

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

Université Blida-1

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**



**Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du Diplôme de Master**

Filière : Sciences biologiques

Option : Génétique et Physiologie

Thème :

**Étude de la diversité génétique de *Leishmania* dans
l'Algérois : ALGER-TIPAZA**

Réalisé par : Mr. KHERROUBI Ayoub

Soutenu publiquement devant les jury:

Mme. HAMZI W.	MAA-USDB1	Présidente
Mr. Mohamed Saïd R.	MCB-USDB1	Examineur
Mme. EDDAIKRA N.	MR-IPA	Promotrice
Mme. EDDAIKRA A.	MAA - USDB1	Co-promotrice

Promotion: 2016/2017

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie le bon **DIEU**, tout puissant pour la volonté, l'opportunité et la patience qu'il m'a donné afin de mener à terme ce travail.

Ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrai témoigner toute ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance et ma profonde gratitude à l'égard de ma promotrice **Mme EDDAIKRA N**, Maitre de recherche au service d'éco épidémiologie parasitaire à l'IPA, qui m'a témoigné tant de compréhension et qui m'a encouragé et soutenue tout au long de la réalisation de ce modeste travail.

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

Il m'est très agréable d'exprimer mes meilleurs sentiments envers **Mme HEMZI.W** d'avoir accepté de présider mon jury, et **Mr MOHAMED SAID R** d'avoir accepté d'examiner mon travail

J'adresse mes gratitudes à **Mme DJENNAD -KHERACHI I**, chargée d'études au service d'éco épidémiologie parasitaire à l'IPA, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. et pour sa patience, sa disponibilité et surtout ces judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Enfin, Mes remerciements vont également à toute l'équipe du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut pasteur.

DEDICACE

Tout d'abord, et avant tout je remercie « **dieu** » le tout puissant et le clément de m'avoir donné assez de courage et de force pour élaborer et représenter ce modeste travail.

Je dédie ce travail a mes chers **parents**, pour leur soutien sans faille tout au long de ces longues études, ont tout sacrifié pour moi n'épargnant ni santé ni efforts.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude, et dont je suis fière, autant

qu'ils peuvent l'être de moi. Je vous suis très redevable.

A mes potes **Khaled; Salah eddine; Houcine ; Dhiaa; Youcef;**

A mes chers frères **Mohamed, Houssemeddine**

A ma sœur **Ibtissem**

A mes chères amis **Rida; Walid ; Mohamed ; Ramadan ; Saïd...**

A toute la famille **Kherroubi et Abdou**

A tout mes amis et collègues de la promotion 2016/2017

A toute personne qui ma aidez ou contribué à l'élaboration de ce travail.

Résumé

Les leishmanioses sont des infections parasitaires communes à l'homme et à certains animaux (anthropozoonoses), elles sont causées par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, et transmises à l'homme par une piqure d'un insecte vecteur, le phlébotome femelle hématophage. Les leishmanioses représentent un groupe de maladies parasitaires d'expression clinique variée. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions de cas. L'Algérie qui compte parmi les pays les plus exposés est concernée par deux formes de leishmaniose coexistent à l'état endémique : la LC et la LV, la recrudescence alarmante dans ce pays depuis les années 1990, a entraîné une forte demande de diagnostic au laboratoire de cette affection.

L'objectif de ce travail est d'étudier la diversité génétique de *leishmania* dans le nord d'Algérie (TIPAZA et ALGER) en essayant d'identifier les différentes espèces de *Leishmania spp* qui dominent au nord d'Algérie par l'optimisation des techniques modernes de biologie moléculaire. On a choisi pour cette étude des lames colorées par Giemsa qui sont conservées pendant des années au niveau des laboratoires du nord de l'Algérie.

Durant une période d'étude s'étalant de 12-02-2017 jusqu'à 20-05-2017 au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations au sein de l'institut pasteur à Dely Brahim- Alger

Parmi les différentes méthodes disponibles pour l'extraction d'ADN on 'à opter pour l'extraction phénol-chloroforme, ce choix dépend d'un certain nombre de facteurs y compris le type d'échantillon et la quantité de départ ; le cout ; la disponibilité des réactifs pour finir toutes les extractions.

Nos résultats obtenus d'analyse moléculaire de l'ADN extrait sont évalué qualitativement par une électrophorèse sur gel d'agarose et un dosage optique sur nanodrope puis quantitativement par l'étude des concentrations d'ADN obtenus.

Les résultats de PCR-RFLP et la PCR en temps réel suggèrent la dominance de *L-infantum* dans le nord d'Alger avec des atteintes viscéral et cutanée. Et enfin, nous avons testé la fiabilité de la HRM dans l'identification des espèces par leurs températures de fusion.

Summary

Leishmaniasis are parasitic infections common to humans and certain animals (anthropozoonoses), are caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania* , and are transmitted to humans by a sting of a vector insect, the blood-haematophagous phlebotome.

Leishmaniasis represents a group of parasitic diseases of varied clinical expression. The importance of leishmaniasis in the world is illustrated by the annual number of new cases, between 1.5 and 2 million cases. Algeria, which is among the most exposed countries, is affected by two forms of leishmaniasis that coexist in an endemic state: LC and LV, the alarming increase in the number of leishmaniasis since the 1990s, has led to a high demand for diagnosis laboratory of this condition. The objective of this work is to study the genetic diversity of *leishmania* in northern Algeria by trying to identify the different species of *Leishmania spp* that dominate the north of Algeria by optimizing modern techniques of molecular biology. Giemsa stained slides, which are kept for years at the level of laboratories in northern Algeria, were selected for this study. During a study period extending from 12-02-2017 to 20-05-2017 at the level of the parasitic eco-epidemiology laboratory and genetics of the populations at the Institute Pasteur in Dely Brahim-Alger. Among the various methods available for DNA extraction, phenol-chloroform extraction is chosen, this choice depends on a number of factors including the type of sample and the starting quantity; availability of reagents to complete all extractions.

Our results obtained from molecular analysis of the extracted DNA are qualitatively evaluated by agarose gel electrophoresis and nanodrope optical assay, then quantitatively by the study of the obtained DNA concentrations.

The results of PCR-RFLP and real-time PCR suggest the dominance of *L-infantum* in northern Algiers with visceral and cutaneous involvement. And finally, we tested the reliability of HRM in identifying species by their melting temperatures.

ملخص

داء الليشمانيات هو العدوى الطفيلية المشتركة بين البشر و بعض الحيوانات (حيوانية المنشأ) , سببها البروتوزوار السوطي من جنس الليشمانيا و التي تنتقل الى الإنسان عن طريق لدغة من أنثى دبابة الرمل التي تمتص الدم. داء الليشمانيات يمثل مجموعة من الأمراض الطفيلية من التعبير السريري المتنوع. و تتضح أهمية داء الليشمانيات في العالم من العدد السنوي للحالات الجديدة. ما بين 1.5 و 2.5 مليون حالة. الجزائر من بين البلدان الأكثر تعرضا لنوعين من أشكال التعايش من داء الليشمانيات CL و VL. و الزيادة المقلقة في البلاد منذ سنة 1990, إلى طلب من المختبر تشخيص هذا المرض.

و الهدف من هذا العمل هو دراسة التنوع الوراثي لليشمانيا في شمال الجزائر في محاولة التعرف على أنواع مختلفة من الليشمانيا التي تسيطر على شمال الجزائر من خلال الإستفادة المثلى من تقنيات البيولوجيا الجزيئية الحديثة. ثم إختيار الشرائح الملطخة من جيمزا, و التي يتم الإحتفاظ بها لسنوات على مستوى المختبرات في شمال الجزائر, لغرض هذه الدراسة.

خلال فترة دراسة تمتد من 2017-02-12 إلى 2017-05-20 في مختبر علم الأوبئة البيئية الطفيلية و الجزيئية على مستوى معهد باستور في دالي إبراهيم الجزائر. و من بين الطرق المختلفة المتاحة إستخراج الحمض النووي قمنا بإختيار طريقة الفينول و الكلوروفورم, و هذا الإختيار يعتمد على عدد من العوامل بما في ذلك نوع العينة و كمية البدائية, توفر الكواشف إستكمال جميع عمليات الإستخراج

يتم تقييم نتائجنا التي تم الحصول عليها من التحليل الجزيئي للحمض النووي المستخلص نوعيا عن طريق الرحلان الكهربائي للهلام و مقايسة البصمة النانوية , ثم كميّا من خلال و **PCR-RFLP** دراسة تركيزات الحمض النووي التي تم الحصول عليها بتشير نتائج في شمال الجزائر مع التداخل **L-infantum** في الوقت الحقيقي إلى هيمنة **PCR** الحشوي والجلدي. وأخيراً , اختبرنا موثوقية إدارة الموارد البشرية في تحديد الأنواع من خلال درجات حرارة ذوبانها.

Liste des figures

Figure 1 : Forme amastigote et promastigote de <i>Leishmania</i>	04
Figure 2: Phlébotome femelle gorgée du repas sanguin.....	05
Figure 3. Les réservoirs des leishmanioses en Algérie	06
Figure 4. Cycle de vie de parasite <i>Leishmania</i>	07
Figure 5: Répartition géographique des deux espèces de <i>Leishmania</i> et principaux foyers et zones d'endémie de la leishmaniose viscérale dans le monde	08
Figure 6: Hépato-splénomégalie observée chez les sujets atteints de LV.....	09
Figure 7: Leishmaniose cutanée à <i>L.major</i>	09
Figure 8 : Organisation génique et maturation des messagers chez <i>Leishmania</i>	12
Figure 9 : Comparaison des Spectres des acides nucléiques avec et sans contaminants....	23
Figure 10 : Mode d'action du SYBR GREEN I.....	26
Figure 11: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7 % des produits d'extraction d'ADN total des lames de références. (1)	28
Figure 12 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7 % des produits d'extraction d'ADN total des lames de patients. (2).....	29
Figure 13: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (1).....	32
Figure 14: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (2)	32
Figure 15 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (3)	33
Figure 16: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (4)	33

Figure 17: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (5)	33
Figure 18 : Profil de digestion enzymatique par <i>Hae III</i>	35
Figure 19: les trois phases qui caractérisent La PCR quantitative en temps réel	36
Figure 20: courbes de fusion en fonction de la fluorescence.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Espèces de <i>Leishmania</i> et formes cliniques correspondants	08
Tableau 2. Lieux de collecte des échantillons à étudier	19
Tableau 3: Données des lames témoins	21
Tableau 4: Moyennes des scores des DO de l'ADN total	30
Tableau 5: Résultats Globaux du dosage de l'ADN des échantillons étudiés	31
Tableau 6: Moyennes des scores des concentrations de l'ADN total	31
Tableau 7: Résultats de la PCR-ITS1 des patients étudiés	34
Tableau 8: les bandes de taille censés obtenues après la digestion enzymatique par <i>Hae III</i>	35
Tableau 9: Résultats de l'Identification des espèces de <i>Leishmania</i> par PCR-RFLP	36
Tableau 10: résultats de CP des échantillons obtenus par le light-cycler 480	38

Liste des abréviations

µl: Microlitre

ADN: Acide Désoxyribo-Nucléique

ADNmt: Acide Désoxyribo-Nucléique Mitochondriale

°C: Degrés Celsius

Ct: Cycle Seuil (Threshold Cycle)

dNTP: Désoxy-Nucléotide Triphosphate

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

PCR: Réaction en Chaîne par Polymérase

pH: Potential Hydrogen

PK: Protéinase K

qPCR: Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RT-PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel

SDS: Sodium Dodécyl Sulphate

Taq: Thermophilus Aquaticus

UV: Ultra Violet

MLEE : Electrophorèse Enzymatique Multilocus

MLST : Multilocus Sequence Typing

MLMT : Multilocus Typage Microsatellites

OMS: l'Organisation Mondiale de la Santé

LC: Leishmaniose Cutanée

LV: Leishmaniose Viscérale

LCM: Leishmaniose Cutané-Muqueuse

LCZ: La Leishmaniose Cutanée Zoonotique

INSP: Institut National de Santé Publique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Mb : Méga Base

pb : Paire de Base

SL-ARN: Spliced Leader ARN

nt: Nucléotide.

CNRL: Centre National de Référence des *Leishmania*

ITS1: Internal-Transcribed-Spacer 1

PCR-RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

DO: Densité Optique

ARN: *Acide ribonucléique*

PM : Poids Moléculaire

IPA : Institut Pasteur d'Alger

HRM : *High-Resolution-Melting*

SOMMAIRE

Introduction	01
---------------------------	-----------

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Les leishmanioses.....	03
2. Etude du parasite.....	03
2.1. Classification.....	03
2.2. Caractères morphologiques	04
2.2.1. Forme amastigote	04
2.2.2. Forme promastigote.....	04
2.3. Biologie du parasite	05
2.4. Reproduction du parasite.....	05
2.4.1. Reproduction asexuée.....	05
2.4.2. Reproduction sexuée	05
2.5 Nutrition du parasite	05
3. Vecteurs et réservoirs.....	05
3.1. Vecteurs.....	05
3.2. Réservoirs.....	06
4. Cycle de vie de <i>leishmania</i>	07
5. Distribution géographique.....	08
5.1. Dans le monde	08
6. Les formes cliniques de la leishmaniose	09
6.1. La leishmaniose viscérale (LV)	09
6.2. La leishmaniose cutanée (LC).....	09

6.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse.....	10
6.4. Leishmaniose canine	10
6.5. En Algérie	10
6.5.1. La Leishmaniose Cutanée du nord.....	10
6.5.2. La Leishmaniose Cutanée zoonotique à <i>L. major</i>	10
6.5.3. La Leishmaniose Cutanée à <i>L. killicki</i>	10
6.5.4. La Leishmaniose Viscérale	10
7. Les techniques de diagnostic...	11
7.1. Diagnostic de la Leishmaniose Viscérale.....	11
8. Traitements	11
9. Le génome de <i>Leishmania</i>	11
9.1. L'ADN nucléaire	11
9.2. L'ADN kinéoplastique	12
10. Identification des espèces de <i>Leishmania</i>	13
11. Méthodes de distinction entre les espèces de <i>Leishmania</i>	13
11.1. Les méthodes à base de protéines.....	13
11.1.1. La MLEE (Electrophorèse Enzymatique Multi-Locus).....	13
11.1.2. Le MALDI-TOF.....	13
11.2. Les méthodes à base d'acides nucléiques.....	14
11.2.1. La PCR.....	14
11.2.2. La PCR nichée et semi nichée.....	14
11.2.3. La PCR Multiplex	14
11.2.4. La PCR en temps réel (PCR quantitative).....	15
11.2.5. Le séquençage	15
11.2.6. Le typage de séquence multi-locus (MLST).....	15
11.2.7. La RAPD (ADN polymorphe amplifié au hasard).....	15
11.2.8. La AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	16
11.2.9. Le typage de microsatellites multi-locus (MLMT).....	16
11.2.10. PCR-ELISA.....	17
11.2.11. La PCR-HRM.....	17

11.2.12. La PCR-RFLP	17
11.2.13. La LAMP (Amplification isotherme médiée en boucle	18

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Matériel biologique	19
2. Matériel non biologique	19

II. Méthodes

1. Examen microscopique	20
2. Grattage des lames	20
3. Extraction d'ADN	22
3.1. Mode opératoire	22
4. Evaluation de la quantité et la qualité de l'ADN	23
4.1. Dosage des ADN au Nanodrop	23
4.2. Électrophorèse de l'ADN total.....	23
5. Analyse moléculaire.....	24
5.1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)	24
5.2. La PCR RFLP	25
5.3. La PCR en temps réel.....	25
5.4. Test HRM (High Résolution Melting)	27

Chapitre III : résultats et discussion

I. Résultats:

1. Qualité de l'ADN total	28
1.1. Résultats d'électrophorèse d'ADN génomique	28
1.2. Dosage optique d'ADN sur Nanodrop.....	29

2. Quantité de l'ADN total.....	31
3. Résultats des produits PCR	32
3.1. L'électrophorèse sur gel des produits de PCR.....	32
4. Résultats de Digestion enzymatique PCR-RFLP	34
4.1. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction	34
5. PCR en temps réel	36
5.1. Interprétation des résultats	37
6. HRM.....	38

II. Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des infections parasitaires causées par un protozoaire du genre *Leishmania*, qui est transmis aux hôtes vertébrés par un insecte diptère le phlébotome femelle. Elles se manifestent par un large spectre clinique, allant de la simple ulcération cutanée à des lésions muqueuses mutilantes et des atteintes viscérales fatales.

Il existe trois formes de Leishmaniose dans le monde, en fonction de l'espèce parasitaire responsable la Leishmaniose Cutanée, la Leishmaniose Cutané-Muqueuse et la Leishmaniose Viscérale. Malgré les avancées de la recherche, les Leishmanioses restent encore un véritable problème de santé publique, d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé 350 millions de personnes de la population mondiale sont exposées à ce risque infectieux dans un total de 98 pays (**Eugénie Gay, 2015**). Il est estimé, que le nombre de nouveaux cas par an est de 1,3 millions, et que la mortalité annuelle est comprise entre 20. 000 à 30. 000 personnes (**OMS, 2015**).

L'Algérie est parmi les pays les plus touchés par cette zoonose, qui est classée comme Maladie à Déclaration Obligatoire, et concernée par deux formes cliniques sévissant à l'état endémique : la Leishmaniose Viscérale et la Leishmaniose Cutanée.

Souvent, les espèces de *Leishmania* sont identifiées en fonction de leur répartition géographique et des manifestations cliniques de la maladie qui en résulte. Cependant, l'origine géographique est un critère inadéquat dans les zones non endémiques, ainsi que dans les régions endémiques où plusieurs espèces de *Leishmania* peuvent coexister tel que l'Algérie.

L'identification des espèces infectées de *Leishmania* en fonction des signes et symptômes cliniques peut être problématique car plusieurs espèces provoquent une atteinte viscérale et cutanée. Dans cette étude, nous allons tenter d'optimiser une méthode de PCR et de PCR RFLP pour l'identification directe des espèces de *Leishmania* sur les lames de prélèvements colorées au Giemsa dans l'Algérois sans avoir besoin de leur culture. De plus, le profil épidémiologique de la leishmaniose dans l'Algérois sera mis à jour avec l'identification des espèces circulantes.

Nous proposons, à travers ce travail de synthétiser en premier chapitre les connaissances les plus récentes sur les Leishmanies, sur le plan clinique et génétique. Quant à la partie pratique réalisée au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger, nous nous sommes concentrées sur les techniques adoptées pour l'étude de la diversité génétique des Leishmanies en Algérie, enfin, nous terminons notre travail par la présentation de nos résultats et de leur discussion.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies vectorielles, parasitaires dues à l'infection par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, incluant des atteintes viscérales ou cutanées. (Kbaier-Hachemi *et al.*, 2008)

Ces affections sont transmises par la piqûre infestante d'un insecte vecteur, le phlébotome femelle. La description de la première espèce de *Leishmania* a été faite par Laveran et Mesnil en 1903, et depuis, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter (Chabasse *et al.*, 2007). Il s'avère que plus de 20 espèces qui sont pathogènes pour l'humain, sont transmises par 30 espèces de phlébotomes (Dedet, 2009).

Actuellement, les leishmanioses sont présentes dans les zones tropicales et subtropicales de 98 pays, dont 72 pays en développement exposant 350 millions de personnes. Les zones d'endémie sont l'Europe du sud et de nombreux pays d'Afrique de l'est, d'Asie du sud, d'Amérique du sud. La prévalence mondiale est estimée à 12 millions de cas. L'incidence des leishmanioses est en augmentation dans le monde. On enregistre entre 1,5 et 2 millions de nouveaux cas de leishmaniose chaque année dans le monde et environ 40 000 décès, ceux-ci dus à la leishmaniose viscérale. Six pays recensent 90% des cas de leishmaniose viscérale : Inde, Bangladesh, Népal, Soudan, Soudan du sud et Brésil. Cette situation alarmante résulte de l'augmentation de la transmission vectorielle et pour la leishmaniose viscérale de l'augmentation du réservoir humain lié à l'infection à VIH/Sida (OMS, 2016).

2. Etude du parasite

2.1. Classification

La classification actuelle des *Leishmania* repose sur des critères biochimique et moléculaire Selon l'OMS (1999).

Règne : Protista (Heackel 1866)

Sous règne : Protozoa (Goldfuss, 1817 emend Siebold, 1848)

Embranchement : Sarcomastigophora (infantum et Balamuth 1963)

Sous embranchement : Mastigophora (Diesing, 1866)

Classe : Zoomastigophora (Quitterie *et al.*, 2005)

Ordre : Kinetoplastida (infantum 1963, Emend Vichkrman 1976)

Sous ordre : Trypanosomatina (Kent, 1880)

Famille : Trypanosomatidae (Dedet, 2009)

Genre : *Leishmania* (Ross 1903).

Sous genre : - *Leishmania*
- *Viannia*

Ces espèces sont morphologiquement identiques et ne sont différenciées que par les isoenzymes et l'ADN. Dans le genre *Leishmania*, on distingue deux sous genres définis par le site de développement du parasite chez le vecteur ; le sous genre *Leishmania*, caractérisé par un développement suprapylorique, à la jonction intestin moyen-intestin postérieur du vecteur et le sous genre *Viannia* par un développement péripylorique à n'importe quelle portion de l'intestin. Cette classification repose sur des critères morphologiques. Cependant les sous

divisions du sous genre *Leishmania* nécessitent un typage enzymatique ou moléculaire. En effet il est impossible de différencier les leishmanies par leur morphologie, aussi bien au microscope optique qu'électronique. Grâce au polymorphisme important exprimé chez le sous genre *Leishmania*, l'électrophorèse des isoenzymes constitue aujourd'hui la méthode la plus courante pour l'identification des souches de *leishmania*, et qui a permis de créer des complexes et ainsi des zymodèmes caractéristiques (Rezalleh 2008-2009)

2.2. Caractères morphologiques

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés, ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades successifs distincts. Le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome, et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Les deux stades se multiplient par division binaire (Dedet, 2009)

2.2.1. Forme amastigote

C'est une forme intracellulaire, de petite taille, présente chez l'hôte vertèbre sous forme d'un corpuscule ovoïde de 2 à 6 µm de diamètre contenant un noyau sphérique et un kinétoplaste au niveau duquel, on peut percevoir l'amorce du flagelle (rhizoplaste intracellulaire) et d'autres organites. (Dedet,1999) .

2.2.2. Forme promastigote

Le parasite sous cette forme est extra cellulaire, allongée, de taille beaucoup plus grande (15 à 25 µm). Le parasite présente un kinétoplaste en position antérieure par rapport au noyau. Le flagelle émergeant dans la partie antérieure possède une position libre importante lui conférant une grande mobilité, et d'autres organites. cette forme est retrouvée chez le vecteur et dans les milieux de cultures (Dedet,1999) .

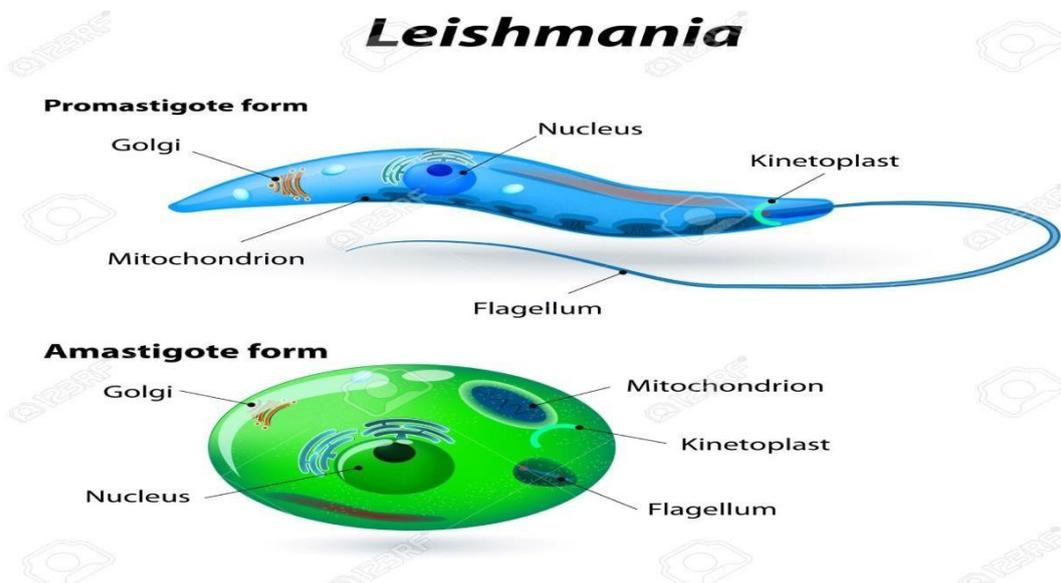


Figure 1 : Forme amastigote et promastigote de *Leishmania* (www.fr.123rf.com)

2.3. Biologie du parasite

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les nœuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage et se multiplient à l'intérieur des macrophages. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage : les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages. Ce qui conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme. La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes. (**Bussieras et Chermette, 1992 ; Slappendel et Ferrer, 1998**).

2.4. Reproduction du parasite

2.4.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée et le mode par lequel les leishmanies se propagent essentiellement. Elle débute par la naissance d'un flagelle fils (de moindre taille), la division du noyau et celle du kinétoplaste viennent après et cela sans que la cytodierèse n'ait lieu puisqu'elle survient en dernier et se fait selon l'axe longitudinal du parasite (**Belkaid et Derraz, 1982 ; Ravel, 1999**).

2.4.2. Reproduction sexuée

Ce mode de reproduction reste à confirmer, malgré les travaux de plusieurs auteurs comme **LANOTTE et RIOUX**, qui postulent l'hypothèse de l'échange du matériel génétique entre les parasites au stade promastigote (**Bastien et Ravel, 1999**).

2.5 Nutrition du parasite

La nutrition s'effectue par pinocytose, à travers la membrane plasmique de la poche flagellaire. Les microvésicules fusionnent avec les lysosomes permettant la digestion des macromolécules ingérées (**Henry,1993**)

3. Vecteurs et réservoirs

3.1. Vecteurs

Le vecteur présente un maillon important dans la chaîne de transmission : le phlébotome. Diptères nématocères de la famille des *Psychodidae*, les phlébotomes sont à l'état adulte, des moucherons piqueurs de petite taille (longueur du corps :1,5 à 4mm). De couleur claire, en général jaune paille, leur corps est couvert de poils et ils présentent des ailes dressées .



Figure 2: Phlébotome femelle gorgée du repas sanguin. (www.aswat.ma)

Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne, dont le développement pré-imaginal (oeuf, quatre stades larvaires et nymphe) se déroule dans la terre humide. Les biotopes de reproduction ne sont connus que pour peu d'espèces, ce qui constitue une limite très sérieuse à l'établissement de programmes de lutte (Dedet, 2009).

Seule la femelle hématophage assure la transmission de la leishmaniose. Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée, où ils confèrent à la maladie un caractère saisonnier (Dedet, 2001).

3.2. Réservoirs

Les réservoirs naturels des leishmanies sont des mammifères domestiques et sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononucléés. L'homme peut jouer un rôle de réservoir de parasite, constituant alors avec le vecteur un cycle anthroponotique (Benyahia 2008-2009).

Les réservoirs de leishmanies sont variables selon l'espèce et selon le foyer. On distingue la forme zoonotique, avec le chien comme principal réservoir de parasites (bassin méditerranéen, moyen Orient, Brésil), causée par : *L. infantum*. Et la forme anthropootique, où l'homme est la seule source d'infection pour le vecteur (Inde, Soudan), l'agent responsable de cette dernière est *L. donovani*.

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet le chien comme réservoir (Belazzoug, 1984, 1987). Quant au réservoir de la leishmaniose cutanée zoonotique, il est représenté essentiellement par deux rongeurs sauvages gerbillidés. Le premier découvert est naturellement infesté par *L. major* au niveau du foyer de M'sila, le *Psammomys obesus* (Belazzoug, 1983), et le second, *Meriones shawi*, au niveau du foyer de Ksar chellala (Belazzoug, 1986).

Les leishmanies circulent en Algérie entre l'homme et le chien, véhiculées par *Phlebotomus* pour les formes viscérale et cutanée à *L. infantum*, et entre l'homme et un rongeur sauvage pour la forme cutanée à *L. major*.

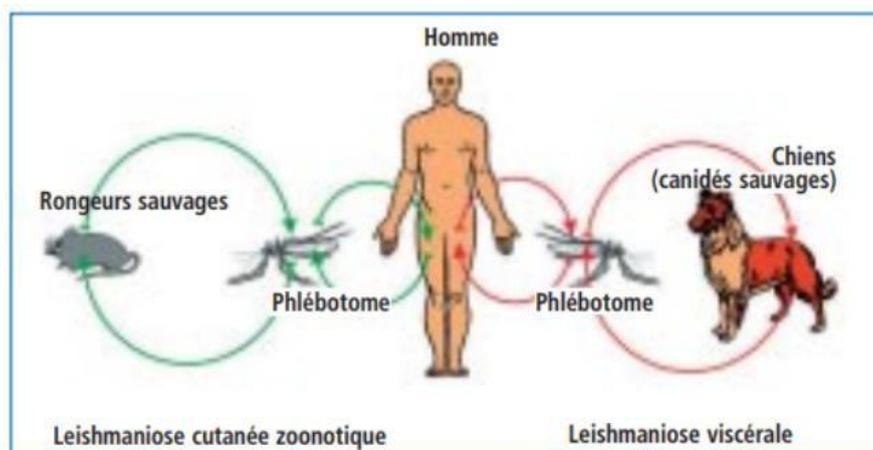


Figure 3. Les réservoirs des leishmanioses en Algérie (Bachi, 2006).

4. Cycle de vie de *leishmania*

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, le vecteur et le mammifère. Le mode naturel de transmission de la leishmaniose est la piqûre infectante du phlébotome lors des repas sanguins chez l'hôte vertébré (figure 4). Le parasite subit alors des changements dans le tube digestif du vecteur et aboutit à la forme promastigote présente au niveau du pharynx de l'insecte. Chez l'hôte vertébré, les promastigotes subissent une transformation et deviennent des amastigotes qui se multiplient dans les cellules du système réticulo-histiocytaire. Ces dernières finissent par éclater et libérer les formes amastigotes. Celles-ci vont être phagocytées par d'autres cellules (Leger et Depaquit, 1999).

La leishmaniose est transmise à l'hôte définitif par la piqure du phlébotome femelle (figure 4). Les phlébotomes injectent la larve au stade infectieux; des promastigotes métacycliques, pendant le repas de sang (1), les promastigotes métacycliques qui atteignent la plaie de piqure sont phagocytés par les macrophages (2), et se transforment en amastigotes (3) (Aurbry, 2014). Les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées et atteignent différents tissus (4), les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (5.6) dans l'intestin du phlébotome, les parasites se différencient en promastigotes, (7) qui se multiplient et se différencient en promastigotes métacycliques, et migrent dans la trompe du phlébotome (8), le parasite modifie l'odeur de son hôte, ce qui attire des phlébotomes qui vont eux-mêmes s'infecter et alors contribuer à véhiculer la maladie (Oshea *et al.*, 2002).

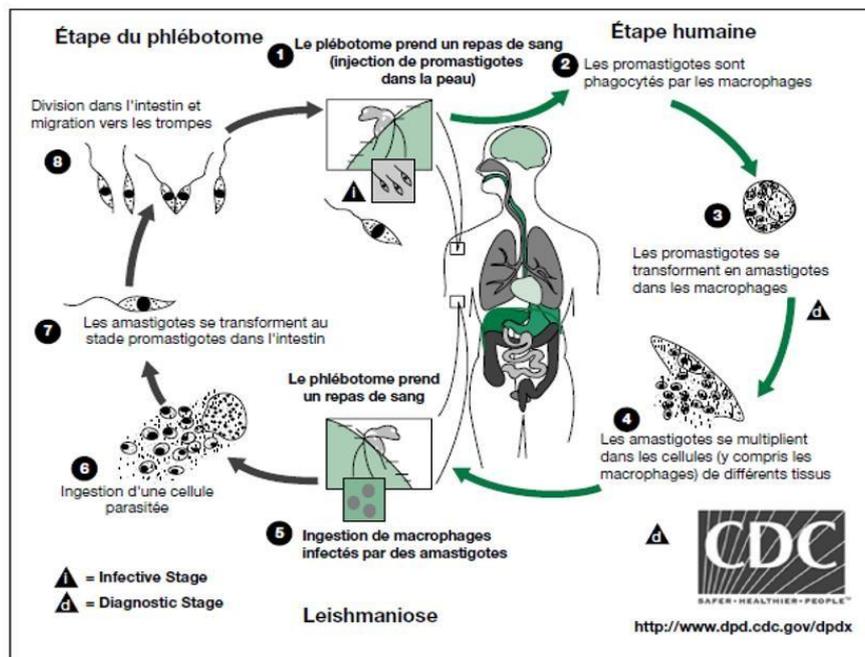


Figure 4. Cycle de vie de parasite *Leishmania* (Carré *et al.*, 2010).

5. Distribution géographique

5.1. Dans le monde

La distribution géographique de la leishmaniose est complexe en raison de la diversité des hôtes intervenant dans les complexes pathogènes. Cette maladie est largement répandue à la surface du globe. Les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées d’Afrique du Nord, du Sud de l’Europe et d’Asie (figure 5). Présentes sur cinq continents dans les zones tropicales et sub-tropicales de 98 pays (Desjeux *et al.*, 2001). Les espèces du l’ancien monde et du nouveau monde sont regroupées dans le tableau 1.

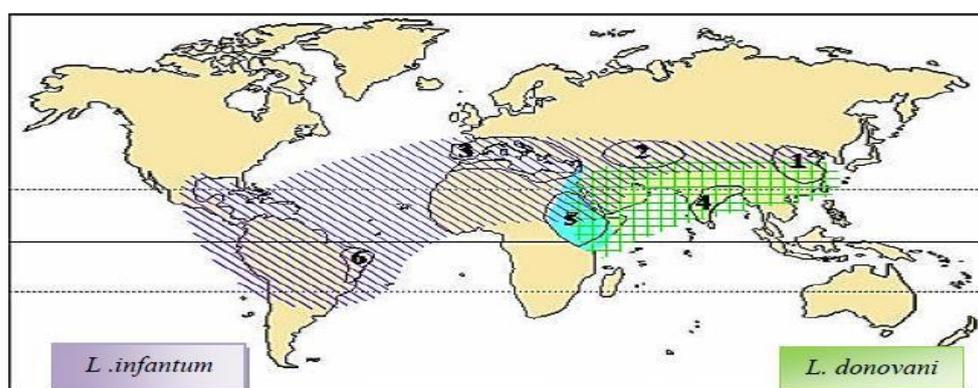


Figure 5: Répartition géographique des deux espèces de *Leishmania* et principaux foyers et zones d'endémie de la leishmaniose viscérale dans le monde. (Desjeux et Dedet,2005).

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1-Foyer chinois | 4-Foyer indien |
| 2-Foyer centre-asiatique | 5-Foyer est-africain |
| 3-Foyer méditerranéen | 6-Foyer nord-est brésilien |

Tableau 1: Espèces de *Leishmania* et formes cliniques correspondants (www.univ-reims.fr)

Sous genre	Sous genre <i>leishmania</i>		Sous genre <i>viannia</i>	
Ancien monde	<i>L.donovani</i> <i>L.infantum</i>	<i>L.major</i> <i>L.tropica</i> <i>L.aethiopica</i>		
Nouveau monde	<i>L.infantum</i>	<i>L.mexicana</i> <i>L.amazonensis</i>	<i>L.guyanensis</i> <i>L.panamensis</i> <i>L.shawi</i> <i>L.naiffi</i> <i>L.lansoni</i> <i>L.peruviana</i>	<i>L.braziliensis</i>
Forme clinique	Viscérale	Cutanée		Muqueuse

6. Les formes cliniques de la leishmaniose

6.1. La leishmaniose viscérale (LV)

La LV est également appelée **kala-azar**. Elle est caractérisée par des poussées irrégulières de fièvre, une perte de poids, une hépato-splénomégalie et une anémie . Elle est mortelle en absence de traitement. La LV est fortement endémique dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est. Selon les estimations, de 200 000 à 400 000 nouveaux cas de LV surviennent chaque année. Plus de 90% d'entre eux se produisent dans six pays : Bangladesh, Brésil, Éthiopie, Inde, Soudan et Soudan du Sud. (Chappuis *et al.*, 2007)



Figure 6: Hépato-splénomégalie observée chez les sujets atteints de LV (<http://s3.amazonaws.com/magoo/2oAE-2.jpg>)

6.2. La leishmaniose cutanée (LC)

C'est la forme la plus fréquente. Elle provoque des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps laissant des cicatrices définitives et des handicaps sévères (figure 7). Environ 95% des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale. Plus des deux tiers des cas surviennent dans les six pays suivants : l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, la Colombie, la République arabe syrienne et la République islamique d'Iran. On estime qu'il y a 0,7 million à 1,3 million de nouveaux cas chaque année dans le monde. (Bailey, 2007; David, 2009).



Figure 7: Leishmaniose cutanée à *L. major* (http://c2i.fmpm.uca.ma/umvf_rd/campus-parasitologie-mycologie/cycle2/poly/0716ico.html)

6.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse

Elle détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Près de 90% des cas de leishmaniose muco-cutanée surviennent au Brésil, dans l'État plurinational de Bolivie et au Pérou. (OMS, 2015).

6.4. Leishmaniose canine

La leishmaniose canine est une atteinte assez commune du chien dans des foyers où sévit la leishmaniose viscérale humaine. Des études portant sur des chiens soumis à des conditions d'infestation en milieu naturel ont permis de démontrer que l'affection débute par un chancre d'inoculation, surviennent ensuite des lésions qui peuvent apparaître après 1 à 6 mois d'incubation (Killicki, 1999).

6.5. En Algérie

L'Algérie est un pays qui compte parmi les pays les plus concernés par la leishmaniose, est caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques qui favorise la dissémination de cette maladie (Harrat et Belkaid, 2003). L'Algérie est concernée par deux formes cliniques sévissant à l'état endémique

6.5.1. La Leishmaniose Cutanée du nord : Est une forme clinique qui sévit au nord du pays (Belazzoug et al., 1985) la transmission du parasite est assurée par *Phlebotomus perfiliewi*, trouvé naturellement infesté par le variant enzymatique *L. infantum* MON24, dans la localité de Ténès, foyer actif de la LC du nord (Izri et al., 1993). Le chien est le principal réservoir de *L. infantum* (Benikhlef et al., 2004).

6.5.2. La Leishmaniose Cutanée zoonotique à *L. major*: La LCZ est la forme la plus rencontrée en Algérie. Elle correspond au clou de Biskra qui s'observe à l'état endémo-épidémique dans les régions arides et semi-arides, principalement au niveau de la frange nord du Sahara. Transmise par *Phlebotomus papatasi*, et les réservoirs sont des rongeurs sauvages désertiques : *Meriones shawi* et *Psammomys obesus*. (Belazzoug, 1983, Harrat et al., 1996)

6.5.3. La Leishmaniose Cutanée à *L. killicki* : décrite récemment dans le sud de l'Algérie dans la région de Ghardaïa (Harrat et al., 2009), à côté de *Leishmania major*, une nouvelle espèce, *Leishmania killicki* appartenant au complexe *tropica*, a été isolée au cours de l'année 2005 et identifiée comme *L. killicki* MON 301. et elle est transmise par *Phlebotomus sergenti* (Boubidi et al., 2011).

6.5.4. La Leishmaniose Viscérale: La LV en Algérie est une affection de type rural. L'agent responsable de la LV est *Leishmania infantum*. Il est transmis par *Phlebotomus perniciosus* (Parrot et al., 1930 ; Parrot et al., 1931 ; Izri et al., 1990). La LV sévit dans le nord du pays et touche essentiellement les enfants en bas âge (90% des cas sont pédiatriques) et les sujets dont l'immunité est faible tel que les sujets séropositifs (VIH). Le réservoir de la LV est le chien (Benikhlef et al., 2004). La LV s'étend sur toute la partie Nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humide et subhumide, mais il est important de signaler la survenue de nombreux cas dans les régions semi-arides et arides connues pour être des foyers de Leishmaniose Cutanée Zoonotique. (Belkaid et Harrat, 1997).

7. Les techniques de diagnostic

Le diagnostic des Leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son ADN, et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée (**Le Fichoux et al.,1999**). Les techniques de diagnostic classiques reposent sur la mise en évidence du parasite dans un prélèvement (grattage, biopsie) sous forme de frottis, ou par une culture de ce prélèvement sur des milieux semi-solide et liquides spécifiques.

7.1. Diagnostic de la Leishmaniose Viscérale

Parmi les Leishmanioses, seule la forme viscérale est généralisée aux organes hématopoïétiques et voit les parasites se multiplier dans le sang et la moelle. Le diagnostic est évoqué à partir d'arguments de présomption et de certitude.

8. Traitements

La Leishmaniose se manifeste de différentes manières ce qui conditionne le traitement à suivre (posologie, voie d'administration) et l'efficacité de celui-ci. Parmi les composés les plus utilisés pour combattre toutes les formes de Leishmaniose, se trouvent les antimoniés pentavalents, l'Amphotéricine B, la Pentamidine et la Miltéfosine.

9. Le génome de *Leishmania*

Leishmania possède deux types d'ADN, un nucléaire et un autre kinétoplastique. Le Kinétoplaste est un organite unique, localisé à la base du flagelle, et considéré comme un ADNmt (ADN mitochondrial) modifié (**Vickerman,1976**).

9.1. L'ADN nucléaire

La condensation de la chromatine du génome de *Leishmania* a rendu son étude difficile mais grâce au projet de séquençage de *Leishmania*, nous connaissons actuellement le génome dans sa quasi-totalité (94%). Son génome d'environ 35 Mb est distribué sur 34 à 36 chromosomes dont la taille varie de 0,3 à 2,8 Mb. Il faut noter que certaines espèces de *L. major* n'ont que 34 ou 35 chromosomes (**Britto et al., 1998**) mais la complexité du génome est globalement conservée. Actuellement, plus de 34 Mb de séquences ont été accumulées dans les banques de données. La séquence des chromosomes 1, 3, 4, 5, 15, 24, 25 et 31 est terminée et le génome de *Leishmania* est régulièrement annoté (www.genedb.org).

L'analyse des données disponibles a révélé une densité de 1 gène/3,5 kb avec très peu de séquences répétées. On s'attend à approximativement 8000 gènes et un nombre un peu plus élevé de protéines, ce qui ne peut être dû à des phénomènes d'épissage alternatif, *Leishmania* étant dépourvu d'introns (figure 9). Les premières analyses suggèrent que plus de la moitié des gènes sont uniques à *Leishmania* et qu'une proportion encore plus grande n'a pas de fonction identifiée. Les gènes sont organisés de façon particulière puisqu'ils

font partie de larges unités polycistroniques. Ainsi sur le chromosome 1, il y a une unité de 29 gènes sur un brin d'ADN et de 50 gènes sur l'autre brin (Myler *et al.*, 1999).

L'état de ploïdie de *Leishmania* s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie. En effet, des doubles knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique (Souza, 1994). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation) (Dujardin, 2000), ou des amplifications chromosomiques (Stiles, 1999) ont été mis en évidence. Les gènes de *Leishmania* sont organisés en unités polycistroniques. Ces unités sont co-transcrites en très grands pré-messagers qui sont maturés par l'addition d'un mini-exon en 5' (épissage en trans) et par polyadénylation en 3'. Les réactions d'épissage en trans et de polyadénylation sont couplées.

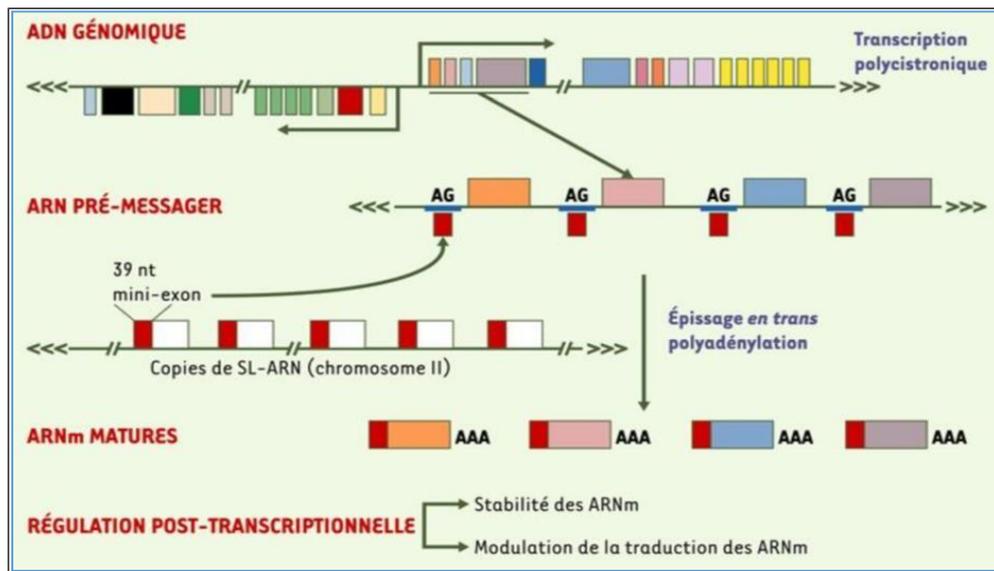


Figure 8 : Organisation génique et maturation des messagers chez *Leishmania* (Ouellette, 2003).

9.2. L'ADN kinétoplastique

Outre l'ADN nucléaire, les Kinétoplastidés se caractérisent par leur ADN kinétoplastique qui constitue 10 à 20 % de l'ADN total (Simson, 1987). Ce dernier renferme deux types d'ADN :

- **Les minicercles** qui sont impliqués dans les phénomènes « d'editing » (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN (Gott, 2003)
- **Les maxicercles** qui codent pour des ARN guides et des ARN ribosomiques. Ce mécanisme « d'editing », commun à tous les kinétoplastidés, permet d'exprimer les transcrits des maxicercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités. La formule « insertion » de l'Uridine semble être majoritaire, à tel point, que la taille du transcrit final peut quasiment avoir doublée (Lodish, 2000).

10. Identification des espèces de *Leishmania*

Les *Leishmania* sont morphologiquement identiques. Leur identification exacte est capitale pour asseoir une stratégie de lutte et de prévention appropriée. Pour cela plusieurs méthodes d'identification existent. Les méthodes d'identification qui font simultanément appel à des caractères extrinsèques : manifestation clinique, distribution géographique et cycle épidémiologique et plus souvent à des caractères intrinsèques. L'analyse biochimique des isoenzymes plus particulièrement et l'analyse moléculaire par PCR-RFLP.

11. Méthodes de distinction entre les espèces de *Leishmania*

11.1. Les méthodes à base de protéines

11.1.1. La MLEE (Electrophorèse Enzymatique Multi-Locus)

Elle étudie des enzymes qui possèdent des spécificités similaires ou identiques, et des structures différentes appelées isoenzymes (**Rioux et al., 1990**). Les isoenzymes sont produites par des gènes multiples, et sont importants pour les processus métaboliques dans divers compartiments cellulaires. En utilisant un ensemble défini d'isoenzymes, un «modèle de mobilité» spécifique à une espèce ou à une souche caractéristique, peut être établi. Cependant, la MLEE ne fait pas de discrimination parmi les populations en raison de l'homéoplasie, du faible nombre de marqueurs ou hétérozygotie du gène cible causant plus d'un motif de mobilité (**Jamjoom et al., 2004**). D'autre part, cette méthode a été jugée efficace pour détecter les problèmes majeurs des événements d'hybridation. Pour certaines espèces, la MLEE n'est pas recommandé en raison du manque de pouvoir discriminatif tel que *L.infantum* MON-1. Par ailleurs, cette méthode est contraignante par la culture laborieuse des parasites et l'exigence des équipements (**Schönian et al., 2010**).

11.1.2. Le MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight)

La spectrométrie de masse (MS), est un outil puissant pour l'identification des espèces de *Leishmania* (**Mouri et al., 2014**). Après l'ionisation de l'échantillon dans une solution acide spécifique, le MALDI-TOF MS utilise des faisceaux de laser (coûteux) pour évaporer l'échantillon vers le capteur, où le «temps de vol» dépend du poids moléculaire des molécules ionisées. Cette empreinte protéique spectrale d'un isolat peut être comparée à une base de données spectrale de référence. La méthode est adaptée uniquement aux parasites cultivés; et ne fonctionne pas avec les isolats cliniques.

11.2. Les méthodes à base d'acides nucléiques

11.2.1. La PCR

L'identification par PCR et la discrimination des espèces de *Leishmania* peut se faire par le biais de différentes approches. Des fragments amplifiés d'échantillons peuvent être examinés par électrophorèse afin de déterminer les différences de longueur, par les variations des sites de restriction à l'aide des enzymes de restriction, par l'analyse des courbes de HRM, et par le séquençage. Cependant, les variabilités des cibles sont trop faibles et rendent d'autres méthodes comme la RFLP ou séquençage inutiles et seules certaines de ces cibles sont idéales pour la différenciation et le typage en dessous du genre. Une autre approche est l'utilisation d'amorces complexes ou spécifiques à des espèces telles que la PCR multiplex et la PCR ancrée.

11.2.2. La PCR nichée et semi nichée

C'est une version non quantitative de PCR destinée à réduire les liaisons non spécifiques. Elles impliquent deux couples d'amorces utilisées en deux étapes successives. Des amorces externes dont la spécificité peut permettre d'amplifier à la fois un petit nombre de séquences homologues et des amorces internes permettant d'amplifier spécifiquement une des séquences révélées par le couple d'amorces externes. Cela garantit que le produit de la deuxième PCR a peu de contamination des dimères d'amorces, des épingles à cheveux, et d'autres cibles potentielles des amorces (Akhavan *et al.*, 2010). Elle peut être utilisée pour distinguer les espèces avec les amorces appropriées (Akhoundi *et al.*, 2017).

11.2.3. La PCR Multiplex

Elle utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences. Pour ce type d'amplification PCR, on choisit des amorces ayant des températures d'hybridation semblables. Les longueurs des produits amplifiés devraient être semblables; de grandes différences de longueur des ADN cibles favoriseront l'amplification de la cible courte par rapport à la cible longue, ce qui aboutit à des différences de rendement de produits amplifiés. Les produits de la PCR multiplex peuvent subir une hybridation supplémentaire avec une sonde spécifique du gène pour vérification. Cette méthode a été utilisée pour le diagnostic de la leishmaniose utilisant différents types de marqueurs, tels que les ARN multi-copies SL (Harris *et al.*, 1998; Jorquera *et al.*, 2005) et les mini-cercles d'ADNc (Pita-Pereira *et al.*, 2008).

11.2.4. La PCR en temps réel (PCR quantitative)

Elle permet la mesure fiable des produits générés en surveillant l'amplification de la molécule d'ADN cible au cours de chaque cycle de PCR. Elle peut être utilisée quantitativement (PCR quantitative en temps réel) ou semi-quantitativement, et ces méthodes sont importantes pour certains traitements de leishmaniose (**Paiva-Cavalcanti et al., 2010**). Les différents contrôles internes (des gènes tels que GAPDH, β -microglobuline, β -actine, 18S ARNr) sont souvent utilisés comme indicateurs d'extraction optimale d'acide nucléique, de qualité des échantillons, de qualité de PCR et d'inhibiteurs de PCR (**Mortarino et al., 2004**). La quantification absolue nécessite également l'utilisation d'un ADN étalon.

11.2.5. Le séquençage

La première génération des technologies de séquençage de l'ADN a été développée par Sanger *et al* (1977). Elle était basée sur l'incorporation sélective des chaînes terminales des désoxynucleotides et la première machine automatique de séquençage (Applied Biosystems 370A) a été produite en 1987. Depuis, le séquençage s'est nettement amélioré en termes de qualité, de lecture des longueurs, de vitesse et de coût, et il est largement utilisé pour l'identification des espèces complexes de *Leishmania* et les études phylogénétiques. Le séquençage à haut-débit est devenu indispensable dans les études de génomique, épigénomique et transcriptomique. Il est donc plus en plus largement utilisé pour identifier et distinguer les différentes espèces de parasites, y compris les Leishmanies (**Cantacessi et al., 2015**).

11.2.6. Le typage de séquence multi-locus (MLST)

C'est une méthode où plusieurs gènes de ménage non liés, (généralement 4 à 6) sont (simultanément) amplifiés en utilisant la PCR et par la suite analysés par séquençage (**Zemanová et al., 2006; Mauricio et al., 2006; Boité et al., 2012**). La MLST a un pouvoir étendu pour différencier les échantillons où le nombre total des biomarqueurs est important.

11.2.7. La RAPD (ADN polymorphe amplifié au hasard)

Elle consiste à réaliser une PCR en utilisant une amorce courte d'une dizaine de nucléotides, de séquence arbitraire. Cette amorce va s'hybrider au hasard dans le génome. La RAPD peut être utilisée seule ou avec d'autres techniques pour étudier la diversité génétique inter-et intra-

spécifique dans les espèces complexes de *Leishmania* (Toledo *et al.*, 2002; Zemanová *et al.*, 2004; Botilde *et al.*, 2006). Néanmoins, son utilisation est limitée en raison de son besoin d'ADN très pur de *Leishmania* et une normalisation précise des conditions de PCR pour garantir la spécificité. Il est également difficile de normaliser et interpréter les résultats des analyses avec une faible reproductibilité (Schönian *et al.*, 1996; Eisenberger et Jaffe, 1999).

11.2.8. La AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Elle est basée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. Il est utilisé dans l'empreinte génétique des espèces de *Leishmania*. Il est basé sur l'amplification PCR sélective de fragments de restriction d'une digestion totale d'ADN génomique, liés à un adaptateur oligonucléotidique (Vos *et al.*, 1995). Les fragments amplifiés sont séparés et visualisés sur des gels polyacrylamide et sont évalués par la présence ou absence de polymorphismes. C'est un outil puissant et à fort débit pour l'identification des marqueurs et d'étude des variations génétiques chez les souches étroitement liées de *Leishmania* (Kumar *et al.*, 2010) telles que dans le complexe de *L. braziliensis* (Odiwuor *et al.*, 2011).

11.2.9. Le typage de microsatellites multi-locus (MLMT)

Il est basée sur l'amplification des microsatellites (également appelés séquences simples de répétition - SSR ou répétitions courte en tandem - STR) qui sont des répétitions en tandem d'un simple motif de 1 à 6 nucléotides. Les microsatellites sont présents dans les régions codantes (rarement) et les régions non codantes de tout le génome. Les microsatellites sont des marqueurs neutres et co-dominants. La variation de la longueur du microsatellite résulte du gain ou de la perte de répétitions, qui peut être détectée après amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques flanquant le locus. La taille des fragments de PCR est déterminée par un gel d'agarose métaphore ou d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou une analyse des fragments automatisé (utilisation d'amorces étiquetées par fluorescence). La MLMT utilise généralement un ensemble de 10 à 20 loci de microsatellites non liés. Les microsatellites ont un pouvoir discriminatoire élevé dans les complexes d'espèces (Kuhls *et al.*, 2007; Schönian *et al.*, 2010). Les amorces sont généralement spécifiques des espèces et/ou des complexes (comme pour les complexes *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*) et ne peuvent être appliqués pour

comparer les espèces appartenant à différents complexes. Les régions flanquant et les microsatellites ne sont pas fortement conservés entre les espèces apparentées de *Leishmania*. les répétitions polymorphes dans une espèce peuvent être absentes ou non informatives dans d'autres espèces (**Jamjoom *et al.*, 2002; Schwenkenbecher *et al.*, 2004; Schönian *et al.*, 2010**). Il y a des consensus pour l'utilisation des amorces pour différentes espèces d'un complexe, tel que l'ensemble standard d'amorces développé pour le sous-genre *Viannia* (**Oddone *et al.*, 2009**). Dans de nombreuses études, des ensembles standards d'amorces microsatellites spécifiques à une certaine espèce ou complexe d'espèces sont utilisés afin d'obtenir des résultats comparables entre différents laboratoires et utiliser une base de données des souches déjà étudiées.

11.2.10. PCR-ELISA

C'est une méthode immunologique pour détecter et quantifier les produits PCR directement après l'immobilisation de l'ADN biotinylé sur une microplaque en utilisant trois étapes: l'amplification, l'immobilisation et la détection. Le gène d'intérêt est amplifié par PCR dans la présence de digoxigénine-11-DUTP (DIG-DUTP). Les produits de PCR marqués à la DIG se lient à des sondes oligonucléotidiques marquées avec de la biotine à leurs extrémités 5' de sorte qu'elles puissent être immobilisées sur la microplaque et leurs acides nucléiques peuvent être ainsi détectés. La PCR-ELISA est plus sensible que la PCR conventionnelle, et a des temps d'analyse plus courts et des limites de détection plus faibles. En raison de sa nature semi-quantitative, cette méthode peut être un puissant outil de détection dans les analyses médicales, mais pas pour la discrimination entre les espèces (**De Doncker *et al.*, 2005; Sue *et al.*, 2014**).

11.2.11. La PCR-HRM

Elle mesure les changements dans l'intensité de fluorescence d'un colorant intercalant lors de la dissociation de l'ADN bicaténaire (ADNdb) à l'ADN monocaténaire (ADNmb). Elle peut détecter les alternatives de l'ADNdb et différencier les différentes espèces de *Leishmania* en fonction de leur composition, longueur, teneur en GC et la complémentarité des brins (**Nasereddin et Jaffe, 2010; Hernández *et al.*, 2014**).

11.2.12. La PCR-RFLP

C'est une méthode qui détecte la variation entre les motifs des fragments d'ADN produit par digestion enzymatique. Ces fragments sont visualisés en utilisant une électrophorèse sur gel.

Ces RFLP sont causés par des nucléotides alternatifs sur les sites de restriction, et ont souvent été utilisés comme marqueurs sur les cartes de liens génétiques. Les variations de longueur et la différence dans les nombres et les motifs des fragments peuvent être utilisés pour la différenciation des espèces de *Leishmania* (Marfurt *et al.*, 2003; Akhoundi *et al.*, 2013), en particulier lorsqu'il est appliqué à ITS1 (Schönian *et al.*, 2003) et au mini-exon (Minodier *et al.*, 1997) ou le hsp70 (Montalvo *et al.*, 2012).

11.2.13. La LAMP (Amplification isotherme médiée en boucle) utilise quatre amorces différentes spécifiquement conçu pour reconnaître six régions distinctes d'un locus cible, de sorte que l'amplification et la détection de la cible d'ADN peut être complétée en une seule étape à température isotherme (Notomi *et al.*, 2000). L'ADN polymérase utilisée a une activité de déplacement de brin, de sorte qu'il n'y a pas besoin de chaleur. Chaque produit ADNmb initial fournit un modèle supplémentaire pour une réaction en chaîne en utilisant les secondes amorces internes et externes via une structure intermédiaire en boucle de tige (Fu *et al.*, 2011). Une amorce interne se lie alors à cette section de boucle pour permettre la production d'une copie du modèle ADNmb, permettant d'amplifier rapidement la cible à un nombre important de copies. Cela peut être détecté par l'œil sous la forme d'un précipité blanc ou comme solution jaune-vert après l'ajout de colorant vert SYBR. Cette méthode sensible, simple, rapide et rentable ne nécessite pas de réactifs spéciaux ou d'équipements sophistiqués et peut même être combiné avec une étape de transcription inverse pour permettre la détection de l'ARN. La LAMP peut être plus sensible que la PCR conventionnelle et a été utilisé pour la détection d'espèces de *Leishmania* (Khan *et al.*, 2012; Ghasemian *et al.*, 2014; Sriworarat *et al.*, 2015). Ses principales limitations sont l'exigence d'une teneur en GC non-extrême, le risque de structures secondaires d'ADN, et le potentiel limité d'écart de température. En outre, les quatre amorces ont de nombreuses exigences de conception, telles qu'il ne devrait pas y avoir d'homologie avec l'ADN hôte, les extrémités 5' des amorces externes devraient être de 120 à 180 bases, les extrémités 5' des amorces intérieures doivent être séparées de 0 à 20 bases, et les régions en boucles devraient avoir une longueur de 40 à 60 bases.

Chapitre II: Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie- parasitaire et génétique des populations au sein de l'Institut Pasteur à Dely Brahim- Alger durant une période d'étude s'étalant de 12-02-2017 jusqu'à 20-05-2017 .

L'objectif de ce travail était d'identifier les différentes espèces de *Leishmania spp* trouvées dans l'Algérie (TIPAZA et ALGER) en utilisant des techniques modernes de biologie moléculaire permettant d'étudier cette diversité génétique.

Notre étude a porté sur des lames de frottis positives obtenues des hôpitaux d'Alger et de Tipaza. L'ADN extrait à partir des lames a été caractérisé par PCR RFLP et HRM pour identifier les espèces de *Leishmania* dans l'Algérie (TIPAZA-ALGER)

I .Matériels

1. Matériel biologique

Ce travail a été réalisé à partir de 78 échantillons correspondant à 116 lames de frottis positifs de Leishmaniose provenant de quatre laboratoires différents en collaboration avec trois hôpitaux (Tableau 2).

Tableau 2. Lieux de collecte des échantillons à étudier

Hôpital	Mustapha Bacha -ALGER		Hadjout – TIPAZA	Mayo- ALGER	total
Laboratoire	Dermatologie	parasitologie	Parasitology	parasitologie	
Nombre d'échantillons	19	15	15	29	78

2. Matériel non biologique

Les tampons et appareillages utilisés sont donnés en annexe 2.

II. METHODES

1. Examen microscopique

Les lames collectées sont confectionnées en un frottis mince et identifiées, séchées à l'air, à température ambiante, puis sont colorées au May Grünwald-Giemsa et analysées au microscope optique pour la recherche du corps de Leishmania au grossissement Gx100.

Le principe de cette coloration repose sur l'action complémentaire de deux colorants et sur l'affinité des éléments cellulaires pour des colorants acides ou basiques.

Le May Grünwald fixe le frottis par son méthanol et colore les éléments acidophiles et les granulations spécifiques des leucocytes, le Giemsa sur-colore les noyaux.

2. Grattage des lames

Les grattages des lames collectées ont été effectués au niveau du laboratoire en utilisant un bistouri stérile. Cette opération se fait délicatement tout en mettant la matière grattée et pesée dans des tubes de 1.5ml stériles étiquetés.

D'abord dans cette étude, huit lames ont été prises comme témoins provenant de multiples grattages d'organes des souris affectées par les leishmanies (**Tableau 3**).

Tableau 3: Données des lames témoins

ID de lame	Nom de souche	Année de prélèvement	Examen microscopique	Poids de matière issue du grattage (g)
A	Lipa 443R S3	2014	Faiblement parasitée	0.014
B	Lipa 443R S2	2014	Faiblement parasitée	0.021
C	Lipa 445 S5	2014	Riche en parasites	0.050
D	Lipa 445 S3	2014	Riche en parasites	0.039
E	Lipa 100 S2	2012	Faiblement parasitée	0.061
F	Lipa 100 S3	2012	Faiblement parasitée	0.083
G	Lipa 100 S4	2012	Riche en parasites	0.091
H	Lipa 100 S1	2012	Riche en parasites	0.026

Tous les échantillons ont subi le même protocole d'analyse génétique. Les lames qui datent de 2012 ont été considérées comme des lames anciennes et celles qui datent de 2014 sont considérées comme des lames récentes.

3. Extraction d'ADN

Il existe de nombreuses méthodes disponibles pour l'extraction de l'ADN. Le choix de la méthode à utiliser dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris le type d'échantillon et la quantité de départ ; la rapidité, le rendement, et dans certains cas, la possibilité d'automatiser la procédure d'extraction (**Castella *et al* ; 2006**) (**Moss *et al* ; 2003**).

Les molécules d'ADN doivent être séparées des autres matières cellulaires (protéines, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme etc.), avant qu'elles puissent être examinées. Les protéines cellulaires qui protègent l'ADN dans l'environnement de la cellule peuvent inhiber la capacité d'analyser l'ADN (**Butler, 2005**).

L'extraction organique au phénol chloroforme, a été pendant de nombreuses années la méthode la plus largement utilisée pour l'extraction de l'ADN (**Butler, 2012**). Son principe repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans une émulsion à deux phases : une phase aqueuse et une phase organique.

3.1. Mode opératoire

Ce procédé est initié par une lyse cellulaire par l'ajout de 500µl du tampon de lyse (0.5M EDTA, pH8) et 125µl de SDS aux tubes qui contiennent la matière issue de grattage pour casser les ponts disulfure et la bicouche lipidique respectivement. L'ADN libéré dans le milieu est alors traité par une protéinase K (25µl), qui a pour but de digérer les protéines qui lui sont associés (protéines histones). La lyse est réalisée au bain marie à 56°C après une incubation d'une nuit. Une fois que le lysat est récupéré, une déprotéinisation est effectuée grâce au phénol/chloroforme d'où la précipitation des protéines dénaturées au niveau de l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste soluble dans la phase aqueuse qui est récupérée par centrifugation à 2600 tours/min pendant 15 minutes. Pour précipiter l'ADN, environ 500µl de la phase aqueuse sont récupérés dans un nouveau tube, et 50µl d'acétate ainsi que 1000µl d'éthanol absolu sont ajoutés puis centrifugés à +4°C 12000 t/min pendant 10 min. Le culot est alors lavé avec 500µl d'éthanol 70°. Les culots sont séchés à température ambiante toute la nuit, le lendemain, 50µl de tampon d'éluion (TE) sont ajoutés aux culots de 2 à 3 heures a fin de réhydrater l'ADN. Ce dernier est dosée à l'aide du Nanodrop pour pouvoir le conserver à +4°C.

4. Evaluation de la quantité et la qualité de l'ADN

4.1. Dosage des ADN au Nanodrop

Les ADN extraits à partir des lames ont été analysés par Nanodrop. L'absorbance des échantillons a été déterminée à différentes longueurs d'ondes 230, 260 et 280. Pour évaluer avec précision la qualité des échantillons, 260/280 ou 260/230 ratios doivent être analysés en combinaison avec la qualité spectrale globale. Pour les acides nucléiques, généralement un ratio de rendement des 260/280 $\sim 1,8$ et un ratio de 260/230 de $\sim 2,0$ pour l'ADN et l'ARN, respectivement. Ce ratio est dépendant du pH et la force ionique du tampon utilisé pour faire l'ébauche et les mesures d'échantillons. Des solutions acides seront sous-représenter le ratio de 0,2-0,3, tandis qu'une solution de base sera sur-représenter le ratio de 0,2-0,3. Les ratios significativement différents de pureté peut indiquer la présence de protéines, de contaminants de phénol ou d'autres qui absorbent fortement à ou près 280 nm. Le ratio 260/230 pureté est une deuxième mesure de pureté de l'ADN avec des valeurs pour un acide nucléique «pure» couramment de l'ordre de 1.8 à 2.2. Ratios de pureté qui sont nettement inférieurs aux valeurs attendues peuvent indiquer la technique d'isolement utilisées peuvent nécessiter une optimisation plus poussée

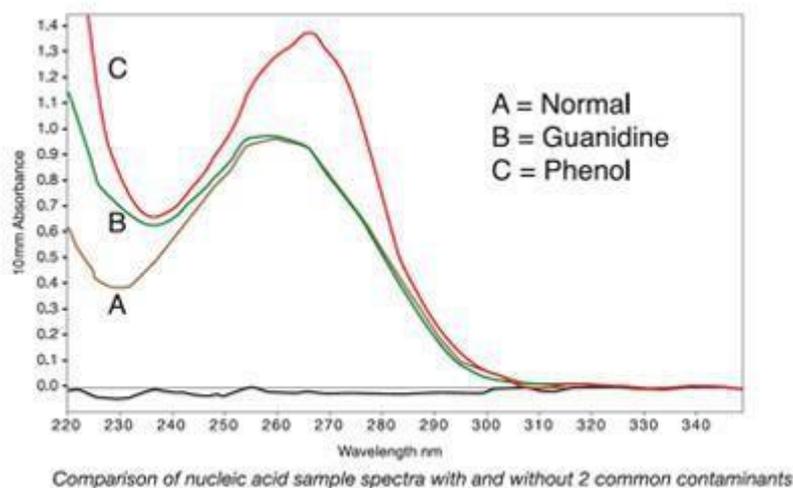


Figure 9 : Comparaison des Spectres des acides nucléiques avec et sans contaminants
(Desjardin et Conklin, 2010)

4.2. Électrophorèse de l'ADN total

Pour évaluer la qualité de l'ADN extrait à partir de nos échantillons, l'ADN total a été testé sur gel d'agarose. Pour cela, 5 μ l d'ADN ont été mélangés avec une petite goutte de tampon de charge

et déposé dans les puits de gel en réservant les deux derniers puits pour le témoin négatif et le marqueur du PM. Ensuite, on branche les électrodes de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient de côté cathode en appliquant une tension de 70 V qui correspond à 40min de migration. Enfin, quand le colorant de charge arrive à proximité du front de migration, on coupe l'alimentation. La Révélation des bandes d'ADN se fait par le transilluminateur : Il s'agit d'une simple visualisation de la migration des bandes d'ADN sur une table UV du Transilluminateur dans une chambre noire.

5. Analyse moléculaire

Dans la présente étude, l'utilisation des lames colorées par Giemsa a été traitée avec deux techniques de PCR. La PCR et la PCR-RFLP ciblent différents gènes et séquences des génomes nucléaires de *Leishmania*.

Cette étude visait à évaluer l'utilisation de la PCR dans le but de détecter la présence ou l'absence des leishmanies dans les échantillons collectés, tandis que la PCR-RFLP pour l'identification de l'espèce.

5.1. La PCR (Polymerase Chain Reaction)

La réaction PCR (**Mullis, 1985**) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique, et répétition d'élongation, en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Dans le thermocycleur, il se produit dans un premier temps une **dénaturation thermique**. Elle consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogènes. L'ADN double brin est chauffé, à une température élevée de l'ordre de 94° C. Cette température de dénaturation est supérieure à celle de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrices au cours des cycles d'amplification.

Dans un deuxième temps une **Hybridation des amorces** a lieu. Le milieu réactionnel contient deux amorces (Reverse et Forward), chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes des séquences à amplifier. Le milieu est amené, à une température inférieure au Tm des amorces. La Tm est en fonction de la séquence, est en générale ; de l'ordre de 45à 60°C. Et en fin dans un troisième temps **l'Elongation des amorces**. Une ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribo-nucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5' 3' à 72° C; température optimale. A la fin du cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

La PCR ITS1 (Internal Transcribed spacer 1) qui cible le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale du gène leishmania. Les produits du mix de protocole ITS1 et leur volume nécessaire pour un seul échantillon sont présentés en annexe 4.

Une PCR a été appliqués aux ADN extraits des lames, ciblant le gène ITS1, spécifique à *Leishmania* qui a été amplifié en utilisant les amorces LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') et L5.8S (5'-TGATACTTATCGCACTT-3') pour générer des produits de PCR entre 300 et 350 pb. Une fois la préparation et la distribution du mix terminé, les micros tubes ont été placés dans le thermocycleur. Ce dernier est programmé selon le gène cible. La réaction de polymérisation en chaîne est cyclique, elle se déroule en 3 étapes qui sont : la dénaturation initiale, l'hybridation et l'élongation finale. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. Les programmes du thermocycleur du protocole ITS1 sont présentés en annexe 4. Les produits PCR ont été révélés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1.5 % durant 40min à 70volts. Les produits de PCR ont été visualisés après migration sur un gel d'agarose grâce au BET pour vérifier s'il y a absence ou présence du gène ITS1.

5.2. La PCR RFLP

Pour effectuer l'analyse PCR-RFLP, les produits de PCR ITS1 ont été encore digérés en utilisant l'enzyme de restriction *HaeIII*. Toutes les réactions ont été incubées pendant une nuit à 37 ° C. Les fragments de restriction résultants ont été séparés sur des gels d'agarose à 3% et la taille des fragments a été estimée par comparaison avec des bandes de taille d'ADN de 100 pb (Vivantis) et 50 pb (Promega, France). Les distances de migration sont spécifiques des espèces de *Leishmania*.

5.3. La PCR en temps réel

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

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

Des essais de PCR en temps réel ont été réalisés sur des ADN provenant de culots parasite, passés sur leightcycler 480 selon le protocole de (Nicolas, 2002) modifié selon les recommandations du fournisseur roche adaptées pour le SYBR GREEN I.

Après avoir préparé le mélange réactionnel en additionnant des sondes fluorescentes et des primers (annexe 6), ainsi que l'ajout des ADN de nos échantillons et du témoin positif. Le mix est mis dans un appareil de PCR quantitative en temps réel. Il s'agit d'un appareil de type light-Cycler, couplé à un spectrofluorimètre. Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

La méthode de préparation du mix est similaire à celle la PCR standard, à l'exception de l'ajout de la sonde marquée. Les volumes recommandés pour un seul échantillon sont présentés dans l'annexe 5.

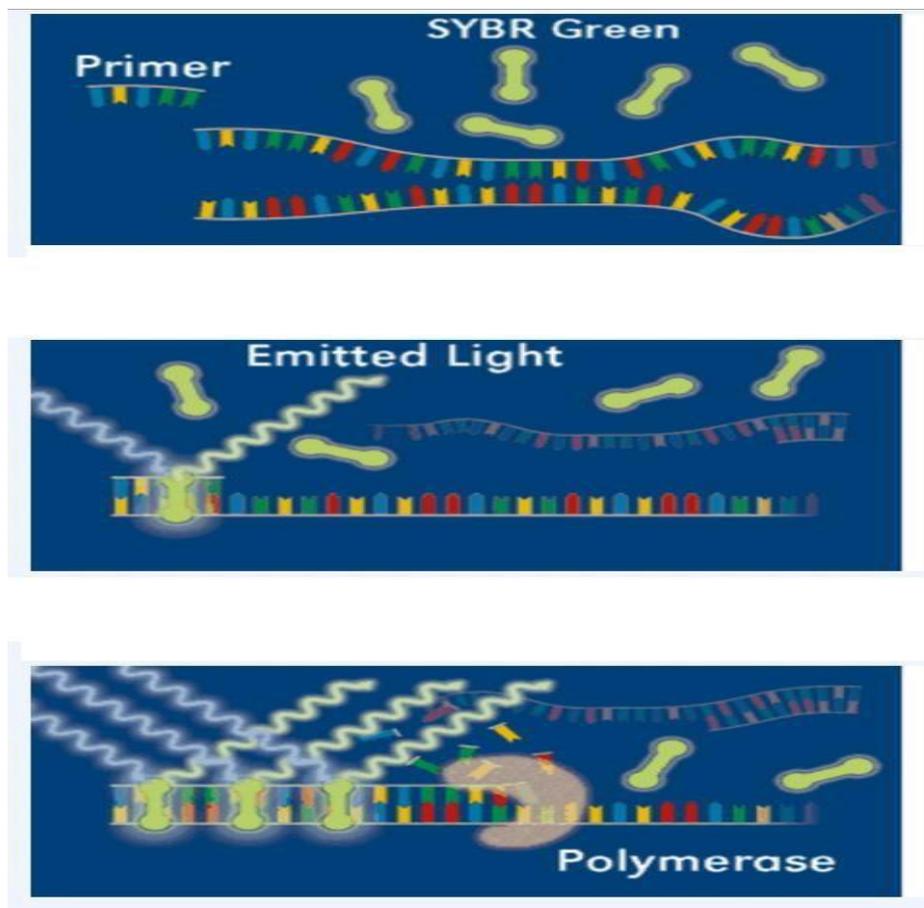


Figure 10 : Mode d'action du SYBR GREEN I

5.4. Test HRM (High Resolution Melting)

Il existe très peu de publications portant sur l'identification des espèces des leishmanies à l'aide d'une analyse de fusion à haute résolution (HRM), une méthode qui détecte les différences dans la composition des nucléotides d'un produit de PCR en temps réel spécifique. La méthode est basée sur des différences thermodynamiques dans les profils de courbes de dissociation des amplicons générés à partir de la PCR en temps réel. Les courbes générées sont des signes spécifiques qui identifient les polymorphismes en raison de petites différences dans la composition des nucléotides. (Castilho *et al.*, 2003)

Les tests HRM ont été réalisés à la fin de chaque PCR en temps réel, et puis on a obtenu des courbes HRM après amplification sur un instrument leightcycler 480. Chaque échantillon a été exécuté en double ou en triple et le gain a été optimisé avant de faire fondre sur tous les tubes.

L'analyse de la dissociation de l'amplicon a été effectuée en capturant des signaux de fluorescence dans des intervalles de 0,2 ° C et en maintenant pendant 10 secondes dans chaque intervalle de la courbe de fusion (entre 60 ° C et 95 ° C)

Chapitre III: Résultats et Discussion

I. RESULTATS

1. Qualité de l'ADN total

1.1. Résultats d'électrophorèse d'ADN génomique

L'ADN total obtenu par l'extraction de nos échantillons a été analysé qualitativement par une électrophorèse sur gel d'Agarose. Les fragments obtenus sont de différente taille. La détermination précise des tailles des fragments séparés par l'électrophorèse a été faite en comparant au marqueur de poids moléculaire (de 50 pb à 100 pb).

Les figures 11,12 présentent respectivement, les résultats de l'électrophorèse qualitative des ADN des lames de références et des lames de patients.

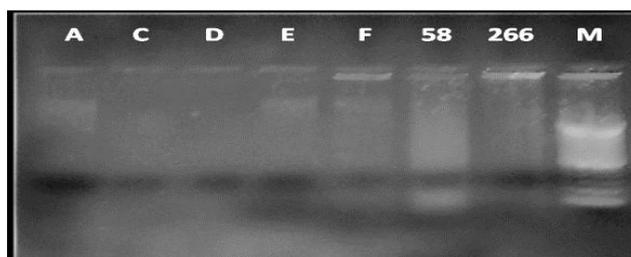


Figure 11: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7 % des produits d'extraction d'ADN total des lames de références.(A-C-D-E-F: ADN total des échantillons de références, **266**: ADN total des échantillons de patients, et **M**: marqueur du poids moléculaire 100pb)

Les ADN extraits ont été chargés sur gel pour voir s'ils produisent des bandes détectables ou non et les images ont été capturés. Dans la figure 11, on peut voir les bandes d'ADN pour les échantillons A-E-F, avec présence légère de smear. On voit aussi des bandes d'ADN pour les échantillons 58 et 266 avec présence de smear. pour les échantillons C et D on ne voit pas des bandes claires d'ADN ni smear.

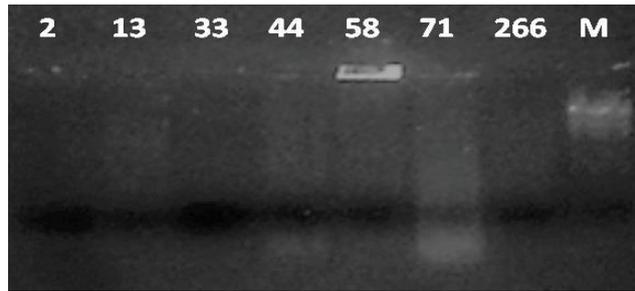


Figure 12 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7 % des produits d'extraction d'ADN total des lames de patients. (2-13-33-44-58-71-266: ADN total des échantillons des patients à analyser, M: marqueur du poids moléculaire 100pb)

Dans la figure 12, les bandes d'ADN pour les échantillons 58 et 71 peuvent être observées, avec absence de smear.

Cependant, on ne voit rien pour les échantillons 2-13-33-44-266, et le marqueur n'a pas bien diffusé.

Les résultats des figures 11,12 suggèrent que les ADN : A-E-F-58-71 sont de bonne qualité par rapport aux ADN : C- D-2-13-33-44, cela peut être dû à des contaminations lors de l'extraction, et l'échantillon 266 a donné deux résultats contradictoires, donc on ne peut rien conclure à propos de la qualité de cet ADN.

1.2.Dosage optique d'ADN sur Nanodrop

Comme il est difficile de s'assurer de la pureté de l'ADN, il est primordial d'évaluer et de visualiser l'intégrité et le rendement des extractions de l'ADN à partir des lames en utilisant la mesure de DO sur un spectrophotomètre (Nanodrop™).

Les résultats du dosage des échantillons de références (grattages fortement positifs), les culots parasitaires et nos échantillons des patients, et leurs scores sont groupés dans les tableaux 1,2 et 3 en Annexe résultats.

Calcul des moyennes :

Formule de calcul :

La moyennes= totale des scores de DO / nombre total d'échantillons

Tableau 4: Moyennes des scores des DO de l'ADN total

Type d'échantillons	Moyenne des scores des DO d'ADN total
Échantillons références (souris)	3.5
Culots parasitaires	5.8
Échantillons des patients	4.3

Le tableau 4 montre que la moyenne des scores des DO d'ADN total obtenus des culots parasitaires est la plus importante (m=5.8), suivi de l'extraction des lames des patients (m=4.3), et en dernier, on retrouve les lames de références (souris) avec une moyenne de scores de (m=3.5).

L'analyse spectrophotométrique pour **A260/280** a donné une moyenne > 1.8 pour 10 échantillons culots parasitaires parmi les 15 (**67%**), 37 échantillons des patients parmi les 78 (**48%**) et un seul échantillon de référence parmi les 8 testés (**12.5%**). **Nos résultats montrent** que l'ADN extrait à partir des culots parasitaires est presque exempt de contamination protéique. L'ADN extrait à partir de nos lames de patients présente des niveaux de contaminants protéiques, et l'ADN extrait à partir des lames des souris présente des hauts niveaux de contaminants protéiques

L'analyse **A260/230**, a donné une moyenne > 1.8 pour 15 échantillons culots parasitaires. Parmi ces 15 qu'on a (**100%**), 25 échantillons des patients parmi les 78 (**32%**) et un seul échantillon de référence parmi les 8 testés (**12.5%**), indiquant une pureté d'ADN des culots parasitaires des composants organiques, et présence des contaminants non-purifiés (tel que les contaminants phénolique) dans l'ADN des échantillons des patients, et des haut niveau de contaminants phénolique dans l'ADN des échantillons de référence.

Sachant qu'on a réalisé les extractions des ADN des lames des souris et les lames des patients par la même méthode : phénol-chloroforme et l'extraction des culots parasitaires a été faite auparavant par les kits d'extraction invitrogène.

Selon les moyennes estimées des scores des DO d'ADN total, et les résultats du dosage optique de l'ADN, on trouve que l'ancienneté des lames n'a aucune influence sur la qualité d'ADN obtenu. La meilleure qualité de l'ADN est obtenue par le kit Invitrogen (extraction des culots

parasitaires) et le Phénol Chloroforme (extraction des lames des patients). L'ADN obtenu par le la même technique phénol-chloroforme (extraction des lames des souris) est de mauvaise qualité puisqu'il donne des valeurs significativement plus faibles que celles qui étaient attendues (tableau 5).

Tableau 5: Résultats Globaux du dosage de l'ADN des échantillons étudiés

Lames	260/280			260/230			Concentration ng/μl			Total
	[1.8- 2.2]	<1.8	>2.2	[1.8- 2.2]	<1.8	>2.2	[50- 100]	<50	>100	
références	1	5	1	3	3	1	2	4	1	7
Témoins	6	3	6	3	0	12	6	2	7	15
Patients	20	35	23	43	27	8	20	42	26	78

2. Quantité d'ADN total

Les moyennes des scores de concentration d'ADN de chaque type d'échantillons sont en partie Annexe résultats.

Le tableau 5 montre que la moyenne des scores des concentrations d'ADN total obtenus des culots parasitaires est la plus importante (**m=2.2**), suivi de l'extraction des lames des patients (**m=1.44**), et en dernier, on retrouve les lames de références (souris) avec une moyenne de scores de (**m=1**). Nos résultats suggèrent que la quantité d'ADN extrait des culots parasitaires est plus importante que celle des échantillons de nos patients. Nos lames de références ont par contre donné une plus faible quantité d'ADN.

Tableau 6: Moyennes des scores des concentrations de l'ADN total

Type d'échantillons	Moyenne des scores des concentrations d'ADN total
Échantillons références (souris)	1
Culots parasitaires	2.2
Échantillons des patients	1.44

3. Résultats des produits PCR

Les séries de PCR-ITS1 cible l'ADN du génome nucléaire de *Leishmania*. Chaque test PCR comprend un témoin négatif d'amplification constitué du mélange réactionnel et d'eau stérile remplaçant l'extrait d'ADN afin de vérifier la contamination possible de nos réactifs.

3.1. L'électrophorèse sur gel des produits de PCR

Dans la présente étude, Les figures 13,14,15,16 et 17 représentant les résultats obtenus des PCR ITS1, afin de s'assurer de la présence d'ADN de *Leishmania* dans les échantillons après le processus d'extraction d'ADN.



Figure 13: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. A.C.D.E.F.G: échantillons de références ; 284.285: échantillons des patients à analyser ; T+ et T- : les témoins positif et négatif respectivement

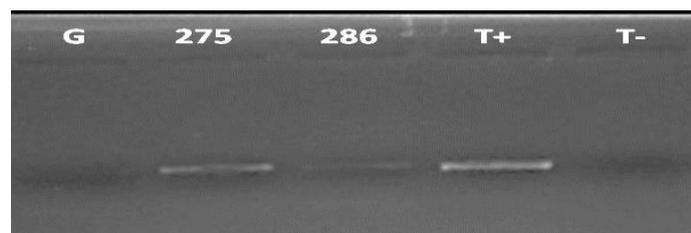


Figure 14: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1.(G: échantillon de référence, 275-286: échantillons des patients à analyser, T+ et T- : les témoins positif et négatif respectivement)

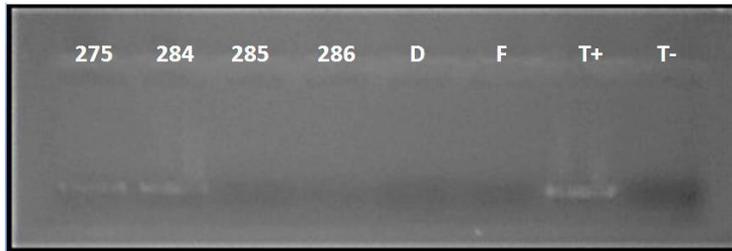


Figure 15 : Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (D-F: sont des échantillons de référence, 275-284-285-286: échantillons des patients à analyser, T+ et T- : sont les témoins positif et négatif respectivement)

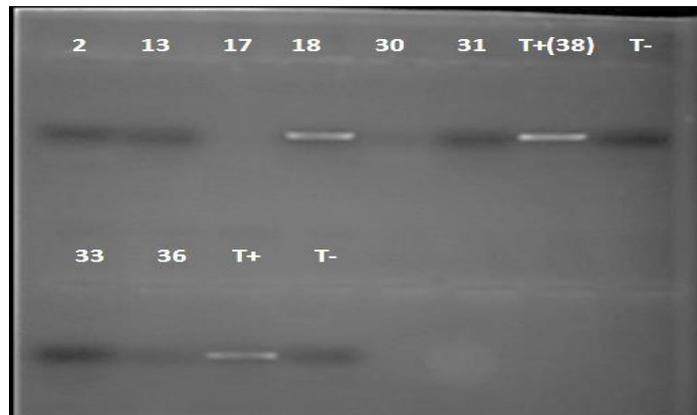


Figure 16: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (2-13-17-18-30-31-33-36: échantillons des patients à analyser, T+ et T- : les témoins positif et négatif respectivement)

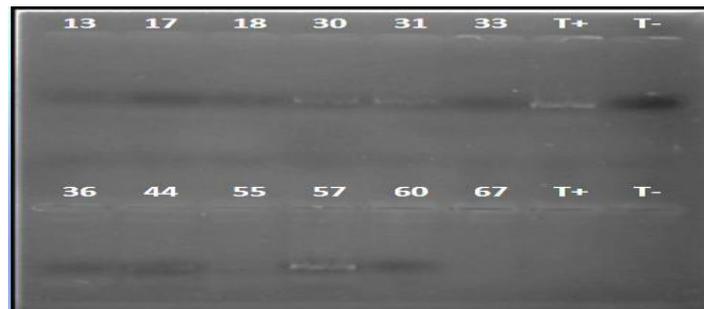


Figure 17: Profil de migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5 % des produits de PCR-ITS1. (13-17-18-30-31-33-36-44-55-57-60-67: échantillons des patients à analyser, T+ et T- : sont les témoins positif et négatif respectivement)

Les figures 13,14,15,16 et 17 expliquent la sensibilité de la PCR-ITS1 dans la détection de l'ADN de *Leishmania* dans nos échantillons. Si la bande attendue est absente, ou si des bandes supplémentaires sont présentes, l'expérience doit être répétée (possibilité de contamination).

Lorsqu'on obtient un signal cela signifie que la réaction a bien marché et que l'amplification s'est bien effectuée. Par contre, si on ne voit pas une bande cela signifie qu'il n'y a pas de produit d'amplification. On suppose qu'une ou les deux amorces n'étaient pas capables de s'hybrider à l'ADN cible.

Parfois on obtiendra un produit d'amplification de la mauvaise taille ou un mélange de produits. Les deux résultats sont dus à l'hybridation d'une ou des deux amorces sur des sites non ciblés sur la molécule d'ADN modèle

Tableau 7 : Résultats de la PCR-ITS1 des patients étudiés

PCR-ITS1	pos	neg	Total
Labo de dermatologie-Mustapha Bacha-ALGER	6	13	19
Labo de Parasitologie-Hadjout-TIPAZA	1	10	11
Labo de parasitologie -Mustapha Bacha-ALGER	7	8	15
Labo de parasitologie-Mayo-ALGER	1	10	11

En effet, sur un total de 56 ADN extraits à partir de nos lames des patients provenant des grattages cutanées ou des aspirations de moelle osseuse, nous avons obtenu 15 échantillons qui présentent des résultats PCR-ITS1 positifs (**27%**) et 41 échantillons PCR-ITS1 négatifs (**73%**)

4. Résultats de Digestion enzymatique PCR-RFLP

4.1. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP)

Les fragments de restriction résultants de la PCR RFLP après digestion enzymatique par *HaeIII*, ont été séparés sur des gels d'agarose à 3%. Les résultats sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 : les bandes de taille censés obtenues après la digestion enzymatique par *HaeIII*

Espèces	<i>L.donovani</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L.major</i>
Fragments de restriction par <i>Hae III</i>	164	184	185	203
	175	72	57	132
	54	55	53	
			24	

L'interprétation de ces résultats est effectuée en se basant sur l'observation directe dans le Trans illuminateur UV. Cet appareil nous permet de voir la taille des bandes avant leur dégradation par les UV. Il s'agit de deux types de *L.infantum* dans notre territoire d'étude : *L.infantum* viscérale et *L.infantum* cutanée, mais on ne peut pas identifier quel type s'agit-il par la PCR-RFLP par ce que dans les deux cas on obtient 3 bandes de taille. Pour une identification précise, il faudrait faire un typage isoenzymatique.

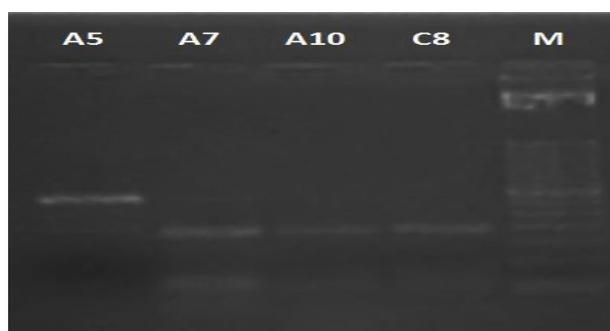


Figure 18 : Profil de digestion enzymatique par *Hae III*. (A5-A7 : témoins culot parasitaire A10-C8: échantillons des patients à analyser, M: marqueur du taille 50pb)

Pour le **A5**, la digestion n'a pas fonctionnée correctement. On ne voit pas clairement les bandes de taille cela ne permet pas d'identifier l'espèce.

Pour le **A7** la digestion a lieu. On voit une bande en dessous de 200 pb et une autre en dessous de 100 pb et une 3ème légèrement en parallèle de 50 pb. Il s'agit donc d'une *L.infantum*

Pour le **A10** et le **C8**, on voit aussi 3 bandes. L'une entre 150 et 200, l'autre proche a 100 et une 3ème proche à 50pb. Donc, il s'agit aussi d'une *L.infantum*.

Dans cette étude, nous avons effectué la digestion de 10 échantillons de nos patients et 7 échantillons des culots parasitaires. Nous remarquons que la totalité des échantillons des patients, qui ont subi une PCR RFLP appartiennent au complexe *L. infantum*. Nos résultats suggèrent la dominance de cette espèce dans l'Algérois (tableau 9).

Tableau 9: Résultats de l'Identification des espèces de *Leishmania* par PCR-RFLP.

Échantillons	PCR-RFLP positif	PCR-RFLP Négatif	Espèce identifié
Culots parasitaires	6	1	5 <i>L. infantum</i> 1 <i>L. major</i>
Échantillons des patients	4	6	4 <i>L. infantum</i>

5. PCR en temps réel

Elle permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence mise par les produits de PCR néo formés.

Le profil d'une réaction PCR classique peut se décomposer en 3 étapes :

- une première étape dite de bruit de fond
- une seconde étape de phase exponentielle de croissance
- une dernière étape de phase de plateau

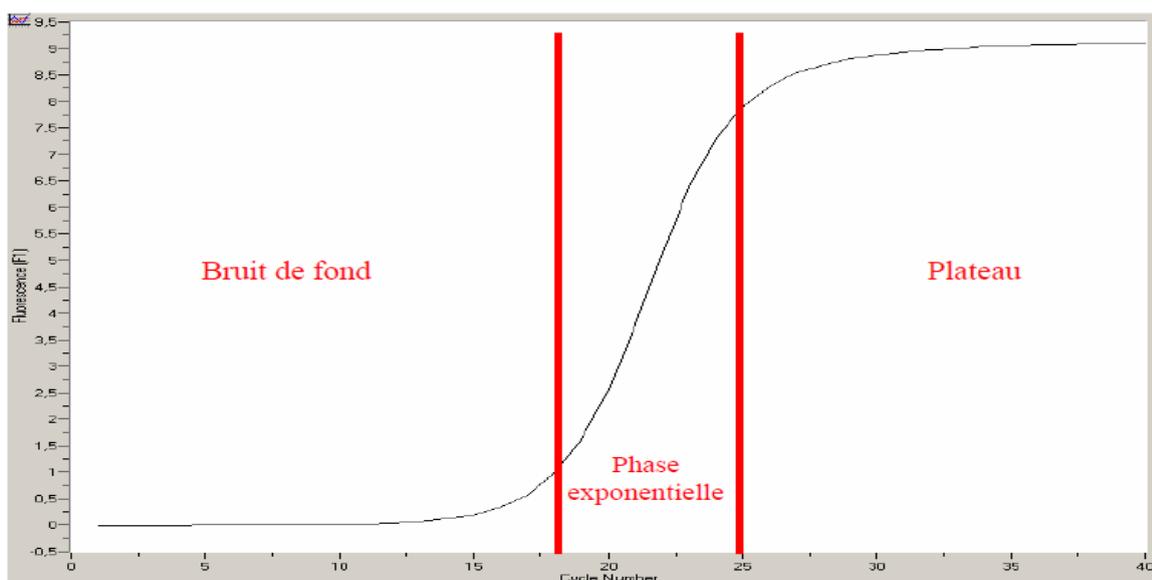


Figure 19: les trois phases qui caractérisent La PCR quantitative en temps réel

A partir de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus pour une meilleure qualité et quantité d'ADN, nous avons fait quelques essais de PCR en temps réel sur des témoins positifs de concentration connue et quelques échantillons de notre étude, afin d'établir une courbe étalon de quantification.

5.1. Interprétation des résultats

Les résultats suivants correspondent aux résultats préliminaires du PCR en temps réel

Le témoin positif devrait avoir une courbe sigmoïde indicative de l'augmentation du signal fluorescent, et le témoin négatif devrait avoir une ligne droite seulement.

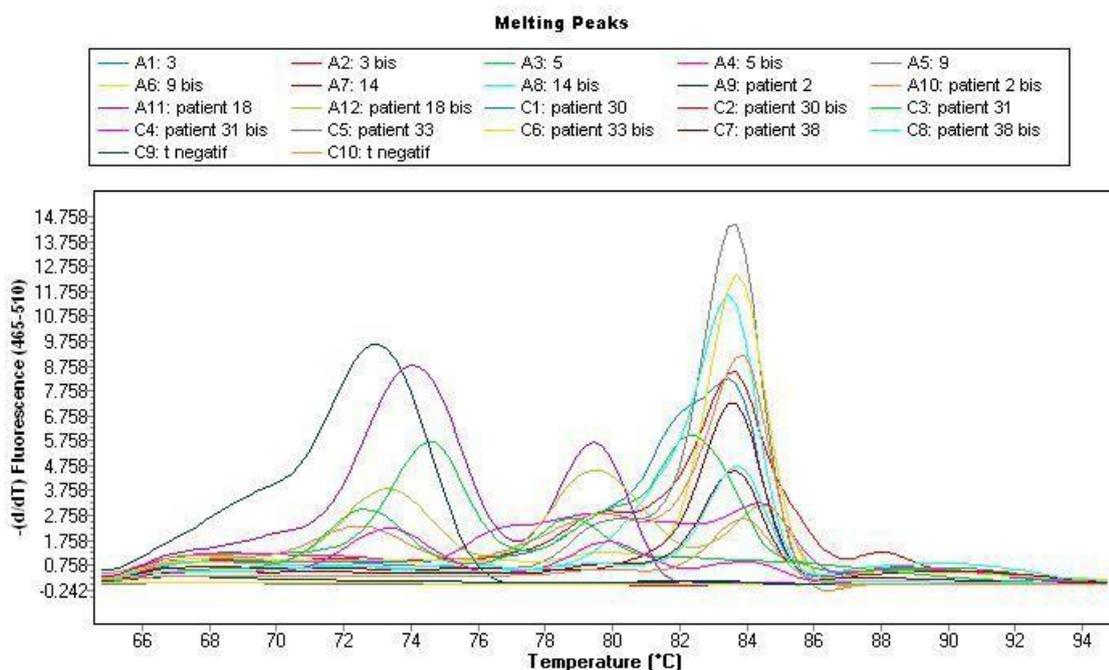


Figure 20: courbes de fusion en fonction de la fluorescence.

Les résultats que nous avons obtenus s'expriment sous forme de courbe représentant des CP (seuil de température cycles) correspondants à des positifs. Notre témoin positif, le patient 2 a donné un CP de 40 et l'autre témoin positif, le patient 2 bis a donné un CP 32.61. Notre témoin négatif a donné un CP de 33.53 et dans une seconde manip, n'a rien donné.

Inc	Pos	Name	Type	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	3	Unknown	36.77
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	3 bis	Unknown	33.76
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	5	Unknown	38.06
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	5 bis	Unknown	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	9	Unknown	14.36
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	9 bis	Unknown	13.21
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	14	Unknown	18.41
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	14 bis	Unknown	26.62
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	patient 2	Unknown	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	patient 2 bis	Unknown	32.61
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	patient 18	Unknown	34.58
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	patient 18 bis	Unknown	32.77
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	patient 30	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	patient 30 bis	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	patient 31	Unknown	35.02
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	patient 31 bis	Unknown	32.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	patient 33	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	patient 33 bis	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	patient 38	Unknown	21.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	patient 38 bis	Unknown	20.13
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	t negatif	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	t negatif	Unknown	33.53

Tableau 10: résultats de CP des échantillons obtenus par le light-cycler 480

Notre souci majeur dans cet essai de mise au point réside dans le fait que quelques échantillons normalement positifs en PCR, n'ont pas donné de résultats positifs ce qui serait probablement due soit à une erreur de pipetage ou à une trop forte concentration en ADN de *Leishmaniase* retrouve anormalement positif. Ce qui nous laisse supposer qu'il s'agit soit d'une contamination ou bien de la présence de dimères dus aux amorces utilisés sachant que le fluorophore utilisé est Sybr-green I (roche)

6. HRM

L'analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou High Résolution Melting (HRM) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations, de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN double brin. Pour tester la fiabilité de la HRM dans l'identification des espèces par leurs températures de fusion, nous avons réalisé deux tentatives de HRM sur quelques échantillons. Nos résultats n'ont pas abouti à l'identification des espèces des leishmanies à partir de leurs Tm de fusion. Cependant, nous avons réussi à faire la mise au point de l'utilité de cette technique.

II. Discussion

Dans les zones endémiques où plus d'une espèce *Leishmania* est présente, des outils de diagnostic sont nécessaires pour détecter les parasites directement dans les échantillons et distinguer toutes les espèces *Leishmania* (Schonian *et al.*, 2003).

La caractérisation des espèces de *Leishmania* est importante, car différentes espèces peuvent nécessiter des régimes de traitement distincts (WHO, 2002). En outre, ces informations sont également utiles dans les études épidémiologiques où la distribution des espèces de *Leishmania* chez les hôtes humains et animaux, ainsi que dans les insectes vecteurs, est une condition préalable à la conception de mesures de contrôle appropriées (Schonian *et al.*, 2003, El Tai *et al.*, 2000).

Sur la base de travaux précédents (Schonian *et al.*, 2003 ; Al Djawabreh *et al.*, 2006 ; Al Djawabreh *et al.*, 2004), nous avons utilisé des méthodes de PCR-RFLP pour le diagnostic et la caractérisation des espèces de *Leishmania* sur des lames colorées de Giemsa sans avoir besoin de les cultiver. Les lames colorées par Giemsa sont très appropriées dans les études sur terrain où des échantillons peuvent être facilement collectés, stockés et envoyés au laboratoire de diagnostic (Schonian *et al.*, 2003 ; Motazedian *et al.*, 2002).

Cette étude se base sur l'utilisation des lames colorées collectés dans l'Algérois au niveau de laboratoires de parasitologie. Les lames colorées étaient à température ambiante dans des conditions favorables et ont été utilisées pour effectuer l'extraction de l'ADN et l'amplification par PCR, puis une identification des espèces a été faite par PCR RFLP.

De nombreux protocoles d'isolement d'ADN génomique ont été optimisés (Budowle *et al.*, 2009 ; Pachot *et al.*, 2007 ; Elgort *et al.*, 2004 ; Nasiri *et al.*, 2005 ;) ; qui ont été vérifiées pour être reproductibles et ont donné de l'ADN de qualité suffisante pour l'analyse génétique (Pachot *et al.*, 2007).

Il est raisonnable de recourir à une procédure d'extraction d'ADN rapide, moins coûteuse et qui convient à notre étude. La méthode que nous avons décidé d'utiliser est une méthode qui se base sur des purifications répétées de l'ADN (par Phénol pur, puis Phénol Chloroforme puis Chloroforme-alcool isoamylique). Ainsi, les Protéines sont efficacement éliminées.

Cependant, la séparation de la phase contenant l'ADN au cours de ces purifications, est une opération délicate. Si on interfère la phase intermédiaire, on prélève des protéines, si on s'éloigne trop de cette phase, on risque d'éliminer des quantités d'ADN. (Brustoloni *et al.*, 2007, Pandey *et al.*, 2013).

Le principal problème rencontré dans notre étude reste la contamination des échantillons. Concernant les coûts, l'extraction par phénol chloroforme a un coût raisonnable, et ces réactifs sont disponibles,

L'ADN obtenu est de bonne qualité pour la plus part de nos échantillons. Bien que la quantité d'ADN isoléene soit pas très importante,

L'Électrophorèse sur gel s'est avéré être un moyen efficient et efficace de séparation des ADN et l'évaluation qualitative des extractions à partir des lames de *Leishmania* colorées par Giemsa utilisées dans notre étude.

L'analyse spectrophotométrique sur Nanodrop par le rapport des mesures de l'absorbance des échantillons à des longueurs d'onde à 260/280 et à 260/230 a pour but d'estimé la qualité et la quantité d'ADN et vérifier si l'ADN extrait est exempt de contamination par des protéines. Les résultats de nos dosages ont permis de valoriser le choix de la technique phénol-chloroforme et la réussite de l'extraction. Par ailleurs, ces dosages sont très importants dans l'orientation de l'utilisation des échantillons en PCR (cas d'échantillon très ou trop peu concentré).

Les outils de diagnostic sont requis pour la détection et l'identification des parasites directement dans des échantillons : Aspiras de moelle osseuse colorés au Giemsa ou grattage de lésion de peau sur des lames en verre, préparé lors du diagnostic de microscopie de routine de la leishmaniose. (Schoénian *et al.*, 2003, Al-Jawabreh *et al.*, 2006, Brustoloni *et al.*, 2007). L'utilisation de la PCR quantitative est l'alternative de choix pour une meilleure identification, mais nécessite une qualité et une quantité d'ADN optimale.

Le test PCR est utilisé dans notre travail pour la détection de l'ADN de *Leishmania* dans nos échantillons et d'amplifier l'ADN génomique de *Leishmania* par une PCR ITS1 (qui cible le gène codant pour le rRNA de la petite sous unité ribosomale- internal transcribed spacer1-).

Les outils de diagnostic actuellement disponibles en Algérie permettent d'identifier plus les LC et les LV. Les données récentes montrent que l'incidence de la maladie est en augmentation, et son aire de distribution géographique en extension ce qui lui confère la première place dans les maladies parasitaires, et représente 35 % des cas de maladies à déclaration obligatoire.

Il est évident que, comme pour la plupart des maladies parasitaires, l'apport du diagnostic moléculaire peut être considérable. La PCR est une méthode diagnostique confirmée pour la LC et la LV.

Les analyses PCR-RFLP ont confirmé *L. infantum* comme responsable de VL et aussi des cas CL au nord d'Algérie ce qui donnent de nouvelles idées sur la répartition des agents éthologiques des leishmanioses dans le nord du pays.

A la différence d'une PCR classique, la PCR en temps réel utilise une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel. Le SYBR GREEN 1 est un fluorophore qui s'intercalant dans le petit sillon d'ADNdb très sensible mais il est spécifique. Il marque tous les ADN doubles brins (spécifiques ou non -dimère d'amorces) La PCR en temps réel jugée plus sensible que la PCR normal , elle a donc permis d'augmenter le nombre de patients détectés , on 'a obtenu des nouveaux cas positifs qui ont été négatifs en PCR normal.

Conclusion

Dans notre étude on 'a visé la détection de *Leishmania* et l'identification des espèces dominante dans le territoire de l'Algérois à partir des lames colorées par Giemsa.

Notre étude démontre la valeur des lames colorées par Giemsa comme source précieuse d'ADN non seulement pour le diagnostic de leishmaniose, mais aussi pour une rétrospective des études épidémiologiques. On peut conclure que ces lames aussi sont considérées comme un outil très utile pour le diagnostic de cas difficiles, ayant un faible nombre de résultats de microscopie et de charge parasitaire.

La technique d'extraction choisie dans cette étude est l'extraction phénol-chloroforme. Elle nous a permis d'obtenir de l'ADN en qualité et en quantité suffisantes pour réaliser des techniques de biologie moléculaire tels que la PCR et la PCR-RFLP et la PCR en temps réel. Le succès de ces méthodes nécessite la maîtrise de la technicité que dépendent les résultats, la disponibilité du temps, nombre d'opérations d'extraction effectuées, matériel initial disponible ainsi que d'autres critères déterminent le choix de la méthode d'extraction. C'est la balance entre les besoins et les moyens qui déterminent le choix pertinent.

Dans le cadre de cette étude il n'a pas été possible d'identifier toutes les espèces existant dans l'Algérois par la technique PCR-RFLP ou par la HRM, et on 'a pas pu confirmer de façon absolue que les patients détectés présentent une LV ou une LC.

Nos résultats ont confirmé l'hypothèse selon laquelle la région de séquence ITS-rDNA peut compléter les caractéristiques des parasites de *Leishmania*. La méthode a été développée dans

la présente étude peut être utilisée comme outil de diagnostic dans les laboratoires de référence qui disposent d'infrastructures appropriées pour la réalisation d'une identification moléculaire des parasites.

Cependant, l'objectif de l'utilisation de la PCR en temps réel n'était pas de démontrer que la RT-PCR permettait de mieux prendre en charge les patients, mais que cette technique, appliquée à des lames conservées et facilement transportables, peut donner de meilleurs résultats en termes de taux de détection des leishmanioses.

Cette démonstration est importante dans la mesure où elle peut permettre aux institutions du pays de se mobiliser pour favoriser l'implantation de laboratoires de référence équipés de la technologie de RT-PCR. La mise à disposition de cet outil performant suscitera le développement d'études clinico-biologiques plus complètes, permettant d'apporter des réponses définitives aux conditions d'amélioration du diagnostic de cette maladie.

Le test HRM suggéré dans cette étude est une technique fiable, robuste et reproductible et peut aboutir dans des conditions favorables à des résultats souhaitables pour l'identification des espèces des leishmanies.

Références bibliographiques

- **Akhavan T, Luhovyy BL, Brown PH, Cho CE, Anderson GH, 2010.** Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *Am J Clin Nutr.* 2010 Apr;91(4):966-75
- **Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D.** 2017 *Mol Aspects Med.* 2017 Oct;57:1-29
- **Aurbry P, 2014.** Cours pour le diplôme de médecine tropical des pays de l'océan indien.
- **Ba Y, 1999.** Phlébotomes du Sénégal : Dynamique des populations de trois régions biogéographiques - Rôle dans la transmission des Arbovirus. Thèse docteur de troisième cycle de Biologie Animale ; Université Cheikh Anta Diop de Dakar Faculté des Sciences et Techniques : p154.
- **Bailey MS, Lockwood DN.**(2007) Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 2007 Mar-Apr;25(2):203-11.
- **Belazzoug S, 1987.** La leishmaniose canine en Algérie. *Magh Veter* 3: (13): p11-13.
- **Belazzoug S, Addadi K, Mokrani T, Hafirassou N, Hamrioui B, Belkaid M, 1985.** La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. *Ann Soc Belg Med Trop* 65: p 329-335.
- **Belazzoug S, Ammar khoudja A, Belkaid M, Tabet-Derraz O, 1985.** La leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Bull Soc Pathol Exot* ; 78 : p615-622.
- **Belazzoug Smail, 1983.** Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie) infestation naturelle de "Psammomys obesus" (rongeur, gerbillidé) .*Bull Soc Pathol Exot* 76:p146-149.
- **Belazzoug Smail, 1984.** La leishmaniose en algérie à travers l'identification isoenzymatique des souches. *Coll Inter Tax Phy des leishmania*, Montpellier : p397-400.
- **Belazzoug Smail, 1986.** Découverte d'un Merions chawi (rongeur, gerbillidé) naturellement infesté par *leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar chellala (Algérie) .*Bull Soc Pathol Exot* 79: p630-633.
- **Benikhlef R, Harrat Z, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali-Braham S & Belkaid M (2004)** Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Medecine Tropicale* 64, 381–383
- **Boubidi S, Benallal K, Boudrissa A, Bouiba L, Bouchareb B, Garni R, Bouratbine A, Ravel C, Dvorak V, Votypka J, Volf P, Harrat Z (2011).** *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes Infect* 13: 691-696.

- **Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, Wincker P, 1998.** Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 1998; 222: 107-17.
- **BUSSIERAS .J, CHERMETTE.R. (1992):** Abrégé de parasitologie vétérinaire, Fascicule V, Mycologie Vétérinaire. Maisons-Alfort. Ecole Nationale Vétérinaire : Service Parasitologie. 1992. 179p
- **Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. (2007)** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007 Nov;5(11):873-82.
- **D. Benyahia.(2008-2009)** Mise au point de la leucocytoconcentration et son application dans le diagnostic de la leishmaniose canine et la leishmaniose viscérale humaine, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009.
- **Dedet J.P, 1999.** Les leishmanioses. Ellipses Paris Edp : p253.
- **Dedet J.P, 2001.** Leishmanies. leishmaniose, biologie clinique et thérapeutique encyclopédie médico-chirurgical : 8 : p506-510.
- **Dedet J.P, 2008.** Thérapeutique des leishmanioses. 19 novembre 2008.
- **Dedet J.P, 2009.** Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique Elsevier Masson Sas a-10 : p508-506.
- **Dedet J-P, Beranrd C, Nicole D ,Gilles B, Laurence L,Francine P, 2013.** Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer, Presse Med : p 0112.
- **Desjeux P, Alvar J (2003)** *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*2003;97(Suppl 1):3–15
10.1179/000349803225002499
- **Desjeux P, Dedet JP. (2005).** Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 610–612
- **Dujardin. J.C, Campino.L, Cañavate.C, Dedet. J.P, Gradoni.L, Soteriadou, K. Mazeris.A., Ozbel.Y.(2008)** and Marleen Boelaert Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe *Emerg Infect Dis.* 2008 Jul; 14(7): 1013–1018.
- **Eugénie Gay, Hélène Guegan, Marie Ameline, Jean-Pierre Gangneux, 2015.** Les leishmanioses humaines : parasitoses importées et autochtones : p 461-477.
- **Euzeby, J. P. (2008).** List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
- **Fu Y, Yang W, Wu W, Yan K, Xing BC, Chen MH.** *Chin J Cancer Res.* 2011 Dec;23(4):295-300.
- **GOLDFUSS, GEORG AUGUST (1817)** *Ueber die Entwicklungsstufen des Thieres,* Nürnberg, Leonhard Schrag (1817)

- **Gott M. (2003)** Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. 10.1073/
- **Harrat Z, Belkaid M. 2003.** "[Leishmaniasis in Algiers: epidemiologic data]." *Bulletin de la Société de pathologie exotique.* 96 (3): 212-4.
- **Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F, Benikhlef R, Selt B, Dedet JP, Ravel C, Belkaid M. (2009)** Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte and Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(7): 716– 720.
- **Henry W. Murray MD* 1993,** Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): A decade of progress and future approaches 158-177
- **IZRLM-A, ROBINO.M, PEPTITHORY.J-C, ROUSSET.J-J: (1999)** Leishmaniose viscérale diagnostic parasitologique par leuco concentration. *La Presse Médicale* 12 juin 93, 22, n°21, p1010
- **Khan.T; Malek TR., 2012** May 25;36(5):702-4.
- **Killick-Kendrick R (1999).** The Biology and control of Phlebotomine sand flies: *clin . Dermatol.* 17. 279-289.
- **Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G.** *Microbes Infect.* 2007 Mar;9(3):334-43.
- **Kumar N, Nuhant P, Solt LA, Conkright JJ, Wang Y, Istrate MA, Busby SA, Ruben DGO, Burris TP, Cameron M, Mercer BA, Hodder P, Roush WR, Rosen H, Griffin PR.** Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. 2010 Sep 1
- **L. Rezalleh.(2008-2009)** Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien Laghouat et Ain oussara, mémoire de fin d'étude de résidanat en parasitologie mycologie médicale, 2008-2009
- **Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, (1999)** Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 1999;37:1953–7
- **Léger N. & Depaquit J., Ferté H.** Systématique moléculaire des Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) : corollaires biogéographiques. *Annales de la Société Française d'Entomologie*, 1999,35 (S), 27–32.
- **Lipp, M., Brodman, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E., 1999.** IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried power. *J. AOAC Int.* 82, 923–928
- **Lodish H, Berk A, Zipursky SL (2000)** *Molecular Cell Biology*, 4th edn. New York: WH Freeman.
- **Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I.** *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):3147-53.
- **Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H.** *J Clin Microbiol.* 1997 Oct;35(10):2551-5.
- *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Apr;77(1):19-29. Erratum in: *Mol Biochem Parasitol* 1996 Nov 25;82(2):273-4.

- **Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L.** Rev Cubana Med Trop. 2012 May-Aug;64(2):108-31.
- **Mouri Y, Nishijima H, Kawano H, Hirota F, Sakaguchi N, Morimoto J, Matsumoto M.** J Immunol. 2014 Nov 1;193(9):4356-67.
- **Mullis KB, Faloona FA. 1985.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. 155:335-50.
- **Myler PJ, Audleman L, de Vos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Ivens A, Stuart K, 1999.** *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2902-6.
- **O.M.S. (2002)** : Relève Epidémiologique Hebdomadaire de l'O.M.S., Vol. 77 (44) : 365- 372.
- **O.M.S. (2014)** : Leishmaniose. Aide-mémoire N°375. Janvier 2014.
- **Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, Espinosa D, Arevalo J, Noyes H, Mauricio I, Kuhls K.** J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):2818-25.
- **Odiwuor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G.** Infect Genet Evol. 2011 Dec;11(8):2113-8.
- **OMS (1990).** Lutte contre les leishmanioses: rapport d'un Comité OMS d'experts.
- **O'Shea J, Massimo G, Robert DS, (2002).** Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway [8674\(02\)00701-8](#)
- **Ouellette M., Olivier M. Sato S., Papadopoulou B. (2003)** : le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. Synthèse Revues. Médecine/Sciences ; 19 : 900-9.
- **P. DEDET (2001)** : Les Leishmanioses. Encycl. Méd. Chir. Maladies infectieuses, 8094 A10, 4, 2001, 8p
- **Paiva-Cavalcanti M, Dantas-Torres F, Figueredo LA, Melo MF, da Silva FJ, da Silva AL, Almeida EL, Brandão-Filho SP.** Vet Parasitol. 2010 Jun 24;170(3-4):313-7.
- **Parrot L (1930).** Notes sur les phlébotomes. à propos de deux *Prophlebotomus* d'Algérie: *Phlebotomus minutus* var. *Signatipennis* et *Phlebotomus fallax*. Arch Inst Pasteur Alger 20: 322-335.
- **Parrot L (1931).** Les espèces algériennes du genre *Phlebotomus* (Psychodidae). Bull Soc Hist Nat Afr Nord 26: 145-149
- **Postras, D. Houde A. Leblanc, A. Letellier, J. Brassard, D. Plante., Ward .P. (2002)** Comparative analysis of different TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control **04104.x**

- **Quitterie N., Odette L., Nadau C. (2005)** : Etude Préliminaire de l'utilisation de la Protéine LACK dans le test d'Intra-Dermo-Réaction de la leishmaniose Canine. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier. Toulouse. 116p : 12-51.
- **Ravel .A. Florence L . Denis Z Franck .B M. Josette. A .** Blood Cholesterol and Walnut Consumption: A Cross-sectional Survey in France.4. 333-339
- **Rioux J.A., Belkaid M., Dedet J.P., 1996.** *Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90(6): 625-629.
- **Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P & Perieres J (1990)** Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 65, 111–125
- **Ross. R. (1903)** NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVANI .1261–1262.
- **Sambrook, J. , Fritsch E. F. Maniatis .T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual.
- **Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E.** Trends Parasitol. 2010 Oct;26(10):466-9.
- **Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C (2003) .** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and
- **Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2003 Sep;47(1):349-58.
- **Simpson L, Neckelmann N, de la Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP, Stuart K.(1987)** Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence,1987. 5;262(13):6182-96.
- **Souza AAA, Ishikawa EAY, Braga RR, Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ. (1994).** *Psychodopygus complexus*, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90, 112–113
- **Stiles,M . McMichael P. Chen.J. Egelhoff, W. F. Appl.J.(1998)** Phys. 83, 7037 - 1998!; Rev. B 58, 8605 -1998
- **Toz.S.O, Nasereddin.A., Ozbel. Y. Ertabaklar.H., Culha.G., Sevil.N., Alkan.M.Z., Jaffe.C.L. (2009)** Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples 1365-3156.2009.02384.x
- **Vickerman . J. Michael B, John .W. 1976** Adsorption and surface reactivity of metals by secondary ion mass spectrometry. Part 1. Adsorption of carbon monoxide on nickel and copper
- **Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Horák A, Miles MA, Lukes J.** Int J Parasitol. 2007 Feb;37(2):149-60.

Webographie:

- **[http://c2i.fmpm.uca.ma/umvf_rd/campus-parasitologie mycologie/cycle7/poly/0254ico.html](http://c2i.fmpm.uca.ma/umvf_rd/campus-parasitologie_mycologie/cycle7/poly/0254ico.html)**
- **http://c2i.fmpm.uca.ma/umvf_rd/campus-parasitologie-mycologie/cycle2/poly/0716ico.html**
- **[http://s3.amazonaws.com/magoo/ 2oAE-2.jpg](http://s3.amazonaws.com/magoo/2oAE-2.jpg)**
- **<http://www.amoedodistribuidora.com/site/leishmaniose-visceral-canina/>**
- **<http://www.goldenpin.org.tw>**
- **www.aswat.ma**
- **<http://www.genedb.org>**

ANNEXES

Annexe 1 : Coloration GIEMSA

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

Annexe 2 : Appareillage et réactifs d'extraction

1. Appareillage:

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage : Microscope optique (Motic) ; Centrifugeuse (Eppendorf) ; Centrifugeuse réfrigérée (Sigma); Vortex (kartell); Bain marie (Mettler) ; Hotte à flux laminaire pour biologie moléculaire (Captair) ; Hotte chimique (Gelaire 1); Transilluminateur (Spectrolin) ; Balance à précision (Scaltec); Balance (Ohaus) ; Microonde (Whirlpool); Thermocycleur (Technogenius) ; Agitateur (Stuart) ; Cuves électrophorèse (Fisher) ; Générateur de courant (consort) ; Spectrophotomètre (Nanodrop™) ; Light-cycler 480 (Roche)

2. Le petit matériel :

On a utilisé lors de ce travail le matériel suivant : bistouri stérile ; verrerie ; poire ; tubes Eppendorfs ; lames porte objet ; lamelles ; boîtes pétri ; les embouts ; biberon ; pipettes stériles ; usage unique de 5 à 20 ml ; micropipettes ; seringues ; écouvillons ; tubes coniques.

3. Réactifs et solutions

Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau distillée ,huile à émulsion (REACTIFS RAL), eau ultra pure, tampon de lyse(MERCK), détergent SDS ,acétate de sodium ,éthanol absolu; éthanol 70, protéinase K (EUROBIO), phénol chloroforme alcool iso amylique (MERCK), TE, bleu de bromophénol , le bromure d'éthidium réactifs de kit QIAGEN, agarose (EUROBIO), tampon de charge TAE, marqueur du poids moléculaire 50pb et 100pb

Préparation du tampon de lyse : pH 8

0.5 M EDTA

Tampon d'élution pH 8

Tris-HCl 1 mM	20 ml	} 200 ml de TE
EDTA 0,5 M.....	400 µl	
H ₂ O	170 ml	

Phénol, chloroforme et isoamyl alcool (25v:24v:1v)

SDS 10% : pH 7,5

SDS10 g
H2O90 ml

Tableau 1: les réactifs nécessaires pour l'extraction de n échantillon

Réactifs utilisés	Volume
Tampon de lyse	500 µl
Protéinase K	25 µl
Détergent SDS	125 µl
Phénol-chloroforme	1 ou 2 volume
Acétate de sodium	50 µl
Éthanol absolue	1000 µl
Éthanol 70 °C	500 µl

Annexe 3 : L'électrophorèse**Réactifs**

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

Préparation du gel d'agarose à 1.5%

- Peser 1.5 g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après Chauffage le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide, pour le refroidir met le mélange sous l'eau courante puis ajouter 6 µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne. Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

Annexe 4 : La PCR

Réactifs : Nous avons utilisé dans notre PCR les réactifs du kit QIAGEN.

Tableau 2: Les produits du mix, leurs rôles, et leurs volumes

Produit	Rôle	volume (µl)
Eau distillée stérile	Dilution des réactifs a leurs concentrtrions optimales d'utilisation	12.55
dNTPs	Elongation des deux brins d'ADN	1.25
MgCl2	Cofacteur positif de la Taq polymérase	1.5
Amorce 1	Amorce sens	0.5
Amorce2	Amorce Reverse	0.5
Solution Q	5
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN	0.2
Tampon	Stabiliser le PH du milieu réactionnel	2.5

Mode opératoire

Une détection spécifique de l'ADN de *Leishmania spp* a été réalisée en utilisant les amorces : ITS1 (pour cibler l'ADN génomique)

Tableau 3 : Amorces utilisées en PCR ITS1

Amorce	Forward : LITSR	Reverse : L5.8s
ITS1	5'- TGATACCACTTATCGCACTT-3'	5'- CTGGATCATTTTCCGATG-3'

Protocol ITS 1

Tableau 4 : Les conditions PCR ITS 1 (Préparation du mix)

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL) Pour 1 échantillon
H2O	/	/	23.1
Tampon	10X	1X	5
dNTP	4mM	0.2mM	2.5
A1	25µM	0.5µM	1
A2	25µM	0.5µM	1
MgCl2	25mM	1.5mM	3
Taq pol	5U	2U	0.4
ADN	/	/	2

- Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillon étudié.
- Tous les constituants sont mélangés dans un tube Eppendorf. 23 μ l de ce mélange sont distribués dans chaque tube de barrettes de 8 spécifiques à la PCR (thermocycleur).
- En plus des échantillons on a : un Témoin (-) : 2 μ l d'eau distillée stérile plus 24 μ l de mix. Et un Témoin (+): 2 μ l de l'ADN (+) plus 24 μ l du mix.
- L'échantillon : contient 2 μ l d'ADN extrait ajouté de 24 μ l de mix. Le volume total de chaque micro tube (échantillons et témoins) est de 25 μ l.

Tableau 5 : Programmation du thermocycleur pour ITS 1 / 35 cycles:

Paramètres	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	15 min
Dénaturation	95°C	20 sec
Hybridation	53°C	15 sec
Elongation	72°C	1 min

Annexe 5 : PCR-RFLP

Tableau 6 : les volumes des réactifs de digestion nécessaire pour la PCR-RFLP

Réactifs de digestion	Volume (μ l)
Hae III	1
Multi-core	3
BSA	0.3
Tampon	3
H2O	7.7

Annexe 6 : PCR en temps réel

on 'a utilisé dans notre RT-PCR le Red master mix

Tableau 7 : volume des produits nécessaires pour un seul échantillon

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

Tableau 8 : Paramètres de la RT-PCR a réalisé sur Leight-cycle 480

Nom du programme	Nombre des cycles	Température (°C)	Temps	Taux de rampe (°C/S)
RT-PCR				
Dénaturation	01	95 °C	10 min	4.40
Amplification	45	95 °C	10 s	4.40
		50 °C	10 s	2.20
		72 °C	20 s	4.40
Fusion	01	95 °C	01min	4.40
		40 °C	01 min	2.20
		65 °C	10 s	1.00
		95 °C	continu	0.11
refroidissement	01	/	/	/

ANNEXE RESULTATS:

tableau 1: Résultats scorés du dosage optique des lames références :

Echantillons références	DO: 260/280	Do: 260/230	Concentration ng/µl	Score 260/280	Score 260/230	Score concentration
A	0,79	1,48	79,91	1	1	2
B	0,84	1,44	31,89	1	1	1
C	0,96	0,98	9,94	1	1	1
D	0,67	1,47	32,97	1	1	1
E	1,1	1,5	60	1	1	2
F	2,32	2,53	549,1	2	2	4
G	1,00	1,32	18,6	1	1	1
H	nég	nég	Nég	/	/	/

tableau 2: résultats scorés des dosages des témoins culot parasite:

ID du témoin	espèce	260/280	260/230	Concentration ng/µl	Score 260/280	Score 260/230	Score concertation
1*	<i>L.Donovani</i>	1,36	2,18	79,3	1	2	2
2*	<i>L.Tropica</i>	1,89	2,38	193,49	2	2	3
3*	<i>L.Infantum.v</i>	2,23	3,49	80,06	2	2	2
4*	/	1,61	2,89	58,92	1	2	2
5*	<i>L.Major</i>	2,04	3,72	61,46	2	2	2
6*	<i>L.Infantum.v</i>	2,54	2,59	243,31	2	2	3
7*	<i>L.Major</i>	2,63	2,68	253,49	2	2	3
8*	/	2,59	2,9	168,31	2	2	2
9*	<i>L.infantum.c</i>	1,89	2,65	127,5	2	2	2

10*	<i>L.Tropica</i>	1,59	2,68	61,91	1	2	2
11*	<i>L.Donovani</i>	1,52	1,94	98,89	1	2	2
12*	/	2,45	3,28	71,99	2	2	2
13*	<i>L.Killicki</i>	1,35	3,18	12,3	1	2	1
14*	/	3,16	3,18	202,49	2	2	3
15*	<i>L.infantum.c</i>	9,95	5,72	17,21	2	2	1

tableau 3: résultats scorés des dosages des échantillons des patients à analyser

ID d'échantillon	260/280	260/230	Concentration	Score 260/280	Score 260/230	Score Concentration
1	1,02	1,62	52,76	1	1	2
2	1,81	2,22	338,22	2	2	3
3	0,94	1,56	37,95	1	1	1
4	1,05	1,55	73,89	1	1	2
5	1,15	1,89	49,95	1	2	2
6	1,17	1,65	21,28	1	1	1
7	1,18	1,51	61,16	1	1	2
8	1,36	1,52	64,14	1	1	2
9	1,2	1,43	51,85	1	1	2
10	1,16	1,63	44,3	1	1	1
11	1,44	1,43	39,8	1	1	1
12	1,07	1,5	48,76	1	1	1
13	1,88	1,95	108,22	2	2	2

14	1,21	1,7	67,35	1	1	2
15	1,22	2,41	36,36	1	2	1
16	1,22	1,6	47,9	1	1	1
17	1,74	1,95	51,91	2	2	2
18	1,52	1,75	69,81	1	2	2
19	1,46	1,8	57,61	1	2	2
20	1,21	0,85	1,31	1	1	1
21	0,96	1,62	26,6	1	1	1
22	1,52	2,43	44,35	1	2	1
23	1,05	1,37	36,96	1	1	1
24	1,05	1,34	42,24	1	1	1
25	2,75	1,63	9,07	2	1	1
26	5,77	1,46	6,5	2	1	1
27	2,32	1,22	17,51	2	1	1
28	2,94	1,43	9,46	2	1	1
29	1,25	2,33	51,2	1	2	2
30	0,92	1,45	144,22	1	1	2
31	1,5	1,82	69,85	1	2	2
32	2,42	1,98	60,41	2	2	2
33	1,89	1,45	24,05	2	1	1
34	1,38	1,68	56,62	1	1	2
35	1,38	2,14	36,19	1	2	1
36	1,9	1,27	209,48	2	1	3
37	2,27	1,42	25,77	2	1	1
38	1,75	1,81	202,6	2	2	3

39	1,21	1,63	46,9	1	1	1
40	1,2	1,29	27,16	1	1	1
41	1,29	3,38	29,35	1	2	1
42	1,25	1,9	61,1	1	2	2
43	1,32	1,78	51,61	1	2	2
44	1,52	1,88	58,55	1	2	2
45	2,1	1,63	14,34	2	1	1
46	2,9	1,35	4,2	2	1	1
47	3,2	1,93	15,8	2	2	1
48	1,15	129	28,48	1	4	1
49	5,69	1,7	8,74	3	1	1
50	1,06	1,25	56,06	1	1	2
51	1,09	1,4	51,45	1	1	2
52	1,12	1,5	51,03	1	1	2
53	3,37	1,47	8,9	2	1	1
54	2,03	1,2	34,66	2	1	1
55	1,82	1,31	17,3	2	1	1
56	4,36	1,67	7,24	3	1	1
57	1,73	1,38	23,52	2	1	1
58	1,85	2,01	653,14	2	2	4
59	2,52	1,71	30,74	2	1	1
60	1,65	1,53	43,1	2	1	1
61	6,54	1,35	7,6	4	1	1
62	2,36	1,72	31,47	2	1	1
63	2,27	1,53	26,1	2	1	1

64	2,66	1,69	26,75	2	1	1
65	2,55	1,83	29,32	2	2	1
66	23,96	1,81	6,37	4	2	1
67	1,88	1,49	19,57	2	1	1
68	3,42	1,59	15	2	1	1
69	4,2	1,57	17,62	2	1	1
70	4,56	1,6	13,63	3	1	1
71	1,96	2	344,51	2	2	4
72	7,05	0,97	7,63	4	1	1
73	2,05	1,21	12,17	2	1	1
74	2,12	0,92	15,77	2	1	1
75	1,53	1,14	23,41	1	1	1
76	1,24	1,43	42,37	1	1	1
77	42,74	0,72	6,05	4	1	1
78	1,24	1,28	30,63	1	1	1

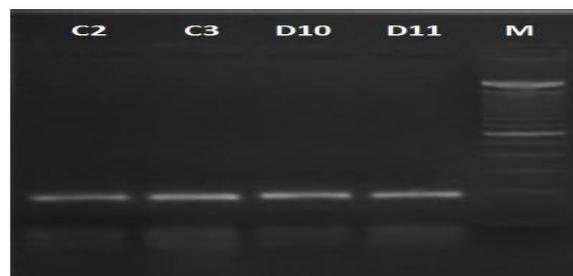


Figure 1: Profil de digestion enzymatique par *Hae III*. (C2-C3-D10-D11 : témoins culot parasite, M: marqueur du taille 50pb)



Figure 2 : Profil de digestion enzymatique par *Hae III*. (C2-C3-D10-D11 : témoins culot parasite, E3-E8-E9: échantillons références, M: marqueur du taille 50pb)

tableau 4: résultats de CP des échantillons obtenus par le light-cycler 480

Inc	Pos	Name	Type	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	3	Unknown	36.77
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	3 bis	Unknown	33.76
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	5	Unknown	38.06
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	5 bis	Unknown	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	9	Unknown	14.36
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	9 bis	Unknown	13.21
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	14	Unknown	18.41
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	14 bis	Unknown	26.62
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	patient 2	Unknown	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	patient 2 bis	Unknown	32.61
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	patient 18	Unknown	34.58
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	patient 18 bis	Unknown	32.77
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	patient 30	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	patient 30 bis	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	patient 31	Unknown	35.02
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	patient 31 bis	Unknown	32.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	patient 33	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	patient 33 bis	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	patient 38	Unknown	21.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	patient 38 bis	Unknown	20.13
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	t negatif	Unknown	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	t negatif	Unknown	33.53

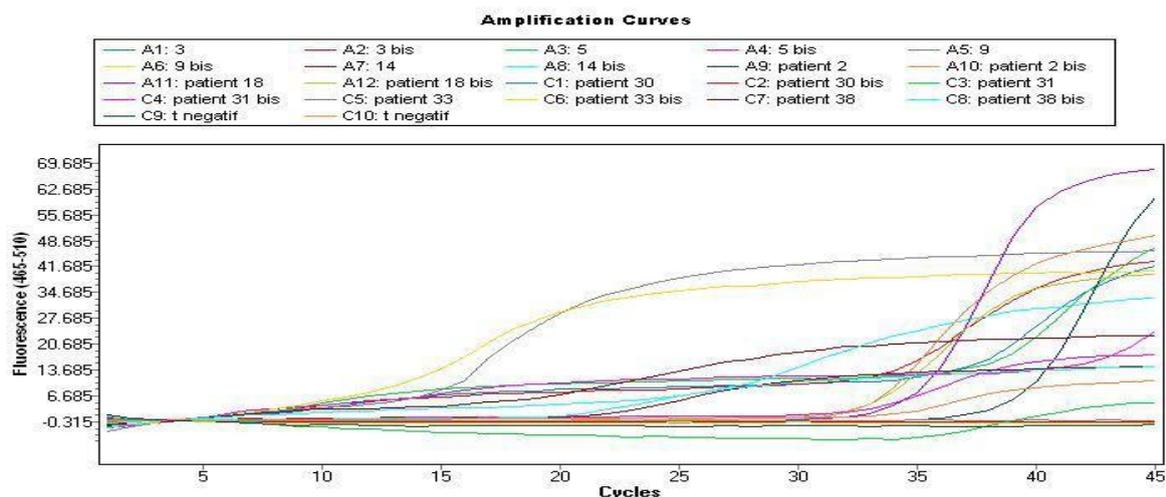


figure 3: courbes des cycles d'amplification en fonction de la fluorescence

tableau 5: informations supplémentaires sur les pics d'étalonnage

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2				Status
			Tm	Area	Width	Height	Tm	Area	Width	Height	
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	3	82.73	31.94	4.04	7.90					
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	3 bis	83.60	24.02	3.17	7.57					
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	5	74.57	13.64	2.71	5.03	82.19	23.13	4.34	5.33	
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	5 bis	80.05	13.77	6.34	2.17	84.34	6.52	2.25	2.90	
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	9	83.54	30.10	2.11	14.28					
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	9 bis	83.71	26.71	2.16	12.36					
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	14	83.51	15.76	2.25	6.99					
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	14 bis	83.19	30.11	2.81	10.70					
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	patient 2	73.09	31.30	3.13	9.99					
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	patient 2 bis	80.32	5.60	3.37	1.66	83.81	21.46	2.27	9.44	
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	patient 18	74.09	32.00	3.62	8.83	79.50	16.32	2.61	6.26	
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	patient 18 bis	73.09	8.56	2.12	4.04	80.82	33.80	8.79	3.85	
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	patient 30									
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	patient 30 bis									
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	patient 31	72.51	8.21	3.21	2.56	78.85	5.82	3.01	1.93	
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	patient 31 bis	73.30	5.66	2.49	2.27	81.03	9.86	7.47	1.32	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	patient 33									
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	patient 33 bis	70.64	0.48	8.08	0.06					
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	patient 38	83.60	10.19	2.30	4.43					
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	patient 38 bis	83.73	10.65	2.25	4.73					
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	t negatif	82.96	1.20	7.10	0.17					
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	t negatif	83.90	6.41	2.41	2.66					

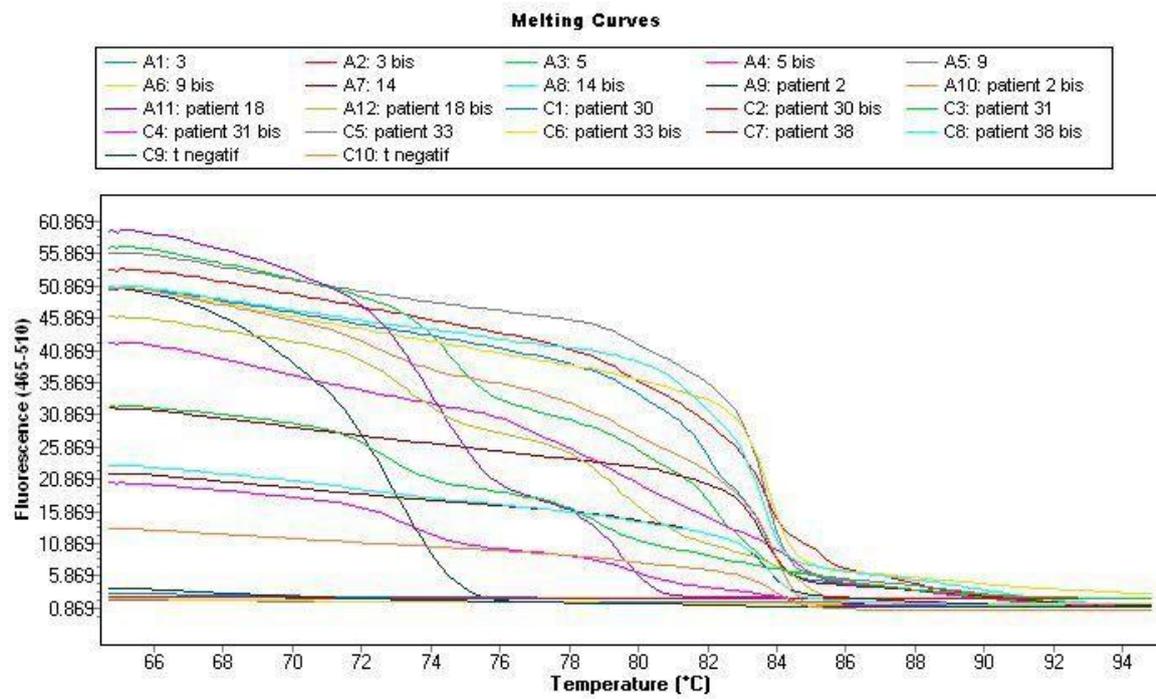


figure 4: courbes de fusion en fonction de la fluorescence.