

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES POPULATION ET DES ORGANISMES



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de

Master : EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCE BIOLOGIQUE

Option : parasitologie

Laboratoire de biotechnologie, Environnement et santé

THEME

**ETUDE DE LA VARIABILITE BIOCHIMIQUE ET
MOLECULAIRE DE LEISHMANIA DANS LES FOYERS DE
BISKRA ET M'SILA**

Présenté par :

soutenu le : 28/06/2018

Mlle : FEDDAK AMINA

Mlle : KASKAS NARIMANE

Devant le jury :

Mme. MAKHLOUF C

MAA

USDB1

PRESIDENTE

Mme. ADEL

MCB

ISV.USDB1

EXAMINATRICE

Mme. BENIKHLEF R

Chargé d'étude

IPA

PROMOTRICE

Mme.TAIL G

Professeur

USDB1

CO-PROMOTRICE

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

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

*En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mme **Benikhlef Razika** pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et son assistance moral durant toute la période du travail.*

Sincèrement vous nous faites l'honneur d'être notre encadreur.

*Nos remerciements s'adressent également à notre Co-encadreur Mme **Tail Ghania** pour ses précieux conseils, sa sympathie et son aide.*

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

*Un grand merci à **Dr Harrat Zoubir** chef de service du Centre National de Référence de Leishmania de l'Institut Pasteur d'Algérie qui nous as ouvert ses portes et de nous donner toutes les facilités et de nous avoir accepté pour passer la période du stage dans son service.*

*Nous tenons à remercier spécialement Mme **Kherachi Ihcen** notre mère de la génétique qui as veillé sans relâche de nous transmettre le savoir durant tout notre cursus.*

*Nous remercions particulièrement et profondément tout le personnel de L'Institut pasteur d'Alger Spécialement l'équipe du Centre National de Référence de Leishmania de l'Institut Pasteur d'Algérie, **Mme Bencherif Souad, Mme Edaikra Naouel, Chebli Adlen, Garni Rafik, Ben allel kamel.***

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail

A mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon frère Youcef et mes sœurs : Souhila, Nezha et Dalal qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A ma famille : mes gendres Djamel et Aziz. Mon oncle Laid, sa femme Oum El Khir et leurs enfants : Fatiha, yousra, Kaouther et Mohamed. Mon cousin Farhat et mes cousines : Saïda, Ikram et Ahlem. Mes neveux et nièces : Oumaima, Abdallah, Nou El Houda, Ayoub, Yassine et la petite Serina.

Cette famille qui me donne de l'amour et la vivacité.

A mes amies : Houda, Amina, Fatfat, Zahia, Imane, Asma et Amina skikda qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que J'aime.

Amina

Merci

Je dédie ce travail

À MES CHERS PARENTS Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon très cher frère Nassim tu m'as toujours aidé par ton soutien tes encouragements et ton aide pratique ...j'avoue vraiment que si je suis arrivé à être là c'est grâce à toi à ton aide et à ton amour

A ma chère famille je remercie mon oncle Ribouh qui a été toujours au petit soin avec moi, ma tante Zehou mes oncles paternels et maternels, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère

A mes chères copines Assia, Khadidja, Hanane et Amel zerouki en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Liste des Abréviations

ARN : acide ribonucléique

DNA : Acide désoxyribonucléique

DO : Densité optique

EDTA : Ethylène diamine tétracétique acide

LC : Leishmaniose cutanée

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse

LCM : Leishmaniose cutanée muqueuse

LEM : Laboratoire d'écologie médical

LIPA : Laboratoire de l'institut pasteur d'Algérie

LV : Leishmaniose viscérale

MLMT : Multilocus microsatellite typing

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MON : Montpellier

NNN : Novy Nicole MC Neal

OMS : Organisation mondial de sante

PCR: polymerase chain reaction

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

RPMI : Roswell park memorial institut

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 01 : Génome de <i>L.major</i> , <i>L.infantum</i> et <i>L.braziliensis</i> | 6 |
| Tableau 02 : Code OMS des souches de <i>Leishmania</i> étudiées..... | 17 |
| Tableau 03 : Zymodème des souches marqueurs utilisées..... | 18 |
| Tableau 04 : Les systèmes enzymatiques révélés et leurs solutions tampon adéquate..... | 23 |
| Tableau 5 : Composition du Master Mix pour PCR-ITS1..... | 28 |
| Tableau 6 : le comportement des souches sur les milieux de cultures..... | 32 |
| Tableau7 : Le profil enzymatique des 26 souches étudiées appartenant aux complexe <i>L.major</i> | 33 |
| Tableau 8: la concentration d'ADN (ng/ml) des souches (* : souches marqueurs)..... | 39 |

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01: Forme amastigote au microscope optique GX25..... | 4 |
| Figure 02: Forme amastigote au microscope..... | 4 |
| Figure 03: Le Phlébotome, vecteur de la leishmaniose..... | 7 |
| Figure 04: le cycle évolutif de la leishmaniose(Cantacessi et <i>al.</i> ,2018)..... | 8 |
| Figures 05: les différentes formes de leishmanioses..... | 10 |
| Figure 06: Distribution mondiale de leishmaniose..... | 11 |
| Figure 07: Distribution de la leishmaniose cutanée et viscérale en Algérie. | 13 |
| Figure 08: cycle de Krebs..... | 15 |
| Figure 09: voie des pentoses phosphate | 15 |
| Figure 10: Gène codant pour l'ARNr de la <i>L. major</i> (Gert et <i>al.</i> ,2016)..... | 17 |
| Figure 11 : Cartographie des fragments hsp70 utilisés dans différentes études dans la région de codage complète du gène hsp70 | 17 |
| Figure 12 : Localisation des deux zones d'études (Wilaya de M'sila et Biskra)..... | 19 |
| Figure 13 : Repiquage et récolte des parasites..... | 21 |
| Figure 14 : les différentes étapes de l'électrophorèse sur gel épais d'amidon..... | 26 |
| Figure 16: la région ITS1 (Internal transcribed spacer 1)..... | 28 |
| Figure 17: les Etapes de la PCR..... | 31 |
| Figure 18: Les différentes étapes de la digestion enzymatique (HaeIII) des produits PCR..... | 32 |

Table des matières

Résumé

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| I. Historique..... | 3 |
| II. Epidémiologie..... | 3 |
| 1. Définition..... | 3 |
| 2. Biologie du parasite..... | 3 |
| 2.1. Morphologie du parasite..... | 3 |
| 2.2. Classification..... | 4 |
| 2.3. Les critères de classification..... | 4 |
| 2.4. Le génome de <i>Leishmania</i> | 5 |
| 2.5. Le vecteur | 6 |
| 2.6. Le cycle évolutif..... | 7 |
| 2.7. La reproduction | 8 |
| 2.8. Le mode de transmission..... | 8 |
| 3. Formes clinique..... | 8 |
| 3.1 La leishmaniose viscérale (LV) | 8 |
| 3.2. La leishmaniose cutanée (LC)..... | 8 |
| 3.3. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)..... | 8 |
| 3.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)..... | 8 |
| 3.5. La leishmaniose cutanée localisée (LCL) | 9 |
| 4. Répartition géographique | 9 |
| 5. Les leishmanioses en Algérie..... | 10 |
| 5.1. La Leishmaniose Viscérale | 10 |
| 5.2. La Leishmaniose Cutanée | 11 |
| 5.2.1. La Leishmaniose Cutanée du nord (sporadique)..... | 11 |
| 5.2.2. La Leishmaniose cutanée chronique | 11 |
| 5.2.3. La Leishmaniose Cutanée zoonotique | 11 |
| III. . Apport des études biochimiques et moléculaire dans l'identification des <i>Leishmania</i> | 12 |
| 1. Les études biochimiques : «les enzymes | |

| | |
|---|----|
| 1. Les études biochimiques : «des enzymes»..... | 12 |
| 1. Les déshydrogénases | 13 |
| 2. Les transférases | 13 |
| 3. Les isomérases | 13 |
| 4. Les lyases | 13 |
| 2. Les études moléculaires..... | 15 |
| | |
| Materiel et Methode | |
| I. MATERIELS..... | 17 |
| 1. Matériels Non biologique..... | 17 |
| 2. MATERIELS BIOLOGIQUE..... | 17 |
| 2.1. Souc..... | 17 |
| 2.2. Milieux de cultures Méthodologie..... | 19 |
| II. Méthodologie..... | 19 |
| 1. Culture des parasites..... | 19 |
| 1.1. La décongélation des souches | 19 |
| 1.2. Repiquage et culture en masse..... | 19 |
| 2. Préparation des extraits protéiques parasite : « Etude biochimique » | 19 |
| 2.1. Culture en masse..... | 19 |
| 2.2. La récolte | 19 |
| 2.3. Lyse cellulaire par congélation-décongélation..... | 20 |
| 2.4. Confection des perles..... | 20 |
| 3. Préparation de l'ADN parasite : « Etude moléculaire »..... | 21 |
| 3.1. Extraction d'ADN par phénol chloroforme alcool isoamylique..... | 21 |
| 3.1.1. La lyse..... | 21 |
| 3.1.2. Extraction d'ADN par phénol chloroforme alcool isoamylique..... | 21 |
| 3.1.3. Précipitation..... | 21 |
| 4. Etude Biochimique : « Electrophorèse sur gel épais d'amidon » | 22 |
| 4.1. Principe | 22 |
| 4.2. Mopérateur..... | 22 |
| 4.2.1. Systèmes enzymatiques | 22 |
| 4.2.2. Préparation des solutions tampons..... | 22 |
| 4.2.3. Préparation du gel d'amidon..... | 23 |
| 4.2.4. Introduction des extraits protéiques dans le gel..... | 23 |
| 4.2.5. La migration électrophorétique | 23 |
| 4.2.6. Préparation des solutions de révélation..... | 24 |
| 4.2.7. La révélation enzymatique..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.2.8. Lectures des zymogrammes | |
| 5. Etude moléculaire : « Polymérase Chain Réaction RFLP » | 25 |
| 5.1. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques par spectrophotométrie | 25 |
| 5.2. La PCR (<i>Polymérase Chain Réaction</i>) | 25 |
| 5.2.1. Principe | 26 |
| 5.2.2. Mode opératoire | 27 |
| 5.3. PCR-RFLP (<i>Polymérase Chain Réaction RFLP</i>) | 30 |
| 5.3.1. Principe | 30 |
| 5.3.2. Mode opératoire | 31 |

Resultat

| | |
|--|----|
| I. Culture des parasites dans les milieux de cultures | 32 |
| II. <i>Etude Biochimique : « Electrophorèse sur gel épais d'amidon »</i> | 33 |
| III. <i>Etude moléculaire : « Polymérase Chain Réaction RFLP »</i> | 39 |
| 1. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques par spectrophotométrie | 39 |
| 2. Evaluation de la qualité de l'ADN total sur gel d'agarose | 40 |
| 3. Polymérase Chain Réaction « PCR » | 40 |
| 3.1. Evaluation de la qualité des amplicons (qualité de la PCR ITS1) | 40 |
| 3.2. PCR RFLP ITS1 | 41 |
| 3.3. PCR HSP70 et PCR RFLP HSP70 | 42 |
| Discussion | 43 |
| Conclusion | 46 |

Références

Annexes

Résumé

En Algérie, les leishmanioses constituent un réel problème de santé publique. La leishmaniose cutanée sévit à l'état endémo-épidémique dans les régions arides et sahariennes. Biskra et M'sila sont considérés comme les plus grands foyers de LCZ. Ils constituent à eux seuls près de 80 % des cas déclarés de LC dans notre pays.

Les souches de *Leishmania* isolées chez des patients atteints de LC de la région de M'sila (10 souches) et Biskra (16 souches) ont été identifiées et caractérisées par deux outils complémentaires ; un outil biochimique basé sur la technique MLEE et un outil moléculaire basé sur la PCR RFLP ITS1.

A travers cette étude, les deux approches ont confirmé la prédominance de *Leishmania major* MON-25 aussi bien à Biskra qu'à M'sila. Cependant deux nouveaux zymodèmes ont été détectés pour la première fois par la MLEE dans les deux zones d'études. L'utilisation de la PCR RFLP d'un seul marqueur ITS1 et une seule enzyme HaeIII n'étaient pas suffisante pour vérifier la diversité génétique au sein du complexe *L.major*. D'autres approches moléculaires tels que le HSP70, MLMT et MLST pourront évaluer la variabilité génétique de ces deux nouveaux zymodèmes et chez d'autres espèces de *Leishmania*.

Mot Clé: Leishmaniose cutané, *Leishmania major* MON-25, MLEE, PCR RFLP-ITS1, M'sila, Biskra.

Summary

In Algeria, leishmaniasis is a real public health problem. Cutaneous leishmaniasis is endemic and epidemic in arid and Saharan regions. Biskra and M'sila are considered to be the largest LCZ outbreaks. They alone account for nearly 80% of the reported cases of CL in our country.

Leishmania strains isolated from CL patients in the M'sila region (10 strains) and Biskra (16 strains) were identified and characterized by two complementary tools; a biochemical tool based on the MLEE technique and a molecular tool based on the PCR RFLP ITS1.

Through this study, both approaches confirmed the predominance of *Leishmania major* MON-25 in Biskra and M'sila. However, two new zymodemes were detected for the first time by the MLEE in the two study areas. The use of PCR RFLP of a single ITS1 marker and a single HaeIII enzyme was not sufficient to verify genetic diversity within the *L.major* complex. Other molecular approaches such as HSP70, MLMT and MLST will be able to assess the genetic variability of these two new zymodemes and other *Leishmania* species.

Summary

Key words: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania major* MON-25, MLEE, PCR RFLP-ITS1, M'Sila, Biskra.

المخلص

في الجزائر يعد داء الليشمانيا مشكلة صحية عامة، داء الليشمانيا متوطن ووبائي في المناطق القاحلة والصحراوية، تعتبر بسكرة ومسيلة أكبر الفاشيات من الحالات المبلغ عنها، هم وحدهم يمثلون ما يقارب 80% من الحالات المبلغ عنها من الليشمانيا الجلدي في بلدنا. تم التعرف على السلالات المعزولة من مرضى الليشمانيا الجلدي في منطقة المسيلة (10 سلالات) وبسكرة (16 سلالة) وتتميز بالآيتين تكمليتين تعتمد على تقنية MLEE وأداة جزيئية تعتمد على PCR RFLP ITS1 من خلال هذه الدراسة كلا النهجين يؤكد الهيمنة للليشمانيا الرئيسية MON-25 في كل من بسكرة و مسيلة و لكن اثنين من Zymodeme تم اكتشافها للمرة الأولى عن طريق تقنية MLEE في المنطقتين المدروستين، استعمال تقنية PCR RFLP ITS1 والأنزيم الوحيد Hae III لم تكن كافية للتحقق من التنوع الوراثي داخل مجمع الليشمانيا الرئيسي. نهج جزيئية أخرى مثل HSP70 و MLMT و MLST قادرة على تقييم التنوع الجيني لهذين النوعين من الأنواع الجديدة لكل من Zymodeme و الليشمانيا.

الكلمات المفتاحية: الليشمانيا الجلدية, الليشمانيا الرئيسية MON-25, MLEE, PCR RFLP ITS1, بسكرة, مسيلة

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à l'infection de l'homme et d'autres mammifères par un protozoaire flagellé, du genre *Leishmania*. Ce parasite est transmis dans la nature par piqûre d'un arthropode vecteur ; le phlébotome femelle (Fraga *et al.*, 2000).

Diverses formes de manifestations cliniques de la leishmaniose humaine ont été décrites : la leishmaniose viscérale (LV), La leishmaniose cutanée localisée (LCL), la leishmaniose diffuse (LCD) et la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) (Fraga *et al.*, 2000 ; Akhoundi *et al.*, 2016). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays tout au long de l'Amérique latine, l'Afrique, l'Asie et l'Europe du sud. 350 millions d'individus sont exposés au risque d'infestation avec une prévalence de 12 millions de personnes par an. L'incidence annuelle estimée est de 0,7 à 1,2 million de cas de LC et 0,2 à 0,4 million de cas de LV (WHO, 2015).

Les leishmanioses constituent en Algérie un réel problème de santé publique. Notre pays est concerné aussi bien par la leishmaniose cutanée (LC) que par la leishmaniose viscérale (LV). La plupart des cas notifiés par LC provenaient des départements de Batna, Biskra et M'Sila. Plusieurs pics de LC ont eu lieu au cours des 30 dernières années, à savoir 1983, 1986, 1997, 2005 et 2010. Le plus grand nombre de cas a été enregistré en 2005, ou plus de 30 000 cas de LC ont été enregistrés (Edaikra *et al.*, 2018).

Depuis la première description du genre *Leishmania* (Ross *et al.*, 1903), les méthodes de classification du parasite ont considérablement évolué. En effet, entre 1916 et 1987, La taxonomie de *Leishmania* a suivi le système de classification de Linnaean, principalement basé sur des caractéristiques extrinsèques, telles que les manifestations cliniques, la distribution géographique, les cycles épidémiologiques et le comportement chez les phlébotomes (Safjanova *et al.*, 1987).

Actuellement, l'approche taxonomique numérique basée sur l'analyse des isoenzymes est considérée comme technique de référence dans la classification du genre *Leishmania* et est couramment utilisée pour les mises à jour de classification et pour les études épidémiologiques (Pratlong *et al.*, 2009).

Depuis l'introduction de la MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) en 1980 (Rioux *et al.*, 1990). La répartition géographique et les caractéristiques épidémiologiques des leishmanioses ont été bien déterminées (Pratlong *et al.*, 2009). La MLEE est une technique de classification biochimique qui a largement contribué à la construction d'une taxonomie globale des *Leishmania* (Pratlong *et al.*, 2009).

Par ailleurs, en raison de la complexité du genre *Leishmania* et la non disponibilité de la MLEE dans tous les laboratoires, d'autres approches moléculaires basées sur l'ADN de *Leishmania* ont été utilisées pour les études phénotiques et phylogénétiques. Depuis les années 90 plusieurs techniques moléculaires ont été étudiées comme, le séquençage de fragments

générés par PCR (PCR-sequencing) (Van Eys *et al.*, 1992), PCR nichée (Noyes *et al.*, 1998), le typage de séquence multilocus (MLST) (Mauricio *et al.*, 2006), le typage de microsatellite multilocus (MLMT) (Oddone *et al.*, 2009) et l'analyse du polymorphisme de longueur de fragment de restriction de fragments PCR amplifiés (PCR-RFLP) (Haouas *et al.*, 2010).

Dans cette optique, afin d'étudier la diversité biochimique et génétique des souches de *Leishmania*, deux techniques d'identification ont été utilisées : la MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) et la PCR-RFLP ITS1 (Polymérase Chain Réaction-du polymorphisme de longueur de fragment de restriction ciblant l'amorce ITS1).

Les souches typées ont été isolées de patients atteints de LC de deux anciens foyers de LC en Algérie, à savoir M'sila et Biskra.

D'autres objectifs secondaires ont été ciblés :

- Reproduire et répétabilité les techniques d'extraction des extraits protéiques
- Reproduire et répétabilité les techniques d'extraction de l'ADN
- Reproduire et répétabilité l'utilisation de la technique de l'électrophorèse des iso-enzymes sur gel épais d'amidon.
- Reproduire et répétabilité l'utilisation de la technique de PCR-RFLP.
- Déterminer le profil électrophorétique biochimique et génétique chez les souches de LC.

Ce mémoire traitera dans une première partie des généralités sur les leishmanioses. Dans la seconde partie, nous traiterons les différentes enzymes utilisées dans la caractérisation biochimique de *Leishmania*. Dans la troisième partie nous aborderons les différents marqueurs moléculaires utilisés dans le typage moléculaire des *Leishmania*. Enfin dans les deux dernières parties, nous présenteront les résultats de l'étude de la diversité biochimique et génétique chez des souches isolées de LC.

Synthèse bibliographique

I. Historique

La première description clinique de la leishmaniose est celle de Mc Naught en 1882 et Cunningham en 1885 (Belazzoug *et al.*, 1982).

En 1901, Sir William Leishman observa des petites cellules dans le foie d'un soldat atteint de Kala-azar. Il publia sa découverte en 1903, il s'agissait des formes amastigotes de *Leishmania donovani*. La même année, Sir Donovan découvrit le même parasite chez un patient souffrant de fièvre et d'un grossissement du foie.

En 1908, Charle Nicolle fut le premier à démontrer le caractère zoonotique (Dedet, 1999).

En 1920 le rôle d'insecte vecteur du phlébotome fut démontré expérimentalement par Adler (Belazzoug *et al.*, 1982).

En 1921 le rôle vecteur des phlébotomes est découvert, grâce aux travaux des frères Sargent à l'Institut Pasteur d'Algérie (Harrat *et al.*, 1995).

La transmission à l'Homme par l'intermédiaire du phlébotome n'a été établie qu'en 1926 par Parrot et Donatie (Akhoundi *et al.*, 2016).

II. Epidémiologie

1. Définition

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par des protozoaires du genre *Leishmania*, qui comporte de nombreuses espèces communes à l'homme et à certains animaux. Elles sont transmises par la pique de la femelle d'un petit moucheron appelé phlébotome. (Dedet, 2009).

2. Biologie du parasite

2.1. Morphologie du parasite

Les leishmanies se présentent sous 2 formes :

- **La forme amastigote** : immobile, intracellulaires dans les cellules macrophagiques du système des phagocytes mononuclées chez les vertébrés (Acebey *et al.*, 2008). Elle apparaît comme une capsule ovoïde de 2 à 5µm de diamètre avec un noyau et un kinétoplaste (Figure 1).
- **La forme promastigote** : mobile, se trouve dans le tube digestif du vecteur et dans le milieu de culture (Acebey *et al.*, 2008). Elle est allongée, de 20µm de longueur, et munie d'un noyau central, un kinétoplaste et un flagelle antérieur libre qui lui permet de se déplacer (Figure 2).

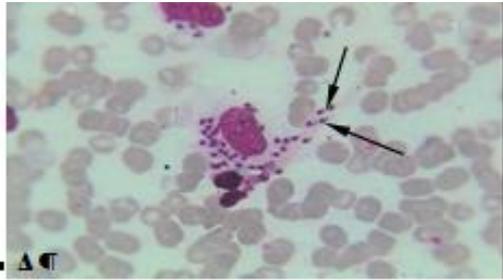


Figure1 : Forme amastigote au microscope optique GX25(IPA)



Figure 2 : Forme promastigote au microscope optique GX25 (IPA)

2.2. Classification

Les parasites *Leishmania* appartiennent (Akhoundi *et al.*, 2016) au :

- Règne : Protista (Haeckel, 1866),
- Classe : Kinetoplastea (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976),
- Sous classe Metakinetoplastina (Vickerman, 2004),
- Ordre Trypanosomatida (Kent, 1880),
- Famille Trypanosomatidae (Döflein, 1901),
- Sous famille : Leishmaniinae (Maslov and Lukeš 2012),
- Genre : *Leishmania* (Ross, 1903), (Annexe4).

2.3. Les critères de classification

Les premières tentatives de classification de *Leishmania* furent des classifications linnéennes proposées entre 1916 et 1961, basées uniquement sur des caractères extrinsèques (Aspect clinique, morphologie du parasite, le pouvoir pathogène expérimental, l'adaptation aux milieux de culture, le cycle intra-vectoriel et le comportement du parasite chez l'animal de laboratoire).

Une classification précoce de *Leishmania* a été suggérée par Nicolle en 1908, qui a séparé *L. infantum*, agent étiologique de la leishmaniose viscérale méditerranéenne, de *L. donovani*, agent causal du kala-azar indien (Akhoundi *et al.*, 2016).

En 1964, Adler a discuté des difficultés d'accepter une taxonomie basée sur la clinique, car la leishmaniose peut présenter les mêmes symptômes cliniques mais par deux espèces de *Leishmania* différentes, par exemple, la leishmaniose viscérale avec symptômes cutanés.

En 1979, Lainson et ses collègues ont décrit trois sections de *Leishmania*, selon le développement intra-vectoriel du parasite : Hypopylaria, Peripylaria, et Suprapylaria.

En 1982, le chercheur russe Safjanova a proposé la séparation de *Leishmania* infectant des lézards des autres espèces de *Leishmania* qui infectent des mammifères, et elle a proposé le nom *Sauro-Leishmania* pour ces espèces (Akhoundi *et al.*, 2016)

Au début des années 1970, les caractéristiques intrinsèques (immunologiques, biochimiques et moléculaires) de *Leishmania* ont été identifiées et utilisées pour développer de nouveaux systèmes de classification. L'électrophorèse des isoenzymes, développée dans les années 1970, a été largement utilisée comme système de typage et a été acceptée pendant des décennies comme l'étalon-or pour l'identification et reste un outil précieux en tant que technique de référence pour la caractérisation des parasites (Gert *et al.*, 2014), (annexe 1).

Récemment, une nouvelle classification pour *Leishmania* a été proposée sur la base de données moléculaires combinées, excellent par leur pouvoir résolutif (séquençage et étude des caryotypes, polymorphisme des fragments de restriction, sondes d'ADN nucléaires et kinétoplastiques, amplification de l'ADN par amorces aléatoires ou Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), qui divisent les espèces de *Leishmania* en deux lignées phylogénétiques principales appelées sections *Euleishmania* et *Paraleishmania*. La section *Euleishmania* comprend quatre sous-genres : *Leishmania* (souche type : *L. donovani*), *Viannia* (souche type : *L. braziliensis*), *Sauroleishmania* (souche type : *L. tarentolae*) et complexe *L. enriettii* (souche type : *L. enriettii*). La section *Paraleishmania* comprend *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* et *L. colombiensis* ainsi que l'ancien genre *Endotrypanum*. De ce groupe, seul *L. colombiensis* a été trouvé pathogène pour l'homme (Akhoundi *et al.*, 2016).

Ainsi, les données moléculaires basées sur des séquences de différentes cibles ne supportent pas le concept de complexes d'espèces présenté par Lainson et Shaw, et la classification devrait être révisée, incluant la suppression de plusieurs espèces et le déclassement de certaines espèces. Le séquençage complet du génome ainsi que des analyses complémentaires par MLST (annexe 2) et MLMT contribueront à de nouvelles améliorations de la classification du genre *Leishmania* (Gert *et al.*, 2014).

2.4. Le génome de *Leishmania*

Le génome de *Leishmania* se trouve dans le noyau, qui contient l'ADN nucléaire et de l'ADN kinétoplastique.

L'ADN nucléaire est très riches en C/G (cytosine/ guanine). Il présente de longues séries de groupements de gènes polycistroniques, et l'absence presque totale d'introns (Sigrid *et al.*, 2011). Il est formé de 36 chromosomes pour les espèces de l'ancien monde et de 34 à 35 pour les espèces du nouveau monde (Cantacessi *et al.*, 2015).

La taille du génome est environ 35 Mégabases (MB). La densité du gène est de 1 gène pour 3,5 Kb et on estime à 8000 le nombre total de gènes. (Tableau 1).

Tableau 1 : Génome de *L.major*, *L.infantum* et *L.braziliensis* (Christopher *et al.*, 2007).

| | <i>L. major</i> (V5.2) | <i>L. infantum</i> (V2) | <i>L. braziliensis</i> (V2) |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Chromosome number | 36 | 36 | 35 |
| Contigs | 36 | 562 | 1,041 |
| Size (bp) | 32,816,678 | 32,134,935 | 32,005,207 |
| Overall G+C content (%) | 59.7 | 59.3 | 57.76 |
| Coding genes | 8,298 | 8,154 | 8,153 |
| Pseudogenes ^a | 97 | 41 | 161 |
| Coding G+C content (%) | 62.5 | 62.45 | 60.38 |

^aPseudogenes include genes that have in-frame stop codons and/or frameshifts but have other characteristics of coding regions, as assessed by similarity to other genes or by codon bias.

Bien que le parasite de *Leishmania* ait généralement été considéré comme des organismes diploïdes, l'aneuploïde peut être un terme plus précis (Sigrid *et al.*, 2011). Dans *L. major*, des chromosomes individuels ont été trouvés dans différents états de ploïdie donnant au génome une structure mosaïque. L'échange génétique n'a été découvert que récemment, mais les croisements sexuels sont peu fréquents et apparaissent seulement dans l'insecte vecteur (Sigrid *et al.*, 2011). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation) ou des amplifications chromosomiques ont été mis en évidence (Dujardin, 2000).

Le génome kinetoplastique, est constitué de molécules d'ADN circulaires de deux types : les mini-cercles impliqué dans le phénomène d'édition de ARN (insertion/délétion d'uridine) et les maxi cercles codant pour des ARN guide et ARN ribosomique (Kazemi *et al.*, 2011).

2.5. Le vecteur

Le phlébotome est un insecte diptère nématocères de petite taille de 2 à 5 mm de longueur (figure 3). Il appartient à la famille des *Psychodidae*, sous famille des *Phlebotominae*. Seule la femelle est hématophage. Elle pique le soir, et assure la transmission de la maladie. Les phlébotomes sont actifs pendant les mois chauds puis disparaissent à l'automne (Luiz *et al.*, 2014).



Figure 3 : Le Phlébotome, vecteur de la leishmaniose.

(<http://leblogdestella.over-blog.com/2017/07/le-phlebotome-un-danger-pour-l-homme.html>)

2.6. Le cycle évolutif

Le cycle évolutif de *Leishmania* se déroule entre deux hôtes : vertébré (homme, chien, rongeur, et autres), et un insecte vecteur (le phlébotome femelle).

La leishmaniose est transmise à l'homme par la piqûre des phlébotomes femelles infectés (figure 4). Les phlébotomes injectent le parasite sous forme de promastigotes métacycliques (1). Les parasites envahissent les macrophages et granulocytes (2 et 3) et se développent en amastigotes à l'intérieur du phagolysosome (4). Les stades amastigotes se répliquent dans le phagolysosome par simple division (5). Les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang sur un hôte infecté, quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (6). Les parasites sont libérés par des macrophages dans l'intestin du phlébotome (7), qui se multiplie et se différencie en promastigotes métacycliques, et migrent dans la trompe du phlébotome (8). Ces stades infectieux sont ensuite libérés dans un nouvel hôte de mammifères (9) (Cantacessi *et al.*, 2018).

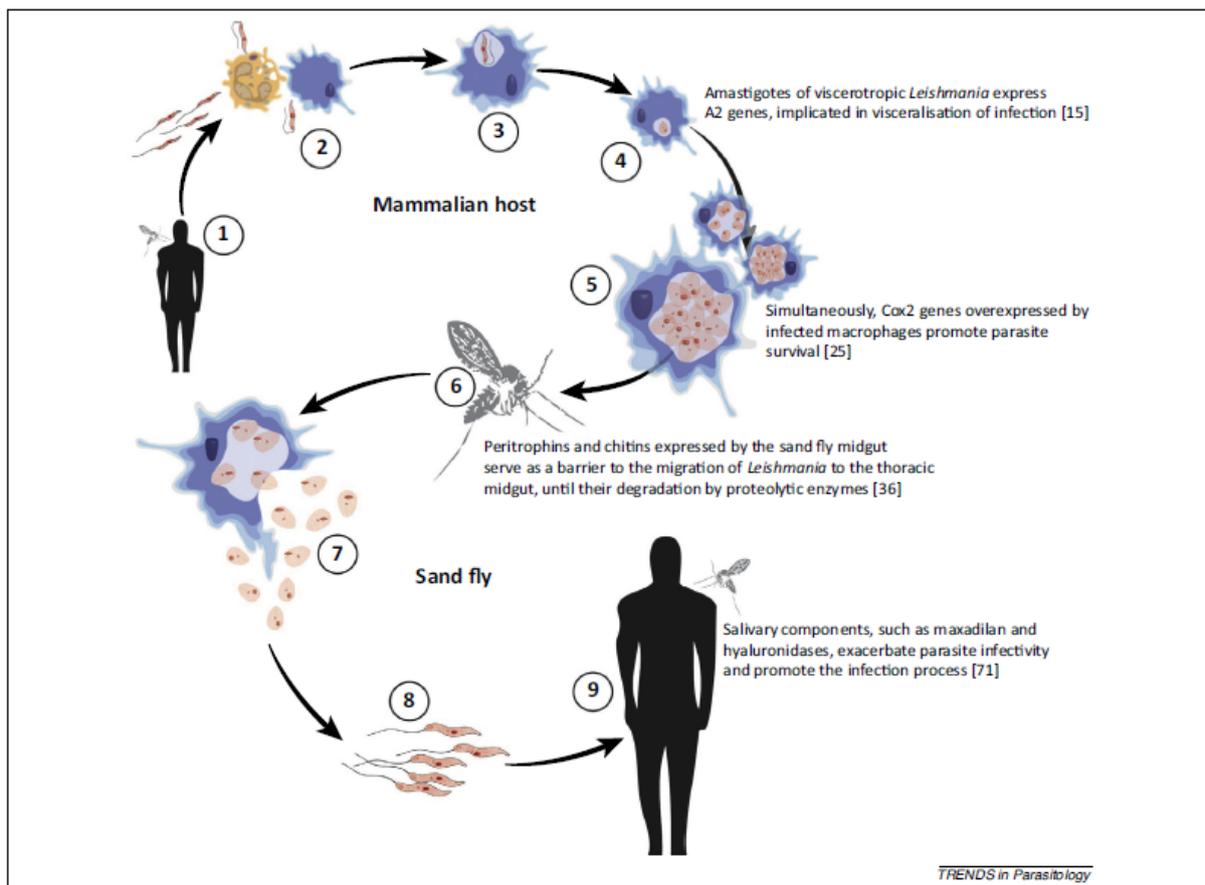


Figure 4 : le cycle évolutif de la leishmaniose (Cantacessi *et al.*, 2018).

2.7. La reproduction

Le mode de reproduction des *Leishmania* est encore débattu. Ce parasite se reproduit généralement de façon clonale (Sambrook, 1989 ; Tibayrenc & Banuls, 2002). Cependant les scientifiques en déduisent que ces organismes présentent aussi la capacité de faire de la recombinaison sexuée puisque des hybrides ont été mis en évidence. (Rougeron *et al.*, 2016). Il semble, que selon l'écosystème et les espèces de *Leishmania*, ces parasites font plus ou moins appel à l'un ou l'autre de ces deux modes (Rougeron *et al.*, 2016).

2.8. Le mode de transmission

La transmission des parasites se fait naturellement par la pique d'un phlébotome femelle infecté lors d'un repas sanguin. L'infection peut se faire aussi dans les laboratoires dans les études de recherches. Exceptionnellement la leishmaniose peut se transmettre par voie congénitale ou sexuelle, par une transfusion sanguine ou le parasites circulent dans le sang (Risueno *et al.*, 2018).

3. Formes clinique

3.1. La leishmaniose viscérale (LV) :

C'est une forme plus grave et potentiellement mortelle, en l'absence de traitement. Elle est décrite en Inde sous le nom de kala-azar (figures 5). Les symptômes comprennent la fièvre, l'amaigrissement, l'anémie, l'hépatomégalie (gros foie) et la splénomégalie (grosse rate). La LV connaît une distribution géographique très large, allant de la Chine à l'Amérique du Sud. Les grands foyers endémiques sont représentés par les Foyers indien, chinois, centre asiatique, Est-Africain, et Sud-Américain (Alvar *et al.*, 2012).

3.2. La leishmaniose cutanée (LC)

La LC est la forme la plus répandue dans le monde est causée par *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania major*, qui provoque de nombreuses plaies sur le corps (figures 5). Elle guérit en quelques mois laissant des cicatrices particulièrement inesthétiques (Gay *et al.*, 2015). On estime qu'il y a 0,5 million à 1,5 million de nouveaux cas chaque année dans le monde (Alvar *et al.*, 2012).

3.3. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Cette forme produit des lésions cutanées étendues qui ressemblent à celles de la lèpre et sont particulièrement difficiles à traiter (Dedet, 1990), (figures 5).

3.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Elle débute avec des ulcérations cutanées qui s'étendent et qui endommagent certains tissus (en particulier le nez et la bouche) est causée par *Leishmania braziliensis*, (figures 5). La majorité des cas signalés se trouve en Bolivie, Brésil, Pérou, Argentine, Colombie, Equateur, Paraguay et Venezuela (Vilela Dionicia *et al.*, 2008).

3.1. La leishmaniose cutanée localisée (LCL)

Elle correspond à la forme bénigne de l'affection. Ces lésions sont localisées uniquement dans la peau. Elle résulte de parasitisme par n'importe quelles espèces, y compris les espèces viscérotropes (*L. donovani* et *L. infantum*). Mais les espèces les plus constamment dermatotropes sont représentées dans l'ancien monde, comme *L. tropica* et *L. major*. Dans le nouveau monde, elles comprennent des espèces à large distribution : Sud-américaine (*L. amazonensis* et à un degré moindre *L. guyanensis*), des espèces plutôt localisées à l'Amérique centrale (*L. mexicana*, *L. panamensis*) brésiliennes (*L. shawi*, et *L. lainsoni*), (Vilela Dionicia *et al.*, 2008).



Figures 5 : Les différentes formes de leishmanioses : a (LCM), b (LCD), c (LCL), d (LV). (WHO, 2012).

4. Répartition géographique

Les leishmanioses sont des pathologies parasitaires de distribution endémiques, dans les régions tropicales et subtropicales du globe, et touchent 98 pays dans le monde (Gay *et al.*, 2015). On distingue les leishmanioses de l'Ancien monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie), et celle du nouveau monde (Amérique du Nord, du Sud et Amérique Central) (annexe3).

La prévalence globale des leishmanioses est estimée à 12 millions d'individus, et environ 310 000 personnes sont à risque d'infection. Elles constituent un véritable problème de santé publique en Inde, en Afrique du Nord, en Amérique du sud et en Europe. Les régions méditerranéennes sont des zones endémiques avec plusieurs centaines de cas déclarés chaque année (en Espagne, en France, en Italie et au Portugal notamment). L'OMS estime que le nombre de nouveaux cas par année est de 1.3 millions, (WHO, 2015).

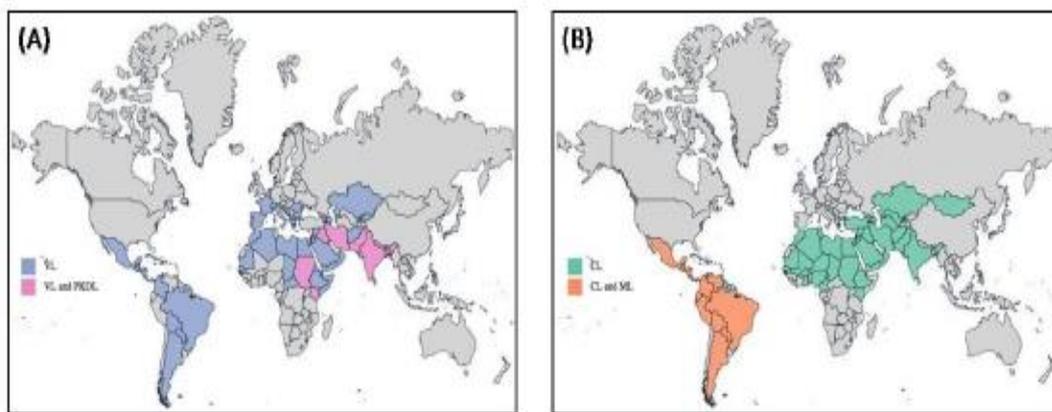


Figure 6 : Distribution mondiale de leishmaniose (A) viscérale, (B) cutanée (Alvar *et al*, 2012).

5. Les leishmanioses en Algérie

Les leishmanioses constituent en Algérie un réel problème de santé publique. L'accroissement du nombre de cas et l'extension de la maladie à plusieurs départements avoisinant les foyers classiques d'infection nécessitent une surveillance accrue de l'évolution de ces zoonoses et l'application de mesures de lutte adéquates (Boudrissa *et al.*, 2012).

Deux types de leishmaniose sévissent à l'état endémique en Algérie : la leishmaniose cutanée (LC) et la leishmaniose viscérale (LV).

5.1. La Leishmaniose Viscérale :

Elle est due à *L. infantum*. Elle a pour réservoir principal, le chien et d'autres rongeurs (Belazoug *et al.*, 1982) et transmise par *Phlebotomus perniciosus* (Belazoug *et al.*, 1982). La leishmaniose viscérale a la même distribution que la leishmaniose canine. Elle s'étend sur toute la partie nord au niveau des étages bioclimatiques humides et subhumides (Adel *et al.*, 2015). Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de leishmaniose cutanée zoonotique (Biskra, Batna), (Boudrissa *et al.*, 2012).

A côté des anciens foyers (Tizi Ouzou, Boumerdès, Médéa et Constantine), de foyers sont apparus : Annaba et Collo à l'Est, La Chiffa, et Chlef au Centre et Tlemcen et Oran à l'Ouest (Harrat *et al.*, 1995) L'espèce isolée des cas de LV appartient à *L. infantum*. Les variants enzymatiques décrits jusqu'à présent sont les zymodèmes MON-1, MON-24 et MON-80 (Harrat *et al.*, 1996 ; Benikhlef *et al.*, 2004).

5.2. La Leishmaniose Cutanée : Elle se présente sous trois formes :

5.2.1. La Leishmaniose Cutanée du nord (sporadique):

due à *L. infantum* (Belazzoug *et al.*, 1985), et qui a pour réservoir putatif le chien (Benikhlef *et al.*, 2004) et transmise par *P. perfiliewi* (Belazzoug *et al.*, 1985). L'aire de répartition de la leishmaniose cutanée sporadique du Nord, intéresse uniquement l'étage bioclimatique humide et sub-humide. Les variantes enzymatiques de *L. infantum* responsables de la forme cutanée du nord sont : les zymodèmes MON-24, MON-80 (Benikhlef *et al.*, 2004).

5.2.2. La Leishmaniose cutanée chronique :

due à *L. killicki* MON-301 (Harrat *et al.*, 2009), et qui est transmise par *P. sergenti* (Boubidi *et al.*, 2011). C'est une Forme décrite à Ghardaïa en 2005. Elle sévit de façon endémique et coexiste avec la LCZ à *L. major* dans le même foyer. Le réservoir suspecté est *Massoutierramzabi* rongeur assez abondant dans les collines entourant la vallée du M'zab (Boudrissa *et al.*, 2012).

5.2.3. La Leishmaniose Cutanée zoonotique :

due à *L. major* MON-25 et qui a pour réservoir des rongeurs sauvages *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* (Rongeur, Gerbillidés) (Belazzoug *et al.*, 1983 et 1986), et transmise par *P. papatasi* (Belazzoug *et al.*, 1982).

La leishmaniose cutanée fût signalée pour la première fois en 1860 à Biskra par le docteur Hamel. Une seconde observation de la maladie dénommée alors « clou de Biskra » fût publiée deux années plus tard à Laghouat Après la création de l'Institut Pasteur d'Algérie en 1905 (Boudrissa *et al.*, 2014). La première épidémie fût rapportée dans les garnisons militaires à Biskra en 1960 où plus de 200 cas ont été enregistrés.

Entre 1982 et 1983, près de 8000 cas ont été recensés dans la Wilaya de M'sila. Ainsi cette forme sévit à l'état épidémique dans les régions steppiques des Hauts plateaux à l'étage bioclimatique aride et semi-aride. Cependant, cette zoonose connaît actuellement un accroissement et une extension géographique inquiétante et occupe pratiquement tout le territoire algérien du nord au sud et d'est en ouest. Les foyers les plus classiques sont ceux de Biskra, M'sila et Batna (Boudrissa *et al.*, 2012). Ils constituent à eux seuls près de 80 % des cas déclarés dans le pays. Plus de 30000 cas ont été enregistrés en 2005, chiffre jamais atteint auparavant (INSP, 2005).

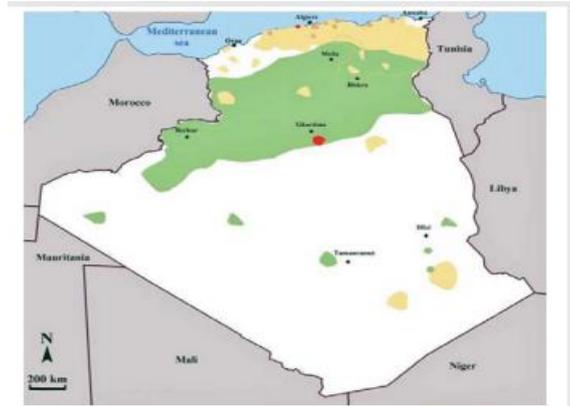


Figure 7 : Distribution de la leishmaniose cutanée et viscérale en Algérie. (Eddaikra *et al.*, 2017).

III. Apport des études biochimiques et moléculaires dans l'identification des *Leishmania*

1. Les études biochimiques : «les enzymes»

Une enzyme, est une substance protéique qui catalyse les réactions biochimiques, en agissant en quantité infime et sans être modifiées par la réaction. Les enzymes accélèrent les réactions en abaissant leur énergie d'activation. Leur activité varie en fonction de certains facteurs comme la température, le pH et leur concentration (Cuesta *et al.*, 2015).

Les enzymes de même fonction qui migrent différemment à l'électrophorèse, sont des isoenzymes. Le terme «iso-enzyme» a été créé par (Markeat & Moller, 1959), pour désigner toute bande apparaissant au sein d'un système enzymatique donné sur un gel.

La majorité des iso-enzymes solubles sont incolores, la visualisation de leur emplacement sur le gel après électrophorèse, se fait par des procédés histochimiques spécifiques (Gennady & Manchenko, 2003).

Un système isoenzymatique correspond à l'ensemble des bandes dont chaque bande correspond à une isoenzyme (Boulanger *et al.*, 1973). L'identification de l'activité des isoenzymes dépend du comportement vis-à-vis de l'analogue de substrat.

L'Union Internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 nombres séparés par des points et précédés de « EC », (ex : malate déshydrogénase : MDH, EC 1.1.1.37).

Le premier nombre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions, le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme et son mécanisme d'action, le 3ème nombre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur et le 4ème nombre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe (Lissoir *et al.*, 2003).

Certaines enzymes interviennent dans le cycle de Krebs, d'autres dans le cycle de pentose et dans le métabolisme du glucose (annexe 5). Il s'agit de :

1. Les déshydrogénases :

- La malate déshydrogénase (MDH) EC 1.1.1.37 : est une enzyme qu'on retrouve dans toutes les cellules, participe à la gluconéogenèse.
- Phosphogluconate déshydrogénase (PGD) E.C.1.1.1.44 : impliquée dans la voie des pentoses.
- Glucose 6-phospho-déshydrogénase (G6PD) E.C. 1.1.1.49 : Cette enzyme est la première de la voie des pentoses.
- Enzyme malique (ME) E.C.1.1.1.40 : intervient dans le cycle de krebs.
- Isocitrate déshydrogénase (ICD) EC.1.1.1.42 : utilisée pendant la troisième étape du cycle de l'acide citrique.
- NADH Diaphorase (DIA) E.C.1.6.2.2 : utilisée dans la chaîne de transport d'électrons pour la génération de l'ATP.

2. Les transférases :

- Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) E.C.2.6.1.1 : transfère des électrons du NADH cytosolique vers le NAD⁺ mitochondrial.
- Purine nucleoside phosphorylase (NP). E.C.2.4.2.1 : intervient dans le métabolisme des Purines.
- Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1 : sert à phosphoryler un résidu de sérine sur le site actif de l'enzyme.

3. Les isomérases :

- Glucose phospho-isomérase (GPI) E.C.5.3.1.9 : situé sur le chromosome 19 et catalyse D-Glucose-6-phosphate en D-fructose-6-phosphate

4. Les lyases :

- Fumarate déshydrogénase (FH) EC.4.2.2.2 : elle intervient dans le métabolisme du fumarate et de certains acides aminés, et sous une forme mitochondriale, elle intervient à la 8^{ème} étape du cycle de Krebs pour catalyser l'hydratation du fumarate en malate.

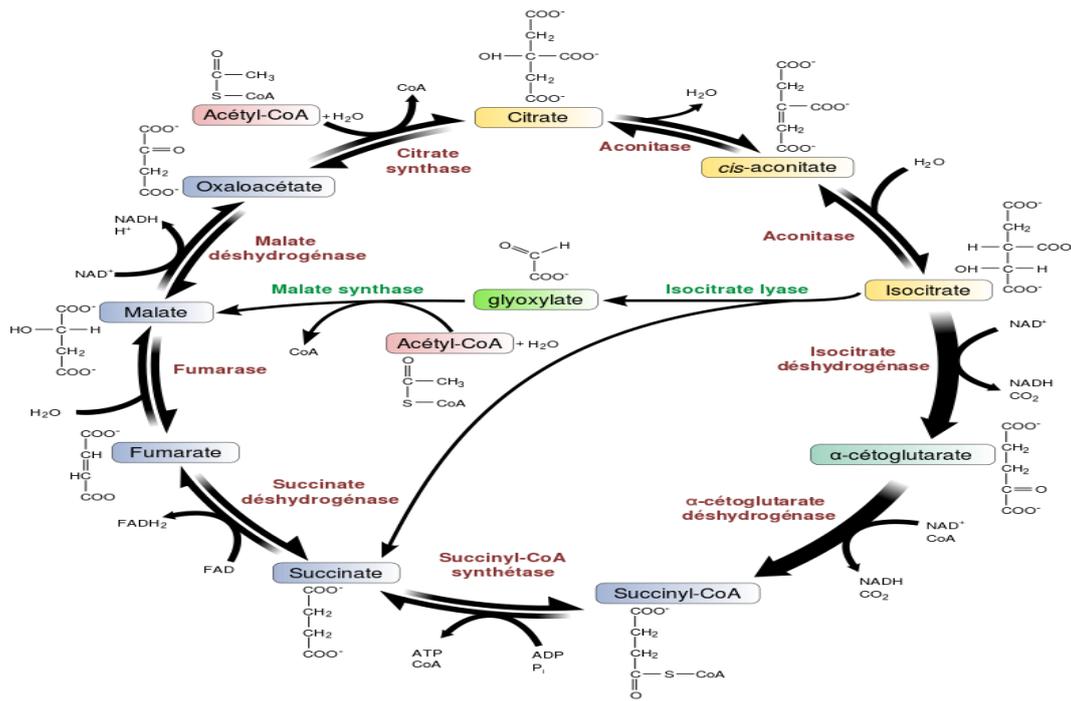


Figure8 : cycle de Krebs (https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_Krebs)

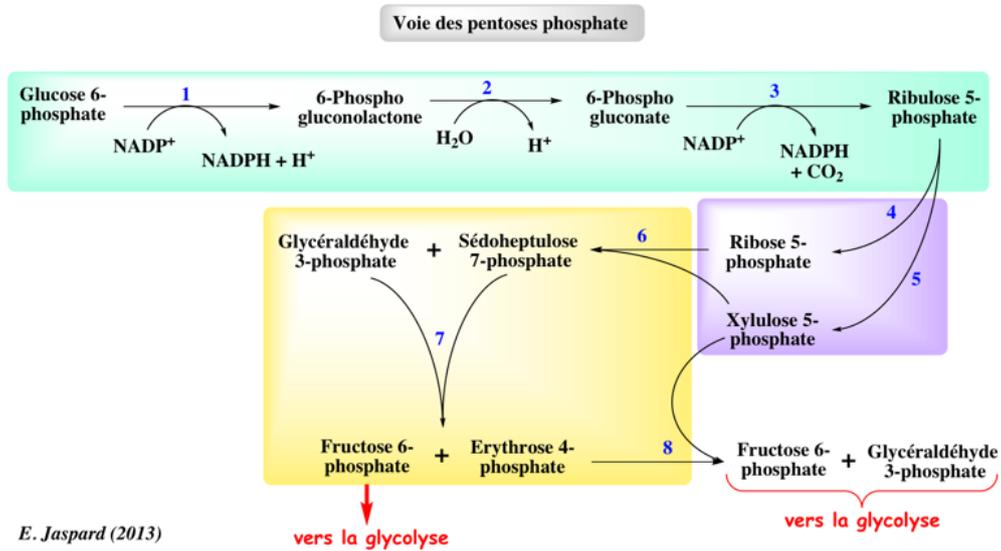


Figure 9 : voie des pentoses phosphate

<http://biochime.j.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentosePhosphate.htm>

2. Les études moléculaires

La grande majorité des méthodes de typage des espèces, que ce soit dans une étude clinique ou dans un contexte épidémiologique, environnemental, expérimental ou de gestion des patients, impliquent l'utilisation de la PCR. La PCR permet une amplification spécifique massive de l'ADN de *Leishmania*, elle est aussi applicable directement sur des échantillons cliniques, sans nécessiter d'isolement parasitaire. La technique utilise soit une PCR générique qui amplifie toute l'espèce de *Leishmania*, soit une PCR spécifique qui amplifie une ou plusieurs espèces, complexes d'espèces ou sous-genres. En utilisant une PCR spécifique, la détection du produit de PCR peut être réalisée soit sur un gel d'agarose classique, soit en temps réel.

Diverses cibles ont été utilisées dans la technologie basée sur la PCR, tels que: SSU, small ribosomal subunit rRNA gene (18S rRNA); LSU, large ribosomal subunit rRNA gene; ITS, internal transcribed spacer ; kDNA (figure 9); Cytochrome *b* (maxicircles) ; The metalloprotease glycoprotein 63 (GP63) ; Cysteine proteinase B (CPB) ; Heat shock protein 70 (HSP70) (figure 10); mini exon ou spliced leader ; 7SL-RNA ainsi que les gènes qui codent pour les enzymes du métabolisme (Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH or G6PD) ; Mannose-phosphate isomérase (MPI)).

la matrice d'ADN ribosomique (ADNr) est l'une des cibles de typage des espèces les plus populaires. Chez *Leishmania* les chercheurs estiment que 10 à 20 copies sont répétées en tandem par génome haploïde, ce qui rend la sensibilité suffisante pour analyser l'ADN de l'échantillon clinique. Chaque unité de répétition comprend plusieurs gènes et espaceurs.

Au sein du réseau, les régions d'espacement contiennent principalement une variabilité suffisante pour la discrimination des espèces, même si elles ont également été utilisées pour distinguer les isolats au niveau de la sous-espèce. Une variation mineure de la séquence entre les différentes copies a été observée, ce qui complique parfois l'interprétation des lectures de séquences. Cependant, il n'est pas clair si ces différences sont biologiques ou causées par des enzymes dans des mélanges de PCR ou de réactions de séquençage (Auwera *et al.*, 2015).

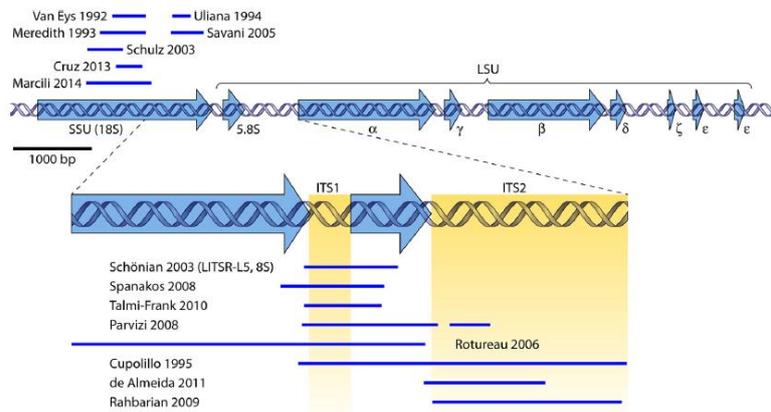


FIG 4 rRNA gene array of *L. major* strain MHOM/IL/81/Friedlin. The sequence and annotations were taken from www.tritrypdb.org (LmjF chromosome 27, nucleotides 989640 to 998595; accessed on 10 August 2014). Arrows in blue indicate the 5'-to-3' direction of the genes. The lower panel represents a more detailed view of the most relevant fragment for species typing. Regions used by different authors are indicated above (top) or below (bottom) each panel (24, 77, 102, 111, 112, 114, 116–118, 120–124, 126). The scale of the upper panel is given on the left. **SSU**, small ribosomal subunit rRNA gene (18S rRNA); **LSU**, large ribosomal subunit rRNA gene; **ITS**, internal transcribed spacer.

Figure 10 : Gène codant pour l'ARNr de la *L. major* (Gert *et al.*, 2014).

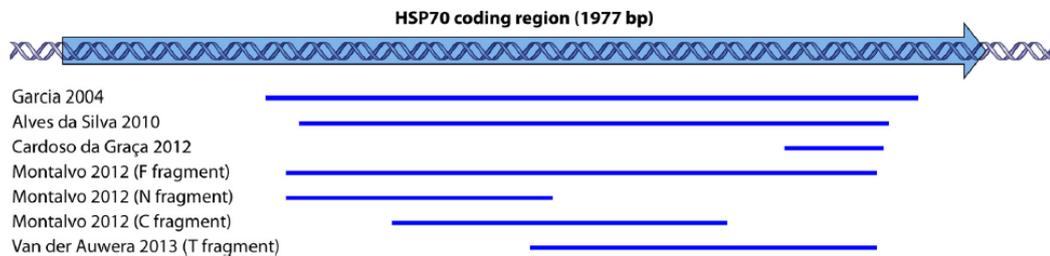


FIG 8 Mapping of *hsp70* fragments used in different studies to the complete coding region of the HSP70 gene (GenBank accession number XM001684512.1) (the arrow indicates the sense direction). These regions were used in either RFLP or sequence analysis (66, 194, 196, 197, 200).

Figure 11 : Cartographie des fragments *hsp70* utilisés dans différentes études dans la région de codage complète du gène *hsp70* (Gert *et al.*, 2014).

Matériels et méthode

I. Matériels

1. Matériels non biologique

Afin d'étudier la diversité biochimique et moléculaire des souches de *Leishmania*, des électrophorèses sur gel épais d'amidon et sur gel d'agarose ont été réalisées. Pour toutes les manipulations nécessaires un matériel non biologique était indispensable (annexe 08). Des additifs, des réactifs, des enzymes, des cofacteurs et des coenzymes indispensables ont également été utilisés (annexe 08).

2. Matériels biologique

2.1. Souches

26 souches de *Leishmania* ont été utilisées dans notre travail, aussi bien pour l'étude biochimique que moléculaire. 15 souches provenaient de la région de Biskra et 11 souches de la région de M'sila (tableau 02, figure 11). Elles étaient toutes isolées de patients atteints de leishmaniose cutanée (LC). Sept souches marqueurs ont également été utilisées pour vérifier le profil électrophorétique et moléculaire des souches étudiées (tableau 03).

Toutes les souches étaient cryo-conservées dans de l'azote liquide à -196°C au niveau du Centre National de Référence de *Leishmania*, Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'Institut Pasteur d'Algérie. Chaque souche porte un code, la forme clinique et la date de la congélation.

Tableau 02 : Code OMS des souches de *Leishmania* étudiées

| Souches | Origines |
|----------------------------|----------|
| 1- MHOM/DZ/18/LIPA544/17 | M'sila |
| 2- MHOM/DZ/18/LIPA545/17 | M'sila |
| 3- MHOM/DZ/18/LIPA555/18 | M'sila |
| 4- MHOM/DZ/18/LIPA 556/18 | M'sila |
| 5- MHOM/DZ/18/LIPA557/18 | M'sila |
| 6- MHOM/DZ/18/LIPA558/18 | M'sila |
| 7- MHOM/DZ/18/LIPA559/18 | M'sila |
| 8- MHOM/DZ/18/LIPA560/18 | M'sila |
| 9- MHOM/DZ/18/LIPA561/18 | M'sila |
| 10- MHOM/DZ/18/LIPA 562/18 | M'sila |
| 11- MHOM/DZ/18/LIPA 568/18 | M'sila |
| 12- MHOM/DZ/ 73/LIPA 06 | Biskra |
| 13- MHOM/DZ/ 73/LIPA 08 | Biskra |
| 14- MHOM/DZ/73/LIPA 44 | Biskra |
| 15- MHOM/DZ/ 81/LIPA 47 | Biskra |
| 16- MHOM/DZ/ 82/LIPA 49 | Biskra |

| | |
|--------------------------|-------------|
| 17- MHOM/DZ/ 82/LIPA 57 | B i s k r a |
| 18- MHOM/DZ/ 82/LIPA 87 | Biskra |
| 19- MHOM/DZ/ 84/LIPA 137 | Biskra |
| 20- MHOM/DZ/ 86/LIPA 147 | Biskra |
| 21- MHOM/DZ/93/LIPA 397 | Biskra |
| 22- MHOM/DZ/81/LIPA 38 | Biskra |
| 23- MHOM/DZ/92/LIPA 367 | Biskra |
| 24- MHOM/DZ/92/LIPA 383 | Biskra |
| 25- MHOM/DZ/92/LIPA 386 | Biskra |
| 26- MHOM/DZ/93/LIPA 398 | Biskra |

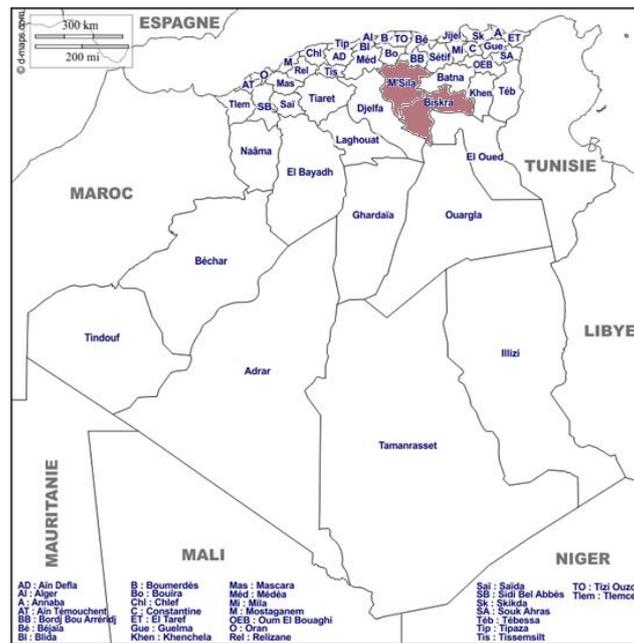


Figure 12 : Localisation des deux zones d'études (Wilaya de M'sila et Biskra)
https://d-maps.com/carte.php?num_car=4429&lang=fr

 Biskra et M'sila

Tableau 03: Zymodème des souches marqueurs utilisées

| Code souche | Complexe | Zymodème |
|--------------------------|----------------------------|----------|
| 1. MHOM/DZ/18/LIPA 233 | <i>Leishmania major</i> | MON-25 |
| 2. MHOM/DZ/18/LIPA 80 | <i>Leishmania major</i> | MON-25 |
| 3. MHOM/FR/82/LEM 75 | <i>Leishmania infantum</i> | MON-1 |
| 4. MHOM/DZ/02/LIPA250L | <i>Leishmania infantum</i> | MON-1 |
| 5. MHOM//LEM 417 | <i>Leishmania infantum</i> | MON-24 |
| 6. MHOM//LEM 189 | <i>Leishmania infantum</i> | MON-80 |
| 7. MHOM/DZ/18/LIPA 07/05 | <i>Leishmania killicki</i> | MON-301 |

2.2. Milieux de cultures

Trois milieux de cultures ont été utilisés. Ils sont à base de gélose et de sang de lapin. Ils servent à l'entretien des souches, leurs isollements (NNN) et à la culture en masse (CCS) :

- Milieu N.N.N (NOVY MC NEAL NICOLL) : pour la décongélation et l'entretien des souches
- Milieu RPMI (ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUT): pour la re-congélation des parasites et la culture en masse.
- Milieu CCS (Cœur, cerveau, sang) : pour la culture en masse des parasites.

II. Méthodologie

1. Culture des parasites

1.1. La décongélation des souches

Les souches sont retirées de la banque de cryoconservation (azote liquide -196°C), et rapidement décongelées dans un bain-marie à 37°C pendant une minute. Après décongélation, la suspension parasitaire estensemencée dans 2 tubes NNN. Une goutte de la suspension est contrôlée au microscope optique afin de vérifier l'état des parasites (richesse, mobilité et absence ou présence de germes). Les deux nouveaux tubes NNN sont incubés à 25°C pendant 6 jours.

1.2. Repiquage et culture en masse

Après 6 jours à une semaine, les parasites sont contrôlés de nouveau et transférés dans 2 autres tubes neufs d'NNN. Après incubation, une partie des parasites est utilisé pour la préparation des extraits protéiques (étude biochimique), et l'autre partie est utilisée pour la préparation de l'ADN parasitaire (étude moléculaire).

2. Préparation des extraits protéiques parasitaire : « Etude biochimique »

2.1. Culture en masse

Pour le typage d'une seule souche de *Leishmania*, 300 μl d'extraits protéiques (sous forme de perles) sont indispensable.

Les cultures positives âgées de 6 jours (2 tubes NNN) sont repiquées sur deux petits flacons de milieux CCS. Après 4 jours d'incubation, les suspensions parasitaires sont repiquées sur deux nouveaux flacons de CCS. Quatre jours après, les 4 flacons sont transférés dans une boîte de Roux contenant une quantité plus importante de milieux CCS et incubé à 25°C durant une semaine (figure 13).

2.2. La récolte

Après vérification des parasites (richesse, mobilité, contamination), la phase liquide de la boîte de Roux est recueillie dans un tube conique stérile et filtrée sur triple épaisseur de gaze pour éliminer les débris de gélose. Une centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min à température $+4^{\circ}\text{C}$ est réalisée.

Trois lavages avec de l'eau physiologique sont indispensables pour éliminer toute présence des globules rouges présentes dans les milieux de culture. Ces lavages sont alternés par des centrifugations à 3000tr/min à +4°C permettant d'obtenir un culot parasitaire purifié (figure 13)



Figure 13 : Repiquage et récolte des parasites

2.3. Lyse cellulaire par congélation-décongélation

Cette méthode permet l'obtention de l'antigène leishmanien sans avoir recours à n'importe quel agent dénaturant qui pourrait affecter la qualité de l'extrait protéique.

Le culot parasitaire récolté est soumis à une lyse membranaire par congélation / décongélation dans de l'azote liquide pendant une minute. Le choc thermique permet la destruction de la membrane plasmique des parasites et la libération des protéines membranaires et cytosoliques. Après la lyse, les suspensions sont soumises à une centrifugation à 14000tr/min pendant 20 min à +4°C afin d'éliminer tous les débris membranaires et obtenir juste les protéines requises pour le typage biochimique.

2.4. Confection des perles

Après la centrifugation, le surnageant recueilli et conditionné sous forme de perles de 25 µl par projection rapide dans de l'azote liquide.

Les perles de chaque souche sont conservées dans des tubes Nalgenes®, dans l'azote liquide (-196°C) pour une utilisation ultérieure.

3. Préparation de l'ADN parasitaire : « Etude moléculaire »

Les suspensions parasitaires des deux tubes NNN issus du deuxième repiquage (après décongélation des souches), sontensemencées sur 4 tubes contenant du RPMI 20 % (à raison de 200 µl de parasites dans 2 ml de RPMI). Après incubation d'une semaine à 25 °C, les suspensions parasitaires de la phase exponentielle sont récupérées dans un tube conique stérile et centrifugées à 3000 tr/mn pendant 15 mn. Le culot parasitaire est soumis à une extraction par phénol chloroforme alcool isoamylique

3.1. Extraction d'ADN par phénol chloroforme alcool isoamylique

L'extraction est une méthode de purification complète qui comprend de nombreuses étapes de la lyse, la digestion, l'extraction et le lavage. La précipitation avec l'éthanol est la méthode standard pour récupérer les acides nucléiques des solutions aqueuses. Elle est rapide et efficace pour les quantités infimes d'ADN.

3.1.1. La lyse

Afin de lyser les membranes cytoplasmiques et nucléaires des parasites, 200 µl du tampon de lyse, 12.5µl SDS 10% (Sodium Dodécyl Sulfate) et 2 µl de la protéinase K sont ajoutés au culot parasitaire fraîchement récolté et laisser incuber au bain marie toute une nuit à 37°C.

3.1.2. Extraction phénol chloroforme alcool isoamylique

La déprotéinisation se fait par le phénol/chloroforme isomérique (25 :24 :1). Après centrifugation à 13000tr/min pendant 10 mn, Les protéines se localisent à l'interphase, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse qui est récupérée soigneusement et transférer dans un nouveau tube de 2 ml, en évitant de toucher l'interphase.

3.1.3. Précipitation

Un volume équivalent à 1/10 (du volume total) d'acétate de sodium, et 2 volumes de l'éthanol absolu sont ajoutés. Une centrifugés à 12000 tr/min pendant 15 minutes est effectuée et le culot récupéré est lavé avec 500 µL d'éthanol 70%. Après une deuxième centrifugation, le surnageant est éliminé et l'ADN parasitaire est stocké dans 100 µl de TE (tampon EDTA), et conserver à -20°C pour une utilisation ultérieure (dosage de la concentration d'ADN et étude moléculaire).

4. Etude Biochimique : « Electrophorèse sur gel épais d'amidon »

4.1. Principe :

L'électrophorèse, est une technique permettant la séparation des macromolécules en fonction de leurs charges et de leurs tailles. Le gel d'amidon présente un effet de tamis retardant sélectivement les grosses molécules. Les protéines migrent à l'intérieur d'un réseau de pores dont la taille est relativement constante et suffisamment grande pour que la plupart des protéines puissent traverser sans être freiné.

4.2. Mode opératoire

4.2.1. Systèmes enzymatiques

Afin d'identifier les parasites de *Leishmania*, 15 systèmes enzymatiques ont été ciblés selon la technique préconisée par Rioux, (1990). Les systèmes enzymatiques sont :

- Malate déshydrogénase EC 1.1.1.37(MDH)
- Enzyme malique EC 1.1.1.40 (ME)
- Isocitrate déshydrogénase EC 1.1.1.42 (ICD)
- Phosphogluconate déshydrogénase EC 1.1.1.44 (PGD)
- Glucose -6-phosphate déshydrogénase EC 1.1.1.49 (G6PD)
- Glutamate désydrégénase EC 1.4.1.3 (GLUD)
- NADH diaphorase EC 1.6.2.2 (DIA)
- Purine nucléoside phosphorylase EC 2.4.2.1 (NP1)
- Purine nucléoside phosphorylase EC 2.4.2 (NP2)
- Glutamate oxalo-acétate transaminase EC 2.6.1.1 (GOT1 .GOT2)
- Phosphoglucomutase EC 5.4.2.2 (PGM)
- Glutamate désydrégénase EC 1.4.1.3 (GLUD)
- NADH diaphorase EC 1.6.2.2 (DIA)
- Purine nucléoside phosphorylase EC 2.4.2.1 (NP1)
- Purine nucléoside phosphorylase EC 2.4.2 (NP2)

4.2.2. Préparation des solutions tampons

Les solutions tampon sont des solutions ionisantes des protéines permettant leur migration sur le gel. Le système tampon comprend :

a- Le tampon du gel :

C'est le tampon utilisé pour la préparation du gel, son pH et sa composition dépendent du système enzymatique à révéler.

b- Le tampon de migration :

C'est un tampon qui sert à relier les électrodes avec le gel, il est de même pH que le tampon gel.

Quatre solutions tampon sont nécessaires pour la révélation des enzymes appropriés (tableau 4).

Tableau 4 : Les systèmes enzymatiques révélés et leurs solutions tampon adéquate.

| Solution tampon gel | Systèmes enzymatiques révélés |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| TME 7.4 + NADP | G6PD, PGD, GOT, ME |
| TME 7.4 + NAD | GPI PGM GOT |
| TC 8.6 + NADP | NP1, NP2, MPI, GOT, GLUD, DIA |
| TC 8.6 + NADP + MnCl ₂ | ICD |
| TC 9.5 + NADP | MDH, ME |

4.2.3. Préparation du gel d'amidon

40 g de la poudre d'amidon sont dilués dans 400 ml de la solution du tampon gel adéquate. Ce mélange est porté à une température précédant immédiatement l'ébullition (apparition des premières bulles), dégazé (à l'aide d'une pompe à vide) et coulé dans un moule en plexiglas (dimensions intérieures de 20 cm X 20 cm x 1cm) en évitant la formation des bulles d'air qui pourraient gêner la migration protéique. Le gel est alors laissé une nuit polymérisé à température ambiante et ensuite couvert d'un film en cellophane afin d'empêcher la déshydratation du gel.

4.2.4. Introduction des extraits protéiques dans le gel

Après polymérisation, le gel est creusé à l'aide d'une règle à gel et un peigne à gel de 12 dents humidifiées par une solution de bleu de bromophénol. Ce dernier est utilisé comme indicateur de migration. Des rectangles de papier wattman sont imbibés par les extraits protéiques et introduits dans les puits du gel un par un à l'aide d'une pince fine.

Le gel est alors couvert par un film en plastique sur la ligne de dépôt des extraits une plaque en verre sur laquelle deux lignes parallèles distantes de 7 cm sont tracés, ces lignes permettent le suivi de l'évolution du front de migration qui ne doit pas dépasser 8 cm, les solutions tampons sont versées dans les bacs du système d'électrophorèse (figure 14).

4.2.5. La migration électrophorétique

Le gel est placé de façon à réunir les deux bacs contenant le tampon pont, le contact entre le tampon d'électrode et le gel est assuré par des éponges plates.

Une deuxième plaque en verre est déposée sur tout l'ensemble, des pochettes de glaces sont placées sur cette dernière assurant la réfrigération des systèmes enzymatiques au cours de la migration.

Les électrodes sont branchées correctement au générateur. Ce dernier est maintenu à environ 90V, l'ampérage se fixera aux alentours de 55-65mA. Le temps de migration est variable, généralement il dure 6 à 8 heures sauf pour la MDH ou la migration est laissée toute la nuit.

4.2.6. Préparation des solutions de révélation

Il existe pour chaque système enzymatique étudié une fiche technique spécifique (Annexe 06). Les solutions de révélation sont préparées 30 min avant la fin de la migration.

4.2.7. La révélation enzymatique

La majorité des iso-enzymes solubles sont incolores, la visualisation de leur emplacement sur le gel après électrophorèse, se fait par des procédés histochimiques spécifiques (Gennady et Manchenko., 2003).

Le gel est traité par une solution de révélation qui contient :

- Un substrat spécifique de l'enzyme à analyser.
- Des co-facteurs: co-enzymes, ions et autres corps chimiques éventuellement nécessaires à l'activité de l'enzyme en cause.
- Un sel coloré, susceptible de réagir avec le produit de la réaction catalysée.

Donc, il y aura une réaction biochimique à l'endroit où l'enzyme spécifique a migré.

Lorsque le front du bleu est à 7cm para rapport à la ligne du dépôt, la migration est arrêtée, les papiers de wattman sont enlevé à l'aide d'une pince fine. Le coin supérieur est coupé de façon à avoir un repère de l'ordre du dépôt des extraits protéiques. Le gel est alors transférer sur une plaque à découper. Le gel est coupé ensuite horizontalement en 3 tranches de 2mm d'épaisseur chacune. Les tranches de gels sont placées dans des bacs de coloration.

La solution de révélation est par la suite verser sur la surface du gel délicatement et laisser à 37°C à l'obscurité jusqu'à apparition des bandes bleues.

Dès que les bandes apparaissent, la réaction est bloquée avec une solution de fixation pour éviter la diffusion des bandes.

4.2.8. Lecture des zymogrammes

Le terme zymogramme, désigne l'ensemble des bandes colorées apparaissant sur le gel. Chaque bande correspond à une protéine distincte codée par un, deux ou plusieurs gènes. Les phénotypes enzymatiques observés sur les zymogrammes peuvent donc être traduits en termes de Zymodème.

Sur chaque électrophorègramme (gel), les indices de migrations des souches à typer sont calculés selon la formule suivante :

$$I_m = \frac{d_x}{d_{LEM75}} \times 100$$

I : indice de mobilité électrophorétique

d_x : distance parcourue par la souche x

d_{LEM75} : distance parcourue par la souche marqueur LEM75

100 : indice de mobilité de la souche LEM75

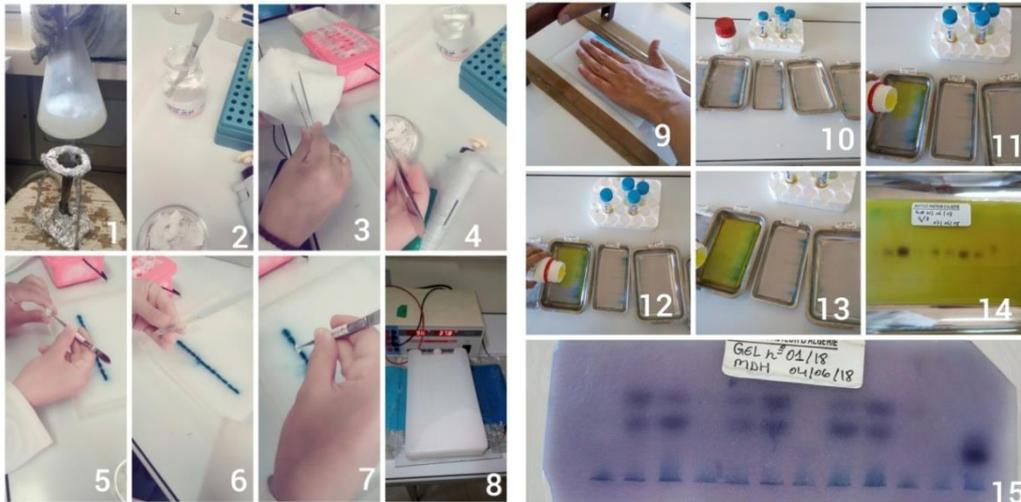


Figure 14 : les différentes étapes de l'électrophorèse sur gel épais d'amidon

5. Etude moléculaire : « Polymérase Chain Réaction RFLP »

5.1. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques par spectrophotométrie

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbe dans l'ultraviolet) (Shanian, 2009).

Le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultra-violet à 260 nm en utilisant un Nanodrop. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm. Cette dernière longueur d'onde permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par des protéines. L'absorption se définit par l'unité de densité optique mesurée à 260 nm (Shanian, 2009).

Le spectrophotomètre doit être allumé 30 minutes avant le début de la mesure pour permettre à la machine de se réchauffer et de se stabiliser. L'échantillon (ADN) doit être dilué à 1/20. Après calibrage du spectrophotomètre avec de l'eau distillée, les DO des échantillons sont lus à 260nm et 280nm. Les valeurs de DO doivent être comprises entre 0,1 et 1,0 pour assurer une mesure optimale. La concentration d'un acide nucléique est déterminée en lisant la densité optique à 260 nm.

La DO à 260nm = 1 correspond à une concentration d'ADN de 50 ug /ml.

Le calcul de la concentration d'ADN est réalisé selon la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ADN} = \text{DO}_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 50$$

Le rapport entre les densités optiques à DO260 et DO280 est compris entre 1,8 et 2 pour les solutions d'ADN pur. Les valeurs <1,8 indiquent une contamination par des protéines, des valeurs > 2 de contamination par de l'ARN.

Le rapport 260/230 détermine la contamination par le phénol, des valeurs > 2 indiquent une contamination par le phénol.

La qualité de l'ADN parasite est également évaluée qualitativement à travers une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%.

5.2. La PCR (Polymérase Chain Réaction)

5.2.1. Principe

Mise au point depuis 1985 par Karine B. Mulis (Karine, 1985) La réaction PCR (Polymérase Chain Réaction), permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle (figure 14) Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Pour avoir réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois phases : une phase de dénaturation (pour obtenir des matrices simple brin), une phase d'hybridation (Borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques) et une phase de d'élongation (Shanian.,2009).

Les trois phases, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil présente un bloc chauffant qui permet d'exposer les tubes qui contiennent le mélange réactionnel à des températures choisies et pour des durées déterminées. La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

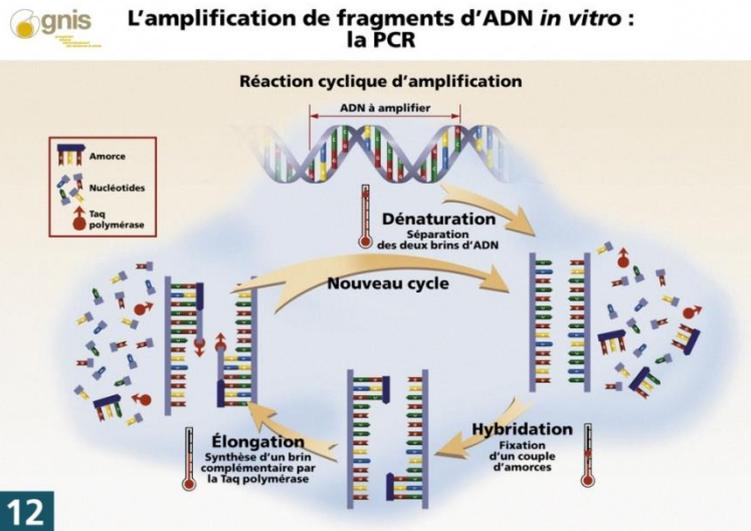


Figure 15 : <https://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>

5.2.2. Mode opératoire :

a. Amplification par PCR de la région ITS1

Dans notre étude, la PCR a été appliquée selon le protocole de shanian (shanian., 2009) pour amplifier la région ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) de l'ADN de *Leishmania* (figure 16). Il s'agit d'une région polymorphe entre espèces de *Leishmania* et qui sépare les gènes codants pour la petite sous unité SSU rRNA et 5.8s rRNA, en utilisant les amorces :

| Primers: | | |
|----------|----------------------------|------------|
| LITSR | 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' | 10 pmol/μl |
| L5.8S | 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' | 10 pmol/μl |

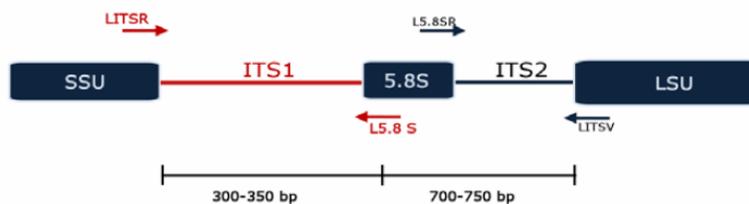


Figure 16 : la région ITS1 (Internal transcribed spacer 1)

Ainsi un master Mix (mélange réactionnel) est préparé et distribuer dans des microtubes (tableau 5). L'ADN extrait auparavant de chaque souche est mis en contact avec le mélange réactionnel et placerdans le thermocycleur selon un programme spécifique à l'amorce ciblé (Schanian., 2009).

Tableau 5 : Composition du Master Mix pour PCR-ITS1.

| | MM | final concentration |
|---|-------------|--------------------------------------|
| 10x PCR buffer (incl. 15 mM MgCl ₂) | 5 µl | 1x (incl. 1.5 mM MgCl ₂) |
| dNTP mix (2.5 mM) | 4 µl | 200 µM |
| primer LITSR (10 µM) | 2.5 µl | 25 pmol |
| primer L5.8S (10 µM) | 2.5 µl | 25 pmol |
| DMSO | 1.25 µl (*) | 2.5% |
| Taq (5U/µl) | 0.2 µl | 1 unit |
| H ₂ O | 32.55 µl | -- |
| Total volume | 48 µl | -- |

Hint: Multiply the quantity shown by the number of samples you have. Always prepare the MM for one sample extra i.e. if you have 5 samples, prepare for 6 so you have MM in excess to meet pipetting errors. (*) optional, works better for clinical samples.

L'amplification des acides nucléiques est lancée selon les paramètres suivants (Schanian., 2009) :

| cycle number | denaturation | annealing | extension |
|--------------|--------------|-------------|------------|
| 1 | 2 min 95°C | -- | -- |
| 33 | 20 sec 95°C | 30 sec 53°C | 1 min 72°C |
| 1 | -- | -- | 6 min 72°C |
| infinite | 4°C | | |

b. Amplification par PCR de la région HSP70

Une autre amorce à était également tester pour la première fois dans cette étude afin de vérifier la variabilité moléculaire pour certaines extraits d'ADN. Il s'agit de la HSP 70.

| Primers: | | |
|----------|-----------------------------|------------|
| HSP70FOR | 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' | 10 pmol/µl |
| HSP70REV | 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' | 10 pmol/µl |

Un master Mix (mélange réactionnel) est préparé comme précédemment :

| | MM for DNA from clinical samples or sandflies | final concentration |
|---|---|--------------------------------------|
| 10x PCR buffer (incl. 15 mM MgCl ₂) | 5 µl | 1x (incl. 1.5 mM MgCl ₂) |
| dNTP mix (2.5 mM) | 4 µl | 200 µM |
| primer HSP70FOR (10 µM) | 2 µl | 20 pmol |
| primer HSP70REV (10 µM) | 2 µl | 20 pmol |
| DMSO | 2.5 µl | 5.0% |
| Taq (5U/µl) | 0.5 µl | 2.5 unit |
| H ₂ O | 32 µl | -- |
| Total volume | 48 µl | -- |

Hint: Multiply the quantity shown by the number of samples you have. Always prepare the MM for one sample extra i.e. if you have 5 samples, prepare for 6 so you have MM in excess to meet pipetting errors.

L'amplification des acides nucléiques est lancée selon les paramètres suivants (Schanian., 2009) :

| cycle number | denaturation | annealing | extension |
|--------------|--------------|------------|-------------|
| 1 | 5 min 94°C | -- | -- |
| 35 | 30 sec 94°C | 1 min 61°C | 3 min 72°C |
| 1 | -- | -- | 10 min 72°C |
| infinite | 4°C | | |

c. Contrôle de la qualité des produits PCR (amplicons)

Les produits PCR (ciblant ITS1 et HSP70) sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose. Ainsi un gel d'agarose (1,5%) est préparé dans du tampon TAE dont 6µl de Bromure d'Ethidium est ajouté (annexe 8). Ce dernier s'intercale entre les acides nucléiques et permet la visualisation de la partie amplifiée sous UV. Après chauffage du gel au micro-onde, ce dernier est coulé dans une cuve d'électrophorèse munie d'un peigne. Après polymérisation, le peigne est spôté du gel et 2 µl de chaque amplicon est spoté dans les puits du gel. Un marqueur de taille est utilisé (100 paire base) pour vérifier la taille du produit PCR (figure 17).



Figure 17 : les Etapes de la PCR

5.3. PCR-RFLP (Polymérase Chain Réaction RFLP)

5.3.1. Principe

L'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction « RFLP », (*Restriction Fragment Long Polymorphism*) est une technique qui permet de comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome qui est préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme (Shanian., 2009). Cette région est utilisée comme substrat pour les enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases) et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est ainsi mis en évidence. Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches (Ndoye., 1998).

5.3.2. Mode opératoire

15 µl des produits révélés positifs (ITS 1 pour toutes les ADN, et HSP70 pour la LIPA 06) sont digérés par l'enzyme de restriction HAE III à 37°C pendant une nuit, selon le protocole de shanian, 2009 (figure18).

| | MM digesting 10 µl PCR product | MM digesting 15 µl PCR product | MM digesting 20 µl PCR product |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 10x buffer | 1.5 µl | 2 µl | 2.5 µl |
| H ₂ O | 2.5 µl | 2 µl | 1.5 µl |
| <i>HaeIII</i> restriction enzyme (10 U/µl) | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Total volume | 5 µl | 5 µl | 5 µl |

Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% et visualisés sous UV (Shanian.,2009).

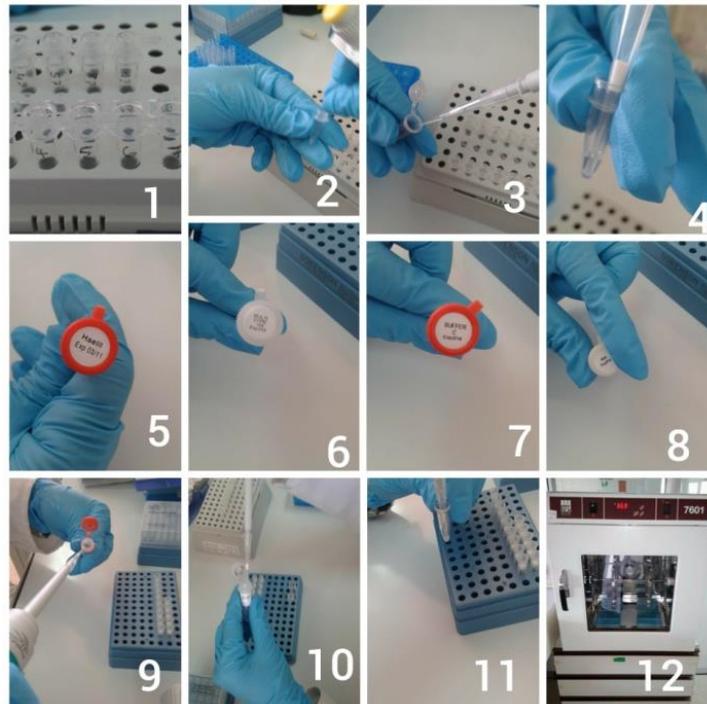


Figure 18 : Les différentes étapes de la digestion enzymatique (HaeIII) des produits PCR

Résultat et Discussion

Résultat

I. Culture des parasites dans les milieux de cultures

La culture des parasites est une étape primordiale pour effectuer deux approches complémentaires dans l'étude de la diversité biochimique et moléculaire. Deux mois ont été consacrés pour la culture des parasites, sachant que la technique biochimique nécessite en moins 300 µl d'extrait protéique pour le typage d'une souche de *Leishmania*.

Trois milieux de cultures ont été utilisés pour l'entretien des souches et la culture en masse pour la production de l'antigène leishmanien soluble « extrait protéique », ainsi que pour l'extraction de l'ADN parasitaire. Dans cette partie, notre but est d'évaluer (qualitativement) le comportement des parasites dans les deux milieux (CCS et RPMI 20S). Le milieu NNN est utilisé dans l'entretien des parasites seulement.

Sur les 26 souches étudiées, une seule souche (LIPA06) isolée d'une LC de la région de Biskra, avait un comportement particulier. La croissance de cette souche était très faible aussi bien sur CCS que sur RPMI comparée aux 24 autres souches (tableau 6).

Tableau 6 : le comportement des souches sur les milieux de cultures (+ : Culture moyen, ++ : Culture riche, +++ : Culture très riche)

| Souches N° | Origine | NNN | CCS | RPMI |
|---------------------------|---------|-----|-----|------|
| 1. MHOM/DZ/18/LIPA544/17 | M'sila | ++ | +++ | ++ |
| 2. MHOM/DZ/18/LIPA545/17 | M'sila | +++ | +++ | ++ |
| 3. MHOM/DZ/18/LIPA546/17 | M'sila | + | +++ | ++ |
| 4. MHOM/DZ/18/LIPA555/18 | M'sila | ++ | +++ | ++ |
| 5. MHOM/DZ/18/LIPA556/18 | M'sila | ++ | +++ | ++ |
| 6. MHOM/DZ/18/LIPA557/18 | M'sila | + | +++ | +++ |
| 7. MHOM/DZ/18/LIPA558/18 | M'sila | ++ | +++ | ++ |
| 8. MHOM/DZ/18/LIPA559/18 | M'sila | + | +++ | + |
| 9. MHOM/DZ/18/LIPA560/18 | M'sila | ++ | +++ | ++ |
| 10. MHOM/DZ/18/LIPA561/18 | M'sila | ++ | +++ | +++ |
| 11. MHOM/DZ/18/LIPA568/18 | M'sila | + | +++ | ++ |
| 12. MHOM/DZ/73/LIPA06 | Biskra | + | + | + |
| 13. MHOM/DZ/73/LIPA08 | Biskra | ++ | ++ | ++ |
| 14. MHOM/DZ/73/LIPA44 | Biskra | ++ | ++ | ++ |
| 15. MHOM/DZ/81/LIPA47 | Biskra | ++ | +++ | ++ |
| 16. MHOM/DZ/82/LIPA49 | Biskra | + | +++ | +++ |
| 17. MHOM/DZ/82/LIPA57 | Biskra | ++ | +++ | +++ |
| 18. MHOM/DZ/82/LIPA87 | Biskra | ++ | ++ | ++ |
| 19. MHOM/DZ/84/LIPA137 | Biskra | +++ | +++ | ++ |
| 20. MHOM/DZ/86/LIPA147 | Biskra | ++ | ++ | ++ |
| 21. MHOM/DZ/92/LIPA383 | Biskra | ++ | +++ | +++ |
| 22. MHOM/DZ/92/LIPA397 | Biskra | ++ | +++ | ++ |
| 23. MHOM/DZ/93/LIPA398 | Biskra | ++ | +++ | ++ |
| 24. MHOM/DZ/92/LIPA 367 | Biskra | + | ++ | + |
| 25. MHOM/DZ/92/LIPA386 | Biskra | ++ | ++ | +++ |
| 26. MHOM/DZ/81/LIPA38 | Biskra | ++ | ++ | ++ |

II. Etude Biochimique : « Electrophorèse sur gel épais d'amidon »

La révélation isoenzymatique à travers la technique MLEE, nous a permis de déterminer le profil électrophorétique des 26 souches typées (tableau 7 de profil). Les résultats montrent que 24 souches typées appartenaient au zymodème MON-25 du complexe *L.major* comparées aux souches marqueurs utilisés. Cependant deux souches (LIPA06) et (LIPA545/17) présentaient des profils électrophorétiques différents. Cette dernière présente une variabilité d'un seul système enzymatique sur les 5 étudiés « ME^{95/67} ». Par contre la LIPA06 présente un profil électrophorétique différent dans 3 enzymes (ME^{95/67}, FH^{48/30} et DIA⁸⁰) (figures 19, 23 et 27). Les figures 19 à 30 montrent le profil électrophorétique sur gel d'amidon des 15 systèmes révélés.

Tableau 7 : le profil enzymatique des 26 souches étudiées appartenant aux complexe *L.major*

| Souches | Origine | Zymodeme | MDH | ME | ICD | PGD | G6PD | GLUD | DIA | NP1 | NP2 | GOT1 | GOT2 | PGM | FH | GPI |
|----------------------|------------|----------|-----|--------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|----|-------|
| MHOM/DZ/18/UPA544/17 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA545/17 | M'sila | Zym-dif | 150 | 118/93 | | | | | 100 | 400 | 90 | | | | | |
| MHOM/DZ/18/UPA546/17 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA555/18 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA556/18 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA557/18 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA559/18 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA568/18 | M'sila | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/73/UPA66 | Biskra | Zym-dif | | 95/67 | | | | | 80 | | | | | | | 30/48 |
| MHOM/DZ/73/UPA08 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/73/UPA44 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/81/UPA47 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/82/UPA49 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/82/UPA67 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/82/UPA87 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/84/UPA137 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/86/UPA147 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/92/UPA383 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/93/UPA397 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/93/UPA398 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/92/UPA367 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/92/UPA386 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/81/38 | Biskra | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/18/UPA80 | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| PPPA/DZ/18/UPA233* | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/DZ/05/UPA07/05* | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/FR/78/LEM75* | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/FR/82/LEM417* | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |
| MHOM/FR/80/LEM189* | S.Marqueur | MON-25 | 150 | 88 | 100 | 122 | 94 | 200 | 100 | 400 | 90 | 110 | 120 | 118 | 87 | 77 |

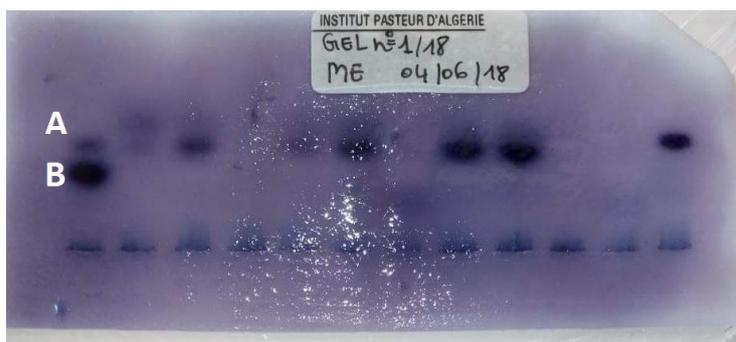


Figure 19 : profil électrophoétique de l'enzyme ME sur le gel épais d'amidon (LIPA06 : ME^{95/67})
 (1/LIPA06, 2/LIPA08, 3/LIPA47, 4/LIPA49, 5/LIPA57, 6/LIPA87, 7/LIPA80, 8/LIPA137, 9/LIPA147, 10/LIPA557, 11/LIPA07/05, 12/LEM75).

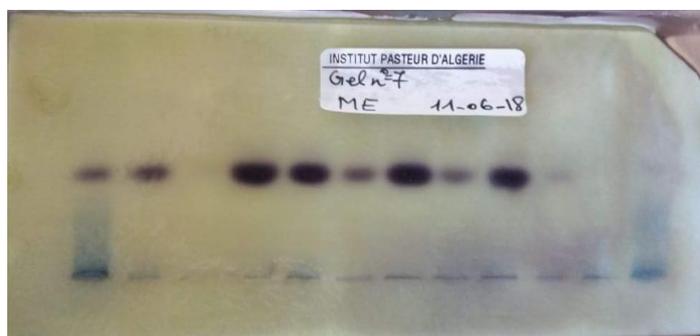


Figure 20 : profil électrophoétique de l'enzyme ME sur le gel épais d'amidon
 (1/LIPA231 ; 2/LIPA44/73, 3/LIPA383/92, 4/LIPA397/92, 5/LIPA398/93, 6/LIPA367/92, 7/LIPA386/92, 8/LIPA38/81, 9/LIPA80, 10/LIPA568/18, 11/LIPA555/18, 12/LIPA325).

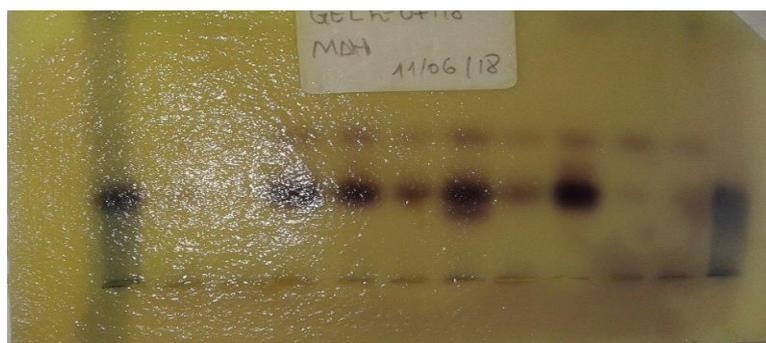


Figure 21 : profil électrophoétique de l'enzyme MDH sur le gel épais d'amidon
 (1/LIPA231 ; 2/LIPA44/73, 3/LIPA383/92, 4/LIPA397/92, 5/LIPA398/93, 6/LIPA367/92, 7/LIPA386/92, 8/LIPA38/81, 9/LIPA80, 10/LIPA568/18, 11/LIPA555/18, 12/LIPA325).

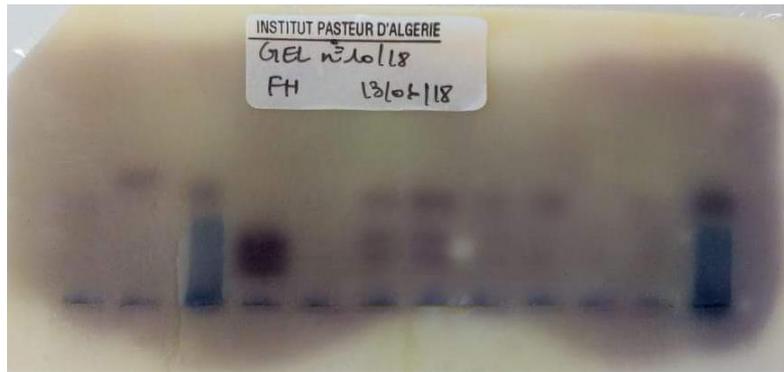


Figure 22 : profil électrophoétique de l'enzyme FH sur le gel épais d'amidon

LIPA06 :FH^{48/30}

(1/LIPA568/18, 2/LEM75, 3/LIPA231, 4/LIPA06, 5/LIPA38/81, 6/LIPA386/92, 7/LIPA367/92, 8/LIPA398/93, 9/LIPA397/92, 10/LIPA383/92, 11/LIPA44/73, 12/LIPA233).



Figure 23 : profil électrophoétique de l'enzyme FH sur le gel épais d'amidon

FH⁸⁷ (*L.major*), FH¹⁰⁰ (*L.infantum*)

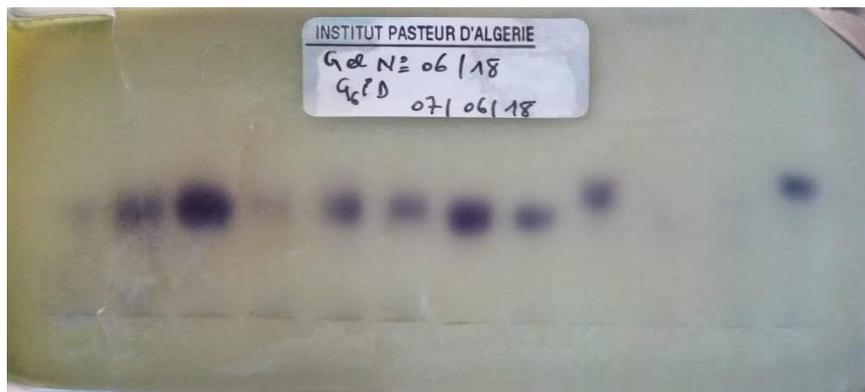


Figure 24 : profil électrophoétique de l'enzyme G6PD sur le gel épais d'amidon

(1/LIPA08, 2/LIPA47, 3/LIPA49, 4/LIPA57, 5/LIPA87, 6/LIPA137, 7/LIPA147, 8/LIPA233, 9/LIPA234, 10/LIPA06, 11/LIPA10/05, 12/LEM75).

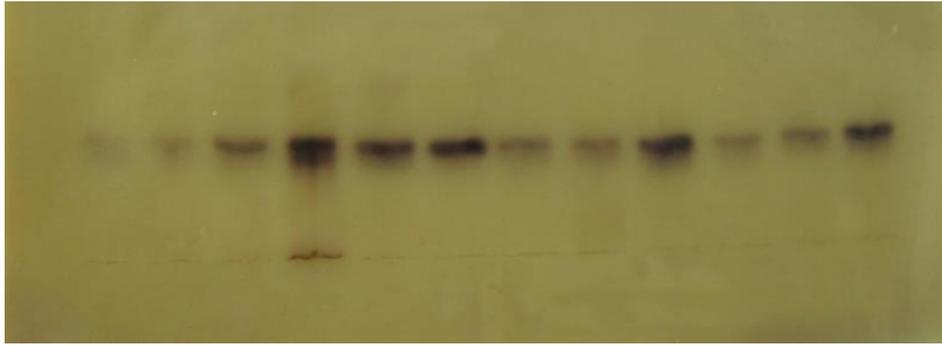


Figure 25 : profil électrophoétique de l'enzyme PGD sur le gel épais d'amidon
(1/LIPA08 ; 2/LIPA47, 3/LIPA49, 4/LIPA57, 5/LIPA87, 6/LIPA137, 7/LIPA147, 8/LIPA233,
9/LIPA234, 10/LIPA44, 11/LIPA10/05, 12/LEM75)

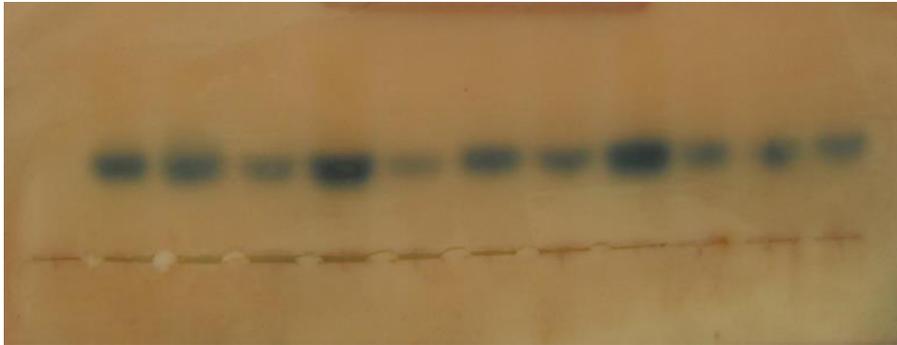


Figure 26 : profil électrophoétique de l'enzyme GOT sur le gel épais d'amidon
(1/LIPA231, 2/LIPA398/93, 3/LIPA367/92, 4/LIPA386/92, 5/LIPA397/92, 6/ LIPA38/81,
7/LIPA47, 8/LIPA49, 10/LIPA57, 11/LIPA08, 12/LEM75).



Figure 27 : profil électrophoétique de l'enzyme DIA sur le gel épais d'amidon
LIPA06 (DIA⁸⁰)
(1/LEM75, 2/LIPA10/05, **3/LIPA06**, 4/LIPA233, 5/LIPA557/17, 6/LIPA147, 7/LIPA137,
8/LIPA87, 9/LIPA57, 10/LIPA49, 11/LIPA47, 12/LIPA08).

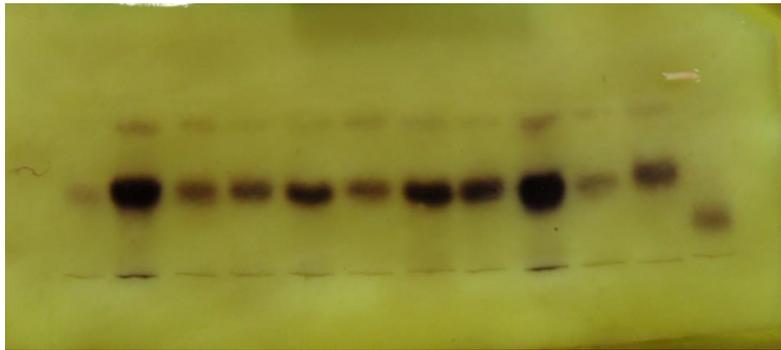


Figure 28 : Profil électrophorétique de l'enzyme NP1/NP2 sur gel épais d'amidon
 (1/LIPA231 ; 2/LIPA44/73, 3/LIPA383/92, 4/LIPA397/92, 5/LIPA398/93, 6/LIPA367/92,
 7/LIPA386/92, 8/LIPA38/81, 9/LIPA80, 10/LIPA568/18, 11/LIPA555/18, 12/LEM75).

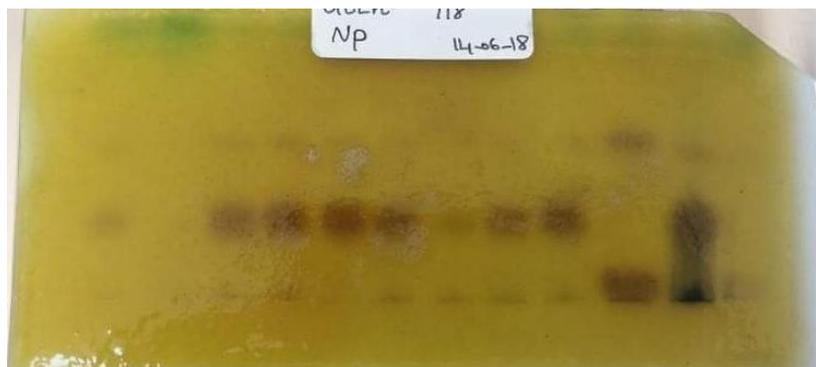


Figure 29 : Profil électrophorétique de l'enzyme NP1/NP2 sur gel épais d'amidon
 (1/LIPA44/73, 2/LIPA383/92, 3/LIPA397/92, 4/LIPA398/93, 5/LIPA367/92, 6/LIPA386/92,
 7/LIPA38/81, 8/LIPA08, 9/LIPA147 ; 10/LEM75, 11/LIPA231, 12/LIPA06)

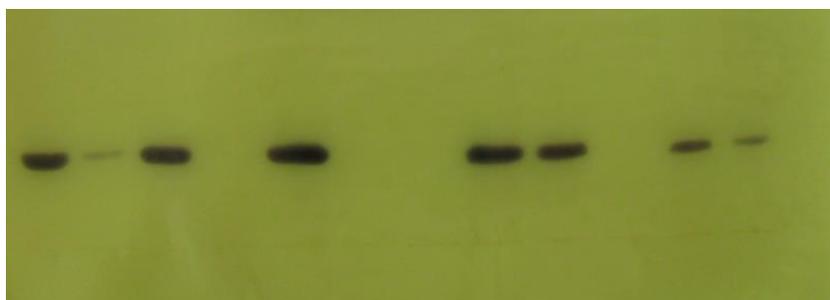


Figure 30 : Profil électrophorétique de l'enzyme ICD sur gel épais d'amidon

III. Etude moléculaire : « Polymérase Chain Réaction RFLP »

1. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques par spectrophotométrie

Le dosage par spectrophotométrie, nous a permis d'évaluer la concentration des acides nucléiques (ng/ml), leurs puretés et le degré de contamination par des ARN/protéines et le phénol.

Concernant la pureté des acides nucléiques, 5 échantillons seulement étaient purs. Les valeurs du rapport 260/280 étaient comprises entre 1,88 (LIPA44/) et 2,16 (LIPA397). Les concentrations d'ADN sont respectivement 300,68 ng/ml et 397,4 ng/ml.

Par ailleurs, 8 échantillons étaient contaminées par des protéines (les valeurs <1,8), et 18 échantillons étaient contaminées par des ARN (valeurs > 2). Par contre la contamination par le phénol était constatée chez 8 échantillons (tableau 6).

A travers ces résultats, nous avons constaté que la concentration d'ADN de la LIPA06 est la plus faible, elle est de l'ordre de 2.99 ng/ml. L'ADN de cette souche était contaminée par les protéines, mais aucune contamination par le phénol n'est observé (tableau 6). La contamination par des protéines est peut être due à la synthèse accrue des protéines du métabolisme, étant donné qu'on a récolté les parasites au cours de la phase exponentielle de croissance (parasites métacycliques).

Tableau 8 : la concentration d'ADN (ng/ml) des souches (* : souches marqueurs)

| Code Souche | Origine | Concentration D'ADN (ng) | 260/280 Pureté de L'ADN | 260/230 contamination par le Phénol |
|---------------------------|----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| 1. MHOM/DZ/18/LIPA544/17 | M'sila | 162,16 | 2,441 | 2,046 |
| 2. MHOM/DZ/18/LIPA545/17 | M'sila | 82,41 | 2,602 | 1,847 |
| 3. MHOM/DZ/18/LIPA546/17 | M'sila | 47,12 | 2,477 | 1,631 |
| 4. MHOM/DZ/18/LIPA555/18 | M'sila | 75 | 2,163 | 1,628 |
| 5. MHOM/DZ/18/LIPA556/18 | M'sila | 125,87 | 2,46 | 1,886 |
| 6. MHOM/DZ/18/LIPA557/18 | M'sila | 131,82 | 2,58 | 2,116 |
| 7. MHOM/DZ/18/LIPA559/18 | M'sila | 122,94 | 1,646 | 1,602 |
| 8. MHOM/DZ/18/LIPA560/18 | M'sila | 50,22 | 1,556 | 1,393 |
| 9. MHOM/DZ/18/LIPA561/18 | M'sila | 8,79 | 1,429 | 0,637 |
| 10. MHOM/DZ/18/LIPA562/18 | M'sila | 26,8 | 1,719 | 1,234 |
| 11. MHOM/DZ/18/LIPA568/18 | M'sila | 380,11 | 2,219 | 2,021 |
| 12. MHOM/DZ/73/LIPA06 | Biskra | 2,99 | 1,591 | 0,73 |
| 13. MHOM/DZ/73/LIPA08 | Biskra | 76,76 | 2,132 | 1,49 |
| 14. MHOM/DZ/73/LIPA44 | Biskra | 300,68 | 1,888 | 1,999 |
| 15. MHOM/DZ/81/LIPA47 | Biskra | 104,68 | 2,547 | 1,864 |
| 16. MHOM/DZ/82/LIPA49 | Biskra | 183,59 | 1,933 | 1,678 |
| 17. MHOM/DZ/82/LIPA57 | Biskra | 545,3 | 2,341 | 1,992 |
| 18. MHOM/DZ/82/LIPA87 | Biskra | 127,43 | 1,95 | 1,739 |
| 19. MHOM/DZ/84/LIPA137 | Biskra | 446,66 | 2,322 | 2,029 |
| 20. MHOM/DZ/86/LIPA147 | Biskra | 478,55 | 1,701 | 1,817 |
| 21. MHOM/DZ/92/LIPA383 | Biskra | 43,63 | 2,925 | 1,601 |
| 22. MHOM/DZ/92/LIPA397 | Biskra | 397,4 | 2,161 | 2,055 |
| 23. MHOM/DZ/93/LIPA398 | Biskra | 15,66 | 2,251 | 1,21 |
| 24. MHOM/DZ/92/LIPA 367 | Biskra | 128,95 | 2,365 | 2,023 |
| 25. MHOM/DZ/92/LIPA386 | Biskra | 35,08 | 2,243 | 1,677 |
| 26. MHOM/DZ/81/LIPA38 | Biskra | 456,28 | 1,983 | 1,961 |
| 27. MHOM/DZ/18/LIPA80* | Marqueur | 339,63 | 2,385 | 2,059 |
| 28. MHOM/DZ/18/LIPA233* | Marqueur | 219 | 1,669 | 1,585 |
| 29. MHOM/DZ/05/LIPA07/05* | Marqueur | 71,87 | 1,741 | 1,304 |
| 30. MHOM/DZ/78/LEM75* | Marqueur | 174,33 | 2,411 | 1,973 |
| 31. MHOM/DZ/82/LEM417* | Marqueur | 243,48 | 2,408 | 2,444 |
| 32. MHOOM/DZ/80/LEM189* | Marqueur | 18,15 | 5,268 | 1,085 |

2. Evaluation de la qualité de l'ADN total sur gel d'agarose

L'ADN totale (génomique de *Leishmania*) apparaît comme une bande unique. L'intensité du signal ainsi que l'apparition des smears, nous a permis d'estimer la qualité d'ADN pour l'ensemble des échantillons (figure 31). Certains échantillons présentaient des smears reflétant la contamination avec des ARN. Il s'agit des mêmes souches signalées auparavant lors de l'évaluation des ADN par spectrophotométrie (tableau 6). L'utilisation des RNase au cours des extractions, limitera certainement cette contamination.

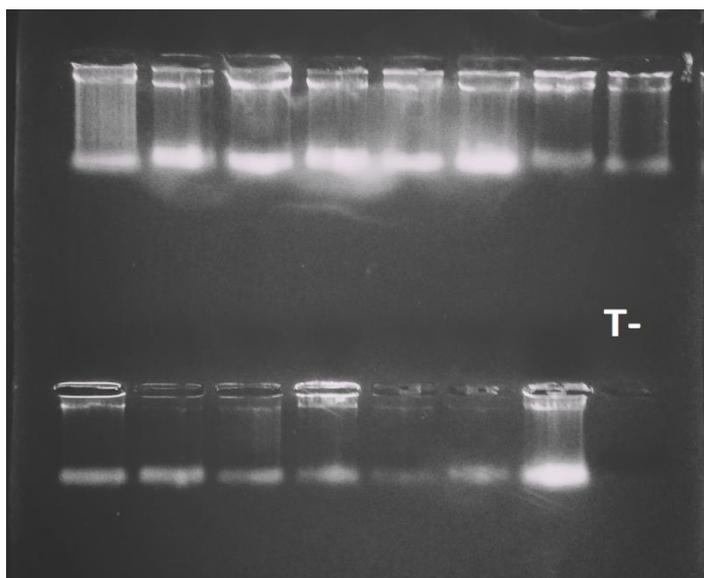


Figure 31 : Evaluation de la qualité de l'extraction sur sur gel d'Agarose (0.8%)

Ligne1 : (1/ T-, 2/LIPA545/17, 3/LIPA44, 4/LIPA47, 5/LIPA49, 6/LIPA57, 7/LIPA87, 8/LIPA06).

Ligne 2 : (1/LIPA233*, 2/LIPA147, 3/LIPA544/17, 4/LIPA546/17, 5/LEM75*, 6/LIPA383/92, 7/LIPA398/93, 8/LIPA386/92).

3. Polymérase Chain Réaction « PCR »

3.1. Evaluation de la qualité des amplicons (qualité de la PCR ITS1)

L'ADN chromosomique intacte apparaît comme une bande distincte à environ 30 Kb (300pb). La comparaison de l'intensité de cette bande avec des bandes standard (marqueur de taille de 100pb), nous a permis d'estimer la quantité et la qualité d'ADN pour l'ensemble des échantillons. Ainsi, tous les produits des amplifications (amplicons), qui ont ciblés la région ITS1 des 33 souches (26 souches étudiés et 6 souches marqueurs) ont montraient que la région ITS1 des *Leishmania* était bien amplifiée pour tous les ADN (figure 32).

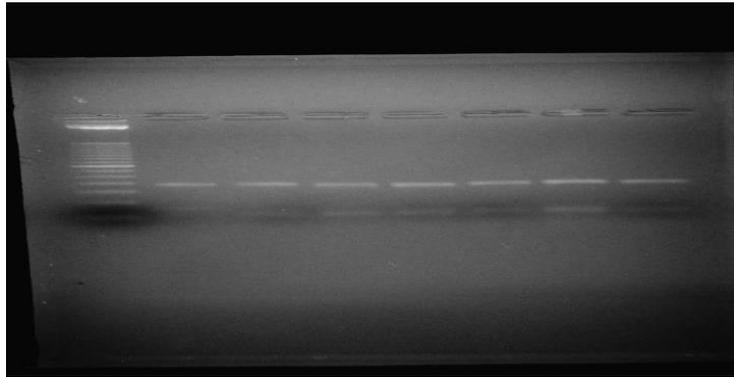


Figure 32 : Evaluation de la qualité des produits PCR ITS1 (amplicons) sur gel d'agarose (1.5%)

(1/Marqueur 100Pb, 2/LIPA08, 3/LIPA06, 4/LIPA556/18, 5/LIPA562/18, 6/LIPA49, 7/LIPA57, 8/LIPA87).

3.2. PCR RFLP ITS1

L'électrophorèse sur gel d'agarose 3%, nous a permis de caractériser les produits PCR révélés positifs, après digestion enzymatique par l'enzyme Hae III. Tous les ADN parasitaires (26 souches) appartenaient au complexe *L.major*. La région ITS1 est digérée en fragments d'ADN de 132 pb et 203 pb, confirmant ainsi l'appartenance de ces souches au complexe *L.major* (figure 33).

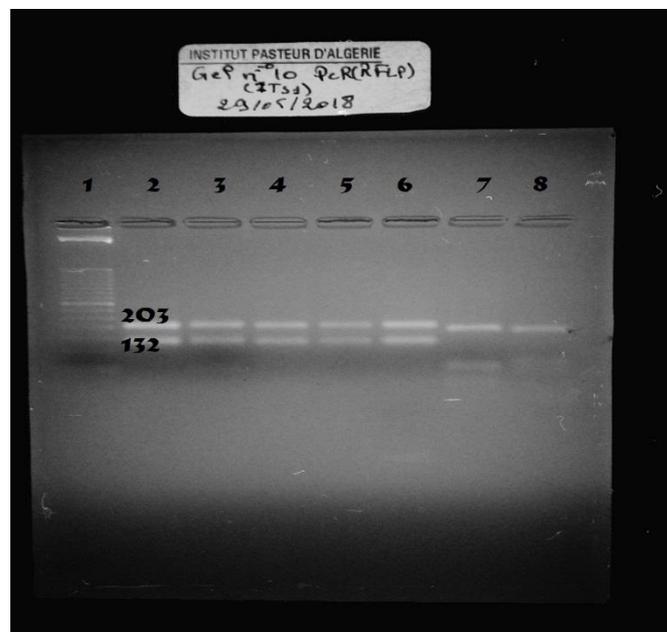


Figure 33 : PCR RFLP ITS1 (électrophorèse sur gel d'agarose 3%)

(1/Marqueur 50Pb, 2/LIPA08, 3/LIPA06, 4/LIPA556/18, 5/LIPA562/18, 6/LIPA80, 7/LIPA07/05, 8/LEM189)

3.3. PCR HSP70 et PCR RFLP HSP70

Les PCR, ciblant la région HSP70 des deux ADN parasites (LIPA06 et LIPA545), ainsi que certains ADN des souches marqueurs (LIPA233 ; LIPA10/05 ; LEM417) ont été visualisés sous UV après une électrophorèse sur gel d'agarose 1.5%. La figure 33 montre que seule la LIPA06 est amplifiée. Le produit PCR HSP70 de la LIPA06 digéré par l'enzyme HaeIII est visualisé sur gel d'agarose 3%. Cette région est digérée en deux fragments d'ADN de tailles différentes de ce qui a été signalé par la PCR RFLP ITS1 (figure 34).



Figure 34 : Evaluation de la qualité des produits PCR HSP70 sur gel d'agarose (1.5%) (1/Marqueur 100Pb, 2/LIPA06, 3/LEM417, 4/LIPA10/05, 5/LIPA545/17, LIPA560/17, 7/LIPA555/17).

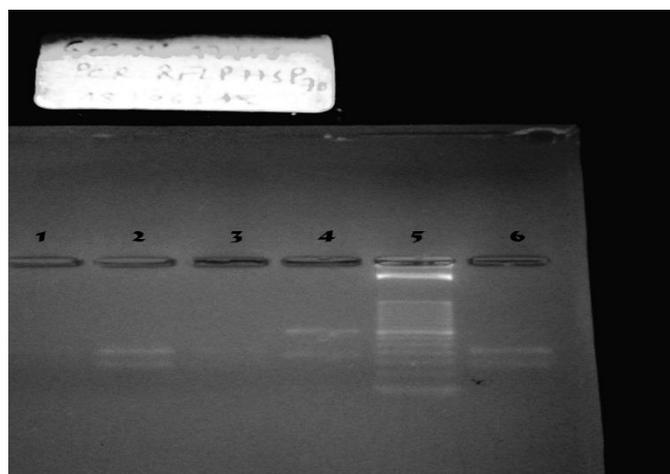


Figure 35 : PCR RFLP HSP70 (électrophorèse sur gel d'agarose 3%) (1/T-, 2/LIPA233, 3/LIPA557/18, 4/LIPA06 HSP70, 5/Marker 50Pb, 6/LIPA06 ITS1).

Discussion

L'Algérie est caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques allant du climat méditerranéen au nord au climat sahariens au sud. La leishmaniose cutanée (LC), constitue un réel problème de santé publique. Les foyers de Biskra, M'sila et Batna sont des wilayas limitrophes représentant à elles seules 80% du nombre total de LC. En 2004, cette forme a franchi la barrière de l'Atlas tellien, précisément dans le sous bassin d'El M'hir (Boudrissa *et al.*, 2011).

La majorité des souches isolées chez des patients provenant de ces régions ont été identifiées comme *L. major* MON-25, le mêmes que celles isolées de *Psammomys obesus*, *Meriones shawi* et *Phlebotomus papatasi* (Izri *et al.*, 1992). Ces différents éléments constituant le cycle épidémiologique de la LC zoonotique.

L'étude de la diversité biochimique des 26 souches de *Leishmania* isolées de LC ont montré encore une fois la prédominance du complexe *L. major* dans la majorité des souches typées aussi bien dans la région de Biskra (16 souches) que celle de M'sila (10 souches). La MLEE nous a permis non seulement de vérifier la présence de ce complexe (*L. major*) dans ces deux régions, mais aussi de cibler l'agent responsable, qui est le MON-25.

A travers notre étude, la MLEE a pu révéler pour la première fois qu'à côté du zymodème MON-25, la probabilité de l'existence de deux autres zymodèmes chez deux souches dans ces deux zones d'études : la LIPA 06 de la région de Biskra, et LIPA 545/17 de la région de M'sila.

La MLEE a révélé que la LIPA06 présente un profil électrophorétique différent dans 3 enzymes (ME^{95/67}, FH^{48/30} et DIA⁸⁰), non seulement du zymodème MON-25 principal agent de la LC signalé jusqu'à ce jour, mais aussi des autres zymodèmes existants en Algérie tels que le MON-301 agent de la LC chronique due à *L. killicki* (Harrat *et al.*, 2005) et les MON-24 et MON-80 agents de la LC sporadique dues aux *L. infantum* (Belazzoug *et al.*, 1982, Benikhlef, 2008). Par ailleurs, la souche LIPA 545/17 a présenté un profil très proche du zymodème MON-25 par rapport à cinq enzymes révélés. La variabilité de ce dernier a résidé au niveau de l'enzyme ME^{118/93}, ce qui suggère probablement l'existence d'un nouveau variant du MON-25. Cette constatation a été rapporté par (Pratlong *et al.*, 2009), ou elle a signalée la présence d'un variant « MON-269 » chez une seule souche isolée de LC en Algérie (Pratlong *et al.*, 2009). Ce zymodème diffère du MON-25 par un seul système enzymatique PGD^{122/94}. Cela pourrait correspondre à une mutation récente ou à une modification post-traductionnelle des protéines (Mauricio *et al.*, 2006). Ces constatations concordent avec la croissance des souches sur les milieux de cultures. Nous avons remarqué à travers cette étude, que la croissance de la LIPA 06 sur les milieux de cultures était faible y compris la concentration de l'ADN qui était de l'ordre de 2.99 ng/ml (tableaux 06 et 08). La faible quantité de l'extrait protéique préparé pour le typage enzymatique, nous nous a pas permis de vérifier tous les systèmes enzymatiques. L'utilisation d'autres milieux de cultures dans la culture en masse de ces deux souches, le dosage protéique et l'utilisation des inhibiteurs d'enzymes ainsi que l'utilisation des RNase dans les extractions d'ADN sont des paramètres clés qu'il faudra prendre en considération dans la confirmation de ces résultats à travers un deuxième typage isoenzymatique et moléculaire.

Il faut signaler, que dans la région de Biskra, à côté du complexe *L.major*, la MLEE a permis de détecter le zymodème MON-1 du complexe *L.infantum* chez une seule souche isolée d'une LC, et chez une seule souche isolée d'un chien (Harrat *et al.*, 2009). Dernièrement le même zymodème a été isolée chez 3 isolats de LV (Benikhlef, 2018 en cours de publication). La diversité biochimique des souches de *Leishmania* dans ce foyer ouvre la voie vers des études beaucoup plus approfondies.

Pratlong, (2009), a montré que cette espèce à un large éventail. 638 souches ont été analysées, originaires de 29 pays, du Sénégal à l'ouest du Pakistan à l'est. L'échantillon comprenait 76,8% de souches humaines, mais sa composition reflète l'épidémiologie, avec un grand nombre de souches de rongeurs et certaines souches isolées à partir de phlébotomes du sous-genre *P. Phlebotomus*, principalement *P. papatasi*. Dans cette étude, Douze zymodèmes de *L. major* ont été identifiés, dont deux sont prédominants, MON-25 et MON-26, avec trois variantes mineures MON-74, MON-103 et MON-117.

Concernant Le typage moléculaire, la PCR-RFLP ciblant l'amorce ITS1 de 26 ADN des mêmes promastigotes typés en MLEE, a révélé que tous les isolats appartenaient au complexe *L.major* y compris les deux souches LIPA06 et LIPA545. Ce résultat prouve la prédominance du complexe *L.major* dans ces deux zones d'études. Cependant l'utilisation d'un seul marqueur comme ITS1 et une seule enzyme de restriction (HaeIII) n'étaient pas suffisantes pour vérifier la diversité génétique au sein du complexe *L.major*. Néanmoins, l'utilisation de ce marqueur était indispensable pour cibler le complexe des *Leishmania* plus particulièrement pour les deux souches dont les profils étaient différents.

Il est à signaler, que les amorces « LITSR-L5, 8S » ont été initialement rapportées par El Tai *et al.* (El Tai *et al.*, 2000). Ils ont été appliqués pour la discrimination d'espèces par analyse RFLP avec l'enzyme HaeIII par Schönian *et al.* (Schönian *et al.*, 2003). Leur utilisation a permis la séparation des espèces du sous-genre *Leishmania* (*Leishmania*) mais n'a pas discriminé les espèces de *Leishmania* (*Viannia*) (Cruz *et al.*, 2013, Roelfsema *et al.*, 2011) ignorant ainsi toute variation intra-spécifique possible.

Le fragment amplifié a également été utilisé pour l'identification par séquençage, permettant une meilleure évaluation du pouvoir de discrimination obtenu avec cette cible. L'analyse la plus complète a été réalisée récemment par Van der Auwera *et al.* (Van der Auwera *et al.*, 2014), qui a évalué les séquences d'un panel globalement représentatif d'espèces.

Tojal da Silva *et al.* (Tojal da Silva *et al.*, 2006) ont proposé d'utiliser l'enzyme de restriction Sau3AI pour l'analyse RFLP de cette cible afin de permettre la séparation des espèces du sous-genre *Leishmania* (*Viannia*).

Odiwuor *et al.* (Odiwuor *et al.*, 2011) ont développé un ensemble de PCR spécifiques aux espèces pour discriminer les complexes *Leishmania* de l'Ancien Monde. Ces PCR sont imbriquées dans le fragment LITSR-L5, 8S, ce qui ouvre la possibilité à la PCR nichée d'augmenter la sensibilité. Contrairement à la technologie ITS1, Cupolillo *et al.* (Cupolillo *et al.*, 1995) pourrait discriminer toutes les espèces testées du sous-genre *Leishmania* (*Viannia*)

Par analyse PCR-RFLP d'un fragment couvrant à la fois ITS1 et ITS2. Cependant, 10 enzymes ont été nécessaires (Gert *et al.*, 2014).

Un autre marqueur « HSP70 », a été testé pour la première fois dans notre étude, afin de vérifier la variabilité génétique des deux souches LIPA06 et LIPA545 ainsi que certaines souches marqueurs. Malheureusement, la PCR RFLP HSP70 n'a fonctionné que pour l'extrait d'ADN de la souche 06. Deux bandes bien distinctes de tailles variables ont été déterminées. Cette approche moléculaire est nouvelle dans le Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'IPA et nécessite une mise au point et une étude plus approfondie pour l'exploiter dans l'étude de la diversité génétique chez *Leishmania*.

Il faut rappeler que le gène HSP70 existe entre 5 et 10 copies dans le génome de *Leishmania* (Folgueira *et al.*, 2007), et des différences mineures entre elles peuvent exister dans une souche particulière (Van der Auwera *et al.*, 2013). Garcia *et al.* (Garcia *et al.*, 2004) ont été les premiers à exploiter la variabilité du gène de la discrimination des espèces du sous-genre *Leishmania* (Viannia) sur la base de l'analyse RFLP. Plusieurs auteurs ont augmenté le nombre d'enzymes de restriction pour permettre le typage de toutes les espèces de *Leishmania*, quelle que soit leur origine ou sous-genre (Gert *et al.*, 2014). Alves da Silva *et al.* (Alves da Silva *et al.*, 2010) ont évalué la cible sur toutes les espèces circulant au Brésil, en utilisant à la fois l'analyse RFLP et le séquençage. Cette étude a été complétée par Van der Auwera *et al.* (Gert *et al.*, 2014), qui ont rapporté plus de 200 séquences du monde. Toutes les études ont montré une congruence presque parfaite avec le typage MLEE, ce qui fait de HSP70 la cible de typage des espèces la plus largement validée à ce jour. Comparé à d'autres cibles, HSP70 combine la possibilité d'un typage précis au niveau de l'espèce.

Conclusion

Conclusion

L'analyse des isoenzymes de *Leishmania* (MLEE) est une méthode puissante, qui a contribué pendant plus de 20 ans à des études dans de nombreux foyers de leishmaniose dans le monde. Cette technique fructueuse a été étudiée dans l'étude de la diversité de *Leishmania*, ce qui a conduit à des révisions taxonomiques ultérieures. Beaucoup de ces recherches ont été menées par plusieurs équipes. Ils ont contribué à la compréhension du fonctionnement des foyers de leishmanioses en Afrique du Nord : Algérie, Maroc et Tunisie ; en Europe : le sud de la France et le Portugal ; au Proche-Orient : Jordanie, Syrie et Yémen, et Afrique orientale : Soudan.

Le typage isoenzymatique des souches de *Leishmania* reste la méthode standard pour l'identification précise des espèces avec une détermination du zymodème. A travers notre étude, nous avons pu évaluer le statut taxonomique par la MLEE, d'un nombre restreint de souches isolées de LC dans deux anciens foyers de LCZ ; Biskra et Msila. A côté du MON-25 agent principal de la LCZ dans ces deux zones, l'existence d'autres zymodèmes n'est pas épargné, vu l'émergence et la diffusion de la LCZ dans de nouvelles zones d'infection.

Cependant, la MLEE présente certaines limites inhérentes car elle est laborieuse, longue et coûteuse, et elle est effectuée seulement par quelques laboratoires de référence. En outre, la méthode MLEE nécessite l'isolement du parasite. Cette technique a besoin d'un outil moléculaire complémentaire et plus rapide à réaliser comme les PCR RFLP ciblant d'autres marqueurs moléculaires, MLMT, MLST et les séquençages du génome pour identifier le parasite en cas de culture négative ou contaminée et effectuer des études beaucoup plus approfondies dans le domaine de la diversité génétique de *Leishmania*.

Références bibliographiques

-
1. Acebey L., Julian V, Sauvain M.(2008)- Ethnopharmacologie et leishmaniose en Amérique latin Ethiopharman°41: p14-32.
 2. Adel A., Abatih E., Speybroeck N., Soukehal A., Bouguedour R., Boughalem K., (2015)- Estimation of Canine Leishmania Infection Prevalence in Six Cities of the Algerian Littoral Zone Using a Bayesian Approach. PLoS ONE.
 3. Akhoundi M., Kuhls k., Cannet A., Votýpka J., Marty P., Delaunay P., Sereno D. (2016)- A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. PLoS Negl Trop Dis.
 4. Alvar J., Velez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P. (2012)- Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): P 35671.
 5. Bañuls A.L., Michel M.H., Tibayrenc. (2002)- Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Volume 96. P: 9–13.*
 6. Belazzoug S.(1983)- Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie) infestation naturelle de "Psammomys obesus" (rongeur ,gerbillide) .Bull So Pathol Exot 76:p146-149
 7. Belazzoug S., (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. assay for *Leishmania major/Leishmania kill*.
 8. Belazzoug S., Addadi K., Mokrani T., Hafirassou N., Hamrioui B *et al.* (1985)-La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. Ann Soc Belg Med Trop 65:p 329-335.
 9. Belazzoug S., Ammar Khodja A., Rioux J.A., Pratlong F. (1986)- Forme chronique de leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania major*. Yakimoff et Schokhor, 1914 L'homme, réservoir éventuel. *Coll Inter CNRS/INSERM 1984 IME.EE* Montpellier :p 459-461.
 10. Belazzoug S., Ammar khoudja, *et al.*,(1985)- La leishmaniose cutanée du Nord de l'algérie . Bull Soc Pathol Exot ; 78 : p 615-622.
 11. Belazzoug S., Bendali-Braham S., Lakhel Z., Abdennebi H. (1986)- Hémagglutination indirecte dans le sérodiagnostic de la Leishmaniose viscérale, comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. Arch Inst Pasteur Alger 1986;55:p107-112.
 12. BelazzougS.,(1984)- La leishmaniose en algérie à travers l'identification isoenzymatique des souches. Coll Inter Tax Phy des leishmania, Montpellier :p 397-400.
 13. Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-braham B., Belkaid B. (2004)- présence de leishmania infantum mon-24 chez le chien.
 14. Boudrissa A., Cherif K., Kherrachi I., Benbetka S., Bouiba L., Boubidi S.C., Benikhlef R., Arrar L., Hamrioui B., Harrat Z.(2012)- Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria.
 15. Boulanger B., Heym H., Mayor J.M., Pietrzy k.(1973)- An absolute calorimeter for high power CO₂ laser.
 16. Cantacessi C., Danta Cantacessi C., Dantas-Torres F., Nolan M.J., Otranto D.(2015)- The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics.

-
17. Cantacessi C., Dantas-Torres F., Nolan J., Otranto D.(2018)- The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, Vol. 31, No. 3/100-108.
 18. Christopher S Peacock Kathy Seeger Matthew Berriman Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease
 19. Christopher S., Seeger K., Berriman K. (2007)- Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease.
 20. Cruz I ., Millet A., Carrillo E., Chenik M., Salotra P., Verma S., Veland N., Jara M., Adaui V., Castrillon C., Arévalo J., Moreno J., Canavate C. (2013)- An approach for interlaboratory comparison of conventional and realtime PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol*. P : 281–289.
 21. Cuesta S., Rahman S., Furnham N., Thornton J. (2015)- The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*; p: 1–5.
 22. . Cupolillo E., Grimaldi J.G., Momen H., Beverley S.M. (1995)- Intergenic Region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 73.p: 145–155.
 23. Dedet. J.P.(2009)- *Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique Elsevier Masson Sas a-10* p 508-506.
 24. Dedet., J.P.(1990)- Epidémiologie des leishmanioses en Algérie. 7-La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 70, 250-265.
 25. Dedet., J.P.(1999)- Les leishmanioses. *Ellipses Paris Edp* : p253.
 26. Dujardin J.C., Victoir K., De Doncher S., Gerboudj S., Le Rey D. (2000)- Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Volume 96, Supplement 1, p 81-86.
 27. Eddaikra N., Ait-Oudhia K., Kherrachi I., Oury B., Moulti-Mati F., Benikhlef R., et al. (2018)- Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. *PLoS Negl Trop Dis*
 28. Eddaikra N., Ait-Oudhia K., Oury B, Farida M.M., Harrat Z., et al. (2017)- *Leishmania* antimony resistance/susceptibility in Algerian foci. *Open J Trop Med* 1(1): 024-032.
 29. El Tai N., Osman O., El Fari M., Presber W., Schönian G. (2000)- Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med* p: 575–579.
 30. Fraga J., Montalvo A.M., De doncker S., Dujardin J.C., Auwera J. (2000)- Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and evolution*. Volume 10, Issue 2: p 238-245. From clinical samples.
 31. Gay E., Guegan H., Ameline M., Gangneux J.P. (2015) Les leishmanioses humaines : Parasitoses importées et autochtones : p 61-65.
 32. Gennady P. Manchenko. (2003)-*Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, Second Edition
 33. Gert Van A., Jean-Claude A.(2014)- Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *Dujardina,b. Clinical Microbiology Reviews ; Volume 28 Number 2*.
 34. Haouas N., Garrab S., Gorcii M., Khorchani H., Chargui N., Ravel C., et al. (2010)- Development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.
 35. Harrat Z, Hamrioui B., *et al.* (1996)- Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en algerie .*Bull Soc Pathol Exot* ; 88 p180-184.

-
36. Harrat Z., Hamrioui B., Belkaid M., Tabet-Derraz O.(1995)- point actuel sur l'épidémiologie des leishmaniose en Algérie : p 180-184.
 37. Karine R.O., César G.H., Elaine C., Bento., Gabriel A. N., Cecilia G., Monique G., Tiburcio S., André L., Eliane L.S.(1985)- *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. Israel Cruz Gert Van der Auwera Isabel Mauricio Gabriele.
 38. Kazemi B.(2011)- Organisation génomique des espèces de *Leishmania*. Journal iranien de parasitologie ; 6 (3): p 1-18
 39. Lissor A.(2003)- Understanding WMI Scripting. P 622
 40. Luiz A., Jansen A.M.(2014)- Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 3: p 251–262.
 41. Mauricio I.L., Yeo M., Baghaei M., Doto D., Pratlong F., Zemanova E., *et al.* (2006)- Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, and PGD). Int J Parasitol; 36:575–69.
 42. Moller M., Al-Jawabreh A., Diezmann S., Wirth T., Schnur F., Strelkova M., Kovalenko D., Razakov S., Schwenkenbecher J, Kuhls K., Schönián G.(1959).

Identification of geographically distribute sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis.

43. Ndoye H.A., Reyburn H., Bailey J.W., Smith D.(1998)- A nested-PCR based schizodeme Method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J Clin Microbiol; 36:2877–81.
44. Oddone R., Schweynoch C., Schönián G., de Sousa C.S., Cupolillo E., Espinosa D., *et al.*(2009)- Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. J Clin Microbiol; 47:2818–25.
45. Odiwuor S.O., Saad A.A., De Doncker S., Maes I., Laurent T., El Safi S., Mbuchi M., Buscher P., Dujardin J.C., Van der Auwera G. (2011)- Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30. P: 209–218.
46. Ortiz J, Martinez-Carrasco C, Berriatua E. (2018)- Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. Veterinary Parasitology. P: 1-28.
47. Pratlong F., Derreur J., Ravel C., Balard Y., Serres G., Lanotte G., Rioux J.A., Dedet J.P.(2009)- Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains.
48. Rioux J A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Perieres J.(1990)- Taxonomy of *leishmania*. Use of isoenzymes suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 65: n° 3, p: 111-125.
49. Risueno J., Ortuno M., Perez-Cutillas P., Goyena E., Maia C., Cortes S., Campino L., Bernal L.J., Munoz C., Arcenillas I., Martinez-Rondan F.J., Gonzalvez M., Collantes F., Ortiz J., Martinez-Carrasco C., Berriatua E.(2018)- Epidimiological and genetic studies suggest a common leishmania infantum transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in southeast Spain. Veterinary parasitology. P 1-28.

-
50. Roelfsema J.H., Nozari N., Herremans T., Kortbeek L.M., Pinelli E. (2011) - Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Exp Parasitol* 127. P: 36–41.
51. Rougeron V., DeMeeûs T., Bañuls A-L. (2016)- Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. *Infection, Genetics and Evolution*. P: 1-5.
52. Safjanova V.M. (1987)- Le problème de taxonomie chez les *Leishmania*. In : *Les Leishmanies*. Léningrad: Académie Soviétique des Sciences. Science : p 5–109.
53. Sambrook., J., Fritsch E.F., and T. Maniatis. (1989)-*Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
54. Sigrid C.(2011)- The genetic tool box for *Leishmania* parasites, *Bioengineered Bugs*; 2:6.p 320.
55. Schonian., Katrin K., Cupolillo E.(2009)- molecular procedures Training cours
Molecular Epidemiology Leishmaniasis.
56. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H.D., Presber W., Jaffe C.L. (2003)- PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. P: 349–358.
57. Steverding D. (2017)- The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*; p:1-10.
58. Tojal da Silva A.C, Cupolillo E., Volpini A.C., Almeida R., Romero G.A. (2006)- Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 11. P: 1388–1398.
59. Van der Auwera G., Ravel C., Verweij J.J., Bart A., Schönian G., Felger I.
60. (2014)- Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol* 52. p: 1098–1104.
61. Van Eys G.J., Schoone G.J., Kroon N.C., Ebeling S.B.(1992)- Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*; 51:133–42.
62. Vilela Dionicia G.(2008)- Analysis of Gene Expression in the *Leishmania* life cycle: *Leishmania (viannia) braziliensis* and *L (viannia) peruviana* model. Thesis University Maastricht. 121 : p 17
63. World Health Organization (WHO). (2011)- Expert Committee on the control of leishmaniases, control of the leishmaniases .Report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniases, geneva, 22 - 26 march 2010 who technical report series, Ed WHO (Geneva) Vol.
64. World Health Organization (WHO). (2015)- South-east Asia poised to defeat visceral leishmaniasis (kala-azar). Geneva Three countries of whose Southeast Asia region.

Autre référence :

<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/1PentosePhosphate/1PentoePhosphate.htm>

<http://leblogdestella.over-blog.com/2017/07/le-phlebotome-un-danger-pour-l-homme.html>

https://d-maps.com/carte.php?num_car=4429&lang=fr

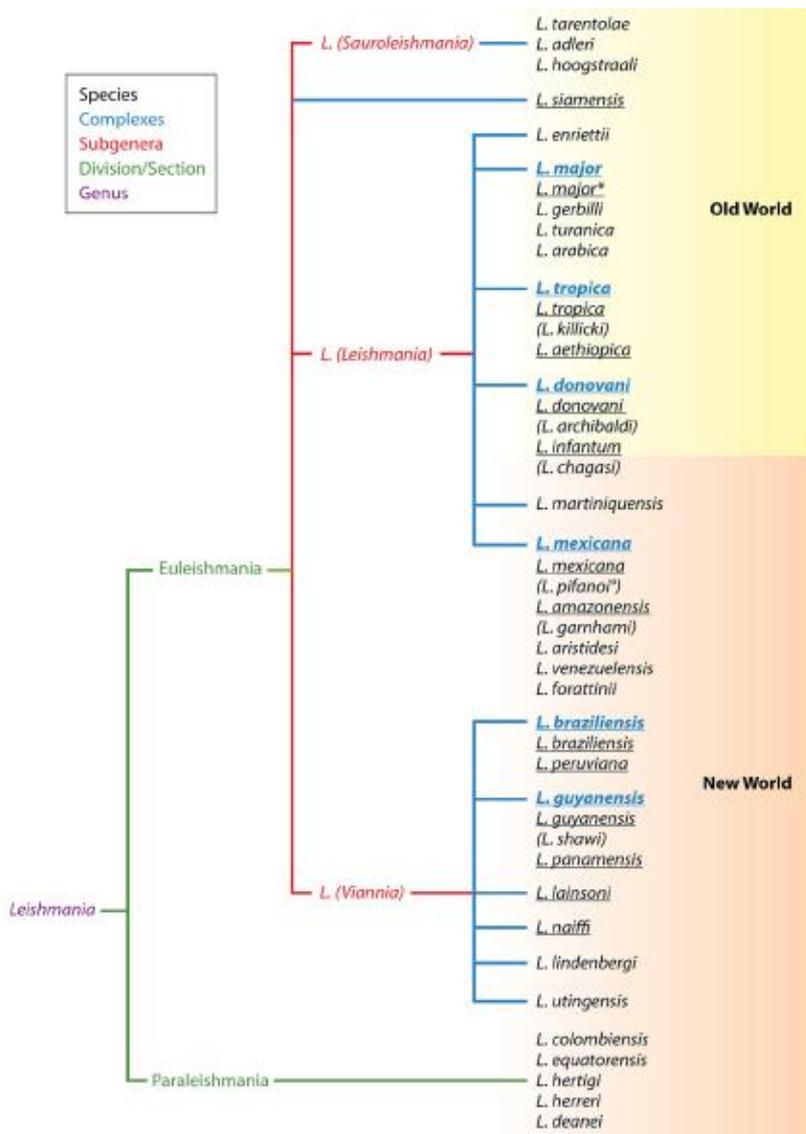
https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_Krebs

<https://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-biologie-amplification-fragment-adn.html>



Annexe

Annexe 01 : Taxonomie basée sur la MLEE du genre *Leishmania* selon Schönian (Gert et al., 2015)



Annexe 02 : Taxonomie de *Leishmania* basée sur la MLST (Gert *et al.*, 2014).

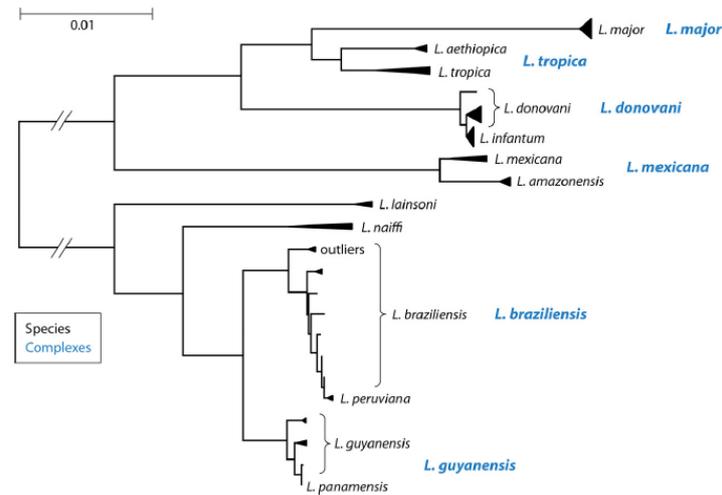


FIG 2 Multilocus sequence analysis of Van der Auwera *et al.* (60), based on sequences of 7 housekeeping genes. Each species and species complex are indicated, as in Fig. 1. *L. braziliensis* outliers are discussed in "Clinically Relevant Taxa: Certainties and Doubts." *L. shawi* was not included in this analysis, and *L. panamensis* was represented by a single strain. The dissimilarity scale is depicted in the top left corner, in substitutions per nucleotide.

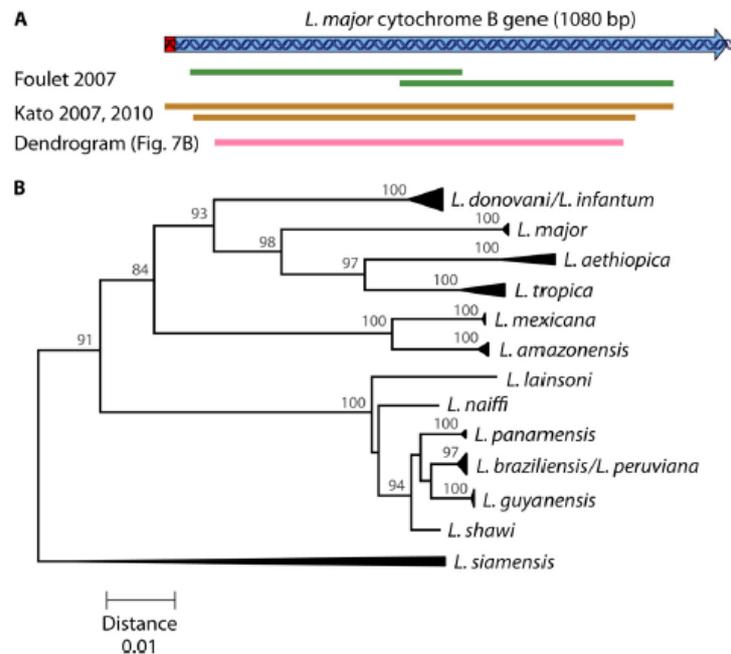
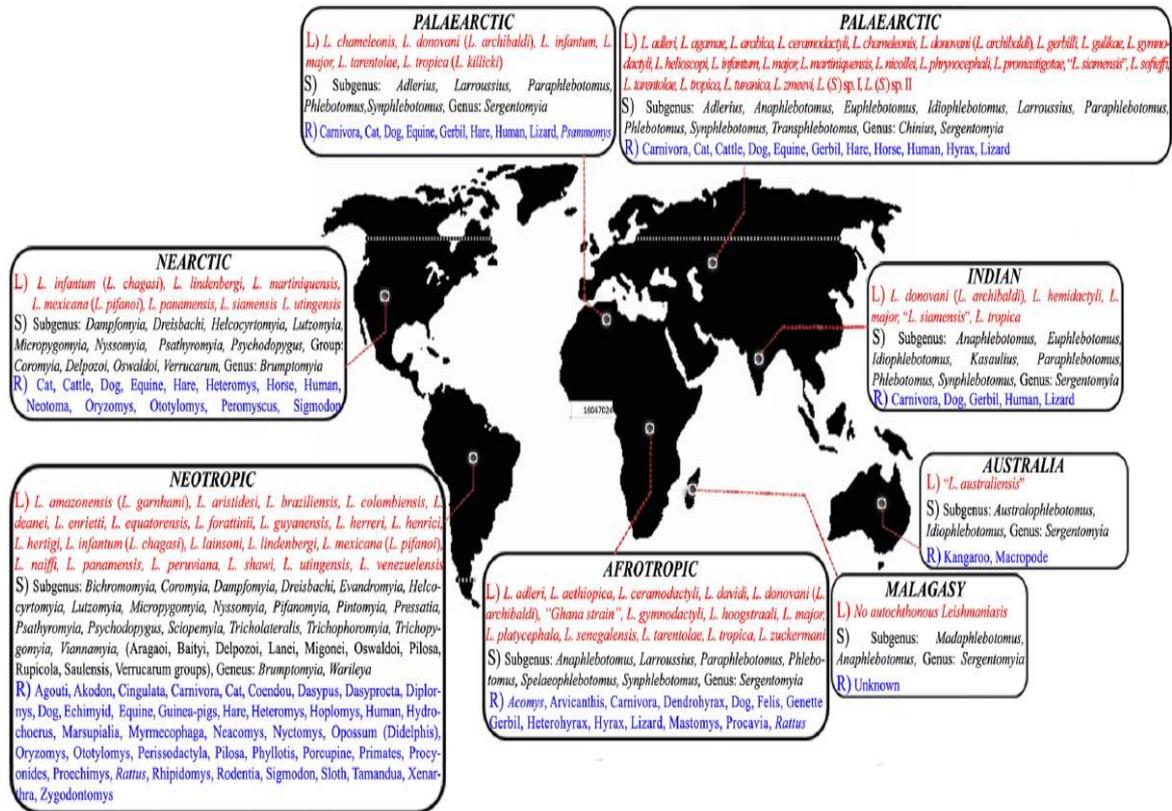


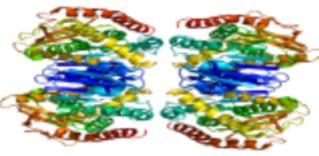
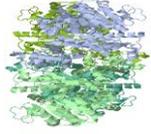
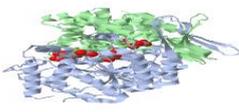
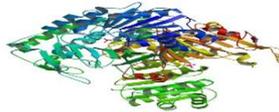
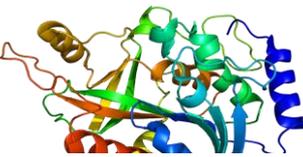
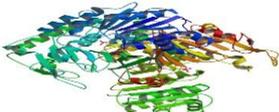
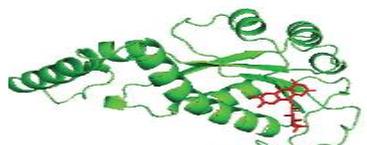
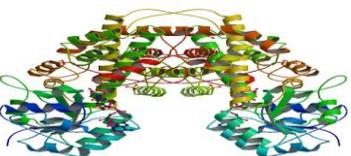
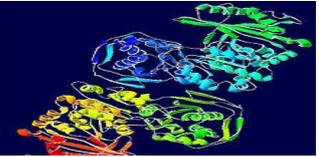
FIG 7 (A) Cytochrome *b* coding sequence of *L. major* (GenBank accession number AB095961) (163). The editing region is shown in red, and the arrow indicates the sense direction. The two overlapping fragments sequenced for typing of clinical samples, covering 887 bp in total, are depicted in green (164). Other fragments amplified for typing of both clinical samples and sand flies are shown in brown, the smallest of which (817 bp) is sequenced (165). The larger brown fragment is the outer PCR amplicon in a nested PCR approach needed for human sample analysis (166). (B) Dendrogram constructed on the basis of cytochrome *b* gene sequences of reference isolates reported by Luyo-Acero *et al.* (163), Asato *et al.* (82), Foulet *et al.* (164), and Leelayova *et al.* (22), complemented with the sequences under GenBank accession numbers AB433279, AB433280, AB433282, AB566382, AB566381, and AB566380. The analyzed fragment is indicated in panel A (pink fragment). The dendrogram was constructed by the neighbor-joining method and is based on uncorrected *p*-distances (the scale is shown below, in substitutions per nucleotide). Bootstrap values from a 2,000-replicate analysis are depicted in percentages at the internodes, when higher than 70%. The dendrogram was constructed with the software package MEGA5 (253).

Annexe 03 : Les principaux foyers de leishmanioses (Akhoundi et al., 2016).



Geographical distributions of various *Leishmania* spp.; sandflies and animal reservoirs in the Old and New World. L: *Leishmania* (species), S: Sandfly (genus or subgenus), R: Reservoir (genus or family).

Annexe 05: configuration tri-dimensionnelles des enzymes

| | | |
|---|--|--|
| <p>Malate déshydrogénase : MDH, EC 1.1.1.37</p>  | <p>Glutamate déshydrogénase: GLUD, EC 1.4.1.3.</p>  | <p>Enzyme malique : ME, EC 1.1.1.40</p>  |
| <p>Isocitrate déshydrogénase: ICD, EC 1.1.1.42</p>  | <p>glucose-6-phosphate déshydrogénase : G6PD, EC 1.1.1.49</p>  | <p>Purine nucléosidephosphorylase: NP 2, EC 2.4.2.</p>  |
| <p>PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose- 6-phosphate déshydrogénase</p>  | <p>glucose-6-phosphate déshydrogénase : G6PD, EC 1.1.1.49</p>  | <p>Glutamate-oxaloacetate transaminase: GOT 1, EC 2.6.1.1.</p>  |
| <p>Purinenucléosidephosphory lase: NP 1, EC 2.4.2.1.</p>  | <p>Glutamate-oxaloacetate transaminase: GOT 2, EC 2.6.1.1.</p>  | <p>NADH diaphorase : DIA, EC 1.6.2.2.</p>  |
| <p>PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose- 6-phosphate déshydrogénase</p>  | <p>Glutamate déshydrogénase: GLUD, EC 1.4.1.3.</p>  | <p>Phosphoglucomutase : PGM EC 5.4.2.2.</p>  |

Annexe 06 : les systèmes enzymatiques et solutions de révélation

| | Enzymes | Tampon de réaction | Substrats et cofacteurs | Enzyme et colorants |
|---------------------------|---|---------------------------|---|--|
| Les Déshydrogénase | Isocitrate déshydrogénase (ICD) EC.1.1.1.42 | Tampon tric-HCL 0.2M | MgCL ₂ .6H ₂ O (0.25M) .. 1ml Acide isocitrique (0.1M) .. 4ml NADP 1% 1ml NBT 1% 1ml | PMS1 % 0.5 ml AGAR2% 5ml Révélation a 37°C |
| | Enzyme malique (ME) EC.1.1.1.40 Malate déshydrogénase (MDH) EC .1.1.37 | Tampon tric-HCL 0.2M | Solution A 5ml NAD 1% 1ml NBT 1% 1ml NaH ₂ PO ₄ 10mg | PMS1 % 0.5 ml AGAR2% 5ml Révélation a 37°C |
| | Phosphogluconate Déshydrogénase (PGD) | Tampon tric-HCL 0.2M | Acide-6-phosphogluconique .. 40mg MgCL ₂ .6H ₂ O (0.5M) 1ml NADP 1% 1ml NBT 1% 1ml | PMS1 % 1 ml AGAR2% 5ml Révélation a 37°C |
| | Glutamate Déshydrogénase (GLUD) E.C.1.4.1.3 | Tampon tric-HCL 0.2M | Lglutamic acid sel monosodique (845mg dans 5ml H ₂ O) ... 5ml NADP 1% 2.5ml NBT 1% 2ml | PMS1 % 1 ml AGAR2% 10ml Revelation a 37°C |
| | Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (G6PD) EC.1.1.1.49 | Tampon tric-HCL 0.2M | Glucose-6-phosphate 20mg EDTA 10mg NADP 1% 1ml NBT 1% 1ml | PMS1 % 0.5 ml AGAR2% 5ml Révélation 37°C |
| | NADH Diaphorase (DIA) E.C.1.6.2.2 | Tampon tric-HCL 0.2M | B NADH 10mg Incubation 37°C pendant 30 mn MTT 10mg/ HCL (0.2M) PH 8 DICIP (1 mg/1ml de tris (PH8)). 0.5ml | Ajouter les solutions 1+2+3 + AGAR 2% Révélation temp ambiante |
| Lyase | Fumarate déshydrogénase (FH) EC.4.2.2.2 | Tampon tric-HCL 0.2M | Fumaric acid sel disodique ... 580mg NAD 1% 3ml Pyruvique sel monosodique .. 20mg NBT 1% 3mn | Malic déshydrogénase ... 200ul PMS1 % 0.5 ml AGAR2% 5ml Révélation à 37°C |
| Transférase | Purine nucléoside phosphorylase (NP) E.C.2.4.2.1 | Tampon tric-HCL 0.2M | Inosine 40mg NBT 1% 2ml | Xanthine oxydase 100ul PMS1 % 1ml AGAR2% 10ml Révélation à 37°C |
| | Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) E.C.2.6.1.1 | Tampon tric-HCL 0.2M | Tris HCL (0.2M) PH8 75ml Alpha kétoglutarate 150mg Acide aspartique 300mg Pyridoxal-5-phosphate 15mg | Fast blue BB 225mg Tris HCL (0.2M) PH 8 75ml Révélation à 37°C |
| | Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1 | Tampon tric-HCL 0.2M | MgCL ₂ .6H ₂ O (0.5M) 1ml NADP 1% 0.5ml NAD 1% 1ml NBT 1% 1ml Glucose-1-phosphate 300mg | Glucose-6-phosphate Déshydrogénase 50ul PMS1 % 0.5 ml AGAR2% 5ml Révélation à 37°C C |

Annexe 08: Matériels non biologique

Appareillage

- Appareil d'électrophorèse horizontale et accessoire
- Appareil photographique
- Autoclave
- Bain marie
- Centrifugeuse à froid et a chaud
- Chambre froide
- Congélateur – 20 °C
- Etuve à 37 °C
- Hôte a flux laminaire
- Réfrigérateur

Equipements

- Agitateur magnétique
- Balance de précision
- Microscope optique
- Micropipettes de 100, 200, 1000 μL
- Ph mètre
- Pompe à vide
- Bac a gel
- Bac à électrodes
- Moule en plexiglas
- Plaque e verre
- Peigne à dents

Produits chimiques

- Acide acétique CHCOOH
- Acide chlorhydrique HCL
- Acide phosphorique HPO_4
- Alcool 95°
- Amidon
- Bleu de bromothymol
- Chlore de potassium KCL
- Citrate $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7, 2\text{H}_2\text{O}$
- Ethanol 95 °
- Hydroxyde de sodium NaOH
- Glycérol $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$

Additifs

- Agar noble
- Carbonate de sodium anhydre Na_2CO

-
- Chlorure de magnésium MgCL₂, 6H₂O
 - DICP : 2-6 dichlorophénol indophénol Na Salt grade I
 - EDTA : Acide éthylène diaminetetracétique C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈, 2H₂O
 - Fast blue BB : 4-benzoylamino-2,5 diethoxybenzenediazonium chloride salt C₁₇H₁₈NOCL ½ Zn CL₂
 - MTT : (4-5 diméthylthiazol 2)-2.5 diphényl tétrazolium bromide : thiazolyl blue
 - NBT : Nitro blue tétrazolium C₄₀H₀CL₂N₁₀O₆
 - PMS : Phénasine méthosulfate (N-méthyl dibenzopyrazine methyl sulfate C₁H₁₁N₂CHSO₄
 - Tris hydroxyméthyl aminomethane C₄H₁₁NO

Réactifs

- Acide aspartique C₄H₇NO₄
- Acide fumarique sel monosodique C₄H₂O₄Na₂
- Acide fumarique disodique C₄H₂O₄Na₂
- Acide L glutamique monosodique C₅H₈NO₄
- Acide isocitrique C₅H₆O₇Na
- Acide maléique disodique C₄H₄O₄
- L acide malique C₄H₄O₄
- Acide-6-phosphogluconique risodiaque C₆H₁₀O₁₀PNa, 2H₂O
- Alpha ketoglutarate C₅H₅O₅K
- Fructose -6-phosphate C₆H₁₁O₉PNa₂
- Glucose -1-phosphate C₆H₁₁O₉PK₂, 2H₂O
- Glucose-6-phosphate C₆H₁₁O₉PNa
- Inosine C₁₀H₁₂N₄O₅
- Pyruvate sel monosodique CHONa

Enzymes

- G6PD : Glucose-6- phosphate déshydrogénase
- MDH : Acide malique déshydrogénase
- PGI : Phosphoglucose isomerase
- Mannose-6- phosphatase de BA

Coenzymes

- NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide grade I C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂
- NADP : Bicotinamide adénine dinucléotide phosohate C₂₁H₂₆N₇O₁₇PNa₂