



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Saâd Dahleb Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master Biologie

Filière : Sciences biologique

Spécialité : Génétique et physiologie

Thème

Etudes des dommages de l'ADN suite à l'action de Préoxyde d'hydrogène et Dioxyde de chlore sur la forme promastigote de *Leishmania*.

Présenté par

- Dahoui Safaa
- Ziouane Asmaa

Soutenu le : 8 Octobre 2017.

Composition du jury

– GUETARNI D.	Professeur	Président	UB1
– MOHAMED SAID R.	MCB	Examineur	UB1
– EDDAIKRA N.	Maitre de recherche	Promotrice	IPA
– EDDAIKRA A.	Maitre-assistant A	Co-promotrice	UB1

Année Universitaire : 2016/2017

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Généralité	
1. Les leishmanioses	
1.1.Définition	3
1.2.Historique	3
2. Épidémiologie	3
2.1.Agent pathogène	4
2.2.Taxonomie	4
3. Les formes cliniques de la leishmaniose en Algérie	4
4. Répartition géographique	5
4.1.En Algérie.....	5
5. Caractères morphologiques	7
5.1.Le stade amastigote	7
5.2.Le stade promastigote	8
5.3.Organisation cellulaire	8
5.4.Cycle de vie	9
5.5.Le vecteur de <i>Leishmania</i>	10
5.6.Les réservoirs du parasite	11
6. Aspects génétiques de <i>Leishmania</i>	12
6.1.Génomome de <i>Leishmania</i>	12
6.1.1. Le génome kinétoplastique.....	12
6.1.2. Le génome nucléaire.....	12
6.2.Le séquençage du génome de <i>Leishmania</i>	13
7. Le traitement de la leishmaniose	14
7.1.Les Sels d'antimoine pentavalent	14
7.2.Recherche de nouvelle alternative thérapeutique	15
8. Les dommages de l'ADN.....	15
9. Etude des dommages de l'ADN par le test des comètes.....	16
9.1.Historique.....	17
9.2.La préparation des lames.....	17
9.3.La lyse.....	17

Table des matières

9.4.La dénaturation.....	18
9.5.L'électrophorèse.....	18
9.6.La neutralisation.....	19
9.7.La coloration.....	19
9.8.L'analyse des lésions.....	19
Chapitre II : Matériel et méthode	
1. Matériel	
1.1.Matériel biologique.....	20
1.2.Matériel non biologique.....	20
1.2.1. Equipements.....	20
1.2.2. Les milieux de culture.....	21
2. Méthodes	
2.1.La culture du parasite	21
2.2.Sur milieu NNN.....	21
2.3.Sur milieu RPMI 10 SVF.....	21
2.4.Observation microscopique	21
2.5.Comptage et viabilité.....	22
3. La technique des Comètes	
3.1. Les Solutions du Test des Comètes.....	22
3.2. Gels d'Agarose.....	22
3.3. Préparation des lames.....	22
3.4. Lyse cellulaire.....	23
3.5. Déroulement de l'ADN.....	23
3.6. Electrophorèse.....	23
3.7. Neutralisation.....	23
3.8. Fixation et déshydratation.....	23
3.9. Coloration des lames.....	23
3.10. Lecture des lames.....	23
3.11. Classement des comètes.....	24
4. Mise au point du test des comètes pour l'étude de Leishmania	
4.1.Protocole 1 (Concentration parasitaire optimale).....	25
4.2.Protocole 2 (Modification des tampons).....	25
4.3.Protocole 3 (Modification des conditions).....	26

Table des matières

5. Traitement des leishmanies par le H ₂ O ₂ et DAC	26	
Chapitre III : Résultats		
1. Résultats de la mise au point du test des comètes pour <i>Leishmania</i>		
1.1. Résultats de l'observation microscopique.....	27	
1.2. Résultats de la mise en points du test de COMET sans inhibiteurs.....	28	
2. Résultats de la génotoxicité du H ₂ O ₂ et du DAC sur différentes espèces de <i>Leishmania</i>	29	
2.1. Résultats des taux d'inhibition du H ₂ O ₂ et du DAC sur <i>Leishmania</i>	29	
2.2. Résultats du test de COMET sur les différentes espèces de <i>Leishmania</i> étudiées.....	30	
2.2.1. Résultats en absence d'inhibiteurs	30	
2.2.2. Résultats en présence de H ₂ O ₂ à 10 µM.....	31	
2.2.3. Résultats en présence de H ₂ O ₂ à 100 µM.....	32	
2.2.4. Résultats en présence de DAC à 10 µM.....	33	
2.2.5. Résultats en présence de DAC à 100 µM.....	34	
Chapitre IV : Discussion générale		35
Chapitre V : Conclusion		39
Références bibliographiques.....		40
Annexes		

Liste des tableaux

- **Tableau 1:** Caractéristiques du génome de certaines espèces de *Leishmania* utilisés dans notre étude 13
- **Tableau 2:** Caractéristiques des espèces de *Leishmania* étudiées 20
- **Tableau 3:** Principe de comptage de parasite par champ 22
- **Tableau 4:** Résultat de contrôle de *Leishmania* étudiées sur milieu NNN 27
- **Tableau 5:** Résultat de contrôle de *Leishmania* étudiées sur milieu RPMI 10SVF 27
- **Tableau 6:** Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 1) 28
- **Tableau 7:** Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 2) 28
- **Tableau 8:** Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 3) 28
- **Tableau 9:** Résultat du taux d'inhibition suite à l'action de H₂O₂ et de DAC sur la viabilité des espèces de *Leishmania* étudiées 29
- **Tableau 10:** La concentration parasitaire (parasites / ml) de *L. killicki* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés. (Annexe IV)
- **Tableau 11:** La concentration parasitaire (parasites / ml) de *L. Infantum* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés (Annexe IV)
- **Tableau 12:** La concentration parasitaire (parasites / ml) de *L. major* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés (Annexe IV)
- **Tableau 13:** La concentration parasitaire (parasites / ml) de *L. tropica* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés (Annexe IV)
- **Tableau 14:** La concentration parasitaire (parasites / ml) de *L. amazonensis* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés (Annexe IV)
- **Tableau 15:** Fréquences des dommages de *L. Killicki* suite à l'activité des inhibiteurs (Annexe V).
- **Tableau 16:** Fréquences des dommages de *L. Infantum* suite à l'activité des inhibiteurs (Annexe V).
- **Tableau 17:** Fréquences des dommages de *L. Major* suite à l'activité des inhibiteurs (Annexe V).
- **Tableau 18 :** Fréquences des dommages de *L. Tropica* suite à l'activité des inhibiteurs (Annexe V)
- **Tableau 19 :** Fréquences des dommages de *L. Amazonensis* suite à l'activité des inhibiteurs (Annexe V)

Liste des figures

- **Figure 1**: Localisation de la Leishmaniose cutanée en Afrique du Nord 5
- **Figure 2a** : Photo de la forme amastigote intramacrophagique de *Leishmania* Gx100 (coloration Giemsa) 7
- **Figure 2b** : Schéma représentant la forme amastigote de *Leishmania* 7
- **Figure 3a** : Photo des formes promastigotes de *Leishmania* Gx100 colorées au Giemsa 8
- **Figure 3b** : Schéma représentant la forme promastigote 8
- **Figure 4** : Schéma de l'organisation cellulaire de *Leishmania*. 9
- **Figure 5** : Schéma du cycle de vie du parasite *Leishmania* 10
- **Figure 6** : Photo d'un phlébotome femelle 11
- **Figure 7** : Une comète sélectionnée 19
- **Figure 8** : Les cinq types des comètes obtenues colorées par SYBER Green I Gx400 24
- **Figure 9** : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en absence d'inhibiteur(Control) 30
- **Figure 10** : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence H₂O₂ à 10 µM 31
- **Figure 11** : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence H₂O₂ à 100 µM 32
- **Figure 12** : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence de DAC à 10 µM 33
- **Figure 13** : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence de DAC à 100 µM 34
- **Figure 14** : Photographie de la cellule de Thoma et la formule de comptage (Annexe III)
- **Figure 15** : Composition de la cellule Thomas (Annexe III)

Liste des abréviations

μl : Micro-litre

μM : Micro-molaire

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN g : Acide Ribonucléique Guide

BET : Bromure d'Ethydium

C° : Degrés Celsius

Ca : Calcium

DAC : Dioxyde de chlore.

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

EEPGP : Eco-Épidémiologie Parasitaire et Génétique de Population

Gr : Gramme

H₂O_D : L'eau distillé

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

H₂O_p : L'eau physiologique

HCl : Chlorure d'hydrogène

INSP : Institut national de santé publique

IPA : Institut Pasteur d'Algerie

Kb : Kilo Base

LC : Leishmaniose Cutané

LCS : La leishmaniose cutanée sporadique

LCZ : La leishmaniose cutanée zoonotique

LMA : Low Melt Agarose

LMPA : Low Melt Point Agarose

LV : Leishmaniose Visirale

mA : milliampère

Mb : Méga base

MCL : Leishmaniose muco-cutanées

Liste des abréviations

Mg : Magnésium

mL : Millilitre

NA: Normal Agarose

Na₂EDTA: Disodium Ethylenediaminetetraacetate dihydrate

NaCl : Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NNN : Novy Nicolle Mc Neal

OMS : Organisation Mondial de Santé

PBS: Phosphate buffered saline

pH: potential d'Hydrogène

RPMI: Roswell Park Memorial Institut

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SVF : Sérum de Veau Foetal

Tr : Tour

V : Volt

v : Volume

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mon père , qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien , tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils pour toute son assistance et sa présence dans ma vie .

A la source de chaleur et tendresse l'origine de douceur et patience ma mère.

*A mes chers frères Bahaa Eddine, Abdelhak.
A mes adorables amis et mes collègues : Assia , Imene , Faiza , Lamia , Mr SAIDI , Samira .*

Merci pour vos soutiens et vos conseils, ce travail est le fruit de votre bonne collaboration.

Merci à mes collègues d'études .

Merci à toutes les personnes qui ont donné un avis critique sur notre mémoire.

*A ma chère Binôme Safaa
que j'adore pour ta
sympathie ,Merci pour les très bons moments qu'on avait partagé ensemble .*

Asmaa.

Dédicaces

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A MES CHERS ET ADORABLE FRERES ET SOEURS

*Dalila, la prunelle de mes yeux, Amina, la douce, au cœur si grand,
Nassim le généreux, Moumen mon petit
frère que j'adore, et mon beau-frère Tarek*

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mon Binôme et Amie Asmaa

que j'aime, avec laquelle j'ai partagé des moments difficiles comme des moments de joies, je te souhaite une bonne continuité.

Safaa.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de madame EDDAIKRA Naouel , Maître de recherche au service d'Eco-épidémiologie Parasitaire Et Génétique des populations à l'Institut Pasteur d'Alger, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos remerciement s'adresse à notre co-promotrice Madame EDDAIKRA Atika, pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Professeur GUETARNI en étant président du jury et Docteur MOHAMED SAID d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions particulièrement et profondément tout le personnel de l'Institut pasteur en l'occurrence Docteur HARRAT Zoubir, ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations pour leur accueil, notamment, Monsieur LAZHARI , Monsieur Rafik, Madame BENKHLIF, et les Doctorantes, Rym , Ikram et Nalia).

Nos remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Résumé

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires touchent l'homme. En Algérie il existe deux formes cliniques de leishmaniose. En absence d'un traitement efficace pour cette maladie nous avons réalisé se travaille pour tester l'action de deux produits génotoxiques et évaluer leur effets sur l'ADN de différentes espèces de *Leishmania* par COMET assay, afin de confirmer leur aspect thérapeutique contre la maladie de leishmaniose. Les deux produits tels que H₂O₂ et le DAC avec des concentrations différentes, présentent un effet sur deux niveaux : cellulaire et nucléaire pour les différentes souches de *Leishmania*.

Mots clé : Leishmaniose, COMET assay, produits génotoxiques , H₂O₂, DAC .

Summary

Leishmaniasis is parasitic diseases affecting the man, In Algeria there are two clinical forms of leishmaniasis. In the absence of an effective treatment for this disease, we realized this work to test the action of two genotoxic products and estimate them effects on the DNA of various species of *Leishmania* by COMET assay to confirm their therapeutic aspect against the disease of leishmaniasis. Two products H₂O₂ and the DAC with different concentration present effect on two level: cellular and nuclear on various stem of *Leishmania*.

Keywords: Leishmaniasis, COMET assay, genotoxic products, H₂O₂, DAC.

ملخص :

داء الليشمانيات مرض يُسببه أحد الطفيليات التي تتكاثر عند الانسان , يوجد في الجزائر نوعان من هذا الداء . في غياب علاج ناجع و فعال لهذا المرض , قمنا بهذا العمل من اجل التعرف على امكانية وجود علاج جديد عن طريق مواد سمية و من اجل اظهار فعاليته على الحمض النووي على مختلف انواع مسببات هذا المرض عن طريق اختبار المذنب . كلتا المادتين المستعملتين اكسيد الهيدروجين و ثنائي اكسيد الكلور , اظهرتا فعاليتها على مستويين الخلوي و النووي .

كلمات المفتاحية :

داء الليشمانيات , اختبار المذنب , مواد سمية , اكسيد الهيدروجين , ثنائي اكسيد الكلور.

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires transmissibles dues à un protozoaire flagellé, parasite du système reticulo-histiocytaire, appartenant au genre *Leishmania*, transmis aux mammifères vertébrés (hôte) par la pique d'un insecte (vecteur) : le phlébotome femelle infectée du genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde.

Les leishmanioses sont des maladies tropicales négligées qui touche plus de 12 millions de personnes dans le monde, avec 350 millions de personnes à risque (Sarkari *et al.*, 2016). Cette maladie est causée par des parasites du genre *Leishmania*. Chez l'homme, ces maladies peuvent avoir des manifestations cliniques cutanées (LC), muco-cutanées (LMC) ou viscérales (LV) (Charaa *et al.*, 2015).

L'Algérie est un pays où la Leishmaniose cutanée (LC) et viscérale (LV) sévissent à l'état endémique et où la LC a touché plus de 25000 personnes en 2005 (Eddaikra *et al.*, 2013). L'OMS classe l'Algérie comme le deuxième pays le plus touché par la LC après l'Afghanistan (Alvar *et al.*, 2012), dont les agents sont *Leishmania major*, *Leishmania infantum* et *Leishmania killicki*. La leishmaniose viscérale (LV), est transmise par *Leishmania infantum*. La situation épidémiologique en Algérie est inquiétante. La maladie est en réémergence et la propagation semble être due à plusieurs facteurs dont les changements environnementaux le statut immunitaires des hôtes et au développement de résistances aux différents traitements utilisés.

Parmi les molécules de synthèse, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le dioxyde de chlore DAC sont des produits qui possèdent des propriétés antibactériennes, et qui pourraient avoir un effet leishmanicide. Le peroxyde d'hydrogène est utilisé en Algérie comme antiseptique local pour nettoyer les lésions et les plaies avant chaque traitement, tandis que le chlorite de sodium a été utilisé dans le traitement de leishmaniose cutanée en Afghanistan. Ces deux produits présentent un effet anti-infectieux et immun modulateur favorisant la réparation des tissus (Jebran *et al.*, 2014).

La résistance au traitement de la leishmaniose étant un sérieux problème en Algérie, deux produits sont en cours d'étude dans le laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie, pour évaluer leur effet thérapeutique et toxique sur *Leishmania*. Ce travail se veut comme une suite d'une première étude qui a permis de déterminer l'activité leishmanicide et cytotoxique *in vitro* de ces deux produits. Le but étant dans un premier temps de faire une mise au point de la technique des comètes sur *Leishmania* ; et en deuxième temps d'évaluer la génotoxicité du H₂O₂ et du DAC à des concentrations extrêmes, par l'étude des

dommages sur l'ADN de différentes espèces de *Leishmania* sous leur forme promastigote par la technique du test des comètes en milieu alcalin.

Généralités

1. Les leishmanioses

1.1. Définition

Les leishmanioses sont des anthroponoses dues à des protozoaires du genre *Leishmania* (Basset *et al.*, 1999 ; Dedet et Pratlong, 2001), de la famille des Trypanosomatidae (Lightburn *et al.*, 2000). Ce sont des maladies infectieuses dues au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaires flagellés (Del Giudice *et al.*, 2001). Ces parasites obligatoires dihéteroxyènes, affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme (Dedet, 2001). Ils sont transmis par la piqûre infectante d'un insecte diptère vecteur hématophage de 2 à 4 mm de long (Marty, 2002) appartenant au genre *Phlebotomus* dans Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Osman *et al.*, 2000).

1.2. Historique

La première description clinique moderne est celle de Mc Naught en 1882 et c'est Cunningham en 1885 qui découvre les parasites dans un prélèvement de « bouton d'Orient ». Le parasite *Leishmania* fut découverte par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de *Leishman-Donovan* (Roberts et Janovy, 2000 ; cité par (Forget, 2004). En 1921, les frères Sergent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes. Mais la transmission par la piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler & Ber. Knowles, en 1924, l'établit pour le kala-azar, Parrot et Donatien le font pour la leishmaniose canine en 1930 (Mazelet, 2004).

2. Épidémiologie

Leishmania implique le passage alterné d'un hôte mammifère à un autre par l'intermédiaire d'un insecte vecteur, le phlébotome.

La plupart des leishmanioses sont des zoonoses, ce qui signifie que les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages qui diffèrent selon les espèces de *Leishmania* : carnivores, rongeurs, marsupiaux, etc (Dedet, 2001). Pour certaines espèces comme *L. donovani*, l'homme semble être le seul réservoir du parasite.

2.1. Agent pathogène

Les leishmanies sont des flagellés sanguinoles, appartenant à l'ordre des *kinétoplastidés* (Dedet, 2009). Ils présentent au cours de leur cycle deux stades évolutifs distincts : le stade amastigote est intramacrophagique et retrouvé chez les hôtes vertébrés dont l'homme ; et le stade promastigote libre et mobile est retrouvé dans l'intestin du phlébotome et dans les milieux de culture (Chabasse *et al.*, 2007).

Ce parasite est transmis de mammifère à mammifère, par la pique d'un arthropode vecteur " le phlébotome" (Marty, 2009). Ce dernier pique la nuit ; préférentiellement à la tombée du jour (Dedet, 2009). Le parasite pénètre dans le macrophage et le promastigote se transforme en amastigote.

2.2. Taxonomie

Les leishmanies sont des parasites protozoaires appartenant au règne des Protista, sous -règne des Potozoa, Embranchement des Sarcomastigophora, Classe des zoomastigophorea (Quitterie *et al.*, 2005), famille des Trypanosomatidae (Dedet 2001), Genre *Leishmania* (Hide, 2004) le Genre *Leishmania* comprend deux sous Genres *Leishmania* et *Viannia* (Dedet, 2009), ces espèces sont morphologiquement identiques et ne sont différenciées que par une caractérisation biochimique iso-enzymatique ou moléculaire de l'ADN.

3. Les formes cliniques de la leishmaniose en Algérie

On distingue deux formes de leishmanioses en Algérie : viscérale et cutanée.

- **La leishmaniose viscérale (LV) :** Elle représente la forme la plus grave de la maladie. Les parasites ne restent pas au niveau du site de pique. Ils migrent vers les organes lymphoïdes, via les systèmes sanguin et lymphatique. La LV se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières. Une perte de poids, une hépato-splénomégalie, une lympho-adénopathie et une anémie (Acebey *et al.*, 2008). L'agent de la maladie est *Leishmania infantum*.
- **Leishmaniose cutanée (LC) :** Elle se caractérise par la formation d'une petite papule prurigineuse rouge sombre qui apparaît au site de piqûres. Puis, elle s'ulcère, s'infiltré en profondeur et se recouvre d'une mince croûte évoluant lentement sous forme sèche ou forme humide. Elle laisse de profondes cicatrices non pigmentées (Acebey *et al.*, 2008). Trois agents sont responsables de la LC en Algérie : *Leishmania major* responsable de la leishmaniose cutanée zoonotique, *Leishmania infantum* responsable de la leishmaniose cutanée sporadique du Nord, et *Leishmania killicki*, isolée pour la première fois en Algérie dans la wilaya de Ghardaïa (Harrat *et al.*, 2009).

4. Répartition géographique

Les leishmanioses sont largement répandues à la surface du globe sévissent sur les 4 des 5 continents

- Leishmaniose viscérale avec cinq foyers : indien, méditerranéen, chinois, américain (Brésil), africain (foyers est-africain, avec quelques cas en dehors des foyers traditionnels [Cameroun]).
- Leishmaniose cutanée : trois foyers, méditerranéen, américain, africain.
- Leishmaniose cutanéomuqueuse : un seul foyer, américain (Soto *et al.*, 2009).

4.1. En Algérie

L'Algérie est un pays qui compte parmi les plus exposés au Monde. Elle est concernée par quatre formes cliniques sévissant à l'état endémique : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) et la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) (figure 1) et tout dernièrement, la forme cutanée à *L. killicki* qui fut récemment signalée à Ghardaïa (Alavar *et al.*, 2012).

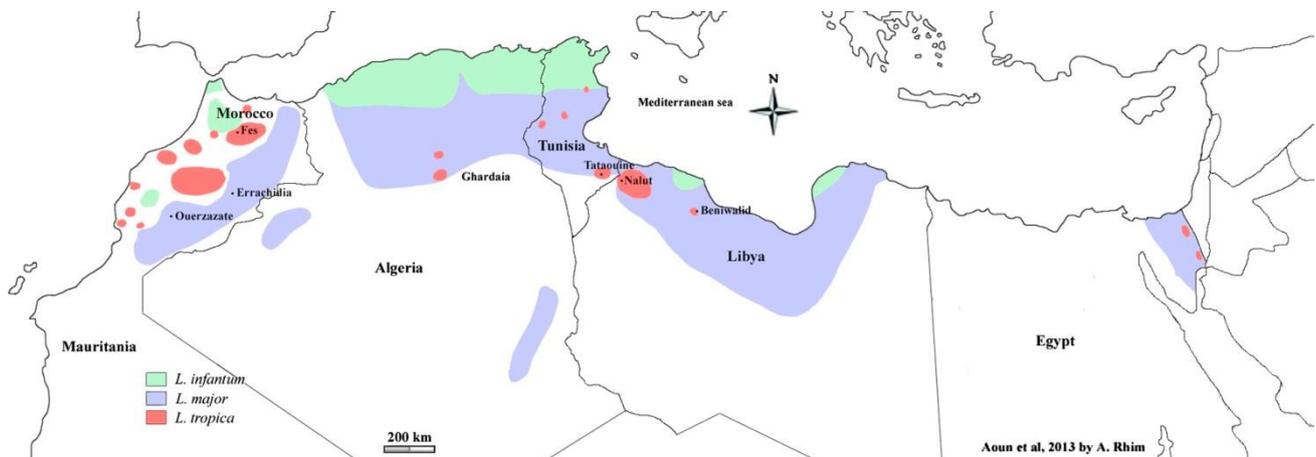


Figure 1: Localisation de la Leishmaniose cutanée en Afrique du Nord (Aoun *et al.*, 2013)

- **Leishmaniose Cutanée sporadique du Nord**

La leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCN) est connue en Algérie sous le nom de clou de Mila. Elle a été rapportée par Sergent en 1923 (Sergent *et al.*, 1923). Cette forme présente la particularité de siéger au niveau du visage sous forme d'une lésion nodulaire souvent unique, très riche en parasites. Son évolution chronique s'étale entre 6 et 12 mois (Belazzoug, 1986 b). Ténès est le foyer actif de la leishmaniose cutanée du nord (Izri *et al.*, 1993). Le chien est le principal réservoir de *L. infantum* (Benikhlef *et al.*, 2004).

- **Leishmaniose Cutanée Zoonotique**

Cette forme sévit à l'état endémo-épidémique au niveau des zones arides et semi-aride de l'Algérie. Les débuts de l'épidémie remontent à 1982 avec l'apparition des premiers cas à l'Est du chott El Hodna. Rapidement toute la région fut concernée ; l'incidence de la maladie atteignit 9 pour mille en 1982 (Belazzoug, 1983). L'épidémie ne se limita pas à la région de M'sila puisque les wilayas voisines déclarèrent elles aussi des cas, avec cependant une incidence nettement plus faible.

L'extension de la maladie a touché les wilayas suivantes : Biskra Tiaret, Bordj Bou Arreridj, Batna, Djelfa, Saida, Sétif, etc. Elle fut signalée la première fois dans la wilaya de Ghardaïa. Elle constitue l'un des gros foyers émergents de leishmaniose cutanée, d'après la Réunion du Comité de pilotage de lutte contre la leishmaniose 18 413 cas y ont été recensés au cours de l'année 2010.

Une nouvelle forme de leishmaniose cutanée fut récemment découverte à Ghardaïa par Harrat *et al* (Harrat *et al*, 2009). Les différents prélèvements effectués sur les malades ont révélé la présence de *L. killicki*. La leishmaniose cutanée provoquée par *L. killicki* a été décrite pour la première fois au Maghreb en 1986 dans le sud tunisien (Ben Ahmed *et al.*, 2009). C'est une nouvelle forme clinique urbaine émergente, d'allure épidémique à profil épidémiologique particulier, cette forme est apparue en 2005 à Ghardaïa. Son vecteur est *P.sergenti* (Harrat *et al*, 2009), et le réservoir reste inconnu.

- **Leishmaniose Viscérale Zoonotique**

Elle s'étend sur toute la partie Nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humide et subhumide, mais il est important de signaler la survenue de nombreux cas dans les régions semi-arides et arides connues pour être des foyers de leishmaniose cutanée zoonotique. En effet, Belazzoug (Belazzoug *et al.*, 1986) signalait déjà la présence de 21 cas de leishmaniose viscérale à Biskra, foyer de leishmaniose cutanée, en 1986. D'autres cas continuent à être signalés dans le Hoggar et dans le Tassili N'ajjar (Belkaid *et al.*, 1997). À côté des anciens foyers (Tizi Ouzou, Constantine, Jijel, Mila, Boumerdès et Médéa), de nouveaux sont apparus. Il s'agit d'Annaba et de Collo à l'Est, de Blida, Cherchell, Ténès et Chlef au centre et de Tlemcen et Oran à l'Ouest. En 1987, l'Ouest algérien était considéré par Belazzoug (Belazzoug *et al.*, 1987) comme indemne de leishmaniose viscérale humaine.

Entre 1995 et 2003, 1 654 cas ont été déclarés à l'Institut national de santé publique (INSP). Cette incidence est sans doute inférieure à la réalité dans la mesure où plusieurs cas échappent au diagnostic du fait de l'insuffisance de l'infrastructure sanitaire dans les zones rurales.

5. Caractères morphologiques

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle, deux stades évolutifs distincts : amastigote et promastigote.

5.1. Le stade amastigote

C'est la forme intracellulaire des leishmanies que l'on retrouve dans les cellules du système réticulo-histiocytaire des hôtes vertébrés et dans les cellules mises en culture (figure 2a,b). Ce sont de petits corpuscules ovalaires ou arrondis de 2 à 6 μm de diamètre, immobiles, enveloppés d'une membrane bien définie, présentant un gros noyau, un appareil flagellaire rudimentaire appelé rhizoplaste attaché à un blépharoplaste et un corpuscule parabasal (kinétoplaste) qui est une mitochondrie géante contenant de l'ADN. Et se multiplie par scissiparité. (Acebey *et al.*, 2008).

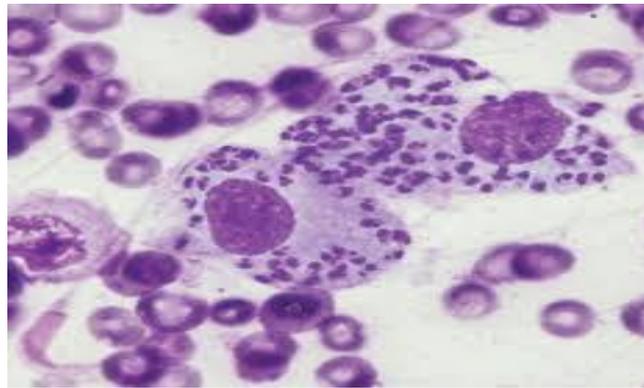


Figure 2a : Photo de la forme amastigote intramacrophagique de *Leishmania* Gx100 (coloration Giemsa) (IPA).

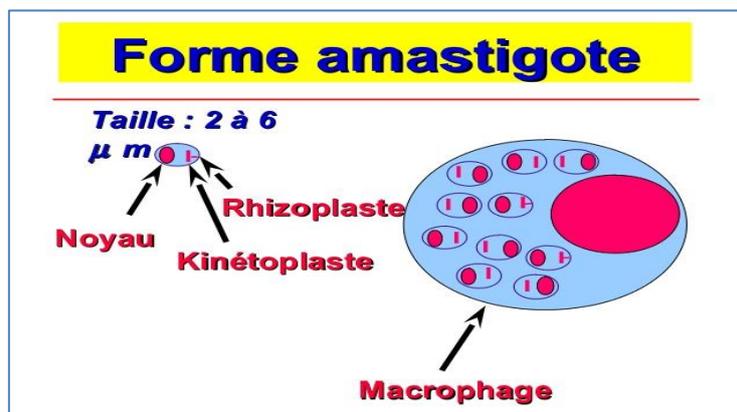


Figure 2b : Schéma représentant la forme amastigote de *Leishmania* (originale).

5.2. Le stade promastigote

Munie d'un flagelle antérieur, cette forme est issue de la forme amastigote aspirée par le phlébotome au cours d'un repas sanguin. Il s'agit d'un organisme allongé, d'environ 10 à 25µm de longueur. Le noyau est approximativement central. Le kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure promastigote procyclique. Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au pharynx et devient métacycliques (Handman, 2001). La durée de cette phase varie de 14 à 18 jours. Le parasite est régurgité par l'insecte au moment de son repas sanguin. C'est aussi la forme que l'on retrouve dans les milieux de culture. (Figure 3a, b).

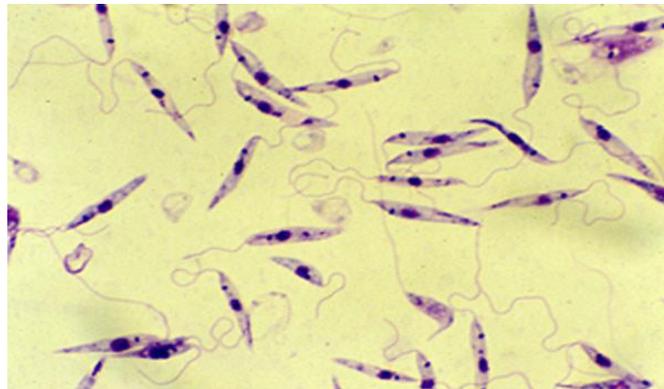


Figure 3a : Photo des formes promastigotes de *Leishmania* Gx100 colorées au Giemsa (IPA).

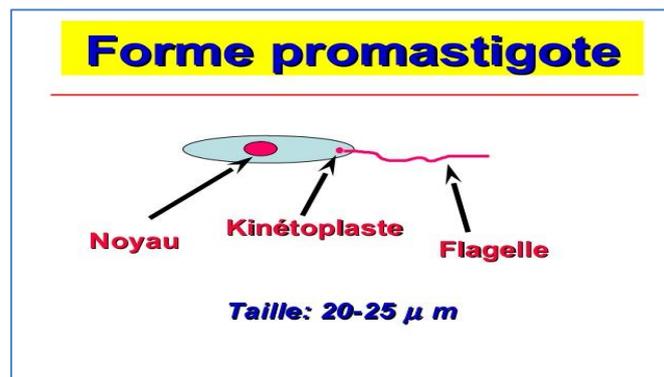


Figure 3b : Schéma représentant la forme promastigote (originale)

5.3. Organisation cellulaire

Les leishmanies sont des eucaryotes unicellulaires pourvus d'un organe spécifique aux kinétoplastidés, le kinétoplaste, situé en position antérieure. Il contient deux types de molécules

d'ADN, les maxi-cercles et les mini-cercles. La composition cellulaire des leishmanies inclue des organites plus classiques tels que le noyau, le flagelle et sa poche flagellaire ou encore l'appareil de golgi (Figure 4).

La membrane plasmique est composée principalement de glycolipides de haut poids moléculaire (GIPLs) et de protéines membranaires (Hide, 2004).

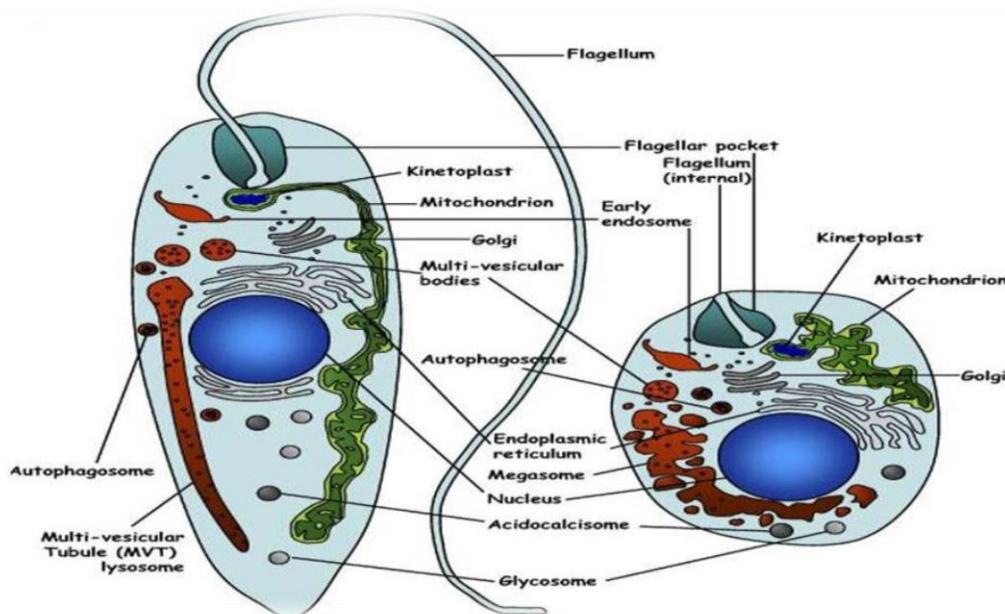


Figure 4 : Schéma de l'organisation cellulaire de *Leishmania*. (Bestiero *et al.*, 2007).

5.4. Cycle de vie

La leishmaniose est transmise à l'hôte définitif par la piqûre du phlébotome femelle, qui a joué le rôle d'hôtes intermédiaires (Figure 5). Les phlébotomes injectent la larve au stade infectieux, de promastigotes métacycliques, pendant le repas de sang (1). Les promastigotes métacycliques qui atteignent la plaie de piqûre sont phagocytés par les macrophages (2) et se transforment en amastigotes (3). Les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées et atteignent différents tissus, suivant (du moins en partie) l'espèce de *Leishmania* qui est impliquée (4). Ces spécificités d'atteinte tissulaires différentes sont la cause des manifestations cliniques qui diffèrent dans les diverses formes de leishmaniose. Les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (5.6). Dans l'intestin du phlébotome, les parasites se différencient en promastigotes (7), qui se multiplient et se différencient en promastigotes métacycliques et migrent dans la trompe du phlébotome (8) (« Cycle évolutif »). Le

parasite modifie l'odeur de son hôte, ce qui attire des phlébotomes qui vont eux-mêmes s'infecter et alors contribuer à véhiculer la maladie (O'Shea 2002).

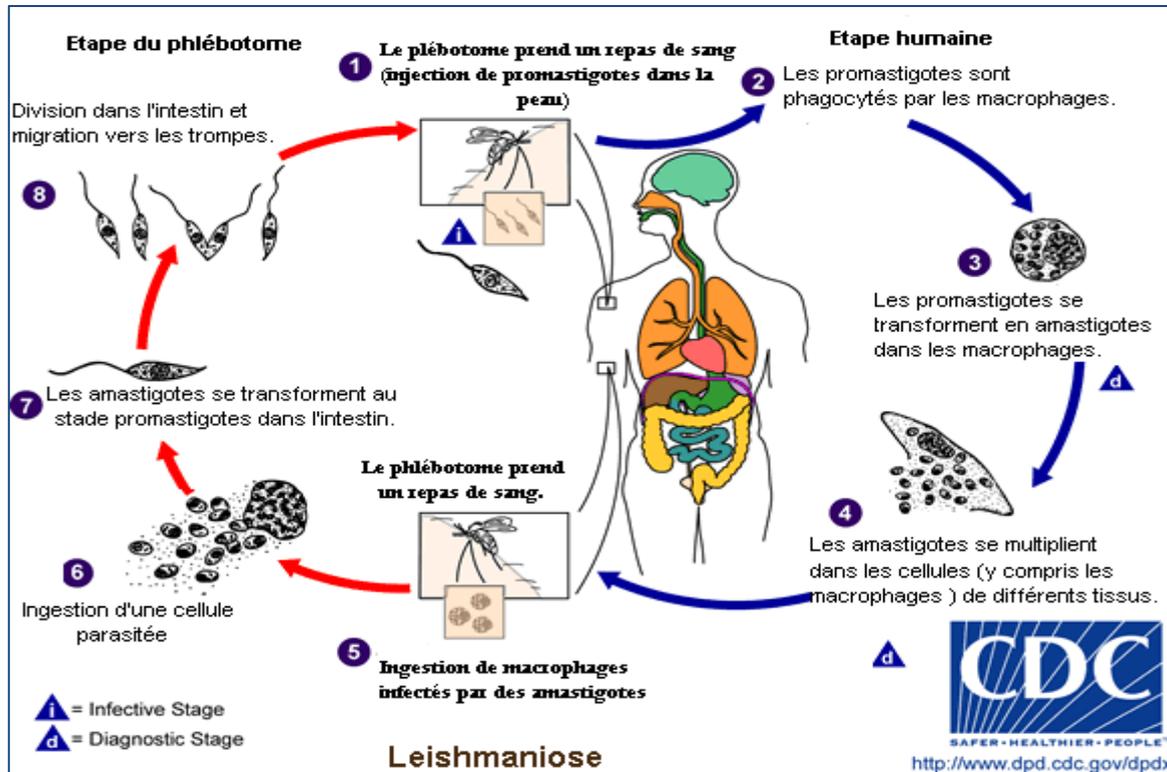


Figure 5 : Schéma du Cycle de vie du parasite *Leishmania*. (CDC, 2002).

5.5. Le vecteur de *Leishmania*

Les flagellés du genre *Leishmania* sont transmis par des insectes diptères de la famille des Psychodidae appartenant au genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde, et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Ripert, 1996). Les phlébotomes sont les vecteurs exclusifs dans la transmission des leishmanioses. L'adulte mesure 2 mm à 5 mm de longueur. Il est d'aspect « bossu » et à peine coloré. Le corps, les ailes et les pattes sont velues, les yeux sont nettement visible (Figure 6).

Les phlébotomes vivent dans les pays tempérés et tropicaux. Les adultes ont une activité crépusculaire et nocturne. Leur vol est silencieux. Seules les femelles sont hématophages. La pique est douloureuse car ces insectes dilacèrent les téguments avec leurs pièces buccales pour aspirer le sang (Ripert, 1996). Elles s'alimentent par tégumentophagie de sang et de lymphe. Ce repas peut s'effectuer de manière interrompue, à la suite de plusieurs piques, sur le même individu ou sur les des individus différents. Il faut noter que la salive inoculée est allergisante (érythème, douleur) et

participe activement à l'installation et à la multiplication des leishmanies chez l'hôte vertébré (Monteiro *et al.*, 2005).

La longévité de ces insectes est de l'ordre de quelques mois. Un cycle gonotrophique complet dure environ six semaines. La femelle ne prend qu'un seul repas sanguin par cycle (Leger et Depaquit, 1999).



Figure 6 : Photo d'un Phlébotome femelle. (Poinsignon, 2005).

5.6. Les réservoirs du parasite

Ce sont les animaux sauvages et domestiques (en particulier les chiens errants); les commensaux (rats); les hommes.

Il existe deux entités :

- La forme zoonotique, avec le chien comme principal réservoir de parasites (Bassin méditerranéen, Moyen Orient, Brésil). La leishmanie en cause est *L. infantum*,
- La forme anthroponotique où l'homme est la seule source d'infection pour le vecteur (Inde, Soudan, Soudan du Sud). La leishmanie en cause est *L. donovani*. Le nom de kala-azar vient de l'Inde (Syndar *et al.*, 2010).

6. Aspects génétiques de *Leishmania*

6.1. Le Génome de *Leishmania*

Comme tous les kinétoplastidés, les *Leishmanias* possèdent deux types de génome : un génome nucléaire et un génome kinétoplastique (Clayton *et Shapira*, 2007).

6.1.1. Le génome kinétoplastique

Le kinétoplaste représente de 10 à 20% de l'ADN total de la cellule et il est considéré comme un ADN mitochondrial. C'est en effet une portion particulière de l'unique mitochondrie, il est constitué de deux types de molécules d'ADN circulaire : les maxi-cercles (environ de 10 à 30 par cellule) et les mini-cercles (de 5000 à 10 000 par cellules) entrelacés les uns dans les autres constituant un réseau complexe et condensé (Ivens *et al*, 2005).

Les maxi-cercles d'une taille 20 à 40 kb selon les espèces sont identiques dans un même réseau, et sont équivalents de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. Ils contiennent des gènes classiques de la mitochondrie qui codent pour l'ARN ribosomique (ARN_r) , des gènes qui codent pour les petits ARN appelés ARN guide (ARN_g), qui interviennent dans un processus très original de modification post transrionnelle de la séquence de l'ARNm appelé l'ARN éditng, et codent aussi pour des gènes de la chaîne de transports des électrons ((cytochrome oxydase, complexe NADH déshydrogénase ...)) (Gott, 2003).

Les mini-cercles d'une taille inférieure à 1 Kb, codent également pour des ARNg. Mais contrairement aux maxi-cercles, leur séquences sont très variables au sein d'une même espèce et aussi d'une espèce à l'autre (Ivens *et al.*, 2005).

6.1.2. Le génome nucléaire

Leishmania est essentiellement diploïde car elle porte deux copies de la plupart de ses chromosomes homologues (Peacock *et al.*, 2007 ; Ivens *et al.*, 2005 ; Rogers *et al.*, 2011 ; Bastien *et al.*, 1998 ; Mannaert *et al.*, 2012). Cependant, il existe de plus en plus des études suggérant que l'aneuploïdie peut se produire chez certaines espèces de *Leishmania*. (Rogers *et al.*, 2011 ; Mannaert *et al.*, 2012 ; Sterkers *et al.*, 2012). Tandis que Le nombre de copies des chromosomes peuvent varier considérablement selon les souches et les espèces provenant de différentes régions géographiques.

Le nombre de chromosomes chez *Leishmania* est resté longtemps indéterminé à cause de l'absence de condensation au cours de cycle cellulaire. Grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé, il a été possible de visualiser les chromosomes de *Leishmania*. Son génome mesure d'environ 35 Mb est distribué sur 36 chromosomes dont la taille varie de 0.3 à 2.8 Mb. Il faut noter que certaines espèces n'ont que 34 à 35 chromosomes mais la complexité du génome est conservée (Britto *et al.*, 1998 ; Peacock *et al.*, 2007).

6.2. Le séquençage du génome de *Leishmania*

Le projet de séquençage de *Leishmania* a pris forme lors d'une réunion à Rio de Janeiro en 1994 (Ouellette *et al.*, 2003), et il a débuté avec la souche *Leishmania major* et qui a été complété en 2005, suivi par le séquençage des génomes de *L. infantum* et *L. braziliensis* qui a été achevé en 2007 (Peacock *et al.*, 2007).

Le séquençage a permis d'établir le nombre de chromosomes de plusieurs espèces de *Leishmania*. (Wincker *et al.*, 1996) Les caryotypes moléculaires des espèces de *Leishmania* du Vieux Monde *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major* et *L. tarentolae* comprennent chacune 36 chromosomes. (Wincker *et al.*, 1996), alors que les espèces du Nouveau Monde, *L. braziliensis*, et *L. mexicana* ont respectivement 34 et 35 chromosomes, en raison des événements de fusion des chromosomes 20 et 34 dans ces derniers (Britto *et al.*, 1998 ; Peacock *et al.*, 2007).

L'une des caractéristiques du génome de *Leishmania* est sa richesse en guanine/cytosine (G/C) : elle atteint en moyenne 60% dans les régions codantes. Le génome comporte de 60 à 65 % de séquences uniques, 13% de séquences moyennement répétées et environ de 12 % de séquences fortement répétées (Tableau 1). Ivens et ses collaborateurs décrivent 8272 gènes codant des protéines, 911 gènes d'ARN et 39 pseudo-gènes (Ivens *et al.*, 2005).

Tableau 1: Caractéristiques du génome de certaines espèces de *Leishmania* utilisés dans notre étude.

Facteurs	<i>L.major</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.amazonensis</i>
Nombre de chromosome	36	36	34
Taille de chromosome (Mb)	0.27-2.68	0.28-2.67	29.6
Taille total de GC contenu (Mb) %	59.72	59.58	58.5
Les gènes codant les protéines	8400	8199	8100

7. Le traitement de la leishmaniose

La thérapeutique des leishmanioses n'a connu que certains changements limités depuis de nombreuses années. Le traitement des leishmanioses reste complexe, en raison de la multiplicité des formes cliniques, des différentes espèces de *Leishmania* et de leur sensibilité variable aux traitements antileishmaniens, ainsi que le nombre restreint de produits disponibles. Il est dominé depuis les années 1920 par les dérivés stibiés à la fois pour le traitement des formes viscérale et cutanée.

Pour la LV, l'accroissement des cas de co-infection LV/SIDA et l'apparition des résistances aux antimoniés (Croft *et al.*, 2006), ont conduit à utiliser l'Amphotéricine B, surtout sous sa forme liposomale, en première intention dans de nombreux pays. Le Miltéfosine, premier antileishmanien oral, très efficace en Inde où elle est utilisée en première ligne, est également un des médicaments essentiels (Dhillon *et al.*, 2008). La Pentamidine n'est plus utilisée que dans certaines formes de LC. L'utilisation délicate de ces molécules, compte tenu de leur voie d'administration parentérale et leur toxicité, ont conduit à de nouveaux essais thérapeutiques, mais il n'existe pas de produit réellement nouveau en développement. Des produits comme l'Aminosidine ou les Imidazolés peuvent se positionner en seconde intention dans certaines formes de leishmanioses.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a recommandé l'utilisation des traitements locaux tel que la Paromomycine en pommade et l'infiltration des lésions avec les antimoniés comme un traitement de première intention pour les cas de LC sans complication (Firdessa *et al.*, 2015).

En Algérie, le ministère de la Santé a recommandé l'utilisation de Glucantime® en intramusculaire ou en péri-lésionnelle comme un protocole de traitement de la LC et de la LV, dans le cas de non réponse, il est recommandé d'utiliser l'Amphotéricine B (Fungizone®) par voie intraveineuse (Eddaikra *et al.*, 2013).

7.1. Les Sels d'antimoine pentavalent

L'antimoine pénètre dans la cellule hôte (macrophage), traverse la membrane phagolysosomale et va ainsi agir contre le parasite intracellulaire. Les premiers travaux ont suggéré que les antimoinés agissent probablement en inhibant la glycolyse et l'oxydation des acides gras (Sereno *et al.*, 1998). Des travaux récents ont montré que l'antimoine tue le parasite par le mécanisme d'apoptose impliquant la fragmentation de l'ADN (Ashutosh *et al.*, 2007).

Le mécanisme de résistance est la diminution de la concentration active de médicament dans la cellule parasitaire. Le parasite peut réduire la concentration de médicament par plusieurs

mécanismes : dont une diminution de l'absorption, une augmentation de l'efflux, une inhibition de l'activation du médicament, une inactivation du médicament actif par métabolisme ou séquestration, et enfin en développant un mécanisme de dérivation. Le mécanisme de la résistance à l'antimoine apparaît comme étant multifactorielle (Croft *et al.*, 2006 ; Ashutosh *et al.*, 2007).

7.2. Recherche de nouvelle alternative thérapeutique

L'augmentation de la résistance à l'antimoine et aux autres molécules thérapeutique, le cout élevé du traitement par l'Amphotéricine B liposomale, a soulevé un problème sérieux qui nécessite le développement de nouvelle alternative thérapeutique antileishmanien (Croft *et al.*, 2006) qui peuvent être à base d'extrait de plante ou bien certaine molécule de synthèse (Loo *et al.*, 2017). Parmi les nouvelles thérapies locales, efficaces et simples, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le dioxyde de chlore ClO₂ qui ont des effets antiviraux et antimicrobiens et anti-leishmaniens (Jebran *et al.*, 2014).

8. Les dommages de l'ADN

Les dommages à l'ADN peuvent être générés directement ou indirectement par l'exposition aux agents chimiques et physiques de (radiations UV, radiations ionisantes, contaminants chimiques...) (Samson *et al.*, 1996). Des dommages endogènes existent également, mais à un degré moindre, du fait d'erreurs de la réplication , des mécanismes de réparation (Speit *et al.*, 1998), d'instabilités en conditions physiologiques de certaines liaisons, de l'accumulation ou de la production de métabolites et d'intermédiaires métaboliques cellulaires réactifs, et de la génération au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Eastman et Barry, 1992).

Les conséquences biologiques des lésions à l'ADN sont les suivantes :

- Elles peuvent induire la mort cellulaire.
- Les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent restaurer la structure de l'ADN endommagé.
- Une mutation peut apparaître ou persister à l'issue des processus de réparation inopérants ou défailants.

Les dommages à l'ADN représentent la cause majeure d'apparition des mutations au sein des génomes cellulaires (Moustacchi, 2000). On admet aujourd'hui que ces mutations participent à l'initiation de la cancérogenèse chez les vertébrés, à l'apparition de genotoxic diseases syndrome chez les invertébrés, à l'embryotoxicité et à la tératogenèse.

Dans le cas d'un agent génotoxique, l'exposition peut se traduire par différentes modalités consécutives : induction de dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation du génome, mutation génique, altération chromosomique, mort cellulaire, processus de tumorigénèse, nécrose, inaptitude à la reproduction, susceptibilité aux maladies, létalité, voire atteinte des populations. Ces modifications pourront être observées aux niveaux moléculaire, cellulaire, tissulaire ou de l'organisme, voire des peuplements.

Les dommages à l'ADN, se situent en amont des mutations géniques et chromosomiques et restent susceptibles d'être pris en charge par les mécanismes de réparation (Léonard, 1990 ; Friedberg, 1995 b ; Moustacchi, 2000).

9. Etude des dommages de l'ADN par le test des comètes

Le test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Il permet d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les cassures d'ADN simple et double-brin et les sites alcali-labiles (Collins *et al.*, 2001). Ces cassures sont induites soit directement par un agent génotoxique et indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages (Collins *et al.*, 2003) ou lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose (Collins *et Dusinská*, 2002). Le test de la comète est un test simple et rapide pour évaluer les dommages de l'ADN dans les cellules eucaryotes (Speit *et al.*, 2009). Il est également utilisé par les chercheurs pour l'évaluation des dommages de l'ADN dans les cellules germinales du sperme (Baumgartner *et al.*, 2009; Perrin *et al.*, 2007; Preaubert *et al.*, 2016) et dans les ovocytes aussi (Berthelot-Ricou *et al.*, 2013, 2011a; Courbiere *et al.*, 2013; Einaudi *et al.*, 2014).

Cette technique peut détecter les ruptures d'ADN à double et unique brin et les sites labiles alcalins dans des cellules individuelles et une réparation incomplète des sites d'excision (Singh., 2000).

9.1. Historique

Cette technique fut mise au point en 1984 par Osting O et Johanson K dans le but de détecter les cassures doubles brins de l'ADN. La lyse et l'électrophorèse fut effectuées dans des conditions neutres et la coloration avec de l'acridine orange (l'acridine se lie à l'ADN et à l'ARN grâce à ses propriétés d'intercalation). Elle fut ensuite optimisée par Singh et col. en 1988 afin de détecter les cassures simples brins et les sites alcali-labiles. Actuellement, l'électrophorèse se réalise dans des conditions fortement alcalines afin de relaxer et de détendre l'ADN super enroulé (Tice *et al.*, 2000).

9.2. La préparation des lames

Le principe du test des Comètes consiste à inclure la suspension de cellules individualisées, l'ensemble étant déposé sur des lames de microscopie. En réalité, il ne s'agit pas d'un simple dépôt sur lame de microscope. Ce mélange cellules-agarose est inclus «en sandwich» entre deux autres couches de gel d'agarose.

- la première couche d'agarose (à point de fusion normal) doit permettre d'assurer l'adhérence de la totalité du « sandwich » à la lame.
- la seconde couche est constituée du mélange entre la suspension de cellules individualisées et l'agarose à bas point de fusion, ce dernier ayant l'avantage d'être liquide à 37°C (température optimale pour la viabilité des cellules) et permet de réaliser un mélange homogène.
- La dernière couche est facultative ; elle permettrait de «protéger» davantage le tout, évitant une perte de cellules voire de fragments d'ADN.

9.3. La lyse

Les échantillons de cellules à analyser par le protocole de dosage de la comète standard sont intégrés dans 1% d'agarose à faible point de fusion (concentration finale) sur des lames et lysés pour un minimum de 1 heure à 4 ° C (Forchhammer *et al.*, 2012).

Lorsqu'une cellule est soumise à une solution de lyse contenant un détergent, le détergent rendra la cellule perméable en dissociant la double couche de phospholipides membranaires, tandis que la solution saline dissociera les histones de l'ADN soit plus de 95 % des protéines nucléaires (Fairbairn *et al.*, 1995).

De cette façon, bien que la plupart des auteurs préconisent une durée d'une heure, temps minimum pour lyser la membrane cytoplasmique, la lyse pourrait être prolongée pendant des mois sans provoquer de lésions supplémentaires. Lors de cette étape, les membranes cellulaires, nucléaires, et les protéines liées à l'ADN sont éliminées (Tice *et al.*, 2000).

9.4. La dénaturation

L'étape de dénaturation permet le relâchement de la molécule d'ADN suivi par son déroulement et par la dénaturation de l'ADN double-brin, c'est-à-dire la séparation des deux brins ; l'ADN devient alors simple-brin ou monocaténaire. L'augmentation de pH est un agent dénaturant car il modifie les charges portées par les groupements chimiques engagés dans les liaisons hydrogènes qui maintiennent la structure en double hélice.

Dans la mesure où la solution de déroulement est la même que la solution d'électrophorèse, cette étape permet aussi qu'un équilibre s'établisse entre la solution et le gel d'agarose avant la réalisation de l'électrophorèse (Miyamae *et al.*, 1997).

9.5. L'électrophorèse

La solution tampon utilisée est identique à celle de la phase de dénaturation. Par rapport aux techniques conventionnelles, l'exécution de l'électrophorèse en comète ne requiert qu'un temps court, une faible tension et une faible intensité. Ainsi l'électrophorèse est, comme la dénaturation, réalisée à pH alcalin (pH > 13), pendant 20 minutes, à 25 V et 300 mA. Ainsi les fragments d'ADN vont migrer dans le gel selon leur taille. (Tice *et al.*, 2000). Selon Tice (Tice *et al.*, 2000) recommande une réalisation à + 4°C pour garantir une bonne reproductibilité.

Le test peut également être effectué à pH neutre. En effet, si l'objectif de l'étude à pH alcalin est de détecter les cassures simples et double-brin, lorsque le test est effectué à pH neutre, seules les cassures double-brin sont détectées. Cette variante est en conséquence beaucoup moins utilisée. Notons qu'à pH neutre, le test ne permet pas de dénaturation de l'ADN double-brin.

De ce fait au cours de l'électrophorèse, la présence de protéines liées à la molécule d'ADN ralentit la migration à travers le gel. Une faible tension de courant d'électrophorèse ne permet pas aux nucléotides de se relâcher et aux extrémités endommagées de l'ADN chargées négativement de s'étirer vers l'anode.

Enfin en condition neutre, la forme de la comète est également différente. La queue de la comète n'est pas constituée de fragments d'ADN comme c'est le cas en condition alcaline, mais correspond aux boucles d'ADN relâchées encore liées à la matrice nucléaire. C'est pourquoi la méthode en condition alcaline est celle recommandée dans les propositions de lignes directrices de Tice et son équipe (Tice *et al.*, 2000).

9.6. La neutralisation

Après électrophorèse, les lames ont été prélevées dans le réservoir et ont lavé trois fois dans le tampon de neutralisation (Tris 0,4 M, pH=7,5) pendant 5 min (Liang *et al.*, 2017).

9.7. La coloration

Les lames peuvent être lues en l'état immédiatement, une fixation à l'alcool méthanol (Silva Da Silva, 2014). La fixation a pour but de déshydrater les lames, afin de permettre une conservation plus longue, évitant ainsi la diffusion de l'ADN à travers la matrice du gel d'agarose au fil du temps. La coloration est réalisée par un fluorochrome soit : le Bromure d'Ethydium (BET) (Ostling et Johanson, 1984, Singh *et al.*, 1988), l'Iodure de Propidium (IP) (Olive *et al.*, 1991), Giemsa-stained (Osipov *et al.*, 2014). Ces fluorochromes permettent d'obtenir des images de très bonne qualité (Osipov *et al.*, 2014).

9.8. L'analyse des lésions

La lecture des lames se fait immédiatement après la coloration et toujours à l'obscurité. L'analyse des lésions de l'ADN se fait alors sous un microscope à fluorescence, reliée à un système informatique d'analyse d'image. En l'absence de logiciel, les dommages sont analysés qualitativement, en classant visuellement les comètes obtenues en fonction de leur aspect. (Avishai *et al.*, 2003). Pour chaque cellule sélectionnée (Figure 7) , un cadre de mesure est créé permettant de délimiter la tête et la queue de la comète, de mesurer l'intensité de fluorescence et le bruit de fond.

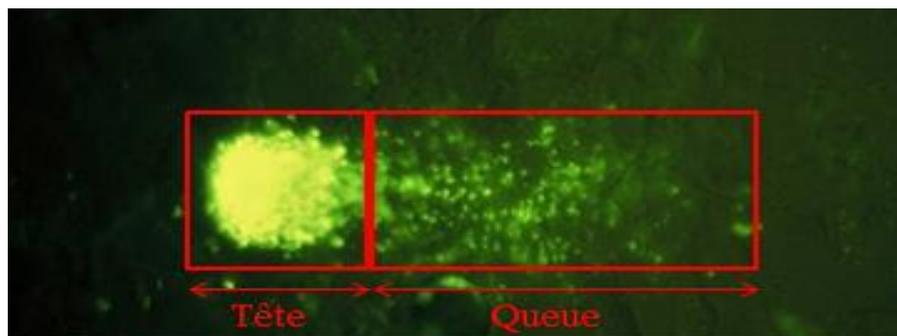


Figure7 : Une comète sélectionnée originale (Originale).

Matériels
Et
Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'EEPGP de l'IPA du service éco-épidémiologie parasitaire

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

- **Le parasite**

Les souches des espèces de *Leishmania* à tropisme cutanée faisant l'objet de notre étude, ont été décongelées à partir de la cryobanque du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie. Les cinq souches utilisées figurent dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des espèces de *Leishmania* étudiées.

Code	Espèces	Forme clinique
LIPA 100/09	<i>Leishmania major</i>	LC
LIPA 15/05	<i>Leishmania infantum</i>	LC
LIPA 281/11	<i>Leishmania killicki</i>	LC
K27	<i>Leishmania tropica</i>	LC
LEM 2248	<i>Leishmania amazonensis</i>	LC

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Equipements

Appareillage : Microscope optique (Motic), Bec benzène, Incubateur (Immovems), Bain Marie (Mettler), Hotte à flux laminaire (Faster), Centrifugeuse (Eppendorf), Microcentrifugeuse (Warning), Agitateur (Fisherbrand), Cuve d'électrophorèse (A A Hofer), Générateur de courant (Consort), pH-mètre (Mettler Toledo), Microscope à fluorescence (ZEISS), Incubateur à 25°C (Mettler).

Réactifs : PBS (Phosphate Buffer Saline), SYBR Green I, Bleu de Trypan, Formol, H₂O₂ à 30%, DAC à 4.5 %, Low Melting Agarose (LMA), Normal Agarose (NA), HCl, BET Ethanol absolu.

Le petit matériel utilisé lors de ce travail est le matériel courant de laboratoire : Micropipettes, pipettes stériles à usage unique (1ml, 5 ml et 20 ml), poire, pipetus, lames porte objet, portoirs, lamelles, tubes stériles, tubes coniques, micro tubes (Eppendorf), lame de numération cellulaire de Thoma, Microplaque de 96 puits stériles à fond plat, barreaux magnétiques, parafilm.

Verrerie : Entonnoir, Bécher, Erlenmeyer, Eprouvette graduée (20ml, 100 ml, 1000 ml), fiole jaugée.

1.2.2. Les milieux de culture

Les milieux de culture ayant servi dans l'entretien, la croissance et la multiplication des souches étudiées sont les milieux NNN et le milieu RPMI 1640.

Le milieu NNN : La culture sur milieu NNN biphasique (Nicolle Mac Neal Novy 1904), a pour but d'entretenir les souches étudiées. Il assure la multiplication du parasite sous sa forme extracellulaire (forme promastigote). Les cinq souches ont été cultivées sur milieu NNN incubé à 25°C. La prolifération sur milieu NNN nécessite 5 à 7 jours d'incubation, pour cela les promastigotes ont été repiqués chaque 5 jour sur NNN, après vérifications des cultures par examen direct de la suspension parasitaire.

Le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut) supplémenté de 10 % de Sérum de veau fœtal (SVF), a été préparé au niveau du laboratoire d'EEPGP de l'IPA. Pour augmenter la densité de la suspension parasitaire, les promastigotes ont été repiqués sur Milieu RPMI, à 10% de SVF. Les cultures ont été préparées dans des tubes stériles et incubées à 25°C.

2. Méthodes

2.1. La culture du parasite

Les souches utilisées ont été décongelées avant leur utilisation par chauffage à 37°C puis ensemencées dans le milieu NNN.

2.2. Sur milieu NNN

Le milieu NNN est un milieu semi solide, à base de gélose de sang de lapin, utilisé pour l'isolement et l'entretien des leishmanies. Les souches ont été ensemencées avec quelques gouttes d'eau physiologique à 9 % et incubées à 25°C pendant 5 à 10 jours.

2.3. Sur milieu RPMI 10 SVF

Après 5 jours d'incubation à 25°C, les leishmanies, en phase exponentielle ont été repiquées du milieu NNN au milieu RPMI supplémenté de SVF à 10 %.

2.4. Observation microscopique

Chaque observation microscopique est basée sur le contrôle et le comptage visuel des souches de *Leishmania*, le contrôle est basé sur trois critères:

- La richesse des milieux en parasites.
- L'absence de contamination.
- Et l'observation de la mobilité des parasites.

Ce contrôle des souches a été effectué sur les deux milieux utilisés : le NNN et le RPMI 10 SVF. Toutes les souches de *leishmania* sont sélectionnées selon le tableau 3.

Tableau 3 : Principe de comptage de parasite par champ.

Richesse	Signification
+/-	Un parasite par champ
+	Deux parasites par champ
++	Cinq à dix parasites par champ
+++	Vingt parasites par champ
++++	Plus de 20 parasites par champ

2.5. Comptage et viabilité

Après concentration des suspensions parasitaires par centrifugation à 2500 tr/min, la numération cellulaire a été faite par la cellule de Thomas (Annexe III). Par ailleurs, une évaluation de la viabilité a été faite par le bleu de Trypan à 0.4%.

3. La technique des Comètes

La technique des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Elle permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, qui dans notre étude sont le H₂O₂ et DAC. Cette technique d'électrophorèse de noyaux de cellules isolées en microgels d'agarose, permet la détection des coupures simple et double-brin (McKelvey-Martin *et al*, 1993).

3.1. Les Solutions du Test des Comètes

Dans un premier temps, nous avons préparé les différentes solutions nécessaires au Test des Comètes. Les solutions utilisées figurent en Annexe II (PBS, NA, LMA, Tampon de lyse pH=10, Tampon d'électrophorèse pH= 13, Tampon de neutralisation pH=7.5 et la solution de coloration SYBER Green I.

3.2. Gels d'Agarose

Deux types de gel ont été utilisés : un gel à point de fusion normal (NA = Normal Agarose) à 0.7% et un gel à bas point de fusion (LMPA = Low Melt Point Agarose) à 0.75%. Ils ont été préparés dans du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺, afin d'inhiber l'activité endonucléasique Ca²⁺- Mg²⁺ des cellules.

3.3. Préparation des lames

Des lames portes objets en verre ont été utilisées comme support pour le gel d'agarose. Elles ont été refroidies à -22°C, la veille de leur utilisation. Elles ont été ensuite recouvertes d'une première couche d'Agarose NA à 0.75%, puis d'une deuxième couche d'Agarose LMPA à 0.1% contenant 50 µl de la suspension cellulaire à étudier et recouverte d'une lamelle.

3.4. Lyse cellulaire

L'étape d'inclusion des cellules terminée, les lamelles ont été retirées délicatement. Les lames ont été ensuite plongées dans un bac opaque contenant le tampon de lyse additionnée extemporanément de DMSO et de Triton X100. Le pH de solution finale est à 10 et la lyse se déroule à +4 C° pendant 1h.

3.5. Déroulement de l'ADN

Suite à la lyse, les lames ont été rincées dans le tampon d'électrophorèse. Puis déposées dans la cuve d'électrophorèse. Le déroulement de l'ADN a lieu dans le tampon d'électrophorèse (pH=13) durant 30 minutes. Cette étape a été réalisée en conditions alcalines. Le pH élevé du tampon permet la visualisation des coupures simple-brin et double brin, dans des conditions neutres ne permettant que la détection des lésions double-brin.

3.6. Electrophorèse

Le Tampon d'électrophorèse est identique au tampon de déroulement, le pH étant à 13. L'électrophorèse ne requiert qu'un temps de migration court de 30 min à +4°C. Le générateur délivre une faible tension de 25 V à 300 mA, étant donné que la formation d'une comète ne demande en fait qu'un déplacement court de l'ADN.

3.7. Neutralisation

A la fin de la migration électrophorétique, les lames ont été plongées dans la solution de neutralisation à pH 7,5 pendant 5 minutes à +4°C. L'opération a été renouvelée une fois. Cette étape est importante pour la lecture des lames. Elle permet de rétablir des appariements ponctuels des brins d'ADN et d'éliminer les alcalins et les détergents susceptibles d'interférer avec la fixation de l'agent intercalant utilisé, qui dans notre cas est le SYBR GREEN I. Après neutralisation les lames ont été rincées par de l'eau distillée froide et séchées à l'air libre.

3.8. Fixation et déshydratation

La dernière étape avant la coloration consiste en une déshydratation des lames dans l'éthanol pendant 15 min.

3.9. Coloration des lames

Les lames ont été plongées dans une solution de coloration, pendant 15 min à +4°C à l'obscurité. Après coloration par le SYBR GREEN, elles ont été ensuite rincées par l'eau distillée froide et séchées à l'air libre.

3.10. Lecture des lames

La lecture des lames se fait immédiatement après la coloration et toujours à l'obscurité. L'analyse des lésions de l'ADN se fait alors sous un microscope à fluorescence aux grossissements Gx10 et Gx40. Les dommages ont été analysés qualitativement, en classant visuellement les comètes obtenues en fonction de leur aspect.

Les cellules sont sélectionnées une à une en balayant la lame sous le microscope. En effet, la lecture d'une lame consiste à observer aléatoirement (au grossissement de 400 x) et analyser 100 comètes, en balayant la lame dans un sens unidirectionnel, en évitant toujours les bords.

3.11. Classement des comètes

Les comètes obtenues sont classées visuellement en cinq types selon le degré des dommages de l'ADN (Smith AJO *et al.*, 2007) de (1) à (5)

1. ADN intact (Dom 1).
2. ADN peut endommager (Dom 2).
3. ADN fortement endommagé (Dom 3).
4. Cellule fantôme (Dom 4).
5. ADN complètement endommagé (Dom 5).

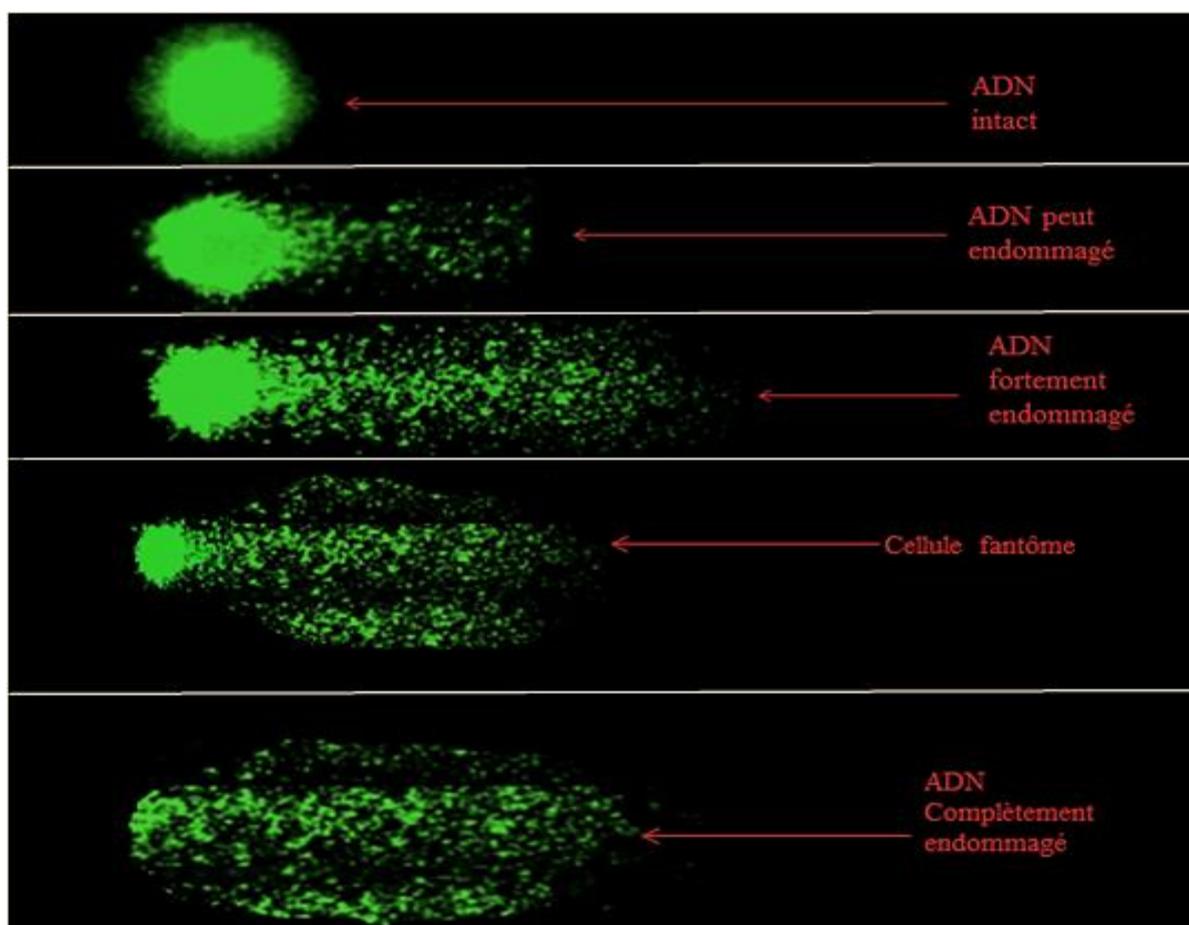


Figure 8: Les cinq types des comètes obtenues colorées par SYBER Green I Gx400 (originale).

4. Mise au point du test des comètes pour l'étude de *Leishmania*

Afin, de mettre au point les différents paramètres de la technique des comètes pour la détection des dommages d'ADN de *Leishmania*, nous avons modifié plusieurs paramètres pour la mise au point de la technique.

4.1. Protocole 1 (Concentration parasitaire optimale)

Afin de déterminer la concentration adéquate de *Leishmania* pour la technique des comètes, nous avons testé trois concentrations de 10^4 , 10^5 et 10^6 cellules/ml avec la technique des comètes. Deux souches ont été utilisées : LIPA 281/11 (*L. killicki*) et LEM 2248 (*L. amazonensis*). De plus, nous avons aussi utilisé différentes compositions des tampons de lyse, d'électrophorèse et de neutralisation (annexe II).

Les étapes de protocole

Les lames ont été préparées 24h avant la réalisation du test, les lames ont été composées par un mélange volume à volume de LMA et les différentes dilutions de la suspension cellulaire C1, C2, C3. Cette solution a ensuite été déposée à la surface des lames. Ces dernières, ont été recouvertes par des lamelles. Par la suite, ces lames sont incubées durant 5 min à +4° C. Puis, les lamelles ont été retirées. Pour la lyse, les lames ont été incubées pendant 24h dans un tampon de lyse à +4 ° C. L'électrophorèse a été réalisée pendant 30 min à 20 V, à température ambiante et dans la lumière. Les lames ont été ensuite neutralisées pendant 5 min dans le tampon de neutralisation, et suivies par un rinçage avec H₂O_D. Les lames ont été colorées avec le BET pendant 15 min.

4.2. Protocole 2 (Modification des tampons)

Dans ce protocole nous avons testé quatre concentrations de 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 cellules/ml avec la technique des comètes. La souche étudiée : LIPA 100/09 (*L. Major*). De plus, nous avons modifié la composition des tampons de lyse, d'électrophorèse et de neutralisation (annexe II).

Les étapes de protocole

Les lames ont été préparées 1h avant de réaliser le test. Les lames ont été composées de LMA V= 50µl qui a été mélangé avec la suspension cellulaire C₁, C₂, C₃, C₄, V=50 µl, déposée sur lames. Les lames ont été recouvertes par des lamelles. Les lames ont été incubées à +4°C pendant 5 min. Pour la lyse, les lames ont été incubées 1 h à +4°C dans le tampon de lyse. Suivi d'une électrophorèse pendant 30 min à 20 V à température ambiante dans la lumière. Puis la neutralisation pendant 5 min, et le rinçage avec H₂O_D. Les lames ont été colorées avec SYBR Green pendant 30 min à l'obscurité puis rinçage avec H₂O_D et finalement la lecture des lames sous le microscope à fluorescence.

4.3. Protocole 3 (Modification des conditions)

Dans ce protocole, nous avons testé les deux concentrations 10^5 et 10^6 cellules/ml avec la technique des comètes. La souche étudiée est la K27 (*L. tropica*). A partir de l'étape de lyse, toutes les étapes se sont déroulées à l'obscurité et à $+4^\circ\text{C}$. De plus, la durée de l'électrophorèse a été réduite à 20 min, à 25 V. Le temps de coloration a été diminué à 15 min, et on a rajouté l'étape de fixation et déshydratation des lames par l'éthanol.

Les étapes de protocole

Les lames ont été préparées 1h avant de réaliser le test. Les lames ont été composées de LMA V= 50 μl qui a été mélangé avec la suspension cellulaire C_1 , C_2 , V=50 μl , déposée sur lames. Ces lames ont été recouvertes par des lamelles. Les lames ont été ensuite incubées à $+4^\circ\text{C}$ pendant 5 min. Suit l'incubation dans le tampon de lyse pendant 1 h à $+4^\circ\text{C}$ et dans l'obscurité. L'électrophorèse a été effectuée pendant 20 min à 25 V dans l'obscurité et à $+4^\circ\text{C}$. Les lames ont été colorées avec le SYBR Green pendant 15 min à l'obscurité puis rincées avec H_2O_D et le séchage des lames à l'air libre, et finalement la lecture des lames sous le microscope fluorescence.

5. Traitement des leishmanies par le H_2O_2 et DAC

Afin de déterminer et de comparer l'effet génotoxique du DAC et du H_2O_2 , les suspensions parasitaires des différentes espèces de Leishmania étudiées : *L. major*, *L. infantum*, *L. killecki* et *L. tropica*, ont subi différents traitements par le DAC et le H_2O_2 . Deux concentrations de 100 μM et de 10 μM , de chaque produit ont été mises en contact avec une concentration de 3×10^6 parasites/ml pour chaque souche. La durée du contact était de 1h à l'obscurité et à $+4^\circ\text{C}$.

Résultats

Les résultats de cette étude sont divisés en deux parties. Dans la première partie, nous rapporterons les résultats de la mise au point du test de COMET pour les formes promastigotes de *Leishmania*, avec modification de certains paramètres de la technique. Dans la deuxième partie, nous évalueront la génotoxicité du H₂O₂ et du DAC sur les formes promastigotes de 5 espèces de *Leishmania* à tropisme cutanée.

1. Résultats de la mise au point du test des comètes pour *Leishmania*

1.1. Résultats de l'observation microscopique

Avant de sélectionner les souches pour le test de COMET, les cultures de parasites devaient réunir certaines caractéristiques. L'observation de l'état des cultures au microscopique, nous a permis de contrôler la mobilité, la richesse et l'absence de contamination. Les cultures contaminées, ou avec un nombre insuffisant du parasite, ou bien immobiles sont toutes éliminées. Les résultats obtenus sur les deux milieux, pour les 5 espèces sont regroupés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Résultat de contrôle de *Leishmania* étudiées sur milieu NNN

Souches étudiées	Comptage		Contamination	
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2
<i>L. infantum</i> : Lipa 15/05	+++	+++	-	-
<i>L. major</i> : Lipa 100/09	++	+++	-	-
<i>L. tropica</i> : K27	+++++	+++	-	-
<i>L. killicki</i> : Lipa 281/11	++	+++	-	-
<i>L. amazonensis</i> : LEM 2248	+++	++++	-	-

Tableau 5 : Résultat de contrôle de *Leishmania* étudiées sur milieu RPMI 10 SVF

Souches étudiées	Comptage		Contamination	
	Tube 1	Tube 2	Tube 1	Tube 2
<i>L. infantum</i> : Lipa 15/05	+++++	++++	-	-
<i>L. major</i> : Lipa 100/09	++++	+++++	-	-
<i>L. tropica</i> : K27	+++++	+++	-	-
<i>L. killicki</i> : Lipa 281/11	++++	+++	-	*
<i>L. amazonensis</i> : LEM 2248	+++++	+++++	*	-

(-) Absence de contamination, (*) Présence de contamination.

1.2. Résultats de la mise en points du test de COMET sans inhibiteurs

Les résultats des 3 protocoles de mise au point pour les formes promastigotes de *Leishmania* sont regroupés dans les tableaux 6, 7 et 8.

Tableau 6 : Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 1)

Souches	Concentrations	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
<i>L. killicki</i>	10^6	0	0	0	0	0
	10^5	0	0	0	0	0
	10^4	0	0	0	0	0
<i>L. amazonensis</i>	10^6	0	0	1	0	0
	10^5	0	0	0	0	0
	10^4	0	0	0	0	0

(Dom) Dommage

Les résultats du protocole 1 sur 2 espèces de *Leishmania* montrent, l'absence des comètes pour l'espèce *L. killicki*, et une seule comète fortement endommagée pour *L. amazonensis* à une concentration de 10^6 . Ces résultats montrent que les modifications apportées par le protocole 1 ne sont pas concluantes.

Tableau 7: Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 2)

Souche	concentrations	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
<i>L. major</i>	10^6	0	0	0	0	0
	10^5	0	0	0	0	0
	10^4	0	0	0	0	0
	10^3	0	0	0	0	0

Les résultats des modifications apportées par le protocole 2 sur *L. major*, n'ont pas permis d'obtenir de comètes pour toutes les concentrations étudiées.

Tableau 8 : Résultats de la mise au point du test de COMET (protocole 3)

Souche	concentration	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
<i>L. tropica</i>	10^6	20	2	0	0	0
	10^5	25	0	0	0	0

Les résultats des modifications effectuées sur les paramètres de la technique des comètes dans le protocole ont montré de bons résultats pour la souche de *L. tropica* utilisée. A des concentrations de 10^6 et 10^5 , nous avons obtenu respectivement 20 et 25 comètes intactes.

2. Résultats de la génotoxicité du H₂O₂ et du DAC sur différentes espèces de *Leishmania*

2.1. Résultats des taux d'inhibition du H₂O₂ et du DAC sur *Leishmania*

Les résultats de l'activité leishmanicide sur les formes promastigotes de *Leishmania* traités avec 10 µM et 100 µM de DAC et 10 µM et 100 µM de H₂O₂ figurent dans le tableau 9. Le temps d'incubation étudié était d'une heure.

Tableau 9 : Résultat du taux d'inhibition suite à l'action de H₂O₂ et de DAC sur la viabilité des espèces de *Leishmania* étudiées.

Espèces de <i>Leishmania</i>	Temps d'incubation 1h			
	% de viabilité avec H ₂ O ₂ avec		% de viabilité avec DAC avec	
	10 µM	100 µM	10 µM	100 µM
<i>L. infantum</i> : Lipa 15/05	64.33	93.33	53.33	85.33
<i>L. major</i> : Lipa 100/09	43.33	50	26.66	4.8
<i>L. tropica</i> : K27	83	83	80	80
<i>L. killicki</i> : Lipa 281/11	66.66	50	60	46.66
<i>L. amazonensis</i> : LEM 2248	66.66	74.66	60	56.66

Les résultats de l'inhibition en présence de concentration minimale 10 µM et concentration maximale 100 µM de H₂O₂ et de concentration minimale 10 µM et maximale 100 µM de DAC après 1 heure d'incubation, montrent que les deux produits possèdent un effet inhibiteur sur la croissance des espèces de *Leishmania* étudiées. Nous avons noté qu'après 1 h d'incubation avec chacun des produits, le pourcentage de viabilité a été réduit à moins de 83 % pour toutes les espèces, et a atteint un minimum de 4.8% pour *L. major* avec 100 µM de DAC. Donc on constate que l'effet du H₂O₂ et de DAC semble très rapide puisque après 1 h de contact seulement, la viabilité a été réduite pour toutes les espèces.

En fonction des espèces et de produit, *L. tropica* apparaît comme étant la plus résistante au H₂O₂ avec 83 % de viabilité, et *L. major* la plus sensible au H₂O₂ avec 43.33% de viabilité. L'effet du DAC ne semble pas très différent par rapport au H₂O₂, avec un maximum pour *L.*

tropica à 80 % et un minimum de 4.8 % pour *L. major* qui est considéré comme la plus sensible au DAC.

2.2. Résultats du test de COMET sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées

2.2.1. Résultats en absence d'inhibiteurs

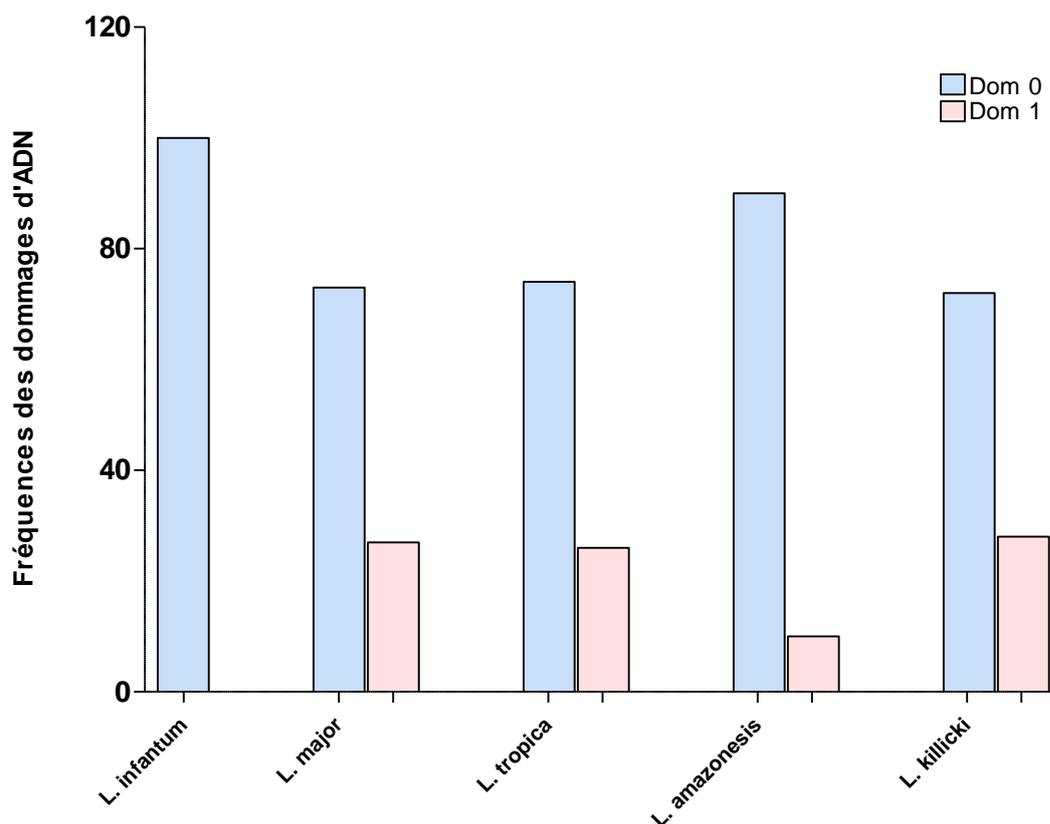


Figure 9 : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en absence d'inhibiteur (Control)

Les résultats de test des comètes pour les différentes espèces étudiées en absence d'inhibiteur montrent que la majorité d'ADN est intacte avec un pourcentage qui ne descend jamais en dessous de 70 %. Par ailleurs, nous avons aussi observé que pour certaines espèces de *Leishmania* ont un pourcentage des dommages de 2^{ème} degré (Dom 1) qui ne dépasse pas 35 %.

En fonction des espèces, *L. infantum* avec une fréquence de 100% et *L. amazonensis* avec une fréquence de 90% sont en première place par rapport à la conservation de leur ADN intact.

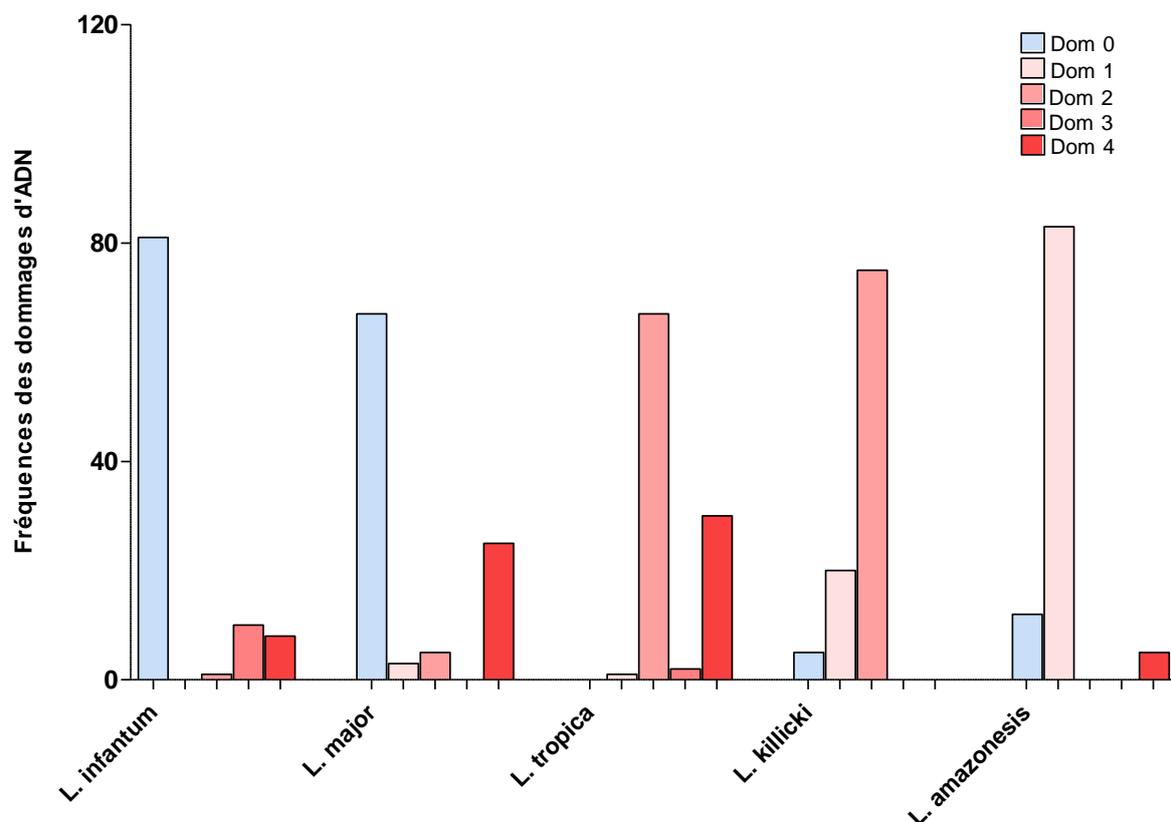
2.2.2. Résultats en présence de H₂O₂ à 10 µM

Figure 10 : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence H₂O₂ à 10 µM

Les résultats montrent que la concentration à 10 µM de H₂O₂ a induit des dommages d'ADN sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées. *L.tropica* apparaît comme étant la plus sensible avec des dommages qui varient : de fortement endommagés avec une fréquence de 67 %, à complètement endommagés avec 30 %. En 2^{ème} lieu, on observe *L. killicki* avec 75 % d'ADN fortement endommagés, ainsi que *L.major* avec ADN complètement endommagé supérieur à 20%, par contre *L. infantum* apparaît comme étant la plus résistante avec 80% d'ADN intact.

En fonction des espèces et les fréquences des dommages d'ADN, *L.killicki* et *L. tropica* sont classées comme étant les plus sensibles au H₂O₂ à 10 µM, et *L. infantum* et *L.major* apparaissent comme étant les plus résistantes.

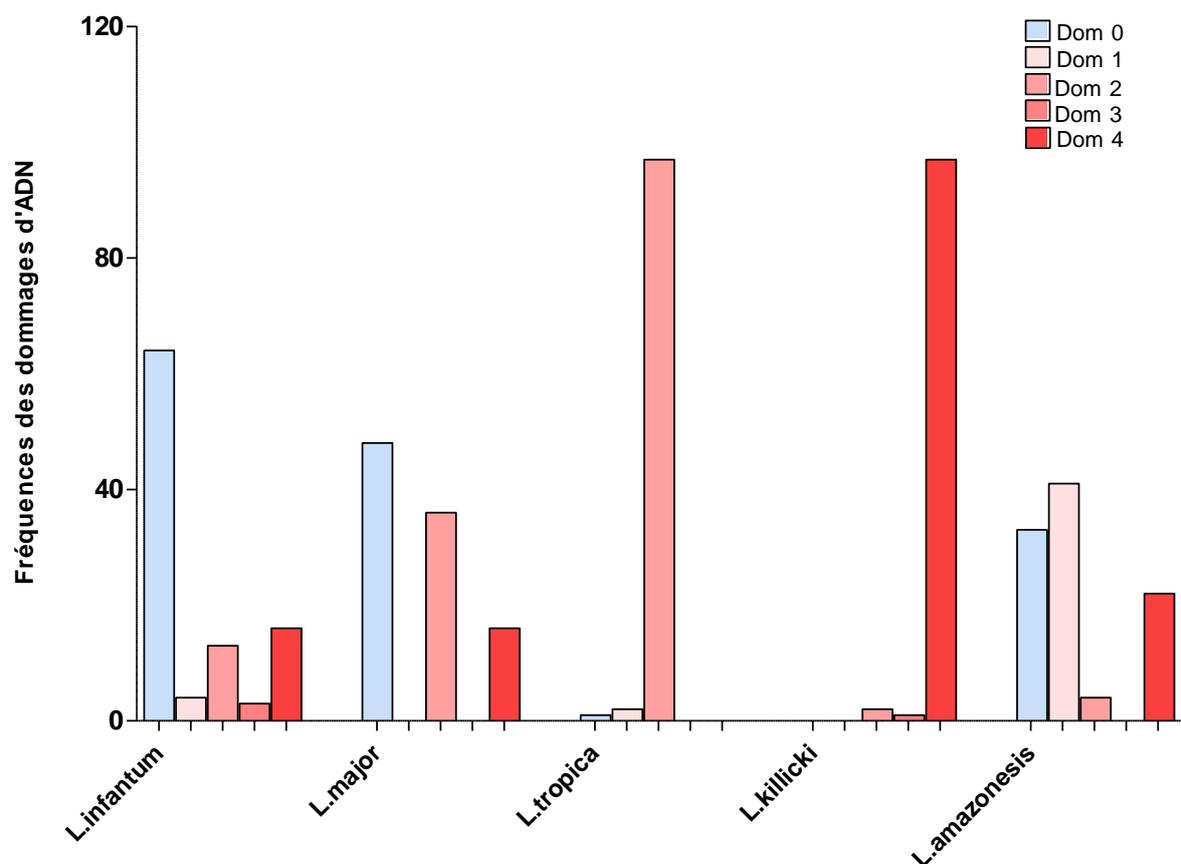
2.2.3. Résultats en présence de H₂O₂ à 100 µM

Figure 11 : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence H₂O₂ à 100 µM.

Les résultats d'observation des lames sous microscope à fluorescence montrent qu'effectivement le H₂O₂ à 100 µM a induit des dommages d'ADN sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées. Certaines espèces de *Leishmania* apparaissent plus sensibles. En premier lieu *L. killicki* qui présente un ADN complètement endommagé avec une fréquence de 97%, et en deuxième lieu *L. tropica* qui présente un ADN fortement endommagé avec une fréquence qui atteint les 97%. De plus, *L. infantum* et *L. major* sont les souches les moins sensibles au H₂O₂ à 100 µM, avec une fréquence respective de 64% et 55% d'ADN intact.

En fonction des espèces et les fréquences des dommages d'ADN, *L. killicki* et *L. tropica* sont classés comme étant les plus sensibles au H₂O₂ à 100 µM, par contre *L. infantum* et *L. major* apparaissent comme étant les plus résistantes.

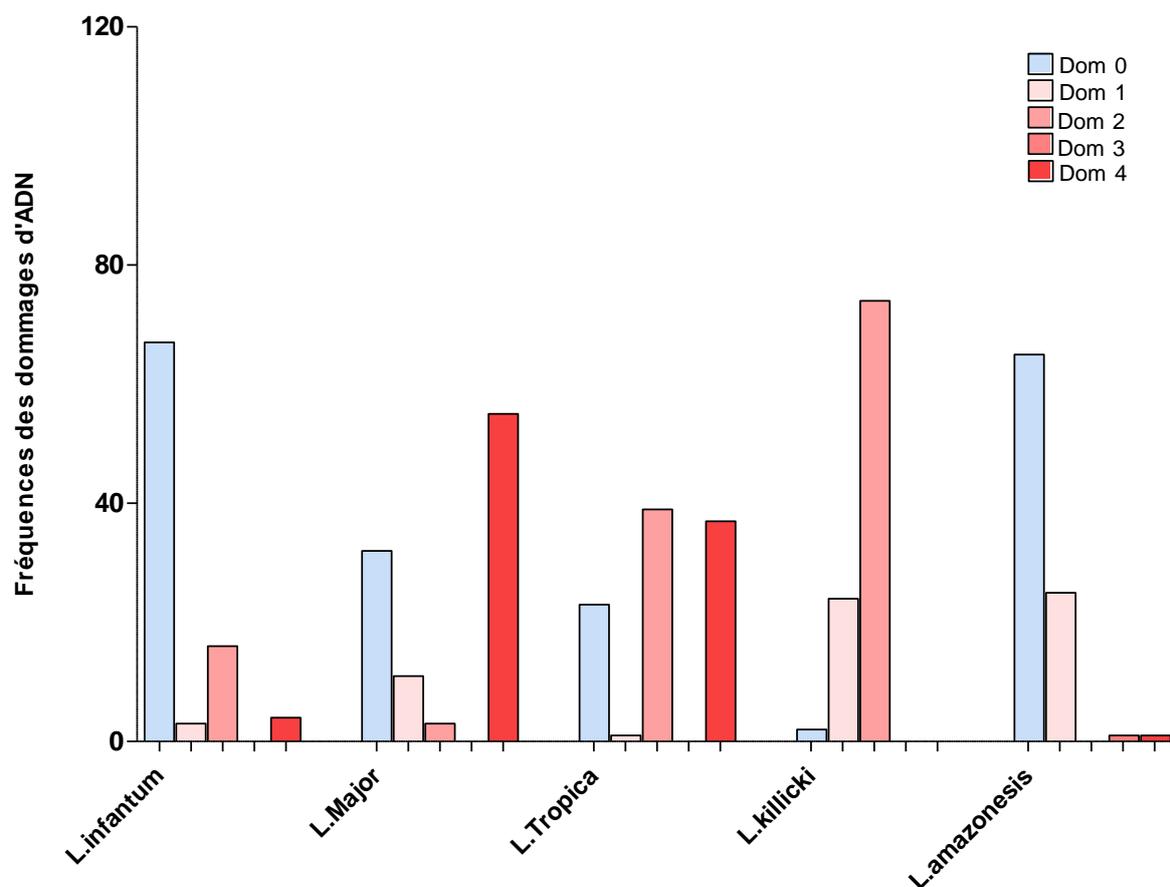
2.2.4. Résultats en présence de DAC à 10 μ M

Figure 12 : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence de DAC à 10 μ M.

Les résultats montrent qu'effectivement le DAC à 10 μ M a induit des dommages d'ADN à différents degrés qui atteignent 74% d'ADN fortement endommagé pour *L. killicki*, et 55% d'ADN complètement endommagé pour *L. major*. Autrement, certaines souches de *Leishmania* présentent un ADN résistant au DAC à 10 μ M, c'est le cas de *L. infantum* et *L. amazonensis* avec des fréquences respectives de 67% et 65% d'ADN intact.

En fonction des espèces et les fréquences des dommages d'ADN *L. Killicki* et *L. major* sont les plus sensibles au DAC à 10 μ M. Par contre, *L. infantum* et *L. amazonensis* sont les moins sensibles au DAC à 10 μ M.

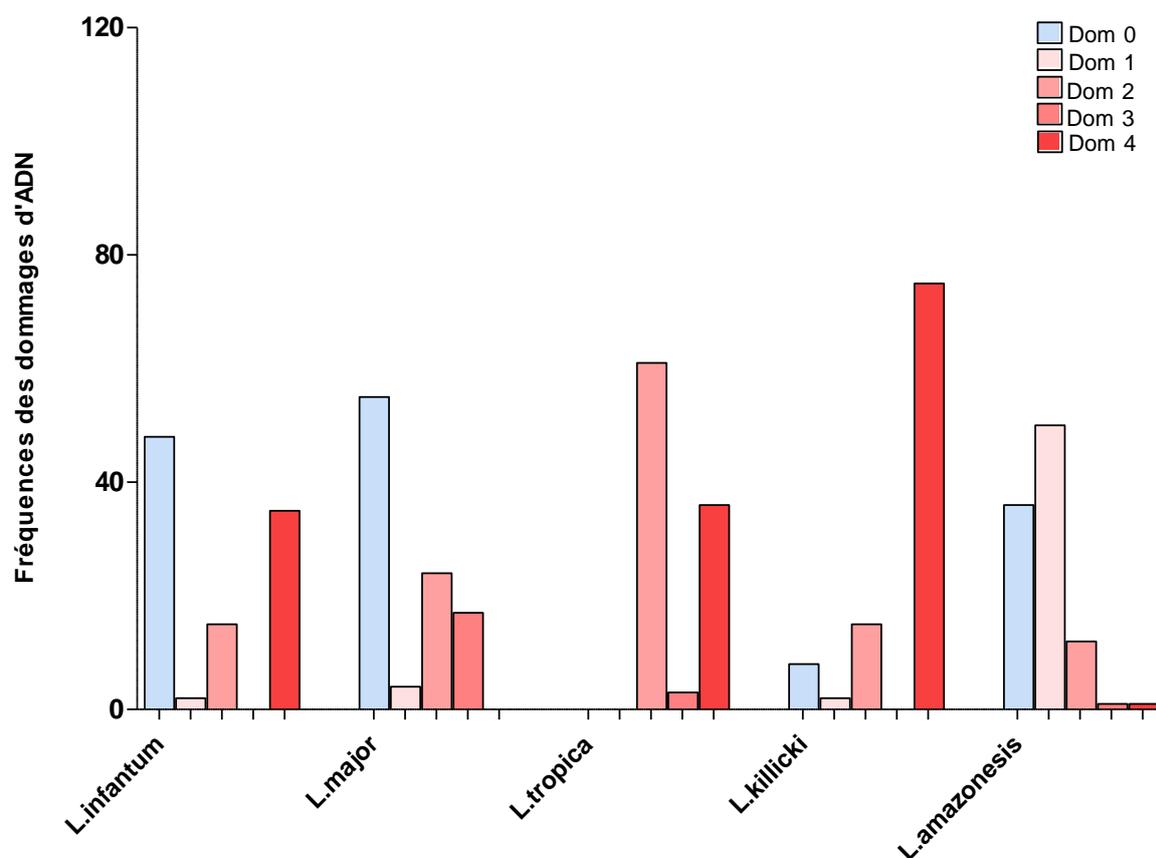
2.2.5. Résultats en présence de DAC à 100 μM 

Figure 13 : Fréquences des dommages d'ADN des espèces de *Leishmania* étudiées en présence de DAC à 100 μM .

Les résultats montrent que le DAC à 100 μM a induit des dommages d'ADN avec différents degrés. L'ADN de *L. killicki* est complètement endommagé avec une fréquence de 75 % donc ce qui représente presque la totalité de son ADN, en 2^{ème} lieu *L. tropica* qui présente aussi un ADN fortement endommagé avec une fréquence de 61 %. C'est donc plus que la moitié de son ADN. Par contre, 55% de l'ADN de *L. major* est resté intact c'est donc la souche la moins sensible au DAC à 100 μM .

En fonction des espèces et les fréquences des dommages d'ADN, *L. killicki* et *L. tropica* sont les plus sensibles au DAC à 100 μM par contre *L. major* est la plus résistante au DAC à 100 μM .

En fonction des produits, les résultats montrent que les fréquences des dommages d'ADN des différentes espèces de *Leishmania* qui sont traitées par le H_2O_2 sont plus élevées par rapport aux espèces de *Leishmania* traité par le DAC. De ce fait les deux produits ont causés des dommages d'ADN avec des différents degrés.

Discussion

Le centre National de Référence de la Leishmaniose de l'Institut Pasteur d'Algérie a parmi ces principaux axes de recherche, l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques leishmanicide extraites de plantes ou de molécules de synthèse. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des dommages d'ADN chez différentes espèces de *Leishmania* étudiées, *L. major*, *L. killicki*, *L. infantum*, *L. tropica* (ancien monde), *L. amazonensis*, (nouveau monde), avec la technique des comètes, suite à l'action des molécules génotoxiques qui sont le DAC et le H₂O₂.

Dans un premier temps ; afin de mettre au point la technique des comètes, nous avons suivi plusieurs protocoles, et dans chaque protocole, nous avons modifié plusieurs paramètres. Parmi ces derniers, les dilutions de la suspension parasitaire de 10⁶, 10⁵, 10⁴ à 10³. Par la suite, nous avons effectués des modifications sur les tampons de lyse et d'électrophorèse. Nous avons changé à chaque fois les proportions des compositions de chaque tampon, leur pH, et aussi la durée de chaque étape. Et enfin, nous avons modifié la température et l'exposition à la lumière. Ces protocoles ont donnés des résultats non significatifs, absence des comètes ou bien en présence de comètes avec un nombre insuffisant. Après ces modifications des paramètres et des conditions, nous avons arrivé à mettre au point le test de COMET.

Dans un deuxième temps ; nous avons ajusté la concentration des différentes espèces de *Leishmania* étudiées à 3 millions de parasites/ml, et les mettre en contact avec nos produits génotoxiques a deux concentrations différentes, une maximal à 100 µM et l'autre minimal 10 µM afin d'évaluer la cytotoxicité de ces deux produits sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées. Nos résultats ont montré que les deux produits présentent des effets inhibiteurs sur la viabilité des espèces étudiées responsables de la LC (*L. major*, *L. killicki*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. amazonensis*).

Après 1h de contact, nos résultats des taux d'inhibition de la viabilité des espèces de *Leishmania* étudiées montrent que le H₂O₂ a induit une forte diminution de la viabilité pour *L. major*, et une diminution jusqu'à la moitié pour *L. amazonensis* et *L. killicki*, alors que pour *L. tropica* et *L. infantum*, nous avons observé une faible diminution de la viabilité. Donc on peut déduire selon nos résultats que *L. major* est la plus sensible au H₂O₂ par contre *L. tropica* et *L. infantum* sont les plus résistantes au H₂O₂. Cette sensibilité au H₂O₂ varie selon les espèces et selon la concentration de H₂O₂.

Notre étude a montré que les formes promastigotes de *L. tropica* et *L. killicki* étaient les plus sensibles à des fortes concentrations de H₂O₂. En revanche, les formes promastigotes de *L. major* et *L. infantum* sont les moins sensibles à la cytotoxicité du H₂O₂.

Des travaux de (Debra E, 2015), sur l'effet cytotoxique de H₂O₂ sur les formes promastigotes de *L. amazonensis*, ont montré que les cellules parasitaires sont complètement lysés, à travers ces résultats on suggère que la cytotoxicité retrouvée pour le H₂O₂ à travers nos résultats serait due à un phénomène de mort cellulaire qui est causé par une lyse cellulaire, donc les fortes concentrations de H₂O₂ font aboutir à la mort cellulaire. Cette mort cellulaire partage de nombreuses caractéristiques avec une apoptose de métazoaire, telles que la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN et la perte de volume cellulaire (Das et al., 2014).

Les résultats d'inhibition du deuxième produit étudié ont montré que le DAC induit une forte diminution de la viabilité des promastigotes après 1h d'incubation pour *L. major*, tandis qu'une diminution moindre est noté pour *L. killicki* et *L. amazonensis*, Par contre, l'effet sur *L. tropica* et *L. infantum* est faible.

Nos résultats pour le DAC montrent que *L. major* est la plus sensible pour la concentration du DAC de 10 µM et moins sensible pour une concentration de DAC plus élevée (100 µM), *L. killicki* est pratiquement aussi sensible pour les deux concentrations, par contre *L. infantum* et *L. amazonensis* sont les moins sensibles aux deux concentrations. D'après nos résultats nous supposons que le DAC exerce un effet cytotoxique extracellulaire sur les promastigotes pour les espèces étudiées.

Les résultats des inhibitions de la viabilité des deux produits sur la forme promastigote des différentes espèces de *Leishmania* étudiées ont montré que l'effet inhibiteur du DAC pour certaines souches de *Leishmania* apparait comme plus important que celui de H₂O₂.

Après l'étape d'évaluation de la cytotoxicité des deux produits le H₂O₂ et le DAC sur la forme promastigote des différentes espèces de *Leishmania* étudiées, nous sommes passé à l'étape de l'évaluation de la génotoxicité de ces deux produits sur la molécule d'ADN des différentes espèces de *Leishmania* étudiées par la technique des comètes. Le but de cette étude étant de détecter et de classer les dommages d'ADN de *Leishmania* suite à l'action du H₂O₂ et du DAC.

Les résultats des lames de contrôle des différentes espèces de *Leishmania* ont montré que en absence de produit génotoxique l'ADN de certains espèces de *Leishmania* étudiées est intact,

alors que pour les espèces, *L. major*, *L. tropica*, *L. killicki* et *L. amazonensis*, où nous avons observé un certain nombre de comète peu endommagé (Dom 1). Ces dommages d'ADN sont probablement dus au stress des milieux NNN et RPMI 10 SVF après chaque repiquage. Les travaux de Sakkas et Alvarez, sur l'application de la technique des comètes sur les spermatozoïdes, ont déduit que le stress oxydatif pouvait activer les caspases et les endonucléases dans les spermatozoïdes, ce qui aboutit à l'apoptose et donc à la fragmentation de l'ADN (Sakkas et Alvarez, 2010).

Les résultats du test de COMET sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées suite à l'action du premier produit le H₂O₂ ont montré qu'il induit différents types de dommages d'ADN. Pour les espèces *L.killicki* et *L. tropica* ont un ADN fortement et complètement endommagé avec des fréquences très élevés, alors que pour *L.major* qui est l'espèce le plus fréquent en Algérie, leur ADN est moyennement sensible avec des dommages différents. Ces résultats montrent que l'ADN des souches *L.killicki* et *L. tropica* est le plus sensible à la génotoxicité du H₂O₂, nous constatons que le H₂O₂ a induit des lésions au niveau de l'ADN de ces deux souches. Par contre pour *L. infantum* et *L.major*, nous avons observé un nombre important de l'ADN intact malgré les 27% d'ADN complètement endommagé de *L.major* ces deux souches restent tout de même les plus résistantes à l'action du H₂O₂. Cette résistance est similaire pour les concentrations extrêmes de H₂O₂. Notre hypothèse est que ce produit n'a pas induit de fortes lésions d'ADN, ou bien que ces souches de *L. infantum* et *L.major* ont pu activer des mécanismes de réparation d'ADN.

Les résultats du test de COMET pour le deuxième produit, ont montré que le DAC induit différents types des dommages d'ADN sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées. La fréquence des dommages varie selon les espèces, *L. killicki* apparaît comme étant la plus sensible avec un ADN fortement endommagé pour la concentration 10 µM et un ADN complètement endommagé pour la concentration 100 µM. Par ailleurs, pour les deux souches, *L. infantum* et *L. amazonensis* nous avons observé un nombre important de l'ADN intact avec des fréquences très élevés. Nous supposons que ces souches possèdent un mécanisme de réparation des dommages d'ADN. D'après les travaux de (Dickinson *et al.*, 2004), la génotoxicité du dioxyde de chlore est associée à une cytotoxicité cellulaire importante, par la suite ils ont établi des Profils d'expression de certains gènes traités avec le dioxyde de chlore DAC. Les résultats montrent que le dioxyde de chlore n'interagit pas directement avec l'ADN, mais il modifie l'expression de ces gènes. La génotoxicité indirecte du DAC peut causer une inhibition de la synthèse de l'ADN, Interaction avec la réparation de l'ADN,

Inhibition des topoisomérases, Perturbation du fuseau mitotique, Production de radicaux libres, Inhibition de la synthèse protéique... etc (Dickinson *et al.*, 2004).

Les résultats de notre étude des dommages de l'ADN suite à l'action de H₂O₂ et de DAC sur la forme promastigote des différentes souches de *Leishmania* étudiées ont montré qu'effectivement ces deux produits induisent des altérations de la molécule d'ADN. Cependant, ces altérations sont variables selon les concentrations du produit génotoxique et selon les espèces de *Leishmania* étudiées.

Conclusion

Conclusion

La leishmaniose est une maladie parasitaire endémique. Elle provoque une morbidité et une mortalité significative dans l'Algérie et le monde entier. L'absence d'un traitement efficace contre cette maladie et l'apparition de la résistance clinique contre certains médicaments disponibles cause un très grand problème de santé (Ashutosh *et al.*, 2007).

Le test des comètes, test d'altération primaire de l'ADN, se distingue des autres tests de génotoxicité par sa sensibilité pour détecter une faible quantité de lésions. Il présente l'avantage d'être applicable sur tout type cellulaire, organe ou tissu.

L'objectif général de notre travail était dans un premier temps, de mettre au point et de valider un protocole du test des comètes pour les formes promastigotes de *Leishmania*. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la génotoxicité de deux produits, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le dioxyde de chlore (DAC) sur les différentes espèces de *Leishmania* étudiées. Dans un troisième temps, nous avons utilisé la mise au point du test des comètes pour la détection des dommages d'ADN dans les différentes espèces de *Leishmania* étudiée cutanée de l'ancien monde (*L. major*, *L. killicki*, *L. infantum*, *L. tropica*) et du nouveau monde (*L. amazonensis*) suite à l'action de ces deux produits génotoxiques le H₂O₂ et le DAC, dans le but d'évaluer leur aspect thérapeutique .

Les résultats de la cytotoxicité (au niveau cellulaire) que nous avons obtenue montre que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le dioxyde de chlore (DAC) présentent un effet cytotoxique qui inhibe la croissance des différentes espèces de *Leishmania* étudiées. Cet effet est variable selon la concentration de produit, et aussi selon les espèces de *Leishmania*, pour certaine souche une concentration minimale est suffisante pour inhiber sa croissance, et pour les autres souches une maximale concentration était nécessaire pour inhiber leur croissance.

Les résultats obtenus par le test des comètes ont montré qu'effectivement ces deux produit ont un effet aussi génotoxique (au niveau nucléaire) qui induit des dommages d'ADN dans toutes les souches étudiées. Ces dommages variaient selon les espèces et selon les concentrations des produits génotoxiques.

A travers l'ensemble de nos résultats, nous pouvons dire que ce travail de recherche sur des nouvelles alternatives thérapeutiques pour la leishmaniose cutanée est prometteur. Il en est ressorti l'efficacité de H₂O₂ et de DAC sur la forme promastigote de *Leishmania* des différentes espèces. L'utilisation de ces deux produits peu coûteux et moins toxiques aidera à améliorer le traitement et la prise en charge du malade.

Ce travail devra être complété par l'étude de la génotoxicité des deux produits en fonction du différents temps d'incubation et aussi avec plusieurs concentrations croissantes pour les deux produits, ainsi que les mécanismes mis en jeu et leur relation avec le type de mort et le type des dommage d'ADN induit sur la forme promastigote de *Leishmania*.

Références bibliographiques

- Acebey L., Julian. et Sauvain M., (2008), Ethnopharmacologie et leishmaniose en Amérique latine. *Ethnopharmacologie*, n°41.
- Alavar J., Vélez ID., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., Boer MD., (2012). Leshmaniosis worldwide and Global Estimates of Its incidence. *PLOS ONE* 7(5): e35671.
- Aoun, K. & Bouratbine, A. 2013: Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, 21, 14.
- Ashutosh, Sundar S., Goyal N., (2007), Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*.
- Avishai N., Rabinowitz C. and Baruch R. Use of the Comet Assay for studying environmental genotoxicity. Comparisons between visual and image analyses *Environ. Mol. Mutagen.*, 2003; 42: 155-165.
- Basset D., Pratlong F., Ravel C., Puechberty J., Dereure J. & Dedet J.P. (2001) . Les leishmanioses déclarées en France en 1999. *BEH* ; 5 :19-21.
- Bastien P., Britto C., Ravel C., et al. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* . ; 222:107–17.
- Baumgartner, A., Cemeli, E., Anderson, D., 2009. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 81–98
- Belazzoug S. (1983). Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 876.
- Belazzoug S., Mahzoul D. & Rioux J.A. (1986). Les phlébotomes (Diptera, Psychodidae) de M'sila et Bou-Saada – *Arch.Inst.Pasteur Algérie*, 55, 117-124.
- Belkaid M, Harrat Z. La leishmaniose en Algérie. Mise au point. *Rev MedPhar* 1997:43 6.
- Ben-Ahmed K, Aoun K, Jeddi F, et al (2009) Visceral leishmaniasis in Tunisia: spatial distribution and association with climatic factors. *Am J Trop Med Hyg* 81(1):40–45.
- Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham, S., & Belkaid, M. (2004). Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Médecine tropicale*, 64(4), 381-401.
- Berthelot-Ricou, A., Perrin, J., di Giorgio, C., de Meo, M., Botta, A., Courbiere, B., 2011b. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertil. Steril.* 96, 1002–1007.
- Besteiro S., Williams R.A., Coombs G.H., Mottram J.C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 37,1063-1075.
- Britto C, Ravel C, Bastien P, et al (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*; 222: p107-117.
- CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser — Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL) (2002).
- Chacara D., Ravel., Banuls AL., Haouas N., Lami P., Talignani L., El Baidrouri F., Jaouadi K., Harrat Z., Debet JP., Babah and Pratlong F.,(2015). Evolutionary history of

- Leishmania killicki* (synonymous *Leishmaniatropica*) and taxonomic implication, *Parasites & Vectors* .
- Chabasse D, Danis M, Guiguen C , et al (2007) . Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales .Elsevierp : p480.
 - Clayton C., Shapira M., (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol.Biochem.Parasitol.*156:93101.
 - Collins, A. R. and Dusinská, M. (2002) Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 186, *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols* (Armstrong, D., ed.). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 147–159.
 - Collins, A. R., Dusinská, M., and Horská, A. (2001) Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim. Pol.* 48,611–614.
 - Collins, A. R., Harrington, V., Drew, J., and Melvin, R. (2003) Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* **24**, 511–515.
 - Courbiere, B., Auffan, M., Rollais, R., Tassistro, V., Bonnefoy, A., Botta, A., Rose, J., Orsière, T., Perrin, J., 2013. Ultrastructural Interactions and Genotoxicity Assay of Cerium Dioxide Nanoparticles on Mouse Oocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21613–21628.
 - Croft LS, Sundar S., Fairlamb AH., (2006), Drug Resistance in *Leishmaniasis*, *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, p. 111-126.
 - Das K., Roychoudhury A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2:53 10.3389/fenvs.2014.00053.
 - Debra E (2015) "The Effect of Hydrogen Peroxide on *Leishmania amazonensis* Promastigotes," *DePaul Discoveries: Vol. 4: Iss.1, Article 13*.
 - Dedet J.P. & Pratlong F. (2001). *Leishmanioses*. In: *Epidémiologie des maladies parasitaires*. (Ripert C. Ed). Editions Médicales Internationales, 3 : 221-241
 - Dedet J.P. (2001). *Leishmaniasis, leishmanioses*. *Biologie, clinique et thérapeutique*. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 8 :506-510.
 - Dedet, J. P. (2009). *Leishmaniasis, leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique*.
 - Del Giudice P., Marty P. & Lacour J.P.H. (2001). *Leishmaniose cutanée autochtone en France métropolitaine*. *Ann Dermatol Venerol*, 128 : 1057-1062.
 - Dhillon GP, Sharma SN, Nair B. Kala-azar elimination programme in India. *J Indian Med Assoc* 2008;106:666–8.
 - Dickinson RE, Dallol A, Bieche I, Krex D, Morton D, Maher ER, Latif F. Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. *British Journal of Cancer*. 2004; 91:2071–8.
 - Eastman A. and Barry M.A. The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis. *Cancer Invest.*, 1992; 10: 229-240
 - Eddaikra N., Oury B., Denis S. Harrat Z.,(2013), Retrospective and ongoing researches on *Leishmania* antimony resistance in Algeria. *Microbial pathogens and strategies for combating them : sciences, technology and education*.
 - Einaudi, L., Courbiere, B., Tassistro, V., Prevot, C., Sari-Minodier, I., Orsiere, T., Perrin, J., 2014. In vivo exposure to benzo(a)pyrene induces significant DNA damage in mouse oocytes and cumulus cells. *Hum. Reprod.* 29, 548–554.
 - Fairbairn W. D., Olivie P. J. and O'Neill K. L. The Comet Assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 1995; 339: 37-59

- Firdessa O., Good L., Amestalden MC., Chindera K., Kamaruzzaman NF., Schultheis M., Roger B., Hecht N., Oelschlaeger TA., Meinel L., Lühmann T., Moll H.,(2015), Pathogen and Kost-Directed Antileishmanial Effects mediated by Polyhexanide (PHMB).
- Forchhammer Lykke, Clara Ersson, Steffen Loft,Lennart Möller, Roger W. L. Godschalk, Frederik J.van Schooten , George D. D. Jones , Jennifer A. Higgins, Marcus Cooke, Vilas Mistry, Mahsa Karbaschi, AndrewR. Collins, Amaya Azqueta, David H. Phillips, Osman Sozeri, Michael N. Routledge, Kirsty Nelson-Smith, Patrizia Riso, Marisa Porrini, Giuseppe Matullo, Alessandra Allione, Maciej Stepnik, Magdalena Komorowska, João Paulo Teixeira, Solange Costa, Laura-Ana Corcuera, Adela López de Cerain, Blanca Laffon, Vanessa Valdiglesias and Peter Møller,2012. Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis* pp. 1–8.
- Forget G. (2004). Etude des mécanismes d régulation négative utilisés par *Leishmania* pour contrer la réponse immunitaire innée. Thèse de Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine. Université Laval. France.
- Friedberg E. c., Walker G. C. and Siede W. DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington, 1995.
- Gott J L (2003).Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing « *Proc Natl Acad sci USA* » 100 (19):10583-10584.
- Handman E.,(2001), *Leishmaniasis : curent status of vaccine developement* .*ClinMicrobiol Rev*, 14(2) : 229-43 .
- Harrat Z, Boubidi SC, Pratloug F, Benikhlef R, Selt B, et al,(2009). Description of a dermatropic leishmania close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratloug 1986) in Algeria.
- Hide M (2004). Variabilité pathgénique du complexe leishmania donovani. Agent de la leishmaniose viscérale. Thèse de Doctorat en parasitologie. Université de Montpellier II.403 :p9-29.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al (2005) .The génome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309(5733) :p436-442.
- Izri M. A.; Belazzoug S. (1993). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria *Trans.of the Royal Society of Trop. Med. and Hyg.* , vol. 87, no 4, pp. 383-385 .
- Jebran AF., Schleicher U., Steiner R., Wentker P., Mahfuz F., Stahl HC., Amin FM., Bogdan C., Stahl KW.,(2014). Rapid Healing of Cutaneous Leishmaniasis by High-Frequency Electrocauterization and Hydrogel Wound Care with or without DAC N-055: A Randomized Controlled Phase Iia Trial in Kabul. *PLOS Neglected Tropical Diseases*
- Leger N. & Depaquit J. (1999) . Les phlébotomes. In : Dedet J.P. Ed. *Les leishmanioses*. Paris : Ellipses ; 89-108.
- Léonard A. *Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques*. ED Masson, Paris, 1990.
- Liang C, Gao Y, Zhao Y, Manthari RK, Ma J, Niu R, Wang J, Zhang J, Wang J.,2017. Effects of Fluoride and/or Sulfur Dioxide on Morphology and DNA Integrity in Rats' Hepatic Tissue. S12011-017-1152-6.
- Lightburn E., Morand J.J. & Chouc C., 2000. Leishmaniose tégumentaire du nouveau monde. *Nouv Dermatol*, 19 : 385.

- Loo CS., Lam NS Yu D., Su XZ., Lu F. (2017). Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria. *Pharmacol Res.*, Mar ; 117 :192-217.
- Mannaert A., Downing T., Imamura H., Dujardin J.C. (2012). Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends Parasitol.* ;28:3706.
- Marty P , Pomares-Estran C, Housseine L , Delaunay P, Haas H , et al ,2009.Leishmaniasis in France : an update.*Archives de Pédiatrie* 16 Suppl 2S96-S100.
- Marty P. & Rosenthal E. (2002). Treatment of visceral leishmaniasis : a review of current treatment practices. *Expert Opin. Pharmacother.* 3(8): 1101-1108.
- Mazelet L. (2004). La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen Français. Thèse de Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pooi-Zobei B. L., De Méo M. P. and Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet Assay): A european review. *Mutat. Res.*, 1993; 288: 47-63
- Miyamae Y., Aizen K., Ohara K., Mine Y. and Sasaki Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) Assay. L-Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat. Res.*, 1997; 393: 99-106
- Monteiro G.R., Queiroz J.W., Sousa J.M.A., Ximenes M.F.F.M. & Jeronimo S.M.B. 2005- Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban–rural interface. *Acta Trop.* 90,155-162.
- Moustacchi E , 2000, DNA damage and repair: consequences on dose-responses *Mutation Research*, 464(t),35-40
- O’Shea B & al. (2002) Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(2):117–118.
- Olive P. L., Wlodek D. and Banath J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.*, 1991; 51: 4671-4676
- Osipov Andreyan , Ekaterina Arkhangelskaya , Alexei Vinokurov , Nadezhda Smetanina , Alex Zhavoronkov and Dmitry Klokov .,2014. DNA Comet Giemsa Staining for Conventional Bright-Field Microscopy.15, 6086-6095.
- Osman O.F., Kager P.A. & Oskam L. (2000). Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med International Health*, 5 (8): 553-562.
- Ouellette M, Olivier M, Sato S, Papadopoulou B (2003).Le parasite leishmania à l’ère de la post-génomique.
- Peacock C S , Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz J C, et al (2007) ; Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39:p 839-847.
- Peacock C.S., Seeger K., Harris D., et al. (2007); Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* ;39:839
- Perrin, J., Lussato, D., De Méo, M., Durand, P., Grillo, J.-M., Guichaoua, M.-R., Botta, A., Bergé-Lefranc, J.-L., 2007. Evolution of DNA strandbreaks in cultured spermatocytes: The Comet Assay reveals differences in normal and γ -irradiated germ cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 81–89.
- Poinsignon A (2005). Diversité et fonctions des protéines salivaires chez les arthropodes vecteurs : Etude de la relation immune homme/vecteur au cours de la

Trypanosomiase Humaine Africaine. Thèse doctorat. Faculté de Pharmacie.

L'université de Paris XI :p 60

- Preaubert, L., Courbiere, B., Achard, V., Tassistro, V., Greco, F., Orsiere, T., Bottero, J.-Y., Rose, J., Auffan, M., Perrin, J., 2016. Cerium dioxide nanoparticles affect in vitro fertilization in mice. *Nanotoxicology* 10, 111–117.
- Quitterie N, Odette ,Nadau C, (2005) . Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le test d'itra-dermo-réaction de la leishmaniose canine-sabatier, Toulouse-116 :p12-51.
- Ripert C. (coord.), Pajot François-Xavier (collab.), Vincendeau P. (collab.), Esquerdo Gomez F. (collab.) (1996). *Epidemiologie des maladies parasitaires. Tome 1 : protozooses* 39 :p393.
- Roberts, L.S. and Janovy, J.J. (2000). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts 'Foundations of Parasitology. Mc Graw-Hill Higher Education, Boston.
- Rogers M.B., Hilley J.D., Dickens N.J., et al. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* ; 21:2129–42.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis, *Fertil Steril* , 2010, vol. 4 (pg. 1027-1036)
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996; 382:722–5.
- Sarkari, B., Hosseini, G., Motazedian, M.H., Fararouei, M. and Moshfe, A. Prevalence and risk factors of intestinal protozoan infections: a population-based study in rural areas of Boyer-Ahmad district, Southwestern Iran. *BMC Infectious Diseases*, 2016; 16: 703.
- Sereno D, Cavaleyra M., Zemzoumi K., Maquaire S., Ouaisi A., Lemesre JL.,(1998). Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec;42(12):3097-102.
- Sergent, E., et, P. I., Donatien, A., & Beguet, M. (1923). Transmission expérimentale du bouton d'Orient (clou de Biskra) à l'homme par *Phlebotomus papatasi* (Scop). *Arch Inst Pasteur*, 40, 411-430.
- Silva da Silva C, Juliana Marzari Rossatob, Jocelita Aparecida Vaz Rochab, Vera Maria Ferrão Vargasa.2014. Characterization of an area of reference for inhalable particulate matter (PM2.5) associated with genetic biomonitoring in children. *Mutation Research* 778 (2015) 44–55.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 1988; 175: 184-191
- Singh N. P., Tice R. R., Stephens R. E. and Schneider E. L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res.*, 2000; 252: 289-296
- Soto J., Rea J., Valderrama M., Toledo J., Valda L., Ardiles J., Berman J. Short report : efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009, 81, 387-389.
- Speit G., Dennog C. and Lampl L. Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. *Mutagenesis*, 1998; 13: 85-7.

Références bibliographiques

- Sterkers Y., Lachaud L., Bourgeois N., Crobu L., Bastien P., Pages M. (2012). Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* ; 86:15–23.
- Syndar S., Chakravarty J., Agarwal D., Rai M., Murray H.W. Single dose liposomal amphotéricine B for visceral leishmaniasis in India. *New Engl. J. Med.*, 2010, 362, 504-512
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. c., and Sasaki Y. F. Single cell gel/Cornet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing *Environ. Mol. Mutagen.*, 2000; 35: 206-221
- Wincker P., Ravel C., Blaineau C., et al. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* ; 24:1688–94

Annexes

Annexe I : Milieux de culture

1.1. Milieu NNN

Composition

Gélose (10 g bacto agar diffco) , NaCl (6g) , eau distillée stérile (100 ml) , sang de lapin (de 10% à 20%).

Préparation

La gélose Bacto agar est ajoutée à la solution de NaCl et chauffée à 80°C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissolution. Après distribution dans des tubes à essai de 8 ml et stérilisation à l'autoclave 120°C pendant 20 minutes, la conservation se fait à + 4 °C.

Le sang de lapin est obtenu par ponction cardiaque. Il est recueilli sur citrate de sodium à 10% après ajout de 250000 unités de pénicilline. La conservation se fait à + 4 °C.

Le mélange gélose-sang : le gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain marie de à 45°C. Le sang est ensuite incorporé à la gélose (2 ml de sang pour 8 ml de gélose). Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation se fait à + 4 °C.

1.2. Milieu RPMI 10 SVF

Composition

- RPMI (16.4g), eau distillé stérile (1000mL).

Préparation

Mesurer environ 900mL d'eau distillée et tout en le soumettant à une agitation magnétique. Ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissolution sans chauffer puis ajouter 2 ml de L-Glutamine, 50 UI/ mL de pénicilline et 50ug/mL de streptomycine. Ajuster le pH à 7 et compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000mL.

Filtrer le milieu avec un filtre de 0.22um et additionner aseptiquement le SVF (sérum de veau fœtal) à raison de 10% .La conservation se fait à + 4 °C.

Annexe II : Réactifs

1. Les réactifs de la mise au point de COMET assay

1.1. Les réactifs de protocole 1 de COMET assay

- **Préparation d'agarose**

1/Agarose NA 0.75 % : 0.75 g d'agarose +100 ml de H₂O_D.

2/LMA 0.7% à 24°C : 0.065 g dans 20 ml de PBS.

- **Préparations des tampons**

-Tampon de lyse :

- 146.1 g de NaCl
- 37.2g d'EDTA
- 1.2g de Tris-Base
- 2000ml d'H₂O qsp.

-Tampon d'électrophorèse :

- 10M de NaOH dans 30 ml de H₂O_D
- 0.2M d'EDTA dans 75 ml de H₂O_D
- 1500 ml d'H₂O
- pH à 13.

-Tampon de neutralisation :

- 48.5 g de Tris-Base
- 800 ml de H₂O_D
- pH = 7,5.

-Préparation de BET

- Une solution de BET à 20 µg/ml.

1.2. Les réactif de protocole 2 de COMET assay

- **Préparation d'agarose**

1/Agarose 0.75 % : 0.75 g d'agarose dans 100 ml H₂O_D.

2/LMA 0.7%: 0.065 g dans 10 ml de PBS.

- **Préparation des tampons**

- **Tampon de lyse :**

- 76 g de NaCl
- 18.5 g d'EDTA
- 12g de Tris-Base
- 900 ml d'H₂O_D Qsp
- pH = 10.

- **Tampon d'électrophorèse :**

- 10M de NaOH dans 30 ml de H₂O
- 0.2M d'EDTA dans 75 ml
- 1500 ml d'H₂O
- pH = 13.

- **Tampon de neutralisation :**

- 48.5 g de Tris-Base
- 800 ml de H₂O_D
- pH = 7,5.

1.3. Les réactif de protocole 3 de COMET assay

- **Préparation d'agarose**

Les mêmes doses que le protocole précédent.

- **Préparation des tampons**

- **Tampon de lyse :**

- 29.22 g de NaCl
- 7.448 g de Na₂ EDTA
- 0.2422 g de Tris Base
- 178 ml d'H₂O_D
- 1% de Triton-X
- 10% de DMSO.

- **Tampon d'électrophorèse :** les mêmes doses que le protocole précède.

- **Tampon de neutralisation :** les mêmes doses que le protocole précède.

2. Les réactifs finals de COMET assay

- **Préparation de PBS**

Préparer saline tamponnée au phosphate de Dulbecco ou (PBS) (Ca ++, Mg ++) solution par addition de PBS 1 paquet dans 500 ml de H₂O Distillée. Stocker à température ambiante.

- **Préparation de tampon de lyse (pH = 10)**

- 29.22 g de NaCl.
- 7.448 g de Na₂ EDTA.
- 0.2422 g de Tris Base.
- H₂O_D : 178 ml
- 2ml de Triton x-100
- 20 ml DMSO au moment de lyse.
- pH ajusté à 10 par HCl et NaOH.

- **Préparation de tampon d'électrophorèse (pH =13)**

- 18g de NaOH.
- 0.56 g de Na₂ EDTA.
- H₂O_D : 2000 ml.

- **Préparation de tampon de neutralisation (pH=7.5)**

- 4.84 de Tris Base.
- H₂O_D : 100 ml.

- **Préparation de LMA à 0.7% à 24°C**

- 0.65 g de Low Melting Point Agarose dans 10 ml de solution PBS.
- Chauffer le mélange dans une micro-onde ((((((

- **Préparation du gel d'agarose à 0.75 %**

- 0.75 g d'agarose NA dans 100 ml de solution PBS.
- Chauffer le mélange dans une micro-onde

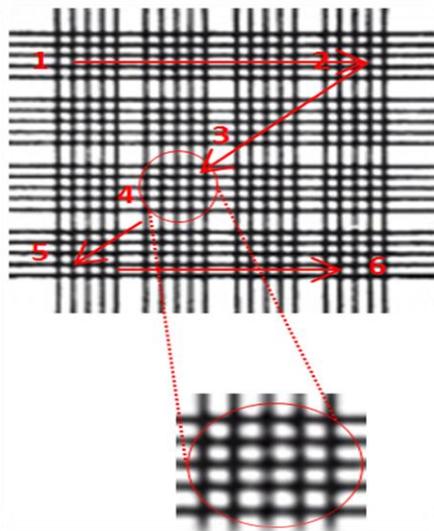
- **Préparation de coloration**

- 1µl de SYBR GREEN
- 10 ml H₂O_D

Annexe III : Comptage et viabilité

Afin de déterminer le nombre de cellules récupérées et leur viabilité on utilise un colorant vital d'exclusion : le Bleu Trypan .On a utilisé le Formol pour fixer les cellules.

Seules les cellules mortes apparaissent colorées en bleues, celles ayant conservé leur intégrité membranaire n'absorbent pas le colorant. Cette méthode sera utilisée pour sa simplicité de mise en œuvre. Le comptage est réalisé à l'aide d'une cellule Thomas. Pour cela 25 µl de suspension cellulaire sont mélangés à 25 µl de Bleu Trypan et Formol 25 µl. Le nombre de cellules est déterminé par comptage au microscope (Figure 14).



Comptage : Nombre de cellules / $6 \times 16 \times 3 \times 10^4 =$ nombre de *Leishmania* en suspension.

Figure 14 : Photographie de la cellule de Thoma et la formule de comptage. (Originale)

* La cellule Thomas est formée

de 16 grands carrés



* Composés chacun de petits carrés

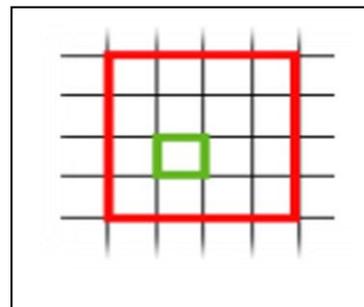


Figure 15 : Composition de la cellule Thomas. (Originale)

Annexe III : Comptage et viabilité

Il faut compter les cellules à l'intérieur et celles qui touchent les bordures en haut et à droite. il ne faut pas compter celles qui touchent les bordures en bas et à gauche (figure 15).

Le comptage doit nous permettre de vérifier qu'un nombre suffisant de cellules a été récupéré pour le test. Il s'agit ensuite de calculer le volume nécessaire de suspension cellulaire à prélever pour avoir suffisamment de cellules par lame.

Annexe IV : Résultats

1. Résultats de comptages (Taux de croissance)

Tableau 10 : La concentration parasitaire (parasites/ml) de *L. killicki* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés.

LIPA 281/11 (<i>L. killicki</i>)					
Concentration initial	Concentration ajustée à	Concentrations après l'incubation de 1h			
		[H ₂ O ₂]=10 µM	[H ₂ O ₂]=100 µM	[DAC]=10 µM	[DAC]=100 µM
26.56 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	2x 10 ⁶	1.50 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶	1.4x 10 ⁶

Tableau 11 : La concentration parasitaire (parasites/ml) de *L. Infantum* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés.

LIPA 15/05 (<i>L. Infantum</i>)					
Concentration initial	Concentration ajustée à	Concentrations après l'incubation de 1h			
		[H ₂ O ₂]=10 µM	[H ₂ O ₂]=100 µM	[DAC]=10µM	[DAC]=100 µM
30 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	1.93 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶	1.60 x 10 ⁶	2.56x 10 ⁶

Tableau 12 : La concentration parasitaire (parasites/ml) de *L. major* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés.

LIPA 100/09 (<i>L. major</i>)					
Concentration initial	Concentration ajustée à	Concentrations après l'incubation de 1h			
		[H ₂ O ₂]=10 µM	[H ₂ O ₂]=100 µM	[DAC]=10 µM	[DAC]=100 µM
22 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	8 x 10 ⁵	1.44x 10 ⁵

Tableau 13 : La concentration parasitaire (parasites/ml) *L. tropica* avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés.

K27 (<i>L. tropica</i>)					
Concentration initial	Concentration ajustée à	Concentrations après l'incubation de 1h			
		[H ₂ O ₂]=10 µM	[H ₂ O ₂]=100 µM	[DAC]=10 µM	[DAC]=100 µM
40 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	2.50 x 10 ⁶	2.50 x 10 ⁶	2.40x 10 ⁶	2.40x 10 ⁶

Tableau 14 : La concentration parasitaire (parasites/ml) de LEM 2248 (*L. amazonensis*) avant et après le contact de 1h avec les produits étudiés.

LEM 2248 (<i>L. amazonensis</i>)					
Concentration initial	Concentration ajustée à	Concentrations après l'incubation de 1h			
		[H ₂ O ₂]=10 µM	[H ₂ O ₂]=100 µM	[DAC]=10 µM	[DAC]=100 µM
30 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	2.24 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶	1.7x 10 ⁶

Annexe V : Résultats

2. Résultats COMET Assay

Tableau 15 : Fréquences des dommages de *L. Killicki* suite à l'activité des inhibiteurs.

Lipa 281/11 (<i>L. Killicki</i>)					
Type des dommages	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
[C]					
Control	72	28	/	/	/
[H2O2]=100uM	/	/	2	1	97
[H2O2]=10uM	5	20	75	/	/
[DAC]=100uM	8	2	15	/	75
[DAC]=10uM	2	24	74	/	/

Tableau 16: Fréquences des dommages de *L. Infantum* suite à l'activité des inhibiteurs.

Lipa 15/05 (<i>L. Infantum</i>)					
Type des dommages	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
[C]					
Control	100	/	/	/	/
[H2O2]=100uM	64	4	13	3	16
[H2O2]=10uM	81	/	1	10	8
[DAC]=100uM	48	2	15	/	35
[DAC]=10uM	67	3	16	/	14

Tableau 17: Fréquences des dommages de *L. Major* suite à l'activité des inhibiteurs.

Lipa 100/09 (<i>L. Major</i>)					
Type des dommages	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
[C]					
Control	73	27	/	/	/
[H2O2]=100uM	48	/	36	/	16
[H2O2]=10uM	67	3	5	/	25
[DAC]=100uM	55	4	24	17	/
[DAC]=10uM	32	11	3	/	55

Tableau 18 : Fréquences des dommages de *L.Tropica* suite à l'activité des inhibiteurs.

K27 (<i>L. Tropica</i>)					
Type des dommages	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
[C]					
Control	74	26	/	/	/
[H2O2]=100uM	1	2	97	/	/
[H2O2]=10uM	/	1	67	2	30
[DAC]=100uM	/	/	61	3	36
[DAC]=10uM	23	1	39	/	37

Tableau 19 : Fréquences des dommages de *L.Amazonensis* suite à l'activité des inhibiteurs.

LEM 2248 (<i>L. Amazonensis</i>)					
Type des dommages	Dom0	Dom1	Dom2	Dom3	Dom4
[C]					
Control	90	10	/	/	/
[H2O2]=100uM	33	41	4	/	22
[H2O2]=10uM	12	83	/	/	5
[DAC]=100uM	36	50	12	1	1
[DAC]=10uM	65	25	/	1	9