

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES ORGANISME



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Parasitologie

Laboratoire de biotechnologies, environnement et santé.

THEME

Evaluation de l'activité antileishmanienne de trois
temporines sur le modèle de *Leishmania killicki* chez la
souris BALB/c

Présenté par :

Soutenu le : 27/ 06 / 2018

Mlle : AYAT Sorya

Mme : CHAREF Dalila

Devant le jury :

Mme Tail G.	Pr	USDB 1	Président
Mme Adel A.	MCB/ ISV	USDB1	Examinatrice
Mme Eddaikra N.	Mr de recherche	à L'IPA	Promotrice

2017-2018

Remerciements

La réalisation et l'achèvement de ce travail ont vu le jour grâce à « **ALLAH** » le tout puissant.

Je remercie « **DR Eddaikra Naouel** » Maître de recherche à l'institut pasteur d'Algérie d'avoir accepté de diriger ce travail de mémoire de fin d'étude et de m'avoir soutenu, aidé et encouragé, tout au long de ce travail. Je lui témoigne toute ma reconnaissance, ma gratitude pour ces précieux conseils, son aide et la rigueur dont elle a fait preuve. Merci pour votre soutien, votre écoute et votre disponibilité.

Je tiens à exprimer mes sincères reconnaissances et mes profondes gratitudes à « **Mr Harrat Zoubir** » pour m'avoir accueillie dans l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

A toute l'équipe du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire pour leurs aides, leurs soutiens et leurs encouragements, plus particulièrement à nos Chercheurs Biologistes : Merci à tous, à **Mme KHERACHI Ihcène, Mr GARNI Rafik, Mr BENALLAL Kamel, Mr Mounir, Mme Bnikhelef Razika, Mr CHEBLI Adlane,**

Je remercie ainsi mes professeurs De la faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie et physiologie des organismes : **Mme Tail Ghania, Mme Kara, Mme Saighie, Mme Cherif, Mme Zerkaoui, Mr Bendjoudi Djamel et a Mr Saidani** qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma **binôme « Dalila »** qui a partager avec moi ce travail et dont l'amitié n'a jamais fait défaut.

Je ne remercierai jamais assez ma famille : **ma mère, mes frères, ma cousine Asma.** Merci infiniment pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance sans faille. Vous m'avez toujours encouragée dans mes choix.

Merci à ma très chère tante Djamila Midoun et à ma cousine Aicha Ameer.

Je remercie ainsi **Docteur Benazouz** et sa femme **Docteur Hassan Bey Djamila** et sa belle sœur **Hassan Bey Sabiha** pour leurs soutiens et leurs aides.

Ayat Sorya

Remerciements

La réalisation et l'achèvement de ce travail ont vu le jour grâce à <<ALLAH>> le tout puissant que nous ne remercierons jamais assez. Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut pasteur d'Algérie (Dely Brahim).

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre cher professeur et encadrant Me Eddaikra Naouel maître de recherche au service d'éco-épidémiologie parasitaire à L'IPA pour son suivi et pour son énorme soutien, qu'elle n'a cessé de nous prodiguer tout au long de la période de ce travail.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude à Mr Harrat Zoubir pour m'avoir accueillie dans l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

A toute l'équipe du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements, plus particulièrement à nos Chercheurs Biologistes :

Merci à tous, A Mr GARNI Rafik, Melle Nalia, Mr BENALLAL Kamel, Mr Mounir, Mme Bnikhelef Razika, Mr CHEBLI Adlane, Mme KHERACHI Ihcène.

Je ne remercierai jamais assez ma famille : mon père, ma mère, mon époux, mon frère, ma sœur.

Merci infiniment pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance sans faille. Vous m'avez toujours encouragée dans mes choix.

Charef Dalila

DEDICACES

Je dédie ce travail a :

Mes parents :

-Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

-A la mémoire de mon Père « **Ahmed** » : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Mes frères

A tous les membres de ma famille

A notre chère et dynamique promotrice « **Eddaikra Naouel** » : Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présente. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

Mes professeurs :

De la faculté des sciences de la nature et de la vie, département de biologie et physiologie des organismes qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.

A Monsieur « **Zoubir Harrat** » :

le Directeur général de l'institut pasteur d'Algérie et le Chef service de laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire : Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

A mes chères amies :

Belhraoui Amine, El mererbi Khadidja, Tidjini Fatiha, Bendjafar Nawel, Boughernout djazia, Takdjout Lilia.

A mes cousines :

Hamed lila, Hamed Chahinaz, Ouanfoufi Assma.

Aux personnels du service éco-épidémiologie parasitaire de l'institut pasteur d'Algérie.
Un profond respect et un remerciement particulier pour la bonne contribution de ce travail.

Ayat Sorya

Dédicaces

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve

Je dédie ce modeste travail :

A la lumière de mes jours , la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur ; que dieu te garde pour nous papa

A mon très cher mari qui a toujours répondu présent dans les moments difficiles, son soutien, son encouragement m'ont toujours donné la force de poursuivre mes études

A ma chère sœur SARAH ; QU'ALLAH soit a tes cotés et te procure la réussite et le bonheur. Je t'aime ma petite

A mon cher frère Mohamed ; QU'ALLAH te garde, je te souhaite tout le bonheur que tu mérites. je t'aime mon cher

A ma chère binôme SORAYA qui a partager avec moi ce travail et dont l'amitié n'a jamais fait défaut

A ma belle mère qui m'a toujours soutenue

A mon beau père qui a été toujours la pour moi

A mes belles sœurs NAOUEL, CILIA

A mon beau frère ; mon petit frère SOFIANE

A mes tantes (SAMIA, AMEL, SIHEM, NABILA, SAWSEN). Votre confiance en moi, vos encouragements, vos prières sont ce qui m'a poussé et me pousse toujours à suivre la voie de l'excellence

A mes chères amies (NAOUEL ; DJAZIA ; LILIA)

Charef Dalila

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de la souche <i>Leishmania killicki</i>	10
Tableau 2 : Répartition des lots de souris pour la caractérisation de la cytotoxicité des temporines	13
Tableau 3 : traitement des souris aux Glucantime, peptide A, peptide B et peptide C après 7 semaines d'infestation par <i>leishmania killicki</i> (LIPA 281/11)	14
Tableau 4 : Résultats de l'analyse statistique par test ANOVA des valeurs des indurations pour les 7 semaines post infestation par <i>L.killicki</i>	21
Tableau 5 : Résultats de la comparaison multiple par test ANOVA des valeurs des indurations pour les 22 semaines poste infestation par <i>L.killicki</i>	22
Tableau 6 : Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni du lot non traité vs les traitements par le Glucantime et les temporines en fonction des indurations.....	23
Tableau 7 : analyse des poids des rates et des foies des souris à la 22 ^{eme} semaine post infestation.....	24
Tableau 8: Résultats de l'Analyse de variance entre les différents lots de souris.....	25
Tableau 9 : Résultats des CT de l'étalon de <i>Leishmania Killicki</i>	30
Tableau 10 : Résultats de l'analyse statistique par test ANOVA des concentrations d'ADN obtenue par qPCR.....	30
Tableau 1: les produits du mix et leurs rôles	Annexe p 3.
Tableau 2: Volume des produits nécessaires pour un seul échantillon	Annexe p 3.
Tableau 3: les épaisseurs des oreilles (indurations) de souris infectée pour les 7 semaines poste inoculatoire	Annexe p 4.
Tableau 4: mesure du poids et des indurations des souris testées	Annexe p 6.
Tableau 5: Valeurs des indurations des oreilles des souris infectées par <i>L.killicki</i> après traitement au Glucantime, peptide A, peptide B, peptide C jusqu'à S22	Annexe p 7.

Liste des figures

Figure 1 : photos de la <i>L. major</i> ; forme amastigote et forme promastigote	2
Figure 2 : Cycle évolutif de la Leishmaniose	3
Figure 3 : Répartition géographique de la Leishmaniose en Algérie	5
Figure 4 : Petit garçon souffrant de leishmaniose viscérale	5
Figure 5 : la leishmaniose cutanée	6
Figure 6 : schéma représentatif du mode d'action du Sb (V) dans la cellule de l'hôte	7
Figure 7 : Séquence nucléotidique partielle et séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc codant pour la pré-protemporine-SHd (ppTemp-SHd) clonée à partir de la peau de <i>Pelophylax saharicus</i>	8
Figure 8 : Schéma expérimental de la caractérisation de l'infection par <i>Leishmania killicki</i> (LIPA281/11) <i>in vivo</i>	12
Figure 9 : Résultats de l'étude de la cytotoxicité des temporines <i>in vivo</i>	18
Figure 10 : Photo des oreilles des souris testées en cytotoxicité des temporines.....	19
Figure 11 : Indurations due à l'infestation par <i>L. killicki</i> (LIPA 281/11) à la 5 ^{ème} semaine post infestation.....	19
Figure 12 : Evolution des indurations due à l'infestation par <i>L.killicki</i> (LIPA 281/11) jusqu'à la 7 ^{ème} semaine post inoculation.....	20
Figure 13 : Différence de développement des indurations entre les 3 lots pendant 7 semaines post infestation à <i>L. killicki</i> avant traitement.....	21
Figure 14 : photos des indurations apparues sur l'oreille des souris BALB/c infestée par LIPA 281/11 à S22.....	22
Figure 15 : Evolution des indurations des oreilles des souris BALB/c infectées par <i>Leishmania killicki</i> (LIPA 281/11) avant et après traitement.....	23
Figure 16 : Différence de poids des foies et des rates des souris infecté par <i>L.killicki</i> à la 22	

me semaine des 5 lots : souris Témoin (T-), souris traitées au Glucantime (T+), peptide A (A), peptide B (B) et au peptide C (C).....	24
Figure 17 : Résultats des charges parasitaires au niveau du site d'inoculation des oreilles infectées par <i>L.killicki</i> LIPA 281/11 à la 22 ^{eme} semaine, traitées au Glucantime et au temporines (A, B et C).....	25
Figure 18 : Photos des frottis des oreilles infectées par <i>L.killicki</i> LIPA 281/11 à la 22 ^{eme} semaine Post infestation.....	26
Figure 19 : résultats de la moyenne des scores des DO de l'ADN total par organe et par traitement.....	27
Figure 20 : Résultats des électrophorèses sur Gel d'agarose de l'ADN en fonction d'organe.....	28
Figure21 : Droite d'étalonnage moyenne de régression Standard.....	29
Figure 22 : Résultats des quantifications en qPCR en CT des rates en fonction de traitement.....	30
Figure 23 : les valeurs des charges parasitaires dans les rates en fonction de traitement.....	31
Figure 1: Phlébotome femelle vecteur de la leishmaniose : gorgé de sang	Annexe p 1.
Figure 2: Réservoir de la leishmaniose viscérale en Algérie : le chien	Annexe p 1.
Figure 3: Rongeurs sauvages, réservoir de la leishmaniose cutanée	Annexe p 1.

Liste des Abréviations

L : *Leishmania*
LC : Leishmaniose cutanée
LV : Leishmaniose viscérale
LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse
NNN: Novy Nicole Mc Neal
RPMI 1640 : Rosewel Parc Memorial Institute
LIPA: *Leishmania* institute Pasteur d'Algérie
SVF: Sérum de veau foetal
OMS : Organisation Mondiale de la santé
IPA : Institut Pasteur d'Algérie
AmB : Amphotricine B
Sb : Antimoine
AMP : Temporine
P : Phlébotome
Temp-SHD : temporine SHd
PCR : Polymérase Chain Reaction
QPCR : la PCR quantitative
g: gramme
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
rpm: round per minute (tour par minute)
PBS: Phosphate buffered saline
NaCl: chlorure de sodium
TAE1X : Tris Acide acétique EDTA
PM: Poids moléculaire
UV: ultra violet
min: minute
µl : microlitre
C°: degré celsius
h: heures
t/m : tours par min
pb : paire de base
PH : Potentiel hydrique
BET: Bromure d'éthidium
S: semaine
CT: cycle threshold
INDRT: induration
DO: densité optique

Table des matières

Résumé.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction 1

1ère Partie : Synthèse bibliographique

1. Généralité sur la Leishmaniose

1.1. Généralité..... 2

1.2. Cycle de vie..... 2

1.3. Vecteur..... 4

1.4. Réservoir de la leishmaniose en Algérie..... 4

1.6. Répartition géographique de la leishmaniose en Algérie..... 4

1.5. Manifestation clinique de la leishmaniose en Algérie..... 5

2. Traitement de la leishmaniose

2.1. Traitement, échec chimiothérapeutiques et résistance aux médicaments en Algérie..... 6

3. les Temporines..... 7

4. Modèle animal..... 8

4.1. Modèle de la LC..... 9

4.2 Modèle de la LV..... 9

2ème Partie : Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique..... 10

1.1.1.Souches..... 10

1.1.2.Animaux..... 10

1.2. Matériel non biologique..... 10

2. Méthodes

2.1. Schéma expérimentale 11

2.2. Culture des promastigotes *in vitro*..... 12

2.3. Infestation *in vivo* et suivi 12

2.3.1. Préparation de l'inoculum 12

2.3.2. Inoculation 13

2.3.3. Monitoring de l'infestation parasitaire..... 13

2.4. Test de cytotoxicité des produits.....	13
2.5. Traitement	13
2.6. Monitoring de l'efficacité du produit	14
2.7. Sacrifice des animaux.....	14
2.8. Evaluation de la charge parasitaire	14
2.8.1. Extraction de l'ADN par Phénol chloroforme	15
2.8.2. Analyse qualitative et quantitative des ADN extraits	15
2.8.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose	15
2.8.2.2. Dosage des ADN par spectrophotomètre	16
2.8.3. PCR en temps réel	16
3. Analyse Statistique	17

3ème Partie : Résultats Et Discussion

Résultats

1. Résultats de l'étude de la cytotoxicité des temporines <i>in vivo</i>	18
2. Résultats de l'infestation <i>in vivo</i> et suivi.....	19
2.1. Apparition des Indurations.....	19
2.2. Résultats de l'efficacité de traitement.....	20
2.2.1. Développement des indurations avant traitement.....	20
2.2.2. Développement des indurations après traitement.....	21
3. Effet des traitements sur le phénotype interne de l'infection par <i>L. killicki</i>	23
3.1. Evaluation de l'hépatosplénomégalie.....	23
3.2. Evaluation de la charge parasitaire au site de l'inoculation.....	25
3.3. Evaluation de l'effet du traitement sur la dissémination des parasites.....	26
3.3.1. Résultat de la qualité et la quantité de l'ADN extrait des organes.....	27
3.3.1.1. Sur Nanodrop.....	27
3.3.1.2. Sur gel d'agarose.....	28
3.3.3. Résultats de la PCR en temps réel.....	29
3.3.3.1. Courbe Etalon.....	29
3.3.3.2. Quantifications de <i>Leishmania</i> dans les rates.....	30
2. Discussion	32
Conclusion générale et perspectives	35

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumé

Les leishmanioses sont des zoonoses parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*. En Algérie le traitement de la première ligne est basé sur le Glucantime®. De nombreux cas de résistance à l'antimoine pentavalent ont été rapportés, ce qui implique la nécessité de rechercher de nouvelles molécules thérapeutiques efficace sur cette zoonose. A cet effet, l'activité antileishmanienne de trois temporines, déjà actives *in vitro* sur *Leishmania*, a été testé sur le modèle de *Leishmania killicki* chez la souris (BALB/c).

Les souris BALB/c ont été infectées par la forme métacyclique de la souche *Leishmania killicki*. Les 03 temporines ont été administré en intradermique oreilles, et leurs effets ont été suivi en même temps que celui du Glucantime® jusqu'à la 22^{ème} semaine post infestation. Nos résultats du suivi du phénotype externe sur 22 semaines et du phénotype interne à la fin de l'expérimentation, ont montré l'efficacité des 03 peptides. Le phénotype externe fait apparaitre le peptide C comme étant le plus efficace alors que le phénotype interne, a fait ressortir le peptide A. Ce dernier étant le plus actif *in vitro*. D'après les résultats obtenu dans cette étude ; l'activité antileishmanienne des trois temporines a été confirmé. Nous suggérons, une étude complémentaire de ce travail, par l'augmentation des doses et le prolongement du temps de traitement par les temporines.

Mots clé :

***Leishmania killicki*, BALB/c, temporines, activité leishmanicide.**

Abstract

Leishmaniasis are parasitic zoonoses caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania*. In Algeria the treatment of the first line is based on Glucantime®. Many cases of resistance to pentavalent antimony have been reported, which implies the need to search for new therapeutic molecules effective on this zoonosis. For this purpose, the antileishmanial activity of three temporins, already active *in vitro* on *Leishmania*, was tested on the model of *Leishmania killicki* in mice (BALB / c).

BALB / c mice were infected with the metacyclic form of the strain *Leishmania killicki*. The 03 temporins were administered intradermally to the ears, and their effects were monitored at the same time as that of Glucantime® until the 22nd week postinfestation. Our results of the follow-up of the 22 week external phenotype and the internal phenotype at the end of the experiment, showed the effectiveness of the 03 peptides. The external phenotype makes the peptide C appear to be the most effective while the internal phenotype has highlighted the peptide A. The latter being the most active *in vitro*. From the results obtained in this study; the antileishmanian activity of the three temporins has been confirmed. We suggest, a complementary study of this work, by the increase of the doses and the prolongation of the treatment time by the temporins.

Key words:

***Leishmania killicki*, BALB/ c, temporines, antileishmanien.**

المخلص

داء الليشمانيا هو مرض حيواني طفيلي ناجم عن بروتوزوا من جنس الليشمانيا. في الجزائر يعتمد علاج الخط الأول على Glucantime®. تم الإبلاغ عن العديد من حالات مقاومة الأنتيمون الخماسي التكافوي ، مما يعني الحاجة إلى البحث عن جزيئات علاجية جديدة فعالة على هذا المرض. لهذا الغرض ، تم اختبار النشاط المضاد للالتهاب لثلاثة temporins ، التي تم اثبات فعاليتها في المخبر ، على نموذج الليشمانيا *killicki* في الفئران (BALB / ج).

أصيب الفئران BALB / c بالشكل metacyclic من سلالة *Leishmania killicki*. تم حقن الـ temporins الـ 03 داخل غشاء الأذن ، وتم رصد آثارها في نفس الوقت الذي تم رصده في Glucantime® حتى الأسبوع الثاني والعشرين بعد الإصابة بالمرض. وأظهرت نتائج متابعة النمط الظاهري الخارجي لمدة 22 أسبوع والنمط الداخلي في نهاية التجربة فعالية البيبتيدات 03. النمط الظاهري الخارجي للبيبتيد C يبدو الأكثر فاعلية في حين أن النمط الظاهري الداخلي قد سلط الضوء على البيبتيد A. هذا الأخير هو الأكثر نشاطا في المختبر. من النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ؛ تم تأكيد النشاط المضاد للالتهاب في للبيبتيدات الثلاثة. نقترح ، دراسة تكميلية لهذا العمل وذلك بزيادة الجرعات وإطالة وقت العلاج ب temporins.

الكلمات الرئيسية :

الليشمانيا *killicki* , c/BALB , temporines, النشاط المضاد لداء الليشمانيا

Introduction

INTRODUCTION

La leishmaniose est une zoonose parasitaire, transmise à l'homme par la piqûre d'un insecte diptère dénommé Phlébotome. Le parasite est un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Le phlébotome s'infecte lors d'un repas sanguin en absorbant des monocytes sanguins parasités sur une hôte infecté. Chez l'homme la maladie se manifeste en trois formes principales : la forme cutanée, la forme muco-cutanée et la forme viscérale (Aubry, 2006). Les réservoirs sont les rongeurs sauvages et le chien, Les canidés et d'autres mammifères tels que Tapirs, Hérissons (Wery, 1995).

Les leishmanioses sont largement répandues dans le monde, endémique dans 98 pays du monde (OMS, 2007). La forme cutanée est la plus courante avec 50 à 75% des cas de leishmaniose. La maladie est un facteur qui contribue au sous-développement pour les pays d'Afrique. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la maladie touche plus de 12 millions de personnes et induit entre 20 000 à 40 000 décès par an (Alvar *et al.*, 2012). L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de la LC. Plus de 21 000 cas de la forme cutanée ont été enregistré en 2010, avec un important impact sur la santé publique (Eddaikra *et al.*, 2017). Actuellement, la LC constitue un sérieux problème de santé publique en Algérie, qui place ce pays en deuxième position après l'Afghanistan en termes d'incidence de la maladie. Pendant ces dernières années un nouveau taxon a été détecté à Ghardaïa et à Tipaza, qui est *L. killicki* responsable de la leishmaniose cutané en Algérie, Libye et Tunisie

Un certain nombre de médicaments ont été employés pour le traitement de la maladie, le traitement de première ligne est basé sur une drogue contenant de l'antimoine (Sb (v)) qui est le Glucantime®, et l'amphotéricine B (AmB) qui est la deuxième ligne de traitement (Croft *et al.*, 2006).

Au cours de ces dernières années, de nombreux cas de résistance à l'antimoine pentavalent ont été rapportés (Singh *et al.*, 2014 ; Loeuillet *et al.*, 2016). En absence de vaccin efficace contre la leishmaniose, les cas de résistance et l'échec de traitement en particulier l'antimoine représentent un sérieux problème de santé publique et implique la nécessité de rechercher de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces sur cette zoonose.

Parmi ces molécules d'intérêt possédant une activité leishmanicide, on retrouve les temporines. C'est une famille de peptides courts produits à partir de la peau d'Eurasien et Grenouilles rousses du nouveau monde. Parmi les temporines étudiées, le temporine-SHd, qui est un peptide de 17 résidus, exprime un large spectre d'activité antimicrobienne. De plus des travaux ont montré qu'il présentait une grande activité antileishmanienne contre le stade promastigote et le stade intracellulaire (amastigote) *in vitro* (Abbassi *et al.*, 2013).

Le but de ce travail est d'évaluer *in vivo* l'activité antileishmanienne de trois différents peptides de synthèse, à savoir la SH-a la SH-b et la Dermaseptine en comparaison avec le traitement par le Glucantime®. Cette activité a été testée sur un modèle animal mis au point à l'institut Pasteur d'Algérie chez la souris BALB/c, infecté par une espèce de *Leishmania* responsable d'une forme chronique de la leishmaniose cutanée en Algérie : *Leishmania killicki*.

Chapitre 1: Synthèse Bibliographique

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La leishmaniose est une maladie tropicale négligée qui touche 98 pays dans les 4 continents (OMS, 2006). Cette maladie est causée par un parasite du genre *Leishmania*, qui fut découvert par Sir William Leishman en 1900. Le parasite se multiplie dans les cellules mononuclées phagocytaires des mammifères et est transmis par la pique d'un insecte du genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomia* dans le nouveau monde. Chez l'homme la maladie se présente sous trois formes : La leishmaniose cutanée (LC), la muco-cutanée (LMC) ou viscérales (LV). Plus de 20 espèces de *Leishmania* sont pathogènes chez l'homme (Dedet, 2009).

1. Généralités sur la Leishmaniose

La leishmaniose est une réticulo-endothéliose parasitaire dont l'agent pathogène est un protozoaire appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* et l'ordre des *kinetoplastidae* (Dedet, 2009). Il présente au cours de son cycle deux stades évolutifs distincts : le stade amastigote retrouvé chez les hôtes vertébrés dont l'homme et le stade promastigote retrouvé dans l'intestin du phlébotome et dans les milieux de culture (Chabasse *et al.*, 2007). Ce parasite est transmis de mammifère à mammifère, par la pique d'un arthropode vecteur " le phlébotome" (Marty, 2009).

1.1. Cycle de vie

Le genre *Leishmania* se multiplie par division binaire et existe sous deux formes : **la forme promastigote** (Figure 1b), qui est une forme extracellulaire qui possède un flagelle de 20 µm de longueur. Les promastigotes procycliques se développent dans l'intestin moyen du Phlébotome puis migrent vers le pharynx et deviennent métacycliques (Figure 2). **La forme amastigote** (figure 1a) qui est intracellulaire, colonise les macrophages. Elle est de forme ronde ou ovale d'environ 4 µm de long et 2 µm de large. La différence de température (25°C à 37°C) et le pH (7.2 à 5) entre l'insecte vecteur et l'hôte vertébré causent la transformation du parasite de la forme promastigote en forme amastigote (Acebey *et al.*, 2008).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

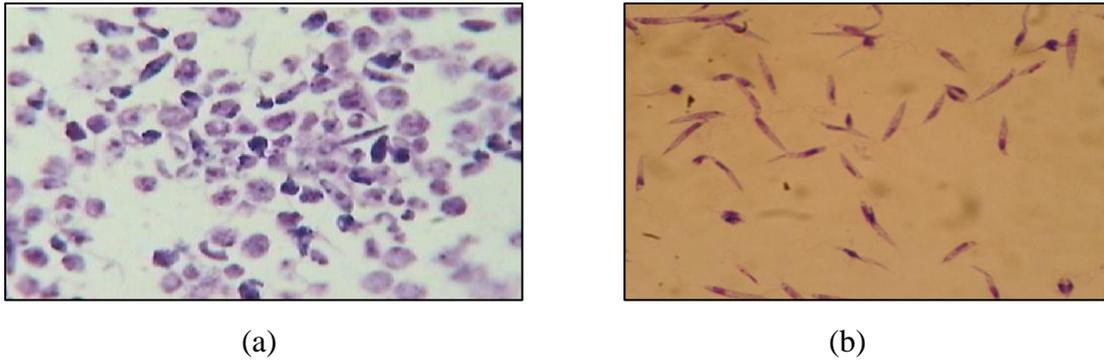


Figure 1 : Photos des formes amastigote Gx100 (a) et promastigotes Gx40 (b) de *Leishmania* (Parvaneh *et al.*, 2008)

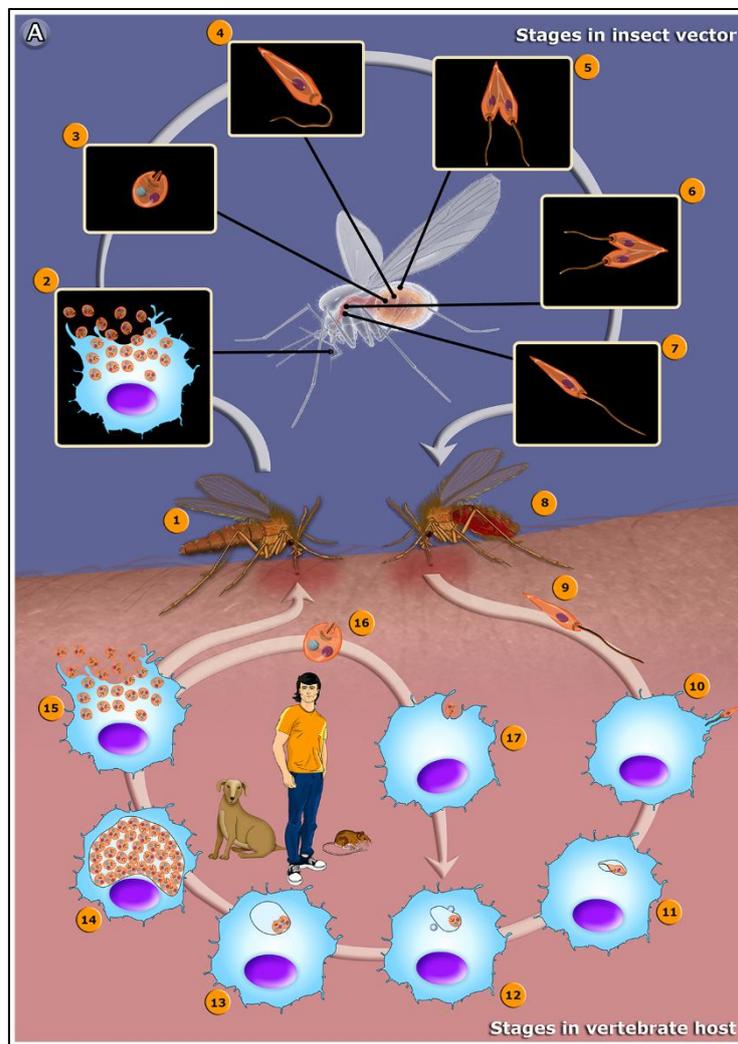


Figure 2 : Cycle évolutif de la Leishmaniose.

<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003594>

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.3. Vecteur

Les phlébotomes sont de petits insectes hématophages de la famille des Psychodidae appartenant à l'ordre des diptères (Annexe 1). Ils mesurent de 2 à 3 mm. Leurs couleurs varient du gris argent à noir, et leurs ailes ont une forme caractéristique de « V » au repos. Il existe environ 800 espèces de phlébotomes dans le monde parmi lesquelles environ 30 sont vectrices de Leishmanioses (BATES, 2007), seule la femelle est hématophage. Les Phlébotomes ont un mode de vie nocturne.

1.4. Réservoir de La leishmaniose en Algérie

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet le chien comme réservoir (Dedet *et al.*, 1977). D'autres réservoirs de la LV existent tels que les canidés et d'autres mammifères tels que Tapirs, Hérissons (Wery, 1995).

Le réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique (Annexe 2) est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages gerbillidés. Le *Psammomys obesus* comme réservoir de *L. major* (Belazzoug, 1983), et le *Meriones shawi* (Belazzoug, 1986). Dans certains cas de la LV à *L. donovani* et la LC à *L. tropica*, l'homme est l'unique réservoir (Dedet, 2009).

1.5. Répartition géographique de la leishmaniose en Algérie

L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de LC (Alvar *et al.*, 2012). Trois formes de leishmaniose cutanée ont été décrites : la forme sporadique causée par *Leishmania infantum* dans le Nord, et la forme classique causée par *Leishmania major* dans les régions centrales du pays. Entre 2004 et 2006, un autre taxon, *Leishmania killicki*, a été détecté à Ghardaïa et à Tipaza (Figure 3) (Harrat *et al.*, 2009 ; Izri *et al.*, 2014).

La forme viscérale de la leishmaniose se trouve principalement dans la partie Nord du pays. La maladie est causée par *L. infantum*. Les foyers de LV actifs sont situés dans la partie Nord du pays et à l'Est, à Mila, Bejaïa et à Sétif. Des cas ont également été signalés dans le Sud dans les montagnes de Tassili et Hoggar à Illizi et Tamanrasset respectivement (Eddaikra *et al.*, 2017 ; Adel *et al.*, 2014).

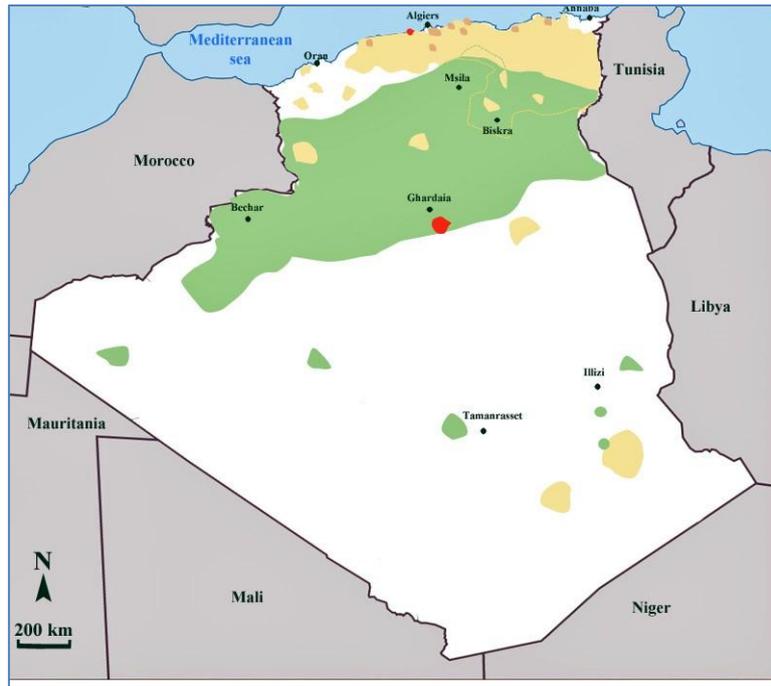


Figure 3: Répartition géographique de la Leishmaniose en Algérie

L. infantum LV (●), *L. infantum* LC (●), *L. major* (●), *L. killicki* (●), (Eddaikra *et al.*, 2017).

1.6. Manifestation clinique de la leishmaniose en Algérie

En Algérie, la leishmaniose se présente sous deux formes : la forme cutanée et la forme viscérale. Actuellement, la LC constitue un sérieux problème de santé publique en Algérie, qui place ce pays en deuxième position après l'Afghanistan en termes d'incidence de la maladie (ALVAR *et al.*, 2012).

Leishmaniose viscéral (LV) : c'est la forme la plus grave de la maladie. Elle est caractérisée par la migration des parasites vers les organes lymphoïdes. Les symptômes cliniques incluent entre autre la fièvre, les douleurs abdominales, une perte de poids, une hépato-splénomégalie (Figure 4) et une lympho-adénopathie. (Acebey *et al.*, 2008).



Figure 4 : Petit garçon souffrant de leishmaniose viscérale.

<https://www.google.dz/sourceimag%2F%2Fcampaigns%2Fworld-healthFleishmaniasis>

Leishmaniose cutanée (LC) : c'est la forme la plus courante, caractérisée par la formation d'une petite papule prurigineuse rouge sombre qui apparaît au site de pique. Puis, elle progresse en nodule érythémateux, en induration et se recouvre d'une mince croûte évoluant lentement sous forme sèche ou forme humide (figure 5) (Acebey *et al.*, 2008).



Figure 5 : la leishmaniose cutanée (El Kartouli, 2015)

2. Traitement de la leishmaniose

En l'absence de vaccin efficace contre la leishmaniose, le traitement de cette maladie est lié aux agents chimiothérapeutiques. Le traitement de première ligne pour soigner cette infection est constitué des dérivés de l'antimoine pentavalent organique (Sb (V)) (Pentostam®, Glucantime®) qui sont utilisés depuis 1916 en Algérie. La résistance clinique à ces médicaments est apparue comme un principal obstacle aux traitements en Inde (Lira *et al.*, 1998), tandis que les traitements de seconde ligne incluent la pentamidine, l'amphotéricine B, la miltéfosine et la paromomycine (Ashutosh *et al.*, 2007).

2.1. Traitement, échec chimio-thérapeutiques et résistance aux médicaments en Algérie

L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques pour les formes cutanées et viscérales de leishmaniose. Pour toutes les formes de leishmaniose, le traitement de première intention repose sur le Glucantime® qui est fourni par les structures de santé gratuitement suivi de l'Amphotéricine B. Ces deux médicaments sont inclus dans la liste nationale des médicaments essentiels. (Eddaikra *et al.*, 2017).

En 1986, dans la wilaya de M'sila des souches de *L. major* isolé chez 97 enfants ont présenté une faible susceptibilité envers le SbV contenu dans des médicaments sous forme de Glucantime®. Récemment, 9% de résistance au traitement par l'antimoine a été enregistré chez les enfants atteints de leishmaniose viscérale (Zait *et al.*, 2012).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les problèmes liés à la résistance, à la toxicité et aux coûts élevés de ces traitements mettent en évidence le besoin criant de nouvelles molécules thérapeutiques.

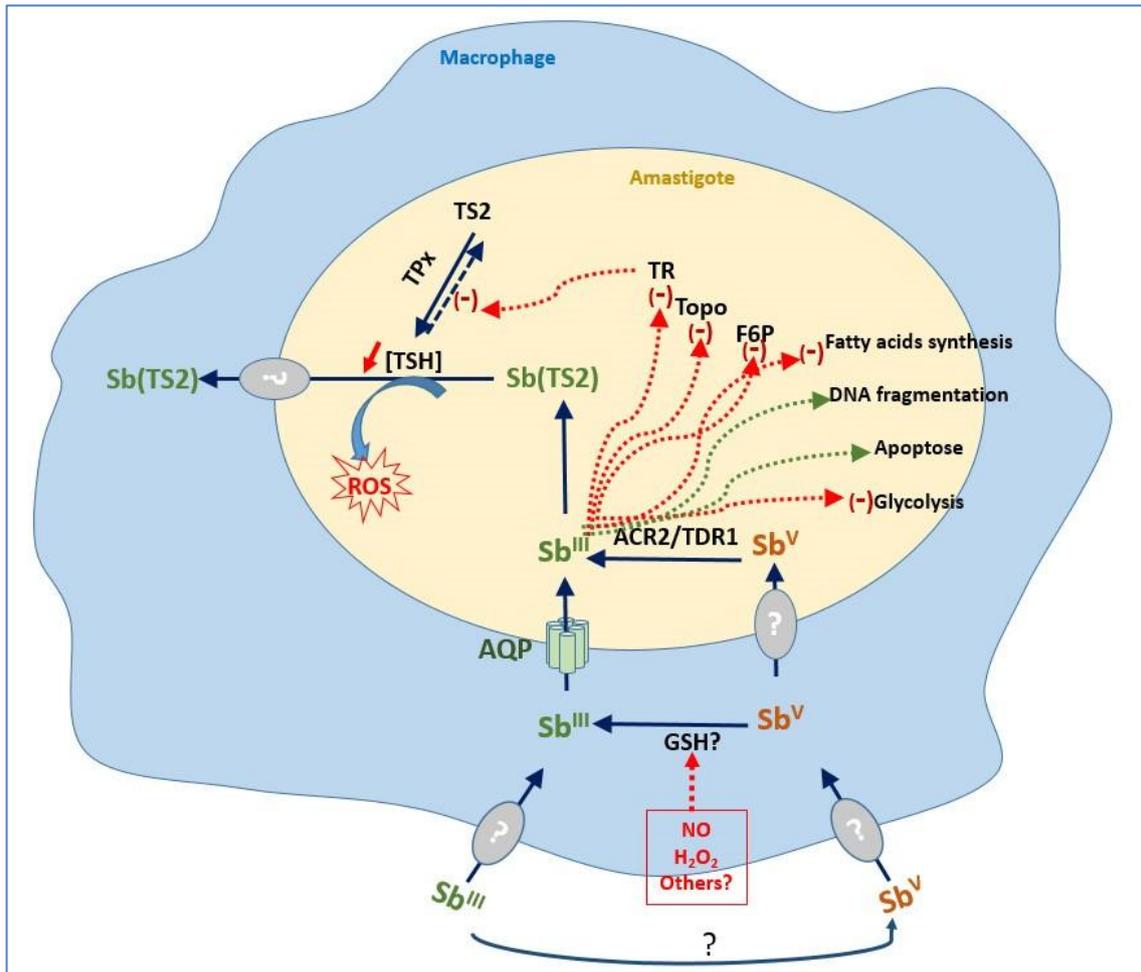


Figure 6 : schéma représentatif du mode d'action du Sb (V) dans la cellule de l'hôte (Eddaikra *et al.*, 2017).

3. Les Temporines (AMP)

C'est une famille de peptides courts (8 à 17 acides aminés), qui appartient à la superfamille Dermaseptine. Ce sont des peptides de défense, produite par la peau des grenouilles rouges (Wang *et al.*, 2009). Elles sont caractérisées par une faible charge positive nette de 0 à +3 et une séquence très variable avec une prévalence d'acides aminés hydrophobes. Les temporines les plus naturelles contiennent un seul résidu basique d'acide aminé et montrent une activité antimicrobienne puissante, et ont également une activité leishmanicide (Abbassi *et al.*, 2013). Les AMP sont extraites de la peau de Grenouilles rouges du nouveau monde (Conlon *et al.*, 2004).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le temporine-SHd (peptide de 17 résidus) (Figure 7) qui exprime un large spectre d'activité antimicrobienne a présenté une grande activité antileishmanienne contre le stade promastigotes et le stade amastigote de *Leishmania in vitro* (Abbassi *et al.*, 2013).

ppTemp-SHd	
F L G T I N L S L C E Q E R D A D E E K	
TTCCTTGGGACCATCAACTTATCTCTCTGTGAGCAAGAGAGAGATGCCGATGAAGAAAAA	60
R D E P D E S D V E V E K R F L P A A L	
AGAGACGAGCCAGATGAAAAGTGATGTTGAAGTAGAAAAACGATTTTTTACCAGCAGCCCTT	120
A G I G G I L G K L F G K *	
GCAGGTATTGGAGGAATTTTGGGTAAACTTTTCGGCAAATAACCCAAAAATGTTGAAACT	180
TTGGAAATGGAATGGAATCATCTGACGTGGAATATCATTGGCTAAATGCTCAACAGA	240
TGTC	244

Figure 7 : Séquence nucléotidique partielle et séquence d'acides aminés déduite de l'ADNc codant pour la pré-protemporine-SHd (ppTemp-SHd) clonée à partir de la peau de *Pelophylax saharicus* (Abbassi *et al.*, 2013).

Le peptide signal putatif partiel (gris) est suivi de la pro-pièce acide et du peptide mature (noir). Le résidu G (en gras) à l'extrémité C-terminale de la séquence de la temporine mature sert de donneur d'amide après élimination du résidu K (en gras) avec une carboxypeptidase. Le codon d'arrêt (astérisque) est le 30- La séquence UTR (italique) est indiquée.

4. Modèle animal de la leishmaniose cutanée

Les modèles animaux ont toujours joué un rôle essentiel dans l'exploration et la caractérisation de la physiopathologie de la maladie, l'identification des cibles, et dans l'évaluation *in vivo* de nouveaux agents thérapeutiques et des traitements.

Parmi les modèles animaux utilisés dans l'étude de la LC et la LV, on retrouve les souris et les hamsters. Les souris BALB/c arrivent à développer la leishmaniose cutanée et viscérale suite à une infection expérimentale par les formes promastigotes métacycliques de *Leishmania* (Belkaid *et al.*, 1998). Dans certains cas, elles meurent suivant une infection à *L. tropica* ou *L. major* tandis que d'autres souris telles que C57BY6 guérissent spontanément de leurs lésion cutanée (Muyombwe *et al.*, 1998). Ces modèles expérimentaux de leishmaniose chez les rongeurs ont permis d'accumuler des informations importantes concernant ces pathologies et pourraient potentiellement permettre l'élaboration de nouvelles approches immunologiques afin de contrôler ces maladies chez l'homme (Cevera *et al.*, 2014).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de la leishmaniose, il est capital de comprendre comment les souches résistantes au traitement et virulentes diffusent et sont contrôlées par le système immunitaire de l'hôte. Différents aspects immunologiques et thérapeutiques de la LC et de la LV ont été étudiés chez les modèles animaux, tel que la souris, le hamster, les chiens, et les primates.

4.1. Modèle de la LC

Afin d'étudier la LC, plusieurs modèles animaux ont été mis au point. Les parasites sont généralement injectés par voie intradermique dans le coussinet plantaire, la base de la queue ou dans le pavillon de l'oreille. L'inoculum varie selon le mode de l'injection puisqu'il peut être très faible pour l'intradermique oreille (de 100 à 1000 parasites) (BELKAID *et al.*, 1998), alors que pour les autres sites d'injection, les concentrations doivent être plus importantes (10^5 à 10^7 parasites).

4.2 Modèle de la LV

Bien que les souris BALB/c ne succombent pas à l'infection par une souche responsable de la LV (différemment des humains non traités), elles peuvent être utilisées pour étudier les changements immuno-pathologiques qui surviennent au cours de la LV (Loeuillet *et al.*, 2016). En effet, les souris BALB/c présentent les caractéristiques cliniques de la LV humaine, tels que l'hépatosplénomégalie ou la destruction du tissu splénique. La principale caractéristique de la LV est sa spécificité d'organe (rate et foie).

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

La partie expérimentale de ce mémoire a été réalisée au sein du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Souche

Une souche appartenant à l'espèce *Leishmania killicki* (LIPA281/11) a été choisie pour l'infestation *in vivo* chez les souris BALB/c : les caractéristiques de cette souche sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques de la souche *Leishmania killicki*

Code OMS de la souche	Typage PCR RFLP	Typage Isoenzymatique	Origine du patient	Forme clinique
MHOM/DZ/2011/281/11	<i>Leishmania killicki</i>	MON 301	Ghardaïa	LC

Cette souche était stockée au niveau de la cryobanque du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire de L'IPA. Elle a été décongelée et cultivée sur milieu NNN puis passée sur un milieu RPMI 10S.

1.1.2. Les animaux

Les souris utilisées dans notre étude sont des BALB/c femelles de 6 semaines (59 souris) avec un poids moyen de 18g. Elles sont issues de l'élevage de l'animalerie du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'IPA. Elles ont été élevées dans des conditions standards de température et de luminosité et une alimentation *Ad libitum*.

1.2. Matériel non biologique

Réactifs et solutions : Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau physiologique, eau distillée, Di-éthyle éther, Bleu de Trypan, Bleu de Bromophénol, SDS, Acétate de Sodium, ARNase, Protéinase K, Ethanol, TAE1X, Chlorophorme, Bromure d'étidium, Phénol/chloroforme alcool iso amylique, Tampon de lyse, Azote liquide, agarose, Giemsa, Formol, Glucantime, les Temporines (SH-a : peptide A, SH-b peptide B, Dermaseptine : peptide C).

MATERIEL ET METHODES

Milieu de culture : Deux milieux de culture de *Leishmania* ont été utilisés au cours de cette étude : le milieu NNN (Nicolle Mac Neal Novy 1904), et le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Park Institut), additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

2. Méthodes

2.1. Schéma expérimentale

Afin d'établir un modèle animal de la LC provoquée par *L. killicki*, en premier lieu nous avons établis une culture des promastigotes métacycliques *in vitro* sur milieu NNN, puis sont repiqués sur le milieu RPMI 10S. En deuxième lieu nous avons préparé l'inoculum par récupération des métacycliques. L'infestation a été réalisée par voie intradermique, au niveau du pavillon de l'oreille par une injection de 10 μ L de 10³ parasites métacycliques. Après l'inoculation des parasites, un suivi hebdomadaire de l'infestation des souris a été effectué pendant 7 semaines post infestation.

Afin de faire le suivi de l'efficacité des peptides nous avons suivi le développement du phénotype externe de cette souche. A cet effet, nous avons utilisé 5 groupes de souris : 10 souris pour le groupe témoin non infecté, 10 souris pour le groupe traité au Glucantime, 9 souris pour le groupe traité au peptide A, 9 souris pour le groupe traité au peptide B, et 9 souris pour le groupe traité au peptide C. Le traitement a été administré à la 7^{ème} semaine post infestation par des infiltrations péri-lésionnelles, avec une seule dose pour les peptides et 5 infiltrations pendant 2 semaines pour le Glucantime. (Figure 7)

Après avoir euthanasié les souris, et afin de savoir si *L. killicki* a pu se disséminer dans les organes internes, les souris ont été sacrifiées et la présence de l'ADN parasitaire a été recherché à la 22^{ème} semaine post infestation. Les organes étudiés sont la rate, les ganglions, et les oreilles.

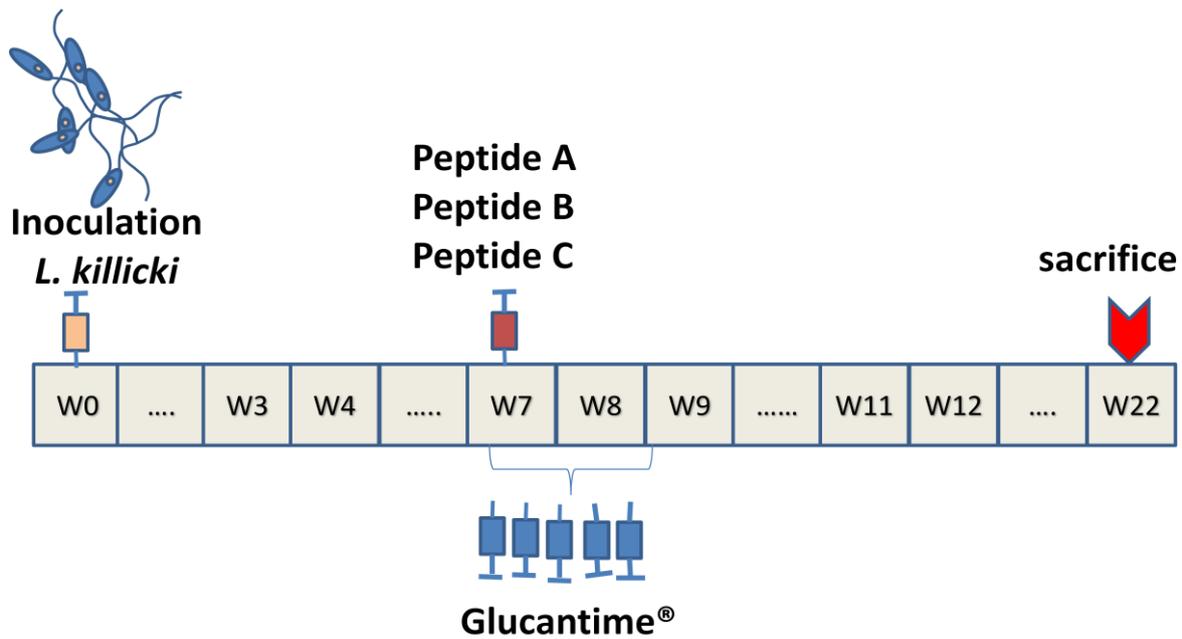


Figure 8 : Schéma expérimental de l'infection par *Leishmania killicki* (LIPA281/11) *in vivo* et du traitement par les temporines et le Glucantime®.

2.2. Culture des promastigotes *in vitro*

Culture sur milieu NNN : La culture sur milieu NNN, qui est un milieu semi solide, a pour but d'isoler et d'entretenir les souches étudiées. Elle assure la multiplication du parasite sous sa forme promastigote. La prolifération sur milieu NNN nécessite 5 à 7 jours d'incubation en moyenne à 25°C. A cet effet, les promastigotes ont été repiqués chaque 5 jour sur le même milieu après contrôle des cultures par examen direct de la suspension parasitaire.

Culture sur milieu RPMI : Pour augmenter la densité de l'inoculum, les promastigotes ont été repiqués sur le milieu RPMI qui est un milieu liquide, supplémenté de 10% de SVF. La culture a été incubée à 25°C et renouvelé par repiquage sur un milieu neuf tous les 5 jours après vérification de cultures par examen direct de la suspension parasitaire.

Congélation des souches : La souche LIPA281/11 a été revitalisée par inoculation en intradermique oreille sur souris Balb/c. Un grattage de la lésion a étéensemencé sur milieu NNN. Après trois jours d'incubation la souche a été repiquée sur RPMI 10S pour constituer 13 stabilats qui ont été congelés dans l'azote liquide, dans la banque de souches de l'IPA.

2.4. Infestation *in vivo* et suivi

2.3.1. Préparation de l'inoculum : Après culture sur milieu NNN puis transfert sur milieu RPMI à 10% de SVF, les suspensions parasitaires en phase exponentielle ont subi 03 lavages

MATERIEL ET METHODES

avec l'eau physiologique par centrifugation à 850g pendant 10 min pour récupérer les formes métacycliques. La numération des parasites présents dans le culot a ensuite été réalisée sur cellule de Thoma (Annexe 3).

2.3.2. Inoculation : Les inoculations ont été faites par une injection de 10 μ L de 10³ parasites métacycliques, réalisée en Intradermique au niveau du pavillon de l'oreille droite des souris BALB/c.

2.3.3. Monitoring des infestations parasitaires : Un suivi hebdomadaire de l'infestation des souris infectées a été effectué pendant 7 semaines post infestation. Le monitoring a consisté en la pesée des animaux et la mesure des indurations (épaisseur de l'oreille). Diamètre des rougeurs et des lésions à l'aide d'un pied à coulisse électronique.

2.4. Test de cytotoxicité des Temporines utilisées

Afin d'étudier la cytotoxicité des produits utilisées sur les souris Balb/c : Glucantime®, Temporines (Peptide A, Peptide B et Peptide C), 12 souris BALB/c femelle de 18 g ont été séparée en quatre lots et inoculé par voie intradermique au pavillon de l'oreille droite (3 souris pour chaque produit) (tableau 2). Le suivie des souris a été effectué chaque 2 jour pendant une semaine. Le suivi consiste à la pesée des animaux et la mesure des indurations.

Tableau 2 : Répartition des lots de souris pour la caractérisation de la cytotoxicité des temporines.

Lots	Glucantime	Peptide A	Peptide B	Peptide C
Souris femelle non infesté	3	3	3	3
Doses	28mg/kg	100 μ M	100 μ M	300 μ M

2.5. Traitement

Après 7 semaines d'infestation par LIPA 281/11 et l'apparition des lésions les 47 souris femelles ont été séparées en 5 lots (un lot pour chaque produit et un lot témoin) (Tableau 3). Les solutions de Glucantime® et des trois Temporines (Peptide A, B et C), ont été préparées stérilement pour toute la durée du traitement : 5 doses de traitement par le Glucantime® et une seule dose pour les 03 temporines. Elles ont été ensuite aliquotées puis conservées à -20°C. Des infiltrations intra-lésionnelles ont été effectuées tous les 5 jours pendant 2 semaines pour le Glucantime® à une concentration de 28 mg/Kg de poids. Alors que pour les Temporines une seule dose a été injectée à une seule concentration selon les concentrations qui figurent dans le tableau 3.

MATERIEL ET METHODES

Tableau 3 : traitement des souris aux Glucantime, peptide A, peptide B et peptide C après 7 semaines d'infestation par *leishmania killicki* (LIPA 281/11).

Groupe de souris	Produit utilisé	Concentration des produits
Lot 1 : 10 souris	Témoin non traitées	-
Lot 2 : 10 souris	Glucantime	28mg/kg
Lot 3 : 9 souris	Peptide A	100 μ M
Lot 4 : 9 souris	Peptide B	100 μ M
Lot 5 : 9 souris	Peptide C	300 μ M

2.6. Monitoring de l'efficacité du traitement : Un suivi hebdomadaire des souris infectées et traitées a été effectué pendant 12 semaines post traitement. Le monitoring a consisté en la pesée des animaux et la mesure des indurations (épaisseur de l'oreille). Diamètre des rougeurs et des lésions à l'aide d'un pied à coulisse électronique.

2.7. Sacrifice des animaux

La surveillance et dissémination des parasites dans les tissus de différents organes (Rate, Foie, Oreille, Ganglion lymphatique) ont été réalisés par plusieurs méthodes de détection (microscope, q-PCR), pour cela les 5 lots de souris ont été sacrifiés à 12 semaine post inoculation.

2.8. Evaluation de la charge parasitaire

Pour évaluer l'efficacité des 03 temporines testées en comparaison au traitement par le Glucantime® sur les souris infectées par *L. killicki*, nous avons déterminé les charges parasitaires au niveau du site d'inoculation, de la rate et des ganglions lymphatiques. A cet effet, 5 souris de chaque lot ont été sacrifiées à 12 semaines post traitement.

La charge parasitaire au niveau du point de l'inoculation a été déterminée par grattage, suivi 3 appositions à partir de l'oreille grattée sur une lame porte objet. Les frottis séchés ont été colorées au GIEMSA (annexe 4). La charge parasitaire dans l'oreille a été estimée par le nombre de parasites par 100 macrophages infectés.

Pour déterminer la charge parasitaire dans la Rate et les ganglions lymphatiques, nous avons utilisé une quantification par qPCR (PCR quantitative) ciblant l'amorce kinetoplastique JW11/JW12 (Nicolas *et al.*, 2000, Eddaikra *et al.*, 2018).

Après avoir anesthésié les souris à l'éther, la rate et les ganglions lymphatiques drainant de l'oreille infectée, ont été prélevés aseptiquement pour déterminer la charge parasitaire.

MATERIEL ET METHODES

2.8.1. Extraction de l'ADN par Phénol chloroforme

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

Lyse cellulaire : 100µl tampon de lyse ont été ajoutés aux organes broyés (10mg pour la rate, et la totalité des ganglions prélevés), pour casser les ponts disulfure. Par la suite, 10µl de SDS à 10% ont été ajoutés pour casser la bicouche lipidique, et 2.5µL de RNAase pour éliminer tous les ARN. Ce mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 à 30 min. L'ADN libéré dans le milieu est alors traité par une protéinase K à 20mg/mL (10µL), afin de digérer les protéines qui lui sont associées, la lyse est réalisée au bain marie à 55°C toute une nuit. Le lendemain, le lysat a été récupéré.

Déproteïnisation : la déproteïnisation de la solution se fait par une extraction au phénol/chloroforme/alcool iso-amylique (25 :24 :1). Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée après centrifugation à 2500 tr/min pendant 15 minutes.

Précipitation : pour précipiter l'ADN, 200µl de la phase aqueuse sont récupérés dans un nouveau tube, 1/10 du volume d'acétate et 2 volume d'Ethanol absolu sont ajoutés puis centrifugés à +4°C à 1200tr/min pendant 30 min. Le surnageant est éliminé, et le culot est remis en suspension avec 60µl de tampon d'éluion afin de réhydrater l'ADN.

2.8.2. Analyse qualitative et quantitative des ADN extraits

2.8.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Par électrophorèse sur gel d'agarose (Annexe 5) on peut analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés par le bromure d'éthidium, un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN.

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

visualisation de la migration des bandes d'ADN sur une table UV du Trans illuminateur dans une chambre noire.

2.8.2.2. Dosage des ADN par spectrophotomètre

La concentration de l'ADN extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop®. Les acides nucléiques absorbent à 260nm, alors que les protéines absorbent à 280nm (à cause des acides aminés aromatiques). Les molécules organiques telles que les tampons, absorbent à 230 nm. La pureté des échantillons a été déterminée par le rapport de la mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 et 280. Un rapport supérieur à 1.8 signifie que les échantillons ne contiennent que de faibles niveaux de contaminants protéiques. C'est pourquoi ratio 260/280 (généralement < 1.9) indique une contamination par protéines et un ratio 260/230 (généralement > 2) indique une contamination par molécules organiques.

2.8.3. PCR en temps réel

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

Le CYBR green 1 est un composé organique aromatique de formule chimique C₃₂H₃₇N₄S faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Il est de se fait utilisé en biologie moléculaire comme agent fluorescent, notamment lors de la réalisation de la PCR quantitative.

La gamme étalon de cette qPCR a été établie par des ADN provenant de culots parasitaires de *Leishmania*, avec une concentration de 86 millions de parasites/ml. L'ADN a été dilué au millième (1/1000) et au dix millième (1/10000) passée sur l'appareil de PCR en temps réel selon le protocole de (Nicolas, 2002) modifié selon les recommandations du fournisseur Roche adaptées pour le CYBR green 1.

Après avoir préparés le mélange réactionnel en additionnant des sondes fluorescentes et des primers, ainsi que l'ajout des ADN de nos échantillons et du témoin positif. Le mélange réactionnel a été déposé dans une plaque de 96 puits, et scellé par un film en plastique. La lecture de la plaque s'est faite dans un appareil de PCR quantitative en temps réel (Smart cycler-rapide) couplé à un spectro-fluoromètre. Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leurs traitements, selon le programme spécifique à l'amorce JW11/JW12 (Annexe 6).

MATERIEL ET METHODES

La méthode de préparation du mix est similaire à celle la PCR standard, à l'exception l'ajout de la sonde marqué. Les volumes recommandés pour un seul échantillon sont présenté dans l'Annexe7.

3. Analyse Statistique

Pour mieux interpréter les résultats obtenu, une analyse par le test ANOVA à été effectué, qui consiste à comparé les différentes moyennes obtenues à partir des cinq lots de souris.

Dans ce travail le test ANOVA à servis à comparé les moyennes de la charge parasitaire dans les cinq lots de souris (lot témoin, lots traités au temporines et lot traité au Glucantime). Ainsi à permet de comparé entre la charge parasitaire dans le lot témoin et les lots traités au peptide. L'analyse est faite sur le logiciel Graphe Prism (5.0).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent travail a pour principal objectif d'étudier l'activité antileishmanienne de trois temporines sur le modèle de leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* chez les souris BALB/c.

Ce travail comporte deux parties relatives à l'étude de l'efficacité des temporines *in vivo*. Une première partie relative à l'infestation et traitement des souris et une deuxième partie relative à l'évaluation de l'efficacité des produits au niveau du site de l'inoculation et sa diffusion dans les viscères. Nos résultats décriront en premier lieu le phénotype externe de l'infection, puis en second lieu le phénotype interne.

1. Résultats de l'étude de la cytotoxicité des temporines *in vivo*

Le suivi des 12 souris femelles testées pour les produits (Glucantime®, Peptide A, Peptide B, Peptide C) a été effectué chaque 2 jours pendant 2 semaines. Le suivi a consisté en la pesée des animaux et la mesure des indurations au point d'injection (Figure 9). D'après le phénotype externe les produits n'ont révélé aucune toxicité pour les souris (Figure 10).

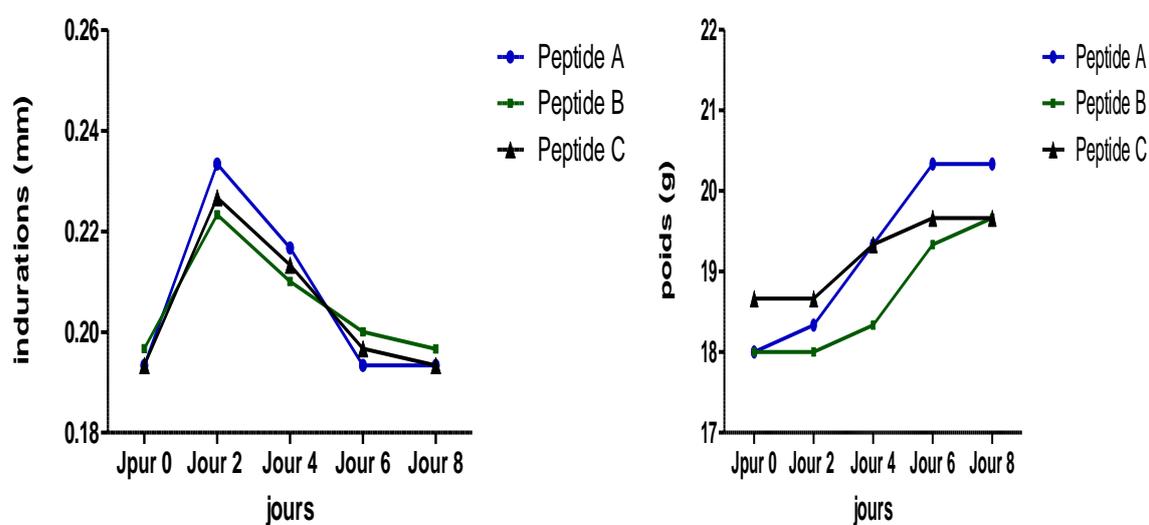


Figure 9 : Résultats de l'étude de la cytotoxicité des temporines *in vivo*.

Les mesures des poids et des indurations sont mentionné dans le tableau 4 de l'Annexe 8.

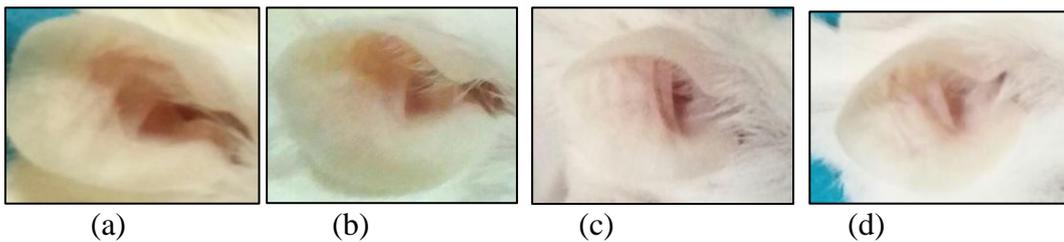


Figure 10: Photo des oreilles des souris testées en cytotoxicité des temporines.
Glucantime® (a), peptide A (b), peptide B (c), et peptide C (c).

2. Résultats de l'infestation *in vivo* et suivi

2.1. Apparition des Indurations

Le premier signe d'infestation par *L. killicki* inoculé dans le pavillon interne des oreilles des souris BALB/c, se manifeste sous forme d'indurations. On remarque l'apparition de ces dernières dès la 5^{ème} semaine pour la souche (LIPA 281/11). Par ailleurs, nous avons noté l'apparition d'inflammations, qui se manifestent au départ sous forme de rougeur (Figure 11). Les indurations variaient entre 0.30 et 1.05 mm avec une moyenne de 0.8 mm et un écart type de 0.75 (Figure 12).

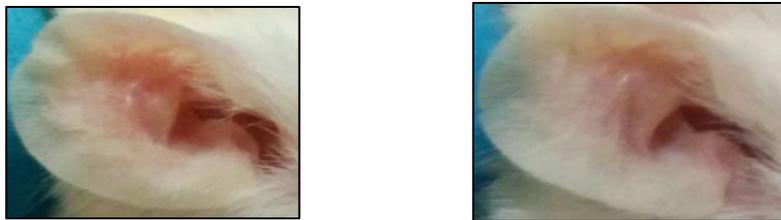


Figure 11 : Indurations due à l'infestation par *L. killicki* (LIPA 281/11) à la 5^{ème} semaine post infestation.

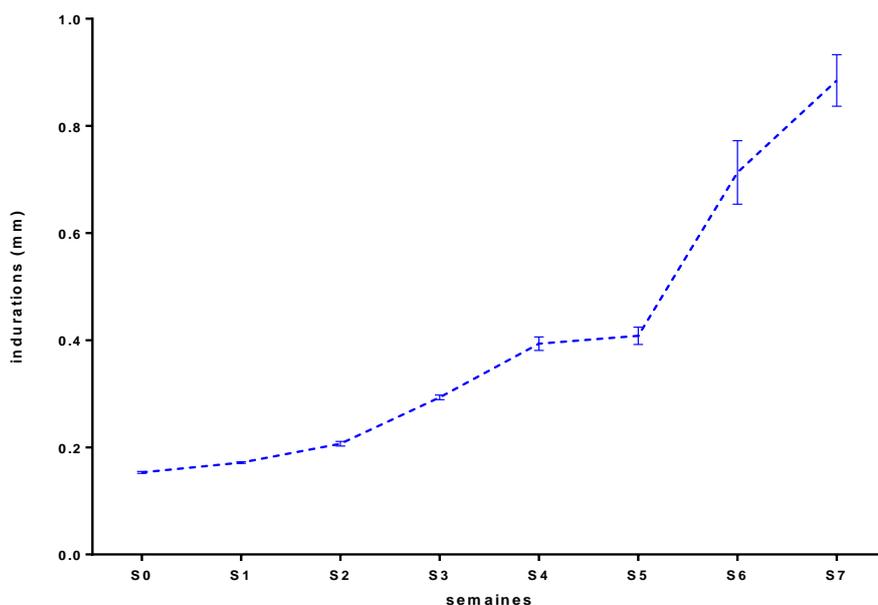


Figure 12 : Evolution des indurations due à l'infestation par *L.killicki* (LIPA 281/11) jusqu'à la 7^{ème} semaine post inoculation.

2.2. Résultats de l'efficacité de traitement

Le suivi hebdomadaire de l'infestation des souris a été effectué pendant 22 semaines après la première inoculation du parasite. Le monitoring a consisté en la pesée des animaux et la mesure des indurations (Annexe 9). On c'est basé en premier lieu sur le phénotype externe des lésions, et en deuxième lieu sur la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation, et en fin on à recherché l'ADN parasitaire dans les organes cible : Foie, rate, ganglion et oreille.

2.2.1. Développement des indurations avant traitement

Dès l'apparition des premiers signes d'infestation à S7, les souris ont été divisées en 5 lots et traitées, au Glucantime® pour le groupe témoin positif, et aux 03 peptides par des infiltrations péri-lésionnelles. Un suivie hebdomadaire à été effectué pendant 22 semaines poste infestation.

L'homogénéité des indurations des 03 groupes infectés avant le traitement c'est-à-dire de S0 à S7, a été testée par une ANOVA à 1 facteur. Les résultats n'ont pas montré de différence significatives entre les indurations des souris des 3 lots infectées, avec une P value > 0.05. (Figure 13) (Tableau 4).

RESULTATS ET DISCUSSION

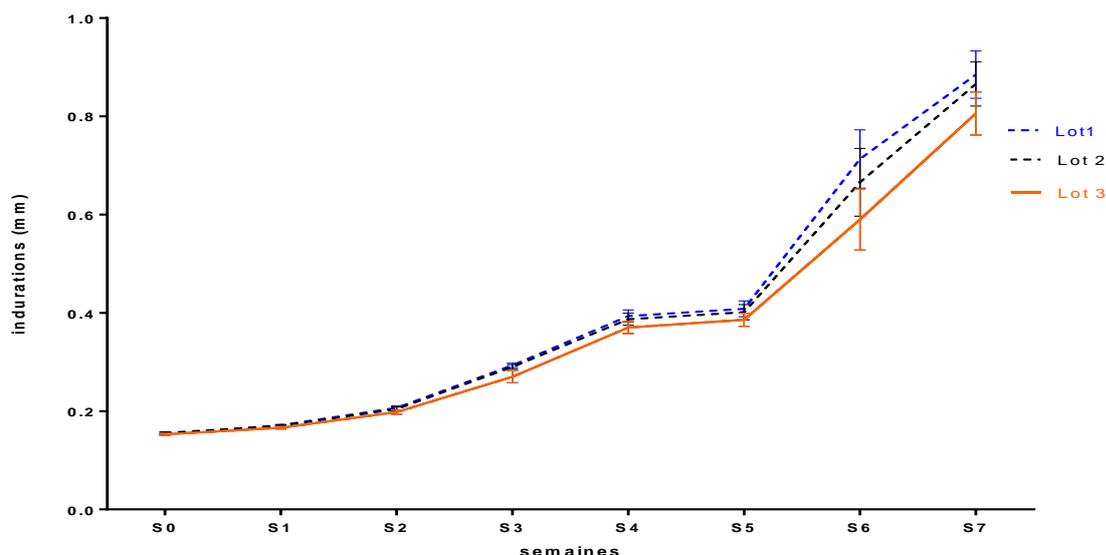


Figure 13 : Différence de développement des indurations entre les 3 lots pendant 7 semaines post infestation à *L. killicki* avant traitement.

Tableau 4 : Résultats de l'analyse statistique par test ANOVA des valeurs des indurations pour les 7 semaines post infestation par *L.killicki*.

ANOVA Table	SS	df	MS
Traitement (between columns)	0.009345	5	0.002336
Residual	2.046	35	0.05847
Total	2.056	39	
P Value	0.9915		

2.2.2. Développement des indurations après traitement

Après traitement, de S7 à S22, un développement important et progressif des indurations a été noté pour le lot témoin négatif et le lot traité au Peptide A. Par contre, nous avons obtenu des valeurs moins importantes pour les lots traitées au peptide B et au peptide C, et proche de celle du lot traité au Glucantime® (Figure 14).

Les indurations des lots de souris traitées au Glucantime et celles au peptide C sont pratiquement les mêmes. Les indurations des souris traitées par le peptide B (2.56mm) sont un peu plus importantes que celle des souris traitées au Peptide C (1.99mm) à la 22^{ème} semaine. Les moyennes des indurations sont mentionnées dans le Tableau 5 en Annexe 9.

RESULTATS ET DISCUSSION

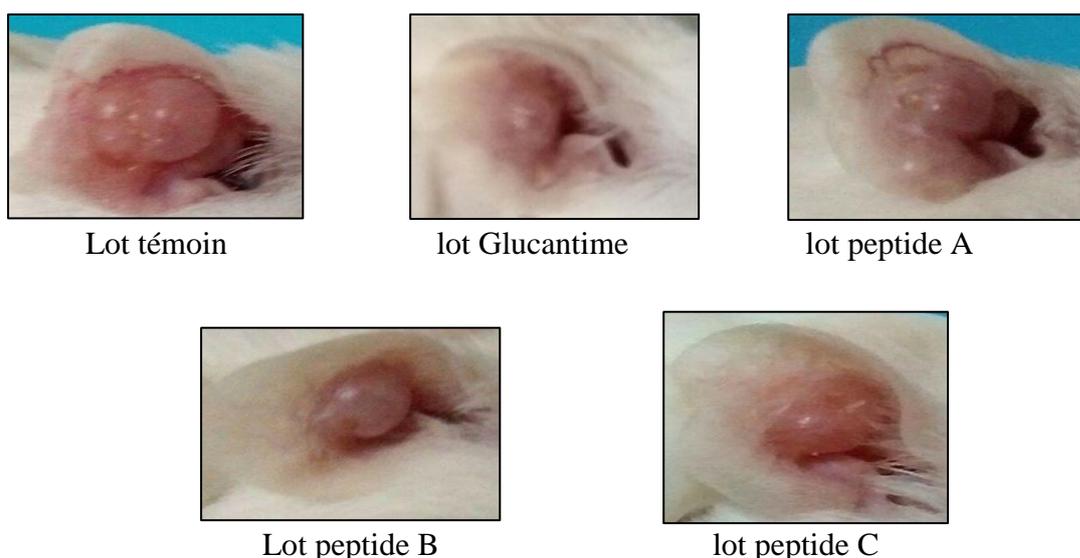


Figure 14 : photos des indurations apparues sur l'oreille des souris BALB/c infestée par LIPA 281/11 à S22.

Cette différence entre l'apparition et l'évolution des lésions a été analysée par une ANOVA à 2 facteurs en fonction des traitements administrés et en fonction du temps (semaines). Les résultats de cette ANOVA ont montré que l'interaction est extrêmement importante avec un pourcentage de variation de 5.99 % de la variance total ($P = 0.0044$). L'effet des semaines sur les indurations est fortement significatif ($P = 0.0001$) et affecte à 48.47% la variance total. De plus, les différents traitements ont aussi un effet hautement significatif sur les résultats (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de la comparaison multiple par test ANOVA des valeurs des indurations pour les 22 semaines poste infestation par *L.killicki*.

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	5,993	0,0044	**	Yes
Semainesr	48,47	< 0,0001	****	Yes
Traitements	6,068	< 0,0001	****	Yes

Le post test de Bonferoni, qui a comparé l'effet des lots traités par rapport à celui du témoin négatif non traité, a montré que sur les 4 traitements appliqués avaient des effets variables. Le glucantime® a montré un effet significatif à partir de la 15^{ème} semaine, pour atteindre un effet très fortement significatif à la 22^{ème} semaine (****). Pour les peptides, le peptide C est celui qui a révélé le plus de significativité à partir de la 15^{ème} semaine ($P < 0.05$), et a atteint une très forte significativité à S22. Les effets du peptide B ne sont apparus qu'à la 21^{ème} semaine. Et paradoxalement, le

RESULTATS ET DISCUSSION

peptide A qui possède un effet antileishmanien *in vitro*, n'a pas montré de significativité en comparaison avec le témoin (Tableau 6).

Tableau 6 : Résultats significatifs de l'Analyse du post test de Bonferoni du lot non traité vs les traitements par le Glucantime et les temporines en fonction des indurations.

	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22
Témoin + vs. glucantime	**	**	*	*	***	***	****	****
Témoin + vs. Peptide A	ns	ns						
Témoin + vs. Peptide B	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	***	*
Témoin + vs. Peptide C	*	*	Ns	ns	**	**	****	****

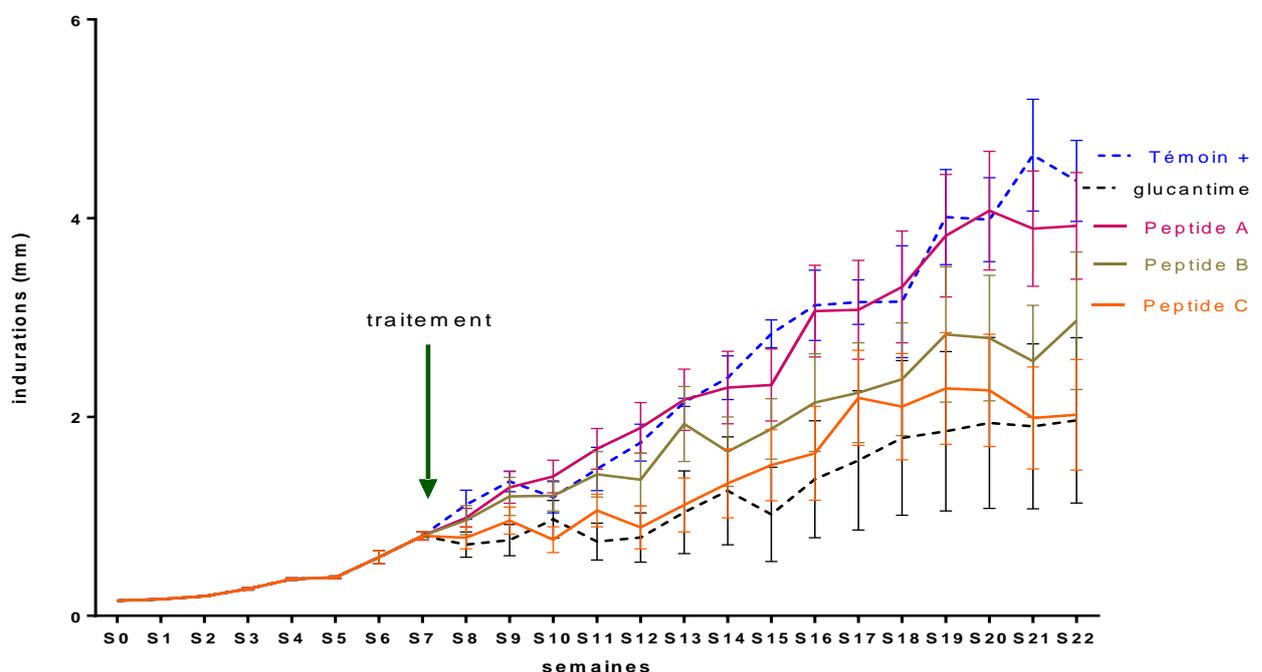


Figure 15: Evolution des indurations des oreilles des souris BALB/c infectées par *Leishmania killicki* (LIPA 281/11) avant et après traitement.

3. Effet des traitements sur le phénotype interne de l'infection par *L. killicki*

3.1. Evaluation de l'hépatosplénomégalie

Les Foies et les Rates prélevés des différents lots de souris, à la 22^{ème} semaine après sacrifice des animaux, ont été pesés afin d'évaluer l'importance du parasitisme de ces organes en mesurant l'hépatosplénomégalie. (Figure 16).

Cette différence des poids des rates et Foies a été analysée par une ANOVA à un facteur. Les résultats de cette analyse pour les rates sont significatifs ($p = 0.0366$). Le peptide B est celui qui semble avoir réduit le plus la rate. L'application du post test de Tukey, a montré une

RESULTATS ET DISCUSSION

différence très significative (**), entre les rates du lot peptide A et les rates du lot peptide B (P=0.0054).

L'application du post Test de Dunett pour comparer les lots traités au lot non traité a montré une différence significative entre les foies des souris non traitées et les foies des souris traitées au peptide B (p<0.01). (Tableau 7).

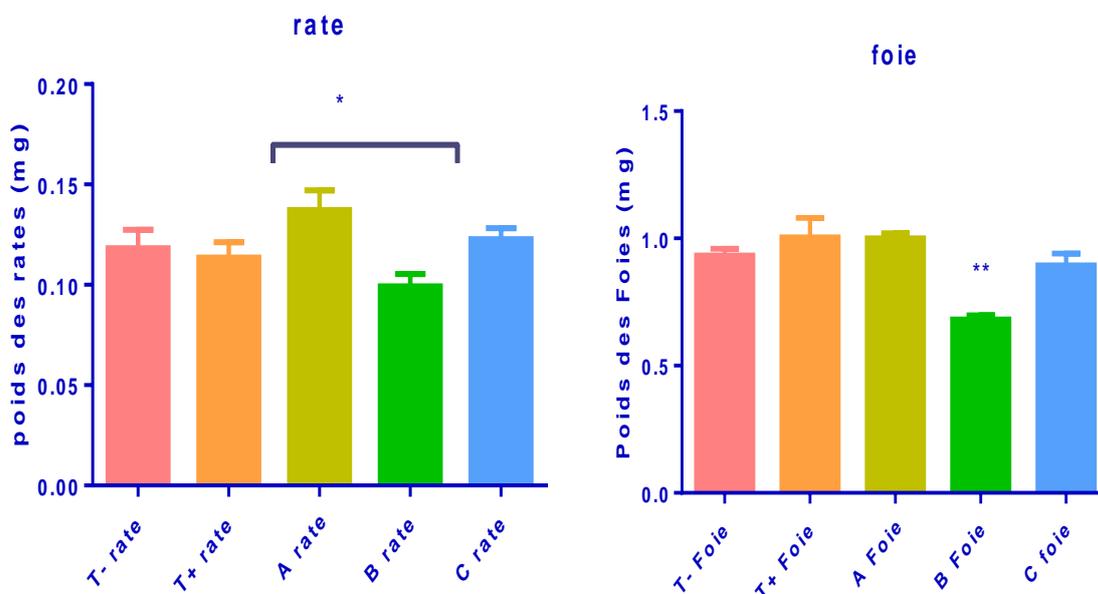


Figure 16 : Différence de poids des foies et des rates des souris infecté par *L.killicki* à la 22^{me} semaine des 5 lots : souris Témoin (T-), souris traitées au Glucantime (T+), peptide A (A), peptide B (B) et au peptide C (C).

Tableau 7 : analyse des poids des rates et des foies des souris à la 22^{eme} semaine post infestation.

Dunnett's multiple comparison test	Significant ? P<0.05 ?	Summary	95% CL of diff
Témoin + vs Glucantime (Foie)	No	Ns	-0.2718 to 0.1305
Témoin + vs peptide A (Foie)	No	Ns	-0.2185 to 0.1838
Témoin + vs peptide B (Foie)	Yes	**	0.006035 to 0.4083
Témoin + vs peptide C (Foie)	No	Ns	-0.1621 to 0.2401
Témoin + vs Glucantime (Rate)	No	Ns	-0.02465 to 0.03398
Témoin + vs peptide A (Rate)	No	Ns	-0.04831 to 0.01031
Témoin + vs peptide B (Rate)	No	Ns	-0.01031 to 0.04831
Témoin + vs peptide C (Rate)	No	Ns	-0.03381 to 0.02481

RESULTATS ET DISCUSSION

3.2. Evaluation de la charge parasitaire au site de l'inoculation

Afin de déterminer l'importance de la parasitémie au niveau du site d'inoculation en fonctions des traitements étudiés, des grattages ont été effectués à S22. Les résultats de la numération de ces frottis sont représentés dans la figure 17.

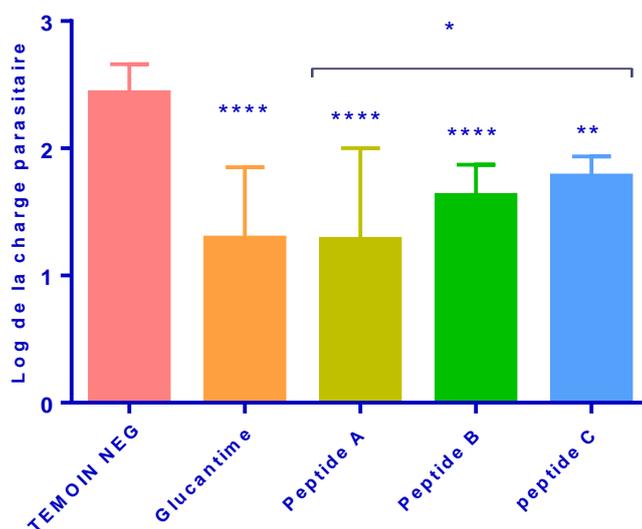


Figure 17 : Résultats des charges parasitaires au niveau du site d'inoculation des oreilles infectées par *L.killicki* LIPA 281/11 à la 22^{ème} semaine, traitées au Glucantime et au temporines (A, B et C).

L'analyse des résultats des grattages d'oreilles par ANOVA à un facteur à la 22^{ème} semaine a montré une différence fortement significative avec un p value <0.0001 (Tableau 8). Les charges parasitaires des lots traités par le Glucantime et les temporines se sont révélées toutes très significative en comparaison avec le témoin négatif (Figure 18). Par ailleurs, le Test de Tukey a montré que le peptide A était plus efficace que le peptide C avec un P value <0.05.

Tableau 8: Résultats de l'Analyse de variance entre les différents lots de souris.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
TEMOIN NEG vs. Glucantime	1,142	0,6747 to 1,610	Yes	****
TEMOIN NEG vs. Peptide A	1,15	0,7912 to 1,509	Yes	****
TEMOIN NEG vs. Peptide B	0,8059	0,3430 to 1,269	Yes	****
TEMOIN NEG vs. peptide C	0,6534	0,1189 to 1,188	Yes	**
Glucantime vs. Peptide A	0,007799	-0,3574 to 0,3730	No	ns

RESULTATS ET DISCUSSION

Glucantime vs. Peptide B	-0,3366	-0,8043 to 0,1311	No	ns
Glucantime vs. peptide C	-0,489	-1,028 to 0,04962	No	ns
Peptide A vs. Peptide B	-0,3444	-0,7034 to 0,01468	No	ns
Peptide A vs. peptide C	-0,4968	-0,9444 to -0,04926	Yes	*
Peptide B vs. peptide C	-0,1525	-0,6870 to 0,3820	No	ns

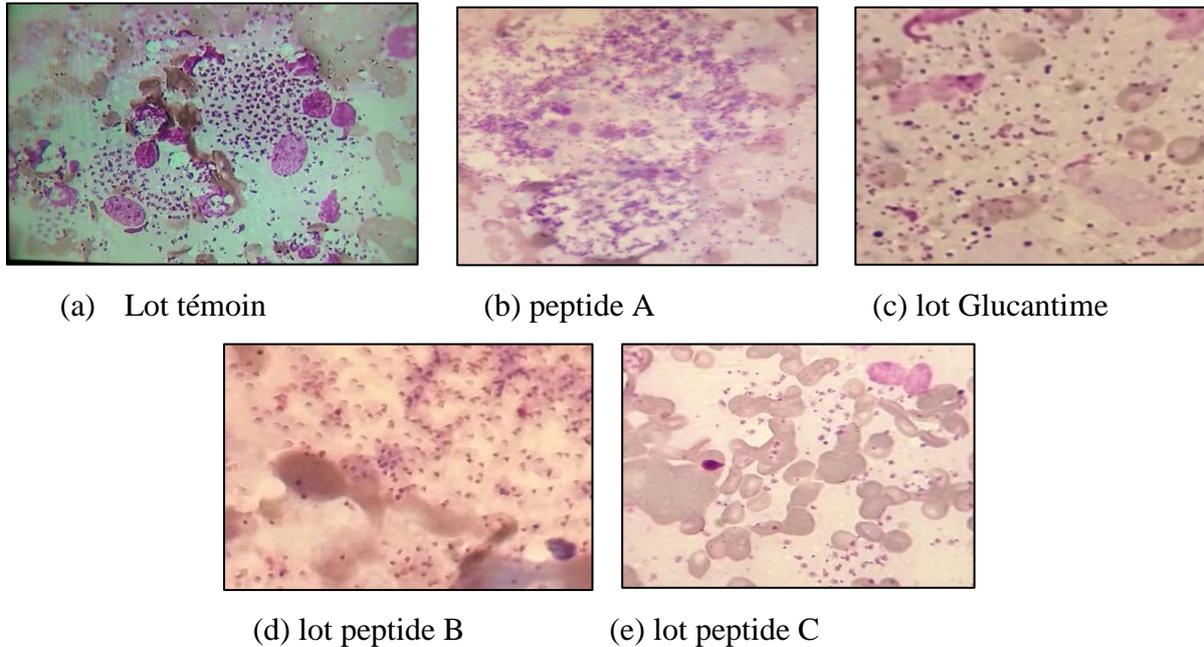


Figure 18 : Photos des frottis des oreilles infectées par *L.killicki* LIPA 281/11 à la 22^{ème} semaine Post infestation.

3.3. Evaluation de l'effet du traitement sur la dissémination des parasites

Afin de déterminer l'importance du parasitisme suite au traitement par le Glucantime et les peptides, les ganglions lymphatiques drainants du site d'inoculation, le foie et la rate, ont été prélevés à la 22^{ème} semaine pour une quantification parasitaire par qPCR.

3.3.1. Résultat de la qualité et la quantité de l'ADN extrait des organes

3.3.1.1. Sur Nanodrop

Afin d'évaluer l'efficacité des extractions par la méthode au phénol chloroforme sur les organes prélevés, les ADN extraits ont été analysés par Nanodrop afin d'évaluer et de visualiser l'intégrité et de rendement de l'ADN en utilisant la mesure DO sur un spectrophotomètre.

RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 19 montre que les concentrations des DO d'ADN total obtenu à partir du broyage des Rates est le plus important ($m = 356.9132$), suivie des ganglions ($m = 137.4124$), et en dernier, on retrouve les oreilles ($m = 43.0904$).

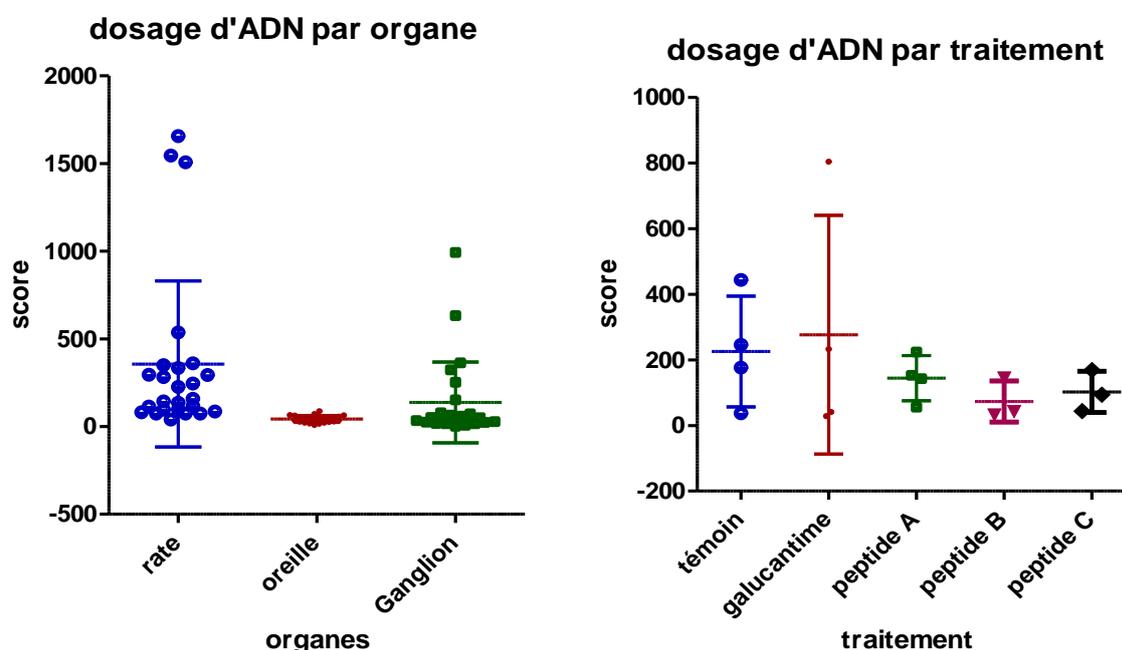


Figure 19 : résultats de la moyenne des scores des DO de l'ADN total par organe et par traitement.

L'analyse spectrophotométrique pour 260/280 a donné une moyenne < 1.8 pour les échantillons extraits de rate et de ganglion quelque soit le traitement, ceci indique que l'ADN extrait est exempt de contamination par des protéines, pour 260/230, tous les échantillons extraits des rates donnent une valeur > 2.0 (100%), indiquant une pureté d'ADN des composants organiques, les échantillons contaminés sont ceux extraits des oreilles et des ganglions.

Selon les moyennes estimées pour le degré de pureté de l'ADN, on trouve que quelle que soit l'organe source de l'échantillon, la meilleure qualité de l'ADN est obtenue par les souris extraites à partir de la rate. Suivies des ganglions. L'ADN obtenu à partir des oreilles est de mauvaise qualité puisqu'il donne des valeurs significativement plus faibles qu'attendue.

3.3.1.2. Sur gel d'agarose

Par ailleurs, l'ADN total obtenu par extraction au phénol chloroforme de différents organes a été analysé qualitativement par électrophorèse sur gel d'Agarose. Les paramètres scorés pour

RESULTATS ET DISCUSSION

l'évaluation des résultats des électrophorèses étaient la qualité de la bande d'ADN obtenue, la présence de smear et la contamination par ARN.

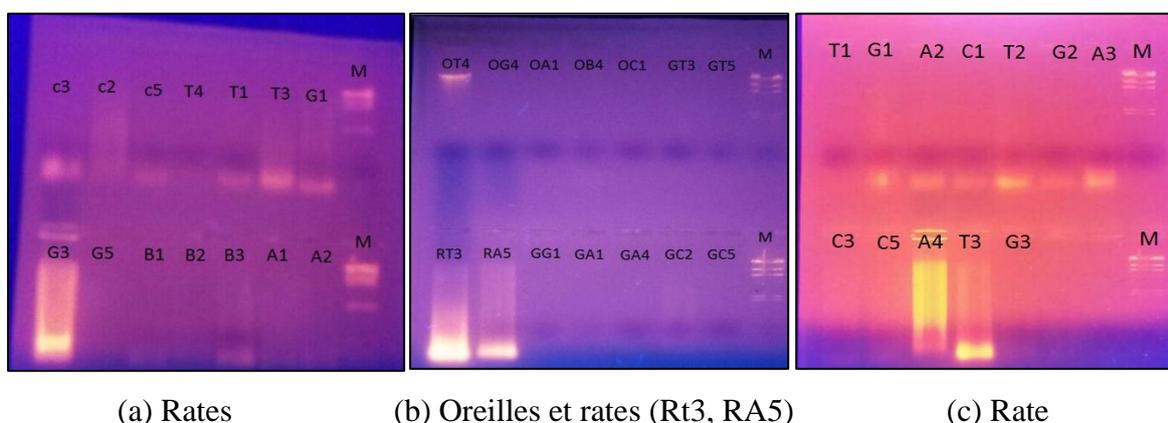


Figure 20 : Résultats des électrophorèses sur Gel d'agarose de l'ADN en fonction d'organe.

Les bandes nommés M correspondent au marqueur de poids moléculaire, Les bandes T correspondent au lot de souris non traitées, les bandes G correspondent au lot traité au Glucantime, les bandes A, B et C correspondent aux lots traités aux peptides A, B et C respectivement.

(a), la présence de l'ARN est faiblement marquée dans les échantillons C5, B3 et moyennement marquée dans les échantillons T1, G1, T3 et C3 et fortement dans l'échantillon G3, l'ARN est absent dans l'échantillon C2 avec absence d'ADN dans l'échantillon G5, B1, B2, A1 et A2. (b), l'ARN est présent dans les échantillons RT3 et RA5 uniquement. (c), L'ARN est faiblement visible dans les échantillons G1, T2 et A3, moyennement visible dans l'échantillon T3, et fortement visible dans l'échantillon A4.

3.3.3. Résultats de la PCR en temps réel

3.3.3.1. Courbe Etalon

A partir de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus pour une meilleur qualité et quantité d'ADN, nous avons fait essais de PCR en temps réel sur un témoin positif de concentration connue, afin d'établir la courbe étalon de quantification.

La quantification de l'ADN au cours d'une qPCR est basée sur la relation linéaire entre la quantité de molécules d'ADN présent dans un échantillon et le cycle de seuil CT (cycle threshold) obtenu pour cet échantillon.

RESULTATS ET DISCUSSION

Afin de déterminer la concentration d'ADN de *Leishmania* présent dans nos échantillons, nous avons établi une courbe Etalon à partir de dilutions en série d'ADN de *L. Killcki* avec des concentrations de 7.6×10^6 à $7.6 \cdot 10^2$ parasite par réaction (Tableau 9). La droite de régression a été établie à partir des Ct obtenu sur light cycler, en fonction de Logarithme des concentrations de la souche étalon (figure 21).

Tableau 9 : Résultats des Ct de l'étalon de *Leishmania Killicki*.

Ct	Concentration parasite	Log concentration
20,905	7600000	6,88081359
25,46	760000	5,88081359
27,89	76000	4,88081359
29,2	7600	3,88081359
32,385	760	2,88081359

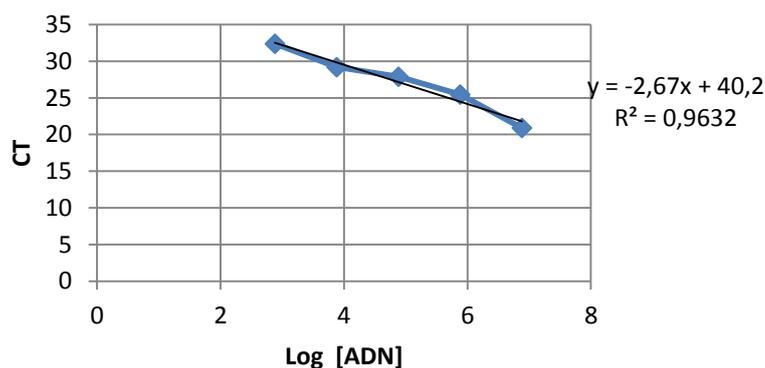


Figure21 : Droite d'étalonnage moyenne de régression Standard (de $76 \cdot 10^5$ à 760 parasites).

3.3.3.2. Quantifications de *Leishmania* dans les rates

A partir de la droite d'étalonnage standard obtenu par régression linéaire ($Y = -2.67X + 40.2$), nous avons calculé les moyennes des charges parasitaires dans les rates à partir des Ct obtenus en qPCR (figure 22).

RESULTATS ET DISCUSSION

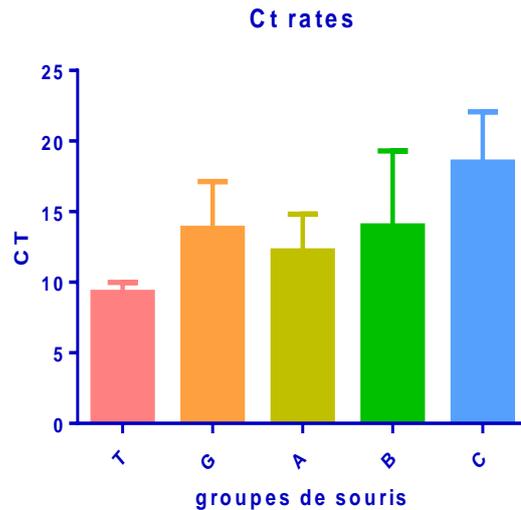


Figure 22 : Résultats des quantifications en qPCR en CT des rates en fonction de traitement.

T: témoin, **G:** Glucantime, **A:** peptide A, **B:** peptide B, **C:** peptide C.

Les concentrations d'ADN parasites obtenus ont présenté une grande variabilité pour les rates des différents lots. La figure 23 des charges parasitaires des rates en fonction des lots traitées, a montré une réduction importante de la charge parasitaire de la rate pour le peptide C. Le test ANOVA à un facteur n'a pas montré de différence significative entre les concentrations d'ADN d'organes extraits et quantifiés par qPCR, avec $P \text{ value} = 0,2225$ ($P > 0,05$).

Tableau 10 : Résultats de l'analyse statistique par test ANOVA des concentrations d'ADN obtenue par qPCR.

Dunnett's Multiple Comparison Test	q	Significant? P < 0,05?	Summary
témoin vs glucantime	1,071	No	Ns
témoin vs peptide A	0,6918	No	Ns
témoin vs peptide B	0,1426	No	Ns
témoin vs peptide C	2,173	No	Ns

RESULTATS ET DISCUSSION

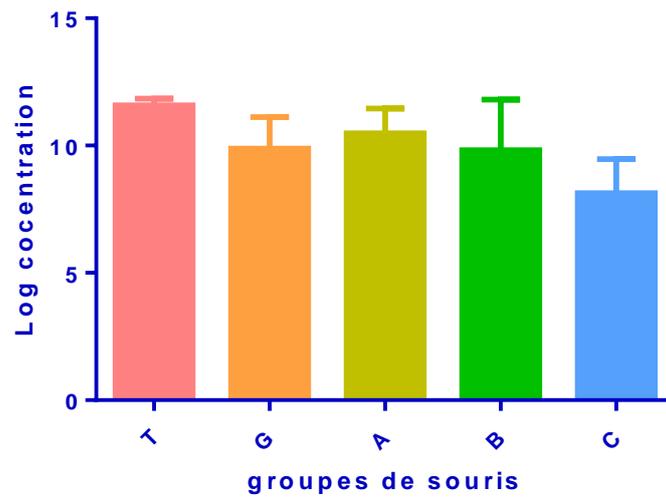


Figure 23 : les valeurs des charges parasitaires dans les rates en fonction de traitement.

T: témoin, **G:** Glucantime, **A:** peptide A, **B:** peptide B, **C:** peptide C.

RESULTATS ET DISCUSSION

Discussion

Dans ce travail, nous avons testé *in vivo*, l'activité de trois temporines possédant une activité antileishmanienne et antimicrobienne *in vitro* (Abassi *et al.*, 2013). Le modèle animal utilisé est la souris les BALB/c infectée par *Leishmania killicki*: parasite responsable de la LC et récemment détecté en Algérie (Harrat *et al.*, 2009). Cette espèce a permis de mettre au point un modèle d'infection chronique de la LC sur la souris BALB/c (Eddaikra *et al.*, 2016).

Avant d'étudier les effets thérapeutiques de ces molécules, l'activité cytotoxique des concentrations utilisées, a été évaluée en premier sur les BALB/c.

Par la suite, nous avons aussi suivi la diffusion du parasite avant et après traitement par les temporines et par le Glucantime®. Après administration intradermique de 10^3 promastigotes métacycliques de *L. killicki* dans l'oreille, la présence du parasite et de leur charge ont été estimées dans le site d'inoculation, dans les ganglions lymphatiques drainant et la rate.

Le derme de l'oreille a été choisi comme site d'inoculation, car en plus d'être un site de Transmission commun dans les réservoirs de rongeurs, il offre l'avantage que tous les événements dynamiques qui se produisent sur le site de l'infection ainsi que dans les Compartiments interconnectés de l'épiderme et des ganglions lymphatiques peuvent être facilement monitorés (BELKAID *et al.*, 1998 ; BELKAID *et al.*, 2000).

En premier lieu les souris ont été infestées à l'intradermique oreille par *L. killicki* (LIPA281/11), qui a reproduit une lésion cutanée dans le derme de l'oreille. Des Lésions localisées qui ne guérissent pas spontanément ont été obtenues dès la 5^{ème} semaine post infestation, Avec un prolongement continu de l'induration et de la lésion. Les lésions cutanées causées par *L.killicki* sont aussi appelées lésions cutanées chroniques parce qu'elles persistent pendant plusieurs années (MAUBON *et al.*, 2009 ; Eddaikra *et al.*, 2016).

Les souris infestées par *Leishmania killicki* ont été utilisées pour tester l'activité leishmanicide des temporines à la 7^{ème} semaine post infestation. Il s'agit de trois peptides de défense, produite par la peau des grenouilles rousses (Wang *et al.*, 2009 ; Abassi *et al.*, 2013).

Avant le traitement les indurations des 5 lots étaient homogènes. Des Lésions localisées qui ne guérissent pas spontanément ont été obtenues dès la 5^{ème} semaine post infestation, Avec un prolongement continu de l'induration et de la lésion.

RESULTATS ET DISCUSSION

Après traitement, c'est-à-dire de S7 à S22 un développement important et progressif des indurations a été noté pour le lot témoin négatif et le lot traité au Peptide A. Par contre, des valeurs beaucoup moins importantes pour les lots traitées aux temporines ont été obtenues. Cela signifie que les peptides (B et C) ont contribué à diminuer le développement des indurations et qu'ils ont un effet hautement significatif ($p= 0.001$) sur le développement des lésions. Et paradoxalement, le peptide A qui possède un effet antileishmanien *in vitro* (Abassi *et al.*, 2013), n'a pas montré de significativité sur les indurations en comparaison avec le témoin.

L'effet des traitements sur le phénotype interne de l'infection par *L. killicki* a été exploré à la 22^{ème} semaine. Afin de révéler l'hépatosplénomégalie, les organes extraits (Rate, Foie), ont été pesés. L'analyse des poids a montré une différence très significative avec une P value de 0.01 entre le poids des foies du groupe de souris traitée au peptide B et les autres lots. Ce qui signifie que le peptide B a un effet sur le foie, donc il contribue à diminuer la parasitémie dans le foie.

Les moyennes des charges parasitaires au site d'inoculation étaient moins importantes pour les groupes de souris traitées aux temporines par rapport au groupe des souris non traitées. Ces dernières ont montré une forte charge parasitaire au niveau du site d'inoculation. Nos résultats confortent l'activité retrouvée *in vitro* (Abassi *et al.*, 2013). Les 03 peptides ont un effet sur la diminution de la parasitémie au niveau du site d'inoculation par *L. killicki*.

Le traitement (Glucantime, peptide B, peptide C) des souris infectées par *L. killicki* a eu comme effet, une réduction de l'épaisseur de l'induration, associée à une diminution drastique de la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation contrairement aux souris témoins. Une bonne corrélation a été observée entre le diamètre des lésions et la charge parasitaire ce qui nous a permis de démontrer que la taille des indurations est un facteur révélateur de la charge parasitaire. Ces résultats s'accordent bien avec les travaux de BELKAID *et al.*, (2002).

Pour l'évaluation de l'effet des traitements par les temporines et Glucantime® sur la dissémination des parasites, nous avons extrait les ADN des rates, foies et ganglions lymphatiques, et nous avons quantifié l'ADN parasitaire par qPCR.

Selon les moyennes estimées pour le degré de pureté de l'ADN, on trouve que quelle que soit l'organe source de l'échantillon, la meilleure qualité de l'ADN est obtenue par les souris extraites à partir de la rate. Suivies des ganglions. L'ADN obtenu à partir des oreilles est de mauvaise qualité puisqu'il donne des valeurs significativement plus faibles qu'attendue.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des ADN extrait par phénol chloroforme sur gel d'agarose a donné une mauvaise qualité de la bande d'ADN obtenue et à montré une contamination par ARN, cela est due soit à un mauvais broyage ou à une contamination par le sang.

Les résultats des PCR en temps réel, ont permis grâce à la courbe étalon de calculer les concentrations parasitaires à partir des CT.

Les moyennes de la charge parasitaire calculée à partir des CT obtenue en qPCR pour les ADN extrait à partir des rates des différents lots de souris ont montré une grande variabilité, une réduction importante de la charge parasitaire des rates du lot de souris traitées au peptide C à été observé.

Tout d'abord ces observations corroborent l'idée que les temporines ont une activité leishmanicide. Sur les trois peptides, nous avons obtenus une efficacité de deux peptides : peptide B et peptide C sur la souche LIPA 281/11. Paradoxalement, le peptide A n'a pas eu d'effet sur le phénotype externe, à savoir les indurations, mais a considérablement réduit la charge parasitaire sur le site d'inoculation.

Ces peptides ont été utilisé à petites doses, il serait intéressant d'augmenter les doses des peptides afin d'obtenir des résultats plus efficace.

Chapitre 4: Conclusion et perspective

Conclusion

La leishmaniose représente un important problème de santé publique en Algérie. Les traitements disponibles requièrent pour la plus part des administrations parentérale, sont couteux et les cas de résistance sont de plus en plus fréquent. La nécessité de trouver des molécules leishmanicide reste une priorité pour un pays comme l'Algérie.

La souris BALB/c représente un modèle expérimental pour la leishmaniose cutanée, elle est largement utilisée dans l'étude de la réponse immunitaire et le développement de nouveau médicament et vaccin. La majorité de ces études requièrent la détection et la quantification des charges parasitaires dans les organes de la souris.

Dans notre étude, nous avons testé l'évaluation de l'activité antileishmanienne de trois temporines *in vivo* chez la souris BALB/c infesté par la souche *Leishmania killicki* qui induit une forme chronique de la leishmaniose cutanée.

Cette étude a montré que les peptides de la peau de grenouille rousse possèdent une activité leishmanicide sur *Leishmania killicki* (LIPA 281/11) *in vivo*.

Les peptides (B et C) ont contribués à diminuer le développement des indurations, la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation, l'évaluation de l'hépatosplénomégalie et à diminué la dissémination des parasites dans les différentes organes. Et paradoxalement, le peptide A qui possède un effet antileishmanien *in vitro* (Abassi *et al.*, 2013), n'a pas montré de significativité en comparaison avec le témoin.

Les techniques de la culture classique et de frottis ne permettent pas une évaluation précise de cette charge parasitaire. Des alternatives plus rapides tels que la PCR en temps réel existe, mais nécessite une qualité et une quantité d'ADN approprié.

Il parait claire en vue des résultats que les temporines ouvrent des voies prometteuses en terme de traitement contre la leishmaniose, il serait intéressant d'augmenter les doses des peptides afin d'obtenir des résultats plus efficace.

Références bibliographique

Référence Bibliographique

A

Abbassi F., Zahid R., Bruno O., Elodie Gazanion., Piesse C., Sereno D., Pierre Nicolas., Foulon T., Ladram A. (2013). Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue longmembrane-damaging peptide, *Biochimie*; 388-399.

Acebey L., Julian V., Sauvain M. (2008). Ethnopharmacologie et leishmaniose en Amérique latine *Ethnopharma*, n°41.

Adel A., Boughoufalah A., Saegeerman C., de Deken R., Bouchene Z., Soukhal A., Berkven D., Boelaert M. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria an update, *Plos One*. 20;9(6): e99207.

Alvar J., Vélez ID., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Janin J., Boer MD. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7(5) : e35671.

Ashutosh, Sundar S., Goyal N., (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania* *J Med Microbiol*. 56(P12): 143-53.

AUBRY, P., 2006. Leishmanioses Actualité [en ligne] accès internet <http://medecinetropicale.free.fr/cours/leishmanioses.htm> (page consultée le 1er Février 2009).

B

BATES P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37(10):1097-106.

Belazzoug Smail. (1983). Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie) infestation naturelle de "*Psammomys obesus*" (rongeur, gerbillide) .*Bull Soc Pathol Exot* 76:p146-149.

Belazzoug Smail. (1986). Découverte d'un Merions chawi (rongeur, gerbillide) naturellement infesté par leishmania dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar chellala (Algérie) .*Bull Soc Pathol Exot* 79:p630-633.

Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Riberio J., Sacks DI. (1998). Development of natural model of cutaneous Leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*, 188, 1941-1953.

Belkaid Y., Mendez S., Lira R., Kadambi N., Milon G., Sacks D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*, 165, 969-977.

BELKAID Y., PICCIRILLO C. A., MENDEZ S. (2002). CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420, 633-7.

Référence Bibliographique

C

Cervera Elsy Nalleli Loría & Fernando José Andrade-Narváez. (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(1):1-11.

Chabasse D., Danis M., Guiguen C., et al. (2007). Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales *.Elsevier* : p480.

Conlon JM., Kolodziejek N., Nowotny. (2004). Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents, *Biochim. Biophys. Acta* 1696 1e14.

Croft SL., Sundar S., Fairlamb AH. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.*;19:111-126.

D

Dedet JP., Addadi K., Iannuzel b. (1977). Epidémiologie des leishmanioses en Algérie : la leishmaniose viscérale dans le foyer de grande Kabylie . *Bull Soc Pathol Exot* 70:p250-265.

DEDET J.P. (2009). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *EMC*, 8, 506-510.

E

Eddaikra N., Kherach Djened I., Benbetka S., Bnikhlef R., Ait-Oudhia K., Moulti-mati F., Oury B., Sereno D., Harrat Z. (2016). Development of murine infection Model with *Leishmania killicki*, responsible for cutaneous leishmaniasis in Algeria: application in pharmacology, *Biomed Res Int* 2016 2;2016:7985104. Epub 2016 Feb 2.

Eddaikra N., Ait-Oudhia K., Oury B., Farida MM., Harrat Z., Sereno D. (2017). *Leishmania* antimony resistance/susceptibility in Algerian foci. *Open J Trop Med* 1(1): 024-032.

Eddaikra N., Kherachi Djened I., Ait-Oudhia K., Bnikhlef R., Oury B., Harrat Z., Sereno D. (2018). Antimonial susceptibility and *in vivo* behavior of *Leishmania major* isolates collected in Algéria before and after treatment. *Acta Trop* 2018 Apr 24;180:7-11. Epub.2017.Dec.24.

El kartouti Abdeslam et al. (2015). Leishmaniose cutanée érysipéloïde: à propos d'une observation clinique *.Pan African Medical Journal.* ;21 :54.

H

Harrat Z., Boubidi SC., Pratlong F., Bnikhlef R., Selt B., Dedet JP., Ravel C., Belkaid M.(2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L.killicki* (Rioux, Lanotte&Pratlong 1986) in Algeria *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(7): 716- 20.

Référence Bibliographique

I

IZRI A., BENDJABALLAH A., ANDRIANTSOANIRINA V., DURAND R. (2014). Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerg Infect Dis*, 20, 502-504.

J

Jaouadi K., Depaquit J., Haouas N., Chaara D., Gorcii M., Chargui N., Dedet J.P., Pratlong F., Boubabous R., Babba H. (2012). Twenty-four new human cases of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of *Phlebotomus sergenti* in the transmission. *Acta Tropica*, 122, 276-283.

L

Lira R., Méndez S., Carrera L., Jaffe C., Nova P., and Sacks D. (1999). *Leishmania tropica* the identification and purification of métacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Exp Parasitol*, Vol, 89, no, 3, pp. 331-342.

Loeuillet et al. (2016). *Parasites & Vectors* 9:144 DOI 10.1186/s13071-016-1413-9.

M

Marty P., Pomares-Estranc., Hasseine L., Delaunay P, et al. (2009)- Actualités sur les leishmanioses en France. *Archiver de pédiatrie* 2009 :16 : p96-100.

Maubon D., Guillou C.T., Ravel C., Leccia M.T., Pelloux H. (2009). *Leishmania killicki* imported from Tunisian desert. *Emerg Infect Dis*, 15, 1864-1865.

Mullis K. (1987). Synthèse spécifique de de l'ADN *in vitro* par l'intermédiaire d'une réaction en chaîne polymérase, catalysée. *Méthods enzymol* 155 :335 à 350.

Muyombwe A. M., Oliver P. Ha-eM., G, Bergeron M Ouelette et papadopoulou B. (1998). Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J. Infect. Dis.* 177: 188-195.

N

Nicolas L., Sidjanski S., Colle J.H., Milon G. (2000). *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infect Immun*, 68, 6561-6566.

Nicolas L., Prina E., Lanq T., Milon G, (2002). Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* May; 40(5):1666-9

O

OMS. (2006). Lutte contre la leishmaniose. Rapport du secrétariat conseil exécutif cent dixhuitième session. -Geneve : OMS : 118 (4) : 1-7.

Référence Bibliographique

OMS. (2007). Lutte contre la leishmaniose. Rapport du secrétariat, soixantième assemblée mondiale de la santé. -Genève : OMS : 1-5.

P

Parvaneh H., Seyed M., Sadjjadi., Minwji., Kazemian S. (2008). caractérisation de formes cultivées amastigotes de *Leishmania major*: A Substitution for *in Vivo* studies.

S

Singh N., Mishra BB., Bajpai S., Singh RK., Tiwari VK. (2014). Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem.*;22(1):18–45.

W

Wang H., Yan X., Yu H., Hu Y., Yu Z., Zheng H., Chen Z., Zhang Z., Liu J. (2009). Isolation, characterization and molecular cloning of new antimicrobial peptides belonging to the brevinin-1 and temporin families from the skin of *Hylarana latouchii* (Anura: Ranidae), *Biochimie* 91: 540e547.

Wery M. (1995). Protozoologie médicale. De Boeck.

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. **Link:** <https://goo.gl/2mcHuH>

Liens consulté

<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003594>

<https://www.google.dz/sourceimag%2F%2Fcampaigns%2Fworld-healthFleishmaniasis>

Annexes

Annexe

Annexe 1 : Vecteur de la leishmaniose



Figure 1: Phlébotome femelle vecteur de la leishmaniose : gorgé de sang
<http://leblogdestella.over-blog.com/2017/07/le-phlebotome-un-danger-pour-l-homme.html>

Annexe 2 : Réservoir de la leishmaniose en Algérie



Figure 2 : Réservoir de la leishmaniose viscérale en Algérie : le chien
<http://www.cliniqueveterinairecalvisson.com/article-veterinaire-41-12-la-leishmaniose>



(A)



(B)

Figure 3 : Rongeurs sauvages, réservoir de la leishmaniose cutanée : *Psammomys obesus*

(A) <https://www.gettyimages.co.uk/detail/news-photo/august-2008-fette-sandrattte-fat-sand-rat-news-photo/644532885> et le *Meriones shawi* (B) <https://www.biolib.cz/en/image/id11806/>

Annexe

Annexe 3 : Cellule de Thoma :

La cellule de Thoma permet de dénombrer, dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l'objectif 40.

Principe pour le parasite *Leishmania*

On prépare d'abord notre échantillon : on centrifuge les parasites cultivés sur milieu RPMI 10S 2500t/m pendant 15 min, ensuite on récupère le culot, on prend 2 µl on ajoute 2 µl de bleu de Tripin pour colorer les parasites et 2 µl de Formol pour fixer les parasites.

On dépose, entre cellule et lamelle, une goutte de l'échantillon (1 µl), dilué compte dans le quadrillage les éléments voulus. Ensuite on applique la formule suivante :

$$\text{Nombre trouvé} \div 6 \rightarrow \times 3 \times 16 \times 10^4$$

Annexe 4 : Coloration de GIEMSA

Le GIEMSA est un colorant spécifique des chromosomes, constitué d'un mélange de deux colorants (azur de méthylène et éosine) rose violacé. Le GIEMSA permet notamment de mettre en évidence les territoires chromosomiques.

On dilue 1 ml de Giemsa dans 9 ml d'eau du robinet, ensuite on filtre le colorant avant l'utilisé.

Annexe 5 : l'électrophorèse sur gel d'agarose

1. Réactifs

- TAE 1X (Tris Acide acétique EDTA) dilué une fois (40mM Tris, 20mM acétique acide et 1m M EDTA).
- BET (Bromure d'éthidium).

2. Préparation du gel d'agarose à 0.8 %

- Peser 0.8g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après chauffage le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide, pour le refroidir met le mélange sous l'eau courante puis ajouter 6 µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne. Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

Annexe

Annexe 6: PCR

1. Principe : utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

Le processus est initié par la fixation d'amorce oligonucléotidiques (≈ 20 pb : primers), de séquences complémentaire de l'un et l'autre des brins à amplifier. Elles délimitent la longueur du fragment à amplifier

2. Réactifs

Tableau 1 : les produits du mix et leurs rôles.

Produits	rôle
Tampon	Stabiliser le PH du milieu réactionnel
dNTPs	Elongation des 2 brins d'ADN
Mgel2	Cofacteur positif de la Taq polymérase
Amorce 1	La reverse et la forward
Amorce 2	
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN
Eau distillée stérile	Dilution des réactifs à leurs concentrations optimales d'utilisation

3. PCR en temps réel

Tableau 2 : Volume des produits nécessaires pour un seul échantillon.

Mix	Volume nécessaire pour un seul échantillon (μ l)
H2O	2
Master mix	10
Primer 1	0.5
Primer 2	0.5
Sonde	2
Total du mix	15

Annexe

Annexe 7 : Le suivie hebdomadaire des souris infectées

Tableau 3: les épaisseurs des oreilles (indurations) de souris infectée pour les 7 semaines poste inoculatoire.

souris	S0 (mm)	S1 (mm)	S2 (mm)	S3 (mm)	S4 (mm)	S5 (mm)	S6 (mm)	S7 (mm)
1	0,13	0,2	0,21	0,27	0,32	0,41	0,43	0,59
2	0,16	0,15	0,26	0,32	0,3	0,39	0,45	1,18
3	0,14	0,19	0,24	0,28	0,4	0,41	0,33	0,43
4	0,18	0,16	0,16	0,38	0,35	0,29	0,24	1,23
5	0,15	0,15	0,15	0,26	0,33	0,41	0,33	1,36
6	0,13	0,14	0,2	0,3	0,34	0,42	0,32	0,41
7	0,17	0,17	0,16	0,3	0,41	0,31	0,83	1,1
8	0,18	0,2	0,15	0,22	0,39	0,36	0,53	0,71
9	0,14	0,17	0,22	0,31	0,36	0,33	0,47	1
10	0,16	0,19	0,17	0,25	0,25	0,34	0,42	1,02
11	0,15	0,2	0,22	0,29	0,4	0,35	0,81	0,4
12	0,17	0,13	0,17	0,31	0,23	0,39	0,8	1,6
13	0,15	0,15	0,16	0,25	0,3	0,33	0,23	1,09
14	0,13	0,2	0,2	0,29	0,36	0,5	0,36	0,42
15	0,18	0,19	0,23	0,31	0,4	0,41	0,45	0,53
16	0,17	0,18	0,2	0,33	0,32	0,4	0,87	0,4
17	0,15	0,17	0,2	0,29	0,4	0,36	0,94	1,34
18	0,12	0,2	0,18	0,31	0,42	0,38	0,36	0,7
19	0,18	0,19	0,27	0,33	0,42	0,31	0,36	0,56
20	0,14	0,13	0,22	0,29	0,36	0,34	0,36	1,19
21	0,15	0,19	0,14	0,25	0,32	0,37	0,29	1,26
22	0,13	0,14	0,21	0,27	0,41	0,33	0,49	0,81
23	0,18	0,17	0,16	0,35	0,4	0,38	0,42	1,22
24	0,15	0,14	0,18	0,3	0,34	0,36	0,3	0,97
25	0,16	0,19	0,23	0,27	0,34	0,34	0,4	0,99
26	0,12	0,15	0,19	0,24	0,39	0,49	0,31	1,24
27	0,17	0,18	0,28	0,33	0,23	0,41	0,28	0,88
28	0,15	0,16	0,21	0,34	0,46	0,4	0,74	0,4
29	0,17	0,18	0,16	0,27	0,39	0,34	0,34	1,19
30	0,17	0,13	0,25	0,28	0,26	0,3	0,24	0,34
31	0,15	0,2	0,21	0,29	0,43	0,39	0,66	0,3
32	0,16	0,2	0,29	0,3	0,4	0,31	0,59	0,87

Annexe

33	0,17	0,19	0,25	0,29	0,36	0,31	0,95	0,38
34	0,19	0,15	0,19	0,32	0,37	0,46	0,74	1,34
35	0,17	0,2	0,16	0,26	0,41	0,44	1,08	0,32
36	0,14	0,18	0,19	0,23	0,37	0,48	0,33	0,41
37	0,13	0,16	0,23	0,28	0,5	0,45	0,7	0,65
38	0,18	0,2	0,21	0,16	0,38	0,54	0,73	0,44
39	0,15	0,14	0,2	0,2	0,44	0,4	0,99	1,43
40	0,19	0,18	0,23	0,29	0,57	0,34	1,04	0,74
41	0,17	0,2	0,18	0,24	0,34	0,39	1,34	0,96
42	0,13	0,16	0,19	0,23	0,29	0,33	0,61	0,4
43	0,12	0,18	0,26	0,29	0,28	0,34	1,05	0,4
44	0,16	0,17	0,15	0,25	0,29	0,44	0,88	0,51
45	0,18	0,18	0,19	0,29	0,43	0,42	0,74	0,92
46	0,13	0,19	0,22	0,19	0,33	0,49	0,7	1,08
47	0,19	0,13	0,19	0,19	0,35	0,41	0,96	0,62
48	0,12	0,13	0,19	0,16	0,46	0,48	0,47	0,61

Annexe

Annexe 8: test de cytotoxicité

Tableau 4 : mesure du poids et des indurations des souris testées.

jours	jour 0		jour 2		jour 4		jour 6		jour 8	
mesure	Poids (g)	Indrt (mm)								
Peptide A	18	0,20	19	0,24	19	0,22	21	0,21	20	0,20
	18	0,18	18	0,21	19	0,20	19	0,20	20	0,18
	18	0,20	18	0,25	20	0,23	21	0,20	21	0,20
Peptide B	18	0,20	18	0,22	18	0,22	19	0,20	20	0,20
	18	0,19	18	0,23	19	0,20	20	0,20	20	0,19
	18	0,19	18	0,22	18	0,21	19	0,20	19	0,19
Peptide C	19	0,20	19	0,24	20	0,22	20	0,20	20	0,20
	18	0,19	18	0,21	19	0,21	19	0,20	19	0,19
	19	0,19	19	0,23	19	0,21	20	0,19	20	0,19

Annexe

Annexe 9: les valeurs des indurations après traitement

Tableau 5 : Valeurs des indurations des oreilles des souris infectées par *L.killicki* après traitement au Glucantime, peptide A, peptide B, peptide C jusqu'à S22.

Semaines	S8	S 9	S 10	S 11	S12	S13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18	S 19	S 20	S21	S22	
Témoïn	0,26	0,26	0,4	0,25	0,4	0,4	0,26	0,25	0,15	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,18	
	0,78	1,13	1,44	1,88	1,9	2,2	3,07	2,9	4	2,91	3,31	3,97	3,04	3,2	6,07	
	0,37	0,34	0,36	0,32	0,26	0,26	0,27	0,27	0,15	0,19	0,17	0,17	0,17	0,3	0,18	
	1,18	1,39	1,57	1,87	2,5	1,97	2,36	2,91	3,61	3,6	4,3	4,97	5,05	6,3	3,39	
	1,78	0,96	1,54	2,05	1,8	2,17	1,5	2,98	2,75	2,8	0,95	3,09	3,09	5,71	4,93	
	0,45	0,31	0,56	0,37	0,37	0,29	0,44	0,4	0,15	0,17	0,17	0,17	0,17	0,19	0,18	0,18
	0,92	1,62	1,07	0,7	1,7	2,12	2,73	3,23	2,08	2,76	2,6	2,85	4,31	5,57	0,58	
	1,17	1,52	0,92	1,1	1,22	2,27	2,55	2,2	4,02	4,07	4,87	5,83	3,13	3,78	3,48	
	0,48	0,34	0,46	0,42	0,54	0,33	0,33	0,32	0,17	0,18	0,49	0,16	0,17	0,18	0,18	
	0,87	1,5	0,62	1,26	1,34	2,15	2,16	2,81	2,28	2,8	2,93	3,36	5,3	3,25	4,19	
Glucantime	0,37	0,36	0,39	0,26	0,24	0,2	0,19	0,16	0,14	0,17	0,17	0,16	0,18	0,17	0,18	
	0,97	0,9	1,56	0,33	0,49	2,92	2,91	0,24	4,04	0,2	4,67	4,5	3,1	3,56	0,65	
	0,31	0,3	0,4	0,24	0,25	0,2	0,18	0,17	0,14	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	
	0,38	0,32	0,42	0,31	0,26	0,25	0,16	0,18	0,15	0,16	0,16	0,17	0,17	0,18	0,19	
	0,72	1,2	0,48	0,36	1,65	0,26	3,54	0,21	1,85	0,18	4,4	4,44	4,67	0,49	5,62	
	0,42	0,41	0,48	0,33	0,26	0,25	0,17	0,2	0,15	0,16	0,16	0,17	0,18	0,18	0,18	
	0,43	1,43	1,5	1,02	0,82	2,18	0,21	3,47	2,79	0,17	0,17	0,18	5,15	3,18	3,5	
	0,36	0,39	1,38	0,46	0,27	0,28	1,53	0,84	0,4	2,08	2,52	3,33	0,19	5,6	0,18	
	0,83	0,56	0,93	1,54	0,27	1,14	0,22	1,95	0,15	3,81	0,43	0,17	0,17	0,17	0,19	
	1,28	0,45	0,46	1,18	1,76	0,26	0,2	0,23	0,15	4,33	0,17	0,2	0,18	0,18	3,44	
Peptide A	1,16	1,84	1,55	1,74	2,2	3	1,03	2,9	1,98	0,3	2,21	2,98	5,11	2,5	5,2	
	1,36	0,48	0,76	2,02	2,23	0,74	2,82	3,5	0,5	4,34	5,69	6,54	4,47	0,5	2,56	
	0,48	1,46	1,47	0,79	2,06	1,13	2,52	3,36	3,5	2,79	4,17	4,89	6,32	3,95	5,42	
	1,14	1,9	2,02	2,33	2,05	2,2	0,54	0,6	3,58	3,91	5,1	3,92	0,72	2,52	4,91	
	0,71	1,51	0,6	1,86	0,93	1,14	2,53	1,05	4,5	3,85	0,5	5,27	3,59	4,51	5,05	
	0,84	0,96	1,46	2,34	2,17	3,03	3,63	3,33	1,55	5,01	3,45	0,46	5,54	5,64	2,8	
	1,25	1,36	1,27	0,74	3,25	2,47	1,31	2,31	4,15	2,81	4,1	2	2,41	5,63	4,84	
	1,11	0,73	1,42	1,23	0,79	2,92	2,75	2,51	4,15	1,87	1,44	3,42	5,49	5,38	0,59	
	0,82	1,38	2,07	2,06	1,34	2,94	3,45	1,34	3,68	3,77	3,12	4,94	3,04	4,43	4,54	
	Peptide B	1,18	1,77	1,62	1,51	1,69	2,26	2,76	2,5	0,47	0,17	2,34	3,48	4,12	4,13	4,7
0,46		0,42	0,49	0,49	0,3	0,43	0,22	0,21	0,15	0,17	0,17	0,18	0,19	0,17	0,17	
0,93		1,03	1,72	1,72	1,58	2,92	2,29	2,6	2,8	0,58	0,24	3,52	4,84	4,22	6,1	
1,55		1,33	0,89	2,31	1,98	0,62	0,38	1,87	0,15	2,25	3,68	0,54	3,09	2,49	3,41	
1,7		0,49	0,7	1,56	1,86	3,01	0,21	2	2,56	3,47	0,29	3,56	4,24	0,81	4,04	
0,55		1,5	1,64	0,51	2,17	2,8	2,2	2,2	3,41	3,5	3,56	4,01	3,44	3,39	1,01	
0,79		2,11	1,02	1,91	0,33	2,98	2,24	0,21	3,97	3,29	4,47	4	0,2	3,72	2,65	
0,95		0,73	1,2	0,71	2,04	0,46	2,36	2,82	2,76	3,35	3,3	0,19	4,31	3,82	0,19	

Annexe

	0,56	1,44	1,6	2,09	0,37	1,89	2,2	0,51	2,99	4,43	3,37	6	0,72	0,3	5,44
Peptide C	1,14	1,34	1,05	1,85	1,15	2,31	2,23	2,29	3,27	2,5	2,82	3,01	3,29	1,63	3,32
	1,01	1,03	0,34	1,76	0,33	0,38	0,18	2,62	0,15	4,56	2,8	5,1	2,32	2,23	5,17
	1,29	0,69	1,3	1,18	0,27	1,76	1,31	0,3	3,81	3,3	4,95	1,87	1,91	3,01	0,16
	0,87	1,15	0,53	1,23	2,01	0,3	0,3	3,3	0,64	2,58	0,28	2,48	3,26	4,96	2,98
	0,95	0,64	1,28	0,59	0,94	1,43	0,84	1,02	0,15	2,52	1,36	3,78	5,12	0,69	0,72
	0,48	1,27	0,9	0,95	0,26	1,86	1,77	1,2	2,2	1,23	2,58	3,2	0,65	2,75	1,79
	0,47	0,56	0,76	0,64	1,3	1,49	1,81	0,82	2,43	0,7	3,32	0,77	0,21	0,18	1,33
	0,49	1,56	0,41	0,8	1,48	0,25	3,26	1,92	1,91	0,17	0,67	0,2	3,48	2,3	3,19
	0,37	0,38	0,32	0,53	0,26	0,26	0,29	0,17	0,15	0,17	0,16	0,17	0,17	0,17	0,14