

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, je remercie le bon **DIEU**, ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance et ma profonde gratitude à l'égard de ma promotrice **Mme EDDAIKRA Naouel**, chargée d'études et de recherche au service d'éco épidémiologie parasitaire à l'IPA, qui m'a témoigné tant de compréhension et qui m'a encouragé et soutenue tout au long de la réalisation de ce modeste travail.

Ma co-promotrice **EDDAIKRA Atika**, chargée de cours à l'université SAAD DAHLEB de Blida.

Il m'est très agréable d'exprimer mes meilleurs sentiments envers **Mme CHARAALLAH A** d'avoir accepté de présider mon jury

Et Dr. **BELMESKINE H** d'avoir accepté d'examiner mon travail

Je remercie chaleureusement Madame **DJENNAD -KHERACHI Ihcèn**, chargée d'études et de recherche au service d'éco épidémiologie parasitaire à l'IPA, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

Enfin, Mes remerciements vont également à toute l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut pasteur et particulièrement à **Mr. GARNI Rafik**.

DEDICACE

Tout d'abord, et avant tout je remercie « dieu » le tout puissant et le clément de m'avoir donné assez de courage et de force pour élaborer et représenter ce modeste travail.

*Je dédie ce travail à **mes chers parents**, à l'âme de mon père, et ma chère mère pour leur soutien sans faille tout au long de ces longues études, Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude, et dont je suis fière, autant qu'ils peuvent l'être de moi.*

A mon cher mari Madjid, ma belle mère et ma précieuse fille Djoumana

A mes chers frères Mohamed, Yacine, Tarek et Abderrezak

A mes chères sœurs Djamila, Leila et Chahraed

A mes chères amies Fatma zohra, Asmaa et Chaima

A toute la famille BENAÏSSA et AITMESGHAT

A tout mes amis et collègues de la promotion 2015/2016

A toute personne qui m'a aidé ou contribué à l'élaboration de ce travail.

Zineb

Liste des abréviations

° C : degré celsius
µl : microlitre
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN cyclique
ADNk: ADN kinétoplastique
ARN : acide ribonucléique
CNRL: Centre national de référence des *Leishmania* .
DO : densité optique
ED :Examen direct.
g : gramme
h : heure
INSP : l'Institut national de santé publique
IPA : institut pasteur Algérie
ITS1: internal transcribed spacer1
L. : leishmania
LC : leishmaniose cutanée
LCM : leishmaniose cutanéomuqueuse
LIPA : leishmania d'institut pasteur d'Algérie
LV : leishmaniose vicérale
M : molaire
Mb : Un mégabit
mg: milligramme
min : minute
ml: millilitre
MLEE :électrophorèse enzymatique multilocus
MLMT : La microsatellite Multi typage
MLST : multilocus sequence typing
NaCl : chlorure de sodium
NNN: Novy Nicolle Mc Neal
OMS : organisation mondiale de la santé
pb: paire de base
PBS :Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase Chain Réaction
PH : potentiel hydrique
QPCR : La PCR quantitative (ou
RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction
rpm: round per minute (tour par minute)
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR: real time polymérase chain reaction
SDS :Sodium Dodecyl Sulfate

SVF : sérum de vœu fœtal

t/m : tour par minute

UV : ultraviolet

v : volt

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces de <i>Leishmania</i> et formes cliniques correspondants.....	9
Tableau 2 : Questions épidémiologiques qui seront abordés par les outils de différenciation des espèces et des <i>souches</i> de <i>Leishmania</i>	16
Tableau 3 : Caractéristiques de la souche de <i>L. major</i>	20
Tableau 4 : les ratios 260/280 et 260/230.....	27
Tableau 5 : les produits du mix et leurs rôles.....	annexe 5
Tableau 6 : Amorces utilisées en PCR pour les deux protocoles.....	annexe 5
Tableau 7 : Les conditions PCR ITS 1 (Préparation du mix).....	annexe 5
Tableau 8 : Programmation du thermocycleur pour ITS 1	annexe 5
Tableau 9 : Les conditions PCR JW11-12 (Préparation du mix).....	annexe 5
Tableau 10 : Programmation du thermocycleur pour JW 11-12	annexe 5
Tableau 11 : volume des produits nécessaires pour un seul échantillon.....	annexe 5
Annexe résultats	
Tableau 1 : résultats du scoring du relargage 1 et 2.....	annexe
Tableau 2 : résultats du scoring qualitatif des techniques d'extraction en fonction des organes	annexe
Tableau 3 : résultats du scoring qualitatif de l'ADN total en fonction des techniques d'extraction et des organes	annexe
Tableau 4 : résultats du scoring qualitatif des PCR ITS et JW en fonction des techniques d'extraction et des organes	annexe
Tableau 5 : résultats du scoring qualitatif et quantitatif de l'ADN par Nanodrop en fonction des techniques d'extraction et des organes.....	annexe
Tableau 6 et 7 : résultats du scoring des étapes des techniques d'extraction et en fonction des organes	annexe

Liste des figures

Figure 1 : Formes amastigotes (Institut Pasteur d'Algérie).....	4
Figure 2 : Forme promastigote (Institut Pasteur D'Algérie).....	4
Figure 3 : Cycles de transmission des leishmanioses.....	7
Figure 4 : Distribution de la leishmaniose dans le monde.....	8
Figure 5 : LV chez un enfant avec une hépatosplénomégalie marquée.....	8
Figure 6 : Leishmaniose cutanée à <i>L.major</i>	9
Figure 7 : Leishmaniose cutanéomuqueuse.....	10
Figure 8 : Répartition de l'incidence de la LC en ALGERIE (IPA).....	12
Figure 9 : L'ADN kinétoplastique de Leishmania (Photographie par microscopie électronique)	15
Figure 10 : Comparaison des Spectres des acides nucléiques avec et sans contaminants.....	27
Figure 11 : mode d'action syber green.....	30
Figure 12 : photos des frottis des oreilles infectées par <i>L. major</i> LIPA 100/09 à la 4 ^{ème} semaine (a) et à la 12 ^{ème} semaine (b).....	32
Figure 13 : Résultats de la moyenne des scores des deux techniques de relargage salin en fonction des paramètres étudiés	33
Figure 14 : Résultats de la moyenne des scores de la qualité des extractions par technique et par organe.....	34
Figure 15 : Résultats de la moyenne des scores de l'ADN total par technique et par organe.....	35
Figure 16 : Résultats des électrophorèses sur gel d'agarose de l'ADN en fonction de la méthodes d'extraction	36
Figure 17 : Résultats de la moyenne des scores du DO de l'ADN total par technique d'extraction et par organe	37
Figure 18 : Résultats de la moyenne des concentrations en ADN total par technique d'extraction et par organe	38
Figure 19 : Résultats de la moyenne des scores des PCR JW et ITS en fonction	

des organes40

Figure 20 : Résultats de la moyenne des scores des PCR JW et ITS en fonction

des techniques41

Figure 21 : Résultats préliminaire de la PCR en temps réel.....42

Résumé

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires touchant l'homme et les animaux dont certains sont des réservoirs. Elles sont en passe de devenir un problème de santé majeur.

Au cours de ces vingt dernières années, de très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Le présent travail a pour principal objectif d'optimiser trois différentes techniques d'extractions, deux méthodes classiques (phénol-chloroforme et relargage salin) et une méthode de kit, et de donner au biologiste les principaux éléments nécessaires au choix de la technique d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon tissulaire la plus adaptée à son laboratoire.

On peut conclure que chacune de ces méthodes fait gagner l'opérateur sur certains détails. En effet, l'utilisation des kits permet de gagner en termes de pureté et de temps, alors que le point fort des méthodes classiques est sans doute leur coût largement inférieur à celui des kits. Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification d'ADN utilisée, nous avons obtenu de l'ADN en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des actes de biologie moléculaire tels que la PCR en temps réel.

Mots clés : leishmaniose -PCR - BALB/c - extraction ADN - PCR en temps réel.

summary:

Leishmaniasis are man and animal parasitic disease. they are fast becoming a major health problem.

During the past twenty years , many methods for extracting nucleic acids have been described, and kits are now available from a number of manufacturers. This work main objective is to optimize three different extraction technicals, both traditional methods (phenol - chloroform and salting out) and a kit method, and to give the biologist necessary elements for choice of DNA extraction technical from a tissue sample that best suits his laboratory.

We can conclude that each of these methods allowed the operator to save some details. Indeed, the use of the kits can save in terms of purity and time, while the strength of conventional methods is probably their largely lower cost than kits. Whatever the method of extraction and purification of DNA used , we obtained DNA in sufficient quality and quantity to perform molecular biology acts wich the real-time PCR .

Key words : leishmaniasis - BALB/c - DNA extraction - PCR - real time PCR.

ملخص :

داء الليشمانيات هو مرض طفيلي يصيب الإنسان والحيوان ، التي تصبح بمثابة مستودعات للمرض. حيث أصبحت تشكل مشكلة صحية كبيرة .

خلال السنوات العشرين الماضية ، قد وصفت وسائل عديدة لاستخراج الأحماض النووية ، وهناك مجموعات متوفرة الآن من عدد من الشركات المصنعة. الهدف الرئيسي لهذا هو العمل على إظهار محاسن ثلاث تقنيات مختلفة للاستخراج ، سواء بالطرق التقليدية (الفينول الكلوروفورم و غسيل الأملاح) و طريقة المجموعات الجاهزة للاستخدام ، وإعطاء المستخدم العناصر الأساسية اللازمة لاختيار تقنية استخراج DNA من عينات الأنسجة التي تناسب مختبره.

يمكننا أن نستنتج أن كل من هذه الأساليب توفر على المستخدم بعض التفاصيل . في الواقع ، استخدام مجموعات يمكن أن يساعد على ربح الوقت و الحصول على DNA نقي، في حين أن نقاط قوة الطرق التقليدية تتلخص في تكلفتها التي هي أقل إلى حد كبير من المجموعات . مهما كانت طريقة استخراج وتنقية DNA المستخدمة ، حصلنا على الحمض النووي بنوعية وكمية كافيتين لتنفيذ أعمال البيولوجيا الجزيئية مثل PCR في الوقت الحقيقي .

المفاتيح : داء الليشمانيا- BALB/c - استخراج الحمض النووي - PCR- PCR الوقت الحقيقي.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....1

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES LEISHMANIOSES

I.1.Définition.....3

I.2.Etude du parasite.....3

 I.2.1.Caractères morphologiques.....3

 I.2.1.1. Forme amastigote.....3

 I.2.1.2. Forme promastigote.....4

 I.2.2. Biologie du parasite.....5

 I.2.3.Reproduction des parasites.....5

 I.2.3.1. Reproduction asexuée.....5

 I.2.3.2. Reproduction sexuée.....5

1. I.3.Vecteurs et Réservoirs5

 I.3.1. Vecteurs.....5

 I.3.2. Réservoirs.....6

I.4. Cycle de transmission.....6

I.5. Distribution géographique.....6

 I.5.1. Les formes cliniques de la leishmaniose8

 I.5.1.1. La leishmaniose viscérale8

 I.5.1.2. La leishmaniose cutanée9

 I.5.1.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse.....10

 I.5.1.4. Leishmaniose canine.....10

 I.5.2. Les Leishmanioses en Algérie.....10

 I.5.2.1. La forme viscérale.....10

 I.5.2.2. La leishmaniose cutanée11

I.6. Traitements.....12

I.7. Modèle animal.....12

I.8. Les techniques de diagnostic.....13

CHAPITRE II: LE GENOME DE LEISHMANIA

II.1. L'ADN nucléaire.....	14
II.2. L'ADN kinétoplastique.....	14
II.3. Approches moléculaires dans l'étude l'épidémiologie et la génétique des populations de Leishmania.....	15
II.4. Techniques modernes permettant la détection du parasite.....	17
II.4.1. Techniques d'extraction d'ADN.....	17
II.4.2. Méthodes d'extraction.....	17
II.4.3. Méthodes de purification.....	18
II.4.3.1. Extraction / Précipitation.....	18
II.4.4. LA PCR (Polymerase Chain Réaction).....	18
II.4.5. La PCR en temps réel.....	19

LA PARTIE PRATIQUE

I. Matériel

I.1. Matériel biologique.....	20
I.1.1. Le parasite.....	20
I.1.2. Les animaux.....	20
I.2. Matériel non biologique.....	20
I.2.1. Appareillage.....	20
I.2.2. Petit matériel et consommables	21
I.2.3. Réactifs et solutions.....	21
I.2.4. Les milieux de culture.....	21

II. Méthodes

II.1. Infestation in vivo.....	21
II.1.1. Préparation de l'inoculum	21
II.1.2. Inoculation	21
II.1.3. Sacrifice des animaux.....	22

II.1.4. Prélèvements des organes lymphoïdes.....	22
II.1.5. Charge parasitaire par examen direct.....	22
II.2. Techniques moléculaires.....	22
II.2.1. Techniques d'extraction de l'ADN.....	22
II.2.1.1. Broyage des organes.....	22
II.2.1.2. Extraction de l'ADN.....	23
II.2.1.2.1. Extraction par Phénol chloroforme.....	23
• Lyse cellulaire.....	23
• Déproteinisation	23
• Précipitation.....	23
II.2.1.2.2. Extraction par relargage salin.....	23
Protocole 1 (LONG-CHENGLI 2004).....	24
• La lyse.....	24
• Précipitation à l'isopropanol.....	24
• Récupération de précipité.....	24
Protocole 2 (MILLER 1988).....	24
• La lyse.....	24
• Précipitation	24
• Récupération de précipité.....	24
II.2.1.2.3. Extraction par Kit.....	25
• La lyse.....	25
• Procédure de purification.....	25
• Lavage de l'ADN.....	25
• Elution de l'ADN.....	25
• Stockage de l'ADN.....	26
II.2.2. Evaluation de la quantité et la qualité de l'ADN.....	26
II.2.3. L'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose	27
II.2.4. La PCR (Polymerase Chain Reaction).....	28
II.2.4.1. Protocole expérimentale.....	28
II.2.4.2. Programmation du Thermocycleur.....	29
II.2.4.3. La révélation des produits PCR.....	29
II.2.5. PCR en temps réel.....	29
II.3. Analyse des résultats.....	30

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Charge parasitaire	32
III.2. Qualité de l'extraction.....	33
III.2.1. Choix du relargage salin.....	33
III.2.2. Résultats qualitatifs en fonction des techniques d'extraction.....	34
III.3. Qualité de l'ADN total.....	35
III.3.1. Sur gel d'agarose.....	35
III.3.2. Sur nanodrop	36
III.3.2.1. Qualité d'ADN	38
III.4. PCR ITS et PCR JW.....	39
III.5. Les étapes de l'extraction.....	41
III.6. PCR en temps réel	41
Discussion	43
Conclusion	45

Les leishmanioses comptent parmi les nombreuses maladies vectorielles affectant l'homme et/ou l'animal qui ont émergé ou ré émergé ces dernières années, elles sont en passe de devenir un problème de santé majeur (**WHO, 2007**)

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires provoquant des affections cutanées ou viscérales très invalidantes, voire mortelles si elles ne sont pas traitées. Elles sont dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ces affections sont transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions (**HARRAT, 2002**).

L'Algérie, comme d'autres pays méditerranéens, est hautement concernés par ces zoonoses qui sont classés dans notre pays comme maladies à déclaration obligatoire (**HARRAT et.,al 1995**). Trois formes cliniques y sévissent à l'état endémique : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCN) et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (**HARRAT et BELKAÏD, 2002**).

Des modèles murins de leishmaniose ont été largement utilisés pour étudier la maladie en laboratoire dont les souris BALB / c, Ces souris sont sensibles à l'infection par différentes espèces de *Leishmania*, y compris *L. major* (Courret, N et al 2003).l' infection *Leishmania* des souris BALB / c se traduit souvent par une croissance incontrôlée du parasite au niveau du site primaire de l'infection suivi par diffusion progressive à travers les ganglions lymphatiques dans le système réticulo-endothélial (**SACKS et ANDERSON, 2004**). La méthode standard pour suivre l'infection dans ce modèle in vivo est basée sur l'estimation des charges parasitaires au niveau des lésions qui se sont développées sur le site de l'infection des animaux sacrifiés par énumération microscopique ou par l'identification directe du parasite par l'utilisation de techniques moléculaires telle que la réaction de polymérisation en chaine (Polymerase Chain Reaction).

La PCR est une technique d'amplification de séquence nucléique, décrite par **MULLIS** en 1985. Elle est devenue un outil quasi universel dans le domaine de la biologie : elle permet d'obtenir en quelques heures plusieurs millions de copies d'une séquence donnée d'ADN. L'obtention de produits d'amplification spécifiques après PCR signe la présence de l'ADN du

parasite dans les prélèvements. la qualité de l'ADN est un facteur crucial pour l'amplification réussie.

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

Les méthodes d'extraction des acides nucléiques peuvent se classer en trois principales classes en fonction du principe auquel elles font appel : les méthodes utilisant des solvants organiques (phénol chloroforme), les méthodes utilisant des solvants non organiques (relargage salin), les méthodes basées sur l'utilisation de micro colonnes (les kits commerciaux).

Le présent travail a pour principal objectif d'optimiser la technique d'extraction d'ADN compte tenu des facteurs suivants :

- la quantité et la qualité de l'ADN extrait en vue d'une qPCR,
- le temps et le cout de l'extraction,
- un protocole utilisable par différents laboratoires dont certains sont peu équipés,

Par ailleurs, deux amorces d'ADN vont être testés pour la recherche des leishmanies dans les organes lymphoïdes de la souris BALB/c **PCR ITS** ciblant le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale du genre *Leishmania*, et **PCR JW** qui cible l'ADN kinétoplastique

I. LES LEISHMANIOSES

1. Définition

Les leishmanioses représentent un groupe de maladies parasitaires d'expression clinique variée, dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ces affections sont transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions pour la leishmaniose cutanée et 500000 pour la leishmaniose viscérale (DESJEUX, 2004).

Les leishmanioses sont des parasitoses ayant en commun :

- **L'épidémiologie** : elles sont transmises à l'homme par la piqûre d'un diptère, le phlébotome (DEDET, 1999), plusieurs espèces sont vectrices, avec une spécificité vecteur-parasite étroite ;
- **La physiopathologie** : les leishmanies infectent les phagocytes mononucléaires de l'hôte ;
- **La thérapeutique** : les mêmes médicaments sont utilisés pour les soigner, il s'agit de dérivés antimoniés (Glucantime®), ou d'autres médicaments (Pentamidine, l'Amphotéricine B. etc.).

2. Etude du parasite

2.1. Caractères morphologiques

Les Leishmanies sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des Kinétoplastidés et à la famille des Trypanosomatidés. Ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades successifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré (DEDET, 2009)

2.1.1. Forme amastigote

C'est une forme intracellulaire, de petite taille, présente chez l'hôte vertèbre sous forme d'un corpuscule ovoïde de 2 à 6 μm de diamètre (dans le grand axe), contenant un noyau sphérique et un kinétoplaste au niveau du quel, on peut percevoir l'amorce du flagelle (rhizoplaste intracellulaire) (figure 1)

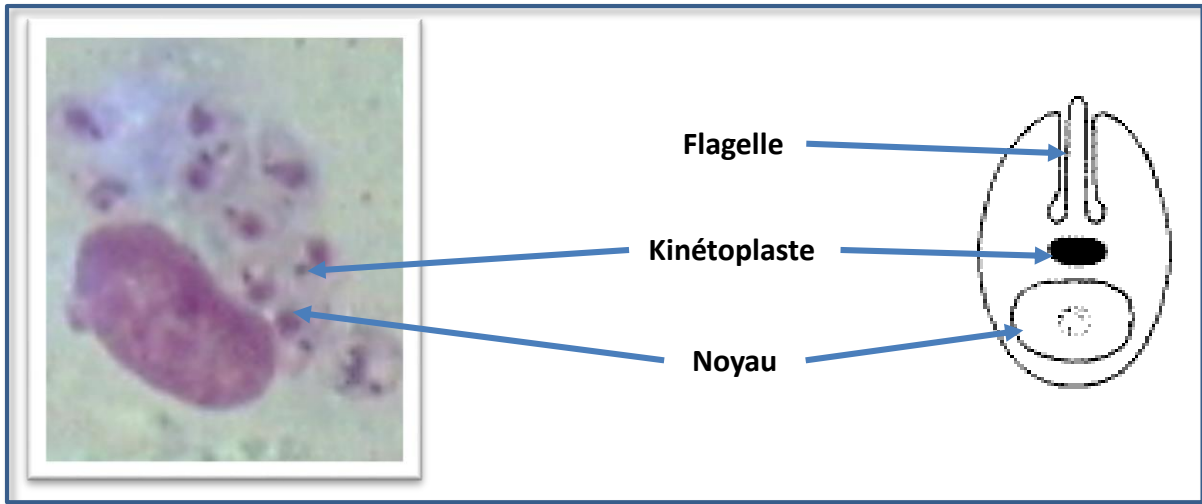


Figure1 : Formes amastigotes (Institut Pasteur d'Algérie) (original)

2.1.2. Forme promastigote

Le parasite sous cette forme est extra cellulaire, allongée, de taille beaucoup plus grande (15 à 25 μm). Le parasite présente un kinétoplaste en position intérieure par rapport au noyau. Le flagelle émergeant dans la partie intérieure possède une position libre importante lui conférant une grande mobilité, cette forme est retrouvée chez le vecteur et dans les milieux de cultures (DEDET. 1999) (Figure 2).

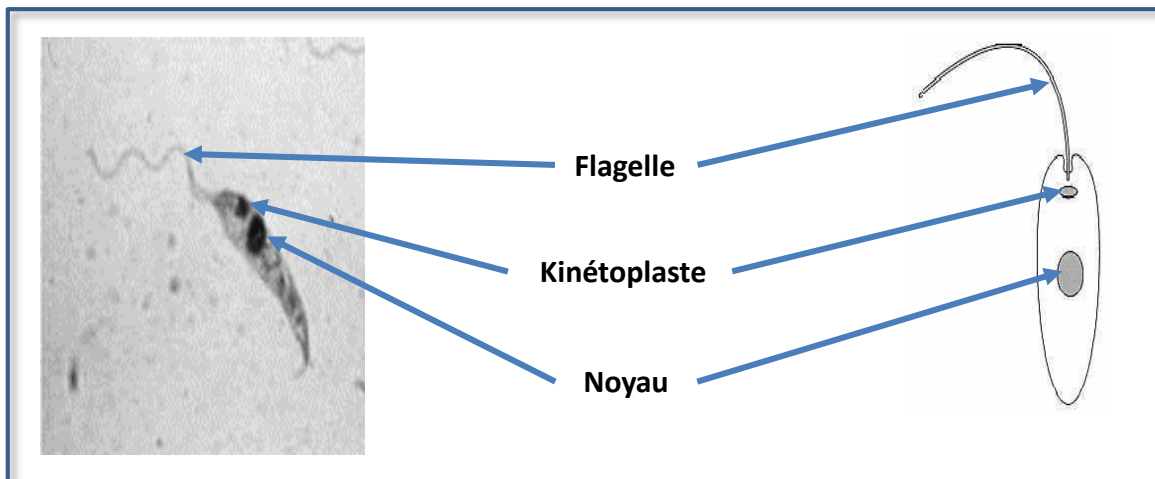


Figure 2 : Forme promastigote (Institut Pasteur D'Algérie) (original)

2.2. Biologie du parasite

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage et se multiplient à l'intérieur des macrophages. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage : les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages. Ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (**BUSSIERAS et CHERMETTE, 1992 ; SLAPPENDEL et FERRER, 1998**).

2.3. Reproduction des parasites

2.3.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée et le mode par lequel les leishmanies se propagent essentiellement. Elle débute par la naissance d'un flagelle fils (de moindre taille), la division du noyau et celle du kinétoplaste viennent après et cela sans que la cytodierèse n'ait lieu puisqu'elle survient en dernier et se fait selon l'axe longitudinal du parasite (**BELKAID et DERRAZ, 1982, RAVEL, 1999**).

2.3.2. Reproduction sexuée

Ce mode de reproduction reste à confirmer, malgré les travaux de plusieurs auteurs comme LANOTTE et RIOUX, qui postulent l'hypothèse de l'échange du matériel génétique entre les parasites au stade promastigote (**BASTIEN et RAVEL, 1999**).

3. Vecteurs et Réservoirs

3.1. Vecteurs

Diptères nématocères de la famille des *Psychodidae*, les phlébotomes sont des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps à l'état adulte : 1,5 à 4 mm). De couleur claire, en général jaune paille, leur corps est couvert de poils et ils présentent des ailes lancéolées dressées. Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement pré-imaginal (œuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide. Mais les biotopes de reproduction ne sont connus que pour peu d'espèces, ce qui constitue une limite très sérieuse à l'établissement de programmes de lutte (**LEGER et DEPAQUIT, 1999**).

Seule la femelle est hémaphage et assure la transmission des leishmanies. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier.

3.2. Réservoirs

Le cycle évolutif des leishmanies peut mettre en jeu un réservoir qui est un mammifère domestique ou sauvage, dont l'espèce varie selon le type de leishmaniose (**DEREURE, 1999**).

4. Cycle de transmission

Le mode naturel de transmission de la leishmaniose est la piqûre infectante du phlébotome lors des repas sanguins chez l'hôte vertébré (figure 3). Le parasite subit alors des changements dans le tube digestif du vecteur et aboutit à la forme promastigote présente au niveau du pharynx de l'insecte. Chez l'hôte vertébré, les promastigotes subissent une transformation et deviennent des amastigotes qui se multiplient dans les cellules du système réticulo-histiocytaire qui finissent par éclater et libérer les formes amastigotes. Celles-ci vont être phagocytées par d'autres cellules (**LEGER et DEPAQUIT, 1999**).

5. Distribution géographique

Largement répandues à la surface du globe (Figure 4), les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe et d'Asie. Présentes sur cinq continents dans les zones tropicales et sub tropicales de 88 pays : 16 sont des pays industrialisés et 72 des pays en développement, dont 13 parmi les pays les moins développés (**DESJEUX et al., 2001**).

On estime à 12 millions le nombre de personnes infectées par les différentes espèces de *Leishmania* en 2000 avec une incidence d'environ 1.0 à 1.5 million de cas par an pour les LC et de 0.5 million de cas par an de LV dans 88 pays (**WHO, 2000 ; DEDET, 2001 ; CROFT et YARDLEY, 2002**).

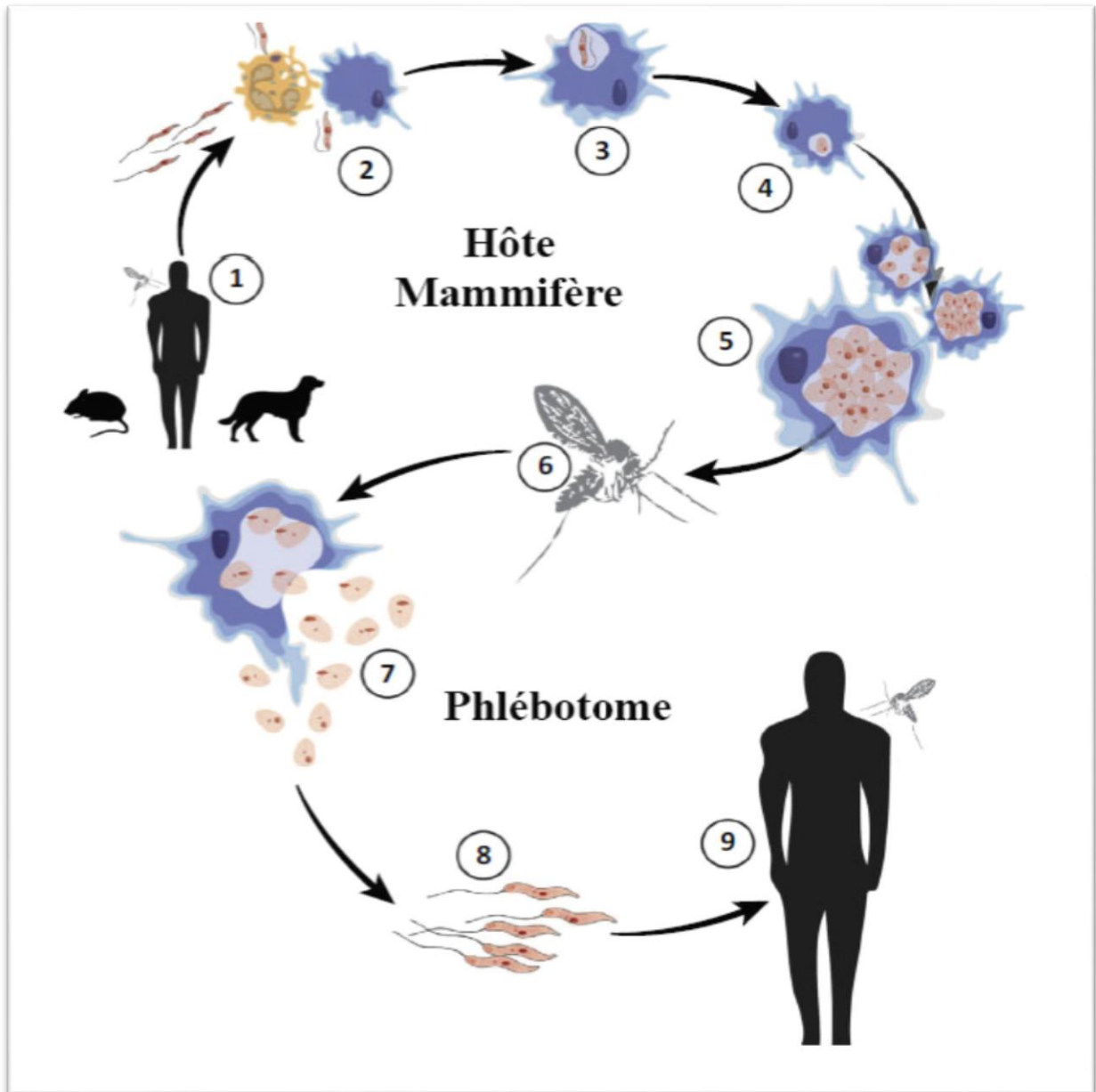


Figure 3: Cycles de transmission des leishmanioses (CANTACESSI *et al.*,2015 modifié)

(1) Les parasites envahissent les macrophages et les granulocytes (2 et 3) et se développent en amastigotes à l'intérieur de la phagolysosome (4) les stades amastigotes répliquent dans le phagolysosome par simple division (5) ;ensuite , les macrophages contenant des amastigotes sont ingérés par le phlébotome pendant le repas de sang (6); les parasites sont libérés par les macrophages infectés au sein de l' intestin moyen de le phlébotome (7) , où ils se transforment en promastigotes procycliques. Ensuite, les parasites migrent vers la soupape stomoceal (de l'intestin moyen antérieur) et se transforment en différents sous-types qui forment les promastigotes métacycliques (8). Ces stades infectieux sont ensuite libérés dans un nouvel hôte mammifère lors d'un repas de sang ultérieur (9).



Figure 4: Distribution de la leishmaniose dans le monde (www.who.int/fr)

5.1. Les formes cliniques de la leishmaniose (tableau 1)

5.1.1. La leishmaniose viscérale (LV)

Egalement appelée **kala-azar**, est mortelle en l'absence de traitement. Caractérisée par des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépatosplénomégalie (augmentation simultanée du volume du foie et de la rate) et une anémie (figure 5). Elle est fortement endémique dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est. Selon les estimations, de 200 000 à 400 000 nouveaux cas de LV surviennent chaque année. Plus de 90% d'entre eux se produisent dans six pays : Bangladesh, Brésil, Éthiopie, Inde, Soudan et Soudan du Sud. (CHAPPUIS *et al.*, 2007)



Figure 5 : LV chez un enfant avec une hépatosplénomégalie marquée

(www.medline.st.com)

Tableau 1 : Espèces de *Leishmania* et formes cliniques correspondants

Sous genre	Sous genre <i>Leishmania</i>		Sous genre <i>Viannia</i>	
Ancien monde	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i>		
Nouveau monde	<i>L. infantum</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lansoni</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. braziliensis</i>
Forme clinique	Viscérale	Cutanée		Muqueuse

5.1.2. La leishmaniose cutanée (LC)

C'est la forme la plus fréquente, qui provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices définitives et des handicaps sévères (figure 6). Environ 95% des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. Plus des deux tiers des cas surviennent dans les six pays suivants : l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, la Colombie, la République arabe syrienne et la République islamique d'Iran. On estime qu'il y a 0,7 million à 1,3 million de nouveaux cas chaque année dans le monde. (BAILEY, 2007; DAVID, 2009)



Figure 6 : Leishmaniose cutanée à *L. major*

(http://c2i.fmpm.uca.ma/umvf_rd/campus-parasitologie-mycologie/cycle2/poly/0716ico.html)

5.1.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse

Elle détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge (figure 7). Près de 90% des cas de leishmaniose muco-cutanée surviennent au Brésil, dans l'État plurinational de Bolivie et au Pérou. (OMS, 2015).



Figure 7 : Leishmaniose cutanéomuqueuse(www.parasitologie.univ-montp1.fr)

5.1.4. Leishmaniose canine

La leishmaniose canine est une atteinte assez commune du chien dans des foyers où sévit la leishmaniose viscérale humaine. Des études portant sur des chiens soumis à des conditions d'infestation en milieu naturel ont permis de démontrer que l'affection débute par un chancre d'inoculation, surviennent ensuite des lésions qui peuvent apparaître après 1 à 6 mois d'incubation (KILLICKI et KILLICKI, 1999).

5.2. Les Leishmanioses en Algérie

L'Algérie est un pays qui compte parmi les plus exposés au Monde, elle est concernée par deux formes cliniques sévissant à l'état endémique :

5.2.1. La forme viscérale

L'agent responsable de la LV est *Leishmania infantum*. Il est transmis par *Phlebotomus perniciosus* (PARROT *et al.*, 1930 ; PARROT *et al.*, 1931 ; IZRI *et al.*, 1990). La LV sévit dans le nord du pays et touche essentiellement les enfants en bas âge (90% des cas sont pédiatriques) et les sujets dont l'immunité est faible tel que les sujets séropositifs (VIH). Le réservoir de la leishmaniose viscérale est le chien (BENIKHLEF *et al.*, 2004). Elle s'étend sur toute la partie Nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humide et subhumide, mais il

est important de signaler la survenue de nombreux cas dans les régions semi-arides et arides connues pour être des foyers de leishmaniose cutanée zoonotique. (BELKAID et HARRAT, 1997).

Entre 1995 et 2003, 1 654 cas ont été déclarés à l'Institut national de santé publique (INSP). Cette incidence est sans doute inférieure à la réalité dans la mesure où plusieurs cas échappent au diagnostic du fait de l'insuffisance de l'infrastructure sanitaire dans les zones rurales et de la sous-déclaration des cas. (BELAZZOUG *et al.*, 1985 ; HARRAT *et al.*, 1990 ; BACHI 2006)

5.2.2. La leishmaniose cutanée

Sur une période de 12 années (1991 à 2002), l'incidence annuelle de la leishmaniose cutanée zoonotique a connu des variations très importantes allant de 5 à 34 cas pour 100 000 habitants (REM, 2002) (figure 8). Il existe 3 formes :

- La leishmaniose cutanée du nord : la transmission du parasite est assurée par *Phlebotomus perfiliewi*, trouvé naturellement infesté par le variant enzymatique *L. infantum* MON24, dans la localité de Ténès, foyer actif de la leishmaniose cutanée du nord (IZRI *et al.*, 1993). Le chien est le principal réservoir de *L. infantum* (BENIKHLEF *et al.*, 2004).
- La leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major* transmise par *Phlebotomus papatasi*, Cette forme sévit à l'état endémo-épidémique au niveau des zones arides et semi-arides de l'Afrique du Nord et dont les réservoirs sont des rongeurs sauvages désertiques : *Meriones shawi* et *Psammomys obesus*. (BELAZZOUG, 1983, HARRAT *et al.*, 1996)
- La leishmaniose cutanée à *L. killicki* : décrite récemment dans le sud de l'Algérie dans la région de Ghardaïa (HARRAT *et al.*, 2009) et transmise par *Phlebotomus sergenti* (BOUBIDI *et al.*, 2011).

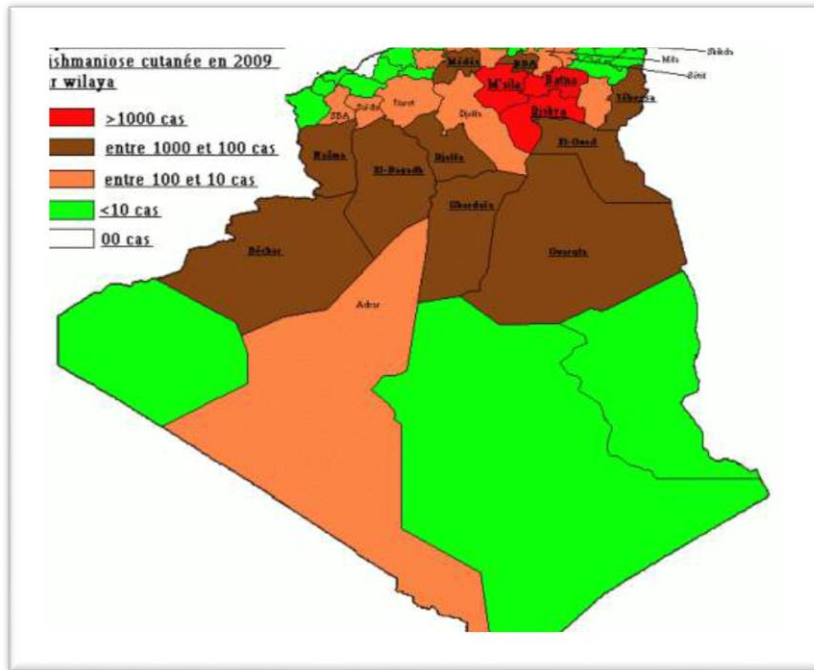


Figure 8 : Répartition de l'incidence de la LC en 2009 en ALGERIE (IPA)

6. Traitements

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

7. Modèle animal

Il existe des souris, dont la souris BALB/c qui arrivent à développer la leishmaniose cutanée et viscérale suite à une infection expérimentale. Dans certains cas, elles meurent suivant une infection à *L. tropica* ou *L. major* tandis que d'autres souris tel que la C57BY6 guérissent spontanément de leurs lésions cutanées (MUYOMBWE *et al.*, 1998). Ces modèles expérimentaux de leishmanioses chez les rongeurs ont permis d'accumuler des informations importantes concernant ces pathologies et pourraient potentiellement permettre l'élaboration de nouvelles approches immunologiques afin de contrôler ces maladies chez l'homme. Toutefois, comme pour plusieurs modèles animaux lors de maladies infectieuses, on n'a pu déterminer jusqu'à quel point ces systèmes rejoignent les pathologies observées chez l'homme.

Les souris BALB/c, contrairement à la très grande majorité des souches de souris utilisées en laboratoire, sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection. Ces animaux constituent donc un modèle expérimental particulièrement bien adapté à l'identification des gènes impliqués dans le développement d'une réponse immunitaire (**FILLIPI *et al.*, 2001**).

8. Les techniques de diagnostic

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son acide désoxyribonucléique (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée (**LE FICHOUX *et al.*, 1999**).

Les techniques de diagnostic classiques reposent sur la mise en évidence du parasite dans un prélèvement (grattage, biopsie) sous forme de frottis, ou par une culture de ce prélèvement sur des milieux semi-solide et liquides (annexe1)

II. LE GENOME DE LEISHMANIA

1. L'ADN nucléaire

Le génome de *Leishmania* varie de 29Mb pour *L. amazonensis*, à 33 Mb pour *L. major*, *L. infantum* et *L. braziliensis* (PEACOCK, 2007 ; REAL, 2013). Il est organisé en un nombre variable de chromosomes : 34 pour *L. amazonensis* et *L. mexicana*, 35 chez *L. braziliensis*, et 36 pour *L. major*, *L. donovani*, et *L. infantum* (REAL, 2013). Malgré la variabilité pathogénique des différentes espèces de *Leishmania* et la différence dans leur tropisme tissulaire, leur génome est remarquablement similaire, montrant un haut degré de conservation dans l'architecture et le contenu génique (PEACOCK, 2007 ; REAL, 2013).

L'ADN des leishmanies est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques (MYLER, 2000). Il est très riche en G/C puisqu'il est de 60% en moyenne (ALVAREZ, 1994), et contient assez peu de séquences répétées (OUELETTE, 2003)

L'état de ploïdie de *Leishmania* s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie. En effet, des doubles knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique (SOUZA, 1994). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation) (DUJARDIN, 2000), ou des amplifications chromosomiques (SITES, 1999) ont été mis en évidence.

2. L'ADN kinétoplastique

Il constitue 10 à 20 % de l'ADN total (SIMPSON, 1987), et renferme deux types d'ADN : les **minicercles** impliqués dans les phénomènes « d'editing » (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN et les **maxicercles** codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques (KABB, 2011 ; GOTT, 2003) (figure 9). Ce mécanisme « d'editing », commun à tous les kinétoplastidés, permet d'exprimer les transcrits des maxicercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités.



Figure 9 : L'ADN kinétoplastique de *Leishmania* (BANULS *et al.*, 2007)

(Photographie par microscopie électronique)

3. Approches moléculaires dans l'étude l'épidémiologie et la génétique des populations de *Leishmania*

Ses approches moléculaires sont utilisées de plus en plus dans les études épidémiologiques de leishmanioses viscérales et cutanées. Plusieurs marqueurs moléculaires permettant de résoudre les différences génétiques entre *Leishmania* à des niveaux d'espèces et la souche ont été développés pour aborder des questions clés génétiques épidémiologiques et démographiques. Pour l'étude épidémiologique de *Leishmania*, la technique taxonomique de référence est le typage isoenzymatique (Multilocus Enzyme Electrophoresis :MLEE) 1984; (RIOUX *et al.*, 1990; WHO, 1990). Elle reste une technique de choix pour l'identification des espèces et les études de diversités génétiques (BANULS *et al.*, 2007). La MLEE détecte les allèles des gènes conservés par les différences de mobilité électrophorétique des enzymes pour lesquelles ils codent.

Depuis l'avènement de la PCR, de nombreux outils moléculaires permettant de distinguer les espèces ont été publiés (tableau 1). Ces outils vont de technique d'empreintes génétiques telles que la PCR RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism. (Polymorphisme de longueur de fragment de restriction), à la MLST (multilocus sequence typing), où il s'agit d'examiner les séquences nucléotidiques de plusieurs locus codant des gènes de ménage (housekeeping genes) ou des fragments de gènes de ménage (judicieusement choisis au départ). Le typage microsatellite multilocus (MLMT), est potentiellement l'approche phylogénétique la plus puissante et va, très probablement, remplacer MLEE à l'avenir (ALURU *et al.*, 2015)

La microsatellite Multi typage (MLMT) est capable de discriminer en dessous du niveau de zymodème et semble être le meilleur candidat pour devenir l'or -étalon pour la distinction de souches. Des études génétiques de Population ont révélé par MLMT structure population géographique et hiérarchique dans *L. tropica*, *L. major* et le complexe *L. donovani*. L'existence d'hybrides et de flux de gènes entre populations de *Leishmania* suggère que la recombinaison sexuelle est plus fréquente qu'on ne le pensait. Cependant, tapant que outils analytiques ont besoin d'être améliorée. Les bases de données accessibles doivent être créés et soutenus pour intégrer les données obtenues par différents chercheurs. Cela permettrait d'analyses globales et aider à éviter les biais dans les analyses en raison de la petite taille des échantillons (tableau 2).

Tableau 2 : Questions épidémiologiques qui seront abordés par les outils de différenciation des espèces et des souches de *Leishmania*.

	MLEEa	Espèce spec.PCR	Genre Espèce .PCR (espèces id par RFLPb, Hybridation, séquençage,HRM)	RFLP PCR minicercle ADNk	MLST	MLMT
Typage des espèces						
L'identification des espèces sympatriques et importés	X	(X)	X		X	
L'identification des espèces associée à l'échec du traitement	X	(X)	X		X	
Identification de nouveaux hôtes réservoirs non humain	X	X	X		X	
Incrimination de nouveaux vecteurs phlébotomes	X	X	X		X	
Détection de nouveaux parasites-insectes-host-combinaisons	X	X	X		X	
La détection des hybrides	X				X	
Le typage des souches						
Comparaison des souches isolées à partir de différents hôtes	X			X		X
Différenciation entre cycle de transmission zoonotique et anthroponotiques	X			X		X
Identification de nouveaux génotypes de mammifères et d'insectes hôtes	X			X		X
Identification des origines des nouveaux génotypes	X					X
Rechercher génotypes liés à la résistance aux médicaments				X		X
Différenciation entre la persistance ou la ré-inoculation des rechutes				X		X
Détection des épidémies	X			X		X
Identification des sources de <i>Leishmania</i>	X					X
Test pour la structure de la population des espèces de <i>Leishmania</i>						X
Test de flux génétique entre les populations et pour les hybrides	X					X

Abréviations : MLEE : électrophorèse enzymatique multilocus, RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction, MLST : multilocus sequence typing; MLMT : multilocus typage microsatellites. (X) une application limitée.

4. Techniques modernes permettant la détection du parasite

Elles permettent de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie), et de déterminer aussi avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable.

La détection des antigènes excrétés par les amastigotes se fera par des anticorps monoclonaux et celle des acides nucléiques du parasite, par hybridation moléculaire (sondes marquées aux isotopes) ou amplification de séquences identifiées (PCR) suivie d'hybridation.

4.1. Techniques d'extraction d'ADN

Vu qu'il existe une grande diversité de méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques, le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants :

- L'acide nucléique cible,
- L'organisme source,
- Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.),
- Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.),
- L'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADNc, etc.)

4.2. Méthodes d'extraction

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- la rupture mécanique (tel que le broyage ou lyse hypotonique),
- le traitement chimique (tel que la lyse détergente, les agents chaotropiques, la réduction des thiols)
- et la digestion enzymatique (tel que la protéinase K).

La rupture de la membrane et l'inactivation des nucléases intracellulaires peuvent être combinées. À titre d'exemple, une solution simple peut contenir des détergents pour solubiliser les membranes cellulaires et des sels chaotropiques puissants pour inactiver les enzymes

intracellulaires. Après la lyse cellulaire et l'inactivation des nucléases, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation.

4.3.Méthodes de purification

Les méthodes de purification des acides nucléiques issus d'extraits cellulaires sont généralement des combinaisons de deux ou plusieurs des techniques (**ZIMMERMANN *et al.*, 1998**) :

- Extraction/précipitation,
- Chromatographie,
- Centrifugation,
- Séparation par affinité.

4.3.1. Extraction/Précipitation

L'extraction par solvants est souvent utilisée pour éliminer les contaminants d'acides nucléiques. À titre d'exemple, une combinaison de phénol et de chloroforme sert fréquemment à supprimer les protéines. La précipitation par l'isopropanol ou l'éthanol est généralement utilisée pour concentrer les acides nucléiques. Si la quantité d'acides nucléiques cibles est faible, un véhicule inerte (tel que le glycogène) peut être ajouté au mélange afin d'accroître l'efficacité de la précipitation. D'autres méthodes de précipitation des acides nucléiques incluent la précipitation sélective à l'aide de fortes concentrations de sel (« relargage ») ou la précipitation de protéines en utilisant les changements au niveau du pH (**MURRAY et THOMPSON, 1980**).

4.5. LA PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification de séquence nucléique, décrite par **MULLIS en 1985**. Elle est devenue un outil quasi universel dans le domaine de la biologie et permet d'obtenir en quelques heures plusieurs millions de copies d'une séquence donnée d'ADN. Son principe est d'utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Le processus est initié par la fixation d'amorces oligonucléotidiques (≈ 20 pb : primers), de séquences complémentaires de l'un et l'autre des brins à amplifier. Elles délimitent la longueur du fragment à amplifier.

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. A partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides

nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Sa nature exponentielle rend cette technique attrayante pour des analyses quantitatives. Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. En pratique, il n'est pas rare que les réactions de PCR en réplica donnent des taux différents d'amplicons. (MULLIS, et FALOONA, 1987)

Le développement de la PCR quantitative en temps réel (utilisée dans notre étude) a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière.

4.6. La PCR en temps réel

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible. Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit le temps d'analyse. Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle. (POITRAS et HOUDE, 2002).

MATERIEL

1. Matériel biologique

1.1. Le parasite

Une souche appartenant à l'espèce *Leishmania major* LIPA 100/09 a été choisies pour l'infestation in vivo chez les souris BALB/c. Les caractéristiques de cette souche sont données dans le tableau 3.

Cette souche de la cryobanque du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'IPA, a été décongelée et cultivée sur milieu NNN puis passée sur un milieu RPMI 10S (Annexe 2)

Tableau 3 : Caractéristiques de la souche de *L. major*

Code OMS de la souche	Espèce	Origine du patient
MHOM/DZ/ 09/LIPA 100/09	<i>Leishmania major</i>	Msila

1.2. Les animaux

Les souris BALB/c sont issues de l'animalerie du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'IPA dans des conditions standards de température et de luminosité et aliments ad libitum. Huit souris femelles non pleines, âgées de 6 semaines avec un poids moyen de 18 g, ont été distribuées en deux groupes. Le 1^{er}lot a été sacrifié après 4 semaines d'inoculation et le second après 12 semaines d'inoculation.

2. Matériel non biologique

2.1. Appareillage

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage : Microscope optique (Motic) ;Centrifugeuse (Eppendorf) ;Centrifugeuse réfrigérée (Sigma), Vortex (kartell) ;Bain marie (Memmert) ; Hotte a flux laminaire pour biologie moléculaire(Captair) ;Hotte chimique (Gelaire 1) ; Transilluminateur (Spectroline) ;Balance à précision (Scaltec) ; Balance (Ohaus), Microonde (Whirlpool) ; Thermocycleur (Technegenius) ; Cuves électrophorèse (Fiesher) ;Générateur de courant (consort) ; Spectrophotomètre (Nanodrop[™]) Smartcycler (Cepheid) ; Agitateur (Stuart), pH mètre (Mettlertoledo), Cages pour rongeurs ; Pied à coulisse.

2.2. Petit matériel et consommables

On a utilisé lors de ce travail le matériel suivant : trousse de dissection, verrerie, poire, tube Eppendorfs, lames porte objet, lamelles, cellule de numération de Thoma, pipettes stériles à usage unique de 5 à 20 ml, micropipettes, pipettes multicanaux, tubes coniques, seringues.

2.3. Réactifs et solutions

Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau physiologiques, Di-éthyle éther (SIGMA-ALDRICH), méthanol (MERCK), huile a émersion (REACTIFS RAL), bleu de Trypan (RAL555),Giemsa (MERK), tampon de lyse(MERCK) , protéinase K (EUROBIO), phénol chloroforme alcool iso amylique (MERCK), réactifs de kit QIAGEN, gel d'agarose (EUROBIO).

2.4. Les milieux de culture

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont : le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal), le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté de 10% de SVF (sérum de vœu fœtal), préparés au niveau de laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire IPA(annexe 2).

METHODES

1. Infestation in vivo

1.1. Préparation de l'inoculum

Après culture sur milieu NNN puis transfert sur milieu RPMI+SVF 10%, les suspensions parasitaires en phase exponentielle ont subi trois lavages avec de l'eau physiologique à 2500 rpm pendant 10 minutes. La concentration parasitaire a été ajusté à 10^6 parasite /ml.

1.2. Inoculation

Une injection de 10^3 parasites a été réalisée en intradermique au niveau du pavillon de l'oreille gauche des souris BALB/c selon les lots (BELKAID *et al.*, 1998).

1.3. Sacrifice des animaux

La surveillance et dissémination des parasites dans les tissus de différents organes (oreille, ganglions lymphatiques drainant de l'oreille, la rate et le foie) ont été réalisées par plusieurs méthodes de détection (microscopie et amplification génique), pour cela les 02 lots de souris ont été sacrifiés à 4 et 12 semaines post infection.

1.4. Prélèvements des organes lymphoïdes

Après avoir anesthésié les souris à l'éther, les organes : les ganglions lymphatiques drainant de l'oreille infectée, la rate, le foie et l'oreille ont été prélevés en utilisant différents ciseaux pour éviter la contamination, et stockés dans des micro tubes de 1,5 ml à usage unique dans du PBS à -80 ° C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

1.5. Charge parasitaire par examen direct

La recherche et quantification des leishmanies au niveau du point d'inoculation a été faite par un grattage de la lésion, par la suite 03 appositions à partir de l'oreille grattée ont été réalisées sur une lame porte objet, séchées et colorées au GIEMSA (annexe 2). La charge parasitaire au niveau du site d'inoculation a été estimée par comptages des parasites par 100 champs.

2. Techniques moléculaires

2.1. Techniques d'extraction de l'ADN

L'objectif était de purifier l'ADN afin d'obtenir la meilleur qualité et quantité d'ADN de *Leishmania* à partir des organes lymphoïdes de la souris BALB/c infectées par *L.major* (LIPA 100). Des échantillons de tissus ont été obtenus en utilisant un poinçon de biopsie de 6 mm le poids des tissus a été de : ≥ 25 mg de foie ,10 mg de la rate, 45 mg de l'oreille et un ganglion complet, les organes sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.1. Broyage des organes

Les tissus prélevés sont d'abord coupés en petits morceaux à l'aide d'un bistouri stérile puis broyés mécaniquement dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon dans des tubes appropriés pour les cellules animales préalablement numérotés et codés, le broyage se fait, directement dans 200 μ l de tampon de lyse, dont la composition chimique varie en fonction de la technique d'extraction d'ADN choisie.

2.1.2. Extraction de l'ADN

Au cours de notre étude, nous avons comparé 3 méthodes d'extractions d'ADN

2.1.2.1. Extraction par Phénol chloroforme

C'est un procédé d'extraction qui repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans une émulsion à deux phases : une phase aqueuse et une phase organique.

- **Lyse cellulaire**

200µl tampon de lyse ont été ajouté au broyat pour casser les ponts disulfure, ensuite 12.5 µl de SDS 10% ont été ajoutés pour casser la bicouche lipidique après 2.5µl de RNAase a été ajoutés pour éliminer tous les ARN et incubés à température ambiante pendant 20 à 30 min. L'ADN libéré dans le milieu est alors traité par une protéinase K (20µl), qui a pour but de digérer les protéines qui lui sont associés, la lyse est réalisée au bain marie à 56°C toute une nuit. Le lendemain on récupère le lysat.

- **Déprotéinisation :**

La déprotéinisation de la solution se fait par une extraction au phénol/chloroforme/isolamique (25:24:1). Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation à 2500t/m pendant 15 minutes.

- **Précipitation**

Pour précipiter l'ADN, 200µl de la phase aqueuse sont récupérés dans un nouveau tube , 1/10 volume d'acétate et 2 volume de l'alcool absolu sont ajoutés puis centrifugés à +4°C 12000tour/min pendant 15 min, Le culot est lavé avec 60µl d'alcool 70° les culots sont séchés à température ambiante toute la nuit ,60 µl de tampon d'élution sont ajoutés aux culots de 2 à 3 heures a fin de réhydrater l'ADN.

2.1.2.2. Extraction par relargage salin

Le relargage est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. L'ADN subit une lyse puis précipité dans l'alcool. Nous avons testé 2 protocoles de relargage salin afin de choisir le plus efficace pour la comparaison avec les autres techniques d'extractions choisies. Le protocole n°1 est celui de LONG-CHENGLI (2004), et le protocole n° 2 est celui de MILLER (1988).

Protocole 1 (LONG-CHENGLI 2004)

Ce procédé implique le relargage des protéines avec une solution saturée de NaCl et une précipitation avec l'isopropanol.

- **La lyse :** 0.5 ml de tampon de lyse 1(annexe3) est ajouté au broyat. La digestion est complète en quelques heures à 55°C avec agitation.
- **Précipitation à l'isopropanol:** un volume d'isopropanol est ajouté au lysat et les échantillons sont mélangés ou tourbillonné jusqu'à précipitation complète (environ 10-20 min) (viscosité complètement disparu).
- **Récupération de précipité :** l'ADN est récupéré par la levée de l'agrégat précipité de la solution en utilisant une pointe jaune jetable. Le liquide en excès est tamponné et l'ADN est dispersé dans un tube Eppendorf contenant préalablement marqué, en fonction de la taille du précipité, de 60 µl de tampon d'élution1 (annexe 3). La dissolution complète de l'ADN peut nécessiter plusieurs heures d'agitation à 37 ° C ou 55 ° C (parfois toute une nuit). Il est important que l'ADN soit complètement dissous.

Protocole 2 (MILLER 1988) :

Ce procédé implique le relargage des protéines cellulaires par la déshydratation et la précipitation avec une solution saturée de NaCl.

- **La lyse :** 3 µl de tampon de lyse 2 (annexe 3) est ajoutés au broyat. Les lysats ont été digérés pendant une nuit à 37 ° C avec 0,2 ml de SDS à 10% et 0,5 ml d'une solution protéase K (annexe 3).
- **Précipitation :** après digestion total 1 ml de NaCl saturé (6 M) est ajouté à chaque tube et secoué vigoureusement pendant 15 secondes suivi d'une centrifugation 2500 rpm pendant 15 minutes. Les protéines précipitées seront précipitées au fond du tube et le surnageant contenant l'ADN sera transféré dans un autre tube. Deux volumes d'éthanol absolu sont ajoutés à 200 µl de surnageant contenant l'ADN, puis centrifugé à 12000 tours/minute à + 4°C.
- **Récupération de précipité :** Les méduses d'ADN sont récupérées dans un nouveau tube, puis lavées avec l'éthanol 70° et laissées à sécher toute la nuit. Après séchage, 60 µl de tampon d'élution 2 (annexe 3) sont ajoutés dans le tube.

La dissolution complète de l'ADN peut nécessiter plusieurs heures d'agitation à 37 ° C ou 55 ° C.

2.1.2.3. Extraction par Kit

C'est une méthode d'extraction commercialisée sous forme de kits prêts à l'emploi. Nous avons utilisé le kit Invitrogen PureLink génomique mini kit. C'est un kit magnétique se basant sur l'activité des perles magnétiques qui se collent sélectivement à l'ADN avec une haute précision.

- **La lyse** : On mélange 180 µl de tampon de digestion PureLink® génomique et 20 µl de protéinase K (fourni avec le kit) dans le tube en vérifiant que le tissu est complètement immergé dans le mélange de tampon. Le mélange est incubé à 55 ° C avec vortex occasionnel jusqu'à ce que la lyse soit terminée (1-4 heures). Afin de retirer les matières particulaires, le lysat est centrifugé à la vitesse maximale pendant 3 minutes à température ambiante. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube stérile auquel on rajoute 20µL de RNase A (fourni dans le kit). Après vortex, le mélange est incubé à température ambiante pendant 2 minutes. L'étape suivante sera de rajouter 200 µL PureLink® GenomicLysis / Binding Buffer et bien mélanger par vortex. Enfin, on rajoute 200 µl 96-100 % d'éthanol au lysat et on mélange bien au vortex pendant 5 secondes en mettant 200 µl de Lysis / Binding Buffer et 200 µl 96-100 % d'éthanol par échantillon.

- **Procédure de purification** : Le kit d'extraction PureLink d'Invitrogen utilise des colonnes de centrifugation à base de membranes de silice pour capturer l'ADN à partir de tranches de gel solubilisées.

- **Lavage de l'ADN** : Tout d'abords on rajoute 500 µl de tampon de lavage 1 préparé avec de l'éthanol à la colonne. Ensuite, on place la colonne dans une centrifugeuse à température ambiante à 10 000 g pendant 1 minute. Après la centrifugation, on jette le tube de collecte et on place la colonne de spin dans un PureLink® propre (tube de collecte fourni avec le kit). Par la suite, on rajoute 500µl de tampon de lavage 2 préparé avec de l'éthanol de la colonne. Enfin, on centrifuge la colonne à la vitesse maximale pendant 3 minutes à la température de la chambre et on jette le tube de collecte à la fin.

- **Elution de l'ADN** : On commence par placez la colonne spin dans un tube stérile de centrifugation de 1,5 ml. À cette dernière, on rajoute 25-200 µl PureLink® de génomique de tampon d'élution. Ainsi, on l'incube à température ambiante pendant 1 minute. Ensuite, on procède à la centrifugation la colonne à la vitesse maximale pendant 1 minute à température ambiante. A la fin de cette opération, Le tube va contenir de l'ADN génomique purifiée. Pour récupérer plus d'ADN, effectuez une deuxième étape d'élution en utilisant le même volume de

tampon comme première élution dans un autre micro tube stérile de 1,5 ml, puis, on met la colonne dans une centrifugeuse sur la vitesse maximale pendant 1,5 minute à la température de la pièce. A la fin, Le tube contient de l'ADN purifié. On peut ainsi le retirer et jeter la colonne.

- **Stockage de l'ADN** Pour éviter les congélations et décongélations répétées de l'ADN purifié, il est stocké à +4 ° C pour une utilisation immédiate ou aliquoté. L'ADN est conservé à -20 ° C pour un stockage à long terme

2.2. Evaluation de la quantité et la qualité de l'ADN

La concentration de l'ADN extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop. Les acides nucléiques absorbent à 260nm, alors que les protéines absorbent à 280nm (à cause des acides aminés aromatiques (Phe, Trp, Tyr). Les molécules organiques (tampons, etc...) absorbent à 230nm. La pureté des échantillons a été déterminée par le rapport de la mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm, un rapport supérieur à 1,8 signifie que les échantillons ne contiennent que de faibles niveaux de contaminants protéiques. C'est pourquoi un mauvais ratio 260/280 (généralement <1.9) indique une contamination par protéines et un mauvais ratio 260/230 (généralement >2) indique une contamination par molécules organiques.

Les sources communes de polluants associés à des techniques d'isolement nucléiques acides comprennent l'extraction phénol / Trizol et la colonne. Dans le cas de l'extraction phénol / Trizol, la contamination réactif résiduel peut être indiquée par des spectres anormaux entre 220 à 240 nm ainsi que par des changements dans la région 260-280 nm. Inversement, la guanidine résiduelles provenant de l'extraction de colonne peut contribuer à un pic de près de 230 nm et un changement dans le creux de 230 nm à environ 240 nm (**DESJARDIN et CONKLIN, 2010**).

Pour évaluer avec précision la qualité des échantillons, 260/280 ou 260/230 ratios doivent être analysés en combinaison avec la qualité spectrale globale. Pour les acides nucléiques, généralement un ratio de rendement des 260/280 ~ 1,8 et un ratio de 260/230 de ~ 2.0 pour l'ADN et l'ARN, respectivement. Ce ratio est dépendant du pH et la force ionique du tampon utilisé pour faire l'ébauche et les mesures d'échantillons. Des solutions acides seront sous-représenter le ratio de 0,2-0,3, tandis qu'une solution de base sera sur-représenter le ratio de 0,2-0,3. Ratios significativement différents de pureté peut indiquer la présence de protéines, de

contaminants de phénol ou d'autres qui absorbent fortement à ou près 280 nm. Le ratio 260/230 pureté est une deuxième mesure de pureté de l'ADN avec des valeurs pour un acide nucléique «pure» couramment de l'ordre de 1.8 à 2.2. Ratios de pureté qui sont nettement inférieurs aux valeurs attendues peuvent indiquer la technique d'isolement utilisées peuvent nécessiter une optimisation plus poussée (Figure 10).

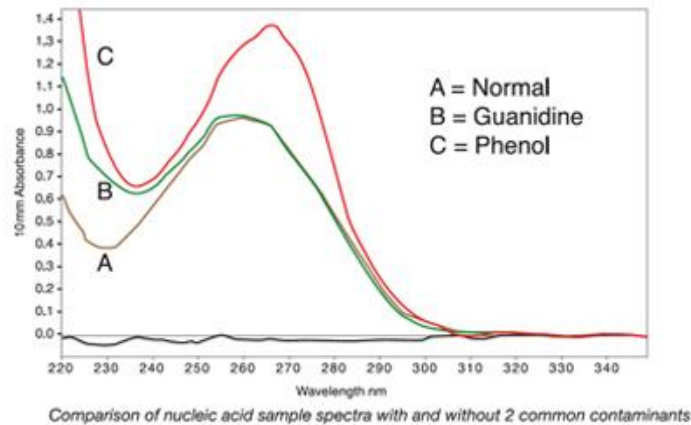


Figure 10 : Comparaison des Spectres des acides nucléiques avec et sans contaminants
(DESJARDIN et CONKLIN, 2010)

2.3. L'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose

Par électrophorèse sur gel d'agarose (annexe 4), on peut analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium, un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN.

Pour cela, on mélange 7µl du produit de PCR avec 3µl de tampon de charge puis on les dépose dans les puits de gel en réservant les trois derniers puits respectivement pour le témoin négatif, le témoin positif et le marqueur de PM. Ensuite, on branche les électrodes de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient de côté cathode en appliquant une tension de 120 V qui correspond à 1h de migration. Enfin, quand le colorant de charge arrive à proximité du front de migration, on coupe l'alimentation. La Révélation des bandes d'ADN se fait par le transilluminateur : Il s'agit d'une simple visualisation de la migration des bandes d'ADN sur une table UV du transilluminateur dans une chambre noire.

2.4. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction PCR (Mullis, 1985) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique, et répétition d'élongation, en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. **Principe :** Dans le thermocycleur, il se produit dans un premier temps une **dénaturation thermique :** Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé, à une température élevée de l'ordre de 94° C. Cette température de dénaturation est supérieure à celle de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrices au cours des cycles d'amplification.

Dans un deuxième temps une **Hybridation des amorces :** Le milieu réactionnel contient deux amorces (Reverse et Forward), chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes des séquences à amplifier. Le milieu est amené, à une température inférieure au T_m des amorces. La T_m est en fonction de la séquence, est, en générale ; de l'ordre de 45 à 60°C.

Et en fin dans un troisième temps l'**Elongation des amorces :** Une ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribo-nucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5' 3' à 72° C, température optimale. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

- Dans notre travail nous avons réalisés deux types de PCR pour la recherche des leishmanies dans les organes lymphoïdes de la souris BALB/c :

- **une PCR ITS**(internal transcribed spacer 1) qui cible le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale du gene leishmania, nous avons réalisés 5 test de PCR ITS1.

- **une PCR JW** qui cible l'ADN kinétoplastique de leishmania. Nous avons réalisés 5 test de PCR JW.

2.4.1. Protocole expérimentale

Préparation du Mix : Cette étape doit se réaliser sous des conditions aseptiques (DNA free) dans une pièce isolée et sous une hotte à U.V. pour éviter toute contamination du mix. Les produits du mix des deux protocoles ITS et JW, et leurs volumes nécessaires pour un seul échantillon sont présentés en annexe 5.

2.4.2. Programmation du Thermocycleur

Une fois la préparation et la distribution du mix terminé, les micro tubes seront placés dans le thermocycleur ; ce dernier est programmé selon le gène. La réaction de polymérisation en chaîne est cyclique, elle se déroule en 3 étapes qui sont : la dénaturation initiale, l'hybridation et l'élongation finale. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. Les programmes du thermocycleur des deux protocoles ITS et JW, sont présentés en annexe 5.

2.4.3. La révélation des produits PCR

Les produits PCR sont révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0.8% durant 40min à 70volts.

Est pour assurer la qualité d'ADN extrait, nous avons effectués une mesure de dosage optiques sur un spectrophotomètre.

2.5. PCR en temps réel

La PCR quantitative (ou QPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN.

Le SYBR Green I est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Il est de ce fait utilisé en biologie moléculaire comme agent fluorescent, notamment lors de la réalisation de PCR quantitatives.

Des essais de PCR en temps réel ont été réalisés sur des ADN provenant de culots parasite de concentration de 86 millions/ml dilués au millième (1/1000) et au dix millièmes (1/10000), passés sur smart cyler Cepheid selon le protocole de (NICOLAS 2002) modifié selon les recommandations du fournisseurs roche adaptées pour le syber green I.

Après avoir préparé le mélange réactionnel en additionnant des sondes fluorescentes et des primers (annexe 6), ainsi que l'ajout des ADN de nos échantillons et du témoin positif. Le mix est mis dans un appareil de PCR quantitative en temps réel. Il s'agit d'un appareil -de type Smart Cyler – rapide, couplé à un spectrofluorimètre. Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

La méthode de préparation du mix est similaire à celle la PCR standard, à l'exception de l'ajout de la sonde marquée. Les volumes recommandés pour un seul échantillon sont présentés dans l'annexe 6.

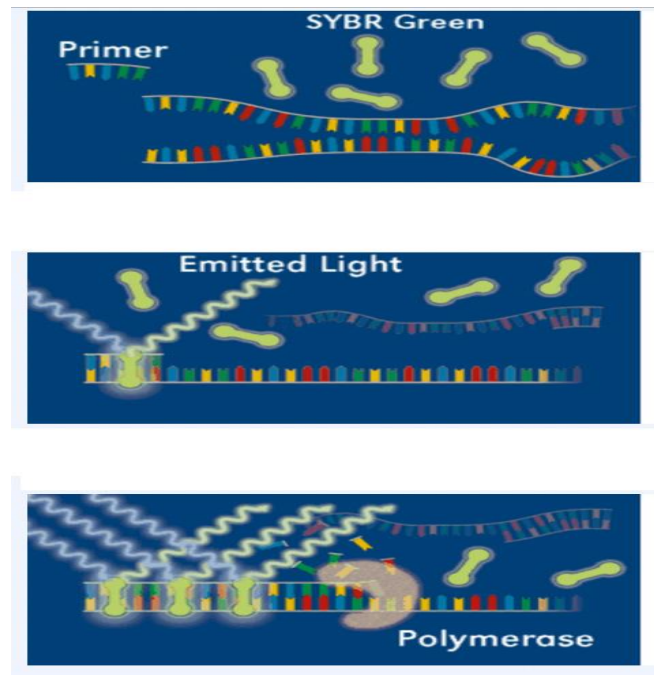


Figure 11 : Mode d'action du Syber Green

3. Analyse des résultats

Afin d'analyser les différentes techniques d'extraction, ainsi que la qualité et la quantité d'ADN obtenu nous avons scorié nos résultats avec un score allant de 1 à 4, 4 étant le meilleur résultat obtenu.

Dans un premier temps, nous avons analysé la qualité de l'extraction. Les paramètres pris en considération pour l'évaluer étaient l'aspect de la Méduse d'ADN obtenue, la présence d'un culot d'ADN, et enfin la turbidité des échantillons. Ces résultats ont été analysés en fonction des techniques d'extraction utilisées et des organes ciblés.

Dans un deuxième temps, la qualité de l'ADN total a été analysée sur gel d'agarose. Les paramètres pris en considération étaient la qualité des bandes d'ADN total, la présence de smear, et la contamination par de l'ARN. De plus, la qualité et la quantité d'ADN obtenu par le Nanodrop ont été analysées. Les variables étudiées étaient la concentration d'ADN obtenu et les rapports 260/280 et 260/230 permettant de déterminer une contamination des échantillons.

Dans un troisième temps, le choix des amorces PCR ITS et JW, a été scorié selon les bandes d'ADN obtenu et les smears, et ce en fonction des techniques d'extractions et des organes.

Par ailleurs, les étapes des différentes méthodes d'extraction ont aussi été évaluées en fonction du temps nécessaire pour chaque technique, de son cout et de la nuisance générée par la technique.

La somme des scores par technique et par organes et par amorces PCR utilisées, ont été analysées par une ANOVA à un facteur et par le test de Student. Toutes les analyses ont été faites sur GraphPad Prism.

RESULTATS

Le modèle souris BALB/c représente un modèle animal de choix de la leishmaniose cutanée, qui est largement utilisé dans l'étude de la réponse immunitaire et dans l'évaluation de nouveaux traitements et vaccins. Ce type d'études nécessite la détection et la quantification de la charge parasitaire de *Leishmania* dans différents tissus de la souris. L'utilisation de la PCR quantitative est l'alternative de choix pour une quantification, mais nécessite une qualité et une quantité d'ADN optimale. Notre étude a pour but de déterminer les conditions de choix pour l'extraction de l'ADN des organes lymphoïdes de la souris BALB/c et les sondes les plus adéquates pour les qPCR.

1. Charges parasitaires

La méthode standard pour suivre l'infection dans le modèle souris BALB/c de la leishmaniose cutanée à *L. major* in vivo est basée sur l'estimation des charges parasitaires par numération des parasites sur des frottis par microscopie optique.

Les résultats de nos grattages d'oreilles à la 4^{ème} et la 12^{ème} semaine ont montré une faible charge parasitaire à la 4^{ème} semaine (W4), avec une moyenne de 15,74 parasites amastigotes / champ, tandis que la moyenne des charges parasitaire était de 25,18 parasites amastigotes / champs à la 12^{ème} semaine (W12). Ces résultats montrent que la parasitémie est plus importante à la 12^{ème} semaine (Figure 12)

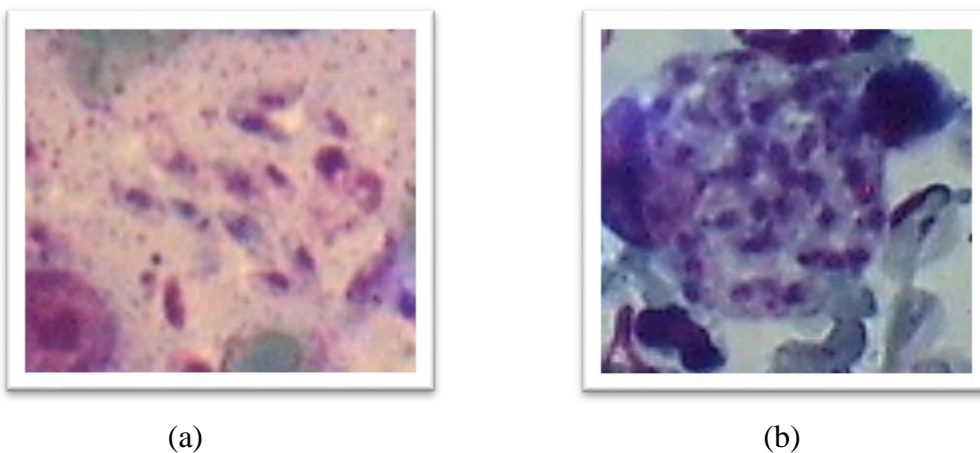


Figure 12 : Photos des frottis des oreilles infectées par *L. major* LIPA 100/09 à la 4^{ème} semaine (a) et à la 12^{ème} semaine (b).

2.2. Résultats qualitatifs en fonction des techniques d'extraction

Au cours de notre étude nous avons comparé 3 techniques d'extraction d'ADN qui sont l'extraction par relargage salin, l'extraction par phénol chloroforme et enfin l'extraction par kit Invitrogen.

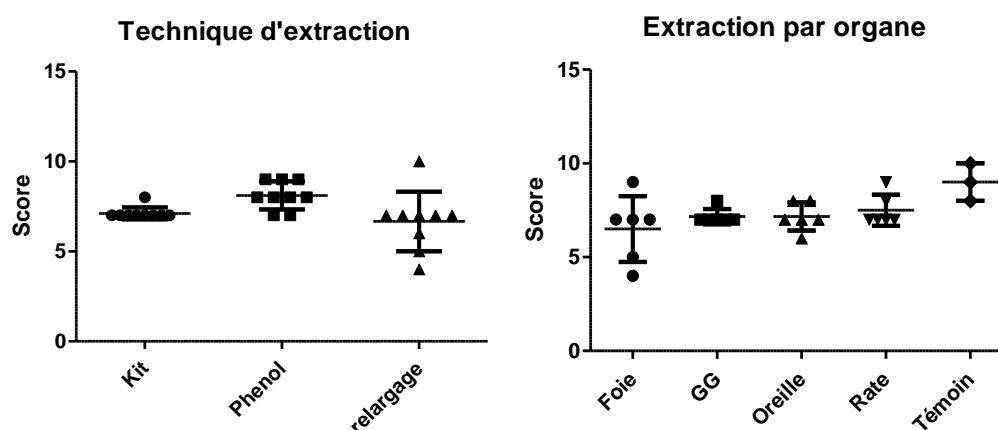


Figure 14 : Résultats de la moyenne des scores de la qualité des extractions par technique d'extraction et par organe.

La figure 14 montre que la moyenne des scores obtenus par l'extraction au phénol est la plus importante, alors que l'extraction par kit est beaucoup plus homogène avec un score moyen légèrement inférieur. Les meilleurs scores de relargage sont ceux des témoins (score = 10), suivi de ceux de la rate et des ganglions.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des scores des techniques d'extraction, a révélé une différence significative entre les trois techniques d'extraction avec une valeur de $p=0.0262$ ($p<0.05$). Une comparaison des techniques deux à deux par le test de Tukey a montré qu'il y avait une différence significative entre l'extraction par phénol et le relargage salin ($p<0.05$). En fonction des organes ciblés, l'ANOVA a aussi fait ressortir une différence significative avec une valeur de $p=0.046$ ($p<0.05$). Cette différence est significative entre le Foie et le Témoin.

Ces résultats montrent bien que l'extraction par phénol est plus efficace que le relargage salin en terme de qualité d'extraction. Le foie semble l'organe le plus difficile à extraire en comparaison avec le témoin.

3. Qualité de l'ADN total

3.1. Sur Gel d'Agarose

Par ailleurs, l'ADN total obtenu par les différentes techniques d'extraction a été aussi analysé qualitativement par une électrophorèse sur gel d'Agarose. Les paramètres scoré pour l'évaluation des résultats des électrophorèses étaient la qualité de la bande d'ADN obtenue, la présence de smear et la contamination par ARN.

La figure 15 montre que la moyenne des scores d'ADN total obtenus par l'extraction par kit est la plus importante ($m=8.51$), alors que les extractions par relargage et phénol ont donné des moyennes de score proche autour de 5. Les meilleurs scores d'ADN total par organe sont ceux des témoins ($m=8.32$), et les plus faibles sont ceux des ganglions correspondant à des bandes très faible d'ADN total.

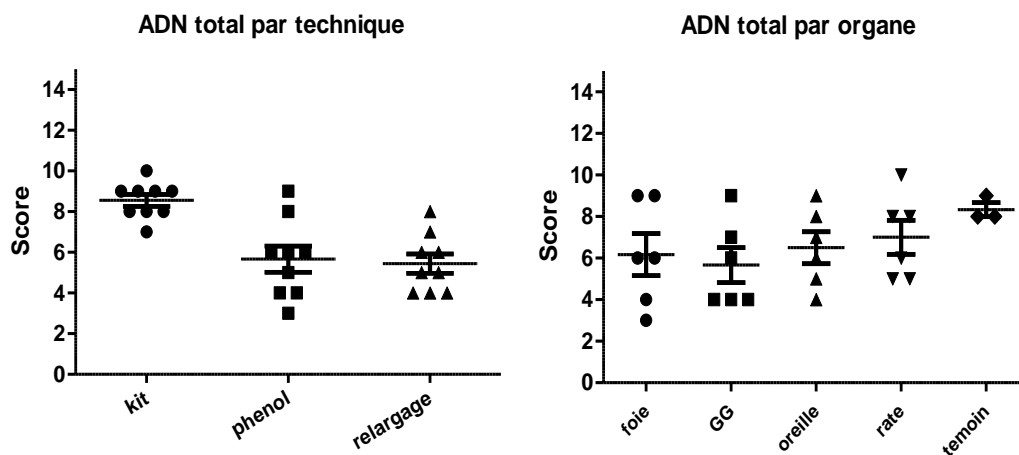


Figure 15 : Résultats de la moyenne des scores de l'ADN total par technique d'extraction et par organe.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des scores de l'ADN total, a révélé une différence fortement significative entre les trois techniques d'extraction avec une valeur de $p=0.0002$ ($p<0.05$). Une comparaison des techniques deux à deux par le test de Tukey a montré qu'il y avait une différence très significative entre la qualité d'ADN total obtenu par kit versus phénol et fortement significative pour kit versus relargage ($p<0.05$). En fonction des organes ciblés, l'ANOVA n'a pas montré de différence significative entre la qualité de l'ADN obtenu des différents organes étudiés.

Ces résultats montrent bien que l'extraction par kit est plus efficace que le relargage salin et l'extraction par phénol, en terme de qualité d'ADN. Les ganglions semblent les organes qui donnent la qualité d'ADN la plus basse en comparaison avec les autres tissus.

Les ADN obtenus avec la méthode au kit et phénol sont en très grande majorité des fragments de grande taille très faiblement dégradés par rapport à la technique du relargage salin qui donnent de l'ADN de mauvaise qualité (figure 16).

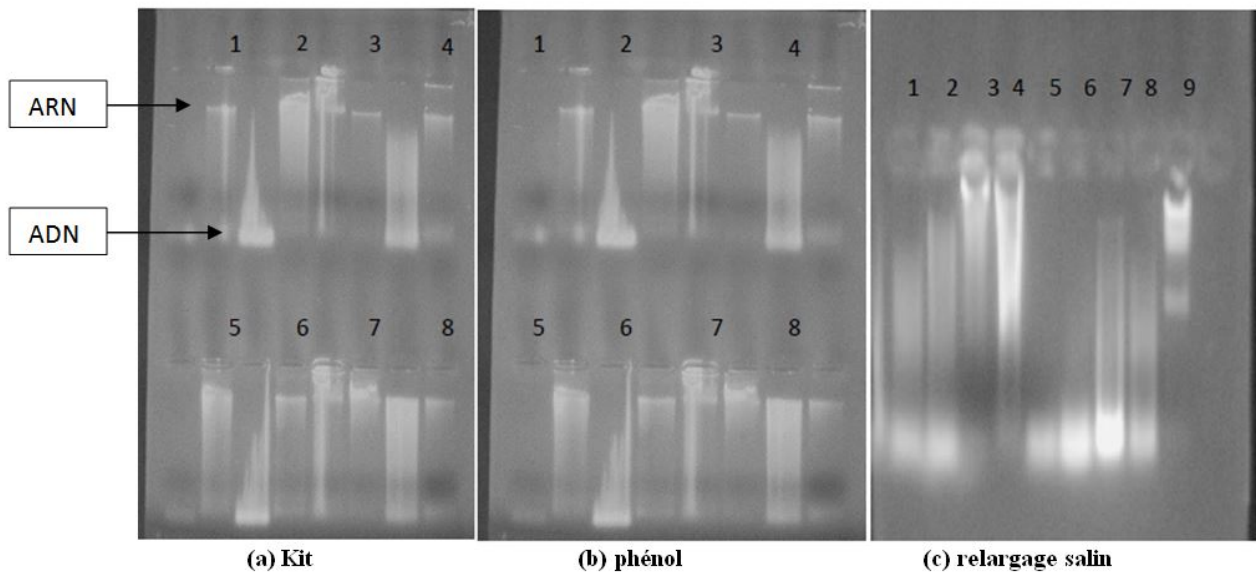


Figure 16 : Résultats des électrophorèses sur Gel d'agarose de l'ADN en fonction de la méthodes d'extraction.

(a). La présence de l'ARN est faiblement marquée dans les échantillons 2, 7 et 3 et moyennement marquée dans les échantillons 1, 4, 5, 6 et 8. (b) L'ARN est absent dans l'échantillon 4, 5, 7, 2 et 6, faiblement visible dans l'échantillon 1 et 8 et moyennement visible dans l'échantillons 3. (c) L'ARN est présent dans les échantillons 3 et 4 uniquement avec une intensité faible.

3.2. Sur Nanodrop

Comme il est difficile de s'assurer de la pureté de l'ADN, il est primordial d'évaluer et de visualiser l'intégrité et le rendement de l'ADN en utilisant la mesure de DO sur un spectrophotomètre (ex : Nanodrop^{TM*}).

La pureté des échantillons a été déterminée par le rapport des mesures de l'absorbance des échantillons à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm puis 260 et 230 nm ainsi, Le ratio

260/280 est utilisée pour évaluer la pureté de l'ADN des contaminants protéiques, un rapport supérieur à 1.8 signifie que l'ADN est «Pur», par contre, lorsque ce rapport est inférieur à 1.8, il indique une contamination par des protéines, de phénol ou d'autres contaminants qui absorbent fortement à 280 nm ou près de cette onde. Le ratio 260/230 est utilisé comme une mesure de la pureté secondaire d'acide nucléique. Les valeurs attendues pour l'acide nucléique pur sont supérieures à celle obtenues pour le ratio 260/280 nm. Elles sont généralement de l'ordre de 2,0-2,2. Si le rapport est sensiblement plus faible qu'attendu, cela peut indiquer une contamination par des composés organiques qui absorbent à 230 nm (l'EDTA et d'autre tampon, les composés polyphénoliques...etc.).

La figure 17 montre que la moyenne des scores des DO d'ADN total obtenus par l'extraction par phénol est la plus importante (m=7.05), suivi de l'extraction par kit (m=6.1), et en dernier, on retrouve le relargage salin avec une moyenne de scores de 5.5. Alors que par organes, le Foie et la rate ont les meilleurs scores en terme de qualité d'ADN.

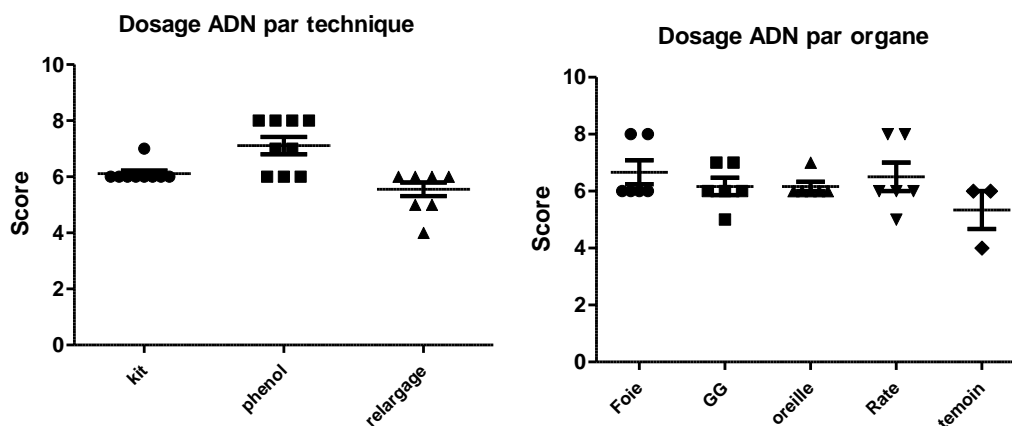


Figure 17 : Résultats de la moyenne des scores du DO de l'ADN total par technique d'extraction et par organe.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des scores des DO mesurées de l'ADN total, a révélé une différence fortement significative entre les trois techniques d'extraction avec une valeur de $p=0.0004$ ($p<0.05$). Une comparaison des techniques deux à deux par le test de Tukey a montré qu'il y avait une différence très significative entre la qualité d'ADN total obtenu par kit versus phénol et fortement significative pour phénol versus relargage ($p<0.05$). En fonction

des organes ciblés, l'ANOVA n'a pas montré de différence significative entre la qualité de l'ADN obtenu des différents organes étudiés.

L'analyse spectrophotométrique pour A260/280 a donné une moyenne > 1.8 pour tous les échantillons extraits des différents organes par kit (**100%**), ceci indique que l'ADN extrait est exempt de contamination par les protéines. Pour A260/230, tous les échantillons des organes différents donnent une valeur > 2.0 (**100%**), indiquant une pureté d'ADN des composants organiques. L'extraction par le phénol a montré que les échantillons ne contiennent que de faibles niveaux de contaminants protéiques et organiques. Les échantillons contaminés sont ceux extraits de l'oreille. L'extraction par le relargage-salin : montre que l'ADN isolé par cette méthode est contaminé par des protéines et par des composants organiques.

Selon les moyennes estimées pour le degré de pureté de l'ADN, on trouve que quel que soit l'organe source de l'échantillon, la meilleure qualité de l'ADN est obtenue par le kit Invitrogen et le Phénol Chloroforme. L'ADN obtenu par le relargage salin est de mauvaise qualité puisqu'il donne des valeurs significativement plus faibles qu'attendues.

3.2.1. Quantité d'ADN

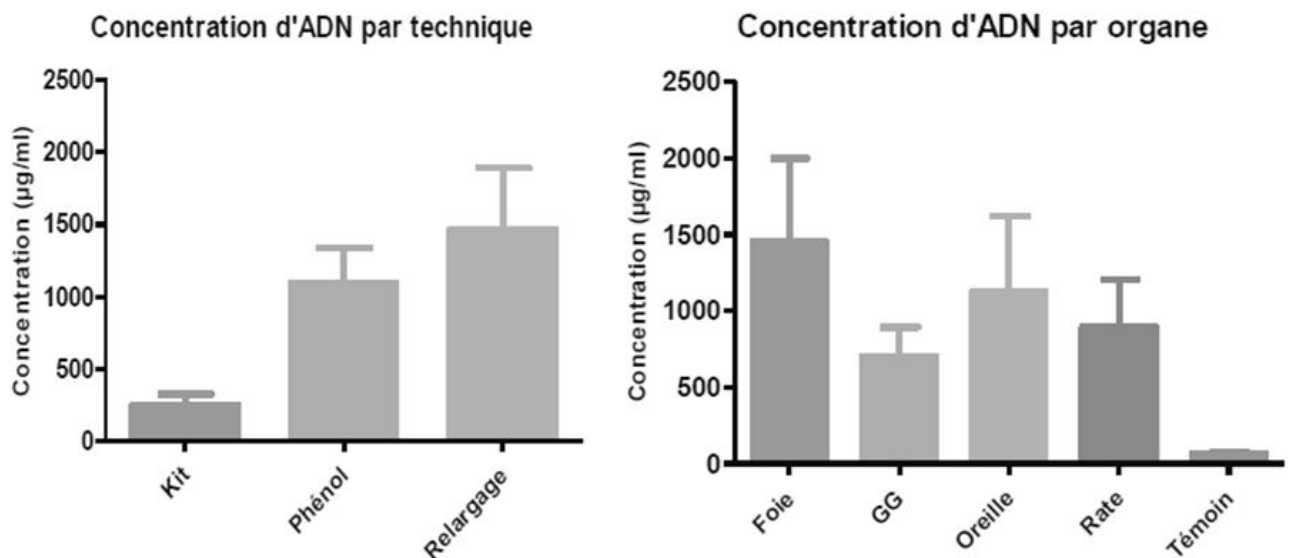


Figure 18 : Résultats de la moyenne des concentrations en ADN total par technique d'extraction et par organe.

La figure 18 montre que la méthode de relargage fournissait des concentrations significativement élevées (66.6% des concentrations élevées observées toute technique confondue) sachant que c'est la méthode qui donne de meilleurs résultats pour les organes : ganglion et oreille. Le phénol fournissait des concentrations intermédiaires et représente la technique de choix pour les organes : rate et foie. Alors que le kit donne les concentrations les plus faibles (60% des concentrations faibles observées toute technique confondue) en comparaison avec les deux autres techniques.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des concentrations d'ADN total, a montré une différence significative entre les trois techniques d'extraction avec une valeur de $p=0.1258$ ($p<0.05$). Une comparaison des techniques deux à deux par le test de Tukey a révélé qu'il y avait une différence significative entre la concentration d'ADN total obtenu par kit versus relargage ($p<0.05$). En fonction des organes ciblés, l'ANOVA n'a pas montré de différence significative entre la concentration d'ADN obtenu des différents tissus étudiés.

4. PCR ITS et PCR JW

Le test PCR est utilisé dans notre travail pour la détection de l'ADN de *Leishmania* dans les organes de la souris BALB/c infestées par *Leishmania major* LIPA 100. Avec la PCR, il est possible de traiter spécifiquement une séquence d'ADN particulière, et à amplifier cette séquence de nombres extrêmement élevés de copie. Pour cela nous avons effectués deux types de PCR sur tous les organes en vue d'amplifier l'ADN kinétoplastique de *Leishmania* par une PCR JW (qui cible l'ADN kinétoplastique mini cercle), et l'ADN génomique de *Leishmania* par une PCR ITS (qui cible le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale internal transcribed spacer1).

Chaque test PCR comprend un témoin négatif d'amplification constitué du mélange réactionnel et d'eau stérile remplaçant l'extrait d'ADN afin de vérifier la contamination possible de nos réactifs. Aucune bande ne sera visible lors de la visualisation des résultats, et un témoin positif d'extraction constitué d'ADN extraits à partir de culots parasitaires de *leishmania* déjà identifié par PCR afin de vérifier si l'étape d'amplification a bien fonctionné. Une bande correspond à la dimension du segment d'ADN de notre culot sera présente lors de la visualisation des résultats.

Selon la séquence ciblée, une bande d'environ 120pb ou de 350pb apparaîtra en fonction qu'il s'agisse respectivement de la région JW ou ITS.

Les résultats des PCR ont été scoré en fonction de la présence de bande d'ADN et la présence de smear. Les photos des résultats PCR figurent en annexe.

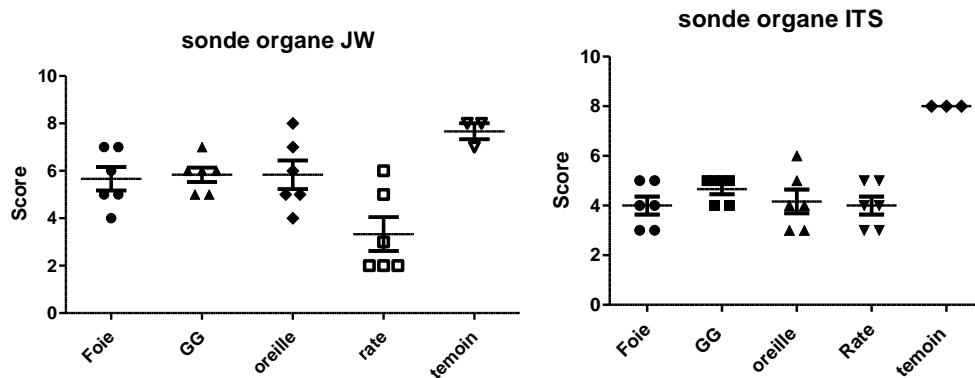


Figure 19 : Résultats de la moyenne des scores des PCR JW et ITS en fonction des organes.

La figure 19 montre que la moyenne des scores par organes obtenus par l'amorce JW en PCR sont plus importants que ceux des PCR ITS. La PCR ITS donne des moyennes de scores voisines pour tous les organes, alors que la rate se démarque par une moyenne de score faible pour la PCR JW.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des PCR JW et ITS, n'a pas montré de différence significative entre les amorces selon les tissus ciblés. Alors qu'entre les organes ayant subi une PCR JW, l'ANOVA montre une différence fortement significative ($p < 0.0001$). Le test de Tukey montre que PCR JW de la rate donne une différence significative avec l'ensemble des tissus étudiés. L'analyse ANOVA de la PCR ITS fait ressortir une différence significative qui se démarque par le test de Tukey les témoins du reste des tissus, ce qui correspond aux meilleurs résultats PCR obtenus.

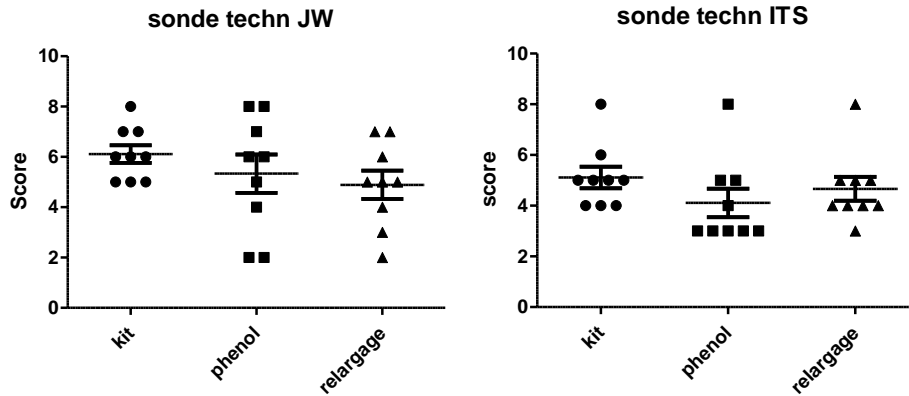


Figure 20 : Résultats de la moyenne des scores des PCR JW et ITS en fonction des techniques.

La figure 20 montre que la moyenne des scores par technique d'extraction obtenus par l'amorce JW en PCR sont plus importants que ceux des PCR ITS. La PCR ITS donne des moyennes de scores voisines pour tous le relargage et le kit, alors que le relargage se démarque par la moyenne de score la plus faible pour la PCR JW.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des PCR JW et ITS, n'a pas montré de différence significative entre les amorces selon les techniques d'extractions utilisées.

5. Les étapes de l'extraction

D'autres paramètres peuvent constituer une base de comparaison des techniques d'extraction : le temps, le coût et la nuisance. En terme de temps, la méthode la plus rapide est la méthode de kit (2-3 heures de temps), l'extraction de l'ADN par les deux autres méthodes relargage et phénol nécessite beaucoup plus de temps (24 h pour chaque méthode). En terme de coût en matériel et réactifs les deux méthodes (relargage et phénol) sont les moins coûteuses par rapport au kit qui est de 2 à 5 fois plus cher. En terme de nuisance la méthode phénol chloroforme semble la plus nuisible à cause du phénol qui est fortement corrosif pour les organismes vivants. Une solution aqueuse à 1 % suffit à provoquer des irritations sévères. Les brûlures au phénol sont très douloureuses et longues à guérir. De plus, elles peuvent être suivies de complications graves pouvant mener à la mort par la toxicité de ce composé et sa capacité à pénétrer dans l'organisme en traversant la peau. Les deux autres techniques sont plus sûres.

6. PCR en temps réel

A partir de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus pour une meilleure qualité et quantité d'ADN, nous avons fait quelques essais de PCR en temps réel sur des témoins positifs de concentration connue, afin d'établir une courbe étalon de quantification.

Les résultats que nous avons obtenus s'expriment sous forme de courbe représentant des CT (seuil de température cycles) correspondants des positifs

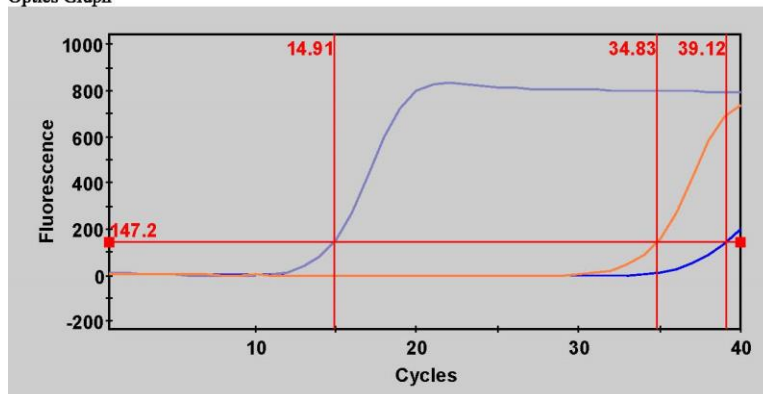
Notre témoin positif 10⁻⁴ a donné un CT de 14.91 (figure 21). L'autre témoin positif que nous avons utilisé, n'est sorti qu'en fin de réaction ce qui serait probablement due soit à une erreur de pipetage ou à une trop forte concentration en ADN de *Leishmania*.

Notre souci majeur dans cet essai de mise au point réside dans le fait que le témoin négatif se retrouve anormalement positif. Ce qui nous laisse supposer qu'il s'agit soit d'une contamination ou bien de la présence de dimères dus aux amorces utilisés sachant que le fluorophore utilisé est Sybergreen I(roche) mais que la lecture s'est faite sur smart cycler cepheid.

D'autres tests sont nécessaires pour la mise au point, mais par manque de temps de réactifs disponibles pour ce travail ces résultats préliminaires sont à prendre avec beaucoup de précautions.

Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	Status	FAM Sid/Res	FAM Ct	Melt Peak1
A3	syber rosh Leishmania	R-3	UNKN		OK	POS	39.12	81.37
A4	syber rosh Leishmania	R-4	UNKN		OK	POS	14.91	80.18
A5	syber rosh Leishmania	TEM NEG	UNKN		OK	POS	34.83	82.25

Optics Graph



Site Legend

Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A3	R-3	39.12	syber rosh Leishmania
A4	R-4	14.91	syber rosh Leishmania
A5	TEM NEG	34.83	syber rosh Leishmania

Data Type	Line Type
Primary Curve	—

Channel	Symbol
FAM	None

Figure 21 : Résultats préliminaire de la PCR en temps réel

Discussion

De nombreux protocoles d'isolement d'ADN génomique ont été optimisés (**BUDOWLE et al., 2009 ; PACHOT et al., 2007 ; ELGORT et al., 2004 ; NASIRI et al., 2005**); qui ont été vérifiées pour être reproductibles et a donné de l'ADN de qualité suffisante pour l'analyse génétique (**PACHOT et al., 2007**). Cependant, dans la plupart de ces méthodes, on utilise des enzymes (telles que la protéinase K) ou des produits toxiques (solvants organiques). Il y a seulement quelques méthodes qui sont non enzymatiques et n'emploient pas de « dangereux » solvants organiques (**LAHIRI et al., 1991**), par conséquent, les protocoles standards pour l'extraction d'ADN prennent beaucoup de temps. Étant donné que ces enzymes sont chers, et la plupart des matériaux qui sont utilisés couramment sont toxiques, il est raisonnable de recourir à une procédure d'extraction d'ADN efficace qui ne subit pas ces étapes.

Généralement, la réussite dans la purification des acides nucléiques requiert 4 étapes importantes qui sont : un broyage efficace des cellules ou tissus, une dénaturation des complexes nucléoprotéiques, une inactivation des nucléases (tel que par les RNase ou DNase), et s'écarter de toute contamination.

L'analyse spectrophotométrique pour A260/280 a donné une moyenne d'environ 1.8 indique que l'ADN extrait est exempt de contamination par des protéines. Selon les moyennes estimées pour le degré de pureté de l'ADN, on trouve que la meilleure qualité de l'ADN est obtenue par les méthodes du kit Invitrogen et du Phénol Chloroforme. Le kit Invitrogen est un kit magnétique se basant sur l'activité des perles magnétiques qui se collent sélectivement à l'ADN avec une haute précision. Cette méthode semble très efficace.

L'ADN obtenu est libre de toute contamination par les protéines ou par les ARN (en moyenne). Bien qu'elle ne soit pas très importante, la quantité d'ADN isolée par ce kit est pure sans avoir d'importantes variabilités entre les différents échantillons. La méthode du Phénol chloroforme est une méthode qui se base sur des purifications répétées de l'ADN (par Phénol pur, puis Phénol Chloroforme puis Chloroforme-alcool isoamylique). Ainsi, les Protéines sont efficacement éliminées.

Cependant, la séparation de la phase contenant l'ADN au cours de ces purifications, est une opération délicate. Si on interfère la phase intermédiaire, on prélève des protéines, si on s'éloigne trop de cette phase, on risque d'éliminer des quantités d'ADN.

Enfin, l'ADN isolé est d'une bonne qualité pour tous les échantillons. L'ADN obtenu par méthode saline est de concentration élevée mais de mauvaise qualité, il est fortement contaminé par les protéines (moyenne inférieure à 1.6), ce qui indique un taux d'erreur élevé. Les méthodes présentent donc des différences significatives pour la concentration mais pas pour la pureté de l'ADN.

En fonction des organes, le principal problème rencontré reste la contamination des échantillons par le sang, et une mauvaise qualité de broyage.

Concernant les coûts, celle des méthodes classiques telle que phénol chloroforme et relargage sont rapprochés, leurs coûts restent raisonnables. Le kit Invitrogen offre la possibilité exclusive d'extraire l'ADN à partir d'un volume initial très limité, mais avec un prix très élevé pour les résultats comparables que donnent les deux méthodes.

CONCLUSION

La souris BALB/c représente un modèle expérimental de choix pour la leishmaniose cutanée. Elle est largement utilisée dans l'étude de la réponse immunitaire et le développement de nouveaux médicaments et vaccins. La majorité de ces études requiert la détection et la quantification des charges parasitaires dans les organes lymphoïdes de la souris. Les techniques de cultures classiques et de frottis ne permettent pas une évaluation précise de cette charge parasitaire. Des alternatives plus rapides telles que la PCR en temps réel existent, mais nécessitent une qualité et une quantité d'ADN appropriées.

Dans notre étude, nous avons testé trois méthodes d'extractions appartenant aux trois principales classes de techniques d'extraction d'acides nucléiques, en fonction du principe auquel elles font appel. Notre choix s'est porté sur une méthode utilisant un solvant organique : le phénol chloroforme, un solvant non organique : le relargage salin, et une méthode basée sur l'utilisation de micro colonnes : le kit Invitrogen.

L'extraction par le kit Invitrogen est celle qui a donné les meilleurs résultats en termes de qualité et de quantité, mais reste chère. Le relargage salin représente une alternative pas chère et plus sûre, qui fournit une bonne quantité d'ADN, mais qui n'arrive pas à éliminer les contaminants protéiques. L'extraction par Phénol Chloroforme est le compromis entre ces deux techniques, mais qui possède un inconvénient majeur qui est sa forte toxicité.

En fonction des organes, le foie est le plus difficile à extraire en raison de la présence de sang. Alors qu'on arrive à obtenir une bonne qualité d'ADN en fonction de la technique d'extraction utilisée pour les autres organes lymphoïdes.

Les amorces PCR testées montrent que l'amorce JW est plus appropriée pour des objectifs de quantification. Le résultat de l'identification directe du parasite par énumération microscopique au niveau de site d'inoculation et par PCR JW 11-12 avec l'amorce spécifique à l'ADN kinétoplastique de *Leishmania*, étaient positifs pour tous les échantillons provenant des organes lymphoïdes de la souris BALB/c, qui signifie la croissance incontrôlée du parasite au niveau du site primaire de l'infection suivi par diffusion progressive à travers les ganglions lymphatiques dans le système réticulo-endothélial (rate et foie.)

On peut conclure que chacune des méthodes d'extraction utilisées dans notre étude, fait gagner l'opérateur sur certains détails. En effet, l'utilisation des kits permet de gagner en termes de pureté et de temps, alors que le point fort des méthodes classiques est sans doute leur coût

largement inférieur à celui des kits. Quelle que soit la méthode d'extraction et de purification d'ADN utilisée, nous avons obtenu de l'ADN en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des techniques de biologie moléculaire tels que la PCR et la PCR en temps réel.

La PCR en temps réel est une technique de diagnostic et d'identification très performante dans notre Etude, mais par manque de temps pour ce travail, les résultats préliminaires que nous avons obtenus sont à prendre avec beaucoup de précautions.

Toutefois, il est important de remarquer qu'un nombre plus important d'échantillons permettra de conclure sur la fiabilité des méthodes d'extraction de l'ADN utilisées. Pour les résultats de l'ADN obtenu, la variable décisive, peu importe la méthode, reste l'opérateur. Toutes ces méthodes sont fiables. Toutefois, c'est de la maîtrise de la technicité que dépendent les résultats. Disponibilité du temps, nombre d'opérations d'extraction effectuées, matériel initial disponible ainsi que d'autres critères déterminent le choix de la méthode d'extraction. C'est la balance entre les besoins et les moyens qui déterminent le choix pertinent.