

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MENISTERE DE L'ENSEGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1

Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB – Blida – SOUMAA



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Laboratoire de biotechnologie, environnement et santé

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la nature et de la vie

Spécialité : Parasitologie

THEME

Etude *in vitro* de la susceptibilité à l'Antimoine d'une population clonale d'isolat de *Leishmania* cliniquement résistant au Glucantime®

Présenté par : Mlle ELMERERBI Khadidja Mlle TIDJINI Fatiha

Soutenu le 27 /06/2018 devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} TAIL G

Pr / USDB1

Promotrice : M^{me} EDDAIKRA N.

Maitre de Recherche (IPA)

Examinatrice : M^{me} ADEL A

MCB / ISV / USDB1

Promotion 2018/2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

A mes parents pour m'avoir encouragé et permis d'entreprendre ce mémoire. Sans eux, je n'en serais pas là.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Mm : (Eddaikra Naouel), son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin plus précisément les personnes de l'Institut Pasteur d'Algérie à la réalisation de ce travail.

Résumé

Les leishmanioses sont des maladies tropicales causées par des parasites du genre *Leishmania* qui sont composées de populations de parasites multiclonaux hétérogènes en termes de virulence. La plasticité du génome de *Leishmania* et l'augmentation des cas de résistance, et l'hétérogénéité des populations des souches de *Leishmania* isolées de l'homme nous a conduits à l'étude des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des espèces résistantes à l'antimoine circulantes en Algérie. De ce fait, le but de notre recherche est d'étudier *in vitro* la susceptibilité des clones d'isolat de *Leishmania* cliniquement résistant au Glucantime®.

Afin de produire des clones à partir de souches de *Leishmania infantum*, *L. major* et *L. killicki*, nous avons utilisé deux techniques de clonage sur milieu solide (LIT) et sur milieu liquide (RPMI20S). Cette dernière nous a permis de cloner nos souches avec très peu de passage. L'étude *in vitro* de la susceptibilité à l'antimoine trivalent d'une population clonale d'isolats de *Leishmania* cliniquement résistant au Glucantime®, nous a permis de d'étudier certains caractères phénotypiques et génotypiques des clones en comparaison avec leur souches mères. Nos résultats ont montré une variabilité des populations clonales dans leur susceptibilité à l'antimoine trivalent. Une comparaison génotypique initiale à l'échelle de l'espèce pour deux souches *L. infantum* par PCR RFLP, a fait ressortir l'homogénéité des clones et de leurs souches mères.

Mots clés: *Leishmania*, clonage, *in vitro*, IC₅₀, antimoine trivalent

Abstract

Leishmaniasis are tropical diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* that are composed of populations of heterogeneous multiclonal parasites in terms of virulence. The plasticity of the *Leishmania* genome and the increase of resistance cases, and the heterogeneity of populations of *Leishmania* strains isolated from humans led us to study the phenotypic and genotypic characteristics of circulating antimony resistant species in Algeria. Therefore, the aim of our research is to study *in vitro* the susceptibility of clonally isolates of *Leishmania* isolate clinically resistant to Glucantime®.

In order to produce clones from strains of *Leishmania infantum*, *L. major* and *L. killicki*, we used two solid medium cloning (LIT) and liquid medium cloning techniques (RPMI20S). The latter allowed us to clone our strains with very little passage. The *in vitro* study of trivalent antimony susceptibility in a clonal population of *Leishmania* isolates clinically resistant to Glucantime® allowed us to study some phenotypic and genotypic characters of clones in comparison with their parent strains. Our results showed a variability of clonal populations in their susceptibility to trivalent antimony. An initial genotype comparison at the species level for two *L. infantum* strains by PCR RFLP, revealed the homogeneity of the clones and their parent strains.

Key words: *Leishmania*, cloning, *in vitro*, IC50, trivalent antimony

ملخص

داء الليشمانيات من الأمراض الاستوائية التي تسببها طفيليات جنس الليشمانيا التي تتكون من مجموعات من الطفيليات متعددة الأضداد غير المتجانسة من حيث الفوعة. أدت مرونة الليشمانيا الجينوم وزيادة حالات المقاومة ، وعدم التجانس بين مجموعات سلالات الليشمانيا المعزولة من البشر إلى دراسة الخصائص المظهرية والوراثية للأنواع المقاومة للأنثيمون في الجزائر. لذلك ، فإن الهدف من بحثنا هو أن ندرس في المختبر حساسية العزلات النسلية من الليشمانيا المعزولة سريريًا المقاومة لغلوكانتيم®.

من أجل إنتاج مستنسخات من الليشمانيا *L. infantum* ، *L. major* و *L. killicki* ، استخدمنا طريقتين للاستنساخ على وسط صلب (LIT) وعلى وسط سائل (RPMI20S). هذا الأخير سمح لنا باستنساخ سلالاتنا مع مرور قليل جدا. إن الدراسة المختبرية لقابلية الأنثيمون ثلاثي التكافؤ في مجموعة سلالية من الليشمانيا المعزولة سريريًا المقاومة لغلوكانتيم® سمحت لنا بدراسة بعض الصفات المظهرية وراثية من الاستنساخ بالمقارنة مع سلالاتها الأصلية. أظهرت النتائج التي توصلنا إليها تباينًا في المجموعات النسلية في قابليتها للتأثير التكافؤ. كشفت مقارنة نمط وراثي أولي على مستوى الأنواع لسلالات *L. infantum* بواسطة PCR RFLP ، تجانس المستنسخات وسلالتها الأم.

الكلمات المفتاحية : الليشمانيا ، الاستنساخ ، في المختبر ، IC50 ، الأنثيمون ثلاثي التكافؤ

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Généralités	
1. Morphologie et cycle de vie <i>leishmania</i>	2
1.1. Les promastigotes.....	2
1.2.Les amastigotes	2
2. Les manifestations cliniques de la leishmaniose en Algérie	3
3. Les espèces responsables de la leishmaniose en Algérie	3
3.1. <i>Leishmania major</i>	3
3.2. <i>Leishmania tropica</i> et <i>L. killicki (tropica)</i>	4
3.3. <i>Leishmania infantum</i>	4
4. Traitement de la leishmaniose	4
5. Résistance au traitement par l'antimoine	5
6. Clonalité	7
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Matériel	8
1.1. Matériel biologique	8
1.2. Matériel non biologique	8
2. Méthodes	9
2.1. Culture des leishmanies	9
2.2. Numération des parasites sur la cellule de Thoma	9
2.3.Dilution des suspensions parasitaire.....	9
2.4.Clonage des leishmanies	9
2.4.1. Clonage sur milieu solide (LIT).....	10
2.4.1.1.Clonage par ensemencement des stries larges	10
2.4.1.2.Clonage par ensemencement par gouttes	11
2.4.2. Clonage par dilution limite.....	11
2.5. Test de sensibilité sur les formes promastigotes	11
2.6.Extraction d'ADN de leishmanies	11
2.6.1. Préparation des culots parasitaires	11
2.6.2. Extraction des <i>Leishmania</i>	12
2.6.2.1.Lyse des parasites	12
2.6.2.2.Extraction phénol/chloroforme et précipitation.....	12
2.7. PCR- RFLP	13
2.8. Analyse statistique	13
Chapitre III : Résultats	
1. Résultats du clonage des trois espèces de <i>Leishmania</i>	14
1.1. sur milieu solide (LIT)	14
1.1.1. Résultats du clonage par ensemencement des stries	14
1.1.1.1. Evaluation de la technique du clonage par ensemencement en stries large sur milieu solide (LIT)	15
1.1.2. Résultats du clonage par ensemencement par des gouttes	15

1.1.2.1. Evaluation de la technique du clonage par ensemencement par des gouttes sur milieu solide(LIT).....	16
1.2.La technique du clonage par dilution limite du clonage par ensemencement des stries ..	17
2. Résultats de cinétique de viabilité en fonction des concentrations de Sb III	18
2.1. <i>Leishmania infantum</i> LIPA 222/11	18
2.2. <i>Leishmania infantum</i> LIPA 155/10	19
2.3. <i>Leishmania infantum</i> LIPA 405/93	21
2.4. <i>Leishmania major</i> LIPA 32/06	22
2.5. <i>Leishmania killicki</i> LIPA 07/05	24
2.6. <i>Leishmania killicki</i> LIPA 10/05	25
3. Résultats des IC ₅₀ du traitement Sb III sur la forme promastigote des mêmes espèces de <i>Leishmania</i> et leurs clones	26
3.1. <i>Leishmania killicki</i>	27
3.2. <i>Leishmania major</i>	28
3.3. <i>Leishmania infantum</i>	29
4. Résultat PCR-RFLP	31
Chapitre IV : Discussion	32
Conclusion	37
Rappel bibliographique	
Annexe	

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- BET** : Bromure d'éthidium
- DO** : Densité Optique
- IC50** : Concentration inhibitrice à 50%
- IPA** : Institut Pasteur D'Algérie
- L** : *Leishmania*
- LC** : Leishmaniose cutanée
- LV** : Leishmaniose viscérale
- LIPA** : Laboratoire de l'Institut Pasteur D'Algérie
- LIT** : Liver Infusion Trypticase
- M199** : Milieu 199 (Medium 199)
- MI** : Microscope inversé
- MP** : Microscope photonique
- MM** : Mélange maître « Master Mix »
- NNN**: Novy Nicole Mc Neal
- Pb**: Paire de bases
- PCR**: Polymerase Chain Reaction
- RFLP**: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
- RPMI1640**: Roswel Parc Memorial Institute
- Sb III** : Antimoine trivalent
- SbV** : Antimoine pentavalent
- SDS** : Dodécyl sulfate de sodium
- SVF** : Sérum de veau fœtal
- T** : Témoin
- TAE** : Tampon pour Tris, Acétate, EDTA
- TE** : Tris-EDTA

Liste des figures

Figure 1. Les principaux composants de la leishmaniose cutanée en Algérie	2
Figure 2. Une hépatosplénomégalie. District d'Éthiopie causée par la leishmaniose viscéral .	2
Figure 3. Répartition géographique des cas de leishmaniose cutanée due à <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> et <i>L. tropica</i> dans les pays d'Afrique du Nord	3
Figure 4. Mécanismes d'action et de résistance à l'antimoine proposés dans <i>Leishmania spp</i>	6
Figure 5. Schéma expérimental des différentes techniques de clonage	10
Figure 6. Représentation schématique des étapes d'Extraction des ADN des promastigotes obtenus à partir des cultures des clones et de la souche mère	12
Figure 7. Aspect de la boîte de LIT ensemencé par stries à l'œil nu(a) et sous stéréomicroscope(b)	14
Figure 8. Aspect de la boîte de LIT ensemencé par gouttes à l'œil nu (a) et sous stéréomicroscope (b).....	16
Figure 9. Aspect de puit de microplaque riche en parasites sélectionnés et observés sous MP	17
Figure 10. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i> (LIPA 222/11) et ces clones après 72h d'incubation..	18
Figure 11. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i> (LIPA 155/10) et ces clones après 72h d'incubation...	20
Figure 12. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania infantum</i> (LIPA 405/93) et ces clones après 72h d'incubation.	21
Figure 13. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania major</i> (LIPA 32/06) et ces clones après 72h d'incubation	23
Figure 14. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania killicki</i> (LIPA07/05)et ces clones après 72h d'incubation.	24
Figure 15. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de <i>Leishmania killicki</i> (LIPA10/05)et ces clones après 72h d'incubation.	25
Figure 16. Résultats de la distribution des IC ₅₀ des souches mères et de leurs clones en fonction des souches étudiées.	27
Figure 17. Résultats des IC ₅₀ du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote des deux souches de <i>Leishmania killicki</i> (LIPA10/05 et LIPA 07/05), et leurs clones après 72h d'incubation.....	28
Figure 18. Résultats des IC ₅₀ du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote de la souche de <i>Leishmania major</i> (LIP32/06), et leurs clones après 72h d'incubation.....	29
Figure 19. Résultats des IC ₅₀ du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote des deux souches de <i>Leishmania infantum</i> (LIPA155/10, LIPA 222/11 et LIPA 405/93), et leurs clones après 72h d'incubation.	30
Figure 20. Visualisation des fragments par comparaison avec un marqueur d'électrophorèse en gel d'Agarose	31

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristique des souches de <i>Leishmania</i> utilisées pour les clonages	8
Tableau 2. Résultats des cultures sur milieu RPMI 20s de colonies obtenues par clonage par stries sur LIT pour les souches étudiées	15
Tableau 3. Critères d'évaluation de la technique du clonage par ensemencement en stries larges sur milieu solide (LIT).....	15
Tableau 4. Critères de la technique du clonage par ensemencement par des gouttes sur milieu solide (LIT)	16
Tableau 5. Résultats d'observation des microplaques obtenus sur milieu RPMI 20S sous Microscope inversée, au G x 1.6.	17
Tableau 6. Critères de la technique du clonage par dilution limite.	18
Tableau 7. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 222/11 en fonction des concentrations de SbIII.	19
Tableau 8. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 222/11 en fonction de la concentration de SbIII	19
Tableau 9. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 155/10 en fonction des concentrations de SbIII.....	20
Tableau 10. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 155/10 en fonction de la concentration de SbIII.	21
Tableau 11. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 405/93 en fonction des concentrations de SbIII.	22
Tableau 12. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 405/93 en fonction de la concentration de SbIII.	22
Tableau 13. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 32/06 en fonction des concentrations de SbIII.....	23
Tableau 14. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 32/06 en fonction de la concentration de SbIII.	23
Tableau 15. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 07/05 en fonction des concentrations de SbIII.....	24
Tableau 16. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 07/05 en fonction de la concentration de SbIII.	25
Tableau 17. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 10/05 en fonction des concentrations de SbIII.	26
Tableau 18. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère en fonction de la concentration de SbIII.	26

Les leishmanioses sont un groupe de maladies causées par des parasites protozoaires du genre *Leishmania*. Le parasite est transmis par les piqûres d'insectes de la famille des Diptères, genre *Phlebotomus* et *Lutzomyia* appelés aussi phlébotomes. Ces derniers sont infectés par le parasite *Leishmania* (Custodio et al, 2018).

La leishmaniose est la deuxième plus grande maladie parasitaire en termes de mortalité après le paludisme. On recense plus de 1,3 million de nouveaux cas par an, 12 millions de personnes sont touchées dans le monde et 350 millions de personnes sont actuellement à risque (Alvar et al, 2012).

Les formes cliniques de la leishmaniose sont particulièrement variées et représentent un ensemble de maladies. La leishmaniose viscérale (LV) est généralement mortelle lorsqu'elle n'est pas traitée. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) est une maladie de longue durée due à réponse immunitaire déficiente à médiation cellulaire, et la leishmaniose cutanée (LC) sont invalidantes lorsque les lésions sont multiples (Desjeux, 2004).

Dans plusieurs régions du monde, l'incidence des flambées de leishmaniose a été associée à l'urbanisation, aux voyages, aux changements climatiques et aux conflits sociaux (Cardenas et al, 2008 ; Akhoundi et al, 2016).

Aucun vaccin humain efficace n'est actuellement disponible contre *Leishmania*, et les mesures de contrôle concernent principalement la chimiothérapie. L'antimoine pentavalent (SbV) est le médicament standard depuis 70 ans et reste le pilier dans de nombreuses régions endémiques (Laffitte et al, 2016).

L'échec thérapeutique au cours du traitement à l'antimoine reste un problème bien connu, mais la résistance à l'antimoine n'est pas le seul facteur qui mène à l'échec thérapeutique. En effet, les facteurs liés à l'hôte, tel que l'immunosuppression due au VIH ou à la malnutrition, le médicament lui-même, l'espèce de *Leishmania* ou le praticien (Croft et al 2006 ; Llanos-Cuentas et al, 2008). Dans la plupart des régions du monde, la fréquence de la résistance à l'antimoine parasitaire liée à l'échec du traitement est inconnue (Aït-Oudhia et al, 2011).

En Algérie, l'absence de réponse à Sb (V) au traitement des leishmanioses cutanées zoonotiques est bien documentée dans l'étude de M'sila. En 1986, une enquête menée auprès de 97 enfants ayant un traitement d'antimoniote de méglumine, n'a pas rapporté de réponse significative par rapport à ceux recevant le placebo (Belazzoug et Neal, 1986). Plus récemment, 9% des cas de non-réponse au traitement antimonial **et de mortalité** ont été enregistrés chez des enfants atteints de leishmaniose viscérale (Zait et al, 2012 ; **Adel et al, 2014**). Cette information devrait être cruciale pour traiter le risque de sélection et de transmission des parasites pharmacorésistants, en particulier dans les zones où l'antimoine est la seule alternative chimiothérapeutique.

La plasticité du génome de *Leishmania* et l'augmentation des cas de résistance, et l'hétérogénéité des populations des souches de *Leishmania* isolées de l'homme nous a conduits à l'étude des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des espèces résistantes à l'antimoine circulantes en Algérie. De ce fait, le but de notre recherche est d'étudier *in vitro* la susceptibilité des clones d'isolat de *Leishmania* cliniquement résistant au Glucantime®.

Les leishmanioses sont des maladies tropicales négligées causées par des parasites *Leishmania* et transmises aux mammifères par des piqûres de phlébotomes infectés du genre *Phlebotomus*. Chez l'homme, ces maladies peuvent avoir des manifestations cliniques cutanées (LC), muco-cutanées (LMC) ou viscérales (LV) (Chaarra et al, 2015).

1. Morphologie et cycle de vie *Leishmania*

Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes et dimorphiques c'est-à-dire possédant deux formes morphologiques différentes au cours de leur cycle de vie. Tout d'abord la forme promastigote qui se développe chez le vecteur, un diptère hématophage, le phlébotome. Alors que la forme amastigote se développe à l'intérieur des macrophages chez l'hôte mammifère (Ouellette et al, 2003 ; Vannier-Santos et al, 2002).

1.1. Les promastigotes: La transmission à l'hôte vertébré provient de phlébotomes, dans lesquels les parasites se développent et se multiplient en tant que promastigotes flagellés de 20 µm. Chez le phlébotome, les parasites subissent un programme de développement en commençant par l'amastigote dans le repas de sang, en continuant à travers plusieurs étapes de maturation des promastigotes, et culminant avec la forme métacyclique infectieuse (Handman., 2001)(**Figure1**).

1.2. Les amastigotes sont des parasites intracellulaires de forme ronde ou ovale d'environ 4µm de long et 2µm de large, possédant un flagelle très court (Dedet, 1999). Le changement de température de 25°C à 37°C (Garlapati et al, 1999) et le changement de pH, d'un pH physiologique à un pH aux environs de 5.0, induisent la différenciation en amastigotes (Ouellette et al, 2003) (**Figure1**).

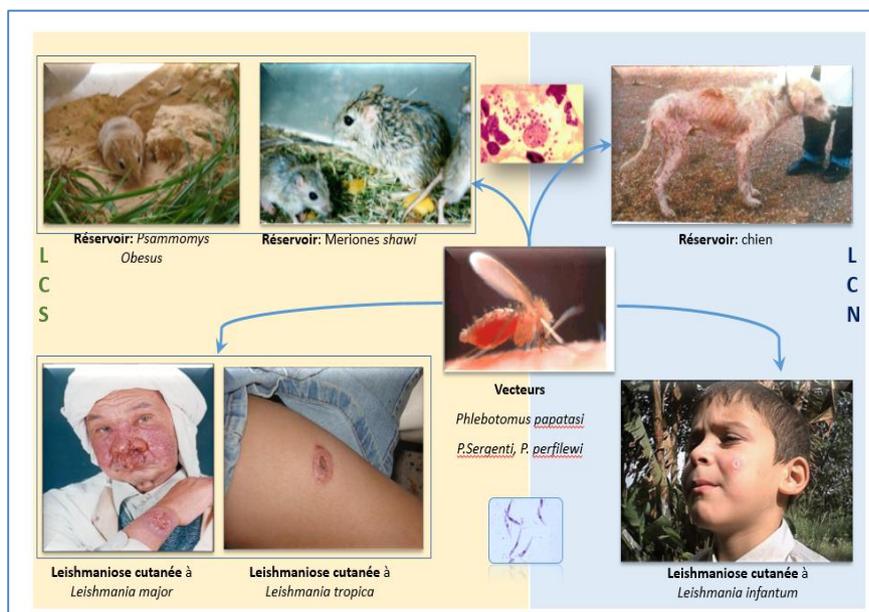


Figure1. Les principaux composants de la leishmaniose cutanée en Algérie (Eddaikra, 2016).



Figure 2. Une hépatosplénomégalie. District d'Éthiopie causée par la leishmaniose viscérale (OMS, 2014).

2. Les manifestations cliniques de la leishmaniose en Algérie

Les manifestations cliniques de la leishmaniose vont de diverses formes cutanées à une forme viscérale fatale. Dans le bassin méditerranéen, la leishmaniose cutanée anthroponotique (LCA), est causée par *Leishmania tropica*. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) est causée en grande partie par *Leishmania major*, et moins fréquemment par *Leishmania infantum*. La leishmaniose viscérale zoonotique (LVZ) est causée par *L. infantum*. La leishmaniose viscérale est largement distribuée autour du bassin méditerranéen (**figure 3**), contrairement à la LCZ et la LCA qui sont plus restreintes aux régions méridionales et orientales (Eddaikra et al, 2017).

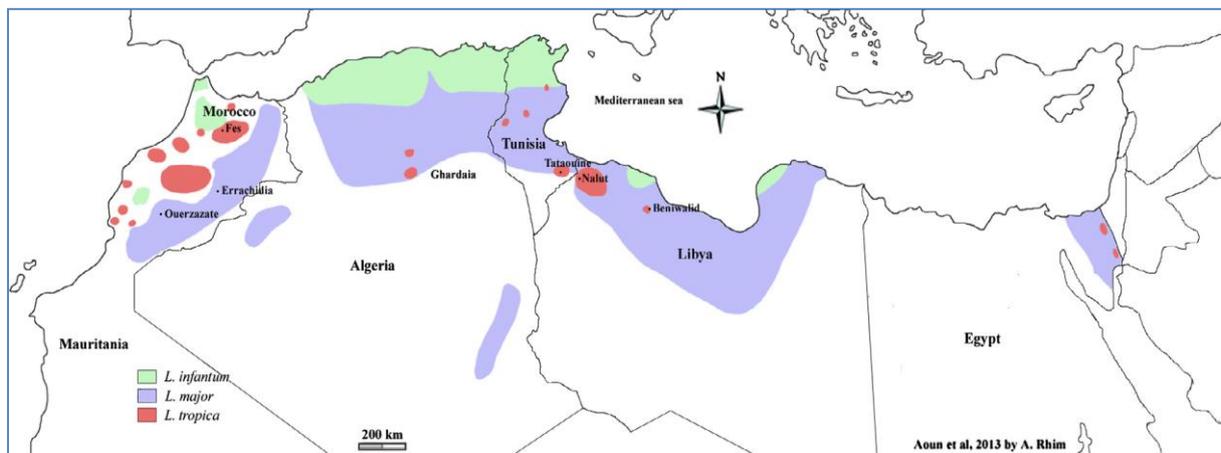


Figure 3. Répartition géographique des cas de leishmaniose cutanée due à *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica* dans les pays d'Afrique du Nord (Aoun et al, 2014).

3. Les espèces responsables de la leishmaniose en Algérie

Dans l'ancien monde, seuls *L. infantum* et *L. donovani* sont connus pour provoquer des formes viscérales de leishmaniose (LV). Néanmoins, ces deux espèces peuvent également être les agents responsables de certaines formes de LC (Sharma et al, 2005 ; Aoun et Bouratbine, 2014).

En Algérie, *Leishmania infantum*, *Leishmania major* et *Leishmania killicki* (*Leishmania tropica*) sont responsables de la leishmaniose cutanée. Alors que *L. infantum* est responsable de la LV (Eddaikra et al, 2016).

3.1. *Leishmania major*

Leishmania major a un taux d'incidence élevé dans tous les pays de la région méditerranéenne où il est considéré comme un problème de santé publique. La LCZ est distribué dans les stades bioclimatiques arides et sahariens (Toumi et al, 2012). *Phlebotomus* (*P. papatasi*) est le vecteur prouvé. Il utilise fréquemment des terriers de rongeurs pour se reposer et se reproduire pendant la journée (Aoun et Bouratbine, 2014). Le rat de sable *Psammomys* (*P. obesus*) et la gerbille *Merionesspp.* Sont des hôtes réservoirs. *Psammomys obesus* est le principal réservoir de *L. major* (Ashford, 1996 ; Ashford, 2000).

3.2. *Leishmania tropica* et *L. killicki* (*tropica*)

La forme nord-africaine de *L. tropica* LC reste nettement distinguable de la LC anthroponotique urbaine et hyper-endémique (Reithinger et al, 2007). En fait, cette forme prédomine dans les foyers ruraux hypo-endémiques dispersés et les petites villes situées dans les montagnes arides où la maladie est typiquement sporadique (Rhajaoui, 2011).

Leishmania tropica est reconnue comme une espèce très hétérogène et son hétérogénéité intraspécifique est facilement démontrée par de nombreux auteurs (Aoun et Bouratbine, 2014). Des cas sporadiques se produisent dans les zones rurales et les petites villes (Ashford, 2000). En Algérie, en Tunisie et en Libye, la rareté relative des cas de LC à *L. tropica* et leur distribution spatiale exclut le caractère anthroponotique de la maladie. *Phlebotomus sergenti* est le vecteur prouvé. Le réservoir animal putatif est le Gundi (Aoun et Bouratbine, 2014).

En Algérie, *L. killicki* a été découvert en 2005 dans la province méridionale de Ghardaïa et récemment signalé dans la partie nord du pays (Harrat et al, 2009 ; Izri et al, 2014). Les lésions cutanées provoquées par *L. killicki* sont appelées lésions cutanées chroniques car elles persistent plusieurs années (Maubon et al, 2009). Outre la Tunisie, ce taxon a été décrit en Libye (Aoun et al, 2006), et en Algérie (Harrat et al, 2009 ; Izri et al, 2014). La transmission de ce parasite est probablement zoonotique, avec le rongeur *Ctenodactylus gundi* comme réservoir et *Phlebotomus* (*P. sergenti*) comme vecteur (Tabbabi et al, 2011 ; Bousslimi et al, 2012). Dans une étude taxonomique récente, il a été confirmé que *L. killicki* est inclus dans le complexe de *L. tropica* et suggéré de l'appeler *L. killicki* (synonyme *L. tropica*). Le statut taxonomique de *Leishmania killicki*, un parasite qui provoque la leishmaniose cutanée chronique, n'est pas encore bien défini (Chaara et al, 2015).

3.3. *Leishmania infantum*

Outre les espèces dermatropes *L. major* et *L. tropica*, l'espèce viscérotrope *L. infantum* est également impliquée dans la LC dans l'Afrique du Nord. La forme LC due à *L. infantum* est répartie dans les stades bioclimatiques humides, subhumides et semi-arides. Elle prévaut en cas sporadiques dans la distribution de la leishmaniose viscérale (Aoun et Bouratbine, 2014). Les vecteurs des espèces phlébotomines appartiennent au sous-genre *Larroussi*, à savoir *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. longicuspis* et *P. ariasi*, et varient selon les pays et les régions concernés (Ghrab et al, 2006 ; Harrat et al, 1996). Le chien domestique est l'hôte réservoir putatif (Benikhlef et al, 2004).

4. Traitement de la leishmaniose

Le traitement de *Leishmania* est basé sur l'administration de quelques médicaments qui ont de plus en plus d'effets secondaires et de résistance croissante (Assche et al, 2011). Le traitement consiste en l'application de médicaments antileishmaniens spécifiques tels que les agents antimoniés pentavalents, l'amphotéricine B, la paromomycine et la miltéfosine (Cobo, 2014). Les préparations d'Amphotéricine ont typiquement été utilisées dans le traitement de la leishmaniose viscérale et de la cutanéomuqueuse (Mitropoulos et al, 2010). L'amphotéricine B conventionnelle a remplacé les antimonieux comme traitement de première intention de la leishmaniose viscérale dans certaines régions, bien que l'amphotéricine B liposomale soit la drogue ayant l'efficacité thérapeutique la plus élevée et le profil d'innocuité le plus favorable.

Le désoxycholate d'amphotéricine B se lie aux précurseurs de l'ergostérol du parasite, provoquant une perturbation de la membrane du parasite. Il doit être administré en perfusion intraveineuse lente pendant quatre heures. Ce médicament peut causer des anomalies rénales qui sont habituellement réversibles à l'arrêt du médicament.

L'amphotéricine B liposomale améliore l'efficacité antimicrobienne et réduit la toxicité systémique. C'est le seul médicament approuvé par la FDA pour le traitement de la leishmaniose viscérale aux États-Unis. Le principal problème avec ce médicament, en dehors de ses effets secondaires, est le coût élevé. La miltefosine est le premier agent oral efficace pour le traitement de la leishmaniose viscérale (Cobo, 2014). La Paromomycine est un aminoglycoside ayant une activité antileishmanial principalement utilisé en combinaison avec l'antimoniés (Sb) pour réduire la durée du traitement (Assche et al, 2011).

Les composés antimonieux pentavalents restent le traitement de première intention contre les formes cutanées et viscérales de la leishmaniose en Afrique du Nord (Eddaikra et al, 2017). Les antimoniés pentavalents (SbV) sont le promédicament et qui doivent être convertis en antimoines trivalents (SbIII) pour l'activité antileishmanial (Assche et al, 2011). En Algérie, la prise en charge de la leishmaniose est assurée gratuitement par les structures de santé. Le diagnostic de LC se fait au niveau du centre de santé mais les formes viscérales sont diagnostiquées dans les hôpitaux (Eddaikra et al, 2017). Le traitement avec les antimoniés nécessite une administration par voie parentérale et est également gêné par des effets secondaires toxiques tels qu'une arythmie cardiaque et une pancréatite aiguë (Assche et al, 2011). Il peut être responsable d'effets indésirables de gravité variable (stibio-intolérance ; stibio-intoxication) (Ezzine Sebai et al, 2010). L'émergence de résistance chez certaines souches de *Leishmania* illustre le besoin urgent de nouveaux médicaments. La cible pour la chimiothérapie est l'amastigote intracellulaire qui survit et se divise en macrophages tissulaires, rendant ainsi la tâche de thérapie antileishmaniale difficile (Assche et al, 2011). Plusieurs autres médicaments, tels que l'allopurinol, la rifampicine, la dapsonne, la chloroquine et le nifurtimox ont été proposés comme alternatives au traitement de la leishmaniose (Mitropoulos et al, 2010).

5. Résistance au traitement par l'antimoine

Le mécanisme de résistance repose sur la compréhension approfondie du mode d'action antileishmanien de l'antimoine (**Figure 4**) (Eddaikra et al, 2017).

Les premiers travaux suggèrent que les antimoniaux agissent probablement en inhibant la glycolyse et l'oxydation des acides gras (Berman et al, 1985, 1987a). Des preuves récentes ont montré que l'antimoine tue le parasite par un processus d'apoptose impliquant la fragmentation de l'ADN et l'externalisation de la phosphatidylsérine sur la surface externe de la membrane (Serenio et al, 2001 ; Sudhandiran et Shaha, 2003 ; Lee et al, 2002). En outre, Il a aussi été démontré que le Sb III inhibe la trypanothione réductase (TR) (Cunningham et al, 1994). La principale fonction du trypanothione est de combattre le stress oxydant (Krieger et al, 2000), et la glutathion synthétase (Wyllie et Fairlamb, 2006) *in vitro*. L'exposition au Sb III entraîne également un efflux rapide de trypanothione (TSH) et de GSH à partir d'amastigotes isolés et de promastigotes *in vitro* (Wyllie et al, 2004). Par conséquent, les

antimoniaux peuvent compromettre le potentiel redox de la cellule en induisant la perte de thiols intracellulaires couplée à l'accumulation de disulfures, et en inhibant le TR (Cunningham & Airlamb, 1995).

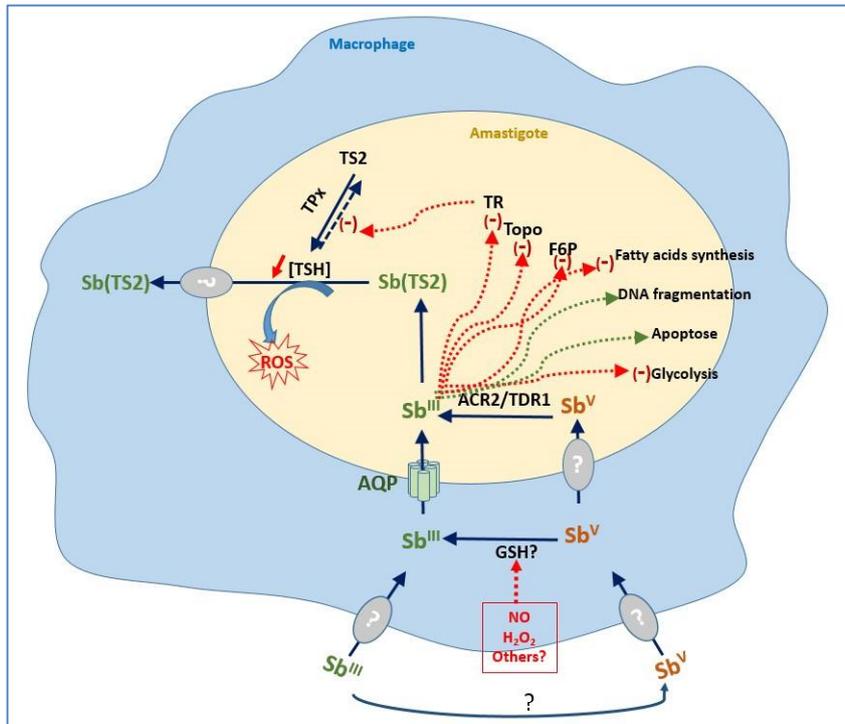


Figure 4. Mécanismes d'action et de résistance à l'antimoine proposés dans *Leishmania spp* (Eddaikra et al, 2017).

Le principal mécanisme de résistance est la diminution de la concentration du médicament actif dans la cellule parasitaire. Le parasite peut abaisser le niveau du médicament par divers mécanismes. Notamment par une diminution de l'absorption du Sb III, par une diminution de l'expression de AQP1 ou en augmentant l'efflux / séquestration du médicament actif en conjugaison avec les thiols en augmentant les niveaux de thiols et en amplifiant les transporteurs (Ashutosh et al, 2007). Un autre mécanisme principal de résistance mis en évidence chez *Leishmania* consiste en des réarrangements génomiques, qui conduisent à l'amplification de gènes de résistance par recombinaison homologue entre des séquences répétées (Eddaikra et al, 2017).

Le mécanisme de résistance à l'antimoine naturel est multifactoriel et peut différer de la résistance du laboratoire. Ces aspects doivent être développés de toute urgence pour surveiller l'utilisation régulière de médicaments, la réponse aux médicaments et la propagation de la résistance (Ashutosh et al, 2007).

6. Clonalité

Malgré de nombreuses études depuis les années 1990 et les progrès récents de la génétique moléculaire de ces organismes, le mode de reproduction du parasite *Leishmania* est encore en débat. Deux hypothèses majeures sont postulées : **Clonalité** versus **sexualité** (Rougeron et al, 2010).

Dans le genre *Leishmania*, la reproduction asexuée a longtemps été proposée comme mécanisme principal de la reproduction. Depuis 1990, Tibayrenc et al. ont proposé **la théorie clonale** pour toutes ou la plupart des espèces de *Leishmania* (Tibayrenc et Ayala, 2002 ; Tibayrenc, 1993 ; Tibayrenc et al, 1990).

Cette théorie était principalement basée sur le concept que la progéniture est génétiquement identique à ses parents (Tibayrenc et al, 1990). La théorie clonale n'indique pas que le sexe est totalement absent chez les espèces essentiellement clonales, mais plutôt qu'il est trop rare de briser un schéma dominant de la structure de la population clonale avec toutes ses manifestations classiques (Tibayrenc et al, 1990). De plus, les **clones** identifiés par des ensembles limités de marqueurs génétiques ne sont pas, dans la plupart des cas, de vrais clones, mais plutôt des familles de clones étroitement apparentés (Tibayrenc et al, 1990). Le terme CLONE utilisé dans ce contexte a une signification génétique qui fait référence à des situations où la progéniture est génétiquement identique aux cellules parentales, quel que soit le système d'accouplement de l'espèce étudiée (Gupta et Day, 1994).

La diversité génétique significative de la plupart des microparasites, est un paramètre qui est de plus en plus pris en compte dans les études appliquées (études cliniques, conception de vaccins et de médicaments). En ce qui concerne la stratégie de reproduction, l'image émergente est fascinante du point de vue de l'évolution. La plupart des parasites jouent sur un clavier complexe de stratégies reproductives, et pourraient tirer profit, selon les circonstances, de la reproduction sexuelle, générant ainsi rapidement une nouvelle variabilité génétique. Cette propagation clonale va stabiliser les génotypes multilocus réussis (Tibayrenc et al, 2002).

Pour surmonter des conditions stressantes telles que la pression médicamenteuse, *Leishmania* dépend souvent des variations du nombre de copies d'ADN : aneuploïdie, amplification génique ou délétion de gènes, pour réguler l'expression de cibles médicamenteuses, de transporteurs de médicaments ou d'autres déterminants de la résistance (Laffitte et al, 2016).

La caractérisation de la virulence parasitaire semble pertinente en tant que marqueur biologique des facteurs parasitaires intrinsèques pouvant affecter la pathologie de la leishmaniose. Puisque les populations de parasites chez les hôtes naturellement infectés sont susceptibles d'être composées d'associations multiclonaux, des études de la biodiversité de la virulence parasitaire sont importantes in vitro utilisant des clones isolés (Garin et al, 2001).

Le clonage des protozoaires parasites permet de mettre en évidence des caractéristiques générales et améliore notre compréhension de la génétique des populations de *Trypanosoma* et de *Leishmania*. La pertinence est considérable non seulement pour notre connaissance de la biologie fondamentale de ces organismes, mais aussi pour la recherche appliquée : épidémiologie moléculaire (typage des souches), recherche clinique, conception de vaccins et de médicaments, et évolution expérimentale (Tibayrenc et al, 2012).

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Les parasites : Toutes les espèces de *Leishmania* utilisées ont été décongelées à partir de la cryobanque du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Alger. Les caractéristiques des souches utilisées sont dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Caractéristique des souches de *Leishmania* utilisées pour les clonages

Code IPA de la souche	Référence OMS des souches	Origine	Forme clinique	Zymodèm	Espèces
(LIPA07/05)	MHOM/DZ/2005/LIPA 07/05	Ghardaia	LC	MON 25	<i>Leishmania killicki</i>
(LIPA10/05)	MHOM/DZ/2005/LIPA 10/05	Ghardaia	LC	MON 25	<i>Leishmania killicki</i>
(LIPA32/06)	MPSA/DZ/2006/LIPA 32/06	Msila	LC	MON 301	<i>Leishmania major</i>
(LIPA155/10)	MHOM/DZ/2010/LIPA 155/10	Tizi Ouzou	LV	MON 1	<i>Leishmania infantum</i>
(LIPA222/11)	MHOM/DZ/2011/LIPA 222/11	Tizi Ouzou	LV	MON 1	<i>Leishmania infantum</i>
(LIPA405/93)	MHOM/DZ/1993/LIPA 405/93	Tizi Ouzou	LC	MON 1	<i>Leishmania infantum</i>
(LIPA506/93)	MHOM/DZ/2005/LIPA 506/93	Bouira	LC	MON 1	<i>Leishmania infantum</i>

Les souches ont été maintenue en culture en milieu NNN et /ou RPMI à 10% de SVF dans une étuve à 25°C après leur décongélation.

1.2. Matériel non biologique

Réactifs et solutions : Bleu de Trypan, Sérum de veau fœtal (SVF), Antimoine trivalent Sb III, SbV (*Glucantime*®), Formaldéhyde à 37% (Formol), Sang de lapin citraté (SL), Biotérine.

Milieux de cultures et de clonage : Milieux NNN, RPMI10S, RPMI20S, LIT. La conservation de ces milieux se fait +4°C.

2. Méthodes

Une culture de Leishmanies sur les deux milieux NNN et RPMI20S a été entamée juste après la décongélation des souches. Cette culture nous a donné des clones par l'utilisation des deux méthodes de clonage (sur milieux solide et liquide). La sensibilité des clones obtenus et leurs souches mères ont été testées à différentes concentrations d'antimoine trivalent (Sb III), pour déterminer les IC50. Enfin, l'identification moléculaire des espèces des deux souches de *Leishmania infantum* LIPA 155/10 et 222/11 a été faite par PCR RFLP.

2.1. Culture des leishmanies

La mise en culture des leishmanies permet à l'isolement, la congélation et l'obtention de biomasse nécessaire pour les études *in vitro*. Nous avons utilisé deux milieux de culture : Le milieu semi solide NNN, qui est très efficaces pour la croissance et l'isolement des souches ; et le milieu liquide RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF (RPMI 10S). Les parasites sont généralement isolés et entretenu sur NNN, alors que la culture sur RPMI 10S est utilisée pour les études *in vitro* des formes promastigotes.

2.2. Numération des parasites sur la cellule de Thoma

La numération des formes promastigotes de *Leishmania* a été faite après immobilisation des parasites par un mélange volume à volume de la suspension parasitaire, du Formol. Une goutte de cette suspension a été déposée sur cellule de Thoma et recouverte d'une lamelle. Les parasites ont été comptés sous microscope photonique au grossissement G x 40 (**voir Annexe**).

2.3. Dilution des suspensions parasitaire

La dilution de la suspension parasitaire a été faite sous une hotte à flux laminaire, à une concentration de 100 parasites/ml dans du RPMI supplémenté de SVF à 10%, au cours de la phase exponentielle de la croissance des parasites. L'opération a été réalisée pour chacune des six souches parasitaires sélectionnées.

2.4. Clonage des leishmanies

Afin de réaliser le clonage des souches étudiées, nous avons fait 2 types de clonages sur milieu liquide RPMI supplémenté de SVF à 10% ou sur milieu solide (LIT). Le but de ce clonage étant d'obtenir une population homogène de parasites à partir d'un seul parasite qui est cultivé, qui se développe et donne naissance à plusieurs leishmanies filles par reproduction asexuée (**Figure 5**).

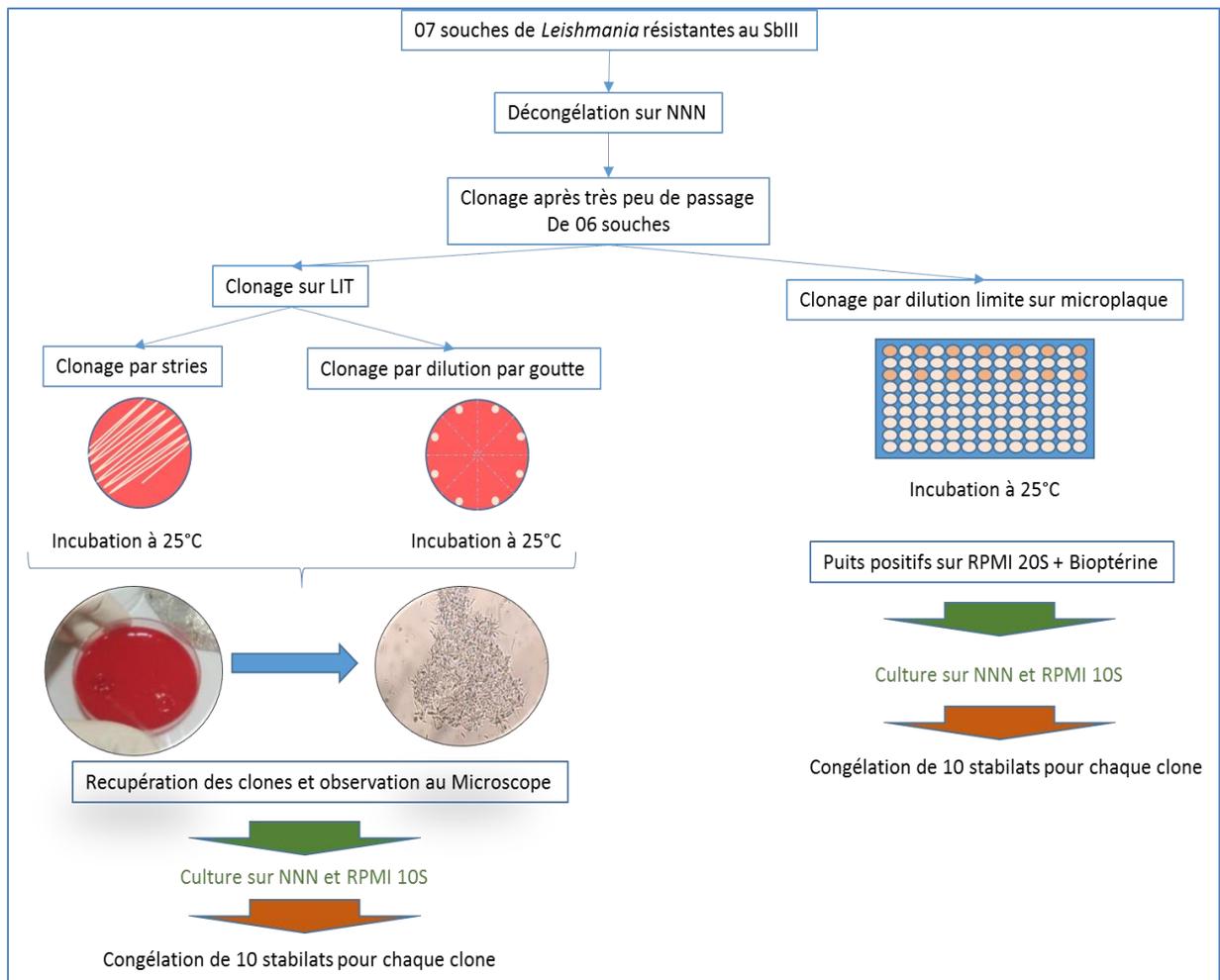


Figure 5. Schéma expérimental des différentes techniques de clonage

2.4.1. Clonage sur milieu solide (LIT)

Deux méthodes de clonage sur Milieu LIT ont été effectuées au cours de notre étude. Un clonage par ensemencement en stries larges, et un Clonage par ensemencement par gouttes. Le milieu LIT a été préparé et coulé stérilement dans des boîtes de pétri. Après refroidissement de la gélose, un contrôle de stérilité de la préparation a été effectué par une incubation de 24h à 37°C.

Afin de faire un ensemencement, une goutte de suspension parasitaire de chaque souche a été prélevée avec une pipette Pasteur stérile ou à l'aide d'une micropipette. Toutes les souches utilisées étaient en phase exponentielle de croissance sur milieu RPMI 10S.

2.4.1.1. Clonage par ensemencement en stries larges

La goutte prélevée a été déposée sur l'extrémité de la boîte LIT et ensemencé par des stries larges. Les boîtes ont été scellées avec du Parafilm® pour éviter la contamination, et incubées à 25°C pendant 2 semaines. L'observation des boîtes a été faite tous les deux jours jusqu'à l'observation de colonies parasitaire (clones) dans l'endroit ensemencé. L'opération a été réalisée pour les 7 souches sélectionnées. Les colonies ont été récoltées stérilement à l'aide de

pipette Pasteur. L'observation des colonies s'est faite à l'aide d'un *stéréomicroscope*. Les 10 colonies récoltées de chaque souche ont été transférées sur milieu RPMI 20S (**Figure 4**).

2.4.1.2. Clonage par ensemencement par gouttes

Après le comptage et la dilution à 100 parasites/ml de la suspension parasitaire des souches en phase exponentielle de croissance, une goutte de 5µL a été prélevée à l'aide de micropipette et déposée sur les boîtes LIT. L'opération a été renouvelée 10 fois pour obtenir 10 clones. Les boîtes ont été scellées avec du Parafilm® pour éviter la contamination, et incubées à 25°C pendant 2 semaines. L'observation des boîtes a été faite tous les deux jours jusqu'à l'observation de colonies parasitaire (clones). L'opération a été réalisée pour les 7 souches sélectionnées. Les colonies ont été récoltées stérilement à l'aide de pipette Pasteur suite à l'observation des colonies par un *stéréomicroscope*. Les 10 colonies récoltées de chaque souche ont été transférées sur milieu RPMI 20S et NNN (**Figure 5**).

2.4.2. Clonage par dilution limite

Afin de faire un clonage sur milieu liquide RPMI 20S, les souches de *Leishmania* (souches mères), en phase exponentielle de croissance, ont été diluées 10^2 parasites/ml, dans du RPMI 20S additionné de Biotryptine (10µg/µL). Une dilution en série au dixième sur microplaque de 96 puits à fond plat, a été effectuée sur 12 puits pour chaque souche étudiée.

Les microplaques ont été ensuite incubées à 25°C pendant 1 semaine. L'observation des Plaques sous microscope inversée a été faite tous les trois jours. Les puits les plus positifs des clones obtenus et la souche mère (pour six souches) ont été repiqués sur RPMI 10S et sur milieu NNN.

2.5. Test de sensibilité sur les formes promastigotes

Après numération sur la cellule du Thoma de la suspension parasitaire en phase exponentielle de croissance, les parasites ont été dilués 2 millions parasites/ml sur milieu RPMI 10S. **Quatre** concentrations d'antimoine trivalent Sb III ont été incubées avec *Leishmania* pour déterminer les IC50 des clones et des souches mères : à savoir 12.5µg/ml, 25 µg/ml, 50µg/ml et 100µg/ml. Un volume de 90µl de la suspension parasitaire a été déposé avec 10µl d'antimoine trivalent Sb III dans des microplaques stériles à fond plat de 96 puits. Chaque concentration a été testée en quadriplate.

Les microplaques ont été incubées à 25°C. Le test a été fait pour six souches sur les 7 sélectionnées, et la numération des parasites dans chaque puit a été réalisée après 72h d'incubation.

2.6. Extraction d'ADN de leishmanies

2.6.1. Préparation des culots parasitaires

Les six souches mères et leurs 5 clones cultivés en milieu NNN, ont été repiqués sur RPMI 10S. Après 5 jours d'incubation, la suspension parasitaire a été centrifugée à 3000 tours/min à 25°C pendant 15min. Le surnageant a été écarté et les culots ont été congelés à -20 C°.

2.6.2. Extraction des *Leishmania*

2.6.2.1. Lyse des parasites

La lyse des parasites a été effectuée après décongélation des culots parasitaires de *Leishmania infantum* LIPA 222/11 et ces 3 clones (4,11, et 12) et la LIPA 155/10 et ces clones (4,3 et 7). Pour cela, un volume de 200µl de tampon de lyse a été ajouté avec 13µl de SDS 10%, et 5 µl de protéinase K. Les tubes ont été mélangés dans le vortex, et l'incubation a été faite toute la nuit à 55C° sous agitation.

2.6.2.2.Extraction phénol/chloroforme et précipitation

Sous une hotte chimique, les lysats des suspensions parasitaires ont été transférés dans des tubes Eppendorf stériles, et un volume de 500 µl de phénol chloroforme/Alcool isoamylique a été ajouté dans chaque tube. Ces derniers ont été incubés 5 min jusqu'à l'obtention d'un liquide laiteux avant de les centrifuger à 5000 tours/min pendant 15 min. La phase supérieure a été ensuite transférée dans des tubes Eppendorf. Pour la précipitation de l'ADN, l'acétate de sodium a été ajouté à raison de 1/10 du volume de la phase supérieure, ainsi que 500 µl d'éthanol absolu. Les tubes ont été centrifugés à 12000 tours/min pendant 15 min. Après centrifugation, le surnageant a été jeté et un volume de 500 µl d'éthanol à 70% a été ajouté dans chaque tube, suivi d'une centrifugation à 12000 tours/min pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé délicatement, suivi du séchage des tubes à température ambiante sur papier absorbant pendant une nuit. Après une nuit de séchage, 100 µl de TE ont été ajoutés, et les tubes ont été congelés à -20C° pour la conservation. Pour évaluer la concentration des ADN extraits, nous avons fait une lecture des Densité Optique (DO) par spectrophotométrie sur Nanodrop®. La méthode est schématisée dans la figure 6.

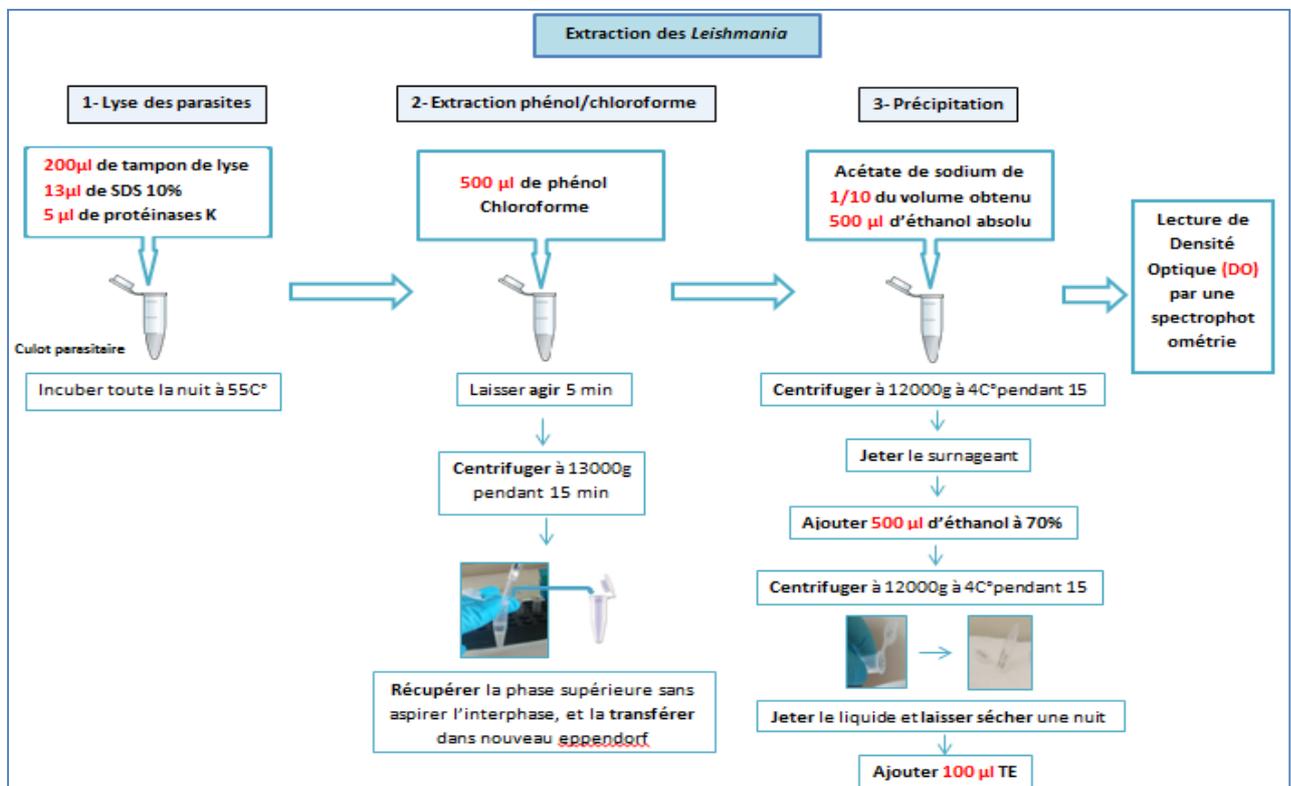


Figure 6. Représentation schématique des étapes d'Extraction des ADN des promastigotes obtenus à partir des cultures des clones et de la souche mère.

2.7. PCR (Polymerase Chain Reaction) RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

Pour la PCR, dans chaque cryotube 24µl de Master Mix (Annexe 3.2), ont été mélangés avec 1 µl d'ADN de parasite. Les tubes vortexés ont été mis dans le Thermocycleur avec le programme spécifique de l'amorce ITS1 (Annexe 3.3), pendant 2 heures et 10min puis conservés à -20C°. La qualité des produits PCR a été contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% (Annexe 3.5). A cet effet, 2µl d'ADN ont été déposés dans les puits du gel d'agarose. De plus, un marqueur de 100 pb a été ajouté en dernière position sur le gel. Au bout d'une migration de 30 min à 70 volt, la migration a été arrêtée et les ADN visualisée sur un transilluminateur dans une chambre noire.

Le Master Mix de digestion a été préparé (Annexe 3.4). Dans chaque cryotube, 15µl de Master Mix de digestion et 15 µl d'ADN des produits PCR de nos souches ont été bien mélangés et incubés à 37C° pendant une nuit.

Pour l'identification des souches, une électrophorèse de 3h à 70 volts, sur gel d'agarose à 3% a été réalisé. Les produits de digestion de nos souches mères LIPA 222/11 et LIPA 155/10 et leurs clones respectifs, ont été déposées dans le puits gel. De plus, des souches référence et un marqueur de 100pb ont aussi été déposés sur le gel. L'observation de migration d'ADN a été faite dans la chambre noire par les rayonnements ultra-violets.

2.8. Analyse statistique

La concentration inhibitrice de l'antimoine trivalent des 50% (IC50) de chaque souche mères et ces clones respectifs, a été calculée par régression non linéaire sur le logiciel Graph Prism 5.0. L'analyse statistique par ANOVA à 2 facteurs, a été utilisée pour comparer l'effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité des formes promastigotes des différentes espèces de *Leishmania* étudiées, à savoir les souches mères et leurs clones, et ce après 72h d'incubation. Le post Test de Bonferoni a permis de comparer les clones à leurs souches mères spécifiques à différentes concentration de SbIII. Les analyses ont été faites sur le Logiciel Graph Prism (5.0).

1. Résultats des Clonages des trois espèces de *Leishmania*

Le clonage *in vitro* des 7 souches de *Leishmania* sur milieu solide LIT et milieu liquide RPMI20S a permis d'isoler le parasite à partir de la souche mère pour obtenir une population de parasites « clone ». En effet, un seul parasite se développe, et donne naissance à plusieurs leishmanies filles. Les différentes espèces de *Leishmania*, ayant subi très peu de passage en culture, ont été contrôlées tous les 3 jours pour suivre leurs évolutions et avoir les conditions optimales pour isoler leurs clones. Les souches devaient être en phase exponentielle de croissance, avoir une bonne mobilité. Les souches utilisées étaient : *Leishmania killicki* (LIPA 07/05 et LIPA 10/05), *Leishmania major* (LIPA 32/06), *Leishmania infantum* (LIPA 405/93 et LIPA 506/93, LIPA 222/11 et LIPA 155/10).

1.1. Sur milieu solide (LIT)

1.1.1. Résultats du clonage par ensemencement des stries

Les 7 souches ensemencées sur boîtes LIT ont été contrôlées régulièrement en vue de suivre la croissance des colonies parasitaires. L'observation des boîtes LIT a été effectuée stérilement et à l'œil nu, et sous un stéréo-microscope, au grossissement Gx1.6 (**Figure 7**). Par ailleurs, les colonies d'intérêt ont été prélevées et examinées au microscope photonique au grossissement Gx40.

Les résultats de l'observation des boîtes ensemencées sont représentés dans le **tableau 2**.

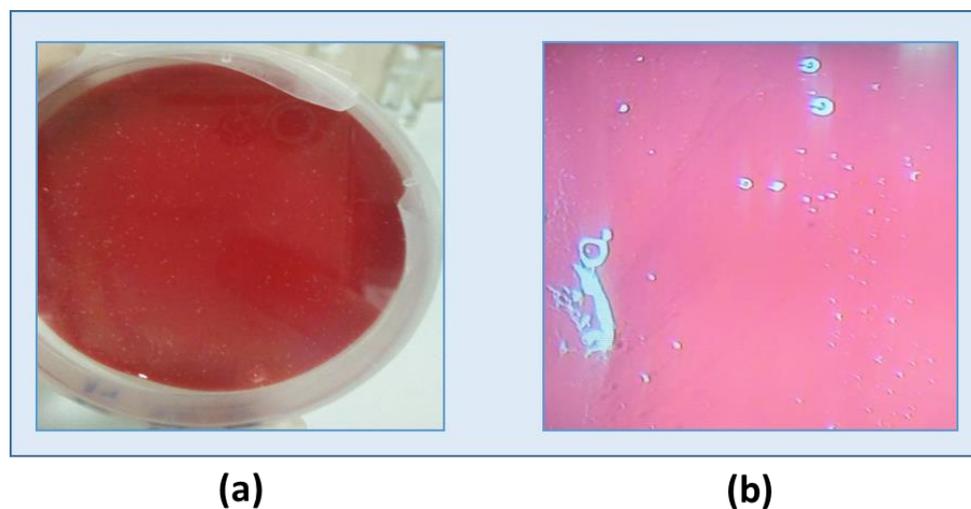


Figure 7. Aspect de la boîte de LIT ensemencée par stries à l'œil nu (a) et sous stéréo-microscope (b).

Bien que nous ayons obtenus des colonies de *Leishmania* sur LIT, nous n'avons pas pu les faire pousser sur RPMI 20S. La difficulté principale que nous avons rencontrée étant le prélèvement du clone par la pipette Pasteur. Les résultats d'ensemencement des clones sur le RPMI 20s ont été infructueuses (**Tableau 2**).

Tableau 2. Résultats des cultures sur milieu RPMI 20s de colonies obtenues par clonage par stries sur LIT pour les souches étudiées.

Souche / Milieux	<i>Leishmania killicki</i> (LIPA 07/05)	<i>Leishmania killicki</i> (LIPA 10/05)	<i>Leishmania infantum</i> (LIPA 405/93)	<i>Leishmania infantum</i> (LIPA 506/93)	<i>Leishmania infantum</i> (LIPA 222/11)	<i>Leishmania infantum</i> (LIPA 155/10)	<i>Leishmania major</i> (LIPA 32/06)
Tube 1	-	-	-	-	-	-	-
Tube 2	-	Contamination (Bactérie)	-	-	-	-	-
Tube 3	-	contamination (Levures)	-	-	-	-	Contamination (Bactérie)
Tube 4	-	-	-	-	-	-	-
Tube 5	-	-	-	-	Contamination (Levures)	-	-
Tube 6	-	-	Contamination (Champignon)	-	-	-	-
Tube 7	-	-	-	-	-	-	-
Tube 8	-	-	-	-	-	-	-
Tube 9	-	-	-	-	-	-	-
Tube 10	-	-	-	-	-	-	-

1.1.1.1. Evaluation de la technique du clonage par ensemencement en stries larges sur milieu solide (LIT)

Les principaux critères d'évaluation de cette technique sont regroupés dans le **tableau 3**. Les avantages majeurs de cette technique de clonage étant l'obtention de formes métacycliques sur un milieu solide, avec un coût modéré. Il **est** à noter que le prélèvement des clones nécessite un manipulateur expérimenté pour éviter les contaminations et la confluence des clones sur boîte de pétri.

Tableau 3. Critères d'évaluation de la technique du clonage par ensemencement en stries larges sur milieu solide (LIT).

Critères	Clonage par ensemencement en stries larges sur milieu solide (LIT)
Taux de contamination	Très élevé
Nécessités budgétaires	Moyenne
Formes obtenus	Promastigotes métacyclique infestantes
Temps de croissance des clones	Long de 5 à 13 jours
Nombre de clone obtenu	Important
Récolte des clones	Très difficile puisque les colonies sont attachés et il faut récoltés un seul clone
Outil de l'observation	L'œil nu et stéréo-microscope
Aspect observé sous stéréo microscope	Tache blanches à l'extrémité de la boîte de pétri au niveau de dépôt de la goutte

1.1.2. Résultats du clonage par ensemencement par des gouttes

En raison de la confluence rapide des colonies de *Leishmania* lors de l'ensemencement par stries, nous avons tenté un clonage par goutte contenant au plus 1 parasite. Les 7 souches

ensemencées sur boîtes LIT par des gouttes de 5ul déposées stérilement sous hotte, ont été contrôlées régulièrement en vue de suivre la croissance des colonies parasitaires. L'observation des boîtes LIT a été effectuée stérilement et à l'œil nu, et sous un stéréo-microscope, au grossissement Gx1.6 (**Figure 8**). Les résultats de l'observation des boîtes ensemencées n'ont pas permis d'isoler des colonies de *Leishmania*. L'absence de Glucose dans notre gélose expliquerait en grande partie les difficultés que nous avons rencontrées avec cette procédure.

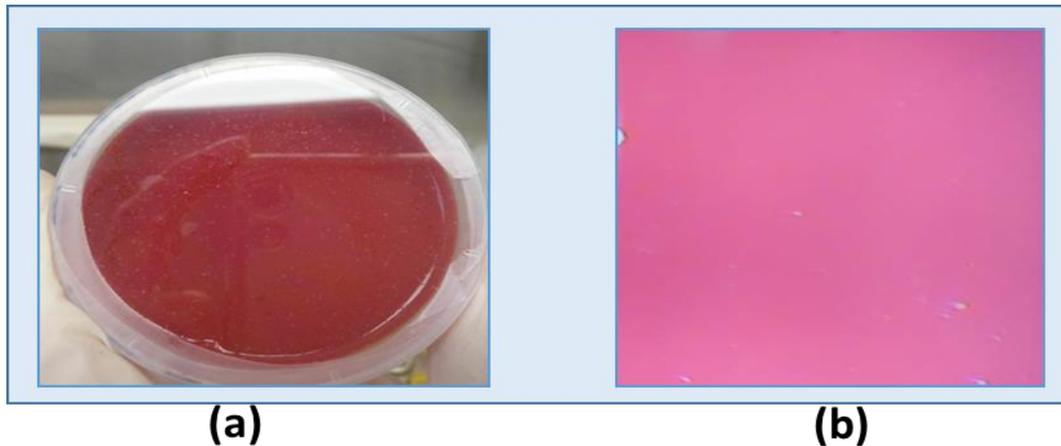


Figure 8. Aspect de la boîte de LIT ensemencé par gouttes à l'œil nu (a) et sous stéréo-microscope (b).

1.1.2.1. Evaluation de la technique du clonage par ensemencement par des gouttes sur milieu solide (LIT)

Presque comme la technique précédente, sauf que la préparation du milieu LIT été par gélose sans glucose (erreur dans la manipulation), on n'a pas eu de culture de clone dans RPMI20s puisque les clones ont été mort à cause de manque de nutriment ou le milieu et pauvre en glucose. Les principaux critères d'évaluation de cette technique sont regroupés dans **le tableau 4**.

Tableau 4. Critères de la technique du clonage par ensemencement par des gouttes sur milieu solide (LIT).

Critères	Clonage par ensemencement par gouttes sur milieu solide (LIT)
Taux de contamination	Très élevé
Nécessités budgétaires	Moyenne
Forme obtenu	Promastigotes métacycliques infestantes
Temps de croissance des clones	Long de 5 à 13 jours
Nombre de clone obtenu	Moyenne
Récolte des clones	Facile puisque les colonies sont déposés séparément au niveau des gouttes ensemencés
Outil d'observation	L'œil nu et stéréomicroscope
Aspect observé sous stéréomicroscope	Points blanc sur les stries ensemencés

1.2. La technique du clonage par dilution limite

Cette technique sert à cultiver les clones après dilution de milieu RPMI20S riche en parasite et de récolter les clones après incubation à 25C°. Le clone obtenu, est mis en culture dans du RPMI20s et des tubes du milieu NNN pour la culture en masse des parasites clonés.

Le contrôle des microplaques a été effectué régulièrement à l'aide du MP (**Figure 9**), au grossissement G x 40, ce qui nous permis de sélectionner les 5 puits positifs ou les plus riches en parasites au clonage (**Tableau 5**).



Figure 9. Aspect de puit de microplaque riche en parasites sélectionnés et observés sous MP.

Tableau 5. Résultats d'observation des microplaques obtenus sur milieu RPMI 20S sous Microscope inversée, au G x 1.6.

Date de culture 14/02/2018. Date d'observation 15/02/2018												
Puits souches	Puit 1	Puit 2	Puit 3	Puit 4	Puit 5	Puit 6	Puit 7	Puit 8	Puit 9	Puit 10	Puit 11	Puit 12
LIPA 155/10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
LIPA 07/05	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++
LIPA 32/06	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	++++	+++	+++
LIPA 10/05	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
LIPA 222/11	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
LIPA 405/93	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	++++	++++

(-) Négatif
 (++++) :> 10 parasites /champs
 Puit sélectionné

Les 5 clones obtenus et leurs souche mère ont par la suite été récoltés puis mis en culture dans du RPMI20S et des tubes du milieu NNN pour la culture en masse des parasites clonés. Toutes les souches ont été clonées sur RPMI20s sauf *Leishmania infantum* (LIPA 506/93),

dont la croissance était faible. Les critères de la technique du clonage par dilution limite sont regroupés dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Critères de la technique du clonage par dilution limite.

Critères	Clonage par dilution limite
Taux de contamination	Faible
Nécessités budgétaires	Elevé
Forme obtenu	Promastigotes procycliques
Temps de croissance des clones	Court 6 a 8 jours
Nombre de clone obtenu	Important
Récolte des clones	Très facile
Outil de l'observation	Microscope inversée

2. Résultats de cinétique de viabilité en fonction des concentrations de Sb III

La cinétique de croissance des souches de *Leishmania* et leurs clones, en présence de Sb III a été considérablement réduite avec l'augmentation des concentrations. Les résultats obtenus montrent qu'avec le Sb III le pourcentage de la viabilité est réduit en fonction du temps d'incubation et en fonction de la concentration.

2.1. *Leishmania infantum* (LIPA 222/11)

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. infantum* (LIPA 222/11), et de ses clones ont montré des cinétiques variables après 72h d'incubation (**figure 10**).

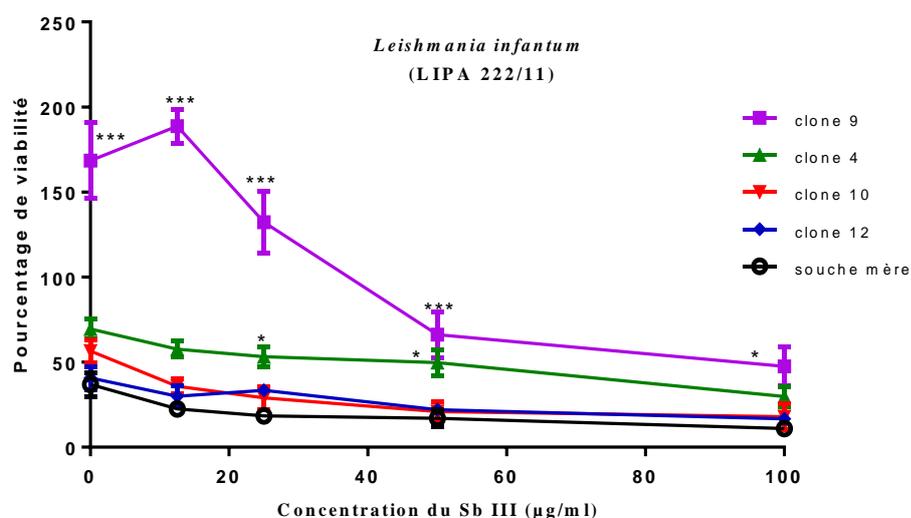


Figure 10. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania infantum* (LIPA 222/11) et ses clones après 72h d'incubation.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. infantum* (LIPA 222/11), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que **l'interaction entre ses 2 facteurs** est extrêmement importante avec un pourcentage de variation de 16.15% de la variance total ($P < 0.0001$). L'effet des clones de LIPA 222/11 sur les résultats est fortement significatif ($P < 0.0001$) et affecte à 57.95% la variance total. De plus, les concentrations de SbIII ont aussi un effet très significatif sur les résultats (**Tableau 7**).

Tableau 7. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 222/11 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	16,15	< 0,0001	****	Yes
concentration SbIII	15,46	< 0,0001	****	Yes
Clones	57,95	< 0,0001	****	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 4 clones générés, le clone 9 était celui qui a présenté la significativité la plus importante de 0 à 50µg/ml de SbIII ($P < 0.001$). Nous avons aussi noté une différence significative pour le clone 4 de 25 à 50 µg/ml de SbIII ($P < 0.05$). Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans **le tableau 8**.

Tableau 8. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 222/11 en fonction de la concentration de SbIII.

SbIII (µg/ml)	Souche mère vs clone 9		Souche mère vs clone 4	
	P value	significativité	P value	significativité
0.0	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns
12.50	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns
25.00	$P < 0,001$	***	$P < 0,05$	*
50.00	$P < 0,001$	***	$P < 0,05$	*
100.0	$P < 0,05$	*	$P > 0,05$	ns

2.2. *Leishmania infantum* (155/10)

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. infantum* (LIPA 155/10), et de **ses** clones ont montré des cinétiques variables après 72h d'incubation (**Figure 11**).

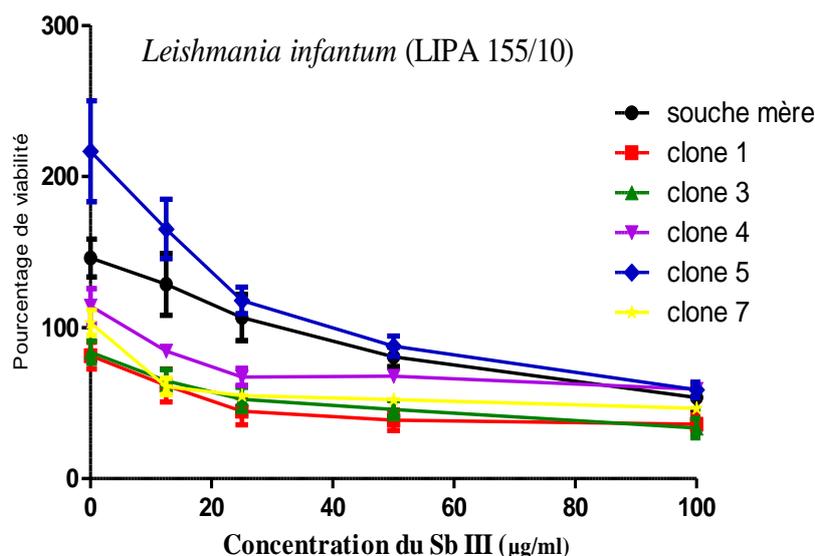


Figure 11. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania infantum* (LIPA 155/10) et ses clones après 72h d'incubation.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. infantum* (LIPA 155/10), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que l'interaction entre ses 2 facteurs est importante avec un pourcentage de variation de 11,42% de la variance total ($P=0.0003$). L'effet des clones de LIPA 155/10 sur les résultats est fortement significatif ($P<0.0001$) et affecte à 37,48 % la variance total. De plus, les concentrations de SbIII ont aussi un effet très significatif sur les résultats (**Tableau 9**).

Tableau 9. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 155/10 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	11,42	0,0003	***	Yes
concentration SbIII	35,16	< 0,0001	***	Yes
Clones	37,48	< 0,0001	***	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 5 clones générés, les clones 1 et 3, sont ceux qui ont présentés la significativité la plus importante de 0 à 25µg/ml de SbIII ($P<0.001$). Ils ont présenté la même allure de susceptibilité au SbIII. Le clone 5 présente une significativité importante en absence de SbIII ($P<0.001$), avec une croissance plus rapide qui a atteint une moyenne de 216%. Le clone 7 présente une différence fortement significative à 12µg/ml de SbIII ($P<0.001$). Nous avons aussi noté une différence significative pour le clone 4 à 12.50 µg/ml de SbIII ($P<0.05$). Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 10**.

Tableau 10. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 155/10 en fonction de la concentration de SbIII.

SbIII (µg/ml)	Souche mère vs clone 1		Souche mère vs clone 3		Souche mère vs clone 4		Souche mère vs clone 5		Souche mère vs clone 7	
	P value	Significativité								
0.0	P<0,001	***	P<0,001	***	P > 0,05	Ns	P<0,001	***	P < 0,05	*
12.50	P<0,001	***	P<0,001	***	P < 0,05	*	P > 0,05	ns	P<0,001	***
25.00	P < 0,01	**	P < 0,01	**	P > 0,05	Ns	P > 0,05	ns	P < 0,05	*
50.00	P > 0,05	Ns								
100.0	P > 0,05	Ns								

2.3. *Leishmania infantum* (LIPA 405/93) :

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. infantum* (LIPA 405/93), et de ses clones ont montré des cinétiques variables après 72h d'incubation (Figure 12). Les clones 1, 11 et 12 se sont clustérisés et ont présenté la même allure.

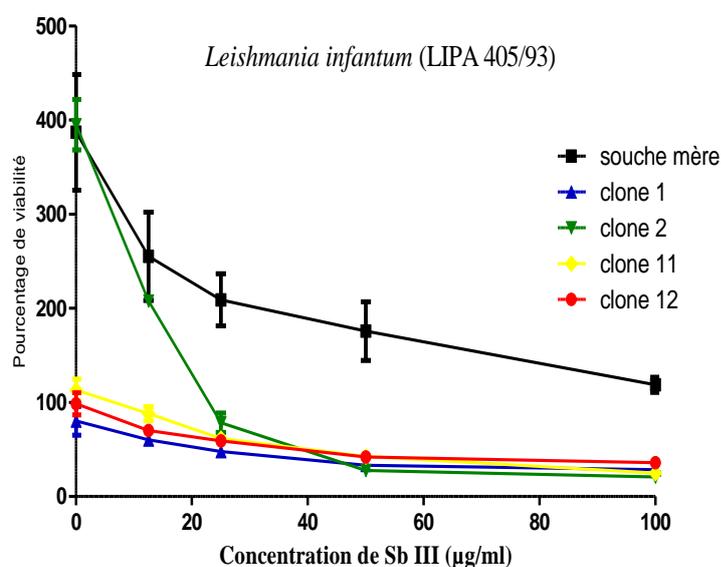


Figure 12. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania infantum* (LIPA 405/93) et ses clones après 72h d'incubation.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. infantum* (LIPA 405/93), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que l'interaction entre ses 2 facteurs est extrêmement importante avec un pourcentage de variation de 19,84% de la variance total (P<0.0001). L'effet des clones de LIPA 405/93 sur les résultats est fortement significatif

($P < 0.0001$) et affecte à 39,03% la variance total. De plus, les concentrations de SbIII ont aussi un effet très significatif sur les résultats (**Tableau 11**).

Tableau 11. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 405/93 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	19,84	$< 0,0001$	****	Yes
concentration SbIII	29,68	$< 0,0001$	****	Yes
Clones	39,03	$< 0,0001$	****	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 4 clones générés, les clone 1 et 11 et 12 étaient celui qui ont présenté la significativité la plus importante de 0 à 50 $\mu\text{g/ml}$ de SbIII ($P < 0.001$). Nous avons aussi noté une différence significative pour le clone 2 de 25 à 50 $\mu\text{g/ml}$ de SbIII ($P < 0.001$). Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 12**.

Tableau 12. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 405/93 en fonction de la concentration de SbIII.

SbIII ($\mu\text{g/ml}$)	Souche mère vs clone 1		Souche mère vs clone 2		Souche mère vs clone 11		Souche mère vs clone 12	
	P value	Significativité	P value	Significativité	P value	Significativité	P value	Significativité
0.0	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***
12.50	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***
25.00	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***
50.00	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***
100.0	$P < 0,05$	*	$P < 0,01$	**	$P < 0,01$	**	$P > 0,05$	ns

2.4. *Leishmania major* (LIPA 32/06)

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. major* (LIPA 32/06), et de ces clones ont montré des cinétiques variables après 72h d'incubation (**Figure 13**).

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. major* (LIPA 32/06), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que **l'interaction entre ses 2 facteurs** n'est pas importante puisque le pourcentage de variation de 6,57% de la variance total ($P = 0,6520$). L'effet des clones de LIPA 32/06 sur les résultats est moins significatif ($P = 0,0198$) et affecte à 5,55% la variance total. Cependant, les concentrations de SbIII ont un effet significatif important ($P < 0.0001$) et affecte à 55.13% la variance total sur les résultats (**Tableau 13**).

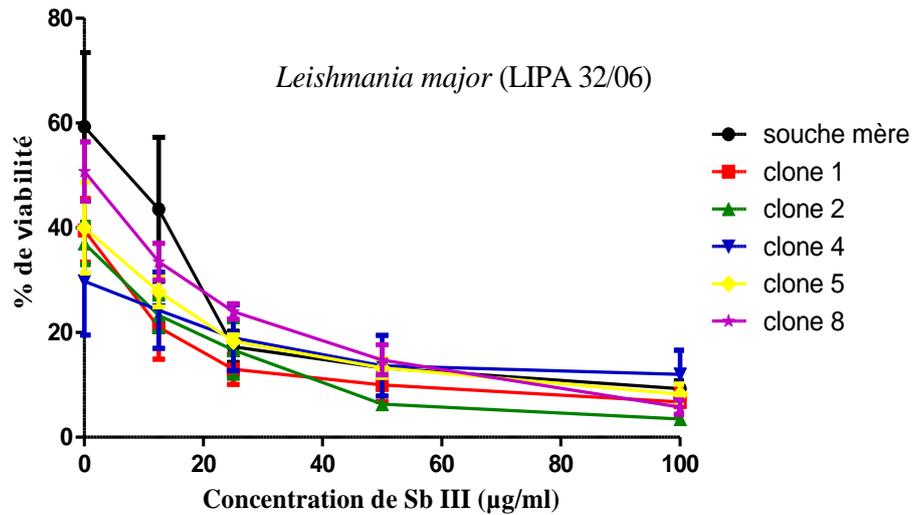


Figure 13. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania major* (LIPA 32/06) et ses clones après 72h d'incubation.

Tableau 13. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 32/06 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	6,57	0,6520	ns	No
concentration SbIII	55,13	< 0,0001	***	Yes
Clones	5,55	0,0198	*	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 5 clones générés, les clone 4 et 2 sont ceux qui ont présenté la significativité la plus importante en absence de SbIII ($P < 0.01$ pour le clone 4 et $P < 0.05$ pour le clone 2). Nous avons aussi noté une différence significative à 12.5 µg/ml de SbIII ($P < 0.05$) pour le clone 1. Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 14**.

Tableau 14. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 32/06 en fonction de la concentration de SbIII.

SbIII (µg/ml)	Souche mère vs clone 1		Souche mère vs clone 2		Souche mère vs clone 4	
	P value	Significativité	P value	Significativité	P value	Significativité
0.0	$P > 0,05$	ns	$P < 0,05$	*	$P < 0,01$	**
12.50	$P < 0,05$	*	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	Ns
25.00	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	Ns
50.00	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	Ns
100.0	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	ns	$P > 0,05$	Ns

2.5. *Leishmania killicki* (07/05)

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. killicki* (LIPA 07/05), et de ses clones ont montré des cinétiques similaires après 72h d'incubation, surtout à la concentration maximale de Sb III (100µg/ml) (**Figure 14**).

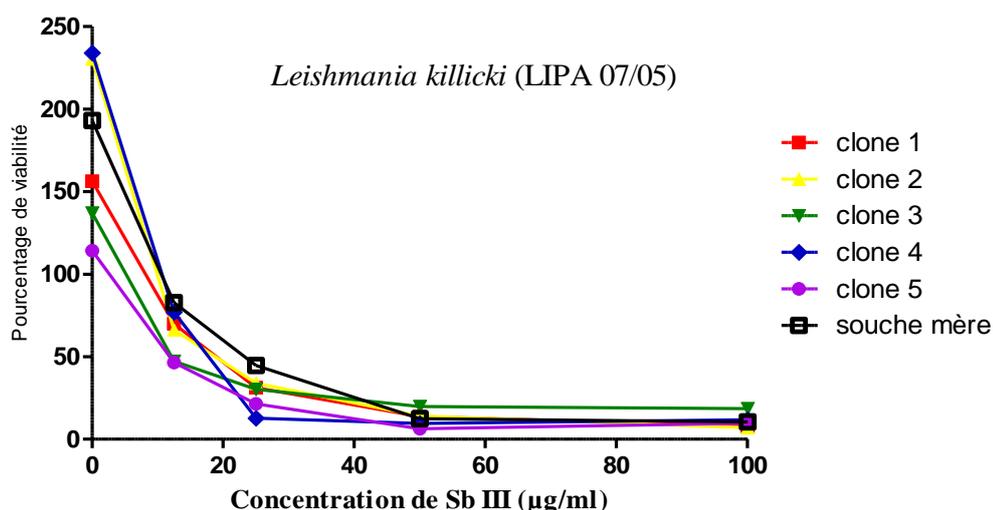


Figure 14. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania killicki* (LIPA07/05) et ses clones après 72h d'incubation.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. infantum* (LIPA 07/05), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que l'interaction entre ses 2 facteurs est extrêmement importante avec un pourcentage de variation de 6.98 % de la variance total (P=0.0005). L'effet des clones de LIPA 07/05 sur les résultats est très significatif (P=0.0026) et affecte à 2.5 % la variance total. De plus, les concentrations de SbIII ont aussi un effet fortement significatif sur les résultats (**Tableau 15**).

Tableau 15. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 07/05 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	6,98	0,0005	***	Yes
concentration SbIII	78,56	< 0,0001	***	Yes
Clones	2,5	0,0026	**	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 5 clones générés, le clone 2 et 4 étaient les seules qui ont présentés

les significativités les plus importantes en absence de SbIII ($P < 0.001$), avec des croissances supérieures à 200%. Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 16**.

Tableau 16. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère LIPA 07/05 en fonction de la concentration de SbIII.

SbIII ($\mu\text{g/ml}$)	Souche mère vs clone 2		Souche mère vs clone 4	
	P value	Significativité	P value	Significativité
0.0	$P < 0,001$	***	$P < 0,001$	***
12.50	$P > 0,05$	Ns	$P > 0,05$	Ns
25.00	$P > 0,05$	Ns	$P > 0,05$	Ns
50.00	$P > 0,05$	Ns	$P > 0,05$	Ns
100.0	$P > 0,05$	Ns	$P > 0,05$	Ns

2.6. *Leishmania killicki* (LIPA10/05)

Les effets des concentrations croissantes de l'antimoine trivalent sur la viabilité de la souche mère de *L. killicki* (LIPA 10/05), et de ses clones ont montré des cinétiques qui ont dégagé 2 groupes après 72h d'incubation (**Figure 15**).

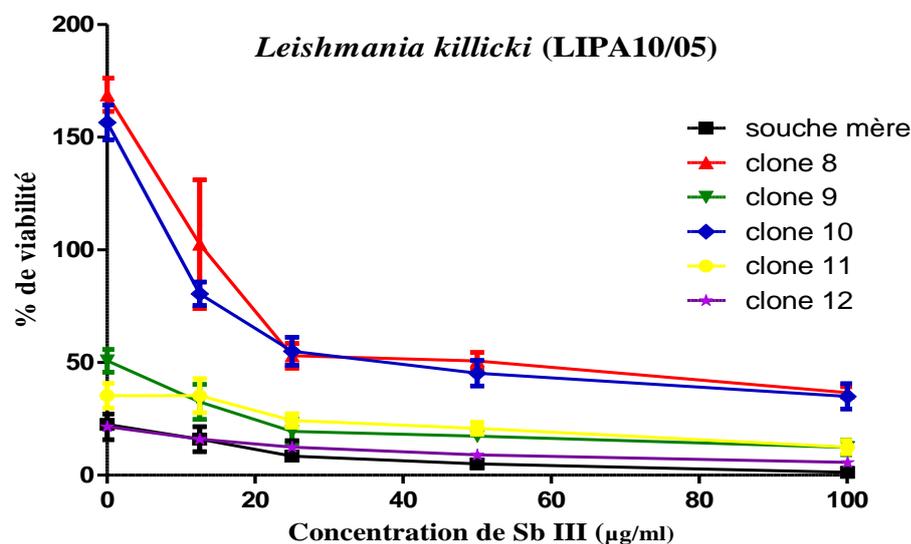


Figure 15. Effet des concentrations croissantes de Sb III, sur la viabilité de la forme promastigote de *Leishmania killicki* (LIPA10/05) et ses clones après 72h d'incubation.

L'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité des clones de *L. killicki* (LIPA10/05), en fonction des concentrations de SbIII, a montré que l'interaction entre ses 2 facteurs est extrêmement importante avec un pourcentage de variation de 18,67% de la variance total

($P < 0.0001$). L'effet des clones de LIPA 10/05 sur les résultats est fortement significatif ($P < 0.0001$) et affecte à 45,12% la variance total. De plus, les concentrations de SbIII ont aussi un effet fortement significatif sur les résultats (**Tableau 17**).

Tableau 17. Résultats de l'analyse par ANOVA à 2 facteurs de la viabilité de LIPA 10/05 en fonction des concentrations de SbIII.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	18,67	< 0,0001	***	Yes
concentration SbIII	24,79	< 0,0001	***	Yes
Clones	45,12	< 0,0001	***	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des clones par rapport à celui de la souche mère, a montré que sur les 5 clones générés, les clone 8 et 10 étaient ceux qui ont présenté la significativité la plus importante de 0 à 50 μ g/ml de SbIII ($P < 0.001$). Nous avons aussi noté une différence significative pour le clone 9 en absence de SbIII ($P < 0.05$). Les résultats significatifs de cette analyse sont regroupés dans le **tableau 18**.

Tableau 18. Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni de la viabilité des clones vs souche mère en fonction de la concentration de SbIII.

	Souche mère vs clone 8		Souche mère vs clone 9		Souche mère vs clone 10	
	P value	Significativité	P value	Significativité	P value	Significativité
SbIII (μ g/ml)						
0.0	$P < 0,001$	***	$P < 0,05$	*	$P < 0,001$	***
12.50	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns	$P < 0,001$	***
25.00	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns	$P < 0,001$	***
50.00	$P < 0,001$	***	$P > 0,05$	ns	$P < 0,001$	***
100.0	$P < 0,01$	**	$P > 0,05$	ns	$P < 0,01$	**

3. Résultats des IC₅₀ du traitement Sb III sur la forme promastigote des mêmes espèces de *Leishmania* et leurs clones

Pour l'analyse statistique des IC₅₀ des clones et de leurs souches mères, les données ont été compilées dans Microsoft Excel et analysées à l'aide de Prism 5 (Graph-Pad, Prism5).

Le seuil épidémiologique ECOFF, nous a permis de différencier les espèces de *Leishmania* responsables de leishmanioses cutanées ou viscérales sensibles (S+) ou résistantes (S-) à la forme trivalente de l'antimoine. Les valeurs du seuil d'IC₅₀ calculées étaient de 23,83 μ g/mL

et de 15,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour respectivement la LV et la LC. Nous avons ensuite classé les isolats comme sensibles (S+, IC₅₀ en dessous de la valeur ECOFF) ou résistantes (S-, IC₅₀ au-dessus de la valeur ECOFF) selon les valeurs en IC₅₀ au SbIII.

Les résultats obtenus analysé par régression non linéaire par le logiciel Graph Pad Prism nous ont permis de calculer la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) des différentes souches de *Leishmania* et leurs clones (**Figure 16**).

Nos résultats montrent que pour *L. killicki*, la souche LIPA 10/05, avait 33% de clones résistants au Sb (III). Alors que pour LIPA 07/05, 100% de clones étaient sensibles au Sb (III). Pour le complexe *major*, 33% des clones étaient résistants au Sb (III), (S-). Le complexe *infantum*, présente par contre une résistance de 60% des clones pour LIPA 222/11 et LIPA 405/93. La 3^{ème} souche *infantum* analysée, a donné 67% de clones sensibles au SbIII (S+).

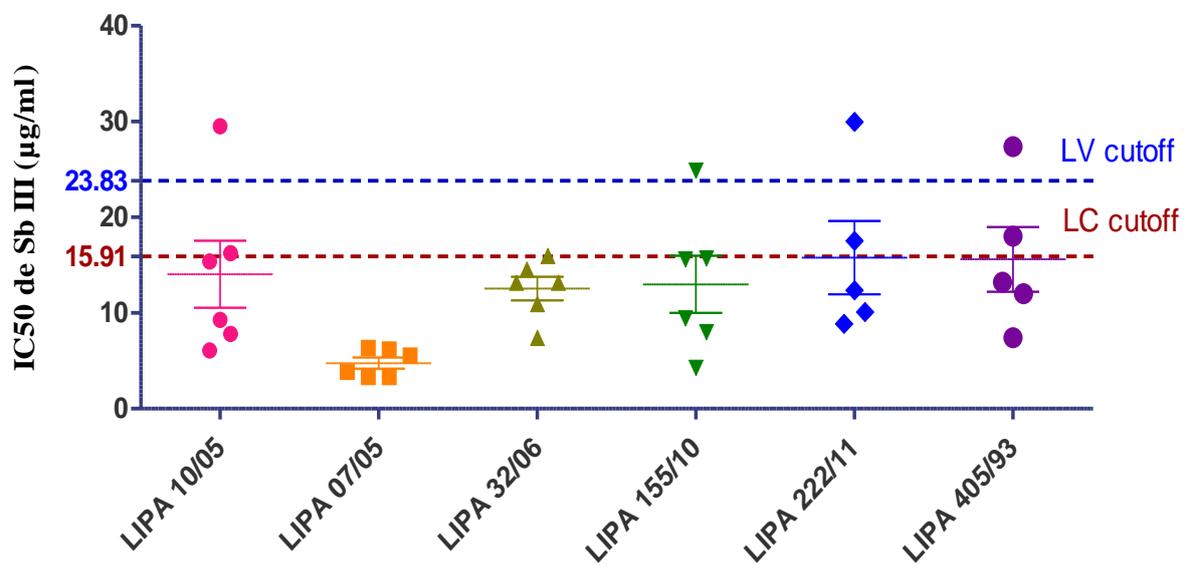


Figure 16. Résultats de la distribution des IC₅₀ des souches mères et de leurs clones en fonction des souches étudiées.

3.1. *Leishmania killicki*

Les moyennes des IC₅₀ des clones de *L. killicki* sont proches de ceux de la souche mère pour les deux souches étudiées. Les clones de 07/05 ont clustérisé, et bien que ceux de LIPA 10/05 ont présentés des susceptibilités variables, ils ont donné une moyenne de $13.79 \pm 4.29 \mu\text{g}/\text{ml}$, proche de celle de la souche mère (**Figure 17**).

Tous les clones de la LIPA 07/05, à savoir 100%, ont présenté un profil sensibles (S+) au Sb III, avec des IC₅₀ qui variaient entre 3,32 et 6,35 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ces valeurs sont inférieures au seuil Sb (III) -ECOFF déterminé par la valeur de 15,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Pour la LIPA 10/05 les clones 11 et 12, étaient résistant au Sb III puisque leurs IC_{50} étaient comprises entre 29.50 et 16.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette valeur est au-dessus de seuil Sb (III) -ECOFF déterminé qui est de 15,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Alors que la souche mère était peu sensible avec une $IC_{50}=15,37\mu\text{g}/\text{mL}$. Cependant, les clones 8,9 et 10 étaient en dessous de la valeur ECOFF, donc sensibles au Sb (III).

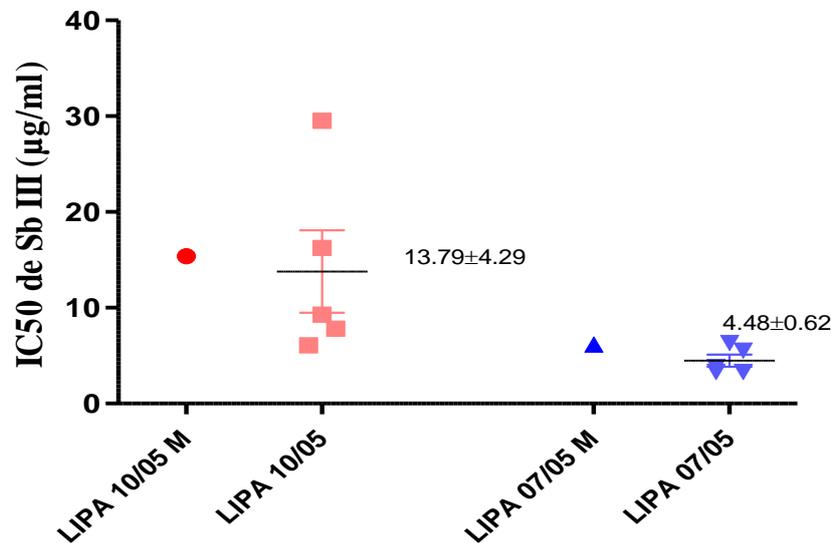


Figure 17. Résultats des IC_{50} du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote des deux souches de *Leishmania killicki* (LIPA10/05 et LIPA 07/05), et leurs clones après 72h d'incubation.

3.2. *Leishmania major*

La moyenne des IC_{50} des clones de *L. major* est plus importante que celle de la souche mère. Les clones ont présentés des susceptibilités variables, avec une moyenne de $12,87\pm 1,45$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, différente de celle de la souche mère (**Figure 18**).

Nous avons observé qu'avec une IC_{50} inférieure à la valeur ECOFF, la souche mère et les clones (1,2 et 5) de *L. major* étaient généralement plus sensibles au Sb (III) que le clone 8 qui était peu sensible avec une valeur de IC_{50} de 14,55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ alors que le clone 4 est résistant puisque son IC_{50} était de 15,99 $\mu\text{g}/\text{ml}$, au-dessus de la valeur ECOFF.

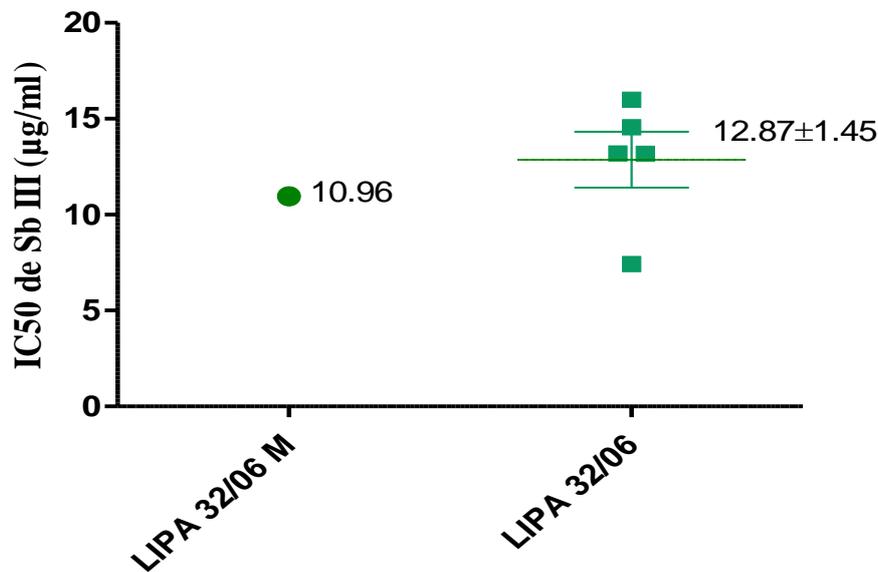


Figure 18. Résultats des IC₅₀ du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote de la souche de *Leishmania major* (LIP32/06), et leurs clones après 72h d'incubation.

3.3. *Leishmania infantum*

Les moyennes des IC₅₀ des clones de *L. infantum* sont proches de celle de la souche mère pour les deux souches LIPA 222/11 et LIPA 405/93. Les clones ont présentés des susceptibilités variables, et ils ont donné respectivement, des moyennes de 17,20±4,61 µg/ml et 16,5±4.22 µg/ml. Ces valeurs moyenne d'IC₅₀ étaient, proche de celle de la souche mère. Cependant, la moyenne des IC₅₀ des clones de la souche LIPA 155/10 était loin de celle de la souche mère, Ces clones ont présentés des susceptibilités regroupés au SbIII, avec une moyenne de 10,62±2,23 µg/ml (**Figure 19**).

Tous les clones et leur souche mère de La LIPA 405/93 étaient S+ en ce qui concerne Sb (III), présentant une IC₅₀ inférieure au seuil Sb (III) -ECOFF déterminé (15,91µg/ml) sauf le clone 11 qui était résistant au Sb III puisque son IC₅₀ était supérieure à 18.02µg / ml.

Pour la LIPA 222/11, les clones 9 et 4 étaient résistant au Sb III puisque leurs IC₅₀étaient respectivement de 27,37 et 29,98µg/ml, bien au-dessus de seuil Sb (III) -ECOFF déterminé 23,83 µg / ml. Alors que la souche mère et les clones (11 et 12) étaient sensibles puisque leurs IC₅₀ étaient en dessous de la valeur ECOFF, donc significativement sensibles au Sb (III).

Pour la LIPA 155/10 Tous les clones étaient S+ en ce qui concerne Sb (III), présentant des IC₅₀ inférieures au seuil Sb (III) -ECOFF déterminé (23,83 µg / ml). Les clones 7, 4 et 1

étaient très sensibles à l'antimoine trivalent. Alors que la souche mère était résistante, et présentait une IC₅₀ de 24,88 µg/ml supérieur à la valeur ECOFF.

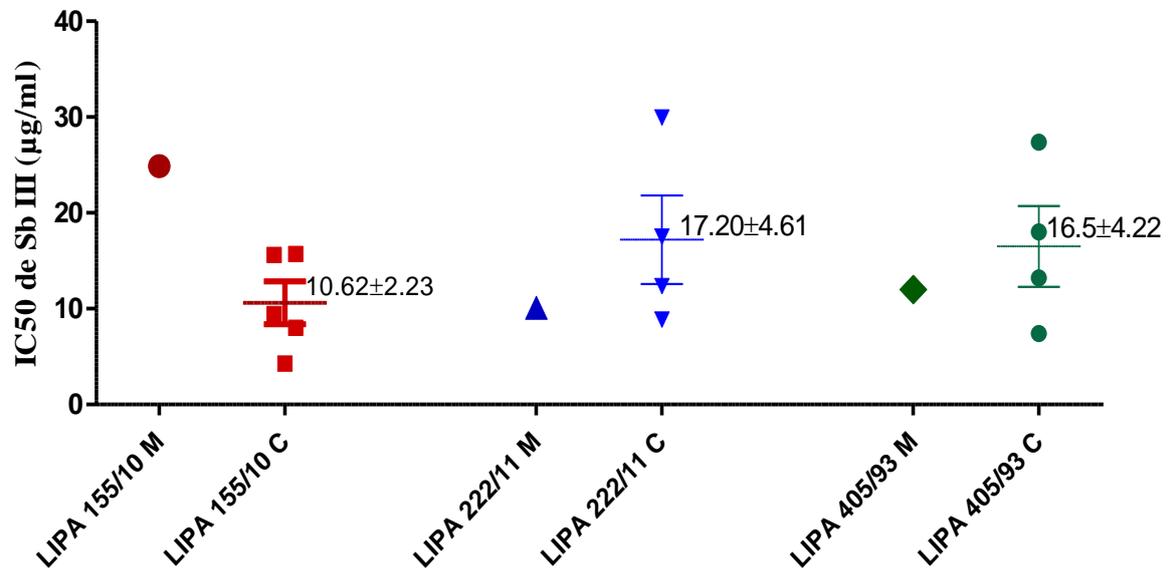


Figure 19. Résultats des IC₅₀ du Sb III à concentrations croissantes sur la forme promastigote des deux souches de *Leishmania infantum* (LIPA155/10, LIPA 222/11 et LIPA 405/93), et leurs clones après 72h d'incubation.

4. Résultat PCR-RFLP

Le gel d'Agarose est exposé a des rayonnements ultra-violets (UV), le BET colore l'ADN en une couleur rouge-orangée (**Figure 20**).

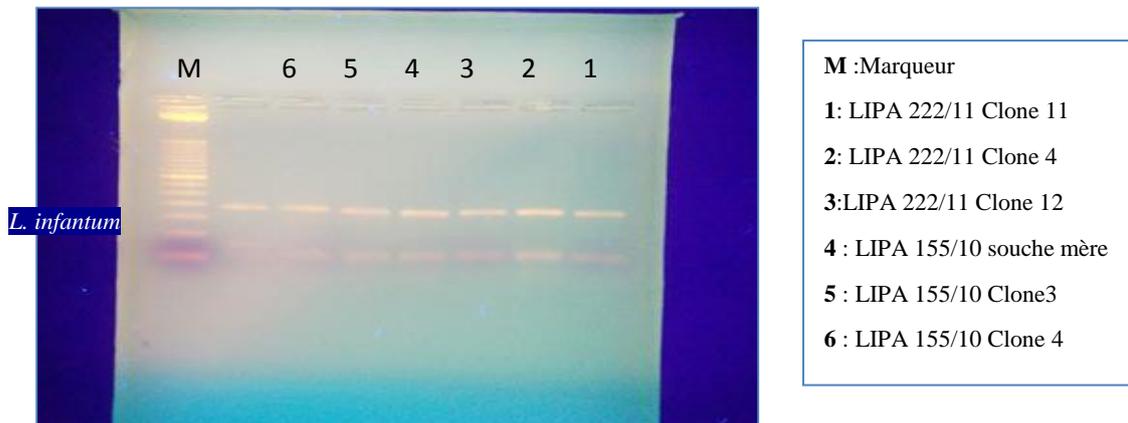


Figure 20. Visualisation des fragments par comparaison avec un marqueur d'électrophorèse en gel d'Agarose

Pour l'identification des souches; les deux souches LIPA 222/11 et la LIPA 155/10 et leurs clones sont purs, et appartient à l'espèce *Leishmania infantum*. Alors que les résultats de la souche mère de la LIPA 222/11 et le clone 7 de LIPA 155/10 étaient négatifs.

L'étude de la plasticité du génome de *Leishmania* et sa relation avec l'augmentation des cas de résistance, et l'hétérogénéité des populations des souches de *Leishmania* isolées de l'homme, nous a conduits à l'étude des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des espèces résistantes à l'antimoine circulantes en Algérie. Il est nécessaire de connaître la susceptibilité des populations clonales d'isolat de *Leishmania* cliniquement résistant au Glucantime® *in vitro*.

La structure des populations de *Leishmania spp*, et des kinétoplastides est principalement clonal. Par ailleurs, les souches isolées d'hôtes naturellement infectés sont probablement composées d'associations de parasites multiclonaux (Jean-Franc et al, 2001). Puisque les souches de *Leishmania* isolées de l'homme sont composées de populations hétérogènes, il est crucial d'utiliser des lignées clonales pour les études sur la caractérisation de ces parasites (Garin et al, 2002).

A cet effet, dans une première tentative pour étudier la susceptibilité, Il a fallu trouver une méthode de clonage sur un milieu adéquat. Pour cela, on a dû adapter des formes promastigotes de leishmanies sur un milieu de réalisation simple pour obtenir des populations clonées de ces parasites. Des prélèvements sanguins et des prélèvements de ganglions lymphatiques, de moelle osseuse et de rate peuvent être utilisés pour la culture dans un milieu spécial tel que la tryptose par infusion de foie (LIT); NNN et RPMI-1640 (Sundar et Rai, 2002). Les milieux qui ne contiennent pas de sérum ou de produits sanguins sont utilisés pour réduire la contamination afin d'obtenir un milieu simple et peu coûteux. Des résultats similaires ont été obtenus avec un milieu complètement défini (CDM / LP) (Merlen et al, 1999), milieu d'infusion de foie supplémenté de tryptose (LIT) (Sadigursky et al, 1986). Nos résultats ont montré que les différentes techniques de clonages, avaient des rendements variables. Le clonage sur LIT nécessite un manipulateur expérimenté pour la reconnaissance des colonies de *Leishmania* sur gélose et leur prélèvement. Le clonage par dilution limite sur RPMI20S, a permis d'obtenir rapidement les clones, en évitant des passages répétés en culture qui pourraient affecter nos résultats. Plusieurs travaux ont montré l'effet des passages sur l'infectivité et la virulence de *Leishmania* (Da Luz et al, 2009; Moreira et al, 2012; Santarém et al, 2014). De plus, il a été montré qu'après 20 passages successifs *in vitro*, on observe une perte d'infectivité à cause d'une perte de matériel génétique, donc on suppose qu'il ya un changement de susceptibilité ou la sensibilité de formes promastigotes **change**, alors les clones **deviennent** sensibles.

La diversité génétique est un paramètre crucial qui doit être pris en compte dans la Leishmaniose. En particulier, le polymorphisme de la virulence et du tropisme parasitaire est susceptible d'avoir un impact profond sur la transmission et / ou la pathologie de la maladie.

Dans les infections multiclonales mixtes, le phénotype de virulence a été exprimé comme un caractère dominant par rapport aux clones de faible virulence associés. Après une provocation avec une souche ou un clone homologue ou hétérologue, les phénotypes de virulence ont été conservés et exprimés. Ces résultats suggèrent fortement que la virulence parasitaire de la leishmaniose viscérale de *L. infantum* est clonale et dominante (Garin et al, 2001). Les gènes dominants qui font le passage à partir de la souche mère vers les clones.

La théorie clonale indique que dans les populations naturelles de nombreuses espèces pathogènes, la recombinaison n'est pas assez fréquente pour rompre le modèle d'évolution clonale prépondérante (PCE) (Tibayrenc et al, 2012). La définition unique du PCE est donc une recombinaison génétique fortement limitée. La théorie clonale énonce clairement deux points importants, Il inclut selfing ou forte homogamie (qui conduisent à la recombinaison restreinte) dans le concept de PCE. Il ne prétend pas que la recombinaison est totalement absente ou joue un rôle mineur (Tibayrenc et al, 2012). Alors *Leishmania* a un mode de reproduction complexe.

Au cours des dernières décennies, les parasites *Leishmania* ont été considérés comme essentiellement diploïdes, mais des données récentes ont montré que l'aneuploïdie semble être la norme. Cependant, *Leishmania* utilise l'aneuploïdie comme mode de vie. Cela soulève un certain nombre de questions sur la génération d'aneuploïdie, la stabilité, la transmission et la signification biologique (Laffitte et al, 2016).

À ce jour, on en sait très peu sur les facteurs sous-jacents favorisant la sélection de *Leishmania* résistant à l'antimoine. Il est supposé que le stress thérapeutique appliqué pendant le traitement de la leishmaniose est la pression sélective primaire qui conduit à la sélection de *Leishmania* résistant aux médicaments. Ce point a été largement documenté dans divers modèles infectieux, mais pourrait être la pointe de l'iceberg dans la résistance au *Leishmania* Sb (Blower et al, 1996 ; Witte, 1998).

La leishmaniose viscérale et cutanée est transmise dans des foyers avec des cycles de vie zoonotiques ou anthroponotiques, ce qui implique que tous les hôtes colonisés par *Leishmania*, ainsi que l'environnement qui entoure ces hôtes, peuvent être très divergents. Par conséquent, un lien entre la consommation de médicaments et la sélection de parasites résistants aux médicaments peut ne pas être aussi évident pour la leishmaniose que pour d'autres micro-organismes (Sereno et al, 2012). Des agents sélectifs qui opèrent pour sélectionner la résistance au Sb sont présents à chaque étape parasitaire. Ils peuvent provenir de l'environnement, de la pression chimiothérapeutique appliquée pendant le traitement à l'antimoine et de facteurs microbicides dérivés de l'hôte. Tous peuvent sélectionner des parasites *Leishmania* avec une faible sensibilité à l'antimoine (Sereno et al, 2012).

Dans les formes zoonotiques de leishmaniose, la principale pression chimiothérapeutique que *Leishmania* rencontrera sera lors du traitement des individus. Les chiens infectés n'atteignent jamais un traitement parasitologique, même lorsque leur santé s'améliore. Ceci, en conjonction avec le pourcentage élevé d'animaux qui vont rechuter et être traités à plusieurs reprises avec le même composé, rend possible la sélection et la transmission de parasites résistants à l'antimoine (Campino et Maia, 2012).

Dans les formes anthroponotiques de la maladie, Le parasite *Leishmania* n'évolue pas dans un environnement naturellement riche en métaux lourds. Cependant, dans les zones fortement polluées telles que les sites miniers, les marécages et les environnements urbains, les phlébotomes se nourrissent de plantes pouvant être contaminées par la poussière atmosphérique locale et de réservoirs animaux sauvages ou féraux pouvant être exposés aux métaux lourds tels que Sb et Arsenic.), en buvant de l'eau polluée. Des concentrations allant jusqu'à 3 mg / l de Sb ont été signalées dans certaines sources naturelles (Krachler et al, 2005 ; Shotyk et al, 2005a, b). La présence d'As ou de Sb dans des environnements

contaminés a été supposée être un agent sélectif impliqué dans la sélection de la résistance à l'antimoine (Aït-Oudhia et al, 2011a). En fait, l'arsenic et l'antimoine sont des métalloïdes qui partagent de nombreuses propriétés structurales et chimiques communes et il est reconnu depuis longtemps que la sélection de *Leishmania* pour la résistance à l'arsenic a conduit à une résistance croisée à l'antimoine (Rosen, 1995).

Outre la présence d'antimoine dans l'écosystème où le *Leishmania* a lieu, plusieurs molécules microbicides dérivées de l'hôte telles que l'oxyde nitrique (NO) ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pourraient également contribuer à influencer la susceptibilité à l'antimoine dans les populations naturelles de *Leishmania*. Ces molécules jouent un rôle dans l'activité *leishmanicide in vivo* des formulations d'antimoine (Carter et al, 2005 ; Mookerjee-Basu et al, 2006 ; Mandal et al, 2007 ;Sarkar et al, 2011) et assurent la médiation de l'effet cytotoxique. La résistance de *Leishmania* au NO implique le métabolisme du trypanothione, qui est crucial pour la résistance à l'antimoine (Bocedi et al, 2010). La preuve expérimentale soutient la notion que le NO peut être un facteur crucial qui peut modifier la réponse à l'antimoine des populations de *Leishmania*. Les amastigotes axéniques de *Leishmania* qui ont été sélectionnés *in vitro* pour la résistance à SbIII présentent une résistance croisée au NO (Holzmuller et al, 2005). Il a été démontré que les promastigotes de *L. braziliensis* isolés de patients ne réagissant pas à l'antimoine étaient généralement moins sensibles au NO (Souza et al, 2010).

Globalement, l'environnement que *Leishmania* rencontre tout au long de son cycle de vie pourrait jouer un rôle plus important dans la sélection de résistance aux médicaments dans le contexte zoonotique de la leishmaniose que dans celui anthroponotique, même s'ils peuvent contribuer à l'émergence de pharmacorésistance dans les deux situations (Sereno et al, 2012).

A la lumière de l'ensemble de ces arguments, nous avons exploré le phénotype de croissance des clones des différentes espèces étudiées en présence d'antimoine trivalent.

On soupçonne qu'une pression sélective élevée du médicament pourrait favoriser l'émergence de parasites chimiorésistants. Bien que l'échec du traitement soit fréquemment rapporté pendant le traitement antimonial à la fois de la LC et de la LV, la résistance à l'antimoine n'a pas été assez explorée en Algérie.

Les travaux d'Eddaikra et al, en 2018, ont déterminé les valeurs du seuil épidémiologique ECOFF selon les formes cliniques décrites comme LC (causées par certains variants de *L. infantum*, *L. major* et *L. killicki* (syn *L. tropica*)) ou LV (provoquée par *L. infantum*). Le Sb (III) -ECOFF calculé contre les promastigotes était de 15,91 µg / mL chez les espèces responsables des formes de LV et de 23,83 µg / mL chez les espèces responsables des formes LC (Eddaikra et al, 2018).

Nous signalons une tendance à l'augmentation de la sensibilité à l'antimoine dans les isolats de LV au cours de la période de 30 ans. En revanche, une augmentation de la fréquence des phénotypes S dans les isolats à l'origine de la LC a été observée pendant la même période. Donc les isolats responsables de la LV chez les humains ont montré une sensibilité significativement plus faible à Sb (III) que ceux responsables de LC. Nous avons ensuite catégorisé les isolats comme sensibles (S+, IC₅₀ en dessous de la valeur ECOFF) ou insusceptibles (S-, IC₅₀ au-dessus de la valeur ECOFF) selon les valeurs Sb (III) (Eddaikra et al, 2018).

La cinétique de croissance des souches de *Leishmania* et leurs clones, en présence de Sb III a été considérablement réduite avec l'augmentation des concentrations. Les résultats obtenus montrent qu'avec le Sb III le pourcentage de la viabilité est réduit en fonction du temps d'incubation et en fonction de la concentration.

Nos résultats montrent que la résistance est exprimée comme un caractère dominant dans les infections multiclonaux expérimentales sans aucune interaction apparente avec les populations clonales à faible résistance associées. De plus, la disponibilité de clones à faible résistance pourrait présenter un intérêt dans les essais d'immunisation.

Nos résultats montrent que pour *L. killcki*, la souche LIPA 10/05, avait 33% de clones résistants au Sb (III). Alors que pour LIPA 07/05, 100% de clones étaient sensibles au Sb (III). Pour le complexe major, 33% des clones étaient résistants au Sb (III), (S-). Le complexe *infantum*, présente par contre une résistance de 60% des clones pour LIPA 222/11 et LIPA 405/93. La 3^{ème} souche *infantum* analysée, a donné 67% de clones sensibles au SbIII (S+).

Il est intéressant de noter que diverses études expérimentales portant sur *L. tropica* et *L. donovani* soutiennent l'idée que la susceptibilité au Sb (III) des promastigotes est prédictive de la susceptibilité au Sb (V) des amastigotes intramacrophages. La présente étude soutient la notion que la susceptibilité à la Sb (III) des promastigotes peut être considérée comme prédictive de la susceptibilité à Sb (V) des amastigotes intramacrophages. (Eddaikra et al, 2018).

La caractérisation phénotypique est une condition préalable à la poursuite de l'identification des loci génétiques et / ou des mécanismes impliqués dans le tropisme parasitaire et la virulence. L'analyse phénotypique des isolats de *Leishmania* repose actuellement largement sur le polymorphisme des isoenzymes.

Afin d'étudier les caractères génotypique des souches mères et de leurs clones, des identifications d'espèces par PCR RFLP ont été réalisées pour LIPA 222/11 et LIPA 155/10. Nos résultats ont montré l'homogénéité des souches mères et de leurs clones à l'échelle de l'espèce. Une caractérisation isoenzymatique pourrait identifier les sous espèces. De plus, un séquençage des produits PCR apporterait plus d'information sur le génotype des clones.

L'identification des parasites ne devrait pas être limitée à la détermination de l'espèce. Même si des espèces particulières peuvent être associées à certaines formes de la maladie ou peuvent affecter le pronostic et la guérison, deux cas peuvent être envisagés lorsque le typage supplémentaire est cliniquement pertinent et le développement de techniques de typage supplémentaires est recommandé. Premièrement, au sein de chaque espèce, des populations différentes sont attendues. Ces populations peuvent avoir des caractéristiques spécifiques, telles que la virulence ou la tolérance à certains médicaments, ce qui rend leur identification pertinente. Ce concept concerne l'identification de différentes unités de typage discrètes (DTU) au sein d'une espèce ou d'un complexe d'espèces donné. Deuxièmement, certains traits biologiques peuvent être conférés par des mécanismes génétiques qui dépassent les limites de la population. Par exemple, des souches appartenant à différentes populations ou même à des espèces peuvent partager des voies qui les rendent résistantes aux médicaments ou qui leur permettent de coloniser certains types de cellules ou certaines espèces de phlébotomes. Dans de tels cas, si la voie biologique est connue ou si des marqueurs corrélés à ces caractères ont

été identifiés, il peut être plus pertinent de caractériser les parasites par ces caractéristiques que de regarder les espèces (Auwera et Dujardin, 2015).

En l'absence d'une frontière d'espèce claire au sein de certains complexes, nous recommandons l'adoption de la stratégie «mieux vaut prévenir que guérir». Lorsque le séquençage place un parasite à mi-chemin entre les différentes espèces du complexe, il est préférable de signaler au niveau du complexe que le niveau de l'espèce. Cette règle est difficile à respecter lors de l'utilisation de RFLP ou d'autres méthodes SNP, qui donne une réponse en noir et blanc (Auwera et Dujardin, 2015).

Nos résultats montrent clairement que les souches de *Leishmania* isolées de l'homme sont composées de populations clonales présentant un polymorphisme marqué de la résistance, et le phénotype de résistance est exprimé comme un caractère dominant dans de telles infections expérimentales avec différentes populations de parasites. Cela peut avoir un impact profond sur l'épidémiologie et l'immunopathologie de *Leishmania*. La caractérisation de la résistance parasitaire est une étape cruciale qui doit être effectuée parallèlement à des études immunologiques ou génétiques sur la LV et LC.

La leishmaniose est une maladie endémique dans de vastes zones tropicales et subtropicales et dans le bassin méditerranéen. Actuellement, la première ligne de défense contre les leishmanioses repose sur l'utilisation de la chimiothérapie. En Algérie, les antimoniés pentavalents sont les traitements standard pour toutes les formes de leishmaniose. Les échecs de traitement sont fréquemment rapportés pendant le traitement antimonial (Eddaikra et al, 2018). Par conséquent, un besoin urgent de connaissances sur l'état de base de la susceptibilité à l'antimoine des souches de parasites en Algérie est requis (Eddaikra et al, 2017). Puisque les souches de *Leishmania* isolées de l'homme sont composées de populations hétérogènes, il est crucial d'utiliser des lignées clonales pour les études sur la caractérisation de ces parasites (Garin et al, 2002). Ici dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude *in vitro* de la susceptibilité à l'Antimoine d'une population clonale d'isolat de Leishmanies cliniquement résistantes au Glucantime®.

Deux méthodes clonales ont été utilisées, le Clonage sur milieu solide (LIT) et par dilution limite. Un clone représente un seul individu qui va donner une colonie, l'objectif est de vérifier si les souches résistantes sont composées d'une population homogène d'individus. Le parasite *Leishmania* est connue pour s'adapter rapidement à de nouveaux environnements, avec des conséquences importantes sur l'évolution de la maladie. Cette adaptation résulte d'amplifications chromosomiques fréquentes et réversibles. Ces variations, appelées aneuploïdies, sont semblables à celles constatées dans de nombreux types de cancers. Ces découvertes représentent une avancée considérable dans la compréhension de l'infection humaine à *Leishmania*.

Le clonage par dilution limite dans du RPMI20S a permis d'obtenir rapidement de nombreux clones de *Leishmania* de la manière la plus polyvalente et la plus efficace, pour obtenir des clones à partir de la souche mère, avec très peu de passages.

L'obtention des clones a pour but de tester les formes promastigotes des différentes espèces de *Leishmania* et leurs clones au traitement par le Sb III à concentrations croissantes et de calculer les IC₅₀ pour comparer la susceptibilité entre les souches mère et leurs clones. Pour *Leishmania killicki*, nous avons constaté que les deux souches et leurs clones sont globalement sensibles au Sb (III). Alors que pour *Leishmania major*, l'étude nous a révélé que la souche mère et leurs clones ont montré une grande sensibilité, puis une apparition d'une résistance dans un clone. L'étude globale sur LC, nous a révélé qu'au fur à mesure de multiplication, qu'il y a une **transmission** des gènes de la souche mère à la descendance, et l'apparition des souches résistantes au traitement Sb (III).

Pour *Leishmania infantum*, les souches mères et leurs clones sélectionnés ont été nettement sensibles au traitement Sb (III) pour LIPA 405/93, alors que l'étude de LIPA 222/11 nous a révélé que la souche mère et ces clones ont montré une grande sensibilité, néanmoins avec deux clones résistants.

Les caractères génotypiques des souches mères et de leurs clones, des identifications d'espèces par PCR RFLP pour LIPA 222/11 et LIPA 155/10, ont montré l'homogénéité des souches mères et de leurs clones à l'échelle de l'espèce. Une caractérisation isoenzymatique pourrait identifier les sous espèces. De plus, un séquençage des produits PCR apporterait plus d'information sur le génotype des clones.

A partir des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons supposer que la résistance est exprimée comme un caractère dominant dans les infections multiclonales expérimentales sans aucune interaction apparente avec les populations clonales à faible résistance associées. De plus, la disponibilité de clones à faible résistance pourrait présenter un intérêt dans les essais d'immunisation. Notamment en termes de pharmaco-résistance des parasites, de pathogénicité et de tropisme tissulaire. Cette perspective inédite de l'instabilité génomique chez les leishmanies devrait ouvrir la voie à l'identification des mécanismes de résistance de ces parasites aux médicaments dans des conditions cliniquement pertinentes et contribuer à identifier des biomarqueurs ayant une valeur de diagnostic et de pronostic.

Ce travail devra être complété par l'étude des infections intramacrophagiques par les amastigotes, et la susceptibilité à l'antimoine pentavalent et Amphotéricine B, avec dosage du NO et de l'Arginine pour la souche mère et leurs clones.

References bibliographiques

1. Acebey L, Jullian V et Sauvain M (2008) Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amériquelatin. *Ethnopharma*. n°41.
2. Adel A, Boughoufalah A, Saegerman C, Deken RD, Bouchene Z, Soukehal A, Berkvens D, and Boelaert M (2014) Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Algeria: An Update. *PLoS One* v.9(6).
3. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, et al. (2016) A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*.
4. Aït-Oudhia k, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D (2011) *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res* 109:1225–1232.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7(5): e35671.
6. Aoun K, Bousslimi N, Haouas N, Babba H, El-Buni A, Bouratbine A (2006) First report of *Leishmania (L) killicki* Rioux, Lanotte and Pratlong, 1986 in Libya. *Parasite*, 13: 87–88.
7. Aoun K et Bouratbine A (2014) Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, 21, 14.
8. Aoun k, Bouratbine A (2014) Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review, *Parasite*, vol. 21, pp. 14–23.
9. Aoun K & Bouratbine (2014) Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, 21, 14.
10. Ashford RW (1996) Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 523–532.
11. Aoun K, Bousslimi N, Haouas N, Babba H, El-Buni A, Bouratbine A (2006) First report of *Leishmania (L) killicki* Rioux, Lanotte and Pratlong, 1986 in Libya. *Parasite*, 13: 87–88.
12. Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1269–1281.
13. Ashutosh, Sundar S, Goyal N (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 56: 143-153.
14. Assche TA, Deschacht M, Raquel A, Luz I, Maes L, Cos P (2011) *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine* 51 : 337-351
15. Auwera GVA, Dujardin JC (2015) Species Typing in Dermal Leishmaniasis *Clin Microbiol Rev*; 28(2): 265–294.
16. Belazzoug S et Neal RA (1986) Failure of meglumine Antimoniate to cure cutaneous lesions due to *Leishmania major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 80(4) :670-1.
17. Benikhlef R, Harrat Z, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali- Braham S, Belkaid M (2004) Détection de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Médecine Tropicale*, 64(4), 381–383.
18. Berman JD, Waddell D, Hanson BD (1985) Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 27: 916-920.
19. Berman JD, Gallalee JV, Best JM (1987a) Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 36:197-201.
20. Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A (2012) Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. *Am J Trop Med Hyg*. 86: 962–965.
21. Campagnes mondiales de santé publique de l'OMS Journée mondiale de la Santé 2014 les maladies à transmission vectorielle

22. Cardenas CM, Sandoval CM, Rofiguez-Morales AJ, Vivas P (2008) Zoonoses and climate variability. *Ann N Y AcadSci* 1149: 326-330.
23. Chaara D, Ravel C, Bañuls AL, Haouas N, Lami P, Talignani L, et al. (2015) Evolutionary history of *Leishmania killicki* (synonymous *Leishmania tropica*) and taxonomic implications. *Parasit Vect*, 8: 198.
24. Croft SL, Sundar S, Fairlamb A (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *ClinMicrobiol Rev* 19: 111-126.
25. Croft SL (2001) Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 899-905.
26. Cunningham ML, Zvelebil MJ, Fairlamb AH (1994) Mechanism of inhibition of trypanothionereductase and glutathionereductase by trivalent organicsarsenicals. *Eur J Biochem* 221 : 285-295.
27. Cunningham ML, Fairlamb AH (1995) Trypanothionereductasefrom *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalentantimonials. *Eur J Biochem* 230: 460-468.
28. Custodio E, López-Alcalde J, Herrero M, Bouza C, Jimenez C, StorcksdieckgenanntBonsmann S, Mouratidou T, López-Cuadrado T, Benito A, Alvar J (2018) Nutritionalsupplements for patients beingtreated for active visceral leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No : CD01226.1
29. Cobo FM (2014) Imported infectious diseases : the impact in developed countries p : 227-242.
30. Dedet J.P (1999) *Les Leishmanioses*, Ellipses Paris, France.
31. Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27 : 305–318
32. Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Oury B, Farida MM, Harrat Z, et al. (2017) *Leishmania* antimony resistance/susceptibility in Algerian foci. *Open J Trop Med* 1(1): 024-032.
33. Eddaikra N, KherachiDjenad I, Benbetka S, Benikhlef R, A\t-OudhiaKh, Moulti-Mati F, Oury B, Sereno D et Harrat Z (2016)Development of a Murine Infection Model with *Leishmania killicki*, Responsible for Cutaneous Leishmaniosis in Algeria: Application in Pharmacology. *BioMed Research International*, 8 p.
34. Eddaikra N, Ait-Oudhia K, Kherrachi I, Oury B, Moulti-Mati F, Benikhlef R, et al. (2018) Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year periodin Algeria. *PLoS Negl Trop Dis* 12(3): e0006310.[https://doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0006310](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006310)
35. EzzineSebai N, Mrabet N, Khaled A, Zeglaoui F, Kharfi M, Fazaa B, Kamoun MR (2010) Les effets indésirables du glucantime® par voiegénérale, dans le traitement de la leishmaniosecutanée : a propos de 15 cas. *La tunisieMedicale*; Vol 88 (n°01) : 9 - 11
36. Jean-Franc Y, Garin O, Sulahian A, Pralong F et al. (2001) Virulence of *Leishmania infantum* Is Expressed as a Clonal and Dominant Phenotype in Experimental Infections. Copyright, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. p. 7365–7373 Vol. 69, No. 12.
37. Garlapati S, Dahan E, Shapira M (1999) Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*, *MolBiochemParasitol*100, 95-101.
38. Ghrab J, Rhim A, Bach Hamba D, Chahed MK, Aoun K, Nourira S, Bouratbine A (2006) Phlebotominae [Diptera: Psychodidae] of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite*, 13(1), 23–33.
39. Gupta S et Day KP (1994) Astrain theory of malaria transmission. *Parasitol. Today* 10, 476–481.
40. Handman E (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 14(2):229-43

41. Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F et al. (2009) Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 103, no. 7, pp. 716–720.
42. Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F, Benikhlef R, Selt B, Dedet JP, et al. (2009) Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103: 716–720.
43. Harrat Z, Pratlong F, Belazzoug S, Dereure J, Deniau M, Rioux JA, Belkaid M, Dedet JP (1996) *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(6), 625–629.
44. Izri A, Bendjaballah A, Andriantsoanirina V, Durand R (2014) Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerg Infect Dis.* 20(3): 502–504.
45. Garin YJ-F, Meneceur P, Sulahian A et Derouin F (2002) Microplate Method for Obtaining *Leishmania* Clonal Populations. *Journal of Parasitology*, 88(4):803-804.
46. Garin, YJF, Sulahian A, Pratlong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E, Dedet JP, et Derouin F (2001) Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infection and Immunity* 69: 7365–7373.
47. Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C (2000) Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology* : 542-552.
48. Laffitte M-C, Leprohon NP, Papadopoulou B, Ouellette M (2016) Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *5:2350*.
49. Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ* 9 : 53-64.
50. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, et al. (2008) Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial.
51. Maubon D, Thurot-Guillou C, Ravel C, Leccia MT et Pelloux H (2009) “*Leishmania killicki* imported from Tunisian desert,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 11, pp. 1864–1865.
52. Mitropoulos P, DO, Konidas P, Pharm D, Mindy DK, Pharm DSK (2010) New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 63:309-22.
53. Ouellette M, Olivier M, Sato S, Papadopoulou B (2003) Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique, *M/S: médecine sciences* 19, 900- 909.
54. Rhajaoui M (2011) Les leishmanioses humaines au Maroc: une diversité nosogéographique. *Pathologie-Biologie (Paris)*, 59(4), 226–229.
55. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596.
56. Rougeron V, De Meeu T, Kako Ouraga S, Hide M, Banuls A-L (2010) “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. *PLoS Pathog* 6(8): e1001004.
57. Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL (2001) Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 45 : 2064-2069.
58. Sharma NL, Mahajan VK, Kanga A et al. (2005) Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in Himachal Pradesh, India,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 6, pp. 819–824.
59. Santarém N, Cunha J, Silvestre R, Silva C, Moreira D, Ouellette M et Cordeiro-DA-Silva A (2014) The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity . Experimental bias induced by *Leishmania* culture media. *Parasitology*, 141, 192–205.

60. Sudhandiran G, Shaha C (2003) Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 278 : 25120-251
61. Tabbabi A, Bousslimi N, Rhim A, Aoun K, Bouratbine A (2011) First report on natural infection of *Phlebotomus sergenti* with *Leishmania* promastigotes in the cutaneous leishmaniasis focus in southern Tunisia. *Am J Trop Med Hyg.* 85(4): 646–647.
62. Tibayrenc M, Ayala FJ (2012) How clonal are Trypanosoma and *Leishmania*. *Trends in Parasitology* xx 1–6.
63. Tibayrenc M, Ayala FJ (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 18: 405–410.
64. Tibayrenc M (1993) Clonality in *Leishmania*. *Parasitol Today* 9: 58.
65. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2414–2418.
66. Toumi A, Chlif S, Bettaieb J, Ben Alaya N, Boukthir A, Ahmadi ZE, Ben Salah A (2012) Temporal dynamics and impact of climate factors on the incidence of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1633.
67. Tibayrenc M et Ayala FJ (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *TRENDS in Parasitology* Vol.18 No.9 September.
68. Vannier-Santos M.A, Martiny A et Souza W (2002) Cell biology of *Leishmania* spp: invading and evading, *Curr Pharm Des* 8, 297-318.
69. Wyllie S, Fairlamb AH (2006) Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 71 : 257-267.
70. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279 : 39925-39932.
71. Zait H, Ferhani Y, Achir I, Hamrioui B (2012) Study of 71 cases of visceral leishmaniasis diagnosed at the Mustapha University Hospital (Algiers) from 1998 to 2009. *Med Mal Infect* 42: 119-125.

Annexes1 : Préparation des milieux de culture

1. Préparation du milieu NNN

a) Composition

- Gélose : Bacto Agar Difco.....10 gr.
- NaCl.....06 gr.
- Eau distillée100 ml.
- Sang de lapin.....10 à 20% (volume)

b) Préparation

- **La gélose Bacto Agar** : elle est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80°C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation. 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** : obtenu par ponction cardiaque, il est recueilli sur citrate de sodium à 10 %. Après ajout de 250 000 Unités (U) de pénicilline, la conservation se fait à + 4°C.
- **Le mélange gélose-sang** : la gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain-marie de 45°C, le sang est ensuite incorporé à la gélose (2 ml de sang pour 8 ml de gélose). APRES homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation de ce milieu est d'un mois à 4°C.

2. Préparation du milieu RPMI 1640 à 15%

a) Composition

- RPMI 1640.....16,4 gr.
- Eau distillée stérile..... 1000 ml.

b) Préparation

- Mesurer environ 900 ml d'eau distillée.
- Tout en soumettant l'eau distillée à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer.
- Ajouter 2 ml de L-Glutamine, 50 U/ml de streptomycine.
- Compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml.
- Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm.
- Additionner aseptiquement du Sérum de Veau Fœtal (SVF) à 15 %.
- Conserver le milieu à 4°C au réfrigérateur.

3. Préparation du Milieu 199

a) Composition :

- M199 en poudre.....0.99 gr.
- Eau bi-distillée stérile.....100 ml.

b) Préparation :

- Peser 0.99 gr de la poudre du M199.
- Ajouter 100 ml d'eau bi-distillée stérile puis mélanger.
- A l'aide d'un pH-mètre, vérifier que le pH du M199 = 7,4.
- Si le milieu est acide (couleur jaune), ajouter de l'Hydroxyde de Sodium (NaOH) ou une demie pastille d'Hydroxyde de Potassium (KOH).
- Si le milieu est basique (couleur rouge), ajouter une goutte de Chlorure de sodium (HCl).
- Ajuster le pH jusqu'à ce que le milieu devienne neutre et prenne une couleur rose.
- Filtrer le M199 avec un filtre stérile de 0,22 µm pour éliminer les bactéries à faible poids moléculaire.

4. Préparation du milieu LIT**a) Composition**

- Sang de lapin citraté.....300 ml.
- Gélose LIT.....100 ml.
- M199.....100 ml.
- RPMI.....100 ml.

b) Préparation

- Faire fondre la gélose LIT au bain-marie.
- Mélanger le sang de lapin citraté avec le M199 et le RPMI.
- Ajouter la gélose LIT fondue.
- Après homogénéisation du milieu, couler immédiatement dans des boîtes de Pétri à 5,5cm de diamètre (Ø) puis laisser refroidir quelques minutes.
- Incuber les boîtes LIT à 37°C afin de détecter d'éventuelles contaminations.

Annexe 2 : Numération cellulaire par la cellule de Thoma

Le nombre de parasite par ml de suspension a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Nombre de parasite par ml} = \text{Nombre de parasite} / 6 \times 16 \times 3 \times 10000.$$

Avec :

6 nombre de carreaux calculés.

16 \longrightarrow nombre de petits carreaux de cellule de Thoma.

3 nombre de solutions.

10000 volume d'un rectangle en mm^2 .

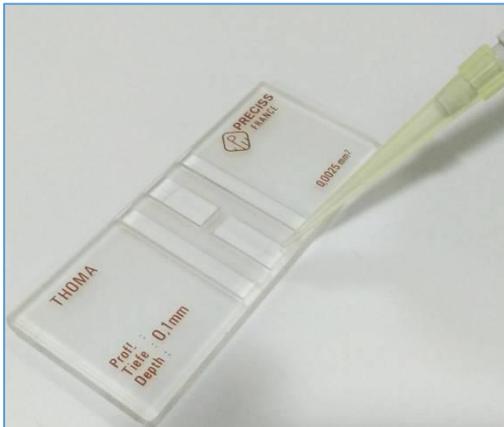


Figure a. Dépôt d'une goutte de solution parasitaire formée entre lamelle et cellule de Thoma.

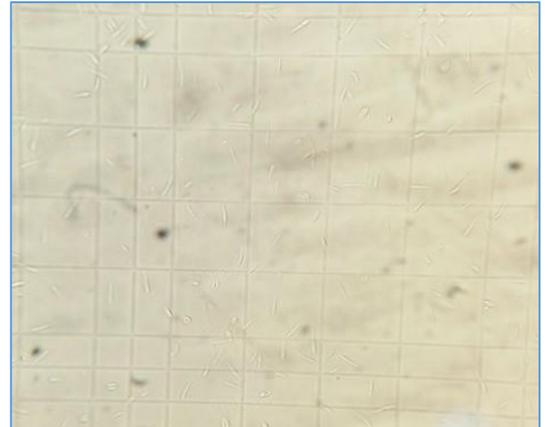


Figure b. Aspect des carreaux de la cellule de Thoma, vus au MP Gx40.

Annexe 3 : Les composés des produits utilisés dans la Technique de PCR (polymerase Chain Reaction)

1. Extraction d'ADN

0,5 M EDTA (pH 8,0)

1. Poids moléculaire EDTA = 292,25 ou 372,24 dans le cas du sel disodique
2. Ajouter la quantité nécessaire d'EDTA à 800 ml de H₂O.
3. Agiter vigoureusement sur un agitateur magnétique.
4. Comme le NaOH est soluble à pH 8,0, ajouter des pastilles de NaOH (la quantité dépend du type d'EDTA utilisé!) Pour dissoudre l'EDTA.
5. Vérifiez le pH et ajustez-le à 8.0. Ajuster le volume de la solution par la suite à 1 litre avec H₂O.
6. Distribuer dans des aliquotes et stériliser par autoclavage.

Tampon de lyse

1. Peser 1,46 g de NaCl.
2. Ajouter 10 ml d'EDTA (0,5 M, pH 8,0).
3. Ajouter 25 ml de Tris.Cl (1 M, pH 7,4).
4. Compléter le volume à 500 ml avec de l'eau distillée et une aliquote.
5. Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à 15 psi à l'autoclave à vapeur. Conserver la solution stérile à 4 ° C ou à température ambiante.

SDS 10%

1. Dissoudre 10 g de SDS d'électrophorèse dans 90 ml de H₂O.
2. Chauffer à 68 ° C et agiter avec un agitateur magnétique pour favoriser la dissolution.
3. Si nécessaire, ajuster le pH à 7,2 en ajoutant quelques gouttes de HCl concentré.
4. Réglez le volume sur 100 ml.
5. Stocker à température ambiante. La stérilisation n'est pas nécessaire. Ne pas autoclaver!

Protéinase K (20 mg / ml)

1. Peser 100 mg de poudre lyophilisée de protéinase K.
2. Ajouter 5 ml de solution aqueuse d'eau distillée stérile.
3. Diviser la solution mère en petites aliquotes et conserver à -20 ° C. Chaque aliquote peut être décongelée et congelée plusieurs fois avant d'être mise au rebut.

Phénol

Le phénol est commercialisé pour la séparation ADN / ARN. Il s'agit de phénol redistillé, de chloroforme et d'alcool isoamylique 25: 24: 1, saturé avec du tampon TE (Tris 10 mM pH 7,5-8,0, EDTA-Na₂ 1 mM). Magasin à 4°C.

3 M Na-Acetate (pH 5.2)

1. Dissolve 40.83 g (0.3 x m. w. 136.1) of Na-Acetate in 50-60 ml of H₂O.
2. Adjust the pH to 5.2 with concentrated glacial acetic acid.
3. Adjust the volume to 100 ml with H₂O.
4. Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

200 ml de Tris-EDTA (TE), pH 8,0

1. Pipeter 2 ml de Tris-Cl 1 M, pH 8,0.
2. Ajouter 400 µl d'EDTA 0,5 M (pH 8,0).

3. Ajouter 170 ml d'eau.
4. Vérifiez le pH et ajustez-le à 8,0 avec 1 M HCl.
5. Complétez le volume à 200 ml.
6. Stériliser à l'autoclave pendant 20 minutes à 15 psi au cycle du liquide. Conserver le tampon à température ambiante.

2. Mélange maître « Master Mix » (MM)

Les composants	MM	concentration finale
10x PCR buffer (y compris. 15 mM MgCl ₂)	5 µl	1x (y compris. 1.5 mM MgCl ₂)
dNTP mix (2.5 mM)	4 µl	200 µM
primer LITSR (10 µM)	2.5 µl	25 pmol
primer L5.8S (10 µM)	2.5 µl	25 pmol
DMSO	1.25 µl	2.5%
Taq	0.2 µl	1 unité
H ₂ O	32.55 µl	--
Total volume	48 µl	--

3. Le programme de thermocycleur

Température de dénaturation	Temps	nombre de cycle
95°C	15 min	1
95°C	20 sec	35
53°C	30 sec	35
72°C	1 min	35
72°C	6 min	35

4. Master Mix de digestion

	MM
10x buffer	3µl
BSA	0.3µl
Multico	3µl
HaeIII restriction enzyme (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O	7.7 µl

5. Préparation de gel d'agarose a 1,5%

La séparation des fragments de restriction par électrophorèse sur gel d'agarose, qui a été préparé, dans un flacon 1,5 mg d'agarose poudre plus 100ml de TAE (préparation d'agarose a 1.5%), mélangé dans une micro-onde jusqu'à l'homogénéisation, puis 6µl de BET a été ajouté à cette solution. Ce gel a été versé dans l'appareil d'électrophorèse.

6. Préparation de gel d'agarose a 3%

Pour l'identification des souches, le gel a été préparé, dans un flacon 3 mg d'agarose poudre avec 100ml de TAE (préparation d'agarose a 3%), cette solution a été mélangée dans un micro-onde jusqu'à l'homogénéisation, puis 6µl de BET a été ajouté à cette solution. Ce gel a été versé dans l'appareil d'électrophorèse.

Annexe 3 : Résultats

Tableau 3. Nombre de parasites (forme promastigote) obtenue après une exposition de 72 heures aux composés de Sb III à différent concentration.

Résultat de *L.infantum*: (LIPA32/06) Résultat de *L.infantum*(LIPA 155/10):

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	40	30	82	85
12,5	22	20	55	77
25	16	13	26	14
50	12	14	15	12
100	10	5	12	10
Clone 1				
0	23	38	50	47
12	10	11	33	30
25	8	8	18	18
50	5	4	15	16
100	3	2	12	10
Clone 2				
0	33	46	28	41
12	15	25	23	30
25	2	6	21	23
50	22	4	7	8
100	3	2	5	4
Clone 4				
0	15	20	60	24
12	11	19	45	22
25	8	15	37	16
50	6	7	25	10
100	4	12	20	19
Clone 5				
0	34	65	36	25
12	27	36	25	23
25	16	69	20	19
50	11	18	14	10
100	9	12	9	3
Clone 8				
0	45	52	40	66
12	30	37	18	12
25	24	21	23	28
50	15	8	22	14
100	9	4	3	7

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	133	128	183	140
12,5	58	92	163	131
25	80	54	133	107
50	99	68	89	85
100	35	45	63	72
Clone 1				
0	75	60	91	100
12	35	53	81	78
25	33	36	72	38
50	34	47	52	30
100	24	28	52	40
Clone 3				
0	75	73	105	82
12	55	49	75	80
25	39	40	59	72
50	36	44	40	63
100	21	25	39	49
Clone 4				
0	128	89	101	139
12	87	79	86	86
25	98	72	74	56
50	79	64	68	60
100	63	55	60	59
Clone 5				
0	222	210	299	136
12	197	189	165	110
25	112	142	118	100
50	103	75	95	78
100	55	60	72	48
Clone 7				
0	100	88	127	98
12	49	72	55	56
25	49	55	50	60
50	52	56	48	53
100	50	80	39	51

Résultat de *L.infantum*(LIPA 222/11):

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	32	28	58	30
12,5	20	14	27	29
25	12	13	21	28
50	11	8	19	30
100	5	4	17	18
Clone 3				
0	9	8	19	10
12	8	6	13	39
25	3	4	15	20
50	0	1	14	5
100	0	0	4	12
Clone 4				
0	81	57	62	78
12	51	29	55	67
25	36	56	60	61
50	28	51	59	61
100	18	22	35	44
Clone 9				
0	145	119	194	216
12	212	188	163	192
25	105	101	177	146
50	33	61	73	98
100	16	47	56	71
Clone 10				
0	43	48	72	63
12	32	25	45	41
25	20	15	42	39
50	11	11	26	36
100	6	5	25	36
Clone 12				
0	33	26	56	48
12	19	21	45	35
25	9	8	32	35
50	18	22	29	19
100	15	25	16	11

Résultat de *L.infantum*(LIPA 405/93):

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	281	348	355	564
12,5	270	380	165	206
25	240	270	150	176
50	138	268	137	160
100	130	128	95	122
Clone 1				
0	126	62	61	73
12	69	52	55	65
25	55	48	46	42
50	40	32	26	35
100	34	28	24	60
Clone 2				
0	320	398	445	417
12	212	212	210	197
25	61	107	78	68
50	36	25	27	23
100	30	20	14	19
Clone 11				
0	137	127	103	86
12	108	91	75	78
25	54	62	54	77
50	18	35	48	45
100	13	24	22	36
Clone 12				
0	131	96	76	91
12	63	71	69	78
25	58	53	57	69
50	43	44	37	44
100	30	42	57	77
Clone 3				
0	--	--	--	--
12	--	--	--	--
25	--	--	--	--
50	--	--	--	--
100	--	--	--	--

Résultat de *L.killiki*(LIPA 10/05):

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	22	26	21	21
12,5	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1
Clone 8				
0	22	26	21	21
12	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1
Clone 9				
0	22	26	21	21
12	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1
Clone 10				
0	22	26	21	21
12	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1
Clone 11				
0	22	26	21	21
12	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1
Clone 12				
0	22	26	21	21
12	21	13	14	16
25	7	6	13	8
50	3	4	6	7
100	1	1	2	1

Résultat de *L.killiki*(LIPA 07/05):

Souche mère				
	P1	P2	P3	P4
0	213	227	145	187
12,5	43	37	154	97
25	9	17	85	68
50	5	4	25	16
100	5	11	14	12
Clone 1				
0	124	190	128	183
12	45	62	91	82
25	21	22	38	44
50	7	6	20	22
100	4	3	18	7
Clone 2				
0	306	205	195	216
12	63	64	57	81
25	16	34	38	48
50	7	7	20	22
100	2	1	18	7
Clone 3				
0	153	156	137	102
12	33	28	79	49
25	12	16	43	50
50	8	6	36	29
100	52	120	21	16
Clone 4				
0	297	277	152	210
12	57	39	151	61
25	2	5	29	15
50	8	15	4	11
100	5	12	9	21
Clone 5				
0	100	109	120	128
12	68	25	61	32
25	14	15	48	9
50	10	3	5	6
100	2	1	26	18

Tableau 4. Concentration efficace d'inhibition de 50% contre les promastigotes de *Leishmania* et leurs clones après une exposition de 72 heures aux composés de Sb III.

<i>Leishmania killicki</i> Lipa 07/05		<i>Leishmania infantum</i> Lipa 155/10		<i>Leishmania killicki</i> Lipa 10/05		<i>Leishmania major</i> Lipa 32/06		<i>leishmania infantum</i> Lipa 405/93		<i>leishmania infantum</i> Lipa 222/11	
Souches	IC₅₀	Souches	IC₅₀	Souches	IC₅₀	Souches	IC₅₀	Souches	IC₅₀	Souches	IC₅₀
Souche mère	6,169	Souche mère	24,88	Souche mère	15,37	Souche mère	10,96	Souche mère	12,01	Souche mère	10,11
Clone 1	6,353	Clone 1	9,450	Clone 8	7,810	Clone 1	7,427	Clone 1	13,21	Clone 3	----
Clone 2	3,841	Clone 3	15,63	Clone 9	9,280	Clone 2	13,17	Clone 2	7,400	Clone 4	29,98
Clone 3	3,323	Clone 4	8,010	Clone10	6,087	Clone 4	15,99	Clone11	18,02	Clone 9	27,37
Clone 4	3,327	Clone 5	15,73	Clone11	29,50	Clone 5	13,19	Clone12	12,38	Clone10	8,895
Clone 5	5,558	Clone 7	4,288	Clone12	16,25	Clone 8	14,55	Clone	----	Clone12	17,55