



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

La mise au point de la HRM dans l'identification des espèces de
Leishmania en Algérie

Présenté par :

Date de soutenance : 14-09-2022

* DRIOUECH MERIEM

* LOTFI RADIA

Devant le jury :

Mme BENHOUNA I.

MAA/USDB1

Présidente

Mme BENMANSOUR S.

MAA/USDB1

Examinatrice

Mme EDDAIKRA N.

MR/IPA

Promotrice

Mme EDDAIKRA A.

MAA/USDB1

Co-promotrice

Promotion : 2021-2022

Remerciements

On remercie le bon **DIEU**, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

On tient à exprimer notre profonde gratitude à l'égard de notre promotrice **Mme EDDAIKRA N**, maître de recherche au service d'éco-épidémiologie parasitaire à l'IPA, qui nous a encouragés et soutenus tout au long de la réalisation de ce mémoire.

À notre co-promotrice, **Mme EDDAIKRA A**, chargée de cours à l'université SAAD DAHLEB de Blida.

Nos remerciements s'adressent à **Mr BOUIBA LEZHARI** pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

On s'exprime aussi nos vifs remerciements aux membres du jury, **Mm BENHOUNA I** et **Mm BENMANSOUR**, pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs remarques.

Enfin, nos remerciements vont également à tous nos professeurs de SAAD DAHLEB, et à toute l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur.

Dédicaces 1

Avant tous, on remercie le bon DIEU, le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Avec l'expression de ma connaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- *A la femme qui a souffert Sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Fatiha**.*
- *A l'homme, mon précieux offre du DIEU, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Zouaoui**.*
- *A mes chères sœurs, mes frères et mon fiancé, qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*
- *A ma sœur, copine et binôme **Meriem** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

Radia

Dédicaces 2

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail accompagné d'un profond amour.

- *À celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la femme la plus belle et la plus forte dans le monde, à ma mère.*
- *À l'âme de mon cher père et mon cousin **Mohammed Abdelkhalak**, que DIEU les bénisse dans son vaste paradis.*
- *À mes chères sœurs et frères, pour leur support dans ma vie.*
- *À ma chère grand-mère, et mes petits anges, **Loudjain, Séradj et Férass.***
- *À la meilleure amie et sœur, celle qui j'ai partager la joie et la tristesse avec, ma chère binôme **Radia.***
- *À tous mes amis.*

Je vous aime ...

Meriem

Résumé

Les leishmanioses sont des anthroponoses tropicales négligées. Elles se manifestent sous trois formes cliniques variées qui peuvent entraîner des issues mortelles, contractées dans 92 pays y compris l'Algérie ou sévissent les formes cutanées et viscérales. L'endémicité de cette maladie a entraîné une forte demande de diagnostic aux laboratoires de cette affection. Pour cela, l'objectif de ce travail est de détecter et identifier les espèces de *Leishmania* circulantes en Algérie, par une technique non classique qui est la PCR-HRM, et évaluer sa sensibilité et spécificité. Pour arriver à ça, deux types d'extractions, par Kit Qiagen et par le Phénol chloroforme ont été faites, à partir des cultures parasitaires de cinq souches de *Leishmania* décongelées de la banque des souches *Leishmania* de l'IPA. Le choix dépend de certains nombres de facteurs y compris le type d'échantillon, la quantité de départ, la simplicité et le cout. Nos échantillons d'ADN extraits ont été analysés qualitativement par une électrophorèse sur gel d'agarose, et quantitativement par un dosage optique, et testés par une PCR-HRM *in vitro* à partir de deux amorces, la 7SL-RNA et l'ITS1, puis *in silico* par cinq amorces dont : la 7SL-RNA, l'ITS1, Hsp70, Hsp20 et la Gp63. Les résultats de la PCR-HRM confirme sa sensibilité par rapport aux basses concentrations et sa spécificité aux espèces, qui la rendre une technique fiable pour l'identification des espèces de *Leishmania*. Les résultats de la PCR-HRM des amorces sélectionnées *in silico* ont montré une sensibilité très élevée par rapport aux températures de fusion précises, et ils ont confirmé la conservation du génome entre *Leishmania* spp.

Mots clé : *Leishmania*, PCR-HRM, 7SL-RNA, ITS1, Hsp70, Gp63.

Summary

Leishmaniasis is neglected tropical anthroponosis. They manifest themselves in three varied clinical forms that can lead to fatal outcomes, contracted in 92 countries including Algeria or plague the cutaneous and visceral forms. The endemicity of this disease has led to a strong demand for diagnosis by laboratories of this condition. For this, the objective of this work is to detect and identify the species of *Leishmania* circulating in Algeria, by a non-classical technique which is the PCR-HRM, and evaluate its sensitivity and specificity. To achieve this, two types of extractions, by Kit Qiagen and phenol chloroform were made, from the parasitic cultures of five thawed *Leishmania* strains from the IPA's *Leishmania* strain bank. The choice depends on certain numbers of factors including sample type, starting quantity, simplicity and cost. Our extracted DNA samples were analyzed qualitatively by electrophoresis on agarose gel, and quantitatively by optical assay, and tested by an *in vitro* PCR-HRM from two primers, 7SL-RNA and ITS1. Then *in silico* by five primers including: 7SL-RNA, ITS1, Hsp70, Hsp20 and Gp63. The results of the PCR-HRM confirm its sensitivity to low concentrations and its specificity to species, which make it a reliable technique for the identification of *Leishmania* species. The PCR-HRM results of the primers selected *in silico* showed a very high sensitivity to precise melting temperatures, and they confirmed the preservation of the genome between *Leishmania* spp.

Key words : *Leishmania*, PCR-HRM, 7SL-RNA, ITS1, Hsp70, Gp63.

Liste des figures

Figure 1 : Forme promastigote et amastigote de <i>Leishmania</i>	04
Figure 2 : Phlébotome femelle prend un repas du sang	05
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	06
Figure 4 : Leishmaniose cutanée à <i>L.major</i>	07
Figure 5 : Hépto-splénomégalie chez des enfants atteints de Kala-azar	07
Figure 6 : Défiguration chez des malades atteints de la leishmaniose cutanéomuqueuse	08
Figure 7 : Carte d'endémicité de la LC dans le monde	09
Figure 8 : carte d'endémicité de la LV dans le monde	09
Figure 9 : Distribution géographique des cas de leishmaniose cutanée en Algérie	10
Figure 10 : cartes génétique des gènes d'ADNr avec longueurs des fragments correspondants chez les espèces de <i>Leishmania</i>	13
Figure 11 : Marqueurs moléculaires et outils proposés pour différents objectifs de diagnostic de <i>Leishmania</i>	13
Figure12 : schéma récapitulatif des méthodes.....	16
Figure 13 : Profil des informations sur la souche MHOM/SU/K27 de <i>Leishmaniatropica</i> sur NCBI.....	21
Figure 14 : Profil des paramètres pour cibler le gène 7SL-RNA de <i>Leishmaniatropica</i> sur Primer-BLAST	22
Figure15 : Résultats d'observation du LIPA 32/06 sous le microscope optique au G×4, en J0 et après 6 jours du premier repiquage sur NNN.....	23
Figure16 : Résultats d'observation de <i>Leishmaniamajor</i> (LIPA 32/06 et LIPA 443/13) sous microscope optique au G×4 après 09 jours de deuxième repiquage (sur RPMI).....	24
Figure17 : contamination de la souche LIPA32/06 de <i>Leishmaniamajor</i> cultivée au milieu de RPMI, observée à l'œil nu et au microscope optique au G×4.....	25
Figure18 : Parasites fixés sur la cellule de Thoma au cours de l'opération de dénombrement de la souche LIPA330, observés sous le microscope optique au G×4.....	26
Figure19 : Histogramme des résultats totaux des opérations de dénombrement des cinq souches de <i>Leishmania</i>	26
Figure20 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7 % des produitsd'extractions totales de la souche LIPA 281/11 (résultats positifs).....	27
Figure21 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7 % des produits d'extractionstotales de la souche LIPA 32/06 à gaucheet la LIPA 443/13 à droite (résultats positifs).....	28
Figure 22: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7 % des produits d'extractions d'ADN total de la souche Lipa 330 à gaucheet la Lipa 118 à droite(résultats positifs).....	28
Figure 23 : profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7% d'une expérience ratée.....	29
Figure 24 : les résultats les plus élevés des concentrations d'ADN des souches de <i>Leishmaniamajor</i> testés par la Nanodrop.....	30

Figure 25 :les résultats les plus élevés des concentrations d'ADN des souches de <i>Leishmaniainfantum</i> testés par la Nanodrop.....	30
Figure 26 :les résultats les plus élevés des concentrations d'ADN de la souche de <i>Leishmaniakillicki</i> testés par la Nanodrop.....	30
Figure 27 :Courbe de la HRM d'un résultat positif et d'autre négatif.....	31
Figure28 :les résultats généraux des courbes du Tm de <i>Leishmania</i> spp réalisé par le Taqman.....	32
Figure 29 : Phénomène de Dye-jumping capté dans les résultats des Tm de LIPA 32/06....	33
Figure 30 : la vue graphique de gène Hsp70 e <i>Leishmaniadonovani</i> obtenue par Primer-BLAST	35
Figure31 : Résultats des Tm ciblant l'amorce ITS1 de <i>Leishmania</i> spp.....	36
Figure 32 : Résultats des Tm ciblant l'amorce Gp63 de <i>Leishmania</i> spp.....	36
Figure33 : Résultats des Tm ciblant l'amorce Hsp70 de <i>Leishmania</i> spp.....	37
Figure 34 : Résultats des Tm ciblant l'amorce Hsp20 de <i>Leishmania</i> spp.....	37
Figure35 : Résultats des Tm ciblant l'amorce 7SL-RNA de <i>Leishmania</i> spp.....	38

Liste des tableaux

Tableau I : Les espèces des <i>Leishmania</i> dans le monde	03
Tableau II : Caractéristiques des souches de <i>Leishmania</i> utilisées	15
Tableau III: Les composants du mix à HRM	20
Tableau IV: Les résultats de la croissance des cinq souches sur NNN	24
Tableau V: Les résultats de la croissance des cinq souches sur RPMI	25
Tableau VI: Les résultats les plus élevés des comptages des cinq souches étudiées de <i>Leishmania</i>	26
Tableau VII: Les températures de fusion obtenues par le test PCR-HRM de la LIPA 32/06	33
Tableau VIII : Les températures de fusion obtenues par le test PCR-HRM de la LIPA 443/13.....	33
Tableau IX : Les températures de fusion obtenues par le test PCR-HRM de la LIPA 330....	34
Tableau X: Les températures de fusion obtenues par le test PCR-HRM de la LIPA 118.....	34
Tableau XI : Les températures de fusion obtenues par le test PCR-HRM de la LIPA 281/11.....	34

Liste d'abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN : Acide Ribonucléique
BET : Bromure Ethidim
C : Cytosine
CAPS : Séquence Polymorphe Amplifiée Clivée
EDTA : Acide Ethylène Tétra Acétique
ELISA : Enzyme linkedImmunoAssay
FHR : Fusion à haute résolution
G : Grossissement
G : Guanine
Gp 63 : glycoprotéine 63
Hsp70 : Heatshockproteins (protéine de choc thermique)
INSP : l'Institut Nationale de la Santé Publique
ITS : Ispaceur interne transcrit
L.infantum : *Leishmaniainfantum*
L.killicki : *Leishmaniakillicki*
L.major : *Leishmaniamajor*
L'IPA : L'Institut Pasteur d'Algérie
LC : Leishmaniose cutanée
LCC : Leishmaniose cutanée Chronique
LCN : Leishmaniose cutanée de Nord
LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique
LV : Leishmaniose viscérale
MALDI-TOF : Matrix assisted laser Desorptionionization Time of flight
MB : Méga base
MDR1 : multi Drogue Resistant1
Min : Minutes
MLEE : Électrophorèse Enzymatique Multi locus
MLST : Multi Locus Sequence Typing
NCBI : National Center of Biotechnology Information
NNN : Novy-McNeal-Nicolle
OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé
Pb : Paire de Base
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
PCR-HRM : PCR- High Resolution Melting
PCR-RFLP : PCR Restriction fragment Length Polymorphism
PK : Protéine K
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
SDS : Sodium DodécylSulphate
SL-ARN : Spliced leader

SNP : Signal Nucléiquepolymorphisme

Tr/min : Tour/minute

TAE : Tris Acétate EDTA

TE : Tris EDTA

V : volt

VF : volume final

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre 1 : Généralités	
1.1 Les leishmanioses.....	3
1.2 Etude du parasite	3
1.2.1 Perspective historique	3
1.2.2 Les espèces de Leishmania	3
1.2.3 Caractères morphologiques du parasite	4
1.2.3.1 Forme amastigote	4
1.2.3.2 Forme promastigote	4
1.2.4 La reproduction chez Leishmania	4
1.2.4.1 Reproduction asexuée	4
1.2.4.2 Reproduction sexuée	4
1.3 Vecteurs	5
1.4 Réservoirs	5
1.5 Cycle de vie de Leishmania	6
1.6 Les formes cliniques de la leishmaniose	6
1.6.1 Les formes asymptomatiques	6
1.6.2 La leishmaniose cutanée	7
1.6.3 La leishmaniose viscérale	7
1.6.4 La leishmaniose cutanéomuqueuse	8
1.7 Répartition géographique de la maladie	8
1.7.1 Dans le monde	8
1.7.2 En Algérie	10
1.7.2.1 La leishmaniose cutanée en Algérie	10
1.7.2.2 La leishmaniose viscérale en Algérie	11
1.8 Le diagnostic	11

1.9 Le traitement	11
1.10 Le génome de Leishmania	12
1.10.1 L'organisation du génome	12
1.10.2 Contenu des chromosomes et conservation du génome	12
1.10.3 L'ADN ribosomique	12
1.10.4 L'ADN kinétoplastique	13
1.11 Les outils d'identification des espèces de Leishmania	13
1.11.1 La PCR-HRM	14

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Matériel	15
2.1.1 Matériel biologique	15
2.1.2 Matériel non biologique	15
2.2 Méthode	15
2.2.1 Schéma récapitulatif des méthodes	15
2.2.2 Culture parasitaire	17
2.2.3 Récolte des parasites	17
2.2.4 Numérotation des parasites	17
2.2.5 Extraction d'ADN	17
2.2.5.1 Extraction par Phénol chloroform	18
2.2.5.2 Extraction par Kit Qiagen	18
2.2.6 Evaluation de la quantité et la qualité d'ADN	19
2.2.6.1 Dosage d'ADN	19
2.2.6.2 L'électrophorèse	19
2.2.7 L'analyse moléculaire : la PCR-HRM	19
2.2.8 Sélection et évaluation in silico des amorces spécifiques de Leishmania spp	20

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1 Résultats	23
3.1.1 Résultats des observations microscopiques	23
3.1.2 Résultats de la numération des parasites	25
3.1.3 Résultats d'analyse d'ADN	27
3.1.3.1 Résultats d'électrophorèse	27
3.1.3.2 Résultats des dosages optiques d'ADN par la Nanodrop	29
3.1.4 Résultats de la PCR-HRM	31
3.1.4.1 L'amorce 7SL-RNA	31
3.1.4.2 L'amorce ITS1	35
3.1.5 Résultats de la sélection et l'évaluation in silico des amorces spécifiques de Leishmania	35
3.2 Discussion	39
Conclusion	43
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction :

En Algérie, les leishmanioses cutanées et viscérales sont des maladies parasitaires à déclaration obligatoire et qui constituent un problème de santé publique. L'Algérie se classe la deuxième, après l'Afghanistan, pour l'incidence des leishmanioses cutanées (OMS, 2022). Les agents responsables identifiés des formes cutanées et viscérotropes de la maladie en Algérie sont *L. major*, *L. infantum* et *L. killicki* (syn *L. tropica*) (Harrat *et al*, 2009 ; Pralong *et al*, 2009)

L'identification précise des espèces de leishmanies est une étape clé dans le diagnostic, le traitement et le contrôle de la maladie. Cependant, les méthodes conventionnelles microscopiques et basées sur la culture sont encore utilisées pour un diagnostic rapide. Elles ne sont pas en mesure d'identifier les espèces de ce parasite. Au lieu de cela, à des fins d'identification d'espèces, des techniques moléculaires telles que la PCR suivie de la RFLP-PCR et le séquençage de l'ADN sont très recommandées. (Haddad *et al*, 2016 ; Thakur *et al*, 2020 ; Espada *et al*, 2018 ; Kermanjani *et al*, 2017 ; Abbasi *et al*, 2019)

Afin de différencier les espèces de *Leishmania* il existe plusieurs techniques, qui sont un élément clé des études épidémiologiques tel que les techniques biochimiques comme la MLEE (The multilocus enzyme electrophoresis) qui est la première méthode utilisée au niveau de laboratoire. C'est une technique lente et coûteuse qui nécessite une culture parasitaire très importante pour distinguer entre les espèces. La deuxième technique utilisée est la PCR RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) qui est plus intéressante et rapide que la MLEE. Jusqu'au développement d'un outil PCR de fusion à haute résolution (PCR-HRM), qui est une technique rapide, moins coûteuse, spécifique et sensible pour l'identification et la détection des différentes espèces de *Leishmania*.

La fusion à haute résolution PCR-HRM (High resolution melting), s'est avérée suffisamment fiable pour identifier les agents pathogènes au niveau de l'espèce. La réalisation de PCR-HRM dans un système fermé réduit les coûts, le temps et les complexités par rapport à la PCR et aux tests post-PCR laborieux. (Mohammadi *et al*, 2017). L'analyse de fusion à haute résolution (PCR-HRM) est une technique moléculaire analytique automatisée qui mesure le taux de dissociation de l'ADN double brin en ADN simple brin avec l'augmentation de la température en incluant un colorant fluorescent. (Nassereddin et Jaffe, 2010)

La PCR-HRM est utilisée dans la détection du polymorphisme d'un seul nucléotide dans les maladies génétiques. Elle a été utilisée par la suite pour la détection de duplications internes en tandem, la recherche de mutations simultanées et le génotypage en bactériologie, (Dufresne *et al*, 2006) et (Wolf *et al*, 2008). Il s'agit d'une technique sensible facilement applicable à la détection d'agents pathogènes, utilisant l'ADN extrait directement du sang et d'autres tissus, éliminant ainsi les longues procédures telles que l'isolement et la croissance des parasites.

L'objectif de notre travail, dans un premier temps, est d'étudier la spécificité de la PCR-HRM dans l'identification des trois espèces de *Leishmania* existant en Algérie : *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum*. Ainsi que l'évaluation de sa sensibilité par rapport aux faibles concentrations d'ADN parasitaire. Cette partie utilisera deux amorces spécifiques à des marqueurs qui sont : l'ARN7-SL et l'ITS1.

Dans un deuxième temps, nous allons effectuer une étude *in silico* afin de d'identifier de nouvelles amorces PCR HRM avec plusieurs marqueurs cibles qui sont : ITS1, ARN-7SL, HSP70, HSP20 et GP63 pour arriver aux conditions optimales d'identification des différentes espèces de *Leishmania* présentes en Algérie avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité. L'outil Primer Blast du site NCBI est à la base de cette étude bioinformatique (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).



Chapitre I : *Généralités*

1.1. Les leishmanioses

Les Leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, appartenant à plus de 20 espèces différents, et transmises à l'homme par la piqûre d'un moucheron vecteur hématophage, le phlébotome femelle (OMS, 2022).

Ces anthropozoonoses, communes à l'homme et à certains animaux, sont endémiques dans 92 pays et 4 continents : l'Afrique, l'Amérique centrale et du sud, l'Asie et l'Europe, exposant 350 millions des personnes (OMS, 2020). Cette maladie a une relation avec les changements environnementaux, la malnutrition, le système immunitaire affaibli et avec le déplacement des populations (OMS, 2022).

1.2. Etude du parasite

Leishmania appartient à la famille des *Trypanosomatidae*, qui se compose de protozoaires parasites. Cette espèce est un parasite obligatoire qui a besoin d'un hôte pour sa vie. Cependant, les leishmanies sont hétéroxènes et nécessitent donc 2 hôtes pour compléter leur cycle de vie.

1.2.1. Perspective historique

En 1900, *William Boog Leishman*, un médecin biologiste militaire observa ce parasite pour la 1^{ère} fois dans la rate d'un soldat décédé, après être rentré dans la région de Dum-Dum (Inde) avec une infection qui, à l'époque, fut appelée fièvre **Dum-Dum** ou Kala-azar. Par la suite, *Charles Donovan* observa le même parasite chez les malades hospitalisés à Chennai (Inde), et l'a identifié comme étant l'agent causal de la leishmaniose viscérale. L'espèce produite fût ensuite nommée *Leishmania donovani* (Hechmi Louzir, 2013).

1.2.2. Les espèces de *Leishmania*

Les espèces du *Leishmania* sont identiques morphologiquement, et ne sont différenciées que par les isoenzymes et l'ADN, et les espèces de *Leishmania* sont représentés dans le nouveau et l'ancien monde (tableau 1).

Tableau I: Les espèces de *Leishmania* dans le monde (ANOFEL, 2014)

	Leishmaniose cutanée		Leishmaniose viscérale	Leishmaniose cutanéomuqueuse
Autre appellation	Bouton d'Orient		Kala-azar	Leishmaniose tégumentaire américaine
Ancien Monde (Europe, Afrique, Asie)	<i>L. tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. arabica</i>		<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	
Nouveau Monde (Amériques)	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>

1.2.3. Caractères morphologiques du parasite

Les parasites du genre *Leishmania* apparaissent sous deux formes tout au long de leur cycle de vie.

1.2.3.1. Forme amastigote

C'est une forme immobile intracellulaire, arrondie à ovale (Figure 1), qui mesure 5 μm . Elle possède un noyau généralement excentrique et un kinétoplaste. Elle est retrouvée chez l'hôte vertébré infecté. (Pace, 2014)

1.2.3.2. Forme promastigote

C'est une forme mobile extracellulaire allongée, qui se trouve dans le tube digestif du phlébotome et dans les milieux de cultures, avec 15 à 25 μm de long et 1,5 à 3,5 μm de large. Elle possède un noyau centrique. Le kinétoplaste se trouve dans une position antérieure au noyau (figure 1). Le promastigote possède un flagelle de 15 à 28 μm de longueur. Il a la forme infectante. (Pace, 2014)



Figure 1: Forme promastigote et amastigote de *Leishmania* (www.shutterstock.com)

1.2.4. La reproduction chez *Leishmania*

1.2.4.1. Reproduction asexuée

La propagation clonale a été proposée comme principal mécanisme de reproduction à travers les protozoaires parasites du genre *Leishmania* (Rogers *et al*, 2014).

1.2.4.2. Reproduction sexuée

Il existe plusieurs preuves de l'existence d'une hybridation naturelle entre des espèces de *Leishmania*, comme il a été démontré avec *L. major* qui a un cycle sexuel, y compris un processus méiotique. Des descendants hybrides sont formés avec des compléments génomiques complets des deux parents. L'accouplement ne se produit que dans le vecteur ou phlébotome qui peut transmettre les parasites hybrides aux mammifères hôtes. (Akhoundi *et al*, 2017)

1.3. Vecteurs

Les vecteurs du *Leishmania* sont des insectes morphologiquement proches des moustiques (Figure 2), qui appartiennent à l'ordre des Diptères, à la famille des *psychodidae* et à la sous famille des *Phlebotominae*. Parmi plus de 800 espèces de phlébotomes recensées, 98 sont des vecteurs avérés ou suspectés de leishmaniose humaine. (Maroli *et al*, 2012)

Seules les femelles sont hématophages (nécessaire à la ponte des œufs) et responsables de la transmission de la maladie. Leur cycle de la vie, de l'œuf à l'adulte, en conditions optimales dure de 4 à 6 semaines et un adulte vit entre 2 semaines à 2 mois. Les parasites passent du stade amastigote au stade promastigote et se multiplient dans l'intestin de l'insecte dans une période de 4 à 25 jours. La saison d'activité des phlébotomes va du juin à septembre, et elles piquent la nuit. (Feliciangeli, 2004)



Figure 2 : Phlébotome femelle qui prend un repas de sang (www.alamy.com)

1.4. Réservoirs

Plus de 70 espèces animales, plus l'être humain sont des réservoirs naturels de ce parasite (OMS 2022). Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. Les mammifères réservoirs des *Leishmania* appartiennent à divers ordres carnivores, rongeurs, primates..., dans ce cas la leishmaniose est dite **zoonotique**. Lorsque l'homme est le seul réservoir du parasite, elle est dite **anthroponotique**. En Algérie, Le chien est le réservoir de la leishmaniose viscérale à *L.infantum* et de la leishmaniose cutanée à *L.infantum* de nord (Bachi 2006). Alors que les réservoirs de la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major* sont deux rongeurs : *Psammomys obesus* et *Mériones shawi*. (Boudrissa *et al*, 2011)

1.5. Cycle de vie de *Leishmania*

Les personnes contractent l'infection lorsqu'elles sont piquées par une femelle phlébotome infectée. Les phlébotomes injectent une forme des protozoaires (appelée promastigote) pouvant provoquer une infection. Les promastigotes sont ingérés par des cellules immunitaires particulières appelées macrophages, (la phagocytose). À l'intérieur de ces cellules, les promastigotes se transforment en amastigote.

Les amastigotes se multiplient à l'intérieur des macrophages dans différents tissus. Lorsqu'un phlébotome pique une personne ou un animal infecté, il s'infecte en ingérant du sang contenant les macrophages dans lesquels se trouvent des amastigotes, dans l'intestin moyen du phlébotome, les amastigotes se transforment en promastigotes. Toujours dans l'intestin moyen du phlébotome, les promastigotes se multiplient, se développent, et migrent vers les segments buccaux de la mouche. Ils sont injectés lorsque la mouche pique une autre personne, bouclant le cycle illustré dans la figure 3. (Pearson, 2020)

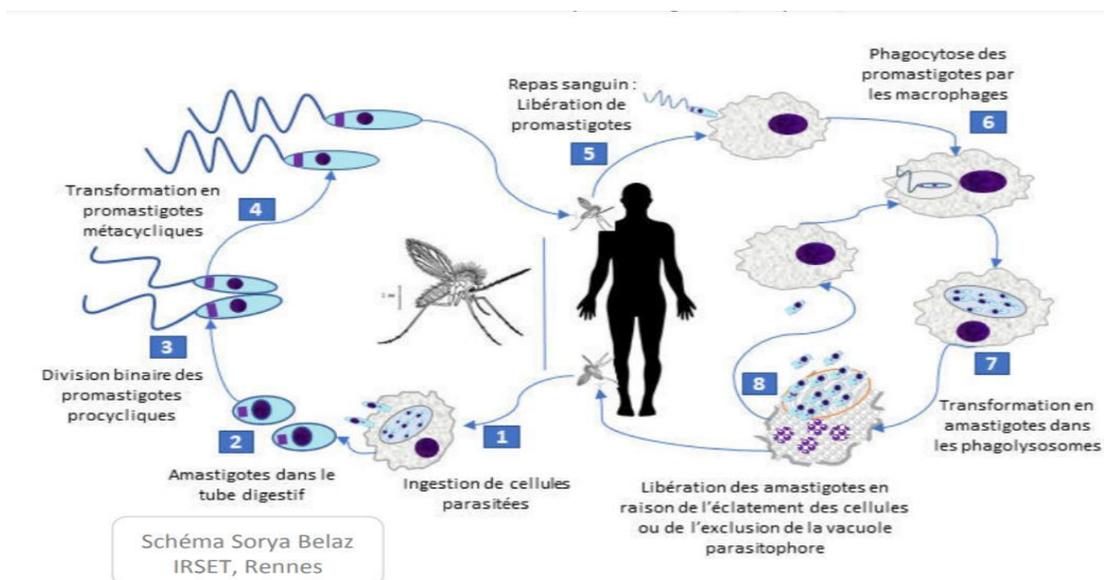


Figure 3 : cycle de vie de *Leishmania* (Belaz, 2017).

1.6. Les formes cliniques de la leishmaniose

Les leishmanioses peuvent se présenter sous 3 formes principales : viscérale, cutanée, cutanéomuqueuse, en plus des formes asymptomatiques.

1.6.1. Les formes asymptomatiques

Elles sont très fréquentes en zone d'endémie où la prévalence peut être élevée ; ainsi 11,2% des donneurs du sang de la région Bologne sont des porteurs asymptomatiques (Ortalli et al, 2019).

1.6.2. La leishmaniose cutanée : LC

Appelée aussi le Bouton d'orient, c'est la forme la plus fréquente, dans toutes les formes de leishmaniose cutanée. Il existe un large spectre clinique. La maladie varie de formes progressives sans tendance à la cicatrisation associée à une anergie (leishmaniose cutanée diffuse) à une forme avec une hypersensibilité exagérée constatée dans les leishmanioses muqueuses et les leishmanioses récidivante, en passant par des formes localisées auto-résolutives.

Cliniquement, les leishmanioses cutanées sont : cutanées localisées, cutanées diffuses, cutanées disséminées (Mokni, 2019).



Figure 4: leishmaniose cutanée à *L.major* (www.alamy.com).

1.6.3. La leishmaniose viscérale : LV

Appelée aussi Kala-azar, c'est la forme la plus sévère et mortelle dans plus de 95%de cas si elle n'est pas traitée. Elle provoque une fièvre irrégulière, une hépato splénomégalie (gonflement du foie et de la rate) comme il est illustré dans la figure 5, une pancytopénie et une hyper-gamma-globulinémie polyclonale. (Pearson, 2020)



Figure 5: Hépato-splénomégalie chez des enfants atteints de Kala-azar (www.medicinus.com)

1.6.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse

Elle détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge (figure 6). Plus de 90% des cas de leishmaniose cutanéomuqueuse se concentrent au Brésil, dans l'Etat plurinational de Bolivie, en Ethiopie et au Pérou. (OMS, 2022)

Cette forme est principalement provoquée par *L.braziliensis*, mais parfois par d'autres *Leishmania* spp. La symptomatologie de la leishmaniose cutanéomuqueuse se développe des mois ou des années après l'apparition des lésions cutanées. (Pearson, 2020)



Figure 6 : Défiguration chez des malades atteints de la leishmaniose cutanéomuqueuse

(www.docplayer.com)

1.7. Répartition géographique de la maladie

La répartition géographique des différentes formes de leishmaniose dépend de facteurs intrinsèques liés aux parasites, au phlébotome vecteur et aux espèces mammifères réservoirs, mais aussi de facteurs environnementaux extrinsèques.

1.7.1. Dans le monde

En 2020, 208357 nouveaux cas de LC et 12838 nouveaux cas de LV ont été notifiés à l'OMS. Plus de 90% des nouveaux cas de LC notifiés provenaient de la région de la Méditerranée orientale (73%) et de la région des Amériques. (OMS, 2022)

La région de la Méditerranée orientale et l'Algérie constituent un foyer éco-épidémiologique, car elles notifient à elles seules 79% de tous les cas de LC. Sept pays (Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Irak, Pakistan et République arabe syrienne) ont chacun notifié plus de 6000 cas de LC, ce qui représente plus de 80% des cas signalés à l'échelle mondiale. (Carte 1, figure 7)(OMS, 2022)

En 2020, 34% des cas de LV ont été notifiés par la région africaine et 29% par la région de la Méditerranée orientale. La région des Amériques et la région de l'Asie du Sud-est ont notifié 16% et 18% des cas, respectivement, tandis que la région européenne et la région du pacifique occidental n'ont signalé que 2% du nombre total de cas. Les 3 foyers éco-épidémiologiques pour la LV sont l'Afrique de l'Est (Éthiopie, Érythrée, Kenya, Ouganda, Somalie, Soudan et

Soudan du Sud), avec 57% du nombre total de cas dans le monde; le sous-continent indien (Bangladesh, Inde et Népal), avec 18%; et le Brésil, avec 16% (OMS, 2022).

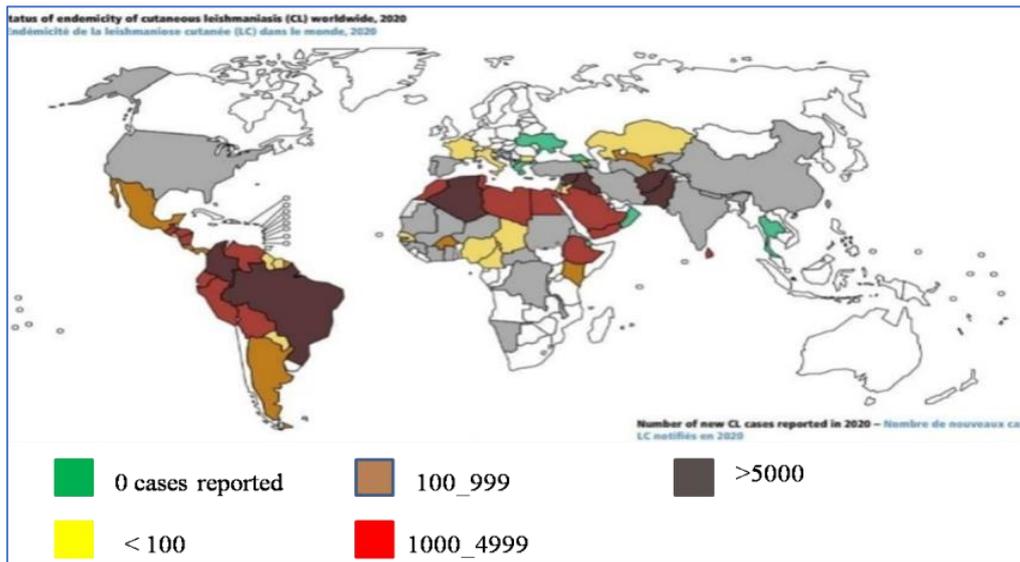


Figure 7 : Carte d'endémicité de la LC dans le monde (Ruiz-Postigo *et al*, 2020)

Six pays (Brésil, Éthiopie, Érythrée, Kenya, Inde et Soudan) ont chacun notifié >1000 cas de LV, soit 79% des cas dans le monde (carte 2, figure 8) Avec l'Irak, le Népal, la Somalie, le Soudan du Sud, le Tchad et le Yémen, ces 12 pays représentent 96% des cas de LV dans le monde. (OMS 2020). En 2020, cette tendance a encore évolué, avec 57% des cas en Afrique de l'Est et 18% sur le sous-continent indien.

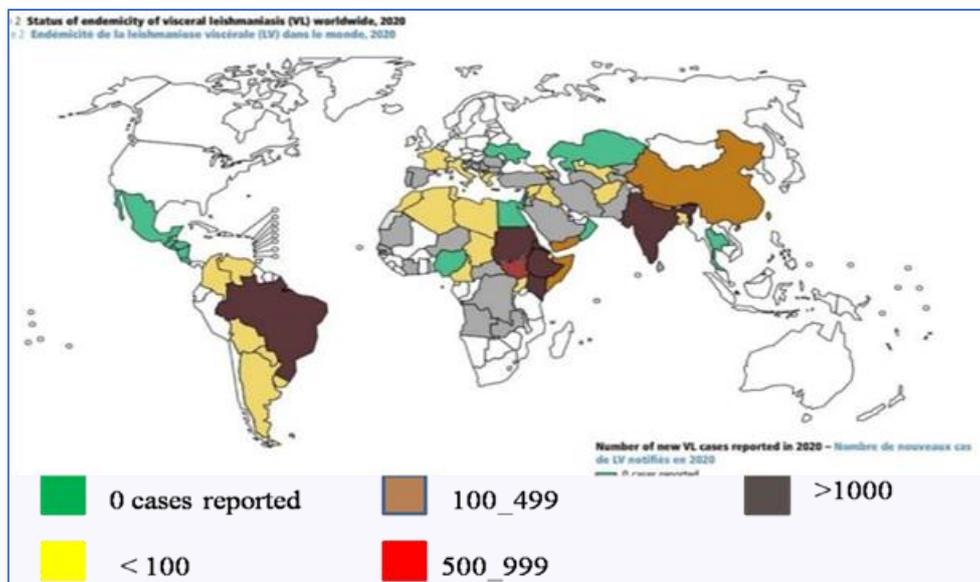


Figure 8 : Carte d'endémicité de la LV dans le monde (Ruiz-Postigo *et al*, 2020)

1.7.2.2 La leishmaniose viscérale en Algérie

La forme viscérale, enregistrée dans les régions humides et sub-humides situées au nord du pays, est causée par *Leishmania infantum*, avec le chien comme principal réservoir et *Phlebotomus perniciosus* ou *P. longicuspis* agissant comme vecteurs. Cette maladie touche principalement les enfants de moins de 5 ans. (Eddaikra *et al*, 2018)

1.8. Le diagnostic

Le diagnostic de la **leishmaniose cutanée** nécessite des prélèvements d'échantillons du tissu infecté chez les individus présentant des lésions cutanées. Des prélèvements de sang, de moelle osseuse, de foie ou de rate sont réalisés en cas de suspicion de **leishmaniose viscérale**. Les tests sérologiques (détection des anticorps) sont aussi utiles dans le diagnostic du LV, mais les résultats peuvent être négatifs, notamment chez les individus affaiblis. Il est ensuite possible de procéder à un examen microscopique, à une mise en culture ou à des analyses d'ADN afin de mettre en évidence la présence de *Leishmania* (Dedet, 2008).

1.9. Le traitement

Le traitement de la leishmaniose dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels la forme de la maladie, les affections concomitantes, l'espèce parasitaire et la situation géographique. La leishmaniose est une maladie qui peut être traitée et guérie, mais qui requiert un système immunitaire compétent car les médicaments n'éliminent pas entièrement le parasite de l'organisme, ce qui induit un risque de rechute en cas d'immunosuppression. Un traitement complet doit être administré rapidement à tous les patients chez lesquels une leishmaniose viscérale a été diagnostiquée. (OMS, 2022)

En Algérie, les antimoiines pentavalents sont les traitements de référence de toutes les formes de leishmaniose. Des échecs thérapeutiques sont fréquemment rapportés au cours de la thérapie antimoniale de la LC et de la LV. Les causes sous-jacentes des échecs thérapeutiques sont multifactorielles et interagissent avec certains facteurs de l'hôte (par exemple, la génétique de l'hôte et les réponses immunologiques), les caractéristiques du traitement (par exemple, la qualité du médicament, l'observance du traitement) et la sensibilité/résistance intrinsèque aux médicaments des souches ou des espèces de *Leishmania*. Ces multiples facteurs compliquent l'analyse des échecs du traitement à l'antimoine et de la résistance à l'antimoine. (Eddaikra *et al*, 2018)

D'autres médicaments peuvent être utilisés, certains donnés par voie injectable ou locale (paramomycine), d'autres par voie orale (antifongiques imidazoles, amphotéricine B). Des traitements physiques sont également proposés en alternative comme le laser, la cryothérapie (traitement par le froid) ou la thermothérapie. (<https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/leishmaniose>)

1.10. Le génome de *Leishmania*

Comme prévu pour un parasite unicellulaire obligatoire, les génomes de *Leishmania* sont compacts, simplifiés et de la même taille qui mesure en moyenne 33 Mb en raison de la perte de gène (Jackson *et al*, 2016 et Oppendoes *et al*, 2016).

1.10.1. Organisation du génome

Les *Leishmania* ont des traits de l'organisation génomique unique par rapport aux eucaryotes, tels que des gènes sans introns, des polycistrons et de petits chromosomes avec des densités des gènes élevées. De plus, ces flagellés possèdent une seule mitochondrie appelée kinétoplaste, qui contient un vaste réseau d'ADN de kinétoplaste (ADNk). Les espèces de l'ancien monde (comme *L.infantum*_ *L.major*) possèdent 36 paires de chromosomes, alors que les espèces de nouveau monde (comme *L.mexicana*, *L.braziliensis*) possèdent 34 ou 35 paires de chromosomes de taille variant entre 0,3 et 2,8 Mb. (Akhoundi *et al*, 2017). *Leishmania* est un organisme considéré comme diploïde mais des cas d'aneuploïdie existent. (Damasceno *et al*, 2020).

1.10.2. Contenu de chromosomes et conservation du génome

Le génome du *Leishmania* possède plus de 8300 gènes qui codent pour des protéines (47,9% du génome). *Leishmania* possède un fort pourcentage de bases C et G avec 62,5% de CG dans la région codante, et presque la totalité des gènes codant pour des protéines ne contiennent pas d'introns et environ 36% entre eux ont une fonction assignée. Environ 99% de gènes sont conservés entre les espèces *L.major*, *L.infantum* et *L.braziliensis*. La différence entre les espèces est due à la formation du pseudo gènes. (Kazemi, 2011)

1.10.3. L'ADN ribosomique : ADNr

Les gènes de l'ARNr sont situés principalement sur le chromosome 27, généralement sous forme des copies multiples de répétitions tête-bêche en tandem d'environ 12,5 Kb. Comme la plupart des eucaryotes, la grande sous unité ribosomique (LSU) est composée d'ARNr 18S, 5,8S et 5S, tandis que la petite sous unité (SSU) contient de l'ARNr 18S (figure10), (Akhoundi *et al*, 2017). Parmi les différents composants de ces gènes, les régions ITS les plus variables, sont idéales pour le typage des espèces (Schönian *et al*, 2001 ; Kuhls *et al*, 2005).

1.10.4. L'ADN kinétoplastique

C'est une masse d'ADN circulaire constituée de milliers de minicercles (environ 1Kb chacun) et de plusieurs dizaines de maxicercles (23Kb chacun) qui est traditionnellement la cible la plus fréquemment utilisée pour la détection et le typage de *Leishmania* en raison de sa nature multicopie et de sa grande sensibilité. (Akhoundi *et al*, 2017).

•Les **maxicercles** : codent pour des gènes de l'ARN ribosomique et les sous-unités de complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Akhoundi *et al*, 2017)

•Les **minicercles** : constituent >95% de la masse totale de l'ADNk, codent pour les molécules d'ARN guide (ARNg), impliqués dans l'édition d'ARN des cryptogènes des maxicercles. (Akhoundi *et al*, 2017)

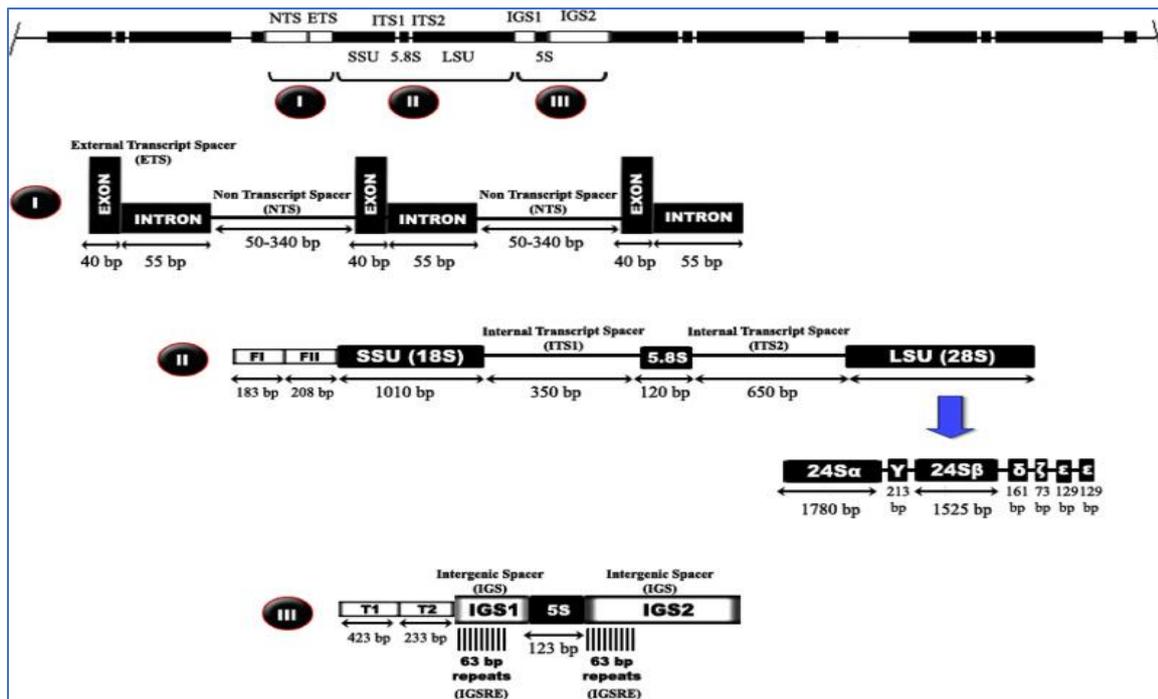


Figure 10 : Carte génétique des gènes d'ADNr (situés dans le chromosome 27) avec la longueur des fragments correspondants chez les espèces de *Leishmania* (Akhoundi *et al*, 2017)

1.11. Les outils d'identification des espèces de *Leishmania*

Malgré les espèces de *Leishmania* sont identiques morphologiquement, il existe plusieurs techniques moléculaires de distinction et d'identification de ces espèces comme il est illustré dans la figure 11.

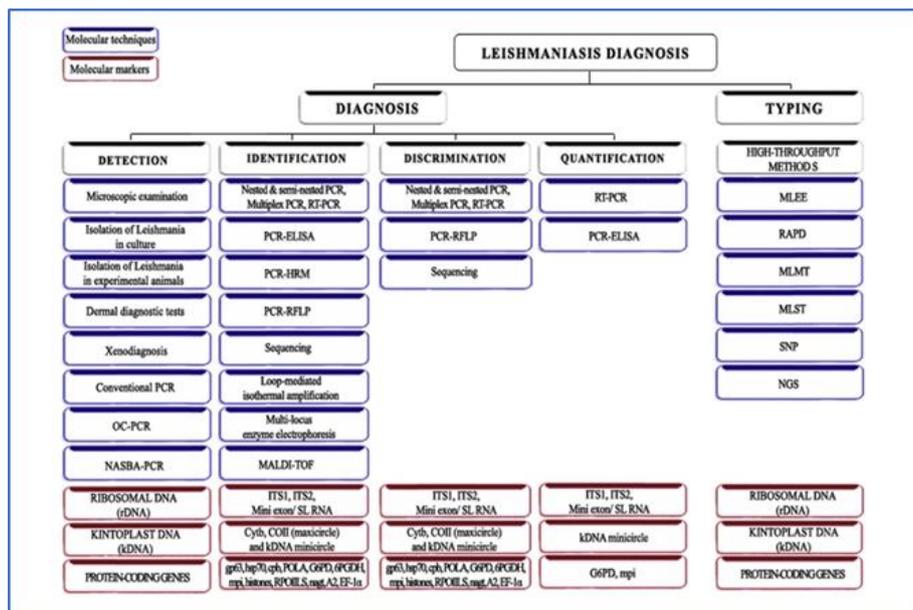


Figure 11 : Marqueurs moléculaires et outils proposés pour différents objectifs de diagnostic de *Leishmania* (Akhoundi *et al*, 2017).

1.11.1. La PCR- HRM

La technique d'analyse de courbes de fusion à haute résolution (**FHR**) ou High resolution melting (**HRM**) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations, de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans les échantillons d'ADN double brin. Elle est simple et rapide < 2 heures, et réduit significativement le coût mais aussi le temps nécessaire à l'étude de variabilité des gènes. (**Chomarat et Breysse, 2011**). Elle consiste en l'intégration d'un fluochrome intercalant à l'ADN amplifiée en mesurant son intensité, lors de l'augmentation de température programmée de façon progressive causant la dissociation de l'ADN bicaténaire à l'ADN monocaténaire (**Herzandez et al, 2014**).

L'analyse HRM ciblant les gènes hsp70, ITS1 et gp63 peut être utilisée comme une technique très sensible pour la détection et la discrimination des différents espèces de *Leishmania* responsable de la leishmaniose (**Housseini-Safa et al, 2018**). Parmi ces trois gènes, la gp63 est la meilleure dans la séparation et l'identification des espèces. Cette méthode a été développée pour détecter les SNP (Signal nucléique polymorphisme) et la variation des séquences des gènes. D'autres amorces sont utilisées dont : L'ITS2, 7SL-RNA, cpb, POLA, G6PD, RV1, RV2 et le Cytb... (**Akhoundi et al, 2017**).

La technique PCR-HRM se déroule en 4 étapes essentiels : la dénaturation, l'amplification 40 cycles, une étape de melting et un refroidissement par la suite (**Nassereddin et Jaffe 2010**).

La signalisation du colorant de fluorescence été mesurée après chaque cycle. (**Housseini-Safa et al, 2018**). Le kit type PCR-HRM (Quigen_Hilden_ Allemagne) contient le nouveau colorant fluorescent qui se lie à l'ADN double brin (EVA Green). Le colorant fluorescent le plus utilisé dans la HRM est le Cyber Green, il ne se lie qu'avec l'ADN double brin. Il existe aussi des nouveaux colorants dont : le LC-Green, le Reso-Light, l'Eva-Green et le Cyto9. (**Housseini-Safa et al, 2018**)

Une étude visait à évaluer la capacité du test PCR-HRM pour la détection des mutations au niveau du gène de résistance MDR1 (multi-drogue resistant 1), confirme qu'environ 65% des souches de leishmanies méditerranéennes ont des gènes MDR1 amplifiés. (**Maryam Fekri Soofi Abadi et al, 2021**).



Chapitre II :
Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasites et génétique des populations au sein de l'institut Pasteur à Daly Brahim-Alger, durant une période d'études s'étalant de 16-02-2022 à 08-09-2022.

L'objectif de ce travail était d'identifier les différentes espèces de *Leishmania* circulant en Algérie en appliquant une technique récente non-classique qui est La HRM (High resolution melting), passant par plusieurs techniques de biologie moléculaire et de bioinformatique.

Notre étude a porté sur des souches différentes de *Leishmania*, l'ADN extrait à partir des échantillons a été identifié par la PCR-HRM *in vitro*, et sur NCBI *in silico* en utilisant plusieurs amorces dont : 7SL-RNA, ITS1, ITS2, Gp63, Hsp70, Hsp20.

2.1. MATERIEL

2.1.1. Matériel biologique

Ce travail a été réalisé à partir de 05 souches de *Leishmania* qui correspondent aux 03 espèces différentes existantes en Algérie, à savoir *Leishmania major*, *L. infantum* et *L. killicki*. Ces espèces sont responsables des formes cutanée et viscérale de la maladie.

Tableau II: Caractéristiques des souches de *Leishmania* utilisées

Souche	Code OMS	Origine	Forme clinique	Espèce
LIPA 32/06	MPSA/DZ/2006/LIPA32/06	Ouargla	LC	<i>L. major</i>
LIPA 443/13	MHOM/DZ/2013/LIPA443/13	MSILA	LC	<i>L. major</i>
LIPA 330	MHOM/DZ/1991/LIPA330	Tizi Ouzou	LC	<i>L. infantum</i>
LIPA 281/11	MHOM/DZ/LIPA281/11/2011	GHARDAIA	LC	<i>L. killicki</i>
LIPA 118	MHOM/DZ/1983/LIPA118	Tizi Ouzou	LV	<i>L. infantum</i>

2.1.2. Matériel non biologique

L'appareillage et les réactifs utilisés sont donnés en annexe 1 de matériel et méthodes.

2.2. METHODES

2.2.1. Schéma récapitulatif des méthodes

Notre travail a été passé par 5 principales étapes qui nous ont permis à identifier les espèces de *Leishmania* étudiées, à partir d'une étude *in vitro*, et une autre *in silico*. La première étape c'était la mise en culture des 5 souches sélectionnées, qui font partie de 3 espèces de *leishmania*, responsables de la LC et la LV en Algérie. En suite, nous avons fait des opérations de dénombrement pour atteindre au minimum 10^6 parasites qu'ils sont par la suite extraits à partir de deux méthodes d'extraction ; par le phénol-chloroforme et le kit Qiagen. Les ADN extraits sont par la suite analysés qualitativement par une électrophorèse sur gel

d'agarose, et quantitativement par un dosage optique, pour lancer une PCR-HRM à la fin à partir de 2 amorces ; la 7SL-RNA et l'ITS1. L'étude a été améliorée par une sélection des amorces *in silico* sur les bases de données bioinformatiques. La figure suivante présente le schéma récapitulatif des méthodes utilisées.

Schéma récapitulatif des méthodes :

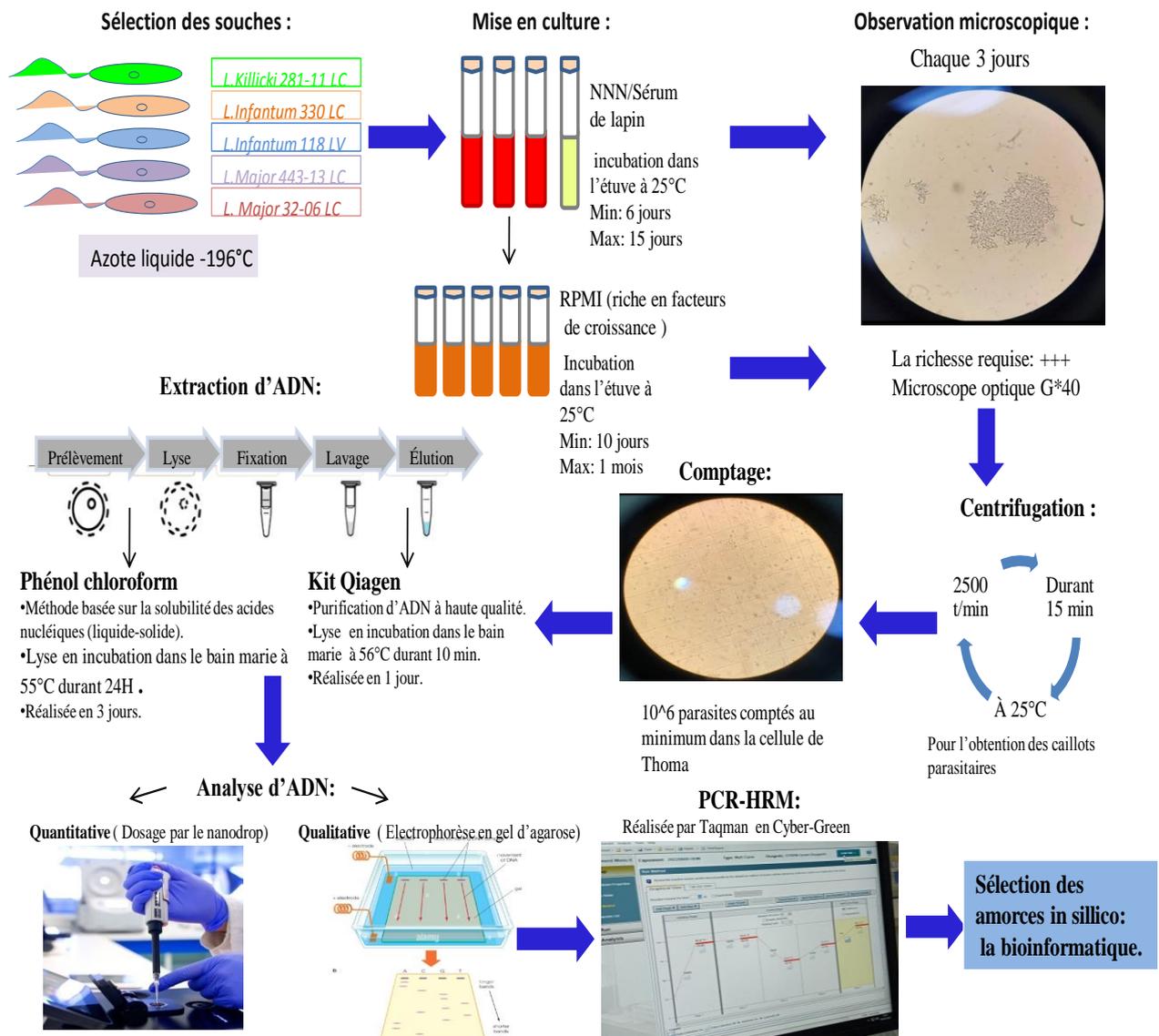


Figure 12 : schéma récapitulatif de la méthode expérimentale de notre étude.

2.2.2. Culture des parasites

L'observation des différentes souches été effectuée au niveau du salle de cultures de laboratoire en utilisant un microscope optique pour arriver à voir les parasites mobiles (forme promastigote) au grossissement $Gr \times 40$. Une goutte d'échantillon a été prélevée à chaque fois en utilisant une pipette pasteur devant un bec benzène pour éviter les contaminations, et la met entre lame et lamelle. Les parasites ont été cultivés sur différents milieux de cultures : milieu NNN, sur sérum du lapin et sur RPMI supplémenté de sérum de veau fœtal à 10% (RPMI 10S). Ces milieux sont riches en facteurs de croissance pour permettre les leishmanies à se multiplier rapidement. La terminologie d'évaluation de la croissance parasitaire en culture est : « - » : aucun parasite été observé sur la lame, « + » : un seul parasite été détecté sur la lame, « ++ » : Entre 1 et 5 parasites ont été détectés, « +++ » : Entre 5 et 10 parasites ont été détectés, « ++++ » : Les champs ont été très remplis en leishmanies.

2.2.3. Récolte des parasites

Sous la hotte, et en travaillant avec chaque souche séparément, les tubes des parasites cultivés en RPMI 10S, ont été versés dans un seul tube conique, puis centrifugés à 2500 tr/min durant 15 minutes à 25°C.

2.2.4. Numération des parasites

Après la centrifugation, deux phases sont apparues : un surnagent de la même couleur que celle de RPMI, et un culot parasitaire de couleur blanche au fond du tube. En utilisant une micropipette, 10 μ l de suspension parasitaire du culot a été mélangée avec 90 μ l de formol dans une microplaque sous la hotte. Le mélange était superposé dans la cellule de Thomas afin de faire une lecture en comptant les parasites sous le microscope optique à l'aide d'un compteur. Le rôle du formol dans cette étape s'était de fixer les parasites mobiles pour les biens comptés. On a appliqué cette équation pour les numérations : $C_i = m \times 16 \times 2 \times 10^4$, $m = (N/6)$: la moyenne du nombre (N) de parasites compté dans les 6 carreaux pour savoir la concentration parasitaire initiale (C_i). Après l'opération de dénombrement sur la cellule de comptage (Thoma), on doit compter au minimum 10⁶ parasites/ml pour arriver à faire des extractions d'ADN.

2.2.5. Extraction d'ADN

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction d'ADN qui peuvent se classer en trois types :

1. Les méthodes utilisant des solvants organiques.
2. Les méthodes utilisant des solvants non-organiques.
3. Les méthodes basées sur l'utilisation de microcolonnes de résines échangeuses d'ions.

(Ziada-Bouchaar H, 2019-2020)

Le choix de la méthode dépend entre autres du type d'échantillon et de la quantité. Cette étape permet d'isoler l'acide désoxyribonucléique (ADN) des autres substances cellulaires (Protéines...). Dans notre étude, nous avons choisis deux méthodes d'extractions :

2.2.5.1. L'extraction par Phénol Chloroforme

L'extraction au phénol-chloroforme était développée en 1987 par Piotr Chomczynski et Nicoletta Sacchi (**Chomczynski et Sacchi, 1987**). C'est la procédure de séparation la plus courante qui repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques dans trois phases : une phase aqueuse supérieure contenant de l'ADN, une interface contenant les protéines et une phase organique inférieure contenant de l'ARN et les lipides.

L'avantage de cette méthode est la simplicité du protocole, la dénaturation rapide des nucléases et la stabilisation des acides nucléiques.

Mode opératoire :

Cette méthode est initiée par une lyse cellulaire en ajoutant 150µl de tampon de lyse (0,5M EDTA pH8) à 200µl de suspension parasitaire centrifugée et 10µl de SDS pour casser les ponts disulfure et la bicouche lipidique. L'ADN libéré dans le tube est traité par 20µl de protéinase K, pour digérer les protéines qui lui sont associées. La lyse est réalisée en incubation dans le bain-marie à 55°C durant une nuit. Après la lyse, une déprotéinisation a été effectuée par l'ajout d'un volume égal de Phénol Chloroforme, suivi d'une légère agitation et une centrifugation à 12000 tr/min durant 10 minutes pour récupérer l'ADN qui reste soluble dans la phase aqueuse supérieure. Ces étapes ont été refaites deux fois.

Pour précipiter l'ADN, environ 250µl de la phase aqueuse ont été récupérées dans un nouveau microtube, et 20µl d'acétate ainsi que 400 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés puis centrifugés à froid à 4°C à une vitesse maximale de 12000tr/min, pendant 30 minutes. Le culot récupéré a été par la suite lavé avec 500µl d'éthanol 70° et centrifugé encore une fois à 12000 tr/min durant 30 minutes. Le surnageant est jeté et le culot récupéré et séché à température ambiante toute la nuit. Le jour suivant, 50µl de tampon d'élution (TE) ont été ajoutés au culot afin de réhydrater l'ADN. Ce dernier a ensuite été dosé à l'aide d'une Nanodrop puis conservé à 4°C.

2.2.5.2. L'extraction d'ADN par kit (Qiagen)

Cette méthode est basée sur des réactifs de kit Qiagen pour extraction et purification d'ADN parasitaires par l'utilisation des microcolonnes de membrane de silice. Elle a pour objet de purifier l'ADN à haute qualité en éliminant tous les contaminants.

Mode opératoire

Dans un tube eppendorf, 200 µl de suspension parasitaire sont mélangés avec 20 µl de la PK et 200µl de AL (tampon de lyse), vortexés, puis incubés à 56°C pour 10 minutes. Après l'incubation, le mélange est transféré vers une microcentrifugeuse, avec 200 µl d'éthanol, puis une centrifugation de 10 minutes à 8000 tr/min est effectuée. Le filtre récupéré est fixé dans un nouveau tube. En ajoutant 500 µl de AW1 (tampon de lavage 1), puis centrifugé pour 1 minute à 8000tr/min. Le tube est encore changé une fois et 500 µl de AW2 (tampon de lavage 2) sont ajoutés avant une centrifugation à 14000tr/min durant 3 minutes. Le filtre récupéré est

mis dans un tube, et 50 µl de tampon d'éluion AE sont ajoutés au tube afin de collecter l'ADN. Le contenu a ensuite été dosé au Nanodrop® puis conservé à 4°C.

2.2.6. Évaluation de la quantité et la qualité d'ADN

2.2.6.1. Dosage d'ADN

Les ADN extraits à partir des milieux de RPMI 10S ont été analysés par le Nanodrop®. L'absorbance des échantillons a été déterminé à différents longueurs d'ondes : 230,260 et 280. Pour évaluer avec précision la qualité des ADN, 260/280 doit être analysée en combinaison avec la qualité spectrale globale. Pour les ADN, généralement un ratio de rendement de 260/280 ~1,8. Ce ratio est dépend du pH et de la force ionique du tampon utilisé pour les mesures d'échantillons. Les ratios significativement différents de pureté peuvent indiquer la présence de protéines, des contaminants du phénol ou d'autres qui absorbent fortement à 280 ou près de cette valeur. La deuxième mesure de pureté est celle de ratio 230/260 avec des valeurs d'acides nucléiques pures de l'ordre 1,8 à 2,2.

1 µl d'échantillon d'ADN était posé dans la Nanodrop® pour effectuer une lecture de dosage.

2.2.6.2. L'électrophorèse

Pour évaluer la qualité d'ADN extrait à partir de nos échantillons, de kit et de phénol, l'ADN a été testé par une électrophorèse sur le gel d'agarose.

Un gel d'agarose a été préparé à partir de 0,8 g de poudre d'agarose dans 100 ml de TAE (annexe 2 de matériel et méthodes) et chauffés dans la micro-onde, puis 5µl du BET (Bromure ethidium) ont été ajouté au mélange. Ce dernier a ensuite été versé dans la cuve d'électrophorèse. Ensuite, 3µl d'ADN de chaque échantillon été mélangée avec 1,5 µl de Bleu de Bromophénol (un tampon de charge) et déposé dans les puits du gel, avec un puits pour le témoin positif. Dans l'étape suivante, on a branché les électrodes de la cuve à l'alimentation (les dépôts étaient de côté cathode), pour faire une migration d'une heure à 80 V de tension.

L'observation des bandes d'ADN était faite par le Transilluminateur : il s'agit d'une visualisation de la migration des bandes d'ADN sur une table UV du Transilluminateur dans la chambre noire.

2.2.7. ANALYSE MOLECULAIRE PCR-HRM (High Resolution Melting)

Un test PCR-HRM a été réalisé afin de mesurer le taux de dissociation de l'ADN double brin en ADN simple brin avec l'augmentation de la température, en raison de la détection et l'identification de la variabilité des gènes chez les différentes espèces de *Leishmania*.

Au total, 26 échantillons d'ADN (dupliqués) étaient extrait par deux protocoles différents, à savoir le phénol chloroforme et le kit Qiagen, et à partir de concentrations différentes des souches du *L.major* (LIPA 32/06, LIPA 444/13 : cutanée), *L.killicki* (LIPA 281/11 : cutanée)

et *L.infantum* (LIPA 330 : cutanée) et (LIPA 118 : viscérale), ont été traité par cette méthode. A cet effet, nous avons utilisé 02 amorces spécifiques : l'ARN-7SL et l'ITS1 (tableau 1 et 2, annexe 3 de matériel et méthodes) et un intercalant fluorescent : le Syber Green.

Les séquences multilocus de gène de 7SL-RNA et l'ITS1 qui ont été rapportées et utilisées dans la séparation et l'identification de *Leishmania* spp ont été amplifié à l'aide d'amorces spécifiques, la 7SL-RNA (Forward: 5'_ACG TGG ACC AGC GAG GGT_3') et (Reverse : 5'_CGG TTC CCT CGC TTC AAC_3'), et aussi l'ITS1 (Forward : 5'_CTGGATCATTTTCCGATG) et (L5-8S-(Reverse) :5'_ TGATACCACTTATCGCACTT) pour un volume final de 20µl dans des tubes de 1,5 ml à froid, contenant un mix pour n=56 (26 d'échantillons dupliqués plus 2 témoins négatifs). Les composants du mix sont motionnés dans le tableau 3:

Tableau III: les composants du mix à HRM.

Le composant	Le volume requis pour n échantillon (µl)	Le volume final (µl)
H2O PCR grade	3	168
Amorce 1(directe)	1	56
Amorce 2(reverse)	1	56
Master Syber-Green	10	560

On a mis le mix réactionnel dans les puits selon le schéma de plaque qu'on a utilisé, en ajoutant 5µl de chaque échantillon d'ADN des cinq souches. La plaque a été scellée et centrifugée à 3000 rpm pendant 2 minutes. Le programme spécifique à chaque amorce a été entré dans l'appareil de PCR en temps réel : Taq-Man (7500 REAL TIME PCR SYSTEM). En impliquant le programme selon le protocole de **Nassereddin et Jaffe, 2010**. (Tableau 5, annexe 3 de matériel et méthodes) pour l'amorce **7SL-RNA** et le protocole 2 pour l'**ITS1**. Le test PCR-HRM peut prendre une durée de deux heures et demie.

2.2.8. Sélection et évaluation *in silico* des amorces spécifiques de *Leishmania* spp

L'évaluation *in silico* a été réalisée à l'aide de la plateforme de conception d'amorces en ligne du NCBI (International Center for Biotechnology Information), qui reçoit des amorces PCR à l'aide du système Primer 3 et vérifie simultanément la probabilité que les amorces se lient à des régions non spécifiques du génome des espèces de *Leishmania* étudiés via l'algorithme BLAST. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

L'ensemble des données utilisées dans l'étape de la PCR électronique comprenait les séquences génomiques des hôtes (chien, humain), du vecteur (phlébotome) et des *Trypanosomatidae*. (NCBI, 2018)

Toutes les données ont été collectées en Août 2022, en rendu sur le site web du NCBI, plus précisément, sur sa section nucléotide, puis nous avons recherché nos gènes d'intérêt en utilisant la barre de recherche en haut en écrivant le nom complet du gènes ciblés en ajoutant le nom de l'un des trois espèces de *leishmania* à chaque fois. Les gènes ciblés dans cette

étude étaient les suivants : **Internal Transcribed Spacer 1 et 2 (ITS1 et ITS2)** situées sur le chromosome 27, **Spliced Leader RNA (7SL-RNA)** située sur le chromosome 17, **Major Surface Protease(Gp63)** située sur le chromosome 10, **Heat Choc Protein 20 et 70 (Hsp20 et Hsp70)** qu'il a trois exemplaires situées sur les chromosomes 28, 34 et 35. (Akhoundi, 2017).

Sur la page de résultat, nous avons trouvé une mine d'information sur chaque séquence de gène, y compris la séquence brute vers le bas de la page comme il est illustré dans la figure suivante :

The image shows a screenshot of the NCBI GenBank database entry for the gene **Isolat de Leishmania tropica MHOM/SU/74/K27 gène de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité, séquence partielle**. The accession number is **MG85581.1**. The source is identified as **Leishmania tropica** from **Leishmania tropica**. The entry includes taxonomic classification, references, and the raw DNA sequence. The sequence is as follows:

```

1  ttttggagaa ttatggagtt gttgagaaa tggtttccca tggcaactt gtttggatg
61  gttgagctt tggagcttt agttgctc gttgagctt cgtttgctt gttgagctt
121  ccttttcaac tcaagcttc taggatgaa gttgagctt tggagctt gttgagctt
181  gttgagctt tggagctt tggagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt
241  gttgagctt tggagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt
301  gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt
361  gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt gttgagctt
//

```

The page also features a sidebar with options for sequence analysis (BLAST, etc.), related information, and social media links (Twitter, Facebook, LinkedIn, RSS). The footer includes contact information for the National Library of Medicine (NLM) and the National Institutes of Health (NIH).

Figure 13 : Profil des informations sur la souche MHOM/SU/K27 de *leishmania tropica* sur NCBI.

Pour ouvrir Primer-BLAST, nous avons cliqué sur [choisir des amorces](#) dans la barre latérale de droite pour concevoir des amorces de PCR à l'aide de ces séquences. Ensuite, et sur la page de résultat, nous avons changé quelques paramètres, y compris les températures de fusion des amorces sur 59°C, 62°C et 65°C respectivement, comme on a changé l'organisme en écrivant les espèces de *Leishmania*, et aussi la taille maximale de l'amplicon cible sur 400 paires de base.

Par la suite, nous avons cliqué sur [Obtenez des amorces](#) en bas de cette page pour avoir les amorces d'intérêt. Les étapes citées sont illustrés dans la figure 13. Dans la page des résultats, nous avons choisi les amorces dont le pourcentage en CG est supérieur à 60% comme une étape finale.

The screenshot shows the Primer-BLAST web interface with the following parameters configured:

- Modèle d'ACP:** Sequence: 7SL-RNA
- Paramètres d'amorces:**
 - Utiliser ma propre amorce avant (0-3 sur le côté plus): 0
 - Utiliser ma propre amorce arrière (0-3 sur le côté moins): 0
 - Taille du produit PCR: 16
 - Températures de fusion des amorces (T_m): 59, 62, 65
- Sélection exact/inton:**
 - Partie de la jonction exacte: Pas de préférence
 - Correspondance de jonction d'écran: 7, 4, 0
 - Inclusion d'étriers: Non
 - Gamme de longueur d'étrier: 1000, 10000
- Paramètres de vérification de la spécificité des paires d'amorces:**
 - Contrôle de spécificité: Activer le contrôle de spécificité des amorces par rapport au génome de l'organisme
 - Mode de recherche: Automatique
 - Base de données: Allen-BLAST
 - Exclusion: Cocher les homologues, Refuser les séquences (carré avec préfixe BL) (X), Cocher les séquences d'homologues non pertinents
 - Organisme: Leishmania tropica major (taxid 1064)
 - Taille maximale de l'amplicon cible: 400

Figure 14 : Profil des paramètres pour cibler le gène 7SL-RNA de *Leishmania tropica* sur Primer-BLAST.



Chapitre III :
Résultats et discussion

3.1. RESULTATS

3.1.1. Résultats des observations microscopiques

Toutes les souches de *Leishmania* utilisées ont été décongelées à partir de la banque de souches du centre de référence de la leishmaniose de l'IPA. Les souches passent par une période de somnolence après chaque décongélation. Afin d'accélérer la multiplication des parasites, ces derniers ont été cultivés sur le milieu NNN, qui est riche en nutriments grâce à la gélose au sang de lapin. L'observation était faite après les premiers 72h du premier repiquage, et a donné des résultats différents d'une souche à l'autre. Les paramètres considérés étaient : la richesse, mobilité, l'aspect et ainsi que le contrôle de la contamination.

Les premières observations ont montré quelques parasites par champ, avec une faible mobilité, plus des petits parasites qui signifient que n'y avait pas de multiplication.

À partir de la deuxième semaine, pour la plupart des souches, le nombre de parasites augmente en parallèle avec la taille de leur flagelle, qui sert à une mobilité plus rapide. Les figures suivantes présentent les leishmanies sous microscope optique en premier jour de repiquage et après 7 jours sur milieu NNN.

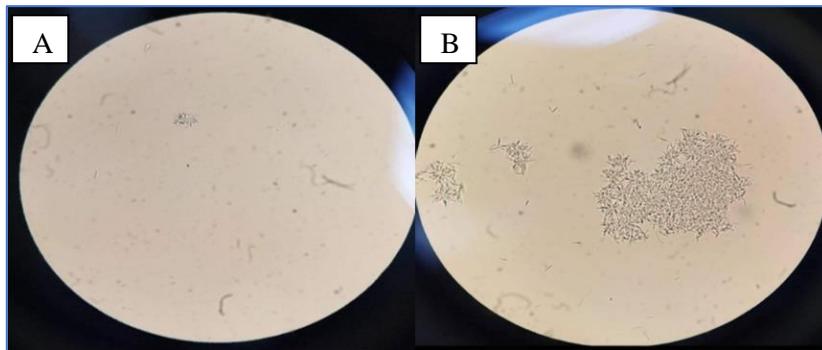


Figure 15: Résultats d'observation du LIPA 32/06 sous le microscope optique au *Gr400X*, à J0 (A) et après 6 jours du premier repiquage sur milieu NNN (B).

La figure «A» montre un champ vide, sur la lame entière deux parasites seulement ont été détectés lors de la première observation. La figure «B» montre un champ rempli par les leishmanies. Les parasites se sont multipliés durant les six jours à cause des nutriments du milieu NNN. Nous avons noté aussi une augmentation de leurs tailles et mobilité. Les résultats de la croissance des souches sur NNN sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau IV: les résultats de la croissance des cinq souches sur NNN

Espèce	<i>L.major</i>						<i>L.infantum</i>						<i>L.killicki</i>		
	32/06 LC			443/13 LC			330 LC			118 LV			281/11 LC		
Tube	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Richesse	+	++	+	+	++	+/-	+			-			+		-
	++	+++		++++			++	+++		++	+++		+++		++
	+	+													
Mobilité	Lentes														
	Rapides														

(●Semaine 1 ● semaine 2 ●semaine 3)

Après 72 heures, chaque souche a été repiquée sur 6 tubes de RPMI à 10% de SVF qui est riche en facteurs de croissance qui poussent les parasites à se multiplier rapidement. Les souches repiquées sur RPMI ont été par la suite observées sous le microscope optique. La richesse s'étalant de + à ++ la première semaine, et de ++ à ++++ la deuxième semaine, sauf que LIPA 281/11 (*Leishmania killicki*), a pris un mois approximativement pour que la croissance s'accélère.

Les parasites avaient un bon aspect, leurs tailles étaient similaires (20 à 25µm), et le flagelle de chaque parasite fait 2 fois du corps cellulaire, ça qui a permis les leishmanies de se déplacer très rapidement.

Les résultats d'observation des souches cultivées sur RPMI (les 3 premiers tubes), lors de la deuxième semaine de repiquage sont illustrés dans les figures 15.



Figure 16: Résultats d'observation de *Leishmania major* (LIPA 32/06) sous microscope optique au Gr400X après 09 jours de deuxième repiquage (sur RPMI10S).

Les résultats de la croissance des souches sur RPMI 10S sont indiqués dans le tableau 5

Tableau V: les résultats de la croissance des cinq souches sur RPMI 10% SVF

Espèce	L.major						L.infantum						L.killicki		
Souche	32/06 LC			443/13 LC			330 LC			118 LV			281/11 LC		
Tube	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Richesse	++			++			+			+			++		+
	++++			++++			+++			+++			++++		++ +
Mobilité	Lentes														
	Très rapides														

(●Semaine 1 ● semaine 2 ●semaine 3)

Cette richesse nous a permis de récolter les parasites pour faire des extractions d'ADN par la suite. Les principales contraintes de cette méthode sont les contaminants par les bactéries et/ou les champignons. La figure 16 présente une contamination à l'œil nu et sous microscope optique au Gr 400X de la souche LIPA 32/06.



Figure 17: Contamination de la souche LIPA 32/06 de *Leishmania major* cultivée au milieu de RPMI 10% SVF, observée à l'œil nu et au microscope optique au Gr 400X.

3.1.2. Résultats de la numération des parasites

La numération des parasites a été faite par la cellule de THOMA. Les résultats des parasites fixés sur cette cellule de numération sont illustrés dans la figure 17.

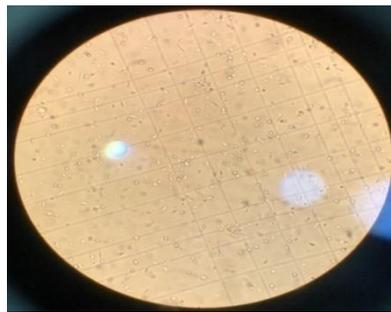


Figure 18 : Parasites fixés sur la cellule de THOMA au cours de l'opération de dénombrement de la souche LIPA330, observés sous le microscope optique au Gr400X.

À l'aide d'un compteur, nous sommes arrivés à avoir des résultats des comptages de nos 5 souches de *Leishmania*. Les valeurs les plus élevées sont motionnés dans le tableau 6. Les résultats de la numération en fonction des espèces de *Leishmania* ont montré que les résultats de comptage des deux souches de *Leishmania major* étaient proches approximativement. Les résultats de comptage de la souche 330 de *Leishmania infantum* étaient les plus élevés « $C_i = 95 \times 10^6$ ». Alors que, Les résultats de comptage de la souche 281/11 de *Leishmania killicki* étaient les plus basses « $C_i = 35 \times 10^6$ ». Ces résultats ont été obtenus après plusieurs opérations de dénombrement. Les résultats totaux sont illustrés sous forme d'un tableau dans l'annexe 1 des résultats, et sous forme d'un histogramme dans la figure 18.

Tableau VI: les résultats les plus élevés de comptages des 05 souches étudiées de *Leishmania*

Souche	LIPA 32/06	LIPA 443/13	LIPA 330	LIPA 118	LIPA 281/11
C_i	$59,2 \times 10^6$	$53,7 \times 10^6$	95×10^6	40×10^6	35×10^6

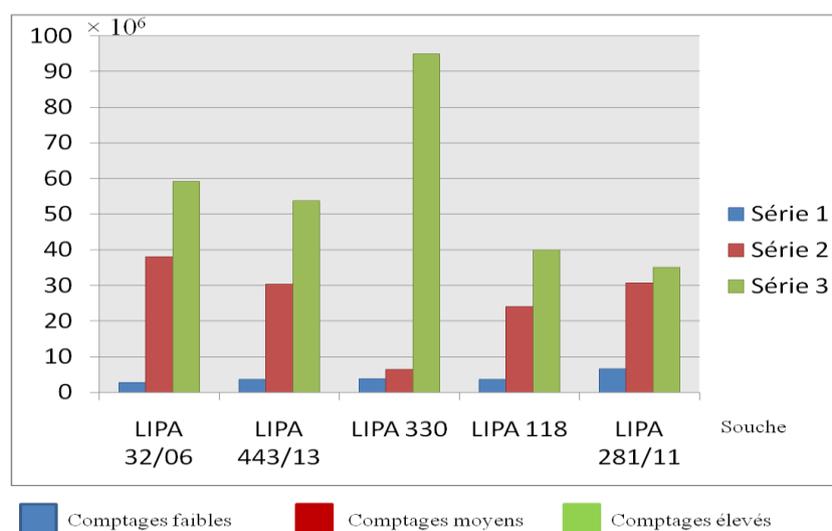


Figure 19: Histogramme des résultats totaux des opérations de dénombrements des cinq souches de *Leishmania*.

3.1.3. Résultats d'analyse d'ADN :

A partir des culots parasitaires obtenus après culture, nous avons effectué deux techniques d'extraction d'ADN. Nous avons utilisé le Kit Qiagen et la technique du phénol chloroform, sur des différentes concentrations qui s'étalent de 10^2 à 10^6 parasites/ml. Nous avons obtenu les résultats suivants :

3.1.3.1. Résultats d'électrophorèse :

L'ADN extrait de nos échantillons a été analysé qualitativement par une électrophorèse sur gel d'Agarose de 0,7%. Les fragments obtenus ont des tailles proches. La détermination précise des tailles de fragments a été faite en comparant au marqueur de poids moléculaire de 50 à 100 pb. Les figures 19,20 et 21 présentent respectivement, les résultats d'électrophorèse qualitative des ADN de différentes concentrations à partir des extractions du phénol et du kit Qiagen.

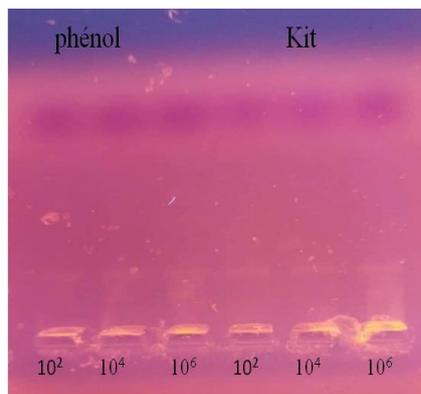


Figure 20: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7 % des produits d'extractions totales de la souche Lipa 281/11(résultats positifs).

L'ADN extrait des deux souches donne des bandes détectables sur le gel. La taille des fragments est significativement proche, entre 50 et 100 pb, et la fluorescence était légèrement apparue.

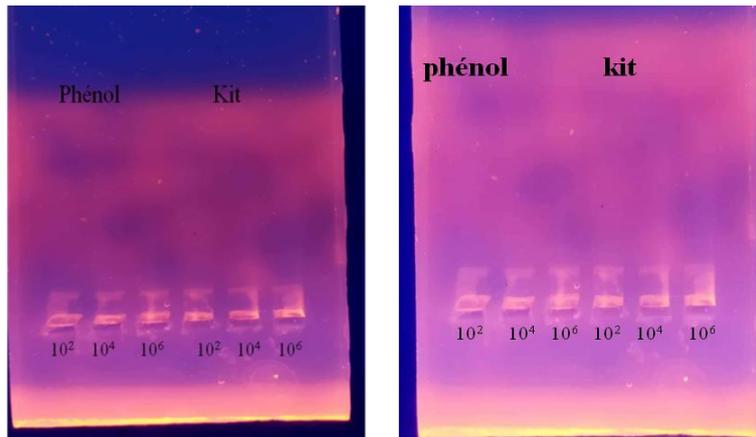


Figure 21 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'Agarose 0,7 % des produits d'extractions totales de la souche LIPA 32/06 à gauche et la LIPA 443/13 à droite (résultats positifs).

L'ADN extrait des deux souches donne des bandes détectables sur le gel, la fluorescence était légèrement apparue et la taille des fragments apparaît presque similaire.

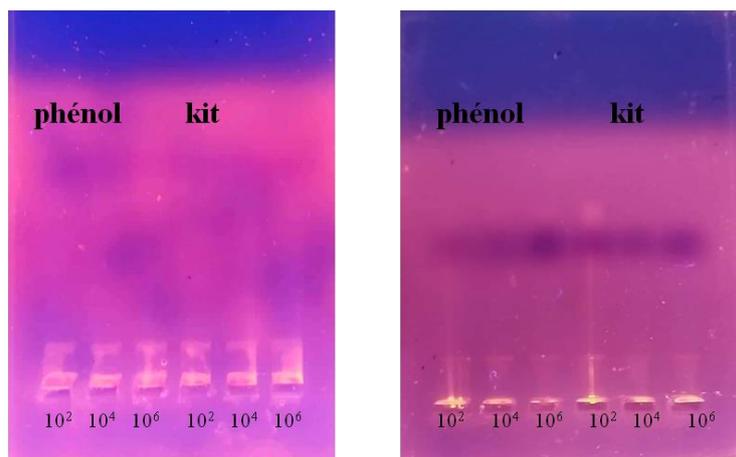


Figure 22 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7 % des produits d'extractions totales de la souche LIPA 330 à gauche et la LIPA 118 à droite (résultats positifs).

Les bandes d'ADN dans les deux souches étaient détectables, la fluorescence était légère, la taille était significativement similaire dans la même souche.

Les bandes d'ADN de la Lipa 330 étaient plus larges que d'autres souches, alors que celles de la LIPA 118 étaient minces avec la présence des smear dans puits de 10^2 parasite/ml, qui était du probablement à des contaminations lors de l'extraction ou des erreurs de pipetage.

Ces résultats apparaissent après des répétitions non probantes de 4 ou 5 expériences pour chaque souche. Dans ces dernières nous n'avons pas pu voir ni les bandes d'ADN des différentes souches qu'on a traité ni la présence de smear. Il n'y a que la présence d'une bande

d'ADN et un smear qui correspond au témoin positif T⁺. Ces résultats peuvent être dus à des erreurs durant les manipulations.

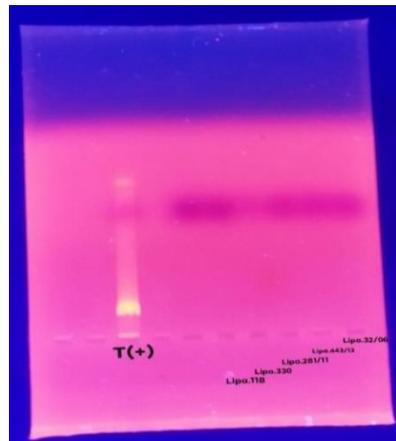


Figure 23: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% du témoin positif

3.1.3.2. Résultats des dosages optiques d'ADN sur Nanodrop

Les résultats des dosages au Nanodrop® nous ont permis de connaître la concentration d'ADN contenue dans chaque échantillon des différentes souches extrait par les deux différents protocoles (phénol-chloroform et kit Qiagen).

Les résultats s'étalant de 2,56 comme la plus faibles concentration (marqué chez la LIPA 443/13), jusqu'à 51,69 comme la concentration la plus élevée qui était marquée chez la LIPA 32/06. Ces résultats sont illustrés dans les figures 23, 24 et 25 et les tableaux détaillés sont en annexe résultats. L'analyse spectrophotométrique pour A260/280 a donné une moyenne > 1,8 pour 10 échantillons sur un total de 15 échantillons extraits par kit Qiagen. L'analyse spectrophotométrique pour A260/280 a donné une moyenne > 1,8 pour 6 échantillons sur un total de 13 échantillons extraits par phénol-chloroform. L'analyse spectrophotométrique pour A260/230 a donné une moyenne > 1,8 pour 13 échantillons sur un total de 15 échantillons extraits par kit Qiagen. L'analyse spectrophotométrique pour A260/230 a donné une moyenne > 1,8 pour 10 échantillons sur un total de 13 échantillons extraits par kit Qiagen.

Les ADN extraits à partir de nos cultures qui ont des faibles concentrations présentent des contaminations, soit protéiques, soit autres types de contaminations. Pour cela, on a pris les fortes concentrations et on a les dilués pour avoir les concentrations requises. Les résultats obtenus par la Nanodrop plus fortes concentrations sont représentés sous forme d'histogrammes dans les figures suivantes :

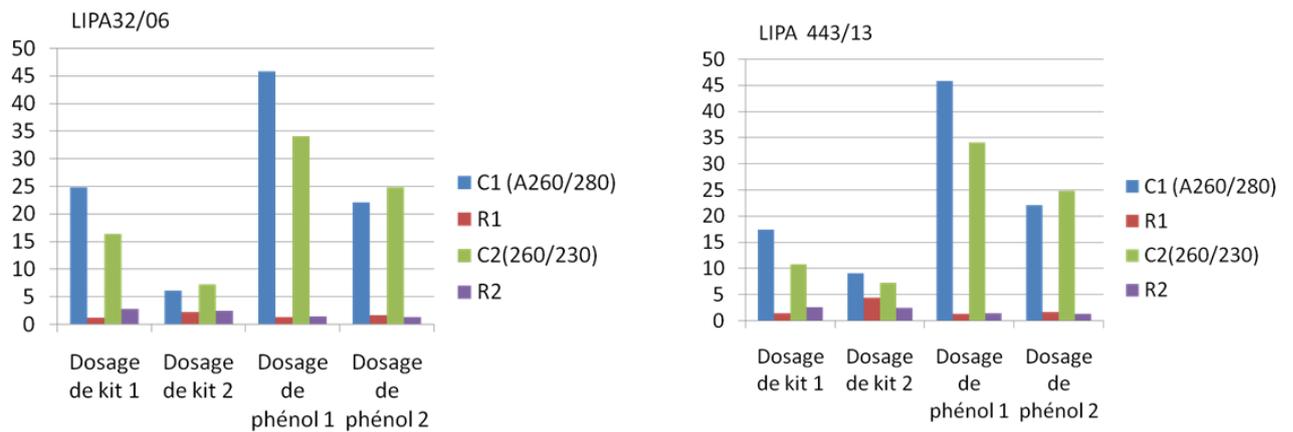


Figure 24: Résultats des quantités d'ADN les plus élevées extraites des souches de *Leishmania major* par la Nanodrop®.

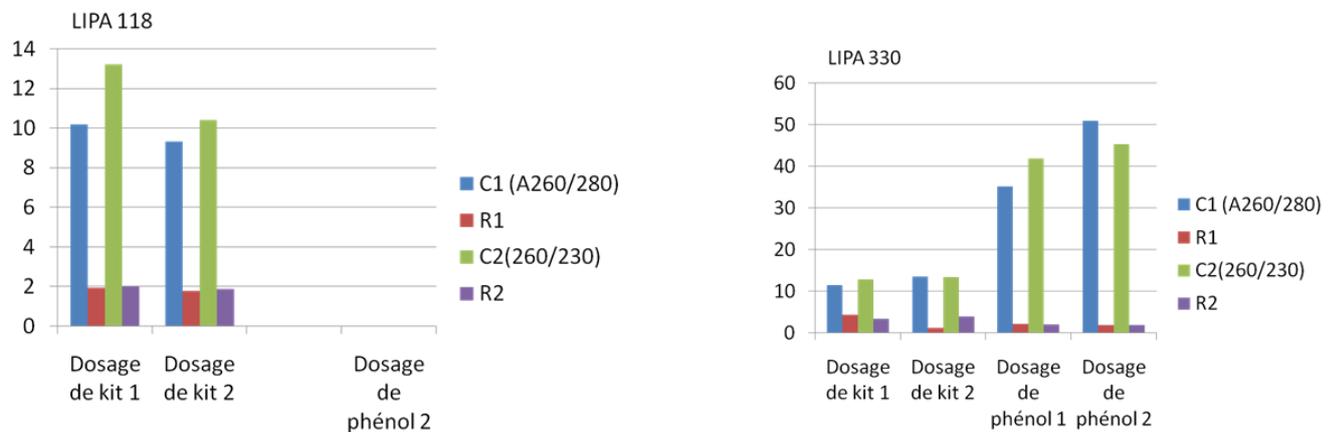


Figure 25 : Résultats des quantités d'ADN les plus élevées extraites des souches de *Leishmania infantum* par la Nanodrop®.

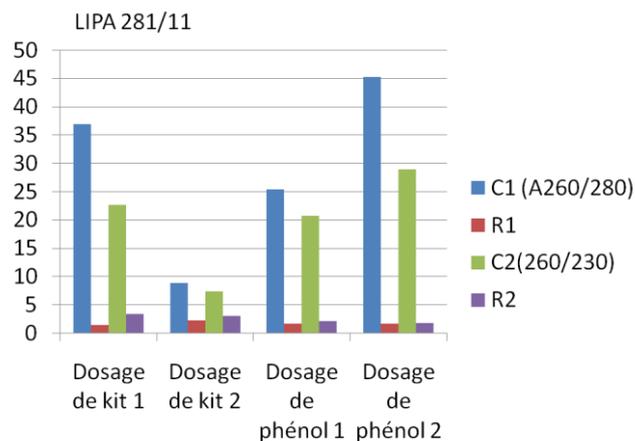


Figure 26 : Résultats des quantités d'ADN les plus élevées extraites des souches de *Leishmania killicki* par la Nanodrop®.

3.1.4. Résultats de la PCR-HRM

3.1.4.1. L'amorce 7SL-RNA :

Les résultats d'amplifications en temps réel et l'analyse de la température de fusion (T_m) en utilisant l'amorce 7SL-RNA (Forward: 5'_ACG TGG ACC AGC GAG GGT_3') et (reverse : 5'_CGG TTC CCT CGC TTC AAC_3') ont été obtenus à l'aide du logiciel Step one plus T_m , et un appareil Taqman (7500 Real Time PCR System) en utilisant le protocole de Nassereddin et Jaffe 2010. Le résultat positif donne une courbe sigmoïde indicative de l'augmentation du signal fluorescent, et le résultat négatif donne une ligne horizontale seulement, comme il est illustré dans la figure 26 :

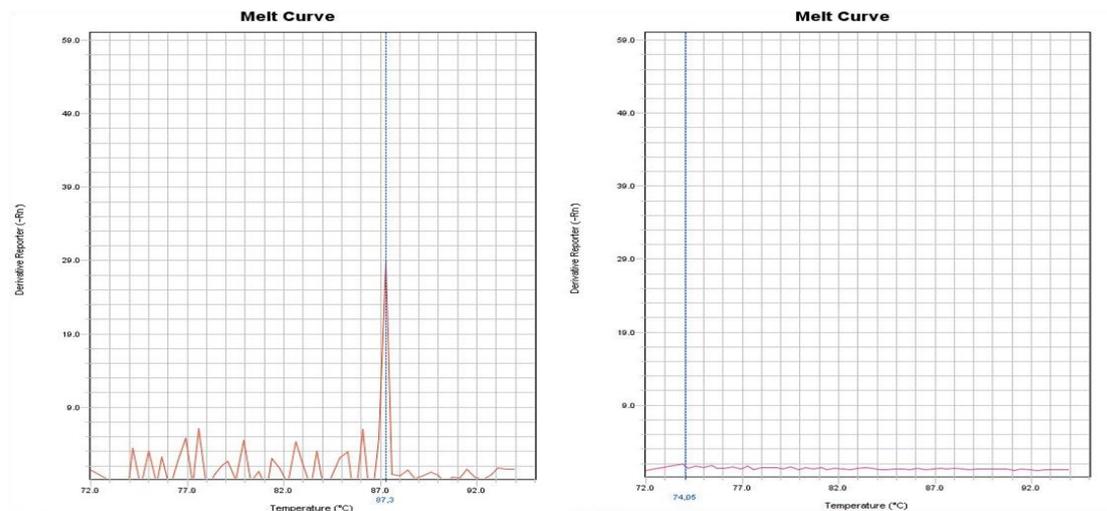


Figure 27 : courbes de la HRM d'un résultat positif et d'autre négatif.

Les résultats que nous avons obtenus représentant les différentes T_m de chaque souche avec des concentrations différentes d'ADN.

Nos résultats montrent que la HRM est arrivée à analyser des quantités d'ADN obtenues à partir de 10^2 parasites/ml allant jusqu'à 10^6 parasite/ml.

Nous avons obtenu des résultats positifs qui donnent des températures de fusion variées pour les échantillons d'ADN extraits par le phénol chloroforme, s'étalant de : $74,05^\circ\text{C}$ (LIPA 32/06) jusqu'à $74,8^\circ\text{C}$ (LIPA 281/11) pour les concentrations de 10^2 parasites/ml ; de $74,2^\circ\text{C}$ (LIPA 32/06) jusqu'à $83,7^\circ\text{C}$ (LIPA 443/13) pour les concentrations de 10^4 parasites/ml ; de $77,3^\circ\text{C}$ (LIPA 330) jusqu'à $87,1^\circ\text{C}$ (LIPA443/13) pour les concentrations de 10^6 parasites/ml.

Aussi, nous avons obtenu des résultats positifs qui donnent des températures de fusion variées pour les échantillons d'ADN extraits par le Kit Qiagen, s'étalant de : $74,05^\circ\text{C}$ (LIPA 281/11) jusqu'à $88,8^\circ\text{C}$ (LIPA 330) pour les concentrations de 10^2 parasites/ml ; de 75°C (LIPA 281/11) jusqu'à $89,8^\circ\text{C}$ (LIPA 330) pour les concentrations de 10^4 parasites/ml, de $81,1^\circ\text{C}$ (LIPA 443/13) jusqu'à 90°C (LIPA 330) pour les concentrations de 10^6 parasites/ml

Ces Tm sont illustrés dans la figure 28.

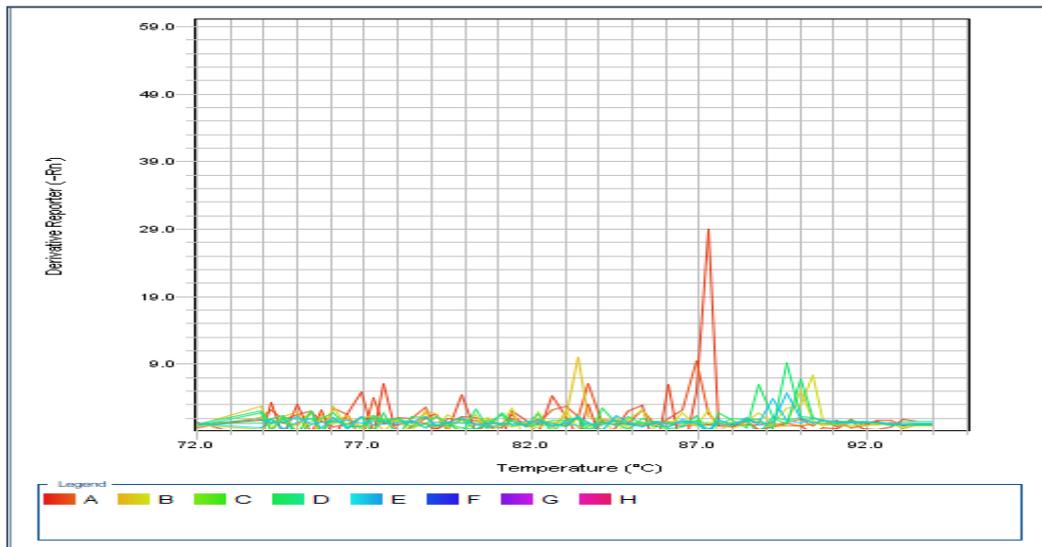


Figure 28 : les résultats généraux des courbes du Tm de *Leishmania* spp réalisé par le Taqman. (A/B: *L.major*. D/E: *L.infantum*, G/H: *L.killicki*.)

Les courbes en différentes couleurs montrent que chaque concentration de chaque espèce a sa propre température de fusion, sachant que chaque échantillon a été testé en duplicate.

Les résultats des duplicates n'étaient pas similaires. Les disparités entre les résultats des duplicates seraient dues à des erreurs de pipetages ou des contaminations lors des dépôts dans les microplaques.

Un certain nombre d'échantillons ont été réamplifié à différentes positions au cours du même cycle d'amplification, et présente plusieurs courbes qui seraient probablement dus soit au phénomène de Dye-jumping (réincorporation de colorant libéré par la fusion à un autre endroit sur l'ADN double brin), soit à des contaminations. Un exemple de ses courbes est illustré dans la figure suivante :

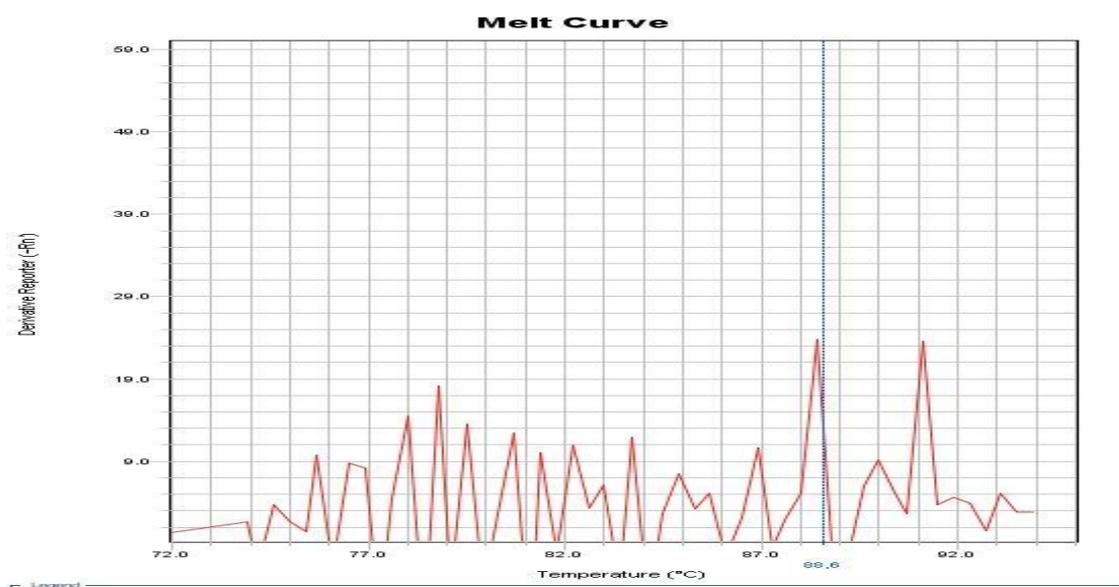


Figure 29: phénomène de Dye-jumping capté dans les résultats des Tm de LIPA 32/06.

Les résultats des Tm de la PCR-HRM de l'amorce 7SL-RNA des cinq souches de *Leishmania* qu'ils sont illustrés sous forme des courbes dans l'annexe 3 des résultats, ont montré que :

Le test PCR-HRM de 3 échantillons d'ADN extraits à partir du kit Qiagen de la LIPA 32/06 (*L. major*), sur un total de 3 échantillons était positif, avec une différence de <2°C entre les Tm des trois concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6). Ainsi que 3/3 échantillons extraits par phénol chloroform étaient positifs, avec une différence de <4°C entre les Tm des trois concentrations. Les Tm d'ADN de la LIPA 32/06 sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau VII: les températures de fusion obtenue par PCR-HRM de *L. major*LIPA32/06

Méthode d'extraction	Les températures de la fusion selon les concentrations en °C		
	10^2 parasites/ml	10^4 parasites/ml	10^6 parasites/ml
Kit Qiagen	82	83	83,55
Phénol chloroform	74,05	74,2	77,8

Le test PCR-HRM de 3 échantillons d'ADN extraits à partir du kit Qiagen de la LIPA 443/13 (*L. major*), sur un total de 3 échantillons était positif, avec une différence de <5,5°C entre les Tm des trois concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6). Ainsi que 2/2 échantillons extraits par phénol chloroform étaient positifs, avec une différence de <4°C entre les Tm des deux concentrations. Les Tm d'ADN de la LIPA 443/13 sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau VIII : les températures de fusion obtenue par PCR-HRM de la LIPA 443/13 (*L. major*)

Méthode d'extraction	Les températures de la fusion selon les concentrations en °C		
	10^2 parasites/ml	10^4 parasites/ml	10^6 parasites/ml
Kit Qiagen	75,5	80,1	81,1
Phénol chloroform	-----	83,7	87,1

Le test PCR-HRM de 3 échantillons d'ADN extraits à partir du kit Qiagen de la LIPA 330, sur un total de 3 échantillons était positif, avec une différence de <1,5°C entre les Tm des trois concentrations (10², 10⁴ et 10⁶), sachant que la courbe de la concentration 10⁶ était faible. Ainsi que 3/3 échantillons extraits par phénol chloroform étaient positifs, avec une différence de <5°C entre les Tm des trois concentrations, sachant que la courbe de la concentration 10² était faible. Les Tm d'ADN de la LIPA 330 sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau IX: les températures de fusion obtenue par le test PCR-HRM de la LIPA 330

Méthode d'extraction	Les températures de la fusion selon les concentrations en °C		
	10 ² parasites/ml	10 ⁴ parasites/ml	10 ⁶ parasites/ml
Kit Qiagen	88,8	89,8	90
Phénol chloroform	74,05	75,55	78,8

Le test PCR-HRM de 3 échantillons d'ADN extraits à partir du kit Qiagen de la LIPA 118, sur un total de 3 échantillons était positif, avec une différence de <2,5°C entre les Tm des trois concentrations (10², 10⁴ et 10⁶), sachant que la courbe de la concentration 10⁴ et 10⁶ étaient faibles. Nous ne pouvions pas faire une HRM sur les échantillons de phénol à cause de la dégradation d'ADN de ces derniers.

Tableau X: les températures de fusion obtenue par le test PCR-HRM de la LIPA 118

Méthode d'extraction	Les températures de la fusion selon les concentrations en °C		
	10 ² parasites/ml	10 ⁴ parasites/ml	10 ⁶ parasites/ml
Kit Qiagen	75,55	77,1	78

Le test PCR-HRM de 3 échantillons d'ADN extraits à partir du kit Qiagen de la LIPA 281/11, sur un total de 3 échantillons était positif, avec une différence de <10°C entre les Tm des trois concentrations (10², 10⁴ et 10⁶). Ainsi que 3/3 échantillons extraits par phénol chloroform étaient positifs, avec une différence de <3°C entre les Tm des trois concentrations. Les Tm d'ADN de la LIPA 281/11 sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau XI: les températures de fusion obtenue par le test PCR-HRM de la LIPA 281/11

Méthode d'extraction	Les températures de la fusion selon les concentrations en °C		
	10 ² parasites/ml	10 ⁴ parasites/ml	10 ⁶ parasites/ml
Kit Qiagen	74,05	75	83,7
Phénol chloroform	74,8	75	77,3

3.1.4.2. L'amorce ITS1

Le protocole appliqué sur la plaque en amorce d'ITS1 (Forward : 5'_CTG GAT CAT TTT CCG ATG_3') et (reverse : 5'_TGA CCA CTT ATC GCA CTT_3') en utilisant le Taqman ne nous a pas permis d'avoir des résultats. Les conditions expérimentales décrites dans le protocole de **Hernandez 2014** n'ont pas fonctionné avec le Taqman. Ce qui nous a poussés à faire une étude *in silico* pour arriver aux conditions optimales d'identification des différentes espèces de *Leishmania*.

3.1.5. Résultats de sélection et évaluation *in silico* des amorces spécifiques de *Leishmania* spp

Après avoir réglé les paramètres de la PCR électronique, motionnés dans le chapitre précédent, nous avons obtenus 10 rapports préliminaires détaillés de chaque espèce, contenant 10 amorces de chaque gène ciblé. Nous avons sélectionné celles dont le pourcentage en CG est supérieur à 60%. De plus, nous avons obtenus les vues graphiques des parties de ces amorces, l'une de ces vue est illustrée dans la figure suivante :

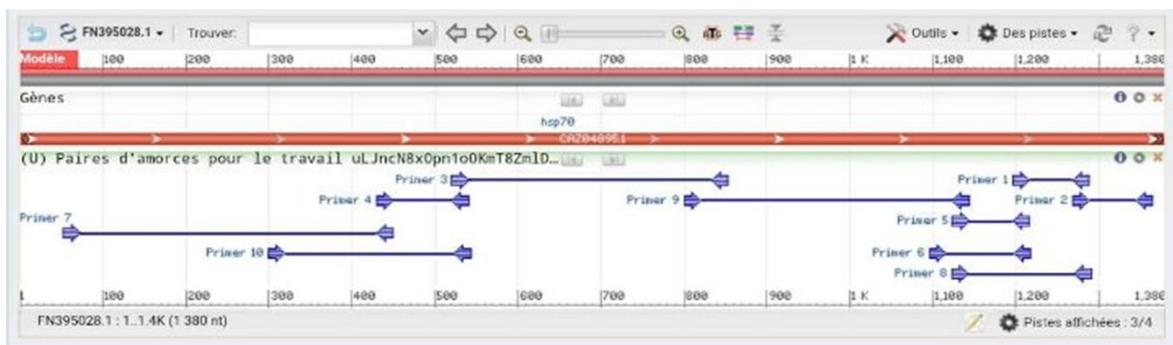


Figure 30 : la vue graphique de gène Hsp70 de *Leishmania donovani* (syn : *infantum*) obtenue par Primer-BLAST

Entres les amorces fiables dans la discrimination de *Leishmania* spp, le gène ITS a une conservation suffisamment élevée pour être une cible PCR de *Leishmania*, mais son polymorphisme reste le plus idéale pour le typage des espèces de *Leishmania*.

Les histogrammes suivants présentent les résultats des températures de fusion des trois espèces de *Leishmania* étudiés ciblant les amorces ITS1, Gp63, Hsp70, Hsp20 et 7SL-RNA :

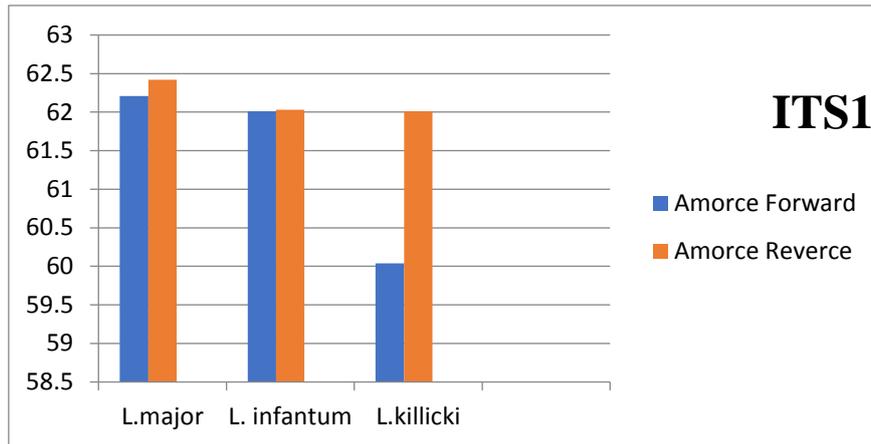


Figure 31 : résultats des Tm ciblant l'amorce ITS1 de *Leishmania* spp

Les Tm de la deuxième amorce de chaque espèce sont les suivants :

61,77°C pour l'amorce Forward, et 62,46°C pour l'amorce reverse (*L.major*).

61,69 °C pour l'amorce Forward, et 62,64 °C pour l'amorce reverse (*L.infantum*).

61,89°C pour l'amorce Forward, et 62,24°C pour l'amorce reverse (*L.killicki*).

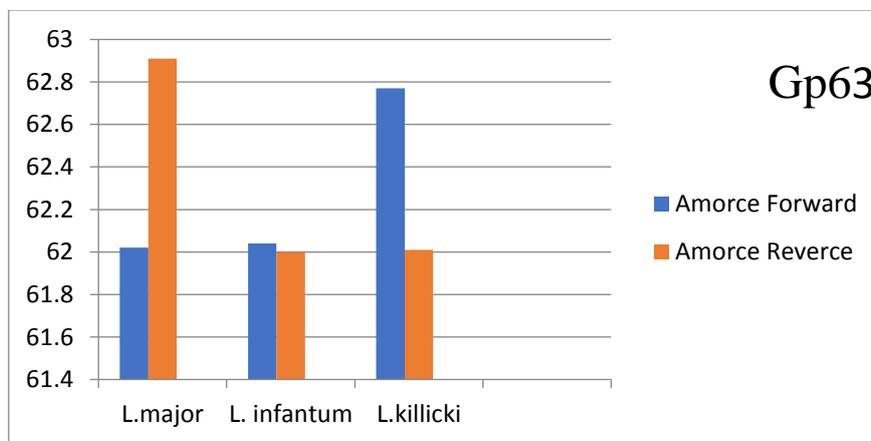


Figure 32: résultats des Tm ciblant l'amorce Gp63 de *Leishmania* spp

Les Tm de la deuxième amorce de chaque espèce sont les suivants :

61,96°C pour l'amorce Forward, et 62,03 °C pour l'amorce reverse (*L.major*).

61,91 °C pour l'amorce Forward, et 61,88 °C pour l'amorce reverse (*L.infantum*).

62,21°C pour l'amorce Forward, et 61,91°C pour l'amorce reverse (*L.killicki*).

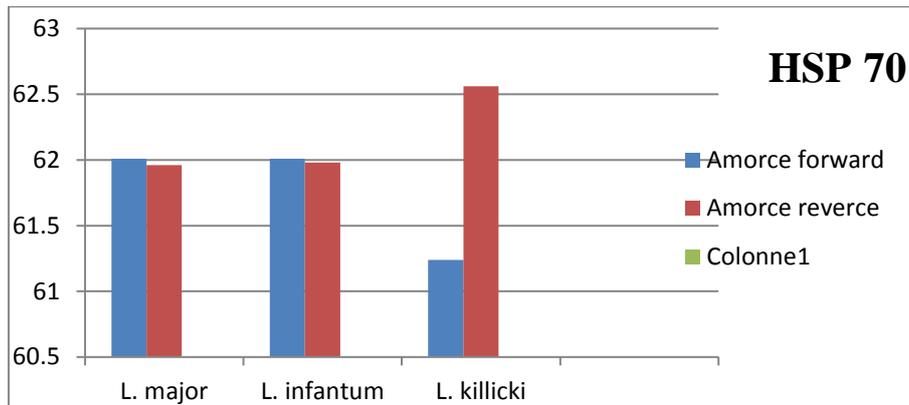


Figure 33 : résultats des Tm ciblant l'amorce Hsp70 de *Leishmania* spp

Les Tm de la deuxième amorce de chaque espèce sont les suivants :

61,89°C pour l'amorce Forward, et 62,01°C pour l'amorce reverse (*L.major*).

61,98°C pour l'amorce Forward, et 62,02°C pour l'amorce reverse (*L.infantum*).

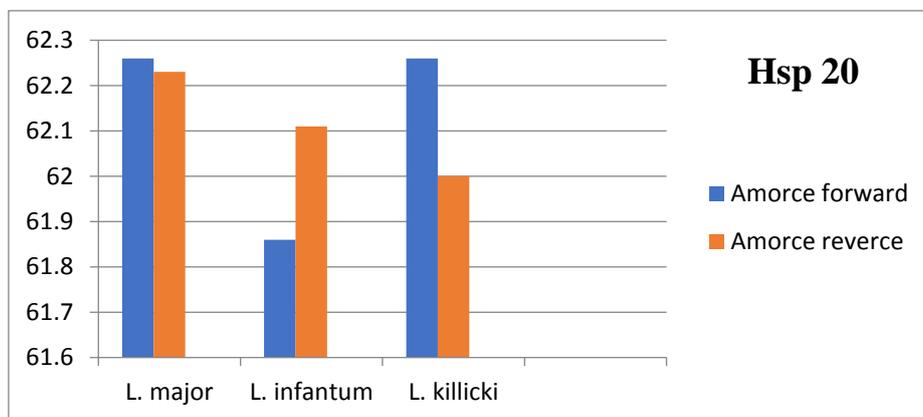


Figure 34: résultats des Tm ciblant l'amorce Hsp20 de *Leishmania* spp

Les Tm de la deuxième amorce de chaque espèce sont les suivants :

62,26°C pour l'amorce Forward, et 62,52°C pour l'amorce reverse (*L.major*).

62,26°C pour l'amorce Forward, et 61,83°C pour l'amorce reverse (*L.infantum*).

61,55°C pour l'amorce Forward, et 62,13°C pour l'amorce reverse (*L.killicki*).

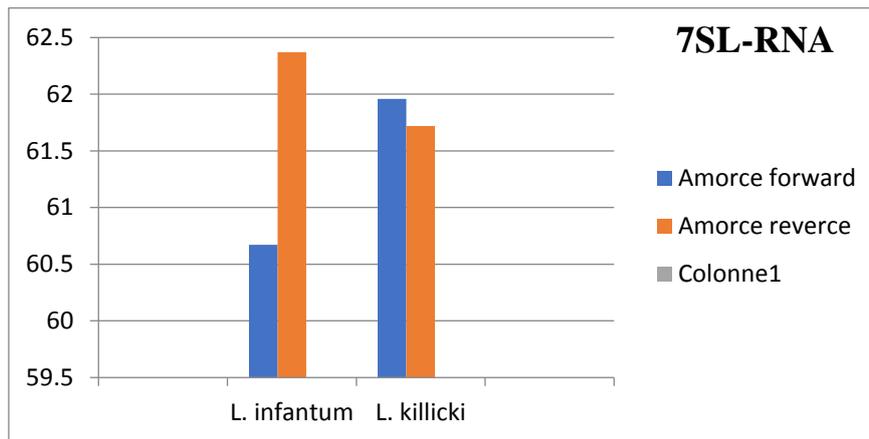


Figure 35 : résultats des Tm ciblant l'amorce 7SL-RNA de *Leishmania* spp

Les Tm de la deuxième amorce de chaque espèce sont les suivants :

61,89°C pour l'amorce Forward, et 62,71°C pour l'amorce reverse (*L.infantum*).

61,97°C pour l'amorce Forward, et 61,95°C pour l'amorce reverse (*L.killicki*).

Les températures de fusion obtenues s'étalant de 60,04°C marquée chez *Leishmania killicki* ciblant l'amorce ITS1, jusqu'à 62,77°C marquée chez *Leishmania killicki* ciblant l'amorce Gp63. Les résultats totaux des Tm sont indiqués dans l'annexe 4 de résultats.



Discussion :

L'objectif de notre étude est de faire, d'une part une étude *in vitro* qui a pour but l'évaluation de la spécificité et de la sensibilité de la PCR-HRM dans la discrimination et la détection des trois espèces de *Leishmania*. Et d'autre part le développement d'une étude *in silico* pour identifier d'autres amorces pour arriver aux conditions optimales d'identification des espèces de *Leishmania*, en utilisant un site à la base de la bio-informatique NCBI Primer Blast.

Parmi les espèces existant en Algérie, nous avons travaillé sur cinq souches qui sont : LIPA32/06, LIPA443/13 pour l'espèce *L. major*, LIPA281/11 pour *L. killicki* et LIPA330, LIPA118 pour *L. infantum*, responsables respectivement de la LC et la LV. Les échantillons des différentes souches ont été cultivés sur différents milieux d'enrichissement tel que NNN, RPMI 10S et le sérum de lapin pendant une période de un à deux mois. Cette période dépend de la richesse, de la mobilité, de l'aspect et ainsi que du risque de contamination. Les souches viscérotropes étaient difficiles à cultiver à cause de leur cinétique qui était lente. Cela pour arriver à la concentration parasitaire voulu qui était au minimum 10^6 parasites/ml.

Dans notre présente étude, deux techniques d'extraction d'ADN ont été utilisées. La première est une méthode basée sur des solvants organiques qui sont le phénol et le chloroforme. Et la deuxième méthode qui est basé sur l'utilisation des micro-colonnes d'un kit commercial qui est le kit Qiagen®. Ces deux techniques ont été comparées en fonction de la qualité et de la quantité d'ADN obtenu. L'objectif en utilisant ces deux techniques d'extraction était de purifier l'ADN afin d'obtenir une meilleure qualité et quantité d'ADN de *Leishmania* à partir des cinq souches des trois espèces, *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum* avec des concentrations différents (10^2 , 10^4 et 10^6 parasite/ml).

Cette pureté a été confirmée et comparée par rapport aux résultats d'électrophorèse sur gel d'Agarose pour avoir la qualité d'ADN extrait, aussi par rapport aux résultats des dosages qui mesure quantitativement la concentration de l'ADN extrait en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop™.

Les résultats des dosages par le NanoDrop™ ont été positifs, l'obtention des concentrations importantes par rapport aux hautes concentrations (51.69 ng) ou faibles par rapport aux faibles concentrations (2,56 ng). Cela n'a pas empêché l'obtention de résultats négatifs. Nous supposons que c'est peut être due à la présence des contaminations au cours de la purification d'ADN surtout par le phénol-chloroforme avec un risque de mauvaise séparation entre les protéines et l'ADN parasitaire.

Donc nos résultats de comparaison avec les deux protocoles d'extraction par phénol-chloroforme et kit Qiagen® qui ont été confirmé qualitativement et quantitativement par deux méthodes l'une basée sur l'électrophorèse sur gel d'Agarose et l'autre sur le dosage montre que les résultats étaient généralement compatibles. Ces résultats rejoignent ceux de **Da Silva et ses collaborateurs (2014)**, qui ont montré que sur quatre protocoles d'extraction étudiés seules les extractions avec le kit Qiagen® et avec le phénol-chloroforme, ont fourni de bons résultats avec une limite de détection de 0,1 pg d'ADN dans l'extraction d'ADN de *Leishmania infantum*.

Dans notre étude, par la suite nous avons utilisé la PCR-HRM, qui est une PCR en temps réel couplée à un test HRM, basé sur le colorant Syber Green à l'aide d'un appareil Taq-Man

(7500 Real Time Step One) et un logiciel Step One Plus™ pour la discrimination et l'identification des différents espèces de *Leishmania* qu'on a étudié, à savoir *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum*. Deux séquences de gènes ont été ciblées dans notre étude, la première amorce ciblant une région conservé codant pour la sous-unité d'ARN-7SL (**Nasereddin et Jaffe, 2010**) et la deuxième amorce utilisée est Internal-transcribed-spacer 1 (ITS1) ciblant une région codant pour L'ARN ribosomique. (**Afshar et al, 2014**). Ces dernières années, nous avons constaté un développement rapide de la technologie, une révolution s'est produite dans le domaine et les techniques de diagnostic moléculaire des maladies. Parallèlement aux avancées technologiques, les approches de diagnostic moléculaire sont devenues plus fiables et plus sensibles tel que la PCR-HRM. L'analyse de fusion à haute résolution (PCR-HRM) est une technique moléculaire analytique automatisée qui mesure le taux de dissociation de l'ADN double brin en ADN simple brin avec l'augmentation de la température. Cette dissociation est surveillée en incluant un colorant fluorescent dans la réaction de PCR qui s'intercale de manière homogène dans l'ADN et ne devient fluorescent que lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Le changement de fluorescence mesure la dissociation de l'ADN induite thermiquement par HRM et le comportement de fusion observé est caractéristique du produit d'ADN particulier tel que déterminé en fonction de la longueur de la séquence, de la teneur en GC, de la complémentarité et de la thermodynamique du plus proche voisin. (**Nasereddin et Jaffe, 2010**)

Les résultats de l'analyse qui a été réalisé avec l'amorce ARN-7SL de l'ADN extrait des échantillons de nos cinq souches par le phénol-chloroforme et par le kit qiagen montrent que le choix de l'utilisation de cette amorce dans notre technique, nous a donné des résultats bien précis. Plusieurs études ont été faites par l'utilisation de cette amorce, parmi eux l'étude de **Nasereddin et Jaffe, (2010)**. Montrant une discrimination réussite entre trois espèces de *Leishmania* : *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* ont été rapportée à l'aide du test 7SL RNA-HRM.

Ainsi qu'une autre étude de **Namazi et ses coll., (2021)** qui ont abouti à des résultats similaires aux nôtres. Montrant que La réalisation de la PCR-HRM avec le gène ARN-7SL s'est manifestement avérée être une application réussie dans les études éco-épidémiologiques pour distinguer les espèces de parasites dans différents complexes du genre *Leishmania*.

Nous avons utilisé un ADN extrait des trois espèces de *Leishmania* avec des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6 parasites/ml) pour évaluer la sensibilité de cette méthode de PCR-HRM par rapport aux faibles concentrations parasitaires. Nos résultats indiquent que notre technique a pu discriminer des échantillons de faibles concentrations de 10^2 parasites/ml. Tandis que la PCR-HRM a donné des différentes courbes de fusion possédant des différentes températures de fusion (T_m) s'étalant de $74,05^\circ\text{C}$ à 90°C pour les différents espèces et les différents concentrations d'ADN de *Leishmania*.

Nôtres résultats concordent avec ceux d'une étude récemment faite en **2022** en **Tunisie**, par **Derghal et ses coll.**, montrant des différentes courbes de fusion permettant de discriminer les trois espèces de *Leishmania* présentes en Tunisie, ainsi que la sensibilité de l'outil PCR-HRM HSP70 qui a atteint 0,1 pg d'ADN de *Leishmania* , équivalent à un parasite dans toutes les

espèces testées, tandis que la PCR-HRM 7RNA-SL a permis de détecter des quantités différentes d'ADN pour les trois espèces.

En outre, diverses quantités d'ADN, allant de 50 pg à 500 fg, représentant la limite de détection, ont également été trouvées dans une étude récente où la PCR-HRM ciblant le gène de la perméase d'acide aminé 3 (*aap3*) a été testée sur différentes espèces de *Leishmania* de l'Ancien Monde et le Nouveau Monde (Müller KE *et al*, 2018).

Nos résultats concernant le temps et la durée de déroulement de cette technique ont montré que notre technique PCR-HRM est rapide. Elle n'a en fait duré que deux heures de temps seulement. En 2019, Asfaram et coll., ont confirmé nos résultats. Trois techniques, y compris l'examen microscopique, la PCR conventionnelle et la fusion à haute résolution (HRM)-PCR, ont été évaluées pour trouver le test le plus précis et le plus rapide. Leurs résultats ont montré que la technique HRM-PCR est le test le plus précis et le plus sensible pour identifier les cas de leishmaniose cutanée, et également un test alternatif précieux à la PCR conventionnelle pour détecter diverses espèces.

Par ailleurs, une autre étude a été faite par Abadi, (2021), a prouvé nos résultats en confirmant que le test PCR-HRM est suffisamment sensible et approprié pour dépister les mutations du gène MDR1. De plus, la rapidité, la simplicité, la faisabilité et la rentabilité sont d'autres avantages qui soutiennent l'utilisation de la PCR-HRM pour détecter les mutations.

Dans notre présente expérience, une autre analyse a été réalisé avec une deuxième amorce qui est l'ITS1 par l'appareil Taq-Man en modifiant le protocole et les paramètres d'utilisation, cela ne nous a pas permis d'avoir des résultats en raison de l'inadéquation des conditions expérimentale sur le Taq-Man pour l'ITS1.

Ce qui nous a poussés à poursuivre et améliorer notre travail par une étude *in silico* pour arriver aux conditions optimales d'identification des différentes espèces de *Leishmania*, à l'aide de la plateforme de conception d'amorces en ligne du NCBI (International Center for Biotechnology Information). Cette plateforme reçoit des amorces PCR à l'aide du système Primer 3 et vérifie simultanément la probabilité que les amorces se lient à des régions non spécifiques du génome des espèces de *Leishmania* étudiés via l'algorithme BLAST. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Les gènes ciblés dans cette étude étaient les suivants : Internal Transcribed Spacer 1 et 2 (ITS1 et ITS2), Spliced LeaderRNA (7SL-RNA), Major Surface Protease (Gp63), Heat Shock Protein 20 et 70 (Hsp20 et Hsp70). Sur l'ensemble des amorces obtenues, nous n'avons sélectionné que celles dont le pourcentage en CG était supérieur à 60%, Avec la modification de plusieurs paramètres de réaction pour chaque amorce.

Les résultats de cette étude concernant la teneur en CG qui a été supérieur à 60%, cela permet une meilleure sensibilité car plus le pourcentage de CG est élevé, plus le protocole choisi est stable. Nos résultats ont montré aussi que les températures de fusion différentes entre les espèces de *Leishmania*, s'étalant de 60,04°C marquée chez *Leishmania killicki* en ciblant l'amorce ITS1, jusqu'à 62,77°C marquée chez *Leishmania killicki* en ciblant l'amorce Gp63.

Des études antérieures ont évalué des études *in silico* similaires à la notre pour une différenciation moléculaire des différentes espèces de *Leishmania*, tel que l'étude de **Trigo et coll., (2021)**, qui ont fait une évaluation *in silico* et *in vitro* d'amorces pour la différenciation moléculaire des espèces de *Leishmania*. Leurs résultats montrent que cette évaluation a permis d'identifier rapidement de nombreuses amorces avec la spécificité souhaitée. Néanmoins, par rapport au temps et aux ressources nécessaires pour tester l'ensemble complet d'amorces *in vitro*, la nouvelle approche proposée ici augmente considérablement l'efficacité de la conception des amorces candidates, même si des amorces faussement positives et faussement négatives peuvent occasionnellement se produire.



Conclusion :

Selon l'OMS en 2022, les leishmanioses se manifestent sous trois formes cliniques variées qui peuvent entraîner des issues mortelles, et sont contractées dans 92 pays y compris l'Algérie.

L'endémicité de cette maladie a entraîné une forte demande de diagnostic aux laboratoires de cette affection. Pour cela, l'objectif de ce travail était de détecter et identifier les espèces de *Leishmania* circulantes en Algérie, par une technique non classique qui est la PCR-HRM, et d'évaluer sa sensibilité et spécificité à partir des différentes souches disponibles au laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations, au sein de l'Institut Pasteur à Dely-Brahim-Alger

Pour arriver à ça, deux types d'extractions, par Kit Qiagen® et par le Phénol chloroforme ont été utilisées, à partir des cultures parasitaires es cinq souches de *Leishmania*. Le choix entre ces deux techniques dépend d'un certain nombre de facteurs tel que le type d'échantillon, la quantité de départ, la simplicité et le coût. Dans l'ensemble, On peut conclure que chacune des méthodes d'extraction utilisée dans notre étude y a compris le phénol-chloroforme et le kit Qiagen®, 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 parasite en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser notre PCR-HRM.

La présente étude *in vitro* a établi que les trois espèces communes de *Leishmania* en Algérie, *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum*, pouvaient être discriminées facilement et distinctement avec l'analyse PCR-HRM à partir des échantillons d'ADN parasite. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle est rapide (<2heures) par rapport aux autres techniques classiques tel que la MLEE ou la PCR-RFLP, plus simple, peu coûteuse, très sensible car elle peut détecter même les faibles concentrations, et est facilement automatisable.

Cette méthode PCR-HRM est un outil robuste et fiable pour la détection moléculaire et l'identification de *Leishmania* et peut être facilement mise en œuvre dans les enquêtes épidémiologiques dans les régions endémiques.

De plus, l'étude *in silico* nous a permis d'obtenir de meilleures conditions optimales pour la discrimination des trois espèces de *Leishmania* grâce à des températures de fusion différentes qui différencie chaque espèce de *Leishmania*.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail ouvre plusieurs perspectives de recherche :

- Choisir judicieusement la méthode d'extraction d'ADN car elle est capitale pour avoir de bons résultats.
- Designer les amorces et les tester avant les utiliser pour permettre de mettre au point une PCR-HRM beaucoup plus spécifique et sensible.
- L'utilisation d'autres intercalants fluorescents plus sensible que le Cyber-Green, car avec ce dernier il y a un risque de phénomène de dye-jumping.
- Utiliser d'autres marqueurs de *Leishmania* plus idéal tel que la HSP70, la GP63.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Abbasi, I., Nasereddin, A., & Warburg, A.** (2019). Development of a next generation DNA sequencing-based multi detection assay for detecting and identifying Leishmania parasites, blood sources, plant meals and intestinal microbiome in phlebotomine sand flies. *Acta tropica*, 199, 105101.
- **Abadi, M., Moradabadi, A., Vahidi, R., Shojaepour, S., Rostami, S., Rad, I., & Dabiri, S.** (2021). High resolution melting analysis and detection of Leishmania resistance: the role of multi drug resistance 1 gene. *Genes and environment : the official journal of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 43(1), 36.
- **Adel, A., Boughoufalah, A., Saegerman, C., De Deken, R., Bouchene, Z., Soukehal, A., Berkvens, D., & Boelaert, M.** (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria : an update. *PloS one*, 9(6), e99207.
- **Andrew P.Jackson, Thomas D.Otto , Martin Aslet , Stuart D.Armstrong , Frédéric Bringaud , Alexandre Schlacht , Catherine Hartley , Mandy Ponceuses , Jonathan M. Wastling , Joel B.Dacks , Alvaro Acosta-Serrano , Marque C. Champ , Michael L. Gingembre , Matthieu Berriman.** (2016). Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. *Curr Biol*. 26(2) :161-172.
- **Asfaram, S., Fakhar, M., & Teshnizi, S. H.** (2019). Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis ? A systematic review with meta-analysis. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 25, e20190012.
- **Associationn Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL).** (2014). Leishmaniose. Université Médicale Virtuelle Francophone.
- **Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D.** (2017). Leishmania infections : Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1–29.
- **Bachi. F.** (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'infectiologue. La Lettre de l'Infectiologue .* (21) :9–1.
- **Bachi, F., Icheboudene, K., Benzitouni, A., Taharboucht, Z., & Zemmouri, M.** (2019). Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Algérie à travers la caractérisation moléculaire [Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Algeria through Molecular Characterization]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 112(3), 147–152.
- **Belaz, S.** (2017). Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose : caractérisation des effets et mode d'action. Thèse de doctorat. Département de biologie et sciences de la Santé. UNIVERSITÉ DE RENNES 1, Sous le sceau de l'Université Bretagne Loire.
- **Belazzoug, S., Ammar-Khodja, A., Belkaid, M., & Tabet-Derraz, O.** (1985). La leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales* , 78 (5), 615–622.

- **Boudrissa, A., Cherif, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Bouiba, L., Boubidi, S. C., Benikhlef, R., Arrar, L., Hamrioui, B., & Harrat, Z.** (2012). Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie [Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990), 105(1), 30–35.
- **Chomarar, M et Breysse, F.** (2011). Applications of High Resolution Melting analysis in infectious diseases. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 26(4) : 207-211.
- **Chomczynski, P., & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156–159.
- **Damasceno, J. D., Reis-Cunha, J., Crouch, K., Beraldi, D., Lapsley, C., Tosi, L., Bartholomeu, D., & McCulloch, R.** (2020). Conditional knockout of RAD51-related genes in *Leishmania major* reveals a critical role for homologous recombination during genome replication. *PloS genetics*, 16(7), e1008828.
- **Dedet JP.** (2008). Leishmanioses cutanées. In : *Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques*. Springer, Paris. Pp 199–217.
- **Derghal, M., Tebai, A., Balti, G., Souguir-Omrani, H., Chemkhi, J., Rhim, A., Bouattour, A., Guizani, I., M'Ghirbi, Y., & Guerbouj, S.** (2022). High-resolution melting analysis identifies reservoir hosts of zoonotic *Leishmania* parasites in Tunisia. *Parasites & vectors*, 15(1), 12.
- **Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D.** (2016). Infections à *Leishmania* : cibles moléculaires et diagnostic. *Mol Aspects*. S0098-2997(16)30045-0.
- **Dufresne, S. D., Belloni, D. R., Wells, W. A., & Tsongalis, G. J.** (2006). BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melt curve analysis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(2), 185–187.
- **Eddaikra, N., Ait-Oudhia, K., Kherrachi, I., Oury, B., Moulti-Mati, F., Benikhlef R., Harrat, Z et Sereno, D.** (2018). Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(3) : e0006310.
- **Espada, C. R., Ortiz, P. A., Shaw, J. J., Barral, A., Costa, J., Uliana, S., & Coelho, A. C.** (2018). Identification of *Leishmania* (*Viannia*) species and clinical isolates of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 91(4), 312–318.
- **Feliciangeli MD.** (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 18(1) : 71-80.
- **HADDAD, M., Hossein, F., GHASEMI, E., MARAGHI, S., TAVALA, M.**(2016). Identification of *Leishmania* Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniasis in Mehran, Western Iran Using Nested PCR. *Iranian Journal of Parasitology*. 11(1) : 65–72.
- **Harrat, Z., Boubidi, S. C., Pratlong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J. P., Ravel, C., & Belkaid, M.** (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki*

(Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 716–720.

- **Hechmi, L., Karim A., Gerald, F., Dhafer, L., Eric, P., Kathleen, V et Aïda, B.** (2013). Les leishmanioses vues au travers du réseau international des Instituts Pasteur. *Med & Sci (Paris)*. 29 : 1151–1160.
- **Hernández, C., Alvarez, C., González, C., Ayala, M. S., León, C. M., & Ramírez, J. D.** (2014). Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & vectors*, 7, 501.
- **Hosseini-Safa, A., Mohebali, M., Hajjaran, H., Akhoundi, B., Zarei, Z., Arzamani, K., & Davari, A.** (2018). High resolution melting analysis as an accurate method for identifying *Leishmania infantum* in canine serum samples. *Journal of vector borne diseases*, 55(4), 315–320.
- **Morvan J.** (2020). La leishmaniose cutanée est en augmentation en Algérie. *Médecine des voyages*.
- **Kazemi B.** (2011). Organization of *Leishmania* Species. *Biology Iranian Journal of Parasitology*. 6(3) : 1-18.
- **Kermanjani, A., Akhlaghi, L., Oormazdi, H., & Hadighi, R.** (2017). Isolation and identification of cutaneous leishmaniasis species by PCR-RFLP in Ilam province, the west of Iran. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 41(1), 175–179.
- **Kuhls, K., Mauricio, I. L., Pratlong, F., Presber, W., & Schönian, G.** (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and infection*, 7(11-12), 1224–1234.
- **Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L.** (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*. 27(2), 123–147.
- **Mokni M.** (2019). Leishmanioses cutanées [Cutaneous leishmaniasis]. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 146(3), 232–246.
- **Mohammadi, M. A., Bamorovat, M., Fasihi Harandi, M., Karimi, T., Sharifi, I., & Aflatoonian, M. R.** (2017). Comparison of Three PCR-based Methods for Simplicity and Cost Effectiveness Identification of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania tropica*. *Iranian journal of parasitology*, 12(2), 215–223.
- **Müller, K.E., Zampieri, R.A., Aoki, J.I. Sandra Marcia Muxel., Audun Helge Nerland., Lucile Maria Floeter-Winter.** (2018). Amino acid permease 3 (aap3) coding sequence as a target for *Leishmania* identification and diagnosis of leishmaniasis using high resolution melting analysis. *Parasites Vectors*. 11, 42.
- **Namazi, M. J., Javaheri, E., Atabati, H., & Mojadadi, M. S.** (2021). Identification of *Leishmania* species by high-resolution melting analysis in newly emerged foci in Sabzevar, northeast of Iran. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 45(1), 191–196.
- **Ortalli, M., Lorrain, D., Gaibani, P., Rossini, G., Vocale, C., Re, M. C., & Varani, S.** (2020). Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Northeastern Italy: Evaluation of Seven Serological Tests. *Microorganisms*, 8(12), 1847.

- **Opperdoes, F., Butenko, A., Flegontov, P., Yurchenko, V., Lukeš, J.** (2016). Comparative metabolism of free-living Bodo saltans and parasitic trypanosomatids. *J. Euk. Microbiol.* 63(5) : 657-678.
- **Pace D.** (2014). Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10–S18.
- **Pearson R. D.** (2020). MD of Virginia School of Medicine. Leishmaniose. Virginia.
- **Pratlong, F., Dereure, J., Christophe, R., Patrick L., Yves, B., Ghislaine, S., Geneviève, L., Jean-Antoine, R., Dedet, J.** (2009). Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Tropical Medicine & International Health.* 14(9) : 1071-1085.
- **Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M.** (2014). Genomic Confirmation of Hybridisation and Recent Inbreeding in a Vector-Isolated Leishmania Population. *PLOS Genetics* 10(1) : e1004092.
- **Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Maia-Elkhoury, A. M. A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Yajima, A., & Gasimov, E.** (2021). Global leishmaniasis surveillance : 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose : 2019-2020, une periode de reference pour la feuille de route a l’horizon 2030. *Weekly Epidemiological Record*, 96(35), 401.
- **Silva, M. A., Medeiros, Z., Soares, C. R., Silva, E. D., Miranda-Filho, D. B., & Melo, F. L.** (2014). A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), 193–197.
- **Schönian, G., Schnur, L., el Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., Sokolowska-Köhler, W., & Presber, W.** (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 217–224.
- **Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W., & Jaffe, C. L.** (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(1), 349–358.
- **Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., & Singh, S.** (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 9(1), 277.
- **Talmi-Frank, D., Nasereddin, A., Schnur, L. F., Schönian, G., Töz, S. O., Jaffe, C. L., & Baneth, G.** (2010). Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(1), e581.
- **Shivani, T., Jyoti, J., Kaur, K.** (2020). Leishmaniasis diagnosis : an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Parasit Dis.* 44(2) : 253–272.
- **Trigo BB, Oliveira-Rovai FM, Milanesi M, Ito PKRK, Utsunomiya YT, Lopes FL, Paulan CS, Nunes CM.** (2021). In silico and in vitro evaluation of primers for molecular differentiation of *Leishmania* species. *Braz J Vet Parasitol.* 30(1) : e022020.
- **World Health Organization (WHO).** (2022). Leishmaniasis.

- **World Health Organization (WHO).** (2020). Leishmaniasis.
- **Wolff Bernard J., W. Lanier Thacker, Stephanie B. Schwartz, and Jonas M. Winchell.** (2008). Detection of Macrolide Resistance in Mycoplasma pneumoniae by Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. Antimicrob Agents Chemother. 52(10) : 3542–3549.
- **Ziada-Bouchaar, H M.** (2019-2020). Techniques d'analyses de de biologie moléculaire. Université frère mentouri. Constantine.

Webographie

- www.shutterstock.com
- www.medicinus.com
- www.docplayer.com
- <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Leishmaniose.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>



Les annexes

Annexes matériel et méthodes

Annexe 1 : Appareillage et réactifs d'extraction

1. Appareillage :

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage qui est mentionné dans les lignes suivantes : Microscope optique (Motic), centrifuge (Eppendorf), centrifuge réfrigérée (Sigma), vortex(Techno Kartell), bain-marie (Mettler), hotte à flux lumineuse (Captair), hotte chimique (Gelaire), balance à précision (Scoltec), microonde (Whirlpool), agitateur (Stuart), cuve électrophorèse (Fisher), spectrophotométrie (Nanodrop tm), micropipette (Eppendorf Research), électrophorèse power supply (Consort), congélateur (Frigor), centrifuge à 4°C (Sigma), étuve (Immovens), Taq-man (7500 Real Time PCR system)...

2. Le petit matériel :

On a utilisé lors de notre travail le matériel suivant :

Verrerie (verre à pied, erlenmeyer, provette), lames porte objet, lamelles, pipettes pasteur stériles à usage unique de 5 à 20 ml, poire, tubes coniques, tubes à vices, tubes Eppendorf, seringues, microplaques, cellule de Thomas, compteur, bec benzène, les embouts, boîtes pétri, plaquette...

3. Réactifs et solutions :

Les réactifs ayant servi à la réalisation de notre étude sont les suivants :eau distillée, tampon de lyse (MERCK), détergent SDS, éthanol 70, acétate de sodium, éthanol absolu, phénol-chloroforme alcool-isoamylique (MERCK), TE, AE, protéine K (EUROBIO), formol, bleu de Bromophénol, BET, réactifs de Kit Qiagen, AL, agarose (EUROBIO), tampon de charge TAE, tampons de lavage AW1 et AW2, milieux de cultures (Sérum de lapin, NNN, RPMI), réactifs à HRM (Cyber-green, les amorces 7SL-RNA et ITS1, H₂O PCR grade).

Tampon d'élution pH8 :

Tris-Hcl 1 mM	20ml	} de TE
EDTA 0,5M	400ml	
H2O	170ml	

Phénol-chloroform isoamylique (25v ; 24v ; 1v)

SDS 10% pH 7, 5 :

SDS10g

H₂O90mL

Milieu de culture RPMI (20ml)

RPMI18ml

SVF2ml

Tableau 1 : Les réactifs nécessaires pour l'extraction par Kit de n'échantillon :

Réactifs utilisés	Volume
Protéine K	200ml
Al	200ml
Éthanol	200ml
AW1	500ml
AW2	500ml
AE	50ml

Tableau 2 : Les réactifs nécessaires pour l'extraction par phénol de n'échantillon :

Réactifs utilisés	Volume
Tampon de lyse	150ml
Protéine K	20ml
Détergent SDS	10ml
Phénolchloroform	1 volume
Acétate de sodium	20ml
Éthanol à froid	400ml
TEX(Élution)	50ml

Annexe 2 : Electrophorèse

Réactifs :

TAE 1*(tris Acide acétique EDTA).

Préparation du gel d'agarose à 0,7% :

- Peser 0,7g de la poudre de gel d'agarose et la mettre dans 100 ml de TAE.
- Chauffer le mélange dans la micro-onde jusqu'à l'ébullition.
- Ajouter 0,5µl de BET et laissez le mélange se refroidie.
- Couler le mélange dans la cuve puis faire positionner le peigne. Après la polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et place le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

Annexe 3 : la PCR-HRM

Réactifs : Nous avons utilisé dans notre PCR-HRM des produits du mix pour deux amorces spécifiques ; la 7SL-RNA et l'ITS. Les composants du mix sont indiqués dans les tableaux 3 et 5 :

Tableau 3 : les produits du mix de 7SL-RNA :

Le composant	Le volume requis pour n échantillon (µl)	Le volume final (µl)
H2O PCR grade	3	168
Amorce 1(7SL-RNA directe)	1	56
Amorce 2(7SL-RNA reverse)	1	56
Master Syber-Green	10	560

Mode opératoire de la HRM-7SL-RNA : une identification spécifique des ADN des souches de *Leishmania* spp a été réalisée en utilisant l'amorce 7SL-RNA selon le protocole de [Nassereddin et jaffe 2010](#).

Tableau 4 : protocole de la HRM appliqué à partir de la 7SL-ARN

	Température °C	Temps	Slope (°C/sec)
Dénaturation	95	15 min	20
Amplification 40 cycles	95	5s	20
	55	10s	20
	72	2 min	20
Melting	75	10s	0,1
	95		0,1
Refroidissement	40	30s	

Tableau 5 : les produits du mix de l'ITS1 :

Le composant	Le volume requis pour n échantillon (µl)	Le volume final (µl)
H2O PCR grade	3	168
Amorce 1(ITS1 directe)	1	56
Amorce 2(ITS1 reverse)	1	56
Master Syber-Green	10	560

Mode opératoire de la HRM-ITS1 : une identification spécifique des ADN des souches de *Leishmania* spp a été réalisée en utilisant l'amorce ITS1 selon le protocole suivant :

Tableau 6 : protocole de la HRM appliqué à partir de l'ITS1

	Température °C	Temps	Slope (°C/sec)
Dénaturation	95	15 min	20
Amplification 40 cycles	95	5s	20
	57	30s	20
	76	1s	20
Melting	60	10s	0,1
	95		1°C/sec
Refroidissement	90>50	1°C/sec	

Annexes des résultats :

Annexe 1 : les résultats généraux des opérations e dénombrement

Tableau 1 : Résultats totaux des dénombrements des souches de *Leishmania*

Souche	LIPA 32/06	LIPA 443/13	LIPA 330	LIPA 118	LIPA 281/11
Nombre des parasites	$2,88 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
	38×10^6	$30,4 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	24×10^6	$30,7 \times 10^6$
	$59,2 \times 10^6$	$50,7 \times 10^6$	$90,5 \times 10^6$	40×10^6	35×10^6

Annexe 2 : résultats des dosages optiques des extractions (en blanc : de kit Qiagen/en bleu : de phénol chloroform)

Protocole utilisé en extraction : Kit.

Tableau 1 : résultats des scores élevés des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen

ID d'échantillon		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
Lipa 443-13	1	17,42	1,52	10,77	2,6
	1'	9,09	2,45	7,3	2,5
Lipa 32-06	1	24,87	1,28	16,35	2,8
	1'	6,13	2,3	7,4	3,03
Lipa 330	1	11,52	4,35	12,82	3,38
	1'	13,57	4,21	13,33	3,91
Lipa 118	1	10,12	1,94	13,2	2,01
	1'	9,3	1,8	10,4	1,89
Lipa 281-11	1	36,85	1,43	22,66	3,38
	1'	8,92	2,31	7,42	3,09

Protocole utilisé en extraction : Phénol

Tableau 2: résultats des scores élevés des dosages optique d'ADN extrait par phénol chloroform

ID d'échantillon		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
Lipa 443-13	1	45,76	1,31	34,1	1,48
	1'	22,14	1,74	24,83	1,31
Lipa 32-06	1	51,69	1,55	33,99	2,38
	1'	35,89	2,55	35,12	2,66
Lipa 330	1	35,14	2,21	41,87	2,05
	1'	50,87	1,98	45,28	1,87
Lipa 281-11	1	25,42	1,76	20,69	2,13
	1'	43,22	1,74	28,94	1,81

Tableau 3 : résultats des scores totaux des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen et phénol chloroform de la LIPA 32/06

Dosage N°		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
1	1	6,13	2,3	7,9	3,03
	1'	5,72	4,87	5,98	4,15
2	2	3,49	1,14	1,7	0,9
	2'	5,65	3,6	6,64	3,16
	2''	24,87	1,28	16,35	2,8
1	1	19,7	1,76	41,87	2,05
	1'	22,25	1,75	45,28	1,28
2	2	32,92	2,57	40,59	2,10
	2'	35,72	2,32	32,92	2,57
	2''	51,69	1,55	33,99	2,38

Tableau 4 : résultats des scores totaux des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen et phénol chloroform de la LIPA 443/13

Dosage N°		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
1	1	17,42	1,52	10,77	2,6
	1'	6,2	2,7	6,16	2,3
2	2	2,56	1,37	1,21	0,69
	2'	9,09	2,45	7,3	2,5
1	1	4,46	3,13	4,63	3,7
	1'	8,12	3,1	9,3	2,7
2	2	45,76	1,31	34	1,48
	2'	22,14	1,74	24,83	1,31

Tableau 5 : résultats des scores totaux des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen et phénol chloroform de la LIPA 330

Dosage N°		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
1	1	11,52	4,35	12,82	3,38
	1'	13,57	4,21	13,33	3,91
1	1	35,14	2,21	41,87	2,05
	1'	50,87	1,98	45,28	1,87

Tableau 6 : résultats des scores totaux des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen et phénol chloroform de la LIPA 118

Dosage N°		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
1	1	10,12	1,94	13,2	2,01
	1'	9,3	1,8	10,4	1,89

Tableau 7 : résultats des scores totaux des dosages optique d'ADN extrait par kit Qiagen et phénol chloroform de la LIPA 281/11

Dosage N°		Concentration 1	Rapport 1	Concentration 2	Rapport 2
1	1	36,85	1,43	22,66	3,38
	1'	8,92	2,31	7,42	3,09
1	1	25,42	1,76	20,69	2,13
	1'	43,12	1,74	28,94	1,81

Annexe 3 : résultats de la PCR-HRM 7SL-RNA.

Mode opératoire : les courbes suivantes étaient obtenus à l'aide du logiciel Step one plus Tm, et un appareil Taqman (7500 Real Time PCR System) en utilisant le protocole de Nassereddin et Jaffe 2010.

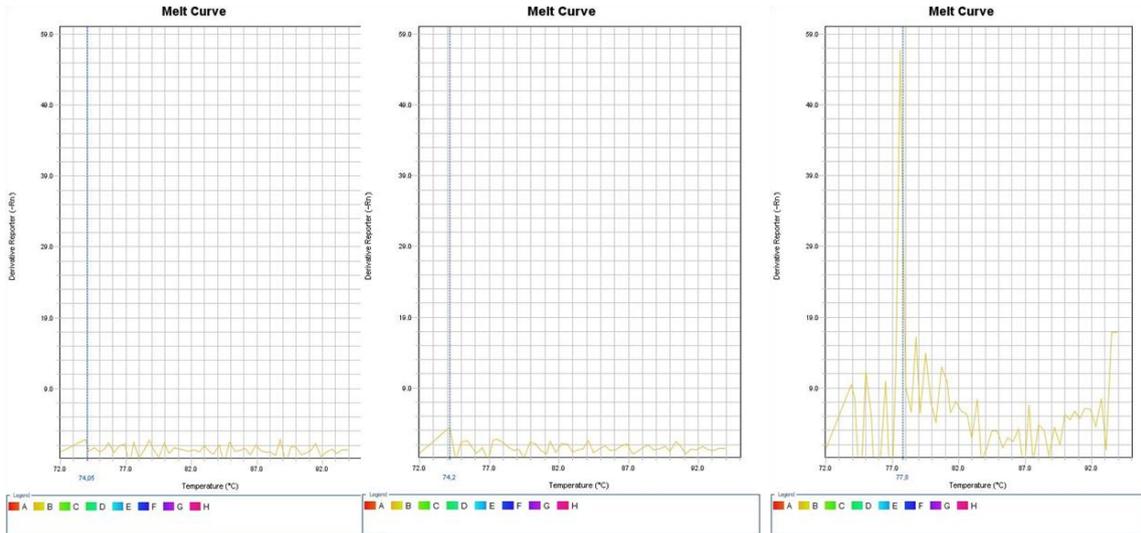


Figure 1 : résultats de la HRM de la Lipa 32-06 extrait à partir du phénol chloroform à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

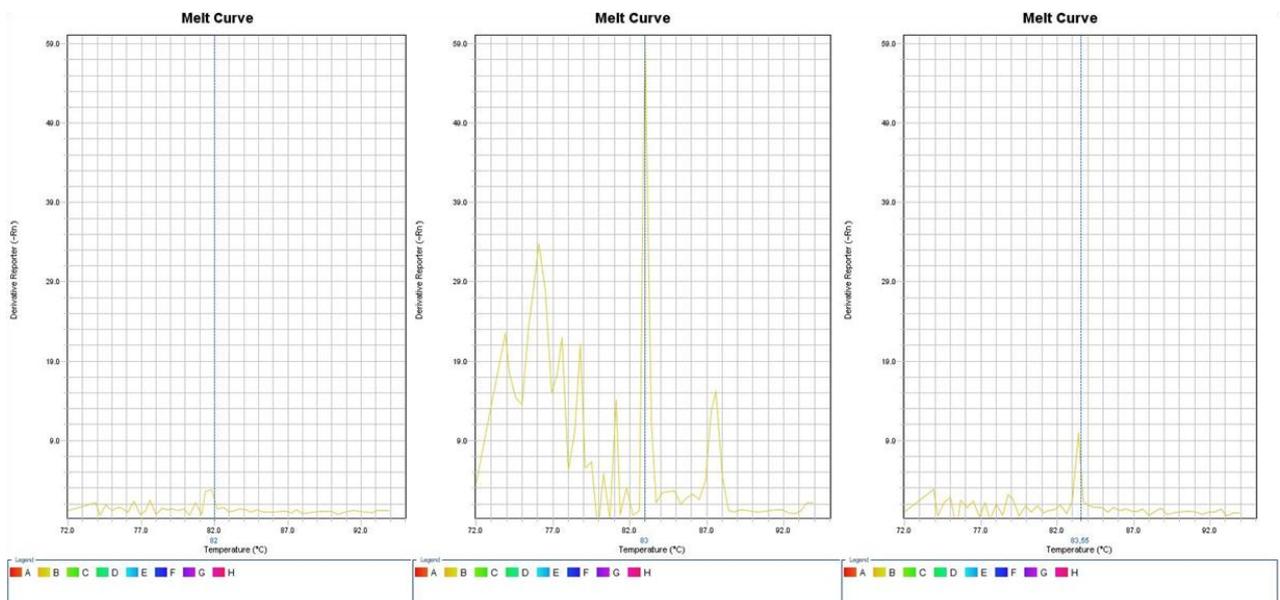


Figure 2: résultats de la HRM de la Lipa 32-06 extrait à partir du Kit Qiagen à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

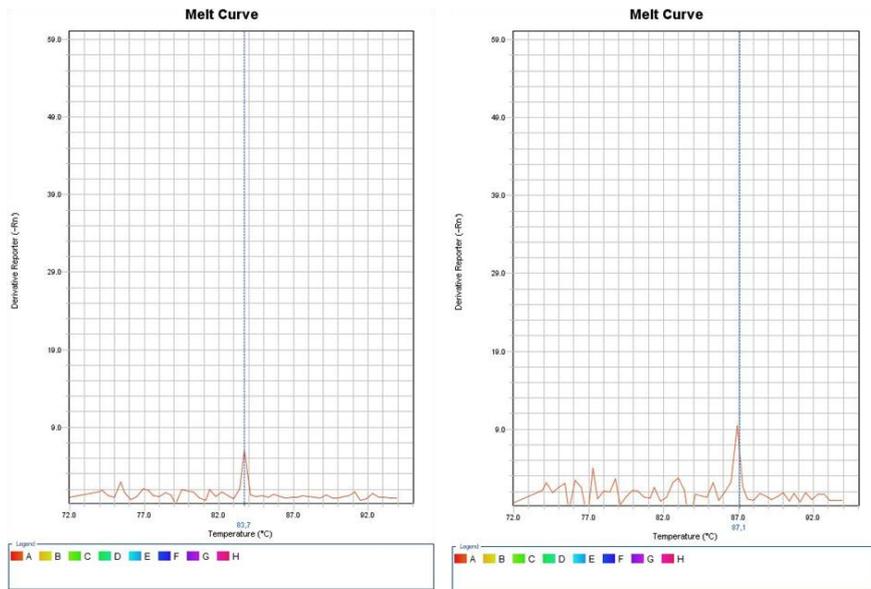


Figure 3: résultats de la HRM de la Lipa 443-13 extrait à partir du phénol chloroform à des différentes concentrations (10^4 et 10^6)

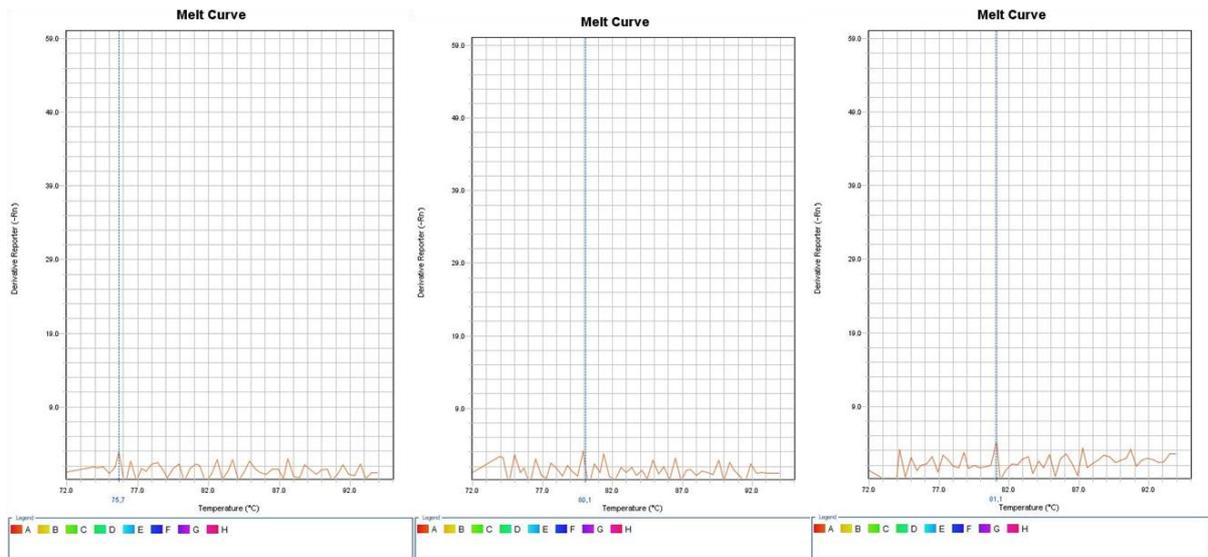


Figure 4: résultats de la HRM de la Lipa 443-13 extrait à partir du Kit Qiagen à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

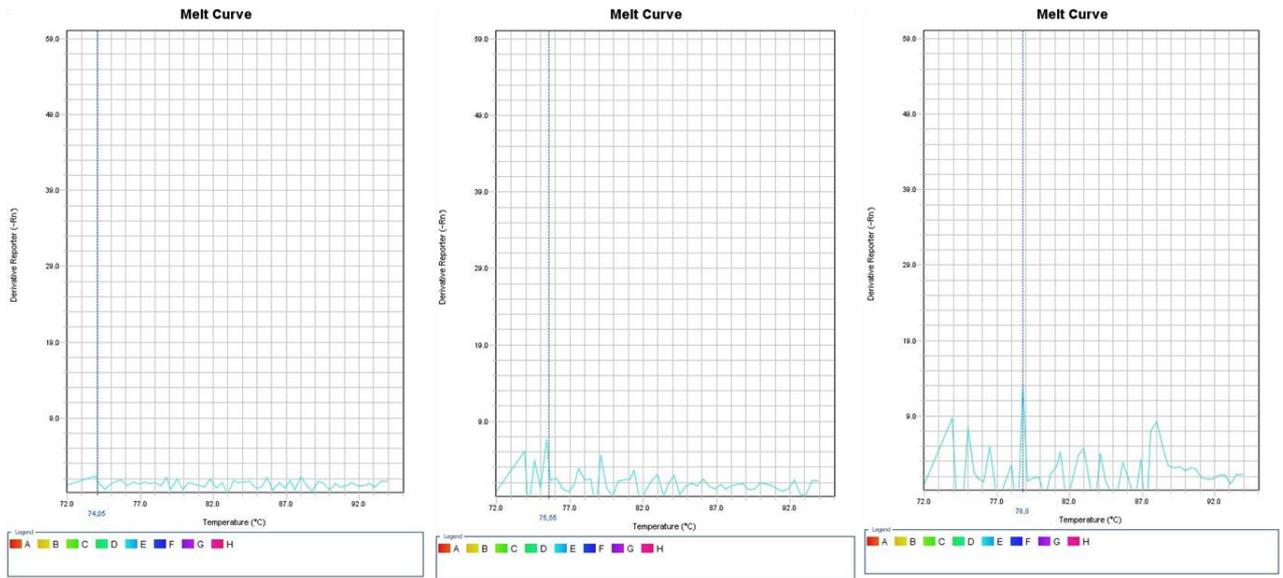


Figure 5: résultats de la HRM de la Lipa 330 extrait à partir du phénol chloroform à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

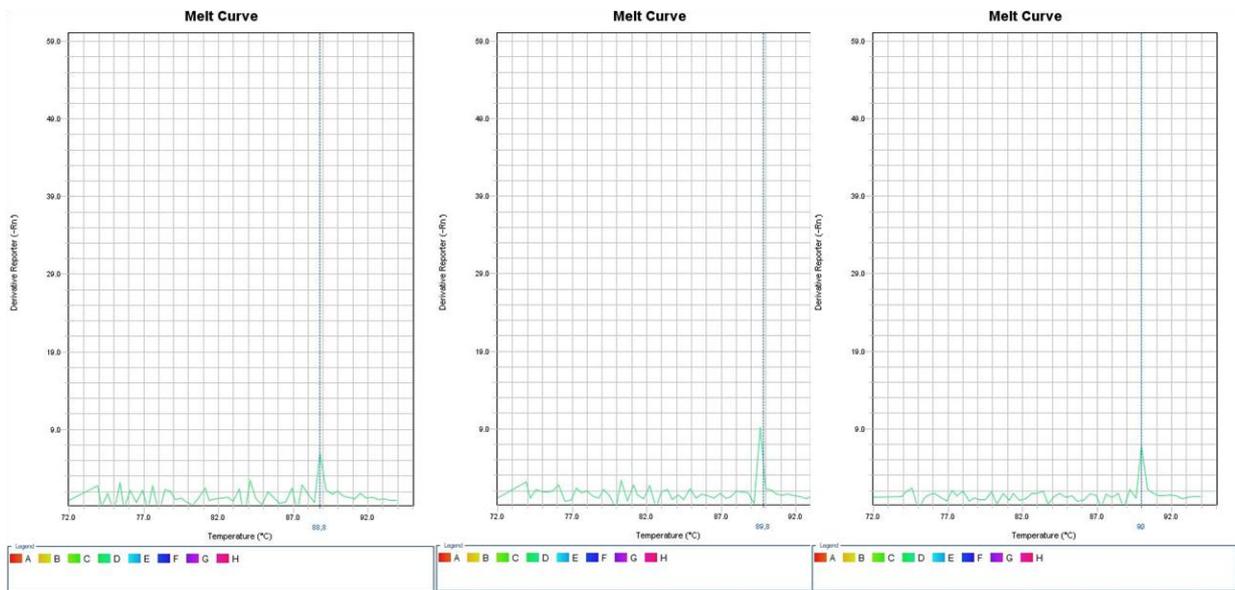


Figure 6: résultats de la HRM de la Lipa 330 extrait à partir du Kit Qiagen à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

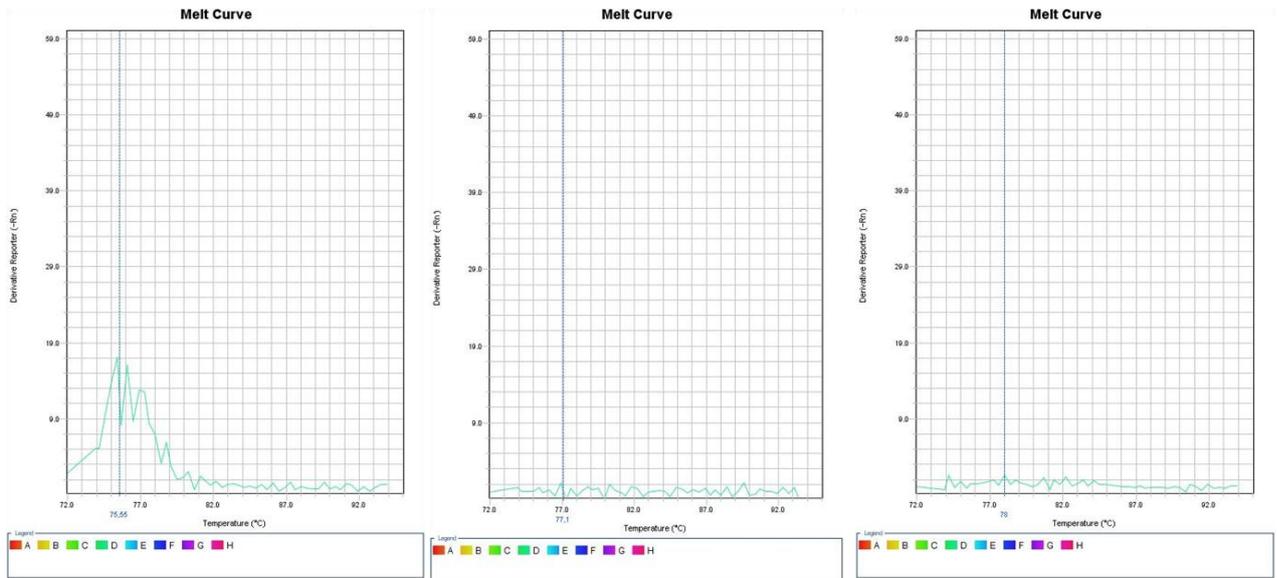


Figure 7: résultats de la HRM de la Lipa 118 extrait à partir du Kit Qiagen à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

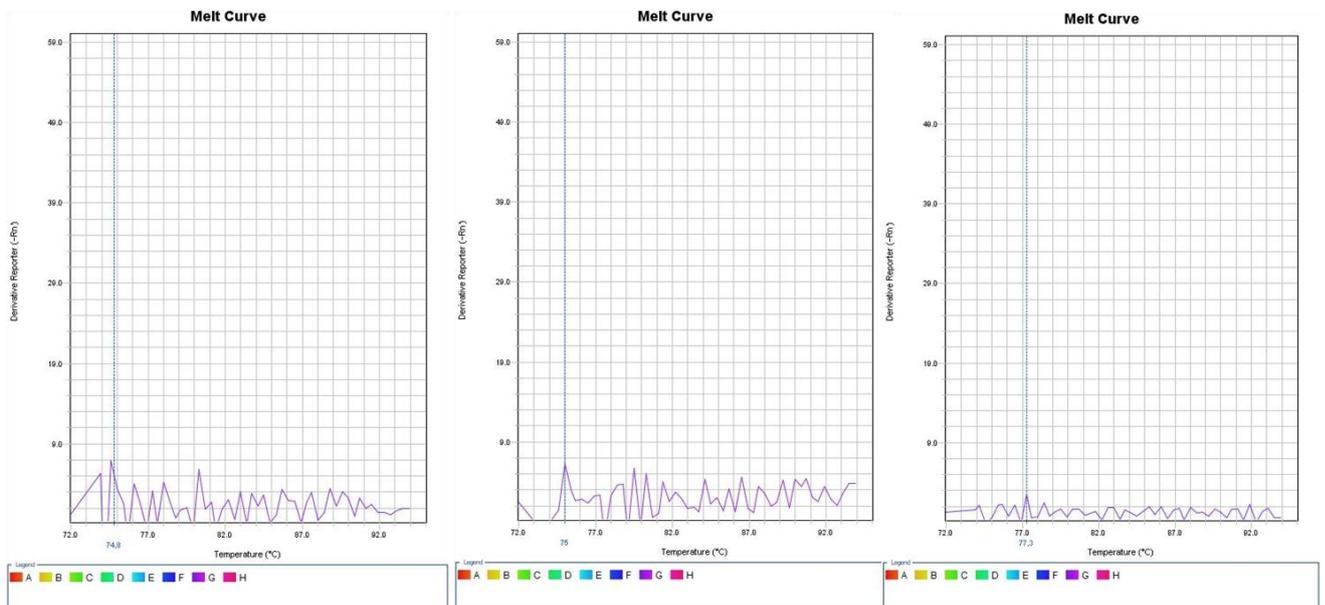


Figure 8 : résultats de la HRM de la Lipa 281-1 extrait à partir du phénol chloroform à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

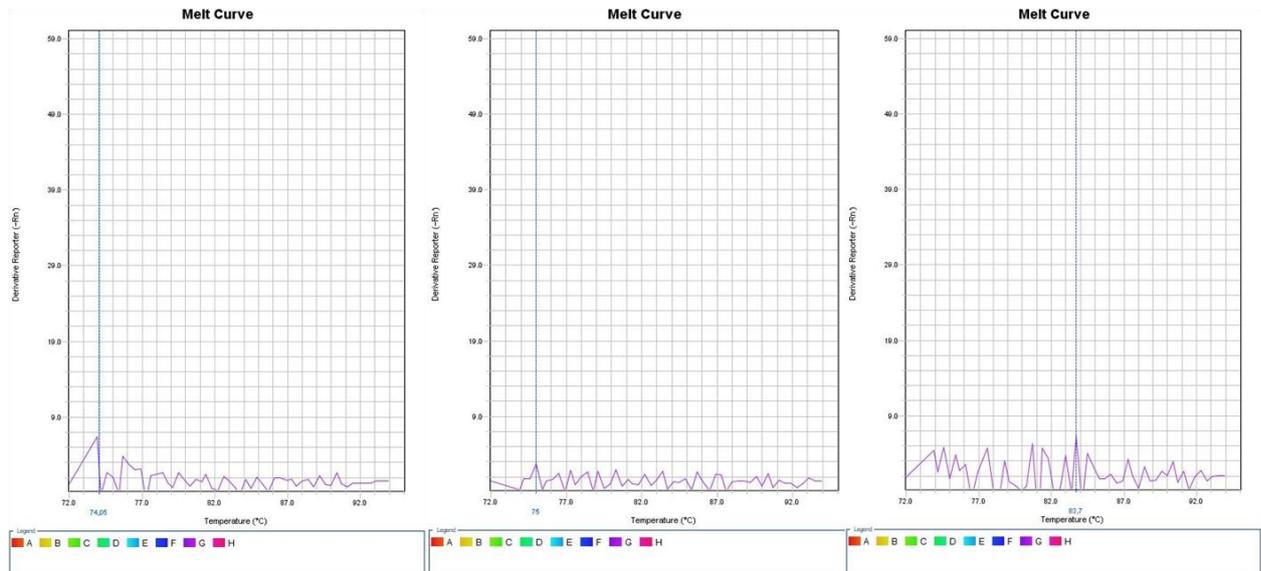


Figure 9 : résultats de la HRM de la Lipa 281-11 extrait à partir du Kit Qiagen à des différentes concentrations (10^2 , 10^4 et 10^6)

Annexe 4 : les résultats totaux des Tm des différentes amorces ciblées *in silico*

Tableau 1 : résultats des Tm de fusion du gène ITS1 des trois espèces de *Leishmania*

ITS1						
Espèce	Paire d'amorce					
			Séquence	longueur	Tm	CG%
<i>L.major</i>	3	Amorce avant	GACGTTGTAGAACGCACCGC	20	62.21	60.00
		Amorce inverse	TCTCCCTCCCGCCAAAACC	20	62.42	60.00
	4	Amorce avant	GTCGCGATGGATGACTTGGC	20	61.77	60.00
		Amorce inverse	ACACGCCTCCTCTGGCTTC	20	62.46	60.00
<i>L.donovani</i>	1	Amorce avant	CGGCTCACATAACGTTGTGCGC	20	62.01	60.00
		Amorce inverse	TAGAGCTTCTCCCCATGCGCC	20	62.03	60.00
	7	Amorce avant	GCGTGTGTGGATAACGGGCTC	20	61.69	60.00
		Amorce inverse	CACACGCCTCCTCTGGCTTT	20	62.74	60.00
<i>L.killicki</i>		Amorce avant	ACGCACCGCCTATACACAAA	20	60.04	50.00
		Amorce inverse	CGCGACACGTTATGTGAGCC	20	62.01	60.00
		Amorce avant	AGGCCTTTCCACACATACACA	20	61.89	50.00
		Amorce inverse	GCCGTTATCCACACACACGC	20	62.24	60.00

Tableau 2 :résultats des Tm de fusion du gène Gp63 des trois espèces de *Leishmania*

Gp63						
Espèce	Paire d'amorce					
		Séquence	longueur	Tm	CG%	
<i>L.major</i>	1	Amorce avant	ATACTTCAGCGACCCGAGGC	20	62.02	60.00
		Amorce inverse	CAGGCGGACAATCGCAGAAC	20	61.97	60.00
	3	Amorce avant	ACCCGCGTGAGTGGGATAAG	20	61.96	60.00
		Amorce inverse	GCGTATGCTGAACTGACCGC	20	62.03	60.00
<i>L.donovani</i>	1	Amorce avant	CGATGCGCGGTGGAATGAC	20	62.04	60.00
		Amorce inverse	CACGAGCGCCATGAGAGAGA	20	62.00	60.00
	5	Amorce avant	CTCCTTCTCACCTGCCCTG	20	61.91	65.00
		Amorce inverse	GGACAGACTGCCGCTACACT	20	61.88	60.00
<i>L.killicki</i>	2	Amorce avant	TTCATGGCATCCGTCGTGG	20	62.21	60.00
		Amorce inverse	GGCTGCCGCTACACTTTGTC	20	61.91	60.00
	6	Amorce avant	CTGCTCGCTGAAACGGAGT	20	62.77	60.00
		Amorce inverse	CGAGGGACGGCGAAGCATAA	20	62.62	60.00

Tableau 3 :résultats des Tm de fusion du gène Hsp70 des trois espèces de *Leishmania*

Hsp70						
Espèce	Paire d'amorce					
		Séquence	longueur	Tm	CG%	
<i>L.major</i>	1	Amorce avant	GACGCGAAGATGGACAAGCG	20	62.01	60.00
		Amorce inverse	GTCCGCGTACGTGAGAAGA	20	61.96	60.00
	2	Amorce avant	AGGGTAAGAACCTGGCGTCTG	20	61.89	60.00
		Amorce inverse	CGCTTGTCCATCTCGCCGTC	20	62.01	60.00
<i>L.donovani</i>	1	Amorce avant	CGAGAAGAACACGCTCGGGC	20	62.01	60.00
		Amorce inverse	CAGCGTCACGTGATCTCCT	20	61.98	60.00
	2	Amorce avant	AGGAGATCGACGTGACGCTG	20	61.98	60.00
		Amorce inverse	TGCATACGCTCTCCAGCTCC	20	62.02	60.00
<i>L.killicki</i>	1	Amorce avant	GAACAAGGAGATCGACGTGGTG	22	61.24	54.55
		Amorce inverse	ATCGGGTTGCATACGCTCTCC	21	62.56	57.14

Tableau 4 :résultats des Tm de fusion du gène Hsp20 des trois espèces de *Leishmania*

Hsp20						
Espèce	Paire d'amorce					
			Séquence	longueur	Tm	CG%
<i>L.major</i>	5	Amorce avant	CATCTCTGGCAACCGCAAGC	20	62.26	60.00
		Amorce inverse	CGGAAGTGGGGAGGTCTGAAG	20	62.23	65.00
	9	Amorce avant	GCATCTCTGGCAACCGCAAG	20	62.26	60.00
		Amorce inverse	GGAAGTGGGGAGGTCTGAAGC	20	62.52	65.00
<i>L.donovani</i>	1	Amorce avant	CAGGACGACGGCTACACACT	20	61.86	60.00
		Amorce inverse	AAGTGGGGAGGTCTGAAGCAC	20	62.11	60.00
	3	Amorce avant	CATCTCTGGCAACCGCAAGC	20	62.26	60.00
		Amorce inverse	GAAGTGGGGAGGTCTGAAGCA	20	61.83	60.00
<i>L.killicki</i>	3	Amorce avant	CGCCCTCTTCCCCTTTCTCC	20	62.26	65.00
		Amorce inverse	TGATGCTCGAGCTCTCCGTG	20	62.00	60.00
	1	Amorce avant	ACGCCCTCTTCCCCTTTCTC	20	61.55	60.00
		Amorce inverse	GCTCCGATATGTCGACGGCT	20	62.13	60.00

Tableau 5 :résultats des Tm de fusion du gène 7SL-RNA des deux espèces de *Leishmania*

7SL-RNA						
Espèce	Paire d'amorce					
			Séquence	longueur	Tm	CG%
<i>L.donovani</i>	5	Amorce avant	TGCTCGATCACACACCCCTC	20	61.89	60.00
		Amorce inverse	ACGGCAGAAACCCTGTCGTC	20	62.71	60.00
	7	Amorce avant	GAGACGACAGGGTTTCTGCC	20	60.67	60.00
		Amorce inverse	CTCCGGAAGTCTCGGCCATC	20	62.37	65.00
<i>L.killicki</i>	1	Amorce avant	CCATCGCAACTTCGGTTCGG	20	61.97	60.00
		Amorce inverse	CGTTCTCCCCCGAACTACCC	20	61.95	65.00
	3	Amorce avant	GGGTAGTTCGGGGGAGAACG	20	61.95	65.00
		Amorce inverse	CCGGCCATAAGTCCCAA	20	61.72	60.00