d'autres déterminants qui seraient les troubles du métabolisme et le manque d'appétit. Des résultats similaires (présence d'amaigrissement et d'alopécie) ont été également rapportés en Algérie par Harrat et al. (2003); et Baneth et al. (2008), chez le chien leishmanien (60, 61).

Notre étude a rapporté des signes cliniques différents sur les chiens séropositifs. Cette diversité des signes serait due à la spécificité individuelle de chaque animal à

développer ou pas des signes patents car ils n'ont pas la même réponse immunitaire en cas d'infection à *L. infantum*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a mis en évidence la présence d'un réservoir canin de *L. infantum* agent de la leishmaniose viscérale, dans la ville de Bobo-Dioulasso. Ceci suscite une inquiétude quant à un risque d'émergence de cette parasitose dans la population humaine de cette ville.

En perspective, il serait donc indispensable de :

- faire une investigation sur les vecteurs, leur répartition, leur taux d'infectivité, leur préférence trophique.
- étendre notre étude sur d'autres sites représentatifs de la ville.
- réaliser une étude épidémiologique et clinique pour identifier les cas humains et les déterminants de la LVH dans la ville.
- mettre en place un plan de surveillance de cette parasitose zoonotique en intégrant le concept *One Health*; un concept qui vise à concevoir une stratégie commune pour l'élimination des maladies animales et humaines surtout à transmission vectorielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **OMS**, (2010) Rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses. Genève, 22-26 mars 2010.
2. **Guiguemde RT, Sawadogo OS, Bories C, Traore KL, Nezien D, Nikiema L, et al.**, (2003). *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 97:168-9.
3. **Aoun K, Jeddi F, Amri F, Ghrab J et Bouratbine A**, (2009) . Actualités épidémiologiques de la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Med Mal Infect.* 39:775-9.
4. **Zougaghi L, Moutaj R, Chabaa L et Agoumi A**, (2009). Leishmaniose viscérale infantile : profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas *Arch Pediatr.* 16:1513-8.
6. **Dedet JP**, (1999). Les leishmanioses. Editions: ELLIPSES; 1999.
7. **Desjeux P**, (1991). Information sur l'épidémiologie des leishmanioses et la lutte contre les maladies par pays ou territoire *Doc OMS WHO/LEISH/91.* 30-46
8. **Djidingar D, Chippaux JP, Gragnic G, Tchani O, Meynard D et Julvez J**, (1997). Visceral leishmaniasis in Niger: six new parasitologically confirmed cases. *Bull Soc Pathol Exot.* 90 :27-9.
9. **Eholie SP, Tanon AK, Folquet-Amorissani M, Doukoure B, Adoubryn KD, Yattara A, et al.**, (2008). Three new cases of visceral leishmaniasis in Cote d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot.* 101:60-1.
10. **Faye B, Bucheton B, Banuls AL, Senghor MW, Niang AA, Diedhiou S, et al.**, (2011). Seroprevalence of *Leishmania infantum* in a rural area of Senegal: analysis of risk factors involved in transmission to humans. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105:333-40.
11. **Sawadogo WR, Le Douaron G, Maciuk A, Bories C, Loiseau PM, Figadere B, et al.**, (2012). In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of five medicinal plants from Burkina Faso. *Parasitol Res.* 110:1779-83.
12. **Pont FL, Robert V, Bernard GV, Rispaïl P et Jarry D**, (1993). Note sur les phlébotomes de l'Aïr Niger. *Bull Soc Path Exo.* 86:286-9.
13. **Depaquit J, Muller F, Gantier JC, Leger N, Ferte H, Ready P, et al.**, (2005) Phlebotomine sand flies from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus (Larrousius) longicuspis* south of the Sahara. *Med Vet Entomol.* 19:322-5.
14. **Sangare I, Gantier JC, Koalaga G, Deniau M, Ouari A et Guiguemde RT.**, (2009). Sandflies of the south part of Ouagadougou City, Burkina Faso. *Parasite.* 16:231-3.

15. **Martinetti L, (2013).** Dépistage, traitement et prévention de la leishmaniose canine en Corse : enquête auprès des vétérinaires praticiens de l'île. Thèse d'exercice Médecine vétérinaire. *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ENVT*. 99p.
16. **Desjeux P, Waroquy L et Dedet JP, (1981).** La leishmaniose cutanée humaine en Afrique de l'Ouest. *Bull Soc Path Exot.* 4:414-25.
17. **Barro-Traore F, Preney L, Traore A, Darie H, Tapsoba P, Bassole A, et al., (2008).** Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* involving the bone marrow in an AIDS patient in Burkina Faso. *Ann Dermatol Venereol.* 135:380-3.
18. **Bamba S, Barro-Traore F, Drabo MK, Gouba A, Traore A et Guiguemde TR., (2013)** Epidemiological profile, clinical and therapeutic cutaneous leishmaniasis in the Department of Dermatology at University Hospital in Ouagadougou, Burkina Faso. *Rev Med Brux.* 34:392-6.
19. **Maroli M, Fausto AM, Sabatinelli G et Majori G, (1986).** Phlebotomines (Diptera, *Psychodidae*) from Burkina Faso. A note on the sand fly species collected in domestic resting sites. *Ann Parasitol Hum Comp.* 61:683-8.
20. **Pampiglione S, Manson-Bahr PE, La Placa M, Borgatti MA et Musumeci S, (1975).** Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 69:60-8.
21. **Roberts LS, Janovy JJ, Gerald D, Schmidt S et Larry, (2000).** Roberts' Foundations of Parasitology. *Boston: Mc Graw-Hill Higher Education* 6:670.
22. **Antinori S, Schifanella L et Corbellino M, (2011).** Leishmaniasis : new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011.
23. **Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG Ferrer L, et al., (2009).** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitology* 165:1-18.
24. **Killick-Kendrick R, (1999).** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 17:279-89.
25. **Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE et Peyrefitte C, (2010).** Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 15:19507.
26. **Abonnenc E et Pastre J, (1971).** Les phlébotomes de la Haute-Volta (Diptera, *Psychodidae*). Notes biologiques. *Cah ORSTOM Entomo Med parasitol.* 9:387-416.
27. **Sangaré I, (2009).** Prospection entomologique de la population phlébotomienne de la ville de Bobo-Dioulasso. Mémoire de DEA. *Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso.*

- 28. Senghor M, Faye M, Faye B, Diarra K, Elguero E, Gaye O, et al.,** (2011). Ecology of Phlebotomine Sand flies in the Rural Community of Mont Rolland (Thiès Region, Senegal): Area of Transmission of Canine Leishmaniasis. *PLoS One*. 6(3):e14773
- 29. Ashford R,** (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*. 14:523-32.
- 30. Dantas-Torres F et Brandao-Filho SP,** (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 48:151-6.
- 31. Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, et al.,** (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*. 106:857-60.
- 32. Briffod C,** (2011). Revue actuelle de la leishmaniose canine ;Thèse d'exercice Médecine vétérinaire *Toulouse 3*. 101p.
- 33. de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP et Michalick MS,** (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. 137:159-67.
- 34. Silva FL, Raquel GO, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF et Santos RL,** (2009) Veneral transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet parasit*. 160:55-9.
- 35. Clemente WT, Rabello A, Faria LC, Peruhype-Magalhaes V, Gomes LI, da Silva TA, et al.,** (2014). High prevalence of asymptomatic *Leishmania spp.* infection among liver transplant recipients and donors from an endemic area of Brazil. *Am J Transplant*. 14:96-101.
- 36. Carré N, Collot M, Guillard P, Horellou M et Gangneux JP,** (2010). La leishmaniose viscerale, épidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *J Pharm Clin*. 29:121-48.
- 37. Antoine J, Lang T et Prina E,** (1999). Biologie cellulaire de *Leishmania* dans "Les leishmanioses", JP Dedet éditions Ellipses, 1999.
- 39. Mouloua A,** (2014). Etude Eco-épidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie. Thèse de Doctorat en sciences biologiques. . *Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU*, Algérie.
- 40. Meunier A,** (2007). Étude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l'influence des facteurs environnementaux (en France depuis 1965,dans le Sud-Ouest en 2006). Collaboration au projet EDEN.*Thèse Doct.Vet . Lyon I*. 124p.
- 41. Harrat Z, Addadi K, Belkaid M et Tabet-Derraz O,**(1992). Visceral leishmaniasis in Algeria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990). *Bull Soc Pathol Exot*. 85:296-301.
- 42. OMS,** (2014). Leishmaniose. Aide-Mémoire N°375.

- 43. Marty P**, (2010). Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement. *La lettre de l'infectiologue*. 25:186-90.
- 44. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D**, (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol*. 36:2877-81.
- 45. Hajiba F, Oursula D, Saâd M et Abdelhakim EOL**, (2014). Etude séro-épidémiologique de la leishmaniose canine au centre du Maroc. *Pan Afr Med J*. 19:248.
- 46. Faye B, Banuls AL, Bucheton B, Dione MM, Bassanganam O, Hide M, et al.**, (2010). Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? *Microbes Infect*. 12:1219-25.
- 47. Bouratbine A, Aoun K, Gharbi M, Haouas N, Zaroui J, Harrat Z, et al.**, (2005) Epidemiological, clinical and parasitological data about canine leishmaniasis in Tunisia. *Bull Soc Pathol Exot*. 98:359-62.
- 48. Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A et Dotsika E**, (1996). Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. *Parasite*. 3:125-30.
- 49. Almeida A, Valéria R, Felipe A, Seabra D, Magyda A, Fabiano B, et al.**, (2012). Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet, Jaboticabal*. 2012; 21:359-65.
- 50. Mostafavi M, Akhtardanesh B, Sharifi I, Kakooei S, Khedri J et Bamorovat M**, (2014). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in southeast of Iran. *J Parasit Dis*. 38:218-22.
- 51. Reithinger R et Dujardin JC**, (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications *J Clin Microbiol*. 45:21-5
- 52. Solano-Gallego L, Guadalupe M, Alek K, Luis C, Pennisi MG, Ferrer L, et al.**, (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis *Parasit Vectors*. 4:86.
- 53. Curasson G, Sissoko B et Laurence**, (1937). La leishmaniose canine à Dakar. *Bull Soc Path Exot*. 8:684-6.
- 54. Lanotte G, Rioux JA, Perieres J et Vollhardt Y**, (1979). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp*. 54:277-95.

- 56. Gavgani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M et Davies CR, (2002).** Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg.* 67:511–5.
- 57. de Araujo VE, Pinheiro LC, Almeida MC, de Menezes FC, Morais MH, Reis IA, et al., (2013).** Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(11):e2540.
- 58. Francisco ALC, (2012).** The Dog as a Risk Factor in Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Review. *Adv Infect Dis.* 2012 2:37-47.
- 59. McCall L, Zhang W et Matlashewski G, (2013).** Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog.* 1:9.
- 60. Harrat Z et Belkaid M, (2003).** Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Bull Soc Path Exo.* 2003 96:212-4.
- 61. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P et Ferrer L, (2008).** Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24:324-30.

Sites Internet visités

- 5. Aubry P, (2013).** Leishmanioses Actualités 2013. Mise à jour le 06/11/2013 <http://medecinetropicale.free.fr/cours/leishmanioses.pdf> consulté le 02 Mai 2014 à 11h10.
- 38. ESCCAP France, (2013).** La leishmaniose canine. Consulté le 03/08/2014 <http://www.esccap.fr/maladies-vectorielles/leishmaniose.html>
- 55. Clinique vétérinaire Clavisson, (2014).** La leishmaniose .Consulté le 04/01/2015 <http://www.cliniqueveterinairecalvisson.com/article-veterinaire-41-12-la-leishmaniose>

ANNEXES

VIII. ANNEXES

Annexe 1 : Demande d'autorisation de collecte des données

MINISTERE DE LA SANTE
SECRETARIAT GENERAL



BURKINA FASO

Unité – Progrès – Justice

Bobo-Dioulasso le 20 Août 2013

Dr. Roch K. DABIRE
IRSS/Centre Muraz

A

Monsieur le Directeur Provincial de
Ressources Animales et
Halieutiques du Houet (DPRAH/
Houet)
Bobo-Dioulasso

Objet : Demande d'autorisation de collecte de données

Monsieur le Directeur,

Je viens par la présente vous informer que Monsieur DJIBOUGOU Diakourga Arthur, Etudiant en Master 2 de Parasitologie –Entomologie médicale à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé/Université Polytechnique (IN.S.SA/UPB) de Bobo-Dioulasso, travaille sous ma direction scientifique pour la finalisation de son mémoire et sera assisté par le Dr SANGARE Ibrahim. Son thème de recherche porte sur : « Etude de la prévalence de la leishmaniose canine et du risque de transmission à l'homme dans la ville de Bobo-Dioulasso ». Son travail nécessite une collecte d'échantillon biologique qui porte entre autres sur un prélèvement de sang chez des chiens à propriétaires. Compte tenue de la sensibilité du thème, nous souhaitons avoir votre accord qui, sans doute, facilitera l'accès et la collecte de ces informations auprès des structures vétérinaires de la ville.

Tout en comptant sur votre appui, nous vous prions de recevoir, Monsieur le Directeur, nos salutations distinguées.

Très cordialement

Chef-Adjoint de l'Unité de Recherche
« Paludisme et maladies Tropicales
Négligées »

CENTRE MURAZ
UNITE DE RECHERCHE PALUDISME
ET MALADIES TROPICALES

Dr. DABIRE ROCH K., PhD
Directeur de Recherche

Annexe 2 : Lettre d'autorisation de collecte des données

MINISTERE DES RESSOURCES ANIMALES
ET HALIEUTIQUES

BURKINA FASO
Unité- Progrès- Justice

REGION DES HAUTS BASSINS

Bobo-Dioulasso le 28 Août 2013

DIRECTION REGIONALE DES RESSOURCES
ANIMALES ET HALIEUTIQUES
DES HAUTS BASSINS

DIRECTION PROVINCIALE DES RESSOURCES
ANIMALES ET HALIEUTIQUES DU HOUET
BP : 345 / Tél 20 98 16 24 Bobo-Dioulasso

N° 2013 - 230 /MRAH/RHBS/DRRAH/DPRAH-HUE

Le Directeur Provincial

Al

Dr Roch K. DABIRE

**Chef Adjoint de l'Unité de Recherche-
Paludisme et Maladies Tropicales Négligées
du Centre Muraz
Bobo-Dioulasso**

Objet : Autorisation de collecte de données

Monsieur le Chef de Service Adjoint

Suite à votre lettre du 20 Août 2013, relative à une demande d'autorisation de collecte de données, par l'Etudiant DJIBOUGOU Diakourga Arthur afin de finaliser son mémoire de Master 2 de Parasitologie-Entomologie, j'ai l'honneur de vous informer que vue l'importance du thème (Etude de la prévalence de la leishmaniose canine et risque de transmission à l'homme dans la ville de Bobo-Dioulasso) et sa portée sur la santé publique et animale, notre structure est disposée à recevoir Mr DJIBOUGOU à la clinique vétérinaire de la DPRAH/ Houet, des cliniques privées et au niveau des ménages pour cet effet.

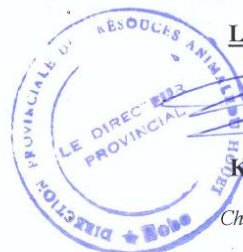
Etant donné que les prélèvements de sang au niveau des canidés est très délicat et risquant, aussi voudrais je souligner qu'un certain nombre de matériel serait indispensable à savoir :

- des gants pour la manipulation des animaux ;
- des tubes de prélèvement ;
- une muselière pour la contention des animaux.

Tout en vous souhaitant bonne réception, je vous prie d'agréer Monsieur le Chef Adjoint, l'expression de mes sentiments distingués.

Ampliations :

- DRRAH/HB
- Toute Clinique Privée



Le Directeur

KOURA Dofinita
Conseiller d'Elevage
Chevalier de l'Ordre National

Annexe 3 : Fiche de collecte des données.

FICHE DE COLLECTE DES DONNEES

Numéro de la fiche collecte :

Lieu de collecte échantillon :

A. CARACTERISTIQUES DU CHIEN

Q01. Sexe : 1=Male ; 2=Femelle

Q02. Age (en année) :

Q03. Poids en Kg

Q04. Race ou couleur : Locale=1 ; Importé ou autre =2

B. STATUT SANITAIRE DU CHIEN

Q05. Signes cliniques Présents Oui=1 ; Non=2

Si oui

Q06.1. Lésions oculaires et/ou alopecie autour des yeux

Q07.2. Lésions ou chancre au niveau du museau

Q08.3. Lésions ou chancre au niveau des oreilles

Q09.4. Lésions cutanées (dermatite)

Q010.5. Onychogriphose ou boiterie

Q011.6. Amaigrissement (perte du poids)

Q012.7. Œdèmes + diarrhée

Q013.8. Fièvre

Q014.9. Arthroses (douleurs articulaires)

Q015.10. Anémie

Q016.11. Troubles de la reproduction (avortements)

Q017.12. Polyhydrobreuvage (boit régulièrement)

Investigation sur la présence de *Leishmania infantum* dans la population canine (réservoir potentiel) dans la ville de Bobo-Dioulasso.

Page 1

Q018.13. Lymphoadénopathies

C.FACTEURS D'EXPOSITION DU CHIEN

Q019. Notion d'errance Oui=1 Non=2

Q020. Séjour en zone d'endémie Oui=1 Non=2

Q021. Transfusion sanguine reçue : Oui=1 Non=2

Q022. Caractéristiques du site d'habitation :

Q022.1. Périurbain : Oui=1 Non=2

Q022.2. Urbain: Oui=1 Non=2

Q022.3. Proche de cour d'eau : Oui=1 Non=2

Q022.4. Proche de végétation: Oui=1 Non=2

Q022.5. Propriétaire instruit : Oui=1 Non=2

D.RESULTATS DE LABORATOIRE

Q023. Sérologie DiaMed-IT LEISH® : Positive Oui=1 Non=2

Q024. PCR (Nested PCR, Noyes *et al.* 1998) : Positive Oui=1 Non=2

Si Oui

***L. infantum* =1 ; *L. major* =2 ; *L. tropica* =3**

Investigation sur la présence de *Leishmania infantum* dans la population canine (réservoir potentiel) dans la ville de Bobo-Dioulasso. Page 2

Annexe 4 : Formulaire d'information du propriétaire de chien.

Les leishmanioses sont des maladies dues à des parasites appelés leishmanies. Ces parasites sont transmis à l'homme ou à l'animal (chien) par la piqûre de la femelle d'un moucheron appelé phlébotome. Sur le plan clinique les leishmanioses se présentent en trois formes : la leishmaniose cutanée (Ouaga 2000, maladie de six mois), la leishmaniose cutanéomuqueuse et la leishmaniose viscérale.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) le poids des leishmanioses reste considérable. En effet, 88 pays sont concernés dont 72 pays en développement. Les zones d'existence permanente de la maladie sont l'Europe du sud et de nombreux pays d'Afrique de l'est, d'Asie du sud, d'Amérique du sud. On note une augmentation de l'incidence des leishmanioses dans le monde. Trois cent cinquante (350) millions de personnes sont exposées et environ 2 millions de nouveaux cas humains sont répertoriés chaque année (1,5 millions concernant la forme cutanée, et 0,5 million la forme viscérale). La mortalité due à cette pathologie est estimée à 60 000 cas par an.

Les leishmanioses constituent un problème de santé publique au Burkina Faso. Jusquelà seules les formes cutanées ont été décrites. La forme qui attaque les viscères n'a pas encore été rencontrée. Les chercheurs s'accordent pour dire que le chien constitue le réservoir de cette forme et que la promiscuité avec le chien infecté constitue un risque pour l'homme. Les signes cliniques comme la fièvre rebelle, l'augmentation du volume du foie, de la rate, se confondent avec d'autres maladies posant donc un problème de diagnostic. Cette situation nous motive donc à connaître le niveau de l'infection de cette maladie chez le chien.

➤ Objectif de l'étude

Nous voulons mener cette étude pour évaluer la prévalence de cette maladie sur la santé des populations de chien dans la ville de Bobo.

➤ Méthodologie

Nous allons sélectionner 376 chiens dans la ville de Bobo-Dioulasso. Avec votre accord, et par un agent vétérinaire nous recueillerons des informations cliniques de votre chien.

Nous recueillerons ensuite un échantillon de sang de 2-4mL, et voir au laboratoire si votre chien est parasité par les leishmanies.

Enfin au où cas les premiers résultats s'avèrent suspects, toujours avec votre accord, nous prélèverons des parties de la peau pour confirmer ou infirmer le résultat. Aussi selon votre accord nous effectueront des captures des insectes vecteurs (phlébotomes) à l'intérieur et/ou à l'extérieur de votre maison à l'aide de moyens techniques appropriés.

❖ **Bénéfices directs et indirects**

➤ **Bénéfices directs**

- Les analyses biologiques permettront de savoir si votre chien souffre de la leishmaniose.
- Les frais d'analyses biologiques sont à la charge de l'étude ;
- Les résultats de tous les examens biologiques vous seront communiqués ;
- En cas de leishmaniose, nous vous conseillerons de prendre attache avec les services vétérinaires pour la prise en charge de votre chien.

➤ **Bénéfices indirects**

Une meilleure connaissance du profil épidémiologique de la leishmaniose chez le chien à Bobo permettra de fournir aux autorités sanitaires humaines et animales des données de base sur cette parasitose et de prendre des décisions importantes.

➤ **Risques éventuels**

Ils sont liés aux prélèvements sanguins. En effet, la seringue et la lame de bistouri utilisée pour prélever le sang, ou le morceau de peau pourrait provoquer une douleur, de rares cas d'hématomes, ou de saignements au point de pique. Nous essayerons par tous les moyens mis à notre disposition de minimiser ces risques.

➤ **Participation à l'étude**

La participation de votre chien à cette étude est entièrement libre. Vous avez le droit de refuser sa participation à l'étude à tout moment.

Le refus de participer ou l'arrêt de sa participation à l'étude n'entraînera aucun préjudice.

➤ **Utilisations des résultats**

Toutes les informations obtenues à la suite de la participation de votre chien seront confidentielles. Les résultats de cette étude pourront être livrés aux autorités sanitaires pour les prises de décisions importantes et être publiés dans une revue médicale mais votre identité ne sera pas révélée. Vous avez le droit de demander des explications sur les résultats obtenus lorsque l'étude sera terminée.

➤ **Procédure de la protection de la confidentialité**

Le personnel de l'étude est astreint au secret professionnel ; cela constitue une garantie de la protection de la confidentialité du chien enrôlé dans l'étude.

Chaque chien participant à l'étude, aura sur sa fiche d'enquête un numéro d'identification.

En outre, les échantillons de chaque chien participant porteront son numéro d'identification.

Les fiches d'enquête seront gardées au Centre MURAZ, les informations ne seront diffusées qu'avec l'accord du participant. Lorsqu'elles seront diffusées, l'origine du chien enrôlé ne sera pas révélée.

Annexe 5 : Fiche de consentement éclairé du représentant légal du chien

Je soussigné.....

Propriétaire du chien du nom de.....

Code d'identification.....

accepte par la présente sa participation à l'étude intitulée: **«Investigation sur la présence de *Leishmania infantum* agent de la leishmaniose viscérale humaine, dans la population canine (réservoir potentiel) dans la ville de Bobo-Dioulasso.»**

J'ai bien pris connaissance des objectifs de l'étude et les conditions de sa réalisation qui m'ont été clairement indiqués par SANGARE Ibrahim (Chercheur à l'INSSA / Centre MURAZ, Téléphone : 70 08 51 67.)

Je reconnais la possibilité qui m'est réservée de refuser sa participation à l'étude ou de la retirer à tout moment quelle qu'en soit la raison et sans avoir à justifier ce retrait.

Les données de cette étude resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par les personnes impliquées dans l'étude, désignées par l'investigateur principal, et les autorités de santé humaine et vétérinaire.

J'accepte volontairement sa participation à la présente étude.

Le propriétaire du chien :

Nom

Prénom.....

Date.....

Signature.....

L'investigateur :

Nom.....

Prénom.....

Date.....

Signature.....

Le témoin indépendant :

Nom

Prénom

Date.....

Signature

Fait à Bobo, le/...../ 2013

Annexe 6: Extraction de l'ADN kinétoplastique selon le kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissue kit® » (Qiagen, Valencia, CA; Janvier 2011).

1. Ajouter aux 200 µL de culot leucocytaire et moins de 0,25g de morceau de biopsie, 20 µL de Protéinase K, mélanger en vortexant et incuber à 56°C jusqu'à la lyse complète du tissu ou des cellules. Vortexer de temps à autre au cours de l'incubation. Vortexer pendant 15 secondes avant d'entamer la seconde étape.
2. Ajouter 200 µL de tampon AL et vortexer
3. Incuber 10 min à 70°C
4. Ajouter 200 µL d'éthanol (100%) et vortexer
5. Déposer le mélange dans la colonne placée dans un tube collecteur
6. Centrifuger 1 min à 8000 rpm puis vider le tube
7. Ajouter 500 µL de tampon AW1 et centrifuger à 8000 rpm puis vider le tube
8. Ajouter 500 µL de tampon AW2 et centrifuger 3 min à vitesse maximale pour éliminer les traces d'éthanol puis vider le tube
9. Insérer la colonne dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL
10. Ajouter 200 µL de tampon d'élution AE et incuber 1 min à température ambiante
11. Centrifuger 1 min à 8000 rpm
12. Jeter la colonne et conserver le tube Eppendorff contenant l'ADN à +4°C.