

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
Master en science de la nature et de la vie
Filière Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique

THEME

Détection et identification moléculaire du virus à ARN de Leishmania dans les souches Algériennes

Présenté par : M^{elle} BOUZOUIDJA Rachida

M^{elle} HADDOUCHE Yasmine

Soutenu le : 12 / 09 / 2018

Devant le jury composé de :

| | | | |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------------|
| Mr GUETARNI D J | Professeur | Université de Blida 1 | - Président |
| M ^{me} EDDAIKRA N | Maitre de recherche | IPA | - Promotrice |
| Mr BENALLAL K | Entomologiste | IPA | - Co-promoteur |
| M ^{me} AISSANI R | MCB | Université de Blida 1 | - Examinatrice |

Promotion 2017 - 2018

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse,
qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère*

*À mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années
des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner
l'aide et à me protéger.*

Que Dieu les garde et les protège.

*À mon frère unique MAHFOUD pour le courage et les conseils qu'il m'avait donné,
pour sa générosité, sa tendresse et sa largesse merci frère pour tout ce que tu m'as
fait.*

*Tous mes amis de l'U.S.D.B, et en particulier :Nourelhouda, Amina, Karima,
Merièmè, tout en leur souhaitant la réussite dans tout ce qu'ils entreprennent*

Ma chère binôme « H. Yasmine » et à toute sa famille.

*Tous mes enseignants qui ont participé à ma formation durant mes cinq ans, sans
les nommer, car la liste est longue et le risque est grand d'en oublier un*

A toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment

A moi-même.

*Merci ALLAH pour tous ce que tu m'as donné, merci ALLAH pour le chemin que tu
m'as fait traverser*

B. Rachida

Dédicace

À mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour me permettre de suivre mes études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'étude. J'espère qu'ils trouvent dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

*À mes adorables frères **ABD ELWADOUD** et **ABD ERRAHMANE**, qui ont été toujours à mes côtés, merci mes frères pour votre existence dans ma vie.*

*Un dédicace spécial, parfumé et plein d'amour à ma chère grand-mère **ZOHOR** qui souhaitait tant me voir soutenir ma mémoire et qui nous a quitté en laissant un vide irremplaçable dans ma vie.*

À mes chers cousins et cousines.

*À mes chers oncles et tantes : **KARIM, HAMZA, DJAMILA, HAYETTE, FAIROUZ** et **SAKINA** pour leur amour, support et courage.*

*À ma chère grand-mère **YAMINA** en lui souhaitant une longue vie pleine de joie, de bonheur et de santé.*

*À ma chère **AMINA**, la sœur que ma mère n'a pas donné naissance, en lui souhaitant une vie pleine de bonheur et de joie.*

*À mes chers oncles et tantes de la famille **CHERGHI** et de la famille **ABD ENNEBI** spécialement à **FATMA** et à ma tante **BOUKEFTANE LINDA**.*

*Je dédie particulièrement mes chères copines : **IMENE, OUARDIA** et **SOUMIA**.*

*Un dédicace spécial et parfumé plein d'amour à ma chère binôme et copine **RACHIDA** pour les années merveilleuses qu'on a vécu ensemble et les moments durs qu'on a partagé, pour sa patience, sa générosité, et sa largesse, en lui souhaitant de tout mon cœur une très belle vie pleine de Santé, de joie et de bonheur, ainsi qu'à sa famille.*

*Merci **ALLAH** pour tous ce que tu m'as donné, merci **ALLAH** pour le chemin que tu m'as fait traverser....*

***H .YASMINE** with love....*

Remerciements

Pour m'avoir permis d'être ce que je suis devenu aujourd'hui, je voudrais remercier le SEIGNEUR des mondes par qui tout est possible : **ALLAH** pour la force qu'il me donne, et qu'il donne aux personnes qui m'ont aidées et soutenues.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur M^{me} : EDAIKKRA NAOUEL, et co-encadreur Mr : BENALLAL KAMEL pour les précieux conseils et l'aide durant toute la période du travail.

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

Un grand merci à l'équipe de laboratoire d'Eco-Épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations, Institut Pasteur d'Alger, pour leur aide et leur gentillesse, aussi pour discuter et répondre à nos questions.

On remercie finalement tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont permis de bien mener ce travail.

Merci 

Table des matières

| | |
|-------------------|---|
| INTRODUCTION..... | 1 |
|-------------------|---|

CHAPITRE I: GENERALITES

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Le parasite <i>Leishmania</i> | 4 |
| 1.1 | La forme amastigote..... | 4 |
| 1.2 | La forme promastigote | 4 |
| 1.3 | Cycle de transmission des <i>Leishmanies</i> | 5 |
| 1.4 | Vecteur | 7 |
| 1.5 | Réservoir | 7 |
| 2 | Les diverses formes de la leishmaniose | 8 |
| 2.1 | La leishmaniose cutanée (LC)..... | 8 |
| 2.2 | La leishmaniose viscérale (LV) | 8 |
| 2.3 | Leishmaniose muco-cutanée (LCM)..... | 8 |
| 3 | Traitement | 10 |
| 4 | Répartition géographique | 10 |
| 4.1 | Dans le monde :..... | 10 |
| 4.2 | En Algérie | 12 |
| 4.2.1 | La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)..... | 12 |
| 4.2.2 | Leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS)..... | 12 |
| 4.2.3 | La leishmaniose viscérale (LV)..... | 12 |
| 4.2.4 | La leishmaniose cutanée due à <i>L. killicki</i> | 12 |
| 5 | Virus à ARN de <i>Leishmania</i> (LRV)..... | 13 |
| 5.1 | Morphologie du virus..... | 14 |
| 5.2 | Organisation du génome | 14 |
| 5.3 | Les types du LRV | 15 |

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

| | | |
|-----|------------------------------|----|
| 1 | Matériels | 18 |
| 1.1 | Matériels biologique..... | 18 |
| 2 | Méthodes | 18 |
| 2.1 | Culture des leishmanias..... | 18 |
| 2.2 | Comptage des parasites | 19 |
| 2.3 | Récolte des souches..... | 19 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | Extraction d'ARN | 19 |
| 2.4.1 | Extraction CASAS | 20 |
| 2.4.2 | Extraction par Kit RNA | 20 |
| 2.5 | Retro transcription-réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)..... | 21 |
| 2.5.1 | Amplification du Virus Sigma | 22 |
| 2.5.2 | Amplification du Virus LRV | 22 |
| 2.1 | Électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose | 23 |

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

| | | |
|----------------------------------|---|----|
| 1 | Résultats | 25 |
| 1.1 | Cultures parasitaire..... | 25 |
| 1.2 | Contrôle de qualité des ARN extraits..... | 26 |
| 1.3 | Réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR)..... | 27 |
| 1.3.1 | Détection du virus Sigma | 27 |
| 1.3.2 | Détection du virus LRV | 28 |
| 2 | Discussion | 28 |
| CONCLUSION | | 31 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | | 33 |
| ANNEXES..... | | 40 |

Liste des Figures

Figure 1: Présence de corps de leishmanies sous forme amastigote en extra cellulaire au myélogramme ($\times 100$) .

Figure 2: Forme promastigote de Leishmania

Figure 3 : Cycle de vie de Leishmania.

Figure 4: Classification des espèces de Leishmania.

Figure 5: Le Phlébotome femelle (Clementi, 2011).

Figure 6 : Leishmaniose cutanée sur le visage d'un enfant.

Figure 7 : Leishmaniose viscérale.

Figure 8 : Lésion de leishmaniose mucocutanée.

Figure 9: Répartition géographique de la leishmaniose cutanée dans le monde.

Figure 10: Répartition géographique de la leishmaniose viscérale.

Figure 11: Micrographie électronique à contraste négatif des particules d'un isolat du virus de l'ARN Leishmania 1 - 1.

Figure 12: Structure de virus à ARN de Laishmanie.

Figure 13: Organisation du génome du virus à ARN de Leishmania (LRV 1/LRV2).

Figure 14 : principe de la RT PCR

Figure 15: Profil de migration sur gel d'agarose 0,8% pour des produits d'extraction Casas et Kit RNA.

Figure 16: Profil de migration des produits d'amplification du virus Sigma sur gel d'agarose 1.5%.

Figure 17: Profil de migration des produits d'amplification du virus LRV sur gel d'agarose 1.5%.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Liste des principales espèces de *Leishmanies* selon les formes cliniques.

Tableau 2: Représentants caractérisés de LRV1 et LRV2 .

Tableau 3: Caractéristiques des souches utilisées pour la recherche de LRV.

Tableau 4: Description des souches selon les protocoles d'extraction de l'ARN.

Tableau 5: Préparation du mix pour l'amplification du virus Sigma.

Tableau 6: Préparation du mix

Tableau 7: Profil thermique

Tableau 8: Charge parasitaire des souches avant la récolte.

Liste des abréviations

| | |
|------------------|--|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | AND complémentaire |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| ARN db | ARN double brins |
| BET | Bromure d'ethidium |
| DNase | Désoxyribonucléase |
| IFN | Interféron |
| IL-6 | Interleukine |
| LC | Leishmaniose cutanée |
| LCD | Leishmaniose cutanée diffuse |
| LCM | Leishmaniose cutanéomuqueuse |
| LCS | Leishmaniose cutanée sporadique |
| LCZ | Leishmaniose cutanée zoonotique |
| LDKP | Leishmaniose dermique post kalaazar |
| L (L) | Leishmania (Leishmania) |
| L (V) | Leishmania (Viannia) |
| LRV | Virus à ARN de Leishmania |
| LV | Leishmaniose viscérale |
| NNN | Novy Nicolle Mc Neal |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| ORF | Open reading frame |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| RdRp | RNA-dependent RNA polymerase |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute medium |
| SLP | Sérum de lapin |
| SVF | Sérum de veau foetal |
| TAE | Tris, Acétate, EDTA |
| TLR3 | Toll-like 3 receptor |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |

Résumé

La leishmaniose est une maladie tropicale négligée et une cause majeure de morbidité et de mortalité, causée par différentes espèces de *Leishmania*. Dans certains pays, cette maladie est aggravée par la présence d'un virus à ARN double brins affectant les parasites (LRV).

Ce présent travail, a pour but la détection du virus de l'ARN *Leishmania* (LRV) chez différentes souches Algériennes de différentes origines. Une culture en masse de parasite dans différents milieux de culture (NNN /SLP et RPMI) a été réalisée afin d'obtenir une quantité suffisante pour les étapes suivantes. Deux approches d'extraction d'ARN ont été appliquées : extraction CASAS et extraction par Kit. Ensuite, une reverse transcriptase RT-PCR a été réalisée pour la détection du virus. Les méthodes utilisées ont été contrôlé par la présence d'un témoin positif qui est le virus Sigma.

L'enrichissement des souches a été différent entre les espèces de *L. major* et *L. infatum*. Les souches testées sur le virus Sigma ont été positives par contre les souches testées pour LRV (27), aucune ne s'est révélée positive pour ce virus.

Mot-clés : LRV, *Leishmania*, Algérie, RT-PCR.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease and a major cause of morbidity and mortality, caused by different species of *Leishmania*. In some countries, this disease is aggravated by the presence of a double strand RNA virus called LRV that has affects parasites.

This work aims to detect the dsRNA virus in *Leishmania* (LRV) in different Algerian strains and from different origins. A mass culture of parasite in different culture media (NNN / SLP and RPMI) was carried out in order to obtain a sufficient quantity for the following steps. Two approaches to RNA extraction were applied: CASAS extraction and Kit extraction. Then, a reverse transcriptase RT-PCR was performed for the detection of the virus. The used methods were checked of their performance by the presence of a positive witness which is the virus Sigma.

The enrichment of the strains was different between *L. major* and *L. infatum* species. All the strains tested on Sigma virus, were positive, and the strains tested for LRV (27), none was positive for this virus.

Key-words: LRV, *Leishmania*, Algérie, RT-PCR.

المخلص

داء الليشمانيات هو مرض استوائي مهملة وسبب رئيسي للمراضة والوفيات الناجمة عن أنواع مختلفة من الليشمانيا. في بعض البلدان ، يتفاقم هذا المرض بسبب وجود فيروس RNA مزدوج الضفيرة يسمى LRV الذي يؤثر على الطفيليات.

يهدف هذا العمل إلى الكشف عن فيروس الرنا المزدوج الجديلة في الليشمانية (LRV) في سلالات مختلفة من الجزائر ومن أصول مختلفة. تم تنفيذ ثقافة جماعية من الطفيليات في مختلف وسائط التربية (NNN / SLP و RPMI) من أجل الحصول على كمية كافية للخطوات التالية. تم تطبيق أسلوبيين في استخراج الحمض النووي الريبي: استخراج CASAS واستخراج كيت. ثم، تم إجراء RT-PCR العكسية للكشف عن الفيروس. تم فحص الطرق المستخدمة من خلال وجود شاهد إيجابي وهو فيروس Sigma.

تكاثر السلالات كان مختلف بين الأنواع *L. major* و *L. infatum* . جميع السلالات التي تم اختبارها للفيروس Sigma ، كانت إيجابية ، أما السلالات التي تم اختبارها لـ LRV (27) ، لم يكن أي منها إيجابياً لهذا الفيروس.

الكلمات المفتاحية: LRV ، الليشمانيا ، الجزائر ، RT-PCR .

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires causées par un protozoaire du genre *Leishmania*, parasite du système des phagocytes mononuclée (Gramiccia et al., 2005). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette parasitose est l'une des sept maladies tropicales les plus importantes qui constituent un problème majeur de santé publique avec 1,5 à 2 million de nouveaux cas et 70.000 de décès par an (Torres-Guerrero et al. 2017). Elle est transmise par des diptères « mouches de sable » du genre *Lutzomyia* dans le nouveau monde et *Phlebotomus* dans l'ancien monde. Elles affectent de nombreuses espèces de mammifères y compris les humains (Alvar J. 2012; Torres-Guerrero et al. 2017). Approximativement 20 espèces de *Leishmania* sont reconnues pathogènes pour l'homme (Choi et al., 2001 ; Desjeux., 2004).

Chez l'homme, ces maladies peuvent avoir des manifestations cliniques différentes qui sont définies par la localisation de parasites dans les tissus infectés : leishmaniose viscérale (LV), leishmaniose dermique post kala-azar (LDPK), leishmaniose cutanée (LC), leishmaniose cutanée diffuse (LCD), leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) et la leishmaniose mucosale (LM) (Akhoundi et al., 2017).

L'Algérie est parmi les pays les plus touchés par cette maladie, où quatre formes de leishmanioses ont été décrites. Dans le nord, la leishmaniose viscérale (LV) et la leishmaniose cutanée du nord (LCN) sont causées par *Leishmania infantum* et transmis par *Phlebotomus perniciosus* (Izri et al., 1990) et *P. perfiliewi* (Izri and Belazzoug ., 1993), le chien et les canidés sauvages sont les principaux réservoirs (Dedet., 2009; Adel et al., 2010; Bessad et al., 2012). Dans le sud et les hauts plateaux, il sévit *L. major* dont les principaux réservoirs sont les rongeurs Gerbillidés *Merione shawi* et *Psammomys obesus*, et *P. papatasi* présente le vecteur (Belazzoug 1983 ; Belazzoug 1986 ; Izri et al., 1992), ainsi que la leishmaniose cutanée due à *L. killicki*, cette dernière est transmise par *P. sergenti* (Harrat et al., 2009 ; Boubidi et al., 2011). Il existe plusieurs facteurs qui sont associés à la progression et à l'évolution de la maladie à savoir les conditions socioéconomiques, la malnutrition, la co-infection avec le VIH, les changements environnementaux et climatiques et l'échec thérapeutique.

Cependant, un autre facteur a récemment été incriminé est la présence du virus à ARN double brins affectant le parasite *Leishmania* (LRV). Ce virus à ARN a été détecté et isolé pour la première fois dans les souches de *Leishmania* du nouveau monde à savoir *L. (Viannia) braziliensis* et *L. (V) guyanensis* (Zangger et al., 2014) et dans l'ancien monde

un seul isolat a été isolé dans *L. major* en Asie centrale et un autre en Afrique de l'est dans *L. aethiopica* en Ethiopie (Scheffet et al., 1995, Hajjaraan et al., 2016). Ils sont classés LRV1 et LRV2 respectivement.

Dans le monde existe un virus qui infecte *Leishmania*. Notre recherche a été effectuée pour savoir si les souches Algériennes contiennent ce virus de diverses espèces responsable de Leishmaniose cutanée (LC) et viscérale (LV). L'étude a concerné des souches qui ont un profil virulent et/ou résistant aux traitements, elle sont originaires de patients et de réservoirs.

Chapitre I
Généralité

1 Le parasite *Leishmania*

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés de l'ordre des *Kinetoplastidea*, de la famille des *Trypanosomatidae* et du genre *Leishmania*. Ce sont des parasites dimorphes, ils présentent deux stades d'évolution avec des formes différentes. La forme amastigote intracellulaire est retrouvée dans le système phagocytaire mononucléaire chez l'hôte mammifère et la forme promastigote qui est flagellée est retrouvée chez le vecteur (Dedet., 2002).

1.1 La forme amastigote

Cette forme niche à l'intérieur des macrophages des mammifères (Figure 1), au sein de vacuoles dites parasitophores. À ce stade, le parasite présente un corps ovoïde ou sphérique de 2,5 à 5 μm de diamètre avec un très court flagelle (CDC., 2013).

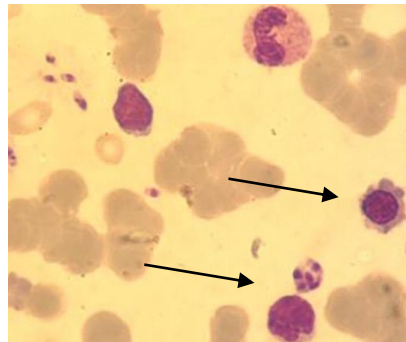


Figure 1: Présence de corps de leishmanies sous forme amastigote en extra cellulaire au myélogramme ($\times 100$) (Benbella., 2016).

1.2 La forme promastigote

Cette forme de parasite est flagellée et se trouve dans le tube digestif du *Phlébotome*. A ce stade, le parasite présente un corps de 5 à 20 μm de longueur et de 1 à 4 μm de largeur prolongé par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur, émergeant de leur pôle antérieur. Chez ces formes parasitaires (Figure 2), le kinétoplaste est situé ente le noyau et la base du flagelle (T.H.Slimane, 2012).

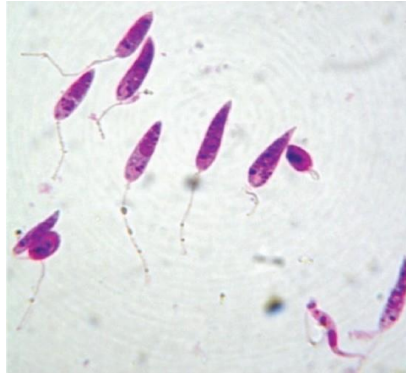


Figure 2: Forme promastigote de *Leishmania* (Suman Gupta, Nishi., 2011).

1.3 Cycle de transmission des *Leishmanies*

Le genre *Leishmania* se multiplie par division binaire et passe par deux grands stades successifs au cours de son cycle évolutif (Figure 3). Lors du repas de sang nécessaire à la maturation des œufs de la femelle, si elle est porteuse de parasite, elle injecte avec la salive les promastigotes présents au niveau de la valve stomodéale. Ces dernières sont phagocytées par les macrophages et se transforment en amastigote. Après la multiplication intracellulaire, les parasites se disséminent par voie lymphatique et hématogène pour infecter d'autres macrophages. Lors d'un second repas sur un animal infecté, le vecteur (*Phlébotome*) absorbe les formes amastigotes. Dans l'intestin de l'insecte, le parasite commence un processus de transformation, et les amastigotes se transforment en promastigote procyclique puis en promastigote métacycliques. Cette dernière à une capacité infectieuse (E. Torres-Guerrero., 2017).

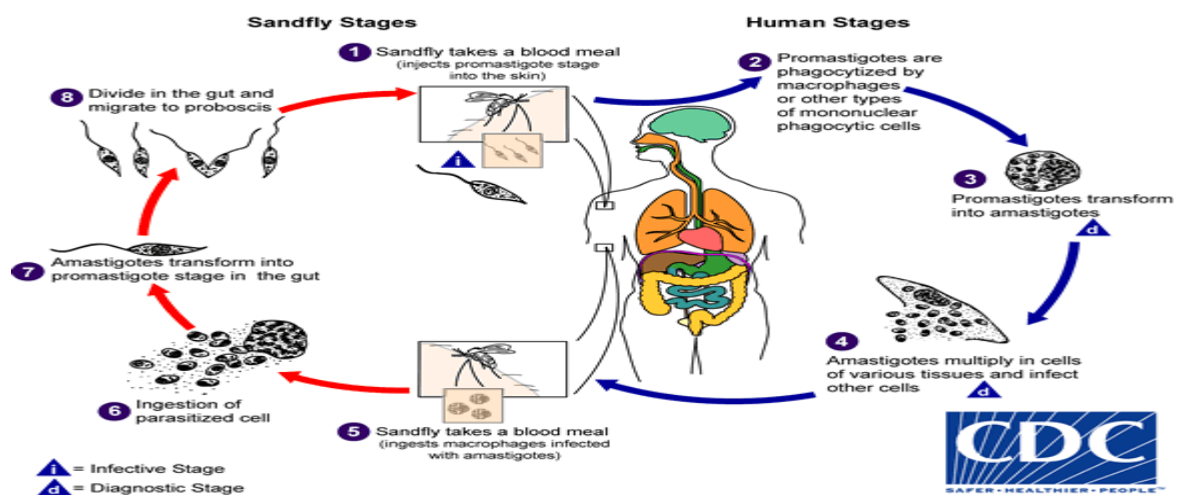


Figure 3 : Cycle de vie de *Leishmania*. (Centers for Disease Control and Prevention. (2013). <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Actuellement, 54 espèces de *Leishmania* sont connues et au moins 21 d'entre elles sont pathogènes pour l'homme (Figure 4). (Akhoundi et al., 2017).

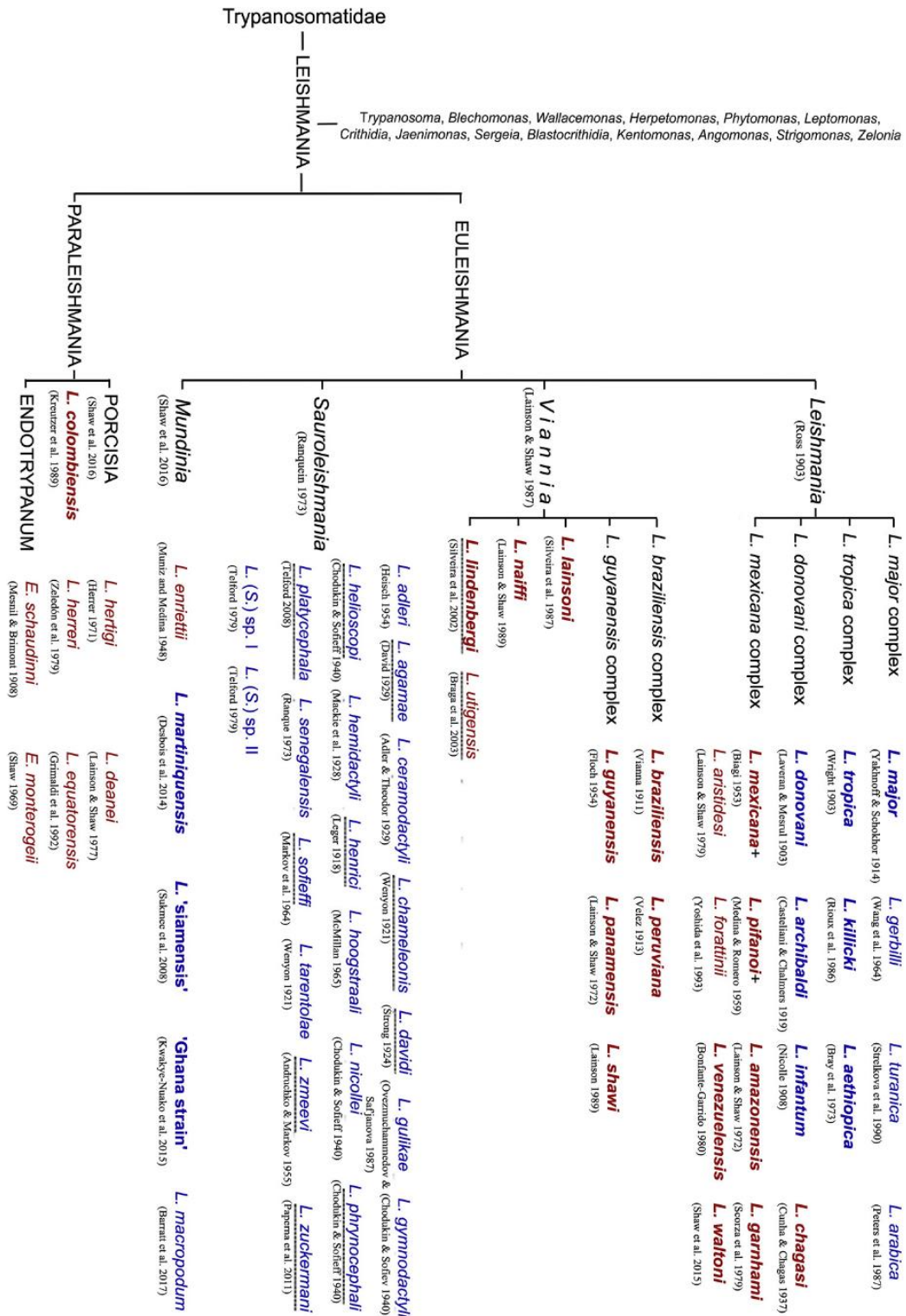


Figure 4: Classification des espèces de *Leishmania* (Akhoundi., 2017).

Souligné: pas de classification finale. Les noms *Leishmania* entre guillemets sont des noms non officiels sans descriptions formelles. Les espèces pathogènes humaines sont écrites en gras. Les espèces de l'Ancien et du Nouveau Monde sont surlignées en bleu et en rouge respectivement.

1.4 Vecteur

Les vecteurs des différentes espèces de protozoaires du genre *Leishmania* sont les diptères du genre *Lutzomyia* dans le nouveau monde et *Phlebotomus* dans l'ancien monde appartenant à la sous-famille Phlebotominae (Figure 5). Habituellement, les phlébotomes se nourrissent la nuit au crépuscule et pendant la journée ils se cachent dans des endroits sombres et humides pour digérer le repas de sang (Bachi., 2006). Il y a plus de 1000 espèces de mouche de sable ; dont 93 sont responsables de transmettre le parasite *leishmania* (Pace., 2014).



Figure 5: Le Phlébotome femelle (Clementi., 2011).

1.5 Réservoir

Les réservoirs naturels de *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclés. Les réservoirs des parasites causant la leishmaniose dans l'ancien monde comprennent les gerbilles et autres rongeurs pour *L. major*, les Hyracoïdes *Hyraxes*. Sp pour *L. aethiopica*, les chiens et les canidés sauvage pour *L. infantum* et les humains pour *L. tropica* (Gangneux., 2015). Dans le nouveau monde, les rongeurs, les canidés, les singes sont des réservoirs pour *L. mexicana* et *L. amazonensis* ; les paresseux, les marsupiaux et les édentés pour le complexe de *L. guyanensis*, et les rongeurs, les chiens, les opossums pour le complexe de *L. braziliensis* (González., 2015).

Certaines espèces provocantes la leishmaniose viscérale ont un réservoir animal et d'autres humains. *Leishmania donovani* a pour réservoir l'homme dans l'ancien monde, tandis que *L.infantum* et *L. chagasi* sont essentiellement retrouvées chez les canidés sauvages et domestiques dans l'ancien et le nouveau monde respectivement (Carre et al., 2010).

Par conséquent, la maladie peut être : zoonotique (transmission d'animal à humain) et anthroponotique (transmission d'humain à humain), (OMS.,2014).

2 Les diverses formes de la leishmaniose

2.1 La leishmaniose cutanée (LC)

C'est la forme la plus fréquente. Elle provoque des lésions cutanées qui caractérisent la maladie et se développent généralement au site de la piqûre du phlébotome, puis elle s'ulcère (Figure 6). Ces lésions peuvent varier dans leur gravité, leur manifestation clinique et leur temps de récupération (Kebede et al., 2013).

2.2 La leishmaniose viscérale (LV)

C'est la forme la plus grave de la maladie. Les parasites se disséminent dans la vascularisation de l'hôte et s'infiltrant dans les viscères y compris la rate, le foie et les ganglions lymphatiques (Figure 7). Elle entraîne diverses réponses potentiellement mortelles, notamment une splénohépatomégalie, une pancytopenie, une perte de poids et une forte fièvre (Geraci et al., 2015).

2.3 Leishmaniose muco-cutanée (LCM)

C'est une forme chronique de leishmaniose. Elle débute par une lésion cutanée unique puis elle se propage aux muqueuses et détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge (Figure 8) et cause ainsi des dommages et une défiguration importante (OMS, 2018).



Figure 6: Leishmaniose cutanée sur le visage d'un enfant (Masmoudi et al., 2013).



Figure 7: Leishmaniose viscérale, OMS. http://www.who.int/leishmaniasis/Leish_visceral.jpg

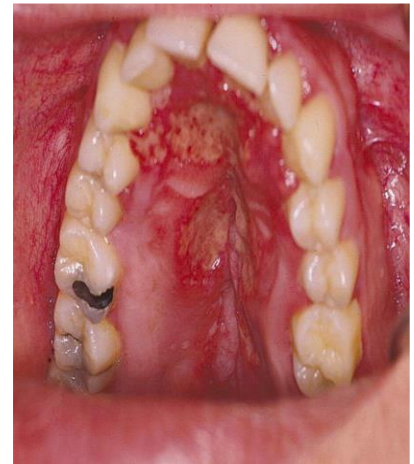


Figure 8: Lésion de la leishmaniose mucocutanée (Thomas., 2018).

La leishmaniose diffère par son contexte clinique et par l'espèce en cause d'un pays à un autre et d'une région à une autre (Tableau 1).

Tableau 1: Liste des principales espèces de leishmanies selon les formes cliniques.

| Formes cliniques | Leishmaniose viscérale | | Leishmanioses cutanée | | Leishmanioses muco-cutanée | |
|-------------------------------------|--|--------------------|--|--|----------------------------|------------------------|
| | Ancien monde | Nouveau monde | Ancien monde | Nouveau monde | Ancien monde | Nouveau monde |
| Classiques | <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> | <i>L. infantum</i> | <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> | <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i> | | <i>L. braziliensis</i> |
| Avec immuno-dépression (VIH) | <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> | <i>L. infantum</i> | Toutes espèces | Toutes espèces | | |

3 Traitement

Il n'existe actuellement aucun vaccin contre la leishmaniose. Il n'y a pas non plus de consensus sur la meilleure option thérapeutique pour le traitement de la maladie. Cela est dû en grande partie à l'absence d'essais cliniques correctement contrôlés (Gonzalez et al., 2008).

Le traitement principal utilisé est la chimiothérapie (Plourde et al., 2012) qui repose sur quelques médicaments de première ligne principalement sur les antimoniés pentavalents. Les cliniciens ne disposent que d'un dérivé pentavalent de l'antimoine, le N-méthyl-glucamine, pour les deux formes cliniques.

Dans le traitement de la leishmaniose viscérale et selon un protocole qui suit les recommandations de l'OMS, qui est une injection intramusculaire profonde avec l'amphotéricine B solubilisée dans du sérum glucosé (Bachi., 2006).

Quant à la leishmaniose cutanée, son traitement dans les formes à lésions multiples et lésions localisées sur le visage est indiqué par injection intramusculaire avec l'antimoniés. Et avec le cas d'un signal de lésions le traitement est réalisé avec des injections intradermiques par le Glucantine (Eddaikra, 2013).

4 Répartition géographique

La leishmaniose est répandue dans 98 pays à travers le monde (Alvar et al., 2012) touchant les régions tropicales et sous tropicales.

4.1 Dans le monde :

La Leishmaniose viscérale et cutanée présente des différences dans les territoires qu'elles occupent (Figure 9 et Figure 10). La leishmaniose cutanée apparaît beaucoup plus en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie du Sud-Ouest (Plourde et al., 2012).

Dans l'ancien monde, cette maladie est principalement causée par *Leishmania major* (détection de cette espèce était en Afrique du Nord, Sahel de l'Afrique et au Centre et Ouest de l'Asie), *L. aethiopica* (Éthiopie et Kenya) et *L. tropica* (Centre et Ouest d'Asie). Dans ce côté du monde, les deux espèces le plus souvent incriminées dans la leishmaniose viscérale sont *L. donovani* (Sous-Continent Indien et l'Afrique de l'Est) et *L. infantum* Bassin Méditerranéen et l'Afrique Centrale et Occidentale (Thomas., 2018 ; Carre'et al., 2010).

Dans le nouveau monde, les espèces de *Leishmania* qui sont à l'origine de la LC comprennent les membres du complexe *L. braziliensis* (Amérique Centrale et du Sud), *L. (V) peruviana* (Peru), *L. (V) guyanensis* et *L. amazonensis* (Amérique du Sud), *L. mexicana* et *L. (V) paramensis* (Amérique centrale). Pour la LV, il y a *L. infantum* et *L. chagasi* (Amérique Latine).

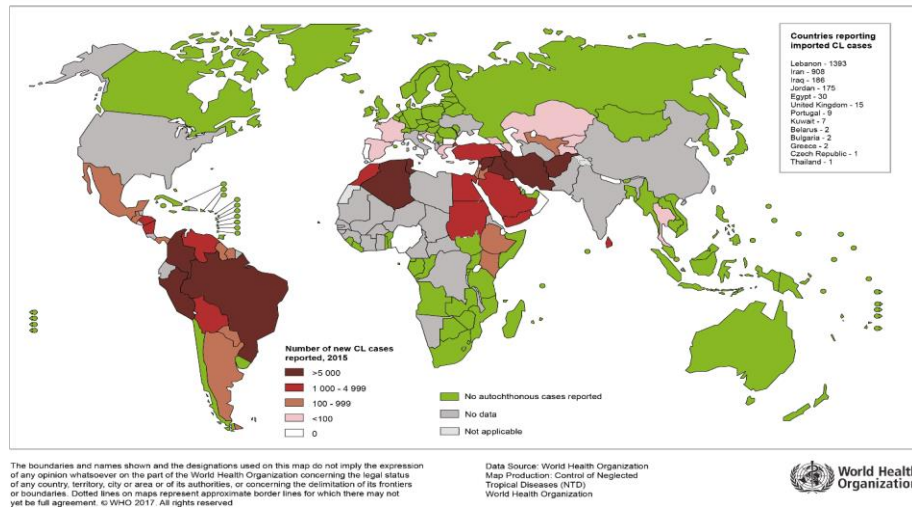


Figure 9: Répartition géographique de la leishmaniose cutanée dans le monde. OMS 2015. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

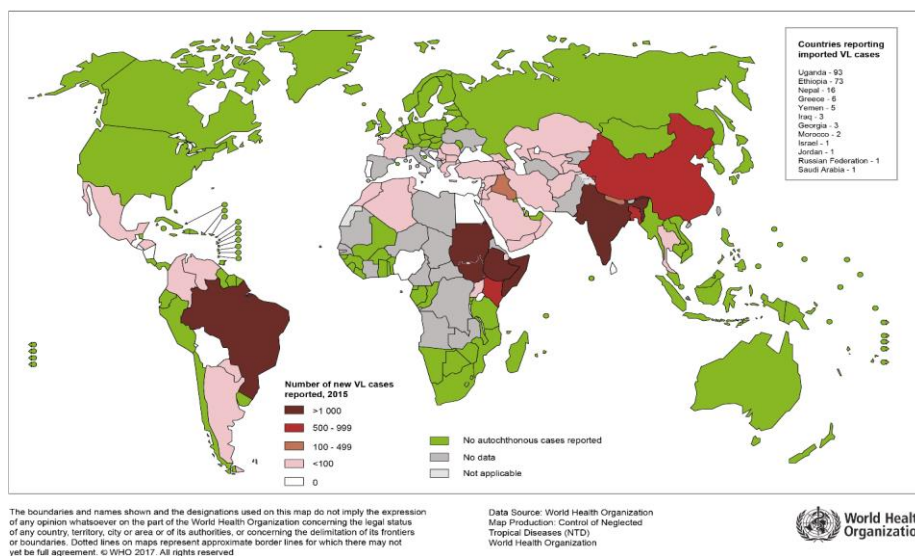


Figure 10: Répartition géographique de la leishmaniose viscérale dans le monde. OMS 2015. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

4.2 En Algérie

L'Algérie est l'un des pays les plus touchés par cette affection. Elle est concernée par quatre formes cliniques distinctes de leishmaniose, la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS), la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) et la leishmaniose cutanée à *L. killicki* (Harrat et al., 2009).

4.2.1 La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ)

La leishmaniose cutanée zoonotique due à *L. major* est répartie dans les zones arides et semi-arides dans la partie sud de l'Algérie. Dans ces régions, cohabitent le vecteur *Phlébotomus papatasi* et les rongeurs sauvages *Merions shawi* et *Psamomys obesus* sont prouvés comme réservoirs de *Leishmania major* (Belazzoug., 1983 ; Belazzoug., 1986 ; Izri et al., 1992).

4.2.2 Leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS)

Elle est due à *L. infantum* et se localise au nord du pays touchant tout le littoral algérien. La LCS est transmise par le vecteur *Phlebotomus perfiliewi* et les chiens comme réservoir (Izri and Belazzoug ., 1993).

4.2.3 La leishmaniose viscérale (LV)

Se répartit sur toute la partie nord du pays au niveau des régions humides et semi-humides. Elle est provoquée par *L. infantum*. Le vecteur est *Phlebotomus perniciosus* avec les chiens comme réservoir principal. (Izri et al., 1990). Cette forme a aussi été détectée dans le Sud (Benallal et al., 2013).

4.2.4 La leishmaniose cutanée due à *L. killicki*

Elle a été découverte en Algérie par Harrat et al (2009). Cette forme chronique est causée par *L. killicki* et transmise par *Phlebotomus sergenti*, Elle se localise principalement dans la wilaya de Ghardaïa (Boubidi et al., 2011).

5 Virus à ARN de *Leishmania* (LRV)

Le virus à ARN de *Leishmania* (LRV) est un virus à double brin d'ARN (dsARN) cytoplasmique endogène, qui infecte de manière persistante certaines souches du protozoaire parasitaire *Leishmania*. Il appartient à la famille des *Totiviridae*. Ce virus est retrouvé dans un large éventail d'hôtes notamment les protistes, les champignons, la levure, les arthropodes et les vertébrés (Zhai et al., 2010). Dans certains cas, la LC a tendance à persister et à métastaser vers d'autres parties du corps provoquant une leishmaniose cutaneo-muqueuse (LCM) ou une leishmaniose cutanée diffuse (LCD). En Amérique du Sud et en Éthiopie, ces formes clinique (LCM et LCD) sont causées principalement par *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* et *L. aethiopica* (Zangger., 2013).

Les lésions provoquant par ces formes sont souvent associées à une réponse inflammatoire très destructive, une parasitémie élevée et à une exacerbation de la maladie avec une fréquence élevée d'échecs de traitement médicamenteux (Faria et al., 2005). D'une part, parmi les facteurs liés à ces maladies, citons les polymorphismes génétiques de l'hôte (Ex. gènes TNF, IL-6) et la co-infection du patient avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Castellucci et al., 2006, Permontier et al., 2016). D'autre part, la présence du LRV qui a été détecté pour la première fois dans les parasites de sous-genre *L.(V)* dans le nouveau monde notamment au bassin amazonien, connu par LRV1. Plus tard, d'autres virus de *Leishmania* ont été décrits dans des isolats de *L. aethiopica* et de *L. infantum* (Zangger et al., 2014, Hajjarian et al., 2016) dans l'ancien monde ce virus est connu sous le nom de LRV2. Il a été démontré que le virus peut aggraver la maladie par un mécanisme dépendant du récepteur TLR 3 (Toll-like Receptor 3) en s'attaquant à l'hypersensibilité de ce dernier par l'ARN viral induisant une forte transcription des gènes codant pour des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α , CXCL10 et CCL5), et leur sécrétion abondante. La production de ces médiateurs inflammatoires est précédée, dans les premières heures, par la production d'interféron de type I, l'IFN- β , qui pourrait agir via une boucle autocrine stimulant ainsi une production accrue de cytokines et chimiokines (Ronet et al., 2011).

5.1 Morphologie du virus

Ces particules virales sont composées d'ARN double brin (dsRNA) (Figure 11 et 12). Elles sont observées sous forme de particules icosaédriques de 30-50 nm avec un génome d'ARNdb de 5,3 kb de longueur associé à une protéine de capsid de 82 kDa et une ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd) nécessaire est suffisante pour la réplication de l'ARN db virale (Zangger., 2013).

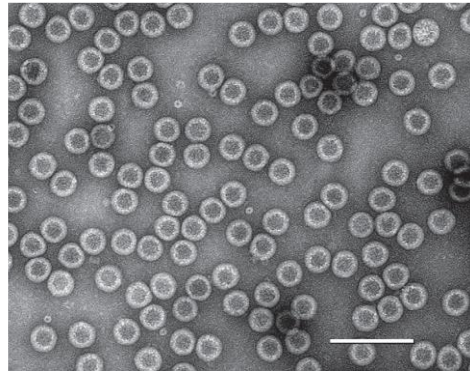


Figure 11: Micrographie électronique à contraste négatif des particules d'un isolat du virus de l'ARN Leishmania 1 - 1 (King., 2012).

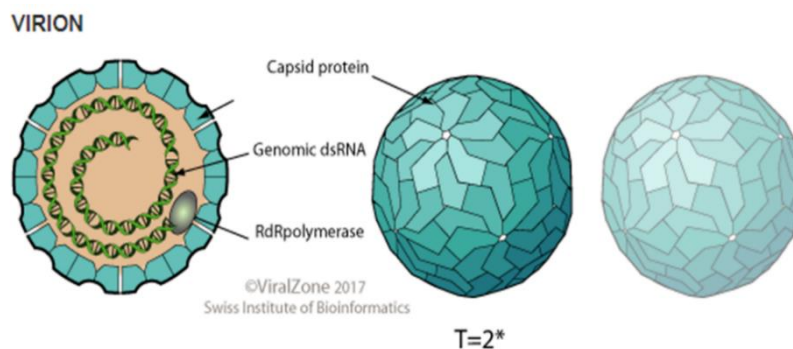


Figure 12: Structure de virus à ARN de Leishmanie. $T = 2^*$: symétrie icosaédrique de la capsid. (https://viralzone.expasy.org/648?outline=all_by_species)

5.2 Organisation du génome

Le génome du *Leishmania* RNA varie de 5,2 kbp pour les virus de l'Ancien Monde à 5,3 kb pour les virus du Nouveau Monde. Il contient deux grands ORF, l'ORF 3'-proximal (ORF3) qui code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd), et l'ORF5'-proximal (ORF2) en amont qui code pour une protéine de capsid (PC). Ces deux ORFs se chevauchent dans tous les représentants de LRV1 et sans codon de départ indépendant pour ORF3, et donc RNA RdRp est traduit uniquement comme une extension C-terminale de la capsid et la protéine de fusion est produite par un décalage du cadre ribosomique +1, facilité par des structures en tige-boucle dans la région de chevauchement. Dans la

structure génomique de LRV 2 les ORF (ORF 2 et ORF 3) ne se chevauchent pas entre eux et le mécanisme de la traduction de la protéine de fusion est différent (Figure 13). (Grybchuk et al., 2018).

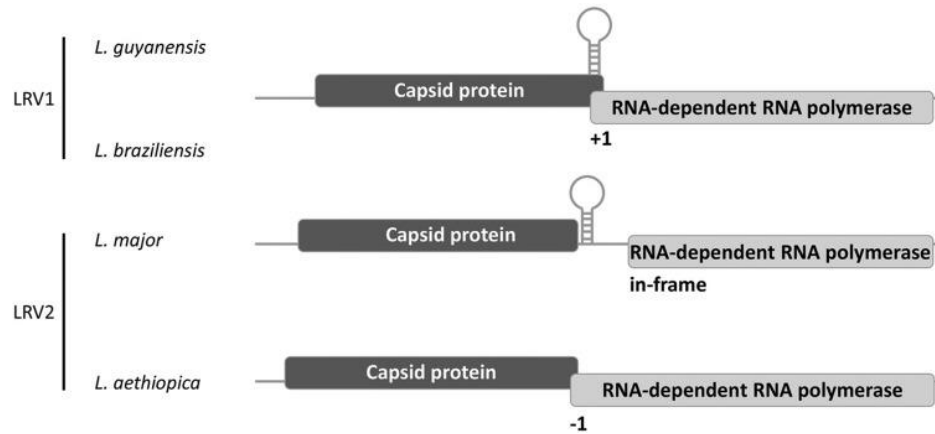


Figure 13: Organisation du génome du virus à ARN de Leishmania (LRV 1/LRV2) (Grybchuk, et al. 2018).

5.3 Les types du LRV

Les formes de LRVs du nouveau et de l'ancien monde sont arbitrairement nommées LRV1 et LRV2 respectivement (Tableau 2) et cela à due aux 60% de différence qui existe entre les deux génomes (Hajjaran ., 2016).

Tableau 2 : Représentants caractérisés de LRV1 et LRV2 (Grybchuk, et al. 2018).

| Types de LRV | Hôtes | Nom | Origine |
|--------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| LRV1 | <i>Leishmania guyanensis</i> | LRV1/Lg2028_3 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgLL28 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2028_1 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgXK73 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgYE48 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgVL91 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgWF69_2 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgWF69_1 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2028_2 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgXJ93_1 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgMJ25 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2015 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgVW21 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgYZ58 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2014 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgYR07 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgPD46 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2008 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgLF94 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgMC71 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgXJ93_2 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgLF98 | Guyane Française |
| | | LRV1/Lg2001 | Guyane Française |
| | | LRV1/LgyM4147 | Brésil |
| | | LRV1/MHOM/SR/80/CUMC1 | Suriname |
| | | LRV1 | <i>L. braziliensis</i> |
| LRV1/LbrLEM2780(a) | Bolivie | | |
| LRV1/LbrLEM2780(b) | Bolivie | | |
| LRV1/LbrLEM3874 | Bolivie | | |
| LRV1/LbrYA70 | Guyane Française | | |
| LRV2 | <i>L. aethiopica</i> | LRV2/MHOM/ET/2011/LDS327 | Éthiopie |
| | | LRV2/MHOM/ET/2011/LDS303 | Éthiopie |
| | | LRV2/Lae-L494 | Éthiopie |
| | <i>L. major</i> | LRV2-1/MHOM/SU73/5-ASKH | Turkménie |
| | | <i>L. infantum</i> | LRV2/IR/2014/HM-2 partial |
| | LRV2/IR/2014/HM-1 partial | | Iran |

Chapitre II
Matériels et
Méthode

1 Matériels

1.1 Matériels biologique

29 souches de *Leishmania* ont été choisies pour la recherche du virus LRV (Tableau 3) (LC= *L. major* ; LV= *L. infantum*), à partir de la cryobanque présente au niveau du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations de L'Institut Pasteur d'Alger (IPA). Ces souches présentent des résistances au traitement Glucantine, des coïnfections avec le virus HIV, des souches isolées à partir des réservoirs (chien et rongeurs).

Tableau 3: Caractéristiques des souches utilisées pour la recherche de LRV.

| Origine | État clinique | Nombre de souches |
|------------|----------------|-------------------|
| Humain | LC, HIV | 1 |
| | LC, Résistante | 1 |
| | LC | 17 |
| | LV | 2 |
| | LV | 3 |
| Rongeur | LC | 2 |
| Chien (ne) | LV | 2 |
| chacal | LV | 1 |

2 Méthodes

2.1 Culture des leishmanias

Après la décongélation des souches (Annexe 1), elles ont été maintenues en culture sur milieu NNN (Novy-MCNeal-Nicolle) (Annexe 2) et SLP (sérum de lapin) dans une étuve de 25°C. Ces dernières sont contrôlées tous les 4 à 5 jours pour la vérification de l'état du parasite (Richesse, Mobilité et détection d'éventuelle Contamination) sous microscope photonique au grossissement Gx40. Ensuite, les souches en phase exponentielle qui présentent une bonne richesse et mobilité sont repiquées sur le milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal) (Annexe 3) pour un enrichissement, une partie servira à la détection du virus et l'autre partie pour reconstituer le stabilat.

2.2 Comptage des parasites

Le comptage des parasites *Leishmania* repiqués sur milieu RPMI 1640 est fait 4 jours après sur cellule de MALASSEZ (Annexe 4). Les promastigotes sont immobilisés avec du formol (20 μ l de suspension parasitaire plus 20 μ l de formol). Les parasites de chaque souche sont comptés sous microscope photonique au grossissement Gx40 dans dix carreaux de la cellule.

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

$$\text{Nombre de parasite} / 10 \times 100 \times 2 \times 1000 = \text{Nombre de parasites/ml}$$

10 : nombre de carreaux calculés

100 : nombre de petits carreaux de cellule MALASSEZ

2 : facteur de dilution

1000 μ l : volume initial de la suspension parasitaire.

2.3 Récolte des souches

Après comptage des parasites, les souches qui présentent un nombre supérieur à 10⁶ parasites/ml, elles sont centrifugées à 2500 tr/min pendant 15 min à +4°C, le surnageant est éliminé et la souche est conservée à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.

2.4 Extraction d'ARN

L'extraction a été faite sur des promastigotes en phase stationnaire d'une quantité entre 2 \times 10⁶ et 30 \times 10⁶ parasites/ml, en utilisant deux protocoles d'extraction :

(i) extraction CASAS (Casas et al, 1995) et (ii) extraction par kit AurumTM Total RNA Mini Kit.

Parmi les 29 souches 27 ont été analysées. Sur les 27 souches 07 souches ont été arbitrairement extrait par le protocole CASAS et les 20 restantes par le Kit (Tableau 4).

Les deux méthodes contiennent des étapes de lyse et des étapes de précipitation et de stockage, pour le protocole CASAS, il y a l'extraction de tous des acides nucléiques (ADN, ARN) par contre le protocole par Kit est concerné pour l'extraction que des ARNs à la présence de DNase.

Tableau 4: Description des souches selon les protocoles d'extraction de l'ARN.

| | État clinique | Origine | Nombre |
|---------------------------|---------------|---------|--------|
| Extraction CASAS | LC | Humain | 7 |
| Extraction par Kit | LC | Humain | 12 |
| | | Rongeur | 2 |
| | LV | Humain | 4 |
| | | Chacal | 1 |
| | | Chien | 1 |

Afin de vérifier la qualité d'extraction du génome viral par les deux protocoles, 14 souches (04 souches pour l'extraction Casas et 10 souches pour l'extraction par Kit RNA) ont été extraites en présence du virus Sigma qui été un témoin positif pour vérifier la performance des méthodes utilisées dans cette étude. Ce virus est de la famille Rhabdovirus qui infecte les Drosophiles. Les mouches infectées deviennent paralysées et meurent lorsqu'elles sont exposées à du CO₂ concentré. (Bentz et al., 2017). Le virus est codé par un génome d'ARN monocaténaire négatif. Son génome est relativement petit à environ 12,625 pb de long et code pour six gènes: 3'-NPXMGL-5' (Longdon et al., 2012).

2.4.1 Extraction CASAS

600µl du tampon de lyse plus 5µl de glycogène (10 mg /ml) sont ajoutés à 150µl de chaque souche. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante (25°C), 600µl d'isopropanol froid est ajouté et les tubes sont incubés à -20°C entre 30 min et une nuit. Les échantillons sont centrifugés à 12500 tr/min à +4°C pendant 10 min. Les surnageants sont éliminés et les culots sont lavés avec 1 ml d'éthanol 70° froid. Une deuxième centrifugation est réalisée à 12500 tr/min pendant 10 min à +4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont à nouveau lavés avec 1ml d'éthanol absolu froid puis centrifugés à 12500 tr/min pendant 05 min à +4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont laissés sécher à l'air libre. Une fois les culots séchés, ils sont dilués dans 25µl d'eau distillée RNA free contenant 1mM de DTT (dithiothreitol) puis sont conservés à -20°C.

2.4.2 Extraction par Kit RNA

L'extraction de l'ARN total des parasites est faite suivant les recommandations du fabricant (Bio-Rad Aurum™ Total RNA Mini Kit). Les culots de parasites récoltés à partir du RPMI 1640 sont décongelés et mis dans un tube eppendorf 2 ml. Toutes les centrifugations sont faites à une vitesse de 12500 tr/min et à température ambiante. Les

surnageants sont éliminés des tubes eppendorf et 350µl solution de lyse du kit + 350µl éthanol 70° sont ajoutées à chaque culot. Après homogénéisation, le contenu des tubes sont transférés dans des colonnes à ARN et centrifugés durant 30 secondes. Suite à cela, 700µl de solution de lavage à faible stringence sont ajoutées et les tubes sont centrifugés pendant 30 sec. Après le premier lavage, 80µl de DNaseI sont ajoutés et les tubes sont laissés en incubation pendant 15 min à température ambiante. Un deuxième lavage des tubes est réalisé en ajoutant 700µl d'une solution de lavage à forte stringence puis les tubes sont à nouveau centrifugés durant 30 sec, un dernier lavage avec la solution de faible stringence est réalisé en ajoutant 700µl de cette solution. Une centrifugation finale pendant 3 min est nécessaire pour bien nettoyer les colonnes des traces de la solution de lavage. Les colonnes sont transférées dans de nouveaux tubes eppendorf RNA et DNA free et 80 µl de la solution d'éluion sont ajoutées dans chaque colonne et sont laissés en incubation pendant 1 minute à température ambiante avant de faire la dernière centrifugation (2min). L'ARN total est stocké à -80°C en attendant l'analyse moléculaire.

2.5 Retro transcription-réaction de polymérisation en chaine (RT-PCR).

Principe

Retro transcription-réaction de polymérisation en chaine (RT-PCR) est une technique d'amplification génique qui permet de traduire l'ARN en ADNc. Ce dernier servira à amplifier en plusieurs copie voir des milliers de copie une région bien spécifique du génome en utilisant des amorces spécifiques afin qu'elle soit détectable sur gel d'agarose.

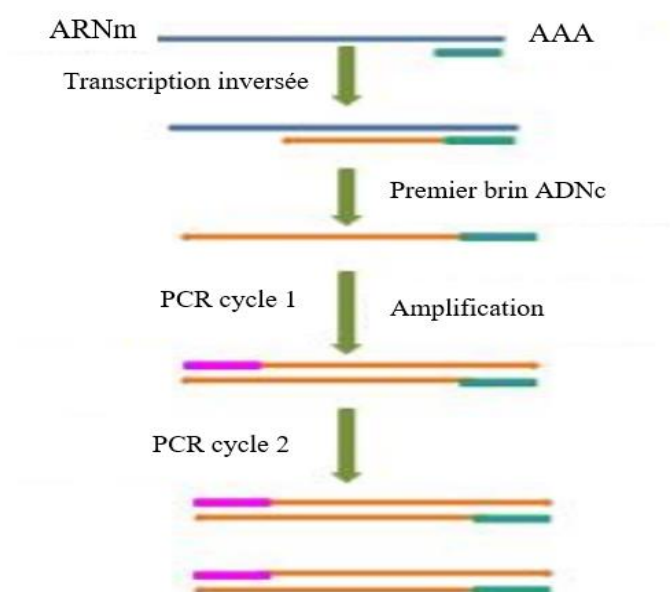


Figure 14 : principe de la RT PCR (Jagtar et al, 2014).

2.5.1 Amplification du Virus Sigma

Protocole expérimental

Dans un volume final de 20 μ l contenant un mélange réactionnel de 10 μ l de master mix (Quanta bio) utilisant une Taq polymérase type qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix®, 4.2 μ l H₂O RNA free, 0.4 μ l de chaque amorce Sig R et Sig F (tableau 5). Le mélange est préparé sous hotte puis 5 μ l de l'extrait de l'ARN sont ajoutés.

L'amplification génique débute par une rétro-transcription des ARN en ADNc à 55°C pendant 20 minutes, suivie par l'étape d'amplification génique de 50 cycles de dénaturation à 95 ° C pendant 30 secondes, d'hybridation à 50 ° C pendant 30 secondes et d'extension à 72 ° C pendant 30 secondes avec une extension finale à 72 ° C pendant 6 min. cette réaction se fait en une seule étape et cela grâce au propriété de l'enzyme utilisée qui assure la retro-transcription des ARN en ADNc et l'amplification génique (Figure 14).

Tableau 5: Préparation du mix pour l'amplification du virus Sigma.

| Réactif | Conc. Initiale | Conc. Finale | 1 tube |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|
| H ₂ O | / | / | 4.2 μ l |
| Amorce Sig + | 10mM | 2mM | 0.4 μ l |
| Amorce Sig - | 10mM | 2mM | 0.4 μ l |
| Master Mix Quanta bio | / | / | 10 μ l |
| Volume total | / | / | 15 μ l |

2.5.2 Amplification du Virus LRV

Une région de 505 pb du gène codant pour la ARN polymérase ARN dépendant (RdRp) est amplifiée en utilisant le même master mix suivant un profil thermique et mélange réactionnel propres à cette région (tableau 6 et 7) suivant le protocole de Hajjaran et *al* (2016).

Tableau 6 : Préparation du mix

| Réactif | Séquence | Conc. Initiale | Conc. Finale | 1 tube |
|-----------------------|---------------------------------------|----------------|--------------|--------|
| H ₂ O | | / | / | 03 µl |
| Amorce LRV_F | 5'- TGTAACCCACATAAACAGTGTGC- 3' | 10mM | 2mM | 01µl |
| Amorce LRV_R | 5'- ATTTCATCCAGCTGAGGGG-3' | 10mM | 2mM | 01µl |
| Master Mix Quanta bio | | / | / | 10µl |
| ARN | | | | 05µl |
| Volume total | | / | / | 20µl |

Tableau 7 : Profil thermique

| Température | Temps | Nombre de cycle |
|-------------|--------|-----------------|
| 55°C | 20 min | 1 (RT) |
| 94°C | 5 min | 1 |
| 94°C | 35 sec | X 35 |
| 55°C | 35 sec | |
| 72°C | 45 sec | |
| 72°C | 10 min | 1 |

2.1 Électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose

La visualisation des résultats d'amplification se fait par électrophorèse sur gel d'agarose (Annexe 5). La révélation a été réalisée par le Bromure d'ethidium, un intercalant de l'ADN et de l'ARN qui émit de la fluorescence sous lumière ultraviolette (UV). Pour le control de qualité des produits d'extrait le gel d'agarose a été d'une concentration de 0,8% et pour le gel de migration de produits d'amplification a été d'une concentration de 1.5%. 5µl du produit de PCR sont mélangés avec 1µl de tampon de charge. Les échantillons sont déposés dans les puits de gel, en commençant par le témoin négatif et le marqueur de PM puis le reste des produits d'amplification. La migration se fera à un voltage de 70V et pendant 1 heure et demie de temps.

La révélation des bandes se fait sur le Transilluminateur : il s'agit d'un appareil qui émit de la lumière ultraviolette pour la visualisation des bandes dans une chambre noire.

Chapitre III

Résultats

et

Discussion

1 Résultats

1.1 Cultures parasitaire

Les souches appartenant à *Leishmania major* ont montré une croissance rapide (4 à 5 jours) après leurs mises en culture dans le NNN, SLP et RPMI 1640, contrairement aux souches de *Leishmania infantum* qui étaient plus lentes entre 15 à 20 jours pour atteindre une bonne richesse.

Les souches repiquées sur milieu RPMI 1640 à 10% ont montré une richesse différente qui variée entre 2×10^6 et 30×10^6 (tableau 8).

Sur les 29 souches sélectionnées, seulement deux ont été éliminées responsable de la leishmaniose viscérale (*L. infantum*), une souche qui parvient d'une chienne et une autre d'Homme, parce qu'elles ne parvenaient pas à pousser normalement et atteindre une richesse minimale pour l'extraction des ARN. Dans les milieux NNN et SLP les souches ont été d'une charge parasitaire très faible qui nous a permis d'ajouter quelques gouttes du milieu RPMI1640, après quelques jours les résultats ont été le même, donc nous avons choisis le milieu RPMI 10% SVF puis RPMI20% SVF qui sont des milieux d'enrichissement. Malgré les efforts effectués la charge a été très faible dans tous les milieux utilisés.

Tableau 8 : Charge parasitaire des souches avant la récolte.

| Souche | Origine | État clinique | Nombre de parasites total sur le milieu |
|--------|------------|----------------|---|
| 01 | Humain | LC, HIV | 1630.10 ⁴ parasites /ml |
| 02 | Humain | LC, Résistante | 2810.10 ⁴ parasites /ml |
| 13 | Humain | LV | 226.10 ⁴ parasites /ml |
| 23 | | LV | 128.10 ⁴ parasites /ml |
| 17 | Humain | LV | 1621.10 ⁴ parasites /ml |
| 19 | | | 1924.10 ⁴ parasites /ml |
| 03 | Humain | LC | 2220.10 ⁴ parasites /ml |
| 04 | | | 314.10 ⁴ parasites /ml |
| 05 | | | 2910.10 ⁴ parasites /ml |
| 06 | | | 1864.10 ⁴ parasites /ml |
| 07 | | | 2552.10 ⁴ parasites /ml |
| 08 | Humain | LC | 474.10 ⁴ parasites /ml |
| 09 | | | 550.10 ⁴ parasites /ml |
| 10 | | | 792.10 ⁴ parasites /ml |
| 11 | | | 662.10 ⁴ parasites /ml |
| 14 | Humain | LC | 988.10 ⁴ parasites /ml |
| 16 | | | 3080.10 ⁴ parasites /ml |
| 20 | | | 576.10 ⁴ parasites /ml |
| 21 | | | 298.10 ⁴ parasites /ml |
| 24 | | | 1114.10 ⁴ parasites /ml |
| 25 | Humain | LC | 522.10 ⁴ parasites /ml |
| 26 | | | 234.10 ⁴ parasites /ml |
| 27 | | | 272.10 ⁴ parasites /ml |
| 12 | Rongeur | LC | 490.10 ⁴ parasites /ml |
| 18 | | | 430.10 ⁴ parasites /ml |
| 15 | Chien (ne) | LV | 732.10 ⁴ parasites /ml |
| 22 | chacal | LV | 2070.10 ⁴ parasites /ml |

1.2 Contrôle de qualité des ARN extraits

Suite à l'extraction des échantillons et pour avoir une idée de la qualité d'extraction et de vérifier s'il y a une présence du virus *Leishmania* LRV, un gel a été réalisé (figure 15). En comparant le profil des extraits par les deux protocoles CASAS et KIT à ARN, la migration a révélé que les échantillons extraits avec le protocole CASAS ont montré des traînées d'ADN par contre avec le KIT puisqu'il utilise une DNase, cette dernière a éliminé tous l'ADN et a donné des extraits nets et propres. D'autre part, aucun échantillon n'a révélé une bande de 5 kpb correspondante au génome du virus de *Leishmania* LRV qui pourrait être à la faible quantité ou son absence dans les extraits.

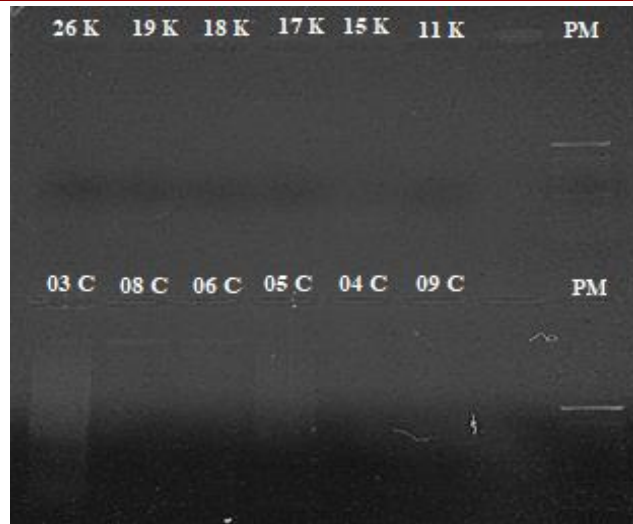


Figure 15 : Profil de migration sur gel d'agarose 0,8% pour des produits d'extraction Casas et Kit RNA, PM 100pb. (K : Kit et C : CASAS).

1.3 Réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR)

1.3.1 Détection du virus Sigma

Les 04 RT-PCR pour la détection du virus Sigma dans 14 souches ont révélé sur gel d'agarose 1.5% la présence d'une bande de 95 pb (Figure 16) correspondante à la région du génome du virus Sigma ciblée par les amorces. Ce résultat permet de conforter l'efficacité des protocoles d'extraction des ARN à partir des échantillons et cela malgré la présence de traces d'ADN dans les extraits des échantillons extraits par le protocole d'extraction CASAS.

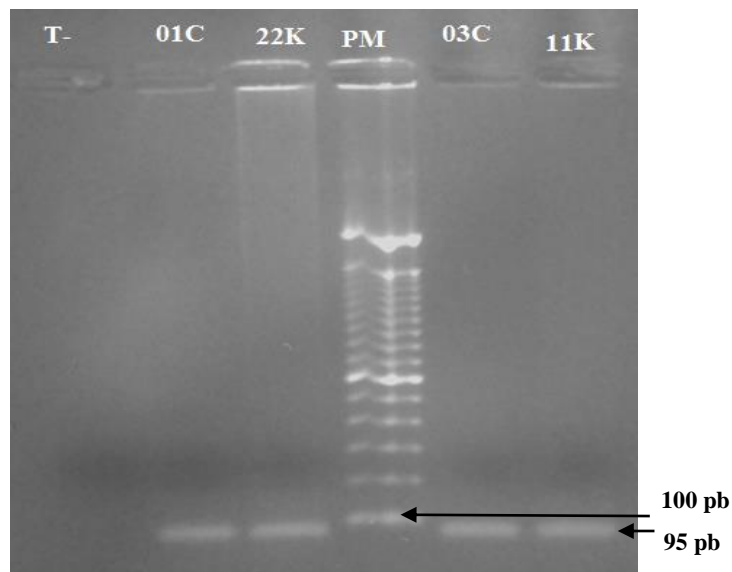


Figure 16 : Profil de migration des produits d'amplification du virus Sigma sur gel d'agarose 1.5%. T-: témoin négatif; les souches 01 et 03 extraites par le protocole CASAS et les souches 22et 11 par le protocole Kit Bio-Rad, PM 100pb.

1.3.2 Détection du virus LRV

La RT-PCR sur les 27 souches n'a pas révélé la présence de bande sur gel d'agarose correspondantes au virus LRV du parasite *Leishmania* dans toutes les souches qui ont été choisies (Figure 17) témoignant de l'absence de ce virus dans les souches algériennes jusqu'à maintenant testées.

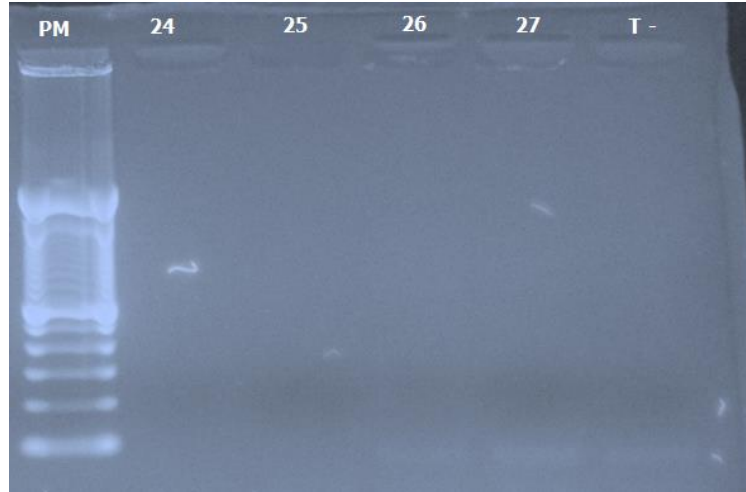


Figure 17 : Profil de migration des produits d'amplification du virus LRV sur gel d'agarose 1.5%. Les souches (24, 25, 26,27), T⁻ : témoin négatif, PM 100 pb.

2 Discussion

Certain parasite protozoaires portent des virus endosymbiotique de type ARN double brin (db). Ces virus ne se multiplient pas chez l'hôte vertébré, mais leur ARN db génomique produit des gènes ou la totalité des vibrions qui seront libérés par le parasite et qui peuvent stimuler le système immunitaire conduisant à une réaction inflammatoire complexe (Martens 2004). Les LRVs ont été détectés pour la première fois dans les formes promastigotes de *Leishmania guyanensis* (1988) et *L. braziliensis* (1996), les agents causatifs de la leishmaniose muco-cutanée (LMC) dans le nouveau monde (Ives et al., 2011). Le phénotype du LMC dans le nouveau monde n'est pas seulement associé à la présence du LRV mais est également corrélé avec la charge du virus dans le parasite (Zangger et al., 2013). De même, dans l'ancien monde, des formes métastatiques sont observées chez le golden hamster infecté avec *L. aethiopica* LRV positive, suggérant que LRV pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité du parasite (Zangger et al., 2014).

Par conséquent, la détection de LRV pourrait s'avérer cliniquement bénéfique guider le traitement ou fournir des informations sur le virus (Ives A, 2011). Dans l'ancien monde

des LRV 2 ont été mise en évidence au Turkménie et en Éthiopie (Sheffert et al, 1995 ; Zangger et al, 2014). Sur les vingt-sept souches sélectionnées selon l'état clinique dont elles sont responsables, leur origine, leur virulence, et enfin leur résistance au traitement aucune ne se révélée positive à LRV, ce qui permet de dire que la résistance et l'échec thérapeutique causé par ces souches chez les patients est essentiellement due à la résistance génétique (Eddaikra et al., 2017).

La croissance des formes promastigotes dans les milieux de culture NNN/ SLP après la décongélation et RPMI1640 10% SVF après le repiquage, était différente entre les souches de *L. infantum* et *L. major* le même constat a été reporté par Carré et al (2010) et que la sensibilité des cultures dépend également de la qualité du milieu utilisé, de la quantité du matériels inoculé et la charge en parasite (Chouih at al, 2009).

La méthode d'extraction CASAS utilisé mise au point depuis les années 1990 par Casas pour extraire l'ARN viral et l'ADN à partir de liquide cérébro-spinal, cette méthode a été à la base de la plupart des méthodes d'extraction ultérieure (He et al, 2017; Nasir et al, 2017 ; Mölder et al., 2018). Malgré le succès de cette technique, des travaux antérieurs ont montré l'efficacité de la technique basée sur une colonne d'affinité (Wang et al., 2008 ; Asai et al, 2014 ; Yang et al, 2017). Les résultats d'amplification du Virus Sigma ont conforté les résultats d'extraction par les deux méthodes ainsi que les réactions RT-PCR effectuées pour la détection des LRVs.

Nos résultats nous permettent de dire que les souches que nous avons choisies ne contiennent pas de LRV mais il est important de noter que l'absence de LRV dans les souches de laboratoire doit être considérée avec prudence car ces virus peuvent être perdus en culture (Ronet et al, 2011). De même, nous supposons que la charge parasitaire et virale était d'une faible quantité car la richesse de la suspension parasitaire était de 10^6 à 10^8 parasites/ml (De Souza., 2014 ; Zangger., 2013). L'importance de la multiplication élevée du LRV est liée à la quantité du parasite dans la culture, qui sera dans ce cas suffisante et facilitera sa détection (Ginouvs et al, 2016).

Conclusion

Conclusion

La leishmaniose est une maladie chronique à plusieurs manifestations cliniques cutanées et/ou viscérales et à transmission vectorielle, due à une vingtaine d'espèces de protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. L'Algérie, pays le plus touché du bassin méditerranéen et du Maghreb, est concerné aussi bien par la leishmaniose cutanée que la viscérale.

L'Algérie fait partie des pays endémiques de la leishmaniose qui n'ont pas encore décelé la présence du virus LRV dans les souches *Leishmania sp.* Notre travail le premier au niveau Maghrébin était plus une mise au point des techniques de détection de ce virus en utilisant deux méthodes d'extractions et une RT-PCR a permis d'avoir des résultats préliminaires attestant que ce virus ne circule pas dans les souches testées que ce soit isolées à partir de patients, de réservoirs ou de phlébotomes.

D'autres investigations sont nécessaires pour confirmer la présence ou non du virus LRV en Algérie avec de certaines modifications de paramètres tels que l'isolement de nouvelles souches dans différentes régions d'Algérie, l'augmentation de nombres des échantillons a testé et a analysé, associer à d'autre techniques de révélation de ce virus tels que l'immunofluorescence et Dot Blot.

Références

bibliographiques

Références

1. **Adel, A.**, Saegerman, C., Speybroeck, N., Praet, N., Victor, B., De Deken, R., Soukehal, A., Berkvens, D. (2010). Canine leishmaniasis in Algeria: true prevalence and diagnostic est characteristics in groups of dogs of different functional type. *VeterinaryParasitology* 172, 204–213.
2. **Alvar Jorge.**, Iván D. Vélez., Caryn Bern., Mercé Herrero., Philippe Desjeux., Jorge Cano., Jean Jannin., Margriet den Boer ., the WHO Leishmaniasis Control Team . (2012). *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.*
3. **Asai S.**, Adrianna Ianora., Chiara Lauritano., Penelope K. Lindeque., Ylenia Carotenuto ., Stazione Zoologica.,Anton Dohrn., (2014). Method paper High-quality RNA extraction from copepods for Next Generation Sequencing: A comparative study.
4. **Akhoundi Mohammad.**, Tim Downing., Jan Votýpka., KatrinKuhls., Julius Lukeš., ArnaudCannet., Christophe Ravel., Pierre Marty., Pascal Delaunay., Mohamed Kasbari., BrunoGranouillac., Luigi Gradoni., Denis Sereno. (2017). *Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis.*
5. **Belazzoug S.** (1983). Isolation of *Leishmania major* from *Psammomys obesus* (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. *Trans R Soc Med Hyg*, 77:876.
6. **Belazzoug S.** (1986). Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeur, Gerbillidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bull Soc Pathol Exo*;79:630-3.
7. **Bachi F.** (Janvier Février 2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie.
8. **Boubidi SC.**, Benallal K., Boudrissa A., Bouiba L., Bouchareb B., Garni R., Bouratbine A., Ravel C., Dvorak V., Votycka J., Volf P., Harrat Z. (2011). *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. 691-6.
9. **Ben Longdon.**, Lena Wilfert., Francis M. Jiggins. (2012). The Sigma viruses of *Drosophila*.
10. **Bessad, A.**, Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., Harrat, Z., (2012). *Leishmania infantum* MON-1 isolated from a golden jackal (*Canis aureus*) in Grande Kabylie (Algeria). *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 105, 5–7.

11. **Benallal K**, B.Gassen., L.Bouiba., J.Depaquit., Z.Harrata. (2013). Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. Volume 128, Pages 518-521.
12. **Benbella Imane**, Fatima Aich., Majdouline Elkhiyat., Hanane Khalki., Assya Khermach., Imane Bergui., Imane Tlemçani., Moncef Amrani Hassani. (2016). La leishmaniose viscérale chez l'adulte à propos de douze cas.
13. **Carre´ Nathalie**, Marianne Collot., Pauline Guillard., Mathilde Horellou., Jean-pierreGangneux. (2010). La leishmaniose viscérale Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. Vol. 29, n o 3.
14. **Casas I**, L. Powell, P.E. Klapper, G.M. Cleator. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay.
15. **Choi C.M.**; Lerner E.A. (2001). Leishmaniasis as an emerging infection. J.Invest. Dermatol. Symp., Proc 6, 175-182.
16. **Castellucci Léa.**, Eliane Menezes., Joyce Oliveira ., Andrea Magalhães ., Luiz Henrique Guimarães., Marcus Lessa., Silvana Ribeiro., JeancarloReale., Elza Ferreira Noronha., Mary E. Wilson Priya Duggal., Terri H. Beaty., Selma Jeronimo ., Sarra E. Jamieson., Ashlee Bales ., Jenefer M. Blackwell ., Amélia Ribeiro de Jesus., Edgar M. Carvalho. (2006). IL6 -174 G/C Promoter Polymorphism Influences Susceptibility to Mucosal but Not Localized Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. Volume 194, Pages 519–527.
17. **Chouihi E**, F. Amri, N. Bouslimi, E. Siala, K. Selmi,N. Zallagua, R. Ben Abdallah, A. Bouratbine, K. Aoun. (2009). Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses.
18. **Clementi Anna.**, Giorgio Battaglia., Matteo Floris., Pietro Castellino., Claudio Ronco., Dinna N. Cruz. (March 2011). Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature.
19. **Centers for Disease Control and Prevention.** (2013). Parasites – Leishmaniasis: Biology. [Online] Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
20. **Dedet J-P.** (2002). Current status of epidemiology of leishmaniasis.
21. **Desjeux P.** (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis, 27, 305-318.

22. **Dedet J-P. (2009).** Leishmanies, leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. EMC (Elsevier Masson SAS/Maladies infectieuses, Paris, 8-506-A-10.
23. **De Souza M M, L R Manzine, M Vinicius G. da Silva, J Bettini, R Vilares Portugal, A K Cruz, E Arruda, O H Thiemann. (2014).** An improved purification procedure for Leishmania RNA virus (LRV).
24. **Eddaikra N, K. Aït-Oudhia, B. Oury, Z. Harrat et D. Sereno. (2013).** Retrospective and ongoing researches on Leishmania antimony resistance in Algeria.
25. **Eddaikra N, Ait-Oudhia K., Oury B., Moulti-Mati Farida., Harrat Z., Sereno D. (2017).** Leishmania antimony resistance/ susceptibility in Algerian foci.
26. **Gramiccia M, Gradoni L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35:1169- 1180.
27. **Gonzalez U., Pinart, M., Reveiz, L., & Alvar, J. (2008).** Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. Cochrane Skin Group. Cochrane Database of Systematic.
28. **Geraci S. Nicholas., John C. Tan., Mary Ann McDowell. (2015).** Characterization of microRNA Expression Profiles in Leishmania Infected Human Phagocytes.
29. **Gangneux J-P., Beraz S., Robert-Gangneux F. (2015) .**Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Journal des Anti-infectieux*. Volume 17, pages : 25-28.
30. **González U., Pinart M., Sinclair D., Firooz A., Enk C., Vélez ID., Esterhuizen TM., Tristan M., Alvar J. (2015).** Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis (Review).
31. **Ginouès M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, P Couppié, M Nacher, M Demar, and Ghislaine Prévot. (2016).** Prevalence and Distribution of Leishmania RNA virus 1 in Leishmania Parasites from French Guiana. 102–106.
32. **Grybchuk Danyil., Alexei Y Kostygov., Diego H Macedo., Claudia M d'Avila-Levy., Vyacheslav Yurchenko. (2018).** RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Vol. 113(4): e170487.*
33. **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&Pratlong 1986) in Algeria. 716-20.
34. **Hajjarian H., Maryam Mahdi., Mehdi Mohebali., Katayoun Samimi-Rad., Angila Ataei-Pirkooh., Elham Kazemi-Rad., Saied Reza Naddaf., Reza Raoofian. (31 August 2016).** Detection and molecular identification of Leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species.

35. **He H.**, Rongqun Li., Yi Chen., Ping Pan., Wenjuan Tong., Xueyan Dong., Yueming Chen., Daojun Yu. (2017). Extraction intégrée de l'ADN et de l'ARN à l'aide de billes magnétiques provenant de pathogènes viraux causant des infections respiratoires aiguës.
36. **Izri M.A.**, Belazzoug S., Boudjebba Y., Dereure J., Pratlong F., Delalbre-Belmonte A., Rioux J.A. (1990): *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie).
37. **Izri, M.A.**, Belazzoug, S., Pratlong, F., Rioux, J.A. (1992). Isolation of *Leishmania*-major from *Phlebotomus-papatasi* in Biskra – completion of an epidemiologic saga. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee* 67, 31–32.
38. **Izri M.A.**, Belazzoug S. (1993): *Phlebotomus* (Larrousius) *perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Ténès, Algeria.
39. **Ives A**, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM. (2011). *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* 331:775–778. doi:10.1126/science.1199326.
40. **Jagtar Singh**, Niti Birbian, Shweta Sinha et Akshra Goswami. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci.* 1(7): (2014): 65–80
41. **King A M.Q.**, Michael J. Adams., Eric B. Carstens., Elliot J. Lefkowitz. (2012). *Virus Taxonomy (Part II: The Double Stranded RNA Viruses)*.
42. **Kebede Nigatu.**, Steve Oghumu., AlemayehuWorku., AsratHailu., Sanjay Varikuti., Abhay R Satoskar. (2013). Multilocus microsatellite signature and identification of specific molecular markers for *Leishmania aethiopia*.
43. **L. Bentz Meghan.**, Eve A. Humphrey., Lawrence G. Harshman., Marta L. Wayne. (2017). *Sigma Virus (DMelSV) Incidence in Lines of Drosophila melanogaster Selected for Survival following Infection with Bacillus cereus*.
44. **Mertens P.** (2004). The dsRNA viruses. *Virus Res* 101:3–13.
45. **Masmoudi Abderrahmen.**, Wala Hariz., Slaheddine Marrekchi., Mariem Amouri., Hamida Turki. (2013). Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. 31- 41.
46. **Mölder Triin.**, Speek Mart (2018). Accelerated RNA—RNA hybridization by concentrated guanidinium thiocyanate solution in single-step RNA isolation. *Biotechniques*. Vol 61.

47. **Nasir A**, Rita de Cássia Pontello Rampazzo , Alexandre Dias Tavares Costa , et Marco Aurelio Krieger (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics.
48. **Organisation mondiale de la Santé. (2014)**. Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région OMS de la Méditerranée orientale.
49. **Plourde Marie.**, Adriano Coelho., YoavKeynan., Oscar E. Larios., MomarNdao., Annie Ruest., Gaétan Roy., Ethan Rubinstein., Marc Ouellette. (January 17, 2012). Genetic Polymorphisms and Drug Susceptibility in Four Isolates of *Leishmaniatropica* Obtained from Canadian Soldiers Returning from Afghanistan.
50. **Pace David. (2014)**. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10-S18.
51. **Parmentier Laurent.**, Alexia Cusini., Norbert Müller., Haroun Zangger., Mary-Anne Hartley., Chantal Desponds., Patrik Castiglioni., Patrick Dubach., Catherine Ronet., Stephen M. Beverley., and Nicolas Fasel. (2016). Case Report: Severe cutaneous leishmaniasis in a human immunodeficiency virus patient coinfecting with *leishmaniabraziliensis* and its endosymbiotic virus. pp. 840–843.
52. **R. Faria Daniela.**, Kenneth J. Gollob., José Barbosa, Jr., Albert Schriefer., Paulo R. L. Machado., HélioLessa., Lucas P. Carvalho., Marco Aurélio Romano-Silva., Amélia R. de Jesus., Edgar M. Carvalho., Walderez O. Dutra. (2005). Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis.
53. **Ronet C**, Stephen M Beverley, Nicolas Fasel. (2011). Leishmaniose muco-cutanée dans le Nouveau Monde.
54. **Scheffter SM.**, Young T. RO., IN K. Chung., J. L. Patterson. (1995). The complete sequence of *Lieshmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an old world parasite strain. 84-90.
55. **Suman Gupta, Nishi. (2011)**. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. Vol 133, p: 27-39.
56. **Touria Hadja Slimane. (2012)**. Profil épidémiologiques et biologique de leishmaniose viscérale infantile dans l'ouest Algérien. Mémoire pour l'obtention du diplôme Magister, option Parasitologie.
57. **Torres-Guerrero Edoardo.**, Marco Romano Quintanilla-Cedillo. ,Julieta Ruiz-Esmenjaud., Roberto Arenas. (26 May 2017). Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved].

58. **Thomas Megan. (2018).** Identification of *Leishmania tropica* and *Leishmania aethiopica* by DNA Sequencing and the Detection of *Leishmania* RNA Virus. A thesis submitted to the University of Lancaster For the degree of Master of Science (by research) In Biomedical Science.
59. **Wang Y, J Shimodaira, T Miyasaka, S Morimoto, Takanori Oomori, Naoto Ogawa, Masao Fukuda & Takeshi Fujii. (2008).** Detection of bphAa Gene Expression of *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 in Soil Using a New Method of RNA Preparation from Soil.
60. **Yang. Y, Michael J. Moore.,Samuel F. Brockington.,Alfonso Timoneda. ,Tao Feng.,Hannah E. Marx.,Joseph F. Walker., Stephen A. Smith. (2017).** An Efficient Field and Laboratory Workflow for Plant Phylotranscriptomic Projects.
61. **Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, Prevel F, Castiglioni P, Pratlong F, Bastien P, Müller N, Parmentier L, Saravia NG, Beverley SM, Fasel N. (2013).** Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 7:1e2006. doi:10.1371/journal.pntd. 0002006.
62. **Zangger H, Hailu A, Desponds C, Lye LF, Akopyants NS, Dobson DE, Ronet C, Ghalib H, Beverley SM, Fasel N. (2014).** *Leishmania aethiopica* field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response.
63. **Zhai Yougang, Houssam Attoui, Fauziah Mohd Jaafar, Huan-qin Wang, Yu-xi Cao, Suo-ping Fan, Yang-xin Sun, Li-dong Liu, Peter P. C. Mertens, Wei-san Meng, David Wang and Guodong Liang. (2010).** Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (*Artivirus*) of the family *Totiviridae* . *Journal of General Virology*, 91, 2836–2845.

Annexes

Annexe 1 : Décongélation des parasites

La décongélation consiste à laisser les parasites se réchauffer pendant quelques minutes à la température ambiante. Les principales étapes de cette méthode :

- Préchauffer le milieu de culture à 26°C (1 tube NNN et 1 tube SLP).
- Sortir les cryotube de l'azote liquide, dévisser partiellement sous la hotte et laisser décongeler pendant 3 min.
- Terminer la décongélation au bain marie à 30°C après avoir resserré le bouchon.
- Transférer rapidement la moitié du contenu du tube NNN et l'autre moitié dans le tube SLP.
- Vérifier l'état des cellules au microscope : viabilité, mobilité, et incuber à 25°C.

Annexe 2 : Le milieu NNN (Novy-MCNeal-Nicolle)

Le milieu NNN (Novy-MCNeal-Nicolle) a été développé par Novy, McNeal et modifié par Nicolle, il est connu pour l'isolement de l'agent du genre *Leishmania*. La culture de cet organisme dans un milieu approprié donne naissance à une forme extracellulaire motile appelée promastigote. Ce milieu est constitué de deux phases ; une gélose au sang et d'un milieu de recouvrement. La base de gélose au sang est un milieu hautement nutritif qui favorise la croissance des organismes.

Préparation

- Suspendre 31 grammes dans 1000 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pour dissoudre complètement le milieu.
- Stériliser à l'autoclave à une pression de 15 lb (121 ° C) pendant 15 minutes.
- Refroidir à 45 ° C et ajouter de manière aseptique du sang de lapin ou de sang humain stérile défibriné.
- Bien mélanger et distribuer en quantités de 5 ml dans des éprouvettes ou de 25 ml dans des flacons.
- Laisser les supports tubulaires refroidir en position inclinée.

Annexe 3 : Milieu RPMI 1640 + 10% (RPMI 10S)

Composition : RPMI (16,4 gr), Eau distillée stérile (1000 ml).

Préparation

- Mesurer environ 900 ml d'eau distillée et tout en le soumettant à une agitation magnétique.
- Ajouter le milieu sous forme de poudre.
- Mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer et ajouter 2gr de HEPES et 3gr bicarbonate de sodium avec 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg /ml de streptomycine (facultatif).
- Complétez avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml.
- Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm et additionner aseptiquement du sérum de veau fœtal à 10%.
- Conserver le milieu à +4°C pendant 1 mois.

Annexe 4 : Principe de la numération cellulaire de parasite sur cellule la MALASSEZ

La numération cellulaire est la détermination du nombre de parasites contenus dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de numération en concentration cellulaire, c'est-à-dire le nombre de parasites par carreaux de la cellule.

Technique de numération cellulaire :

- **Dilution préalable :**

Lorsque la suspension est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, la présence d'un grand nombre de parasites par unité de volume rend le comptage difficile.

- **Utilisation de la cellule de numération :**

- **Présentation de la cellule de MALASSEZ :**

La cellule de numération de MALASSEZ est une lame porte-objets dans laquelle est creusée une chambre de comptage d'un volume connu. C'est une lame épaisse, en verre, comportant des rigoles et un quadrillage spécifique comptant 100 rectangles (10 horizontaux et 10 verticaux). Parmi les 100 rectangles, on trouve 25 rectangles divisés en 20 petits carreaux afin de faciliter le comptage des parasites.

- **Remplissage de la cellule :**

- a- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22x22 mm.
- b- Faire adhérer la lamelle aux plateaux en exerçant une légère pression ainsi qu'un mouvement de va et vient jusqu'à percevoir une résistance jusqu'à créer un effet de ventouse.
- c- Placer la cellule de comptage sur une surface plane puis homogénéiser la suspension parasitaire.
- d- A l'aide d'une pipete pasteur, remplir la chambre de comptage en une seule fois, en gardant la pointe de la pipette inclinée près de la lamelle, sans former de bulles d'air et sans faire déborder le liquide dans les rigoles pour ne pas fausser le comptage des parasites.
- e- Laisser la goutte se diffuser sur toute la surface de la plate-forme centrale du quadrillage.
- f- Laisser le liquide sédimenter quelques secondes avant de procéder à la numération.
- g- Laver puis sécher la cellule de MALASSEZ après utilisation.

Annexe 5 : L'électrophorèse sur gel d'agarose

1. Réactifs

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

2. Préparation du gel d'agarose à 1,5%

- Peser 1,5 % d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Chauffer le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide puis ajouter 5µl 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.