

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB - Blida

Faculté des Sciences Agro vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie



Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme

Master II en biologie

**Option :** Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire-immunologie

## **Thème :**

**Effet de la chimiosensibilité de *Leishmania major* aux dérivés antimoniés sur la signalisation de NO *in vivo* et *in vitro***

**Réalisé par :** Melle Mèkademi Sarra

Soutenu le 17/12/2013

Devant un jury composé de :

**Président:** Mme Aissani.R (Maitre-assistant)

**Examineur:** Mme Anane. A (Maitre-assistant)

**Examineur:** Mr Benyahia.N (Maitre-assistant)

**Promoteur:** Mr Harrat. Z (professeure) IPA

**Co-promoteur:** Mr Besaad. A (Maitre-assistant) USDB

Promotion 2012/2013

## *Dédicaces*

*Je dédis ce travail*

*Tout d'abord à mes chère parents que dieu me les gardent, qui m'ont soutenus le long de mon cursus, vos conseils ont été judicieux. J'espère être toujours à la hauteur de vos espérances !*

*À mes frères et sœurs qui ont toujours pu me faire rire lorsque j'en avais besoin.*

*À mes chère grade parent qui one été à mes coté avec leur louange que dieu les garde et que le paradis soit leur éternelle.*

*À toute la famille Mèkademi et Oumellele*

*À mes amis qui mon aidé de proche ou de loin*

*Merci à vous tous*

OSARRA

## *Remerciements*

Le travail présent a été réalisé au sein du service d'Eco-épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie (Annexe Dely Brahim) sous la direction du professeur **Harrat Zoubir**.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadreur Professeur **Harrat Zoubir** pour tous ses efforts et ses encouragements, pour son aide et sa patience infinie, et pour le soutien qu'il m'a témoigné, je lui exprime ma profonde gratitude.

A mon co-encadreur **Mr Ben saad amine** pour tous ses efforts et ses encouragements durant toute cette période pour son aide et sa patience infinie.

Je remercie infiniment **M<sup>em</sup> Anane.A**, qui a accepté de corriger ce travail et d'être présente en tant que président de ce Jury. Je remercie aussi **M<sup>em</sup> Aissani.R** et **Mr Benyahia.N**, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'exprime mes sincères remerciements au **lycée EDDAIKRA Nawel** pour sa confiance, sa gentillesse incomparable, sa disponibilité totale, son aide et ses conseils concernant toutes les essais et les manipulations au sein de l'Institut Pasteur.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à , **Ihcene Kherchi, Zhar, Sihem, Souad, Fagallal Kamel, Razika, , Adlene, Ghania, Mounir et Merzak** pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces six mois au sein de service éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur Algérie, « J'ai passé des moments inoubliables avec vous ».

A **Khadija** que j'aime beaucoup, et à mes collègues **Hadjer, Hafida, Ouarda, Imen et Abdelkader**.

Que tous ceux, que je n'ai pas nommé, et qui de prêt ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

## Liste des tableaux

**Tableau I :** Caractéristiques des trois types de NO-synthase humaine

**Tableau II :** Caractéristiques des souches utilisées

**Tableau III :** la répartition de groupe 1 des souris sur les lots.

**Tableau IV :** Résultats obtenus par le test de sensibilité des promastigotes et des amastigotes à l'antimoine trivalent ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) et pentavalent ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ )

**Tableau V :** distribution de concentrations du NO dosé *in vitro* pour huit souches

**Tableau VI :** le tableau du courbe étalon de nitrites

**Tableau VII:** tableau représentatif de profil de sensibilité des souches avec leur degré de virulence.

## Liste des figures

**Figure 01:** Distribution de la leishmaniose dans le monde

**Figure 02:** Forme promastigote de *Leishmania*

**Figure 03:** formes amastigotes à l'intérieure des macrophages au MP Gr\*100

**Figure 04:** Phlébotome femelle

**Figure 05:** Cycle de vie et transmission de la leishmaniose

**Figure 06:** Lésion d'une (LC)

**Figure 07:** Enfant atteint de leishmaniose viscérale

**Figure 08:** Interaction entre le MØ et *Leishmania*

**Figure 09:** Les voies de signalisation intracellulaire de macrophage viser par les molécules sécrétées par *Leishmania*

**Figure 10:** structure de la molécule NO

**Figure 11:** Réaction catalysée par la NO synthase et ses cofacteurs

**Figure 12:** cellules Thp1 en suspension au microscope photonique inversé G×40 (IPA 2013)

**Figure 13:** Souris BALB/C

**Figure 14:** différents types de chambre Lab-Tek

**Figure 15:** les indurations apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées

**Figure 16:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 443A/ LIPA 443B, en fonction du temps

**Figure 17:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 339A/ LIPA 339B, en fonction du temps

**Figure 18:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 445A/ LIPA 445B, en fonction du temps

**Figure 19 :** l'inflammation apparue sur l'oreille d'une souris infectée

**Figure 20:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 443A/443B, en fonction du temps

**Figure 21:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 339A/ (LIPA 339B, en fonction du temps

**Figure 22:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 445A/ LIPA 445B, en fonction du temps

**Figure 23:** les lésions apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par la souche LIPA 443A(A) et LIPA 443B (B) à s8.

**Figure 24:** l'évolution des lésions induites par les souches LIPA 443A/443B, en fonction du temps.

**Figure 25:** les lésions apparues sur l'oreille de souris BALB/c infectées par les souches LIPA 339A (A) s8 /339B (B) s8.

**Figure 26:** l'évolution des lésions induites par les souches LIPA 339A/339B, en fonction du temps.

**Figure 27:** lésion (perforation) apparue sur l'oreille des souris BALB/c infectées par la souche LIPA 445B s8

**Figure 28:** l'évolution des lésions induites par les souches LIAP 445A/445B, en fonction du temps

**Figure 29:** l'évolution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 443A/443B

**Figure 30:** l'évolution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 339A/339B

**Figure 31:** distribution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 445A/445B

**Figure 32:** distribution de concentrations du NO *in vivo* des souris infectées par les souches LIPA 443A (avant traitement) et LIPA 443B (après traitement).

**Figure 33:** distribution de concentrations du NO *in vivo* des souris infectées par les souches 339A (avant traitement) et LIPA 339B (après traitement).

**Figure 34:** distribution de concentrations du NO *in vivo* des souris infectées par les souches 445A (avant traitement) et LIPA 445B (après traitement).

**Figure 35** Distribution de concentrations du NO *in vivo* des souris infectées par la souche LIPA 175(traité et non traité).

**Figure 36:** Quadrillage de la cellule de thoma vu sous microscope photonique

**Figure 37:** schéma récapitulatif du protocole adopté dans le suivi de la cinétique d'infestation *in vivo* de six souches

**Figure 38:** courbe de tendance

**Figure 39:** courbe étalon de nitrite

## Liste des abréviations

BH4 : tétrahydrobioptérine

CCS : Cœur Cerveau Sang

CR 1/3: Complement receptor 1/3

CFU: Colony- Forming Units

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de type II

DMSO: diméthylsulfoxyde

DO: Densité Optique

EF-1: élongation factor 1

FAD: Flavine adénine dinucléotid

GP: glycoprotéine 63

HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IA: Index D'activité

IC50: Concentration Inhibitrice à 50 %

IL : Interleukine

IPA: institut pasteur d'Algérie

L : Leishmania

LB : Lymphocyte B

LC : Leishmaniose Cutanée

LIT : Liver Infusion Tryptose

LIPA : Leishmania institut pasteur d'Algérie

L-NMMA: L-NG-Monomethylarginine, Acetate

LPG: lipophosphoglycane

LT : Lymphocyte T

LV : Leishmaniose Viscérale

MTT : sel de tétrazolium

MØ: Macrophage

M199 : Milieu 199 (Medium)

NNN: Novy-Mac Neal- Nicolle

NAPDH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxydase

NO: monoxyde d'azote (Nitrique oxyde)

PMA: Phorbol-12 Myristate-13 Acétate

PN: polynucléaires neutrophiles

R: Résistante

RPML: Roswell Park Memorial Institute 1640

S: Sensible

s: semaine

SACP: secreted acid phosphatase

Sb: Antimoine

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SHP-1: Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase -1

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T : témoin

TDR: Thiol Dèpendent Rèductase

TGF $\beta$  : Transforming Growth factor  $\beta$

Th: T helper

Thp1: Tam Horsfall Protein 1 (biosafety level 1)

TNF- $\alpha$ : tumor necrose factor

VP: vacuole parasitophore

YMA: Yeast Mannitol Agar

PDF Create! 4 Trial  
www.nuance.com

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERALITES</b>	
<b>I. Définition</b> .....	<b>3</b>
<b>II. Historique</b> .....	<b>3</b>
<b>III. Epidémiologie</b> .....	<b>3</b>
III.1. Distribution géographique des leishmanioses.....	<b>3</b>
1. Dans le monde.....	<b>3</b>
2. En Algérie.....	<b>4</b>
III.2. Le parasite.....	<b>5</b>
III.2.1. Classification.....	<b>5</b>
III.2.2. Morphologie.....	<b>6</b>
1. Stade promastigote.....	<b>6</b>
2. stade amastigote.....	<b>6</b>
III.2.3. La biologie.....	<b>7</b>
III.2.4. le Génome de <i>Leishmania</i> .....	<b>7</b>
III.2.5. Vecteurs et réservoirs.....	<b>7</b>
III.2.6 cycle évolutif.....	<b>8</b>
1. Le développement de <i>Leishmania</i> à l'intérieur de phlébotome.....	<b>9</b>
III.2.7. Formes cliniques de leishmaniose.....	<b>10</b>
1. La leishmaniose cutanée (LC) .....	<b>9</b>
2. leishmaniose viscérale (LV) .....	<b>10</b>
III.2.7. le Diagnostic biologique de leishmaniose .....	<b>11</b>
1. Mise en évidence du parasite	
1.1. Examen microscopique	
1.2. Culture	
2. Diagnostic sérologique	

<b>IV. Réponse immunitaire anti leishmanie</b> .....	<b>12</b>
IV.1. Rôle des polynucléaires neutrophiles.....	12
IV.2. inflammation locale.....	12
<b>IV.3. Interaction initiale parasite Macrophage</b> .....	<b>13</b>
<b>IV.4. les Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré</b> .....	<b>14</b>
<b>IV.4.1 Le monoxyde d'azote (NO)</b> .....	<b>16</b>
IV.4.1.1. Définition.....	16
IV.4.1.2. Biosynthèse du NO.....	17
<b>IV.5. Transports des parasites et rencontre avec les lymphocytes T (LT)</b> .....	<b>19</b>
<b>V. Le traitement</b> .....	<b>19</b>

## **Matériel et méthodes**

<b>I. matériel</b> .....	<b>21</b>
<b>I.1. Matériel biologique</b> .....	<b>21</b>
I.1.1 Le parasite.....	21
I.1.2 Cellules Thp1.....	22
I.1.3 les animaux.....	22
I.1.4 Le sérums.....	23
<b>I.2. Matériel non biologique (ANNEXE 03)</b> .....	
<b>II. Méthodes</b> .....	<b>23</b>
<b>II.1. culture des cellules Thp1</b> .....	<b>24</b>
<b>II.2. culture du parasite</b> .....	<b>24</b>
<b>II.3. Infestation <i>in vivo</i></b> .....	<b>24</b>
<b>II.3.1 Préparation de l'inoculum</b> .....	<b>24</b>
<b>II.3.2. Inoculation</b> .....	<b>24</b>
<b>II.3.3 Monitoring</b> .....	<b>25</b>

<b>II.4. Test de sensibilité promastigotes <i>in vitro</i></b> .....	<b>25</b>
<b>II.5. Analyse des résultats</b> .....	<b>25</b>
<b>II.6. Test de sensibilité amastigotes <i>in vitro</i></b> .....	<b>26</b>
<b>II.7. le dosage NO</b> .....	<b>27</b>
<b>I.7.1 Préparation du plasma</b> .....	<b>27</b>
<b>I.7.2 La réaction de Griess</b> .....	<b>27</b>

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Résultats</b> .....	<b>28</b>
<b>II. Discussion</b> .....	<b>42</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>47-48</b>

PDF Create! 4 Trial  
www.nuance.com

## Résumé :

La Leishmaniose cutanée (CL) est une zoonose causée par différentes espèces parasitaires du genre *Leishmania*. En Algérie, cette infection est due principalement à *leishmania major* qui sévit à l'état endémo-épidémique dans les régions steppiques et sahariennes du pays. En 2005, plus de 30.000 cas ont été recensés, dont 70% ont été déclarés dans trois principaux foyers à Biskra, M'sila et Batna. Le traitement des leishmanioses fait appel à un dérivé pentavalent antimonie, le N-méthyl glucamine (Glucantime®). Des échecs thérapeutiques, des rechutes ont été déjà signalés chez des patients en Algérie. Le présent travail a pour principal objectif l'évaluation de la virulence et l'étude du profil de sensibilité ou de résistance des isolats de *Leishmania major*, sous leur forme amastigote et promastigote, aux dérivés de l'antimoine, ainsi que l'effet de ces dérivés sur les voies de signalisation du NO *in vivo* et *in vitro*. Les tests de sensibilité ont été effectués *in vitro* en culture cellulaire et sur les formes promastigotes et *in vivo* chez les souris BALB/c. Les résultats de la sensibilité obtenus *in vitro* indiquent l'existence d'une résistance naturelle chez les *L.major* en Algérie. Par ailleurs Cette étude nous a permis de constater qu'il existe un lien entre l'activité de l'antimoine pentavalent ( $Sb^V$ ) et la production de NO. Cet effet est positif chez les souches ayant un phénotype sensible. Les résultats de l'infestation *in vivo* chez les souris BALB/c montre qu'il n'existe pas de lien entre la virulence et la sensibilité ou la résistance de *L. major* au ( $Sb^V$ ). De plus, le dosage de monoxyde d'azote chez les souris BALB/c infestées montre qu'il existe une liaison entre la virulence de *L. major* et la quantité de NO produite. Le dosage de NO à différents intervalles de temps après l'infestation, montre qu'il existe une liaison entre cette molécule et la virulence de *L. major*. Ainsi un effet du Glucantime ® sur la production de NO est enregistré.

Mots clefs: *Leishmania major*, Monoxyde d'Azote , Sensibilité *in vitro* et *in vivo* . Virulence, N methyl\_ Glucamine,

## Summary

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a zoonotic parasitic disease caused by different species of *Leishmania*. In Algeria, this infection is mainly due to *Leishmania major* which occurs in endemo-epidemic state in the steppe and Saharan regions. In 2005, more than 30,000 cases were reported and 70 % of them were registered in three main foci in Biskra, Batna and M'sila. Treatment of leishmaniasis involves the pentavalent antimony, N-methyl glucamine (Glucantime®). Treatment failures and relapses have already been reported in patients in Algeria. The main objective of the present work is the study and the evaluation of the NO signaling in the virulence and susceptibility of *Leishmania major* on both promastigote and amastigote form to antimony components *in vivo* and *in vitro* tests. Sensitivity tests were performed *in vivo* in Balb/c mice and *in vitro* in cell culture and on the promastigote form. The results of the sensitivity obtained *in vitro* indicate the existence of a natural resistance at *L. major* in Algeria. This study enabled us to note that there exists a relationship between the activity of pentavalent antimony (SbV) and the production of NO. This positive effect is more evident with a sensitive strain. The results of the infestation *in vivo* in the BALB/c mice shows that the intensity of the symptoms goes from pair with the degree of virulence of the stock and that there does not exist relationship between the virulence and the sensitivity or resistance of *L. major* to (SbV). Measurements taken of nitric oxide at smile BALB/c infested watch which there exists a link between the virulence of the *L. major* and the production of this molecule, thus the positive effect of Glucantime® on the production of NO is recorded. In contrary, the determination of NO's level at different times after infestation shows that there is a link between the compound and the virulence of *L. major*. Thus the effect of Glucantime® on the production of NO the batch of the treated mice is definitely.

Keywords: *Leishmania major*, NO, *in vitro* and *in vivo* sensitivity, virulence, N-methylglucamine,

## المخلص

الشمانيا الجلدية هي مرض جلدي طفيلي ناجم عن أنواع مختلفة من سلالة الشمانيا . في الجزائر, هذه العدوى يسببها أساسا النوع *leishmania major* و ينتشر في المناطق شبه الصحراوية و السهبية من الوطن. في سنة 2005 تم تسجيل أكثر من 30.000 حالة, 70% منها سجلت في ثلاث بؤر رئيسية في بسكرة, المسيلة و باتنة. يعتمد علاج الشمانيا على مشتقات أنتيمونية خماسية التكافؤ N-مثيل الغلوكامين (غلوكنتيم®). وقد تم تسجيل حالات عدم إستجابة للعلاج و إنتكاس لدى بعض المرضى في الجزائر. الهدف الأساسي من عملنا هو دراسة مقدار الحدة و حساسية *leishmania major* بمظهرها amastigote و promastigote للمشتقات الأنتيمونية عن طريق تأشير جزيء ال أحادي أكسيد الأزوت حيويا ومخبريا. تجارب الحساسية تم تنفيذها حيويا على فئران BALB/c ومخبريا عن طريق الزراعة الخلوية لمظهر promastigote. أظهرت نتائج الحساسية وجود مقاومة طبيعية عند *L. major* في الجزائر. من جهة أخرى هذه الدراسة أظهرت وجود إرتباط بين نشاط الأنتيمون خماسي التكافؤ ( $Sb^V$ ) و إنتاج أحادي أكسيد الأزوت. هذا الإثر موجب عند السلالات ذات النمط الظاهري الحساس. نتائج الإصابة بالمرض لدى الفئران BALB/c أظهرت أن شدة الأعراض تتناسب زوجيا مع درجة الحدة و الحساسية للسلالة إضافة لعدم وجود علاقة بين الحدة والحساسية أو المقاومة ل ( $Sb^V$ ) لدى *L. major*. وعلى العكس, المعايير أحادي أكسيد الأزوت عند الفئران BALB/c المصابة بالمرض أظهرت وجود علاقة بين حدة سلالة *Lmajor* و هذا المركب, التأثير الإيجابي ل (غلوكنتيم®) على إنتاج أحادي أكسيد الأزوت قد سجلت.

## الكلمات المفتاحية

*Leishmania major*, أحادي أكسيد الأزوت, الحساسية حيويا ومخبريا, الحدة, N-مثيل الغلوكامين.

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. L'expression clinique dépend à la fois du tropisme des espèces de *Leishmania* et du statut immunitaire de l'hôte, ainsi que des modalités de sa réponse immunitaire (Dedet 2009). Les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays des régions tropicales et subtropicales du monde, avec une estimation mondiale de 12 millions de personnes infectées par les différentes espèces de *Leishmania* et une incidence annuelle d'environ 1 à 1.5 million de cas pour la leishmaniose cutanée (LC) et 0.5 million de cas pour la leishmaniose viscérale (LV) (WHO, 2000).

En Algérie, les leishmanioses sont des zoonoses à déclaration obligatoire, elles sévissent à l'état endémique au nord du pays pour la LV et la LC à *Leishmania infantum* et sous forme endémo-épidémique au sud du pays pour la LC à *L. major* dont le nombre de cas annuel est estimé entre 8000-10000 (Harat et al, 1995).

Le traitement des leishmanioses en Algérie fait appel en première intention aux dérivés pentavalents dont le N-méthyl glucamine (Glucantime®) est le chef de file. Depuis plusieurs années, des résistances cliniques à ce médicament ont été rapportées (Belazoug et Neal, 1986). Cette résistance est majoritairement acquise par sélection de mutants résistants et semble être naturelle chez certains parasites (Janvier et al., 2008).

Les leishmanies sont des protozoaires qui parasitent les macrophages de plusieurs espèces de mammifères, dont l'espèce humaine. Comme de très nombreux autres pathogènes, ces parasites ont également la particularité d'utiliser un hôte invertébré, en l'occurrence les phlébotomes, pour leur dissémination et leur transmission. Chez l'hôte vertébré les leishmanies, à l'intérieur des cellules macrophagiques résistent relativement bien à l'environnement inhospitalier des vacuoles parasitophores de pH très acide dans les quelles elles survivent à la digestion par hydrolases et notamment aux protéases lysosomiales. Elles ont aussi la capacité de bloquer partiellement la production par les macrophages de certaines cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12) et les dérivés actifs de l'oxygène et le monoxyde d'azote (NO) (Filippi et al., 2001). Plusieurs de ces signaux environnementaux (pH, Températures, lysosomes..) déclenchent une différenciation

morphologique chez les leishmanies de la forme amastigote à la forme promastigote et vis versa, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des parasites à la digestion cellulaire. En matière de tropisme parasitaire et de virulence il semble qu'il existe une certaine corrélation entre le génotype et l'expression clinique, exemple *L major* pour les atteintes cutanées et *L infantum* pour les atteintes viscérales (Ouellete et al 2003).

Plusieurs déterminants de la virulence du parasite ont été identifiés expérimentalement, Il peut s'agir de déterminants d'envahissement ou d'échappement parasitaire (Ex lipophosphoglycans, cystéine protéases), elles sont importantes pour faciliter l'infection, mais incapables de produire la maladie chez l'hôte ; les déterminants infectieux ou pathogéniques (Ex les histones, ou protéasomes) qui engendrent des manifestations cliniques patentes (Louzir et al, 1998).

Le présent travail a pour principal objectif l'étude et l'évaluation de l'effet de la virulence et la sensibilité de *Leishmania major* sous sa forme amastigote et promastigote aux dérivés de l'antimoine sur signalisation du NO *in vivo* et *in vitro*.

Nous allons dans un premier temps déterminer la chimiosensibilité des souches de *leishmania major* aux dérivés de l'antimoine sous leurs deux formes intra et extracellulaires. Dans un deuxième temps, étudier le phénotype externe et interne de la virulence de *L major* sensible et résistante aux dérivés de l'antimoine et enfin déterminerons le taux du NO produit *in vivo* chez les souris BALB/c et *in vitro* chez des macrophages humains en culture cellulaire.

Cette étude nous permettra de voir s'il existe une relation entre, d'une part la virulence de *leishmania major* et sa sensibilité aux dérivés de l'antimoine, d'autre part

L'effet de ces derniers sur le taux de NO produit *in vivo* ou *in vitro*.

## I. Définition

La leishmaniose, est une infection zoonotique qui est causée par un protozoaire intracellulaire obligatoire du macrophage du genre *Leishmania*, sa transmission est effectuée par des phlébotomes du genre *Phlebotomus* (Vieux Monde) ou *Lutzomyia* (Nouveau Monde). Elle compte parmi les maladies négligées et posent actuellement un problème de santé significatif en Afrique et en Inde (kimutai et *al.*, 2009).

## II. Historique

Le parasite *Leishmania* fut découverte pour la première fois par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre à Dum-Dum en Inde. (Lagardere, 1983; Lagardere et *al.*; 1992; Thakur, 1984). Ce n'est qu'en 1903 que ces résultats ont été publiés. La même année, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Ce parasite fut nommé *leishmania Donovanii*. En 1904, Rogers observe dans une culture *in vitro* de sang citraté des formes flagellées, probablement des promastigotes (Dana, 1972). Par ailleurs l'espèce *Leishmania. infantum* fut découverte en 1909, par Nicolle en Tunisie et en 1913, Chagas identifia la maladie, tandis que Migone retrouva le parasite, appelé *L.chagasi* en Amérique du sud. Toutefois, il s'avère qu'actuellement *L.chagasi* appartient au même type parasitaire que *L.infantum* et *L. Donovanii* (Giraud et *al.*; 1950; Jeannel, 1991; Brouqui et *al.*,1989). La transmission des leishmanias par le phlébotome a été découverte par les frères Sergent à l'Institut Pasteur d'Algérie en 1926.

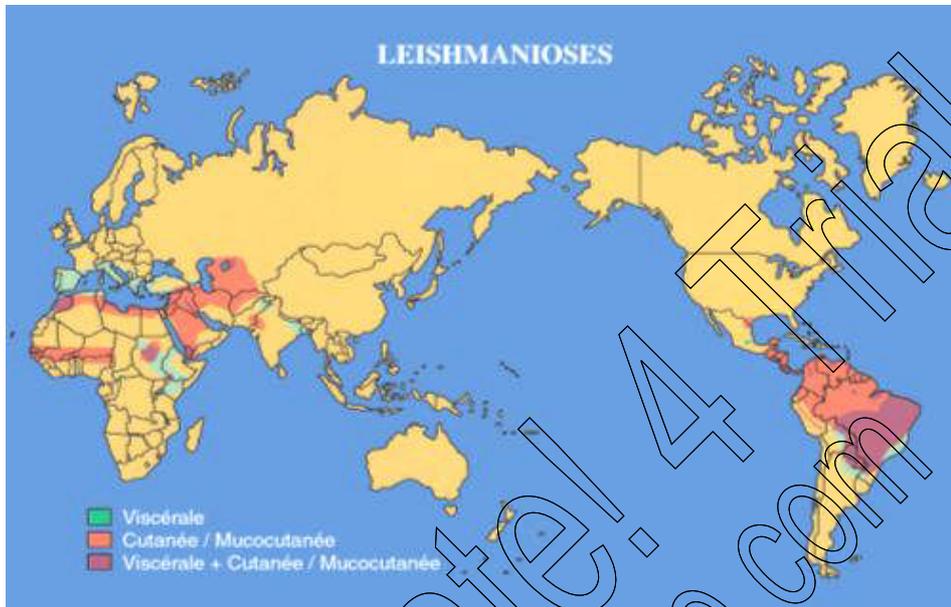
## III. Epidémiologie

### III.1. Distribution géographique des leishmanioses

#### 1. Dans le monde

Répandues à la surface du globe (Fig1), 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. Présentes sur cinq continents dans les zones tropicales et sub tropicales de 88 pays : 16 sont des pays

industrialisés et 72 des pays en développement, dont 13 parmi les pays les moins développés (Desjeux et al., 2001).



**Figure 01** : Distribution de la leishmaniose dans le monde

[www.who.int/fr](http://www.who.int/fr)

On estimait à 12 millions le nombre de personnes infectées par les différentes espèces de *Leishmania* en 2000 avec une incidence d'environ 1.0 à 1.5 million de cas par an pour les leishmaniose cutanée (LC) et de 0.5 million de cas par an de leishmaniose Viscérale (LV) (WHO, 2000 ; Dedet, 2001 ; Croft et Yardley, 2002).

## 2. En Algérie

L'Algérie, qui compte parmi les plus concernés par la leishmaniose, est caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques qui favorise la dissémination de cette maladie (Harrat et Belkaid, 2003).

Quatre formes clinique sévissent à l'état endémo-épidémique, elle se répartissent en trois formes cutanées : la LC due à *L.major* avec 30227 cas déclarés durant l'année épidémique 2005-2006, la LC sporadique du nord avec en moyenne 400 nouveaux cas

par an, la LC à *L.killicki* (Harrat et al.,2009) et enfin une forme viscérale, dont le pronostic reste grave, sévit dans la partie nord du pays (Harrat et al., 1990).

La LC du nord due principalement à *L.infantum*, est une forme clinique qui sévit au nord du pays (Belazzoug et al., 1985), Le vecteur est *Phlebotomus perfiliewi* (Izri et Belazzoug., 1993) et le réservoir est le chien (Benikhlef et al., 2004).

La LC zoonotique due à *L.major* connue pour ne sévir que dans deux foyers historiques : Biskra (34°51' Nord 5°44' Est) et Abadla (31°01' Nord 2° 44' Ouest), progresse depuis les années quatre- vingt dangereusement vers les hauts plateaux et les régions steppiques (Boudrissa et al., 2012). Les nouveaux foyers du nord concernent Batna, Médea, Tiaret et Bordj Bou Ariridj. L'animal réservoir est le « rat des sables » ou *Psammomys obesus* et la gerbille *Meriones shawii* à Médea (Belazzoug, 1986) et le vecteur est *Phlebotomus papatasi* (Izri et al., 1992)

La LV en Algérie est une affection de type rural. Elle sévit à l'état endémique au nord du pays. L'agent causal de la LV appartient au complexe *L.infantum*, le vecteur principal est *phlebotomus perniciosus* et le chien représente le principale réservoir d'infection (Izri et al., 1990).

## **III.2. Le parasite**

### **III.2.1. Classification**

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

**Règne :** Protista (Haeckel, 1866)

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

**Phylum :** Sarcomastogophora (Honigberg et Balamuth, 1963)

**Sous phylum :** Mastigophora (Diesing, 1866)

**Classe :** Zoomastigophora (Calkins, 1909)

**Ordre :** Promastigotid/Kinetoplastidea (Honigberg, 1963 emend Vickerman, 1976)

**Sous ordre :** Trypanosomatina (Kent, 1880)

**Famille :** Trypanosomatidea (Döflein, 1901 emend Grobber, 1905)

**Genre :** Leishmania (Ross, 1903)

### III.2.2. Morphologie

Les leishmanies présentent au cours de leur cycle, deux stades évolutifs distincts le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Ils se multiplient aux deux stades par division binaire simple (Dedet, 2001).

#### 1. Stade promastigote

Sont des parasites extracellulaires, mobiles vivants dans le tube digestif du vecteur qui est un phlébotome. Ils présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 $\mu$ m de longueur et 1 à 4 $\mu$ m de largeur, prolongé par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 $\mu$ m de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur (fig02) (Mazelet, 2004).

#### 2. stade amastigote

Nichent à l'intérieur des macrophages des mammifères, au sein de vacuoles dites parasitophores. A ce stade les leishmanies présentent un corps beaucoup plus ramassé corpuscules ovalaires de 4 $\mu$ m de long et de 2 $\mu$ m de large. Les amastigotes sont également munis d'un flagelle mais celui-ci est très court (intracytoplasmique) et ne dépasse pas le corps cellulaire (Fig03) (Mazelet, 2004).



Figure 02 : Forme promastigote de *Leishmania*

[www.ricet.es](http://www.ricet.es)

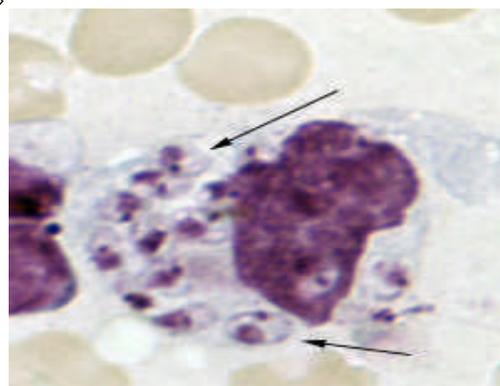


Figure 03 : formes amastigotes

[www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov)

### III.2.3. La biologie

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 exceptionnellement rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage et se multiplient par division binaire longitudinale. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage, et la Ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (Bussières *et al.*, 1992 ; Slappendel *et al.*, 1998). 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 (Euzéby, 2008).

### III.2.4. le Génome de *Leishmania*

La *Leishmania* possède deux types d'ADN, un nucléaire et un autre kinétoplastique. Le Kinitoplaste est un organe unique, localisé à la base du flagelle, et considéré comme un ADN mitochondrial modifié (Vickerman, 1976). La non condensation de la chromatine du génome nucléaire de *Leishmania* a rendu son étude difficile. Actuellement la quasi-totalité du génome (94%) est connu, la densité de gène est de 1 Gène pour 3.5Kb (Ouellette, 2003). L'ADN de *Leishmania* est dépourvu d'intron et il se découpe en grande unité polycistronique (Myler, 2000), il contient assez peu de séquences répétées (Ouellette, 2003). Des phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (Dujardin, 2000), ou des amplifications chromosomiques (Stiles, 1999) ont été mise en évidence.

### III.2.5. Vecteurs et réservoirs

Le vecteur présente un maillon important dans la chaîne de transmission. Diptères nématocères de la famille des *Psychodidae*, les phlébotomes sont, à l'état adulte, des moucheron piqueurs de petite taille (longueur du corps : 1,5 à 4mm) (Fig04). Ce sont des insectes à activité crépusculaire et nocturne. 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).



Figure 04 : Phlébotome femelle ( [www.aswat.ma](http://www.aswat.ma) )

Les réservoirs naturels des leishmanies sont des mammifères domestiques et sauvages appartenant au divers ordre.

### III.2.6. cycle évolutif

Le parasite *Leishmania* a un cycle de vie dimorphique qui nécessite deux hôtes, la mouche des sables et un mammifère (Figure 05). Lorsqu'une mouche des sables femelle infectée prend un repas sanguin chez un hôte mammifère, elle salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion le parasite sous sa forme promastigote. Il infecte ensuite un phagocyte (principalement les monocytes/macrophages) du système réticulo-endothélial et se transforme en amastigote. S'en suit une multiplication du parasite par fission binaire dans phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé. Les parasites ainsi libérés sont phagocytés par les cellules avoisinantes où le processus se poursuit. Le cycle est complété lorsqu'une mouche prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant des *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et motiles appelés nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle.

A partir du 7<sup>ème</sup> jour, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum qui sépare l'intestin médian de l'avant du système digestif. Les nectomades se transforment alors en heptomades, qui sont plus petits et plus arrondis, et en promastigotes métacycliques qui eux, ne se divisent plus, sont plus minces avec un long flagelle et hautement motiles. C'est cette forme qui est infectieuse

pour les mammifères. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des métacycliques vers l'oesophage, le pharynx et le proboscis (Sacks et Kamhawi, 2001).

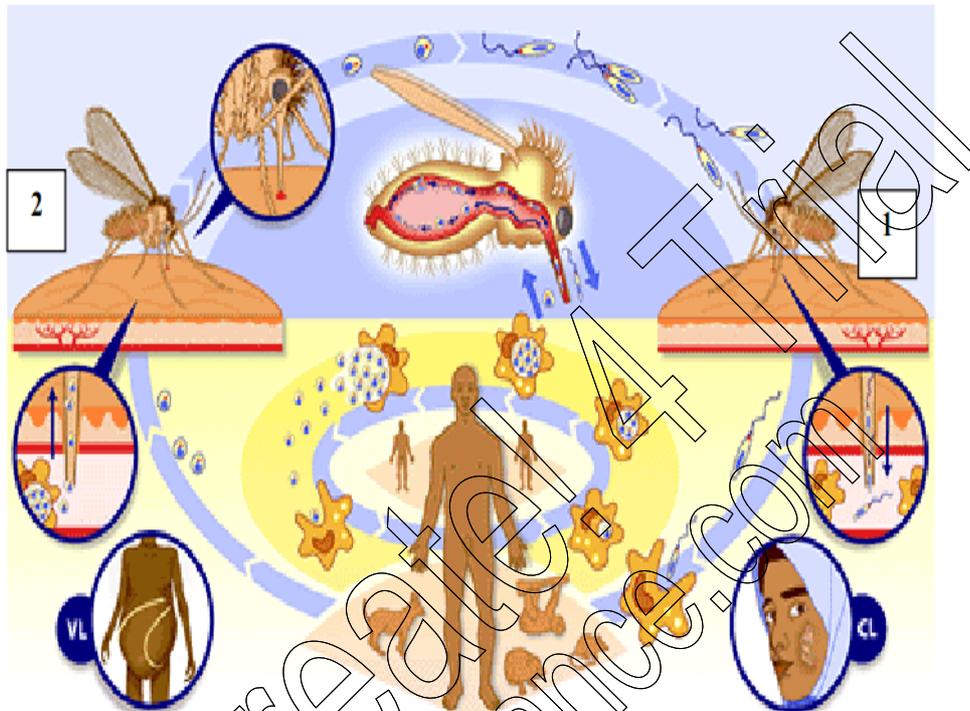


Figure 05 : Cycle de vie et transmission de la leishmaniose

(<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/leish.htm>)

- les promastigotes se trouvent naturellement chez la mouche des sables dans un milieu neutre et à une température de 25C°, tandis qu'à l'intérieur du phagolysosome du macrophage de l'hôte, le parasite vit à 37C° et à pH acide.

➤ **Le développement de Leishmania à l'intérieur de phlébotome**

Après l'absorption de macrophages infectés lors du repas de sang les amastigotes ingérés se différencient en plusieurs stades morphologiques. En effet, dans la matrice péritrophique, les amastigotes se différencient en petites formes, promastigotes procycliques, ovoïdes, capables de se diviser et possèdent un court flagelle. Ces formes marquent le premier cycle de multiplication chez le phlébotome .Les procycliques se développent en suite en grandes formes minces, appelées nectomonades, qui donnent lieu à des leptomonades, capables de se diviser, initialisant la seconde étape du cycle de multiplication. Ces derniers constituent les précurseurs

des formes métacycliques, qui ont un corps cellulaire petit et mince avec un long flagelle leur assurant une grande mobilité, ainsi ces formes sont résistantes à la lyse induite par le complément et donc adaptées à la transmission par le phlébotome et à la survie chez l'hôte vertébré. Pendant la métacyclogenèse, le lipophosphoglycane (LPG), présent dans toutes les *Leishmania spp.* subit d'importantes modifications structurelles visant à promouvoir la transmission du parasite par le phlébotome et son infectiosité à l'hôte vertébré. Ainsi les modifications survenues lors de la métacyclogenèse permettent de faire la différence entre les promastigotes procycliques et métacycliques, (Kbaier-Hachemi *et al.*, 2011).

### **III.2.7. Formes cliniques de leishmaniose**

Parmi les formes cliniques qui présentent la leishmaniose on peut citer les deux formes les plus communes qui sont :

#### **1. La leishmaniose cutanée (LC)**

Autrefois connu comme le " bouton d'Orient ", la LC peut provoquer des lésions cutanées présentant, sur le site de piqûre, une papule prurigineuse. S'en suit une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme qui conduit à une ulcération. (Myler *et al.*, 2008 ; Reithinger *et al.*, 2007 ; Banuls *et al.*, 2007 ; Grevelink *et al.*, 1996) (Fig06).



Figure 06 : Lésion d'une (LC)

[www.parasitologie.univ-montp1.fr](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr)

## **2. La leishmaniose viscérale (LV)**

Elle est appelée kala-azar ou " fièvre noire ", Dues essentiellement à: *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum*, c'est elle qui représente la forme la plus grave de la maladie. En absence de traitement, la LV est mortelle. Lors de la piqûre par le phlébotome, les parasites migrent via le système sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et le foie. Sa clinique se caractérise globalement par une inflammation du foie et de la rate, ce qui provoque une hépatosplénomégalie, une distension abdominale sévère, une perte de poids importante et une anémie (Banuls et *al.*, 2007) (Fig07).

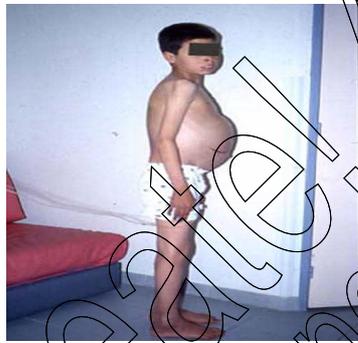


Figure 07: Enfant atteint de leishmaniose viscérale

([umvf.univ-nantes.fr](http://umvf.univ-nantes.fr))

### **III.2.8. le Diagnostic biologique de leishmaniose**

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son génome (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants (Le Fichoux et *al.*, 1999 ).

#### **1. Mise en évidence du parasite**

##### **1.1. Examen microscopique**

Les frottis seront faits à partir de matériel prélevé par ponction de moelle osseuse, de rate ou de lymphes dermiques. Pour les lésions cutanées, le prélèvement se fera par raclage au vaccinostyle à la périphérie de la lésion. Les frottis fixés au méthanol, seront colorés au May Grünwald Giemsa. Réalisé par un opérateur expérimenté, la microscopie semble être le meilleur Examen pour le diagnostic (Del Giudice et *al.*,

1998). Il permet d'observer des formes amastigotes à l'intérieur ou à l'extérieur des macrophages.

## **1.2. Culture**

Elle permet la croissance des formes promastigotes à partir des ponctions ou des biopsies, dans des milieux d'isolement appropriés (Werry, 1995). Le milieu le plus utilisé est le milieu Novy-Mac Neal- Nicolle (N.N.N). D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, de Schneider et le RPMI. Tous ces milieux sont additionnés d'antibiotiques et exceptionnellement d'antifongiques (Bachi, 2001).

## **2. Diagnostic sérologique**

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées dans le diagnostic de la leishmaniose. Elles font appel à des antigènes de nature et de modalités de préparation variées. Les kits commerciaux ont détrôné les préparations d'antigènes fabriquées au laboratoire. Les antigènes sont couramment préparés à partir des formes promastigotes de culture d'espèces de *Leishmania*, les réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI) « Elle consiste à mettre en présence un antigène figuré avec des dilutions successives de sérum suspect », d'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) « C'est une technique qui utilise des antigènes solubles fixés par absorption sur l'alvéole des plaques de microtitration », d'électrosynérèse (ES), d'agglutination directe (DAT) « Elle consiste à mettre en présence des dilutions successives de sérum avec des formes promastigotes de *Leishmania* trypsinées et colorées au bleu d'Evans ou au bleu de coomassie » et d'hémagglutination indirecte (HAI) « Elle consiste à mettre en présence des dilutions croissantes de sérum et des globules rouges sensibilisés par un antigène leishmanien » (Dedet, 2001), le Western Blot (W.B) sont couramment utilisées dans les enquêtes séro-épidémiologiques (WHO 2010)

Parmi les Techniques modernes permettant de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie) et qui permettent aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable la « PCR », Son principe est d'utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier

la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice.

## **IV. Réponse immunitaire anti leishmanie**

### **IV.1. Rôle des polynucléaires neutrophiles**

Dès l'invasion, les leishmanies sont rapidement confrontées aux polynucléaires neutrophiles (PN), des phagocytes normalement présents dans le sang mais que l'on trouve en abondance au niveau du site inflammatoire 1 à 2 heures après l'infection (Tacchini-Cottier et *al.*, 2000). L'élimination des neutrophiles entraîne une aggravation des lésions et une augmentation transitoire de la charge parasitaire. Toutefois, des souris dépourvues de neutrophiles finissent par guérir aussi. (Filippi et *al.*, 2001).

### **IV.2. inflammation locale**

Les lipophosphoglycane (LPG) qui sont spécifiques de chaque espèce sont reconnus par des récepteurs de la cellule hôte appelés lectines. Il a été récemment montré que la galectine-3, une lectine sécrétée par les macrophages (MØ) et les cellules dendritiques activées par des molécules proinflammatoires, se lie spécifiquement aux épitopes polygalactose du LPG de *L. major* (Pelletier et *al.*, 2002). Cette interaction spécifique pourrait s'avérer déterminante dans la réponse inflammatoire massive locale provoquée par *L. major*. En effet, la galectine-3, qui forme une couche à la surface du macrophage pourrait être détruite par la glycoprotéine 63 (GP63) exprimée à la surface du parasite. Le clivage de la galectine-3 par *L. major* provoquerait une augmentation de la sensibilité des macrophages à des stimuli immunologiques, ce qui pourrait expliquer la réponse locale inflammatoire induite par *L. major* (Pelletier et *al.*, 2002 ; Sato et *al.*, 2003).

### **IV.3. Interaction initiale parasite Macrophage**

Suite à leur inoculation dans un hôte par leur vecteur, les promastigotes de *Leishmania* doivent échapper à la lyse par le complément jusqu'à ce qu'ils soient phagocytés par un MØ où ils pourront se répliquer. Sachant que Les promastigotes procycliques de *L. major* ne résistent pas à la lyse par le complément en comparaison

aux métacycliques (Puentes et *al.*, 1990). Ceci semble dû au fait que le LPG des promastigotes métacycliques est plus long et qu'il ne permet pas la fixation du complexe C5b-C9 du complément, responsable de la lyse cellulaire.

Après l'infestation, les leishmanies sont exposées aux protéines du complément. Suite à l'activation de ces protéines par voie classique, (Filippi et *al.*, 2001; Roitt et *al.*, 2003) les promastigotes métacycliques sont généralement opsonisées par le C3b et le C3bi (composants du complément) qui se fixent respectivement sur les récepteurs du complément 1 et 3 (CR1 et 3) du MØ.

Le LPG et la gp63 peuvent se lier au C3b et C3bi (et donc au CR1 et 3) mais il semble que ce soit le CR3 qui permet l'interaction la plus ferme entre le MØ et le parasite. En effet, le C3b est rapidement converti en C3bi, entre autres par l'action de la gp63 (fig08) et cela permet l'opsonisation du parasite et sa phagocytose (Brittingham et *al.*, 1995). Le parasite posséderait des protéines kinases qui jouent un rôle dans la phosphorylation des composants du système du complément et inhiberaient ainsi la cascade qui conduit à la formation de ce dernier (Bogdan et Rölinghoff, 1998). Le LPG empêche l'accès de complexe lytique C5b-C9 à la membrane plasmique (Filippi et *al.*, 2001) (Fig10).

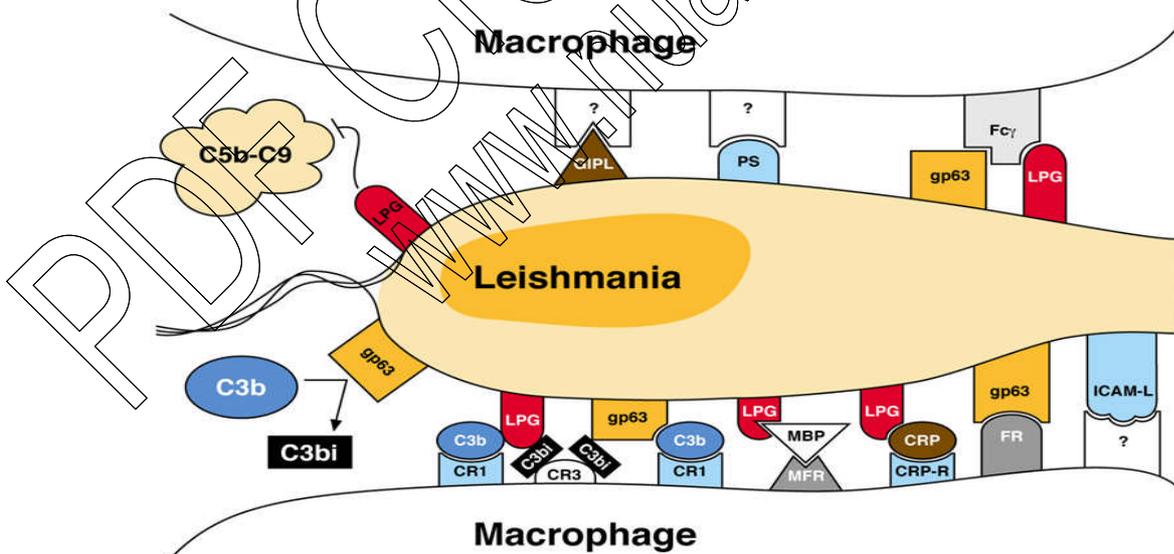


Figure 08 : Interaction entre le MØ et *Leishmania* (Bogdan et Rölinghoff, 1998)

#### IV.4. les Mécanismes de survie chez l'hôte vertébré

Une fois à l'intérieur des macrophages, les promastigotes se métamorphosent en amastigotes à l'intérieur des vacuoles parasitophores (VP). Comme les vésicules des compartiments prélysosomiaux ou lysosomiaux, les vacuoles parasitophores se caractérisent par un pH acide inférieur à 5 (Filippi et *al.*, 2001). Contrairement à d'autres pathogènes, les leishmanies résistent relativement bien à l'environnement inhospitalier des vacuoles parasitophores. Ainsi, les amastigotes sont des organismes acidophiles dont le métabolisme est optimal entre pH 4 et 5,5 (Zilberstein et *al.*, 1994). Ils sont résistants aux hydrolases et notamment aux protéases lysosomiales, vraisemblablement parce que les protéines qu'ils expriment à leur surface sont masquées par des glyco-inositol-phospholipides (Filippi et *al.*, 2001).

Les macrophages infectés par des microorganismes produisent généralement des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12) qui provoquent et amplifient la réaction inflammatoire en attirant et en activant d'autres cellules du système immunitaire et produisent aussi des molécules toxiques comme les dérivés actifs de l'oxygène et le monoxyde d'azote (NO). Ainsi, les leishmanies bloquent partiellement la production par les macrophages de ces cytokines et les dérivés actifs de l'oxygène et le NO (Filippi et *al.*, 2001).

Les molécules parasitaires responsables de cette inhibition sont le LPG et gp63 qui inhibent la production de dérivés actifs de l'oxygène en agissant sur la protéine kinase C (Turco. SJ, 1999). ou en dégradant l'un de ses substrats : la protéine MRP. Les glyco-inositol-phospholipides, qui sont présents en abondance dans la membrane plasmique des leishmanies, sont eux responsables de l'inhibition de la production de NO (Filippi et *al.*, 2001).

Enfin, les macrophages infectés par les leishmanies ne produisent que peu ou pas d'IL-12 (Belkaid et *al.*, 1998), une cytokine pourtant déterminante dans le développement d'une immunité protectrice.

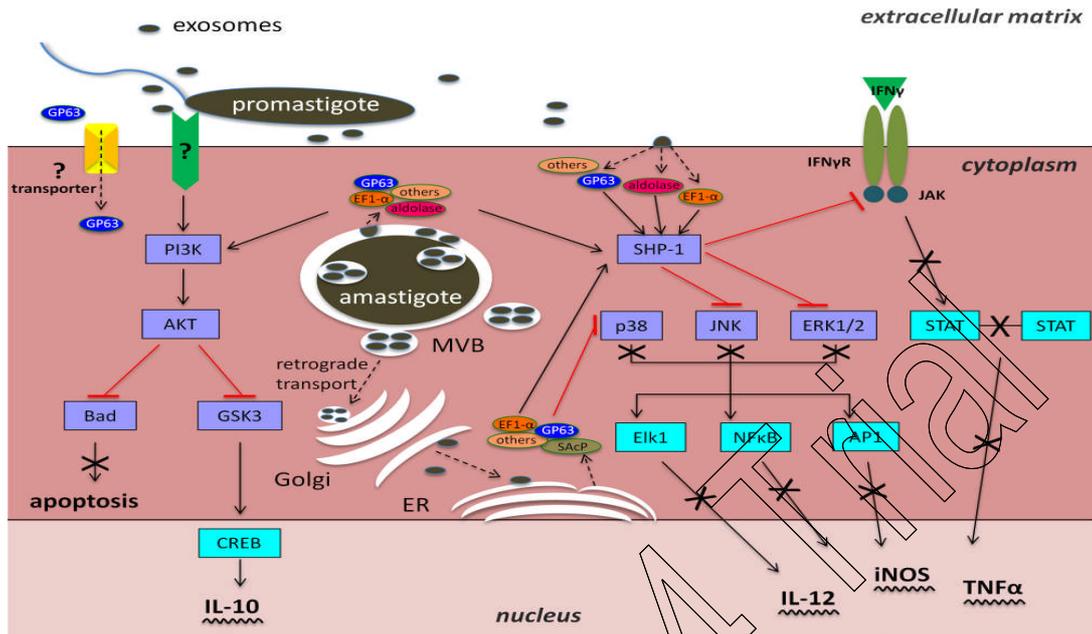


Figure 09 : Les voies de signalisation intracellulaire de macrophage visé par les molécules sécrétées par Leishmania (Kambertz et *al.*, 2012).

Les promastigotes pénètrent les macrophages par une phagocytose facilitée et active la cascade de signalisation des MAPK et PI3K. Les molécules sécrétées par les leishmanies extra ou intracellulaires peuvent accéder au cytoplasme des macrophages à travers des transporteurs membranaires. Parallèlement à la phagocytose, il a été montré que les exosomes sécrétés par les parasites pouvaient libérer des facteurs de virulence au sein du cytoplasme des macrophages et contribuent à la pathogénicité. Ainsi les exosomes peuvent libérer leur contenu moléculaire dans le cytoplasme suite à la formation de corps multivesiculaires, suivi par un transport rétrograde vers le l'appareil de golgi vers le réticulum endoplasmique ou bien par une fusion de la membrane des exosomes avec la membrane cytoplasmique ou la membrane de VP. une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte les leishmanie secrète des effecteurs comme EF-1, GP63, aldolase, et secrete acid phosphatase (SACP) qui ont comme cible les kinase et les phosphatase de la cellule hôte comme SHP-1 et PI3K en modulant leur activités, ces dernier vont bloqué les voies productrice de IL12/iNOS/IFNα (Lambertz et *al.*, 2012), ce processus est en faveur de développement du parasite .

#### IV.4.1 Le monoxyde d'azote (NO)

##### IV.4.1.1. Définition

Le monoxyde d'azote est un composé naturel, radical libre et instable, produit de l'oxydation enzymatique de la L-arginine chez les animaux. Il est biosynthétisé par des systèmes enzymatiques finement régulés appelés NO-synthases. C'est un médiateur biologique ubiquitaire dont les fonctions passent de fonctions physiologiques à des mécanismes pathophysiologiques (Ducrocq et *al.*, 2001).

Dans les conditions normales de température et de pression, le monoxyde d'azote (NO) est un gaz incolore à l'état pur. NO est un radical constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une double liaison (Figure 10).

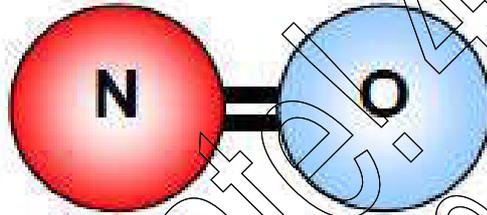
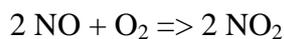


Figure 10 : structure de la molécule NO (Ghafari et *al.*, 2003)

En effet, le NO est impliqué dans certains mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire, reproduction ou maintien du tonus vasculaire, mais aussi du développement des troubles pathologiques au cours de l'inflammation, ainsi que lors du choc septique ou certaines formes de neuro dégénérescence (Crépel et Lamaire, 1995).

La production non réglée du NO peut causer le stress nitrosative, menant aux dommages de protéines/DNA et aux dommages et à la mort de cellules (Hausladen.A, 1999 ; Murphy. M. P, 1999).

La demi vie de l'oxyde nitrique dans la matrice biologique est très courte, s'étendant de plus moins de 1 seconde en présence de l'hémoglobine à ~30 secondes il est rapidement oxydé au nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et/ou au nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) par l'oxygène (Feldman. P. L, 1993 ; Eich et *al.*, 1996).



#### IV.4.1.2. Biosynthèse du NO

Le NO provient de l'oxydation de la L-arginine qui est un acide aminé semi essentiel, est utilisée par les cellules pour les synthèses protéiques. Cependant, elle est aussi utilisée comme substrat par un groupe d'enzymes pour la synthèse NO. Les enzymes permettant cette synthèse sont les NO synthases (NOS) (Alderton et *al.*, 2001), chez les macrophage ces dernier sont activè par différentes cytokines tel que « IL12, TNF, IFN  $\gamma$  ».

Selon les espèces animales et dans une espèce selon le type cellulaire, il existe plusieurs isoenzymes différentes (Tableau I) (annexe1) (Ghafari et Labarde, 2003).

La NO synthase est souvent décrit comme une structure dimérique. Cependant, sa forme active nécessite la présence de calmodulines (CaMs) qui lui conférant une structure tétramérique (deux monomères de NOS associés à deux CaMs). Les NOS sont étroitement liées à des cofacteurs : 6R-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), Flavine adénine dinucléotid (FAD), FMN et le fer de l'hème (Alderton et *al.*, 2001, Ghosh et *al.*, 1995). Chaque monomère contient deux domaines, l'un N-terminal d'activité oxygénase, l'autre C-terminal portant une activité réductase, reliés par un site central qui lie la calmoduline et stabilisés par un pont qui contient un atome de zinc (Crane et *al.*, 1999). Après liaison de la calmoduline (et de calcium pour la NOS-1 et la NOS-3 mais pas pour la NOS-2 qui est dépendant de cytokines), un transfert d'électrons intra-enzymatique est initié, depuis les cofacteurs Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase (NADPH), FAD et FMN du domaine réductase vers le groupement hème du domaine oxydase. Ensuite, en présence de BH<sub>4</sub> et d'oxygène, l'enzyme NOS catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline et la libération simultanée de NO, ou éventuellement de NO<sup>-</sup> (anion nitroxyl) (fig 11).

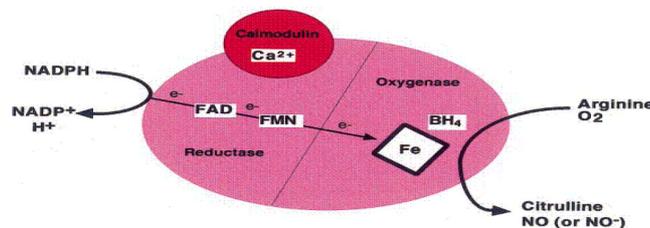


Figure 11 : Réaction catalysée par la NO synthase et ses cofacteurs  
( Alderton et *al.*, 2001)

Divers composés pharmacologique permettant d'inhiber la production de monoxyde d'azote ont été développés. Les inhibiteurs non silictifs de NOS les plus utilisés sont : L-NMMA, L-NNAE et le L-NAME. Ces trois inhibiteurs sont compétitifs avec la L-arginine pour le site de liaison de la NOS avec la L-arginine (Bryk et Wolff., 1999).

#### **IV.5. Transports des parasites et rencontre avec les lymphocytes T (LT)**

Les cellules dendritiques participent également à la phagocytose des leishmanies ce qui induit la maturation de ces cellules et leur déplacement du site de l'inflammation vers le ganglion lymphatique drainant où ils vont présenter les antigènes du parasite aux LT naïfs en association avec le CMH II (Euzèby, 2003 ; Fillippi *et al.*, 2001). Les LT comprennent deux sous-populations : Th1 et les Th2 (T helper 1 et 2).

L'immunité protectrice en matière de leishmaniose est l'immunité de type Th1, associée à une réponse de type cellulaire (Nadau, 2005).

L'interaction des cellules dendritiques avec les LT CD4<sup>+</sup> naïfs, permet la production de IL-12 par les cellules par les cellules dendritiques qui stimulent la sécrétions d'IFN- $\gamma$  par les cellules tueuses (NK). De plus l'IFN-  $\gamma$ , IL-12, IL-1 et le TNF- $\alpha$  permettent la différenciation des CD4<sup>+</sup> activées en Th1 génératrices d'IL-12, IL-2 et l'IFN-  $\gamma$ .

La réponse immunitaire de type Th2, associée à une réponse de type humorale, est en faveur du pathogène et elle ne joue pas un rôle protecteur dans le contrôle de l'infection, Elle favorise la prolifération des lymphocytes B (LB) et la production d'anticorps (Nadau, 2005).

#### **V. Le traitement**

Le traitement des leishmanioses et des maladies parasitaires en générales est compliqué par l'arsenal limité d'antiprotozoaires et par l'émergence de la résistance aux médicaments disponibles. Les antimoniés sont le traitement de première ligne pour la majeure partie des leishmanioses cutanées. Les schémas thérapeutiques comportent des monothérapies, ainsi que des associations entre les différentes molécules (Solgi *et al.*, 2006). La thérapeutique, dominée depuis de nombreuses années par les sels d'antimoine (administration par l'injection intraveineux ou intramusculaire, une fois-quotidiennement), qui a devenu progressivement inefficace dans certaines régions

endémiques. Des molécules tel l'Amphotéricine B, notamment la forme liposomale, est très largement utilisée et commence à s'imposer. Actuellement, la miltéfosine et la paromomycine ont montré une grande efficacité, avec un taux de 94% de guérison pour la miltéfosine (Bouchaud et Izri, 2008).

PDF Create! 4 Trial  
www.nuance.com

Le travail présenté a été réalisé au service Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Dely Brahim) du 03/04 au 15/09/2013

## **I. Matériel**

### **I.1. Matériel biologique**

#### **I.1.1 Le parasite**

Huit souches appartenant à l'espèce *Leishmania major* ont été testées subdivisée en deux groupes :

Groupe 01 :

- Trois souches isolées avant traitement de malades présentant une leishmaniose cutanée : LIPA 443A LIPA 339A et LIPA 445A.
- Trois souches provenant des mêmes patients après traitement par le Glucantime : LIPA 443B, LIPA 339B et LIPA 445B.

Groupe 02 :

- Une autre souche provenant d'un malade présentant une leishmaniose cutanée, résistante à l'antimoine (R), la LIPA 175/11.
- Une souche provenant d'un malade présentant une leishmaniose cutanée sensible à l'antimoine (S), la LIPA 100/09.

Six souches ont été utilisées pour le test *in vivo* sur la souris BALB/ C et *in vitro* (pour la forme amastigote et promastigote).

Les caractéristiques de chaque souche sont répertoriées dans le (tableau II) (annexe 2).

#### **I.1.2 Cellules Thp1**

Lignée cellulaire dérivée de monocytes du sang humain (fig12), obtenues d'une leucémie aigue monocyttaire, conservée en azote liquide et entretenue sur milieu RPMI (Tsuchiya. S et *al.*, 1980).

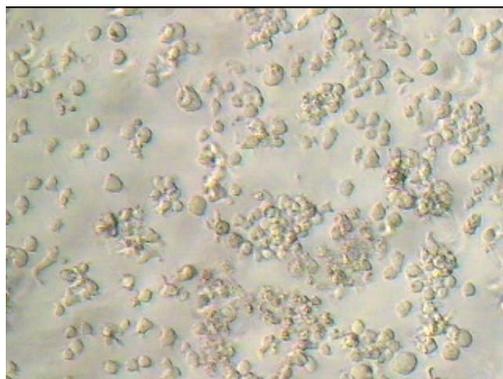


Figure (12): cellules Thp1 en suspension au microscope photonique inversé G×40 (IPA 2013)

### **I.1.3 Les animaux**

Les souris BALB/c sont sensibles aux maladies induites par *Leishmania* (Vladimirov *et al.*, 2003). Elles produisent des cytokines de type Th2, notamment l'interleukine-4 (IL-4) et de l'IL-10, ces dernier sont associée à la progression de la maladie et de la sensibilité (Baldwin *et al.*, 2003).

Des souris BALB/C femelles, âgées de 6 semaines avec un poids moyen de 18 g (fig13) sont utilisées vue leur susceptibilité à l'infection par *leishmania*, Elles ont été fournies par l'animalerie de l'IPA.

- Un groupe constitué de 35 souris réparties en sept lots, six lots pour suivre l'infestation *in vivo* par les souches de groupe 01, et un lot témoin (tableau III).



Figure (13) : souri BALB/C (IPA 2013)

**Tableau III** : la répartition de groupe 1 des souris sur les lots.

Groupe des lots	Nombre de souris / la souche infesté
Lot 1	5 souris infestées par LIPA 339A
Lot 2	5 souris infestées par LIPA 339B
Lot 3	5 souris infestées par LIPA 445A
Lot 4	5 souris infestées par LIPA 445B
Lot 5	5 souris infestées par LIPA 443A
Lot 6	5 souris infestées par LIPA 443B
Lot 7	5 souris témoins (T)

A : Avant traitement

B : Après traitement

#### **I.1.4 Le sérums**

Les sérums ont été récupérés à partir du sang prélevé par ponction cardiaque des souris infectées par la souche LIPA 175(R) de groupe 02, (traités et non traités) et cela 4

Semaines (s) après l'infection, puis à la huit<sup>ème</sup> 10<sup>ème</sup> 12<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> semaine d'infestation, ces sérums sont conservé dans de l'Azote liquide à (-180 °C)

## **I.2. Matériel non biologique (Annexe03)**

## **II. Méthodes**

### **II.1. culture des cellules Thp1**

Les cellules Thp1 conservées dans de l'azote liquide sont décongelées dans un bain-marie à 37 °C pendant une minute. Le contenu des cryotubes est récupéré par la suite et déposé dans 5ml de RPMI à 10 % SVF (Sérum de Veau Foetal). Après 24h le milieu contenant les cellules Thp1 est centrifugé pour éliminer le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le culot est re- suspendu dans 5 ml de RPMI à 10 % SVF. Un repiquage se fait tous les 5 jours (9 ml du RPMI additionné de 1 ml de l'ancienne culture), puis incubé dans l'étuve à 37 °C à 5 % CO<sub>2</sub>. Le contrôle de la culture se fait au microscope inversé.

### **II.2. culture du parasite**

Les souches sont entretenues dans le milieu NNN et le contrôle se fait au microscope optique à grossissement (x40) afin de vérifier la richesse de la culture en promastigotes, la mobilité des parasites, et l'absence de toute contamination. Le repiquage se fait tous les 15 jours. Il est à noter que les souches sont transférées dans milieu RPMI 10 % SVF avant le test de sensibilité.

### **II.3. Infestation *in vivo***

#### **II.3.1 Préparation de l'inoculum**

Les parasites en phase exponentielle sont récoltés et lavés trois fois avec de l'eau physiologique par centrifugation à 2500 rpm pendant 10 minutes. L'inoculum parasitaire est ajusté à une concentration de 10<sup>6</sup> parasite /ml après un comptage avec la cellule de Thoma (annexe 4)

#### **II.3.2. Inoculation**

Une quantité de 10<sup>6</sup> parasites/ml est inoculée par voie intradermique au niveau du pavillon de l'oreille gauche de chaque souris infestée (Belkaid *et al.*, 1998).

### **II.3.3 Monitoring**

Un suivi hebdomadaire de l'infestation des lots des souris infectées ainsi que le lot témoin a été effectué pendant huit semaines après l'infestation. Le monitoring consiste à peser les animaux, et à la mesure des indurations (épaisseur de l'oreille), le diamètre des rougeurs et des lésions à l'aide d'un pied à coulisse électronique (annexe 5).

### **II.4. Test de sensibilité promastigotes *in vitro***

La suspension parasitaire ajustée à  $2 \times 10^6$  parasite/ml a été cultivée sur milieu RPMI + SVF 10% pendant 48 heures à 25°C, en présence de SbIII à des concentrations de 50, 25, 12,5 et 6,25 µg/ml sur une plaque de culture cellulaire de 96 puits. Chaque dilution a été réalisée en quadruplate. La révélation a été effectuée à l'aide du sel de tétrazolium MTT. Ce dernier met en évidence les parasites vivants après réduction en bleu de formazan détectable au spectrophotomètre sous l'action de la succinate tétrazolium réductase présente dans la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules métaboliquement active. Un volume de 10 µl de MTT à 10mg/ml, a été ajouté dans chaque puits. Après une incubation à 37°C pendant 4 heures, 100 µl d'Isopropanol 50%-SDS 50% sont ajoutés, Les plaques étaient incubées sous agitation pendant 30 min. Le mélange d'isopropanol-SDS confère aux protéines parasitaires une charge négative, qui permet une bonne lecture au spectrophotomètre à 550nm (Serenio *et al.*, 1998).

### **II.5. Analyse des résultats**

Les IC<sub>50</sub> sont calculées comme suite :

« Tendence (concentrations du traitement utilisé plus la concentration 0 µg/ml ; pourcentage de viabilité des parasites au présence du traitement ; 50 µg/ml) ». une courbe de tendance a été effectué (annexe 6). La lecture de ce teste par le spectrophotomètre n'est pas stable donc le coefficient de corrélation ne peu être trop élevé mais il fait noter qu'il doit être supérieur a « 0.50 ».

Afin de normaliser les résultats obtenus avec le test promastigote, l'index d'activité a été calculé, Il représente le rapport de l'IC<sub>50</sub> des souches / l'IC<sub>50</sub> de la souche référence

sensible. La souche est sensible si l'IA < 2, intermédiaire si l'IA est compris entre 2 et 3, et résistante si l'IA > 3 (Da Luz et al., 2009).

## **II.6. Test de sensibilité amastigotes *in vitro***

L'étude de la sensibilité des souches au Glucantime® fait appel à une technique de culture cellulaire basée sur la propriété d'adhérence des cellules Thp1 au verre.

Le PMA (un mitogène) est ajouté en raison de 10 µl à 10 ml de la suspension cellulaire des Thp1 après son ajustement à 5.10<sup>5</sup> cellule/ml, 200 µl sont répartie par la suite dans chaque puits de chambre Lab-Tek (fig 14) L'incubation se fait à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. Après formation de tapis cellulaire le milieu est délicatement aspiré à l'aide d'une micropipette, suivi d'un lavage par RPMI pur. Les cellules sont ensuite mises en contact pendant 24 heures à 35°C avec 200 µl de solution parasitaire à 5x10<sup>6</sup> Par puits, le rapport est de 10 leishmanies/cellule Thp1.

Après 24 heures le milieu est récupère pour le dosage NO et Les cellules subissent trois lavages successives pour éliminer les promastigotes non phagocyte.

La sensibilité ou la résistance des souches au Glucantime® est étudié à partir d'une série de dilutions de ce médicament mise en contact avec la suspension parasitaire de chaque souche. Dans le 1<sup>er</sup> puits de chambre Lab-Tek on met 200 µl de RPMI à 10% SVF c'est le puits témoin, dans les autre puits on met 200 µl d'une dilution par puits d'une gamme de 3 concentrations de médicament 100, 50, 25 µg/ml. Après 48 heures d'incubation le milieu retrouvé dans les puits est récupère pour le dosage du NO et est remplacé par de nouvelles dilutions, le milieu du puits témoin est aussi renouvelé. Après 48 heures d'incubation en présence de traitement les lames sont fixées et colorées « GIEMSA » (annexe 7). Pour chaque concentration de Glucantime®, (Farault Gambarelli.1997), le nombre de leishmanies infestées dans cent cellules Thp1, est déterminée par comptage sous microscope photonique. L'indice de parasitisme (IP) est alors calculé comme suit :

$$IP = (\% \text{ de macrophages infecté} \times \text{nombre d'amastigotes/macrophage})$$

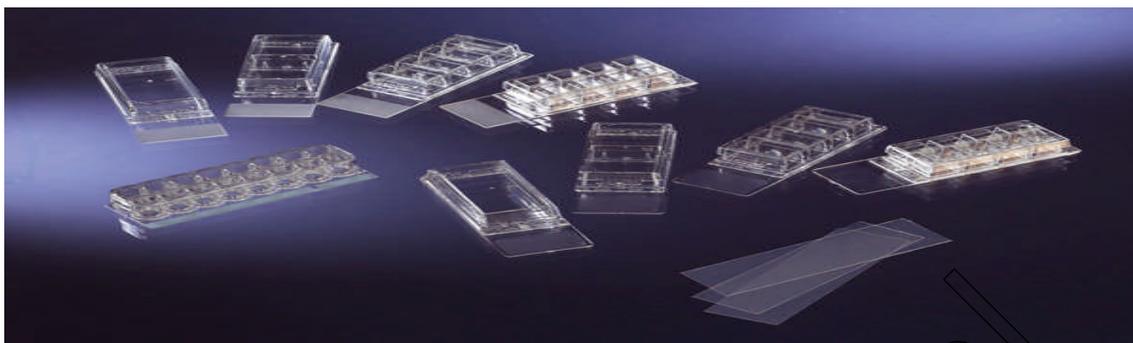


Figure 14: différents types de chambre Lab-Tek

## **II.7. le dosage NO**

### **I.7.1 Préparation du plasma**

Le plasma a été préparé à partir du sang prélevé par ponction intracardiaque, des souris anesthésiées. La défibrination mécanique a été effectuée par agitation du sang total après prélèvement, suivi d'une centrifugation à 1500 rpm pendant 10 min. Les protéines ont été ensuite précipitées par de l'Ethanol absolu (2 volumes d'Ethanol pour 1 volume de sang). Le plasma a été ensuite conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour le dosage de NO (Ghasemi et al., 2007)

### **I.7.2 La réaction de Griess**

Elle est adaptée de la technique de Granger de dosage des nitrites (Granger et al., 1996). Les nitrates ont été dosés en tant que nitrite après incubation de 90 min à  $37^{\circ}\text{C}$  de 2 volumes de l'échantillon avec un volume de tampon NA HEPES à 0.2 M, et 1 volume de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (cette bactérie possède une enzyme qui transforme les nitrates en nitrite), dilué au  $1/20^{\text{ème}}$  dans du Yeast Mannitol Agar (YMA). Un volume du surnageant, obtenu après centrifugation à 13000 rpm pendant 3 min, a été mélangé à 2 volume de réactif de Griess, puis incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min (annexe 8) . la lecture de Densité Optique (DO) a été faite sur un lecteur microplaque à 540 nm. La concentration du NO dans les échantillons a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de sodium nitrite de 0 à  $150\ \mu\text{M}$  (annexe 9).

## I. Résultat

### I.1. Résultats de la sensibilité *in vitro*

#### I.1.1 Résultats de la sensibilité *in vitro* des promastigotes à l'antimoine trivalent $Sb^{III}$ et des amastigotes à l'antimoine pentavalent $Sb^V$ .

Les résultats du test de sensibilité des promastigotes et des amastigotes de *L. major* à l'antimoine trivalent et pentavalent, sont consignés dans le tableau (IV)

Pour la forme promastigote nous avons calculé l'index d'activité (IA), Il représente le rapport de l'IC<sub>50</sub> des souches / l'IC<sub>50</sub> de la souche référence sensible. La souche est sensible si l'IA < 2, intermédiaire si l'IA est compris entre 2 et 3, et résistante si l'IA > 3 (Da Luz et al., 2009). Pour la forme amastigote La valeur seuil de  $Sb^V$  est de **45µg/ml**, si l'IC<sub>50</sub> de  $Sb^V$  est inférieure à **45µg/ml** la souche est dite sensible, si l'IC<sub>50</sub> de  $Sb^V$  est supérieure de **45µg/ml** la souche est dite résistante.

Tableau IV : Résultats obtenus par le test de sensibilité des promastigotes à l'antimoine trivalent ( $Sb^{III}$ ) et des amastigotes à l'antimoine pentavalent ( $Sb^V$ ). Le seuil de sensibilité est de **45µg/ml** de sel d'antimoine pour la forme amastigote.

souches/forme	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		Phénotype		IA
	amastigote	Promastigote	amastigote	promastigote	promastigote
LIPA 175	85	31,89	R	R	3
LIPA 100	31	10,76	S	S	1
LIPA 443A	89	30,8	R	I	2.85
LIPA 339A	28	26,5	S	I	2.46
LIPA 445A	65	41,4	R	I	2.3
LIPA 443B	22	32,0	S	I	2.96
LIPA 339B	29	18,2	S	S	1.68
LIPA 445B	59	18,1	R	S	1.68

La souches témoins : LIPA 175 souche résistante, LIPA 100 souche sensible.

S : Sensible / R : Résistante / I : Intermédiaire

Du tableau IV il en ressort que les deux tests de sensibilité à l'antimoine trivalent ( $Sb^{III}$ ) ou pentavalent ( $Sb^V$ ) ont révélé que l' $IC_{50}$  de ( $Sb^V$ ) obtenue pour la forme amastigote et plus élevée pour la majorité des souches par rapport aux  $IC_{50}$  de ( $Sb^{III}$ ) obtenus pour la forme promastigote avec des valeurs respectives de (10,7 - 41,4  $\mu$ g/ml) pour les premières et de (22- 89  $\mu$ g/ml) pour les secondes.

Les résultats des tests de sensibilité ont montré que parmi les trois souches isolées de patients **avant le traitement** deux se sont révélées résistantes au  $Sb^V$ , il s'agit de : LIPA 443A et LIPA 445A, et une était sensible au traitement LIPA 339A. Le test réalisé sur les souches isolées des mêmes patients **après traitement** a montré qu'une seule souche (LIPA 445B) est restée résistante, néanmoins son  $IC_{50}$  a chuté de 65  $\mu$ g/ml à 59  $\mu$ g/ml. Par contre la majorité des isolats, sous leur forme promastigotes, se sont révélés intermédiaires su( $Sb^{III}$ ). Ceci démontre l'importance et le rôle de la forme parasitaire utilisée comme support du test pour la résistance, il est également vrai pour la forme des molécules testées.

## **I.2. Résultats de la cinétique de l'infestation in vivo chez la souris Balb/c**

### **Analyse statistique**

Les données ont été analysées par une ANOVA à un facteur, l'ANOVA suppose que la variable numérique suit une loi normale dont la moyenne dépend éventuellement de la valeur des facteurs après avoir posé l'hypothèse nulle ou  $H_0$  - est une hypothèse qui postule qu'il n'y a pas de différence entre les moyennes des trois groupes. Les résultats ont été obtenus après avoir fait les calculs nécessaires sur le tableau suivant :

La table d'ANOVA

Source de la variance	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F	p-value
-----------------------	------------------------------	-------------------	----------	---	---------

Inter-classes	$SCE_{facteur}$	$DDL_{facteur}$	$S^2_{facteur} = \frac{SCE_{facteur}}{DDL_{facteur}}$	$F = \frac{S^2_{facteur}}{S^2_{residu}}$	$P_{H_0}(F > F_{ob.})$
Intra-classe	$SCE_{residu}$	$DDL_{residu}$	$S^2_{residu} = \frac{SCE_{residu}}{DDL_{residu}}$		
Total	$SCE_{total}$	$DDL_{total}$			

Toutes les analyses ont été faites sur Excel 2010.

### **I.2.1. Phénotype externe**

A fin de suivre l'apparition des signes cliniques de l'infestation chez la souris par des souches *L major* isolées avant et après traitement, et leur évolution dans le temps, les paramètres suivants ont été sélectionnés : épaisseur de l'induration du pavillon de l'oreille, le diamètre des rougeurs (inflammation) et enfin la taille des lésions.

#### **Les indurations**

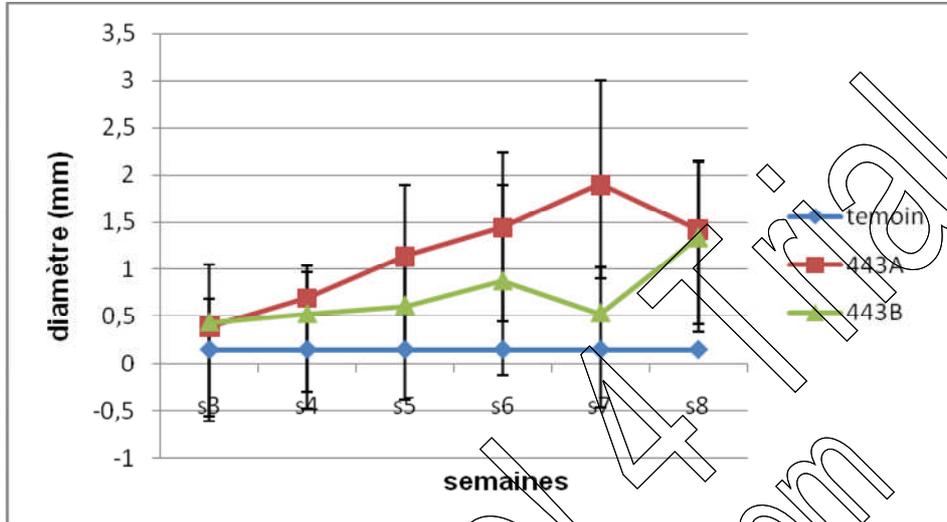
Un des signes précoces d'infestation par les parasites *L. major* inoculés dans le pavillon de l'oreille des souris BALB/c est représenté par l'induration (Fig.15)

L'analyse par ANOVA de différents lots de souris infectées montre qu'il existe une différence statistique entre les indurations de ces lots.



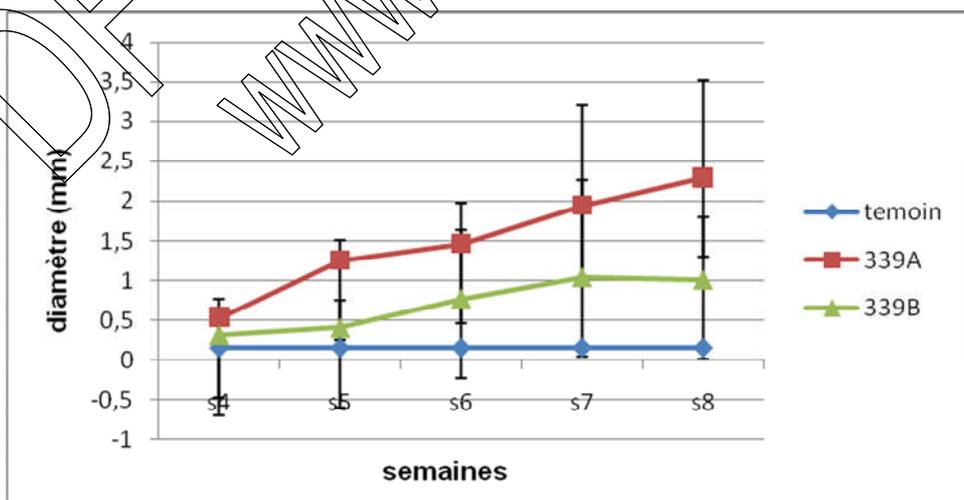
**Figure 15** : induration apparue sur l'oreille des souris BALB/c infectées

On remarque que les indurations apparaissent dès la 3<sup>ème</sup> semaine pour les souches LIPA 443 (A/B) et la souche 445B et à la 4<sup>ème</sup> semaine pour les souches LIPA 445A et 339 (A/B).



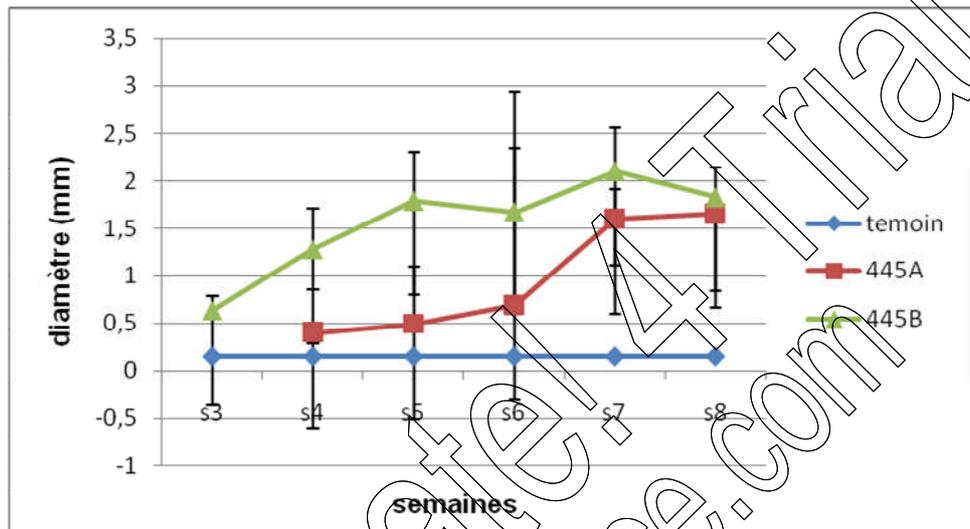
**Figure 16:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 443A et LIPA 443B, en fonction du temps.

Une différence significative de l'induration, entre 0,5 mm et 2mm, a été observée durant toute la période d'observation (fig 16). Cette différence montre que la souche avant traitement (443A) possède un phénotype de prolifération tissulaire plus important que celui de la même souche après traitement par le Glucantime (443B).



**Figure 17:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 339A/339B, en fonction du temps.

Les indurations observées sont plus importantes pour la souche LIPA 339A (0.5 et 2.3 mm) que celles de la souche LIPA 339B (0.3 et 1 mm) Cette différence montre que la souche LIPA 339A possède un phénotype plus virulent que celui de la souche LIPA 339B (fig.17).



**Figure 18:** l'évolution des indurations induites par les souches LIPA 445A/445B, en fonction du temps.

On remarque l'apparition des indurations dès la 3ème semaine pour la souche LIPA 445B. En revanche, les indurations induites par la souche LIPA 445A ne sont apparues que vers la 4ème semaine et étaient moins importantes (fig18).

### **Les rougeurs**

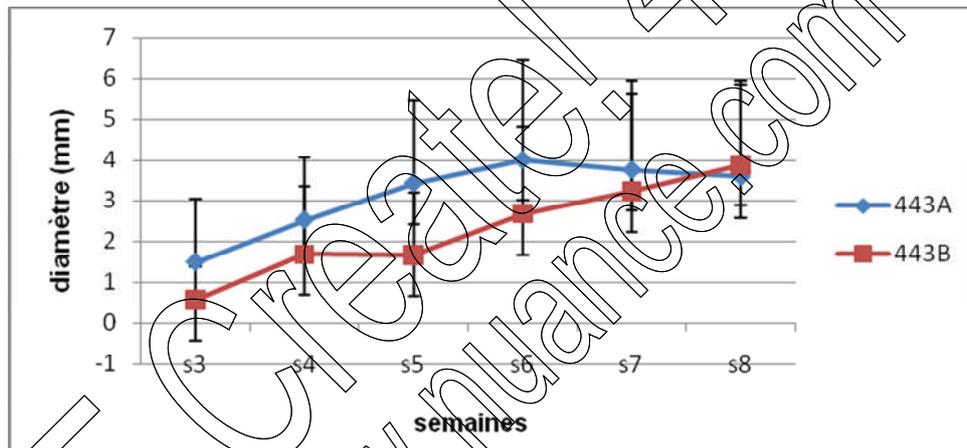
L'apparition de l'inflammation est exprimée aussi sous forme de rougeur au niveau du site d'inoculation (Fig.19).

L'analyse par ANOVA de différents lots de souris infectées montre qu'il existe une différence très significative entre les indurations de ces lots.



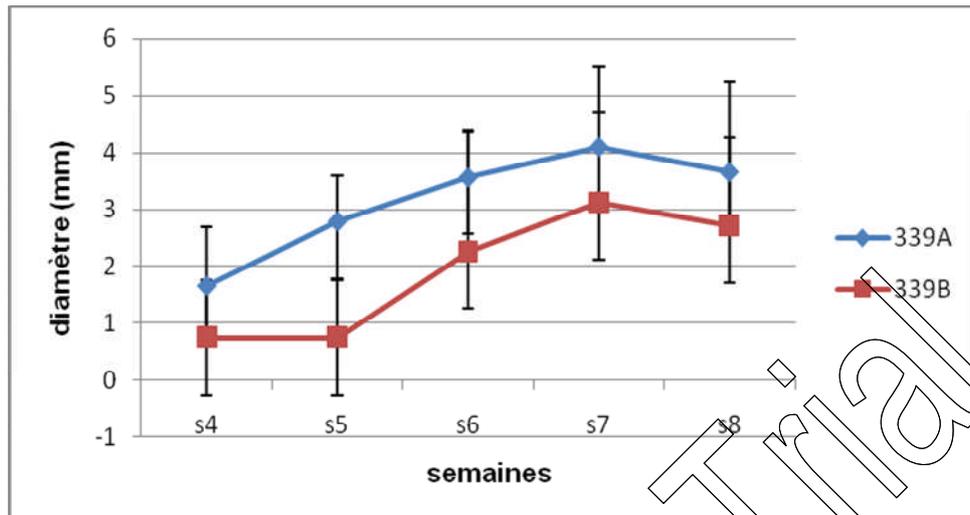
**Figure 19 :** l'inflammation apparue sur l'oreille d'une souris infectée

L'inflammation s'est manifestée au niveau du site d'inoculation dès la 3<sup>ème</sup> semaine pour les souches LIPA 443(A/B) et LIPA 445B et à la 4<sup>ème</sup> semaine pour la LIPA 445A LIPA 339 (A/B) (fig.20, 21, 22).



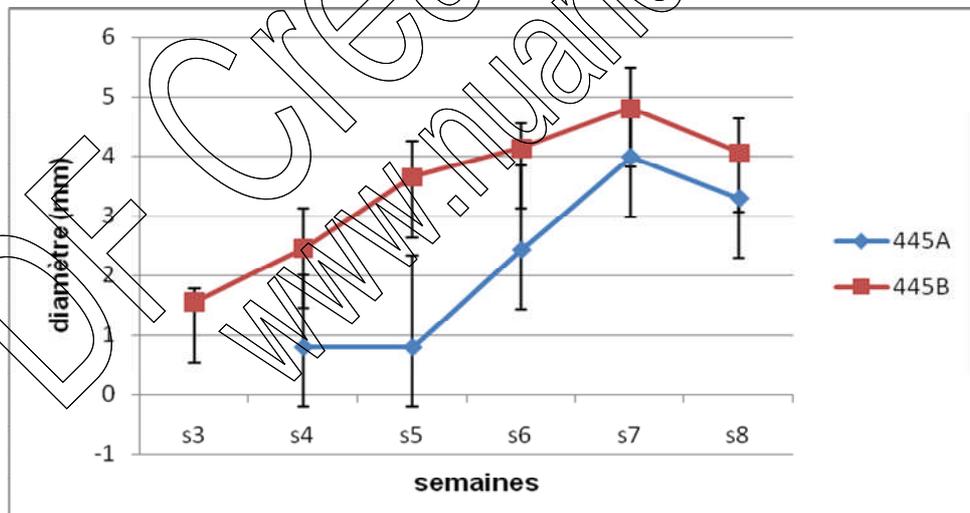
**Figure 20:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 443A/443B, en fonction du temps

Les lésions sont apparues à la même semaine pour les souches LIPA 443A et 443B mais elle est plus importante pour la souche LIPA 443A (fig.20).



**Figure 21:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 339A/339B, en fonction du temps

Les rougeurs sont apparues tardivement pour les deux souches LIPA 339A/339B, mais elles ont été plus importantes chez les souris infestées par souche LIPA 339A (fig.21).



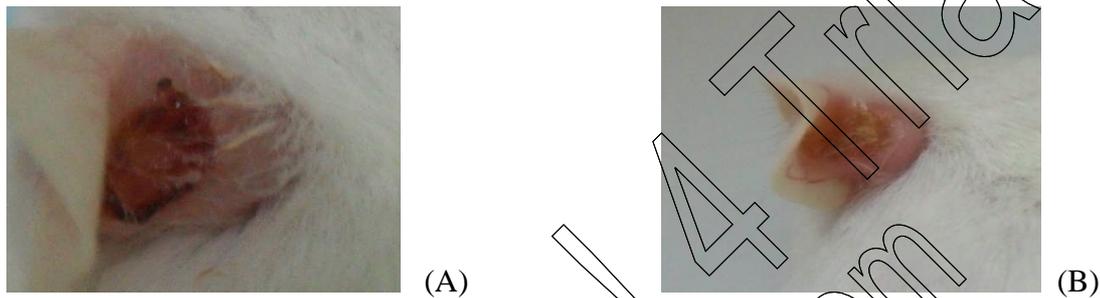
**Figure 22:** l'évolution des rougeurs induites par les souches LIPA 445A/445B, en fonction du temps

L'inflammation (rougeur) est précoce et beaucoup plus intense pour la souche LIPA 445 B qui présente un phénotype résistant après traitement que la souche LIPA 445A (fig.22).

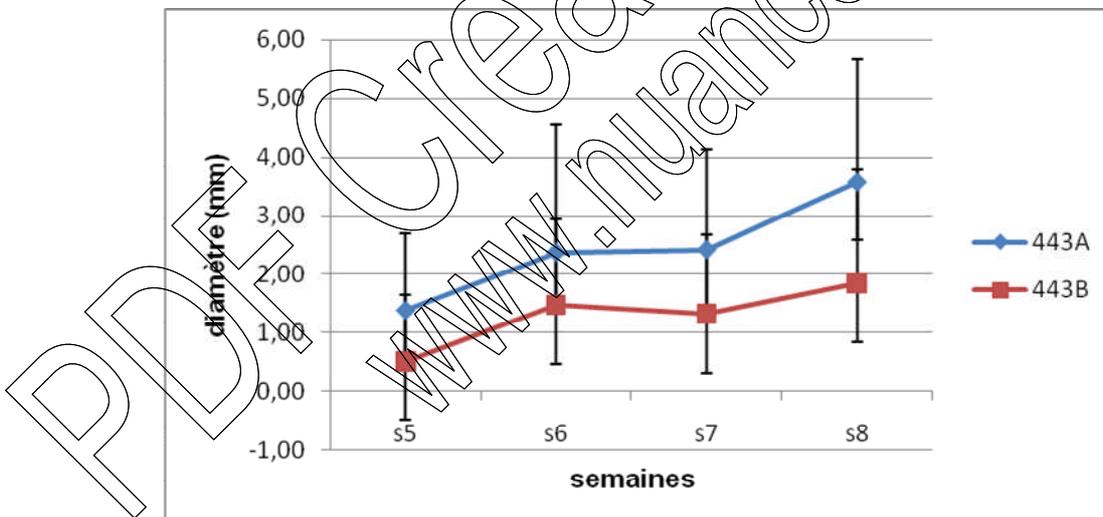
**Les lésions**

L'analyse par ANOVA de différents lots de souris infectées montre qu'il existe une différence très significative entre les lésions de ces lots.

Les lésions sont apparues à la 5eme semaine chez les souris infectées par les souches LIPA 443 (A/B) et 445B (fig.23/fig27) et plus tardivement à la 6eme semaine pour les souches LIPA 339 (A/B) et la 445A.

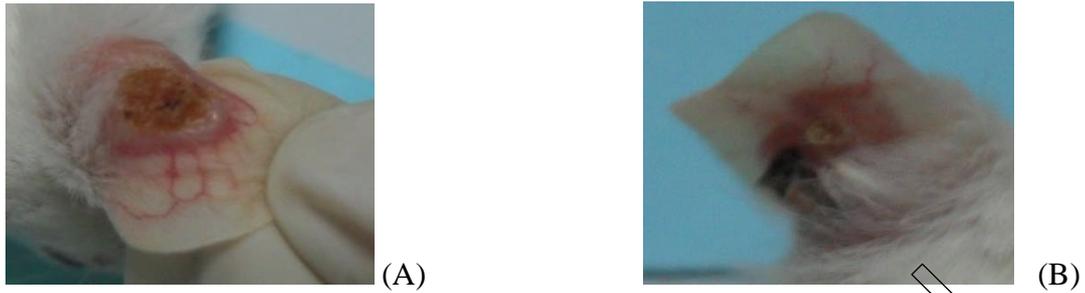


**Figure 23:** les lésions apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par la souche LIPA 443A(A) et LIPA 443B (B) à s8.

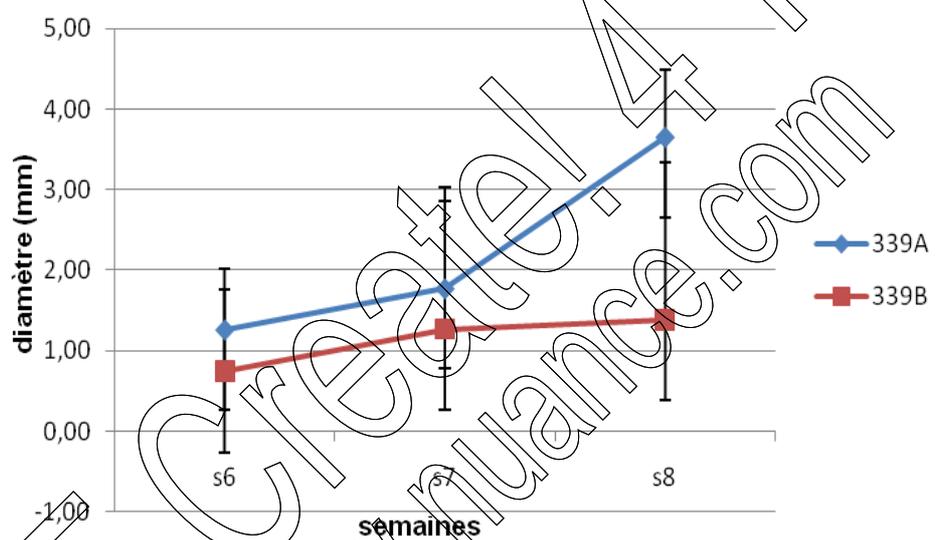


**Figure 24:** l'évolution des lésions induites par les souches LIPA 443A/443B, en fonction du temps

Ces lésions sont importantes pour les souches LIPA 443A avec un diamètre moyen de 1.33mm à S5 et qui augmente avec le temps jusqu'à 3.57mm à S8. Tandis que pour la souche LIPA 443B elle été moins importante mais elle a augmenté avec le temps (fig.24).



**Figure 25:** les lésions apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par les souches LIPA 339A (A) s8 /339B (B) s8.

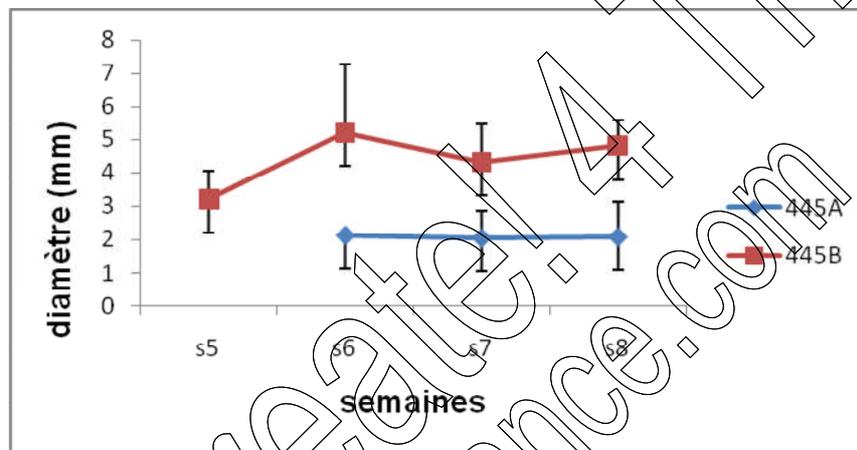


**Figure 26:** l'évolution des lésions induites par les souches LIPA 339A/339B, en fonction du temps

Les lésions sont importantes pour la souche LIPA 339A avec un diamètre moyen de 1,27mm à s6 et qui augmente avec le temps jusqu'à 3,65mm à s8. Tandis que pour la souche LIPA 339B elle a été moins importante mais elle a augmenté avec le temps (fig.26).



**Figure 27:** lésion (perforation) apparue sur l'oreille des souris BALB/c infectées par la souche LIPA 445B s8.



**Figure 28:** l'évolution des lésions induites par les souches LIAP 445A/445B, en fonction du temps

La souche LIPA 445B (fig.27), a montré une lésion importante avec un diamètre moyenne de 3.84mm et qui progresse jusqu'à déformation et perforation de l'oreille infecté. Tandis que pour la souche LIPA 445A elles sont apparues tardivement à la 6eme semaine d'infestation avec un diamètre moins important (fig.28).

Après les observations faites sur nos résultats du phénotype externe (induration/ Rougeurs/lésions) nous avons constaté que les souches LIPA 443A et LIPA 339A et LIPA 445B sont plus virulente que les souches LIPA 443B et LIPA 339B et LIPA 445A.

### **I.2.2. Phénotype interne**

Poids des rates

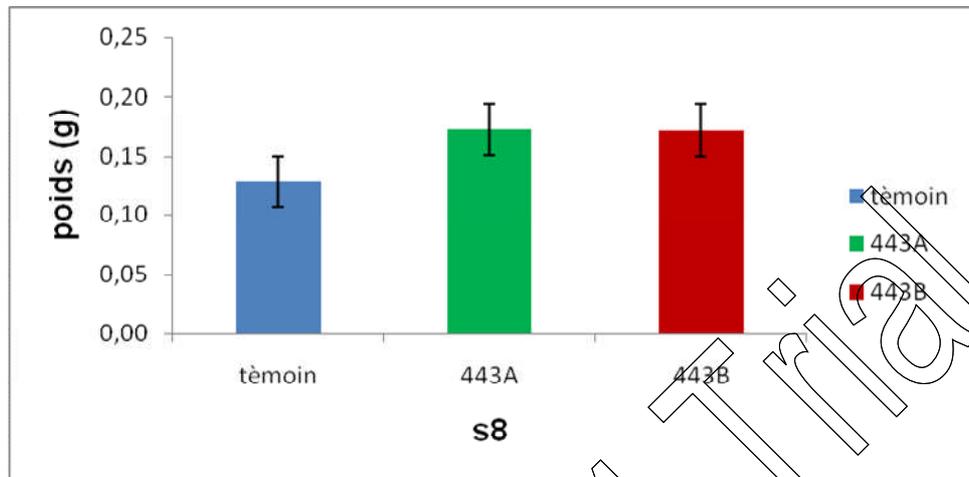


Figure 29: distribution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 443A/443B

Une comparaison entre le poids des rates des souris témoins et les rates des souris infectées par les souches LIPA 443A et 443B, a montré une splénomégalie. Cependant aucune différence significative n'a été notée entre le poids des rates des deux souches, il faut noter que les deux souches ont un profil de sensibilité différent au Glucantime® (Fig.29).

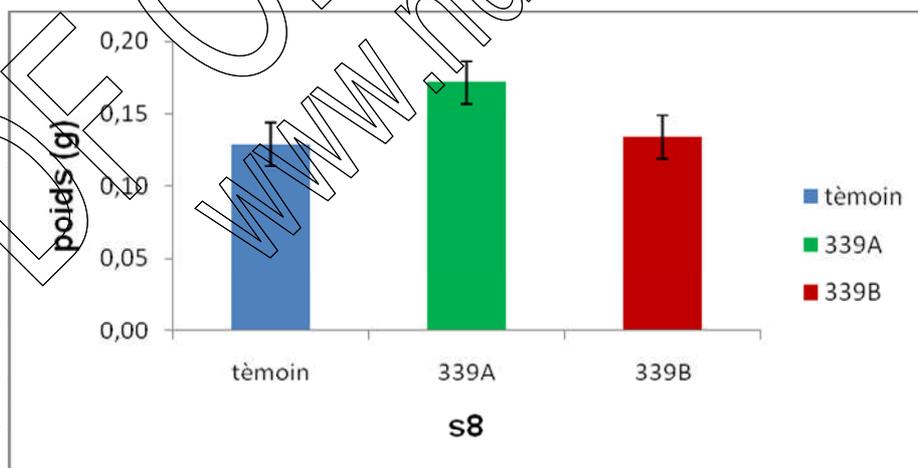
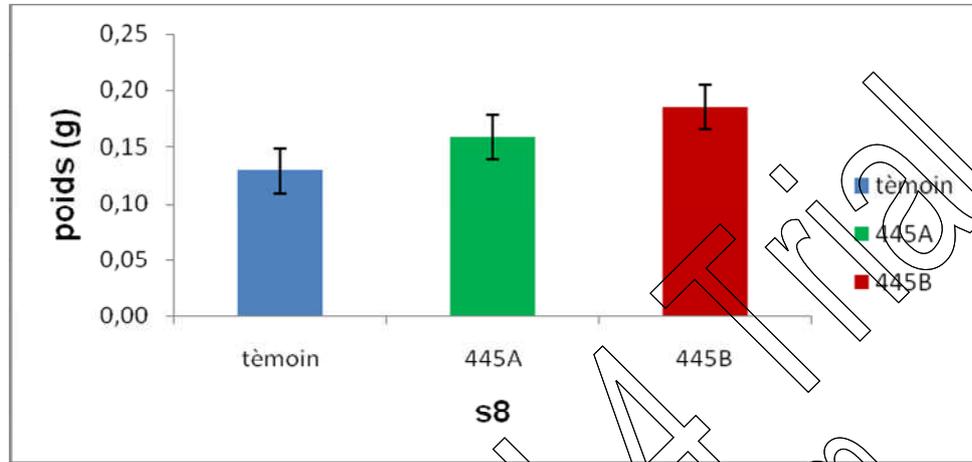


Figure 30 : distribution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 339A/339B

Une comparaison entre les rates des souris témoins et les rates des souris infectées par les souches LIPA 339A/LIPA 339B, a montré une splénomégalie pour les deux

souches. Une différence très significative entre le poids des rates des souris infectées avant et après traitement pour cette souche qui s'est révélée très sensible au glucantime (Fig.30).



**Figure 31:** distribution du poids des rates des souris infectées par les souches LIPA 445A/445B

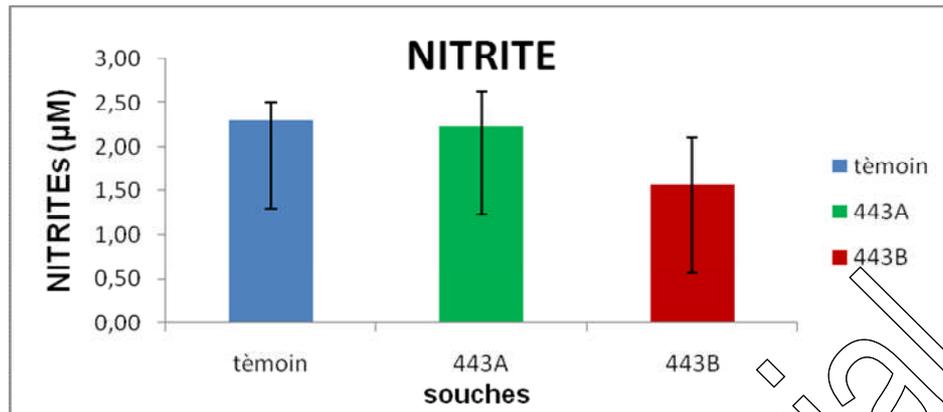
Une comparaison entre les rates des souris témoins et les rates des souris infectées par les souches LIPA 445A/LIPA 445B, a montré une splénomégalie pour les deux souches. La splénomégalie est plus élevée chez les souris infectées par la souche LIPA 445B qui est franchement résistante (Fig 31)

## Dosage de NO

### 1. Dosage de NO *in vivo*

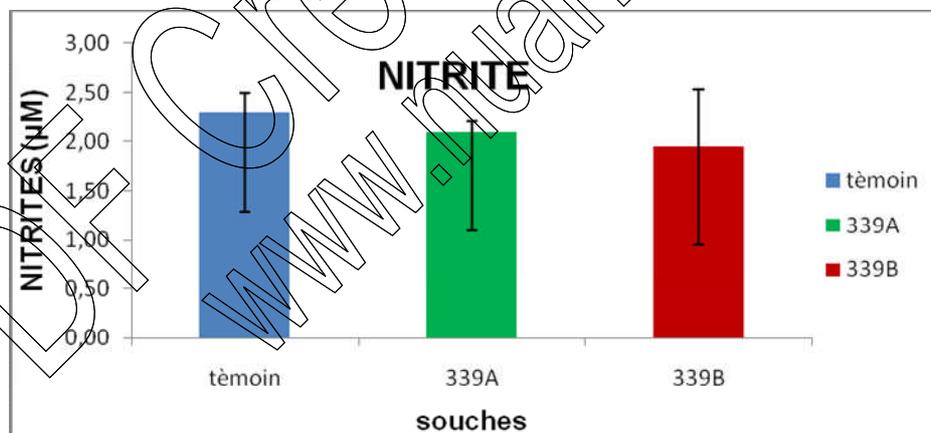
Afin de suivre la réponse de l'hôte à l'infestation par *leishmania major*, nous avons effectué le dosage du NO dans le plasma du sang prélevé huit semaines après l'infestation.

Pour toutes les souches la concentration du NO produit est moins importante que celle produit par les lots témoin.



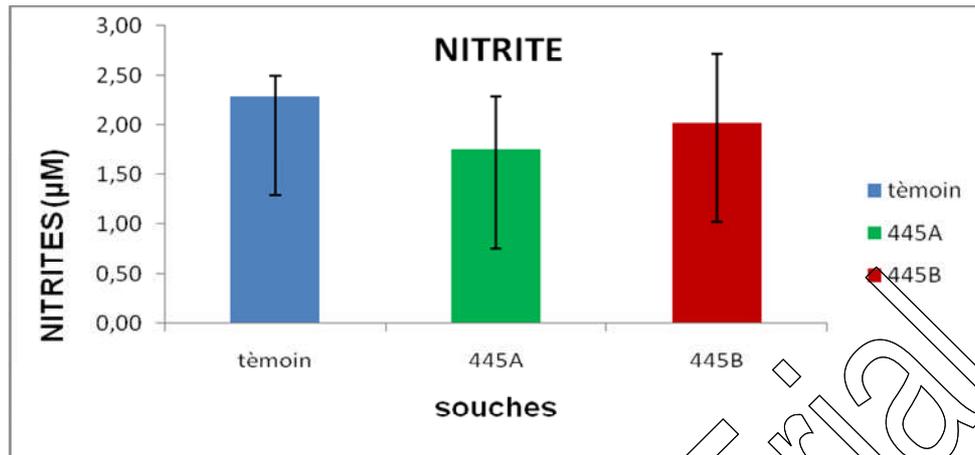
**Figure 32:** distribution de concentrations des Nitrite *in vivo* des souris infectées par les souches LIPA 443A (avant traitement) et LIPA 443B (après traitement).

La quantité du NO produite par souris infectées par la souche LIPA 443A est plus importante que celle produite par les souris infectées par la souche LIPA 443B (Fig.32).



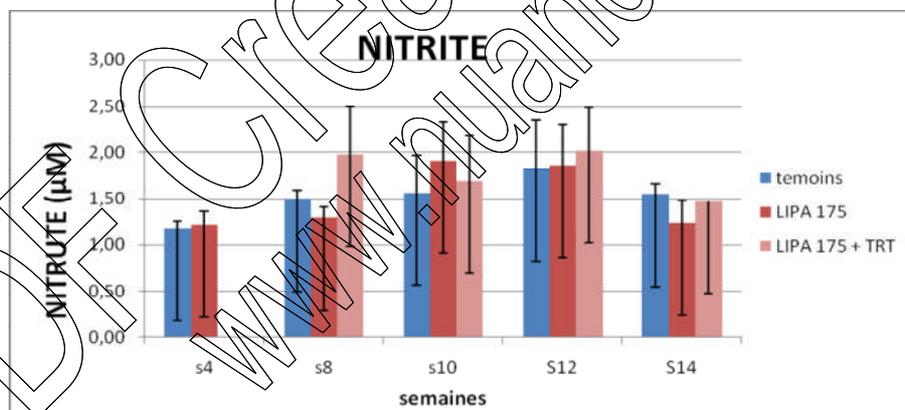
**Figure 33:** distribution de concentrations des Nitrite *in vivo* des souris infectées par les souches 339A (avant traitement) et LIPA 339B (après traitement).

La quantité du NO produite par les souris infectées par la souche LIPA 339A n'est pas très différente par rapport aux souris infectées par la souche LIPA 339B (Fig33). À rappeler que c'est une souche qui s'est révélée sensible au Glucantime (Tab 04).



**Figure 34:** distribution de concentrations des Nitrite *in vivo* des souris infectées par les souches 445A (avant traitement) et LIPA 445B (après traitement)

La quantité du NO produite par les souris témoin est plus supérieure à celle produite par les souris infectées par la souche LIPA 445A et 445 B (Fig.34). Il est à rappeler que cette souche LIPA 445 est résistante au Glucantime avant et après traitement (Tab IV).



**Figure 35:** Distribution de concentrations des Nitrite *in vivo* des souris infectées par la souche LIPA 175(traité et non traité)

On observe une variabilité physiologique de la production de NO par les souris témoins avec un pic à la 12<sup>ème</sup> semaine. Les souris infectées par la souche LIPA 175 produisent, à l'instar des souris témoins non infectées, une faible quantité de NO à s4 et s8 avec Une augmentation de la production de NO à la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine chez le même

lot de souris. Les souris ont été traitées de S4 à S8 à cette semaine (fin du traitement) une production très importante de NO est observée chez les souris traitées cette quantité été variable jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine mais elle été toujours importante, Tandis qu'une diminution est observée la 14<sup>ème</sup> semaine (Fig.35).

**2.Dosage de NO *in vitro***

**Tableau V** : distribution de concentrations du NO dosé *in vitro* pour huit souches

Souches	LIPA 175	LIPA 100	LIPA 443A	LIPA 339A	LIPA 445A	LIPA 443B	LIPA 339B	LIPA 445B
Nitrite( $\mu$ M)								
Macrophage	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Macrophage+parasite	1.37	1	1.19	1.01	1.48	0.94	-0.17	2.17
Macrophage+parasite + 50 $\mu$ g/ml Sb <sup>v</sup>	0.97	1.63	0.95	1.02	0.95	2.54	0.94	2.27

D'après le tableau IV on remarque que les macrophages produisent une quantité de 0.4  $\mu$ M du NO cette quantité augmente une fois en contact avec le parasite, cette quantité est importante pour les souches LIPA 443B/LIPA 339B/LIPA 445B/LIPA 100, il est à rappeler que seule la souche 445B est résistante au Sb<sup>v</sup>. En réponse au Sb<sup>v</sup> une augmentation remarquable de la quantité du NO est observée pour les souches sensible LIPA 100 (2.3  $\mu$ M) / LIPA443B (2.78  $\mu$ M) est observé, tandis quel diminue pour les deux souches résistantes LIPA 175 (0.91  $\mu$ M) /LIPA443A (1.02  $\mu$ M). La quantité du NO produite contre les souches isolées après traitement et plus importante que celle produite contre les souches isolées avant traitement.

## II. DISCUSSION

La quasi-totalité de leishmanioses cutanées algériennes sont dues à *leishmania major* (Harrat et al 1996). Chez l'homme, les manifestations cliniques de l'infection sont différentes selon l'espèce de *Leishmania* et selon le statut immunologique de l'hôte (Filippi et al., 2001). Le traitement des leishmanioses fait appel en première intention aux dérivés pentavalents dont le N-méthyl glucamine (Glucantime®) est le chef de file. Depuis plusieurs années des résistances cliniques sont décrites (Janvier et al., 2008).

### I- Etude de la sensibilité de *L. major* à l'antimoine *in vitro*

D'après nos résultats pour la forme amastigote, nous avons trouvé que sept souches sur huit avait une  $IC_{50}$  de  $Sb^V$  été plus importante que celle obtenue pour la forme promastigote par rapport au  $Sb^{III}$ , ces résultats confirment ceux trouvés par « Belkhodja et Zidane (2009) sur la sensibilité de la forme amastigote et ceux de Arab et al (2013) sur la sensibilité de la forme promastigote » obtenues pour d'autre souches de *leishmania*. Cette différence de sensibilité entre les différentes molécules d'antimoine  $Sb^{III}$  et  $Sb^V$  est due au fait que le  $Sb^V$  doit être réduit *in vivo* en  $Sb^{III}$  qui est la forme active sur les leishmanies. Cette différence est aussi retrouvée chez d'autres espèces de *leishmania* (Ashutosh et al., 2007). Les  $IC_{50}$  obtenues de  $Sb^V$  étaient plus élevées chez les souches isolées de malades non traité que celles obtenues pour les souches isolées après traitement (1<sup>ère</sup> cure), donc les souches ne développent une résistance qu'après plusieurs contacts avec le traitement. D'après Ouellette (2003) le parasite acquiert une résistance lorsqu'il est soumis de façon répétée au Glucantime®.

Une souche isolée de rongeur *P.obesus* a été trouvée résistante au Glucantime® par Belkhodja et Zidane Gharbi (2009), dans la leishmaniose cutanée, les rongeurs jouent un rôle important dans le cycle évolutif des parasites. *P.obesus* est le principal réservoir de *L.major* cela peut expliquer la présence des souches résistantes parmi nos souches isolées de malade avant traitement.

Donc en plus de la perte de sensibilité après plusieurs contacts avec le traitement, il existe des souches leishmanias qui possèdent une résistance naturelle au traitement.

### **I. Etude de la virulence de *L. major* in vivo**

Afin de suivre la virulence des souches *L. major* ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte *in vivo* nous avons utilisé les souris BALB/c qui sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection (Filippi et al., 2001).

Le derme de l'oreille de ces souris constitue le site d'inoculation le plus pratique car il nous permet de bien suivre les manifestations clinique qui se produisent au site d'inoculation et mieux les surveiller (Belkaid et al., 1998).

D'après nos résultats nous avons remarqué que toutes les souches inoculées aux souris BALB/c ont induit une inflammation au site d'inoculation suivie par des indurations et des ulcérations d'intensité différente avec destruction totale de pavillon de l'oreille pour certaines, et avec une splénomégalie pour tous les souris infestées. Ces données confirme que nos souches *L. major* induisent une forme progressive de la maladie avec des lésions remarquable, ces résultats concorde avec les résultats de Lira et al (1998).

La virulence des souches leishmanias infestées chez les souris BALB/c est repérée par l'intensité de l'inflammation au site d'inoculation (Induration/Rougeur/Lésion).

D'après nos observations sur l'intensité de phénotype externe (inflammation et ulcération), nous avons remarqué que les souches LIPA 443A/339A possèdent un profil virulent et qu'elles possèdent un profil de sensibilité différent au Sb<sup>V</sup>, donc nous avons constaté que la virulence d'une souche n'a pas un lien avec son statut résistant ou sensible aux antimonies. Il est probable que le traitement influence ce lien vu que le degré de virulence des souches a changé après traitement, la souche LIPA 445 a gardé sa résistance après le traitement avec une augmentation de la virulence contrairement à la souche LIPA 339 qui a gardée se sensibilité après traitement mais elle a diminué de virulence, tandis que la souche LIPA 443 qui a devenu plus sensible et moins virulente après traitement (tableau VII annexe 10). Ces observations doivent être confirmées par un nombre plus important de souches.

Une splénomégalie est enregistrée à S8 pour toutes les souris infestées. L'augmentation du volume de la rate est un signe de multiplication du parasite dans les cellules

spléniques, ceci indique un stade avancé de la maladie, ce qui est en concordance avec les travaux de Kurey *et al.* (2009) qui rapportent que les souris BALB/c infectées par *L major* montrent un nombre élevé de parasites dans les ganglions lymphatiques et la rate, corrélée à la chronicité des lésions cutanées, une splénomégalie, et une hépatomégalie.

Nous avons aussi remarqué que la splénomégalie a diminué chez les souches sensibles isolées après traitement comme pour la souche LIPA 339 (A/B), tandis qu'elle a augmenté pour la souche résistante LIPA 445(A/B). On peut suggérer que le traitement aurait un effet positif pour les souches sensibles et qui se traduirait par une diminution de la charge parasitaire.

### **III. Dosage de NO in vivo chez les BALB/c et in vitro chez des macrophages humain**

Dans les infections expérimentales, les souris résistantes, telles que la race C57BL/6, guérissent spontanément des lésions provoquées par *L major*. Cette résistance dépend du type Th1 de la réponse immunitaire et la production importante de l'IFN- $\gamma$  et l'induction de l'oxyde nitrique synthase 2 (iNOS) exprimée par les macrophages. A l'inverse les souris BALB/c, susceptibles infectées par *L. major* développent une réponse de type Th2 avec des lésions extensives et une infection disséminée. Dans les lésions on trouve une infiltration cellulaire polymorphe qui se compose de différents types de cellules telles que les neutrophiles, les éosinophiles, macrophages cellules dendritiques qui participent à la production ou à l'amplification d'un grand panel de médiateurs et de cytokines qui participent au processus dans l'immunité innée et adaptative à l'infection par les leishmanies.

Dans ce travail nous avons dosé le NO chez les souris témoins et infectées à la 8eme semaine d'infestation. D'après nos résultats il ressort que la quantité du NO produite par les souris infestées est inférieure à celle produite par les souris témoins. Selon Belkaid *et al.*, 1998 l'infestation des BALB/c par *L major* avec la salive du vecteur entraîne une augmentation dans la production d'IL-4 chez ces souris à la 8eme semaine après l'infestation. Cette augmentation est contemporaine à une diminution dans la production de l'IFN- $\gamma$ , Ce même auteur explique ce phénomène par la déviation de la réponse

adaptative vers la voie Th2. Cette voie limite la fonction Th1 et désactive le macrophage et par la même l'inhibition ou la diminution de la production de NO.

On a aussi remarqué que le taux du NO produit contre les souches virulentes (LIPA 443 A, LIPA 339 A, LIPA 445B et LIPA 175) et plus important que celui produit contre les souches moins virulentes. C'est probablement un signe révélateur d'une forte lutte contre l'invasion et la multiplication des souches virulentes.

Les résultats de dosage de NO chez des souris traitées montrent un effet relatif du traitement sur la production de cette molécule.

La variabilité physiologique de la production de NO par les souris témoins avec un pic à la 12<sup>ème</sup> semaine est due probablement à des infections courantes. Les souris infectées par la souche LIPA 175 produisent, à l'instar des souris témoins non infectées, une faible quantité de NO à s4 et s8, chez ces souris (BALB/c) cette faible production pourrait être une conséquence de la lutte contre le processus pro-inflammatoire au détriment de celui anti-inflammatoire. En effet une désactivation des macrophages par le TGF $\beta$  et une réponse réduite à IFN $\gamma$  ont lieu (Ghassem et al., 2006), Au cours de l'infection par les leishmanias les lymphocytes des BALB/c perdent leur capacité à répondre à IL-12 (une cytokine qui favorise la production de IFN $\gamma$ ) sous l'influence de deux facteurs le TGF $\beta$  qui est reconnu par son rôle déterminant dans l'inhibition de l'activité leishmanicide *in vivo*, et l'IL-4 qui est produit par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifique d'un AG présent chez les leishmanias le « LACK » et qui jouent un rôle important dans la sensibilité des souris aux parasites (Filippi et al., 2001). L'augmentation de la production de ces deux facteurs permet l'évolution de la maladie (Ghassem et al., 2006) par l'activation d'une réponse anti-inflammatoire qui n'est pas en faveur d'une production de NO. Une augmentation de la production de NO est observée à la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine chez le même lot de souris cela est probablement due à une diminution de l'effet anti-inflammatoire et l'activation d'une voie pro-inflammatoire avec une élimination de parasite. Cette voie est probablement absente à la 14<sup>ème</sup> semaine d'infestation vue la chute de la quantité de NO produite et cela peut être expliqué par un phénomène de réémergence et prolifération nouvelle du parasite.

A la fin du traitement (s8) une production très importante de NO est observée chez les souris traitées cette quantité été variable jusqu'à la 2<sup>ème</sup> semaine mais elle été toujours importante, cela indique que le traitement avais un effet sur la production de cette molécule soit indirectement par la destruction des leishmanias soit directement en agissant sur la voie productrice de NO. Tandis qu'une diminution est observée la 14<sup>ème</sup> semaine (6 semaines après le traitement) cela peut être expliqué par une durée insuffisante de traitement ou l'utilisation de monothérapie et qui nécessite une 2<sup>ème</sup> cure. Ce phénomène a été observé par Gramiccia et al qui ont remarqué que la sensibilité des leishmania au Glucantime diminue sensiblement après plusieurs cures de traitement de chiens atteints de leishmaniose (Gramiccia et al., 1992).

Chez l'homme et au cours d'une LC expérimentale, le développement d'une immunité protectrice dépend de la capacité d'activation des macrophages infectés à exprimer l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), et la formation de NO afin d'éliminer le parasite (Hollzumuller et al 2005). D'après les résultats obtenus sur la concentration du de NO produite par les cellules humaines *in vitro* la quantité de NO produite contre les souches isolées après traitement (LIPA 443B/LIPA 339B/ LIPA 445B) est plus importante que celle produite contre les souches isolées avant traitement (LIPA 443A/LIPA 339A/ LIPA 445A). Cela indique que l'antimoine pentavalent  $Sb^V$  avait auparavant chez le patient un effet positif sur production de NO. Par ailleurs, la quantité du NO produite en présence du  $Sb^V$  dans le milieu de culture est variable et semble dépendre du phénotype sensible ou résistant de la souche.

## II. DISCUSSION

La quasi-totalité de leishmanioses cutanées algériennes sont dues à *leishmania major* (Harrat et al 1996). Chez l'homme, les manifestations cliniques de l'infection sont différentes selon l'espèce de *Leishmania* et selon le statut immunologique de l'hôte (Filippi et al., 2001). Le traitement des leishmanioses fait appel en première intention aux dérivés pentavalents dont le N-méthyl glucamine (Glucantime®) est le chef de file. Depuis plusieurs années des résistances cliniques sont décrites (Janvier et al., 2008).

### I- Etude de la sensibilité de *L. major* à l'antimoine *in vitro*

D'après nos résultats pour la forme amastigote, nous avons trouvé que sept souches sur huit avait une  $IC_{50}$  de  $Sb^V$  été plus importante que celle obtenue pour la forme promastigote par rapport au  $Sb^{III}$ , ces résultats confirment ceux trouvés par « Belkhodja et Zidane (2009) sur la sensibilité de la forme amastigote et ceux de Arab et al (2013) sur la sensibilité de la forme promastigote » obtenues pour d'autres souches de *leishmania*. Cette différence de sensibilité entre les différentes molécules d'antimoine  $Sb^{III}$  et  $Sb^V$  est due au fait que le  $Sb^V$  doit être réduit *in vivo* en  $Sb^{III}$  qui est la forme active sur les leishmanies. Cette différence est aussi retrouvée chez d'autres espèces de *leishmania* (Ashutosh et al., 2007). Les  $IC_{50}$  obtenues de  $Sb^V$  étaient plus élevées chez les souches isolées de malades non traités que celles obtenues pour les souches isolées après traitement (1<sup>ère</sup> cure), donc les souches ne développent une résistance qu'après plusieurs contacts avec le traitement. D'après Ouellette (2003) le parasite acquiert une résistance lorsqu'il est soumis de façon répétée au Glucantime®.

Une souche isolée de rongeur *P.obesus* a été trouvée résistante au Glucantime® par Belkhodja et Zidane Gharbi (2009), dans la leishmaniose cutanée, les rongeurs jouent un rôle important dans le cycle évolutif des parasites. *P.obesus* est le principal réservoir de *L.major* cela peut expliquer la présence des souches résistantes parmi nos souches isolées de malade avant traitement.

Donc en plus de la perte de sensibilité après plusieurs contacts avec le traitement, il existe des souches leishmanias qui possèdent une résistance naturelle au traitement.

### **I. Etude de la virulence de *L. major* in vivo**

Afin de suivre la virulence des souches *L. major* ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte *in vivo* nous avons utilisé les souris BALB/c qui sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection (Filippi et al., 2001).

Le derme de l'oreille de ces souris constitue le site d'inoculation le plus pratique car il nous permet de bien suivre les manifestations clinique qui se produisent au site d'inoculation et mieux les surveiller (Belkaid et al., 1998).

D'après nos résultats nous avons remarqué que toutes les souches inoculées aux souris BALB/c ont induit une inflammation au site d'inoculation suivie par des indurations et des ulcérations d'intensité différente avec destruction totale de pavillon de l'oreille pour certaines, et avec une splénomégalie pour tous les souris infestées. Ces données confirme que nos souches *L. major* induisent une forme progressive de la maladie avec des lésions remarquable, ces résultats concorde avec les résultats de Lira et al (1998).

La virulence des souches leishmanias infestées chez les souris BALB/c est repérée par l'intensité de l'inflammation au site d'inoculation (Induration/Rougeur/Lésion).

D'après nos observations sur l'intensité de phénotype externe (inflammation et ulcération), nous avons remarqué que les souches LIPA 443A/339A possèdent un profil virulent et qu'elles possèdent un profil de sensibilité différent au Sb<sup>V</sup>, donc nous avons constaté que la virulence d'une souche n'a pas un lien avec son statut résistant ou sensible aux antimonies. Il est probable que le traitement influence ce lien vu que le degré de virulence des souches a changé après traitement, la souche LIPA 445 a gardé sa résistance après le traitement avec une augmentation de la virulence contrairement à la souche LIPA 339 qui a gardée se sensibilité après traitement mais elle a diminué de virulence, tandis que la souche LIPA 443 qui a devenu plus sensible et moins virulente après traitement (tableau VII annexe 10). Ces observations doivent être confirmées par un nombre plus important de souches.

Une splénomégalie est enregistrée à S8 pour toutes les souris infestées. L'augmentation du volume de la rate est un signe de multiplication du parasite dans les cellules

spléniques, ceci indique un stade avancé de la maladie, ce qui est en concordance avec les travaux de Kurey *et al.* (2009) qui rapportent que les souris BALB/c infectées par *L major* montrent un nombre élevé de parasites dans les ganglions lymphatiques et la rate, corrélée à la chronicité des lésions cutanées, une splénomégalie, et une hépatomégalie.

Nous avons aussi remarqué que la splénomégalie a diminué chez les souches sensibles isolées après traitement comme pour la souche LIPA 339 (A/B), tandis qu'elle a augmenté pour la souche résistante LIPA 445(A/B). On peut suggérer que le traitement aurait un effet positif pour les souches sensibles et qui se traduirait par une diminution de la charge parasitaire.

### **III. Dosage de NO in vivo chez les BALB/c et in vitro chez des macrophages humain**

Dans les infections expérimentales, les souris résistantes, telles que la race C57BL/6, guérissent spontanément des lésions provoquées par *L major*. Cette résistance dépend du type Th1 de la réponse immunitaire et la production importante de l'IFN- $\gamma$  et l'induction de l'oxyde nitrique synthase 2 (iNOS) exprimée par les macrophages. A l'inverse les souris BALB/c, susceptibles infectées par *L. major* développent une réponse de type Th2 avec des lésions extensives et une infection disséminée. Dans les lésions on trouve une infiltration cellulaire polymorphe qui se compose de différents types de cellules telles que les neutrophiles, les éosinophiles, macrophages cellules dendritiques qui participent à la production ou à l'amplification d'un grand panel de médiateurs et de cytokines qui participent au processus dans l'immunité innée et adaptative à l'infection par les leishmanies.

Dans ce travail nous avons dosé le NO chez les souris témoins et infectées à la 8eme semaine d'infestation. D'après nos résultats il ressort que la quantité du NO produite par les souris infestées est inférieure à celle produite par les souris témoins. Selon Belkaid *et al.*, 1998 l'infestation des BALB/c par *L major* avec la salive du vecteur entraîne une augmentation dans la production d'IL-4 chez ces souris à la 8eme semaine après l'infestation. Cette augmentation est contemporaine à une diminution dans la production de l'IFN- $\gamma$ , Ce même auteur explique ce phénomène par la déviation de la réponse

adaptative vers la voie Th2. Cette voie limite la fonction Th1 et désactive le macrophage et par la même l'inhibition ou la diminution de la production de NO.

On a aussi remarqué que le taux du NO produit contre les souches virulentes (LIPA 443 A, LIPA 339 A, LIPA 445B et LIPA 175) et plus important que celui produit contre les souches moins virulentes. C'est probablement un signe révélateur d'une forte lutte contre l'invasion et la multiplication des souches virulentes.

Les résultats de dosage de NO chez des souris traitées montrent un effet relatif du traitement sur la production de cette molécule.

La variabilité physiologique de la production de NO par les souris témoins avec un pic à la 12<sup>ème</sup> semaine est due probablement à des infections courantes. Les souris infectées par la souche LIPA 175 produisent, à l'instar des souris témoins non infectées, une faible quantité de NO à s4 et s8, chez ces souris (BALB/c) cette faible production pourrait être une conséquence de la lutte contre le processus pro-inflammatoire au détriment de celui anti-inflammatoire. En effet une désactivation des macrophages par le TGF $\beta$  et une réponse réduite à IFN $\gamma$  ont lieu (Ghassem et al., 2006), Au cours de l'infection par les leishmanias les lymphocytes des BALB/c perdent leur capacité à répondre à IL-12 (une cytokine qui favorise la production de IFN $\gamma$ ) sous l'influence de deux facteurs le TGF $\beta$  qui est reconnu par son rôle déterminant dans l'inhibition de l'activité leishmanicide *in vivo*, et l'IL-4 qui est produit par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifique d'un AG présent chez les leishmanias le « LACK » et qui jouent un rôle important dans la sensibilité des souris aux parasites (Filippi et al., 2001). L'augmentation de la production de ces deux facteurs permet l'évolution de la maladie (Ghassem et al., 2006) par l'activation d'une réponse anti-inflammatoire qui n'est pas en faveur d'une production de NO. Une augmentation de la production de NO est observée à la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> semaine chez le même lot de souris cela est probablement due à une diminution de l'effet anti-inflammatoire et l'activation d'une voie pro-inflammatoire avec une élimination de parasite. Cette voie est probablement absente à la 14<sup>ème</sup> semaine d'infestation vue la chute de la quantité de NO produite et cela peut être expliqué par un phénomène de réémergence et prolifération nouvelle du parasite.

A la fin du traitement (s8) une production très importante de NO est observée chez les souris traitées cette quantité été variable jusqu'à la 2<sup>ème</sup> semaine mais elle été toujours importante, cela indique que le traitement avais un effet sur la production de cette molécule soit indirectement par la destruction des leishmanias soit directement en agissant sur la voie productrice de NO. Tandis qu'une diminution est observée la 14<sup>ème</sup> semaine (6 semaines après le traitement) cela peut être expliqué par une durée insuffisante de traitement ou l'utilisation de monothérapie et qui nécessite une 2<sup>ème</sup> cure. Ce phénomène a été observé par Gramiccia et al qui ont remarqué que la sensibilité des leishmania au Glucantime diminue sensiblement après plusieurs cures de traitement de chiens atteints de leishmaniose (Gramiccia et al., 1992).

Chez l'homme et au cours d'une LC expérimentale, le développement d'une immunité protectrice dépend de la capacité d'activation des macrophages infectés à exprimer l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), et la formation de NO afin d'éliminer le parasite (Hollzumuller et al 2005). D'après les résultats obtenus sur la concentration du de NO produite par les cellules humaines *in vitro* la quantité de NO produite contre les souches isolées après traitement (LIPA 443B/LIPA 339B/ LIPA 445B) est plus importante que celle produite contre les souches isolées avant traitement (LIPA 443A/LIPA 339A/ LIPA 445A). Cela indique que l'antimoine pentavalent  $Sb^V$  avait auparavant chez le patient un effet positif sur production de NO. Par ailleurs, la quantité du NO produite en présence du  $Sb^V$  dans le milieu de culture est variable et semble dépendre du phénotype sensible ou résistant de la souche.

Les dérivés organiques de l'antimoine sont les médicaments de première intention pour le traitement de la leishmaniose dans notre pays, cette thérapie est compliquée par les rechutes qui sont associées à une diminution progressive de la sensibilité des parasites voir à des résistances franches pouvant assombrir le pronostic de la leishmaniose cutanée.

Notre travail consistait justement à étudier l'expression du NO et le rôle de la sensibilité au traitement et la virulence de *L. major* dans la modulation de cette expression ainsi que de voir si cette virulence concorderait avec le phénotype résistant ou sensible de la souche.

Pour arriver à ce but, nous avons d'abord étudié la sensibilité des souches *L. major* isolées chez des patients vis-à-vis des dérivés de l'antimoine trivalent ( $Sb^{III}$ ) et pentavalent ( $Sb^V$ ), nous avons remarqué que la résistance à l'antimoine ( $Sb^V$ ) est plus importante que celle du ( $Sb^{III}$ ) et que le seuil de sensibilité est plus élevé. Cependant, la comparaison des IC50 de ( $Sb^V$ ) obtenus des formes amastigotes à celles des IC50 ( $Sb^{III}$ ) obtenus des formes promastigote indique que la forme trivalente ( $Sb^{III}$ ) est la forme la plus active et la plus toxique contre les leishmanies. D'après le teste de sensibilité à l'antimoine de trois souches provenant des mêmes patients avant et après traitement par le Glucantime, Nous avons remarqué que certains isolats sont résistants avant le contact même avec la molécule.

Dans un second temps, nous avons étudié la cinétique d'infestation de *L. major* chez les souris BALB/c. D'après nos résultats, nous constatons que la virulence d'une souche n'a pas un lien direct avec son statut résistant ou sensible aux antimoniés, et que le traitement peu influencer le degré de virulence.

L'étude de souris BALB/c infectées expérimentalement par *L. major* nous a permis de mieux comprendre l'implication du NO dans le contrôle de l'infection par ce genre de leishmanie ou de son élimination. Dans notre travail le dosage du monoxyde d'azote in vivo chez ces souris nous a permis de constater l'existence d'une liaison entre la virulence du parasite et la quantité de NO produite par l'hôte infectée, cette quantité est plus importante contre une souche virulente. L'effet du Glucantime® sur la synthèse du monoxyde d'azote est relativement palpable.

## ***Conclusion***

---

Selon l'ensemble des résultats que nous avons obtenu, est particulièrement celle de la production du NO, font qu'une exploration de la réponse immunitaire associée à la résistance du parasite, pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la résistance à l'antimoine.

PDF Create! 4 Trial  
www.nuance.com

**Arab.A., Barouche.O., Raheli.S.** (2013). Etude de la sensibilité au Glucantime® de *Leishmania major* in vivo et in vitro chez les souris BALB/c. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en sciences biologique. 33P. Faculté des USTHB. Alger.

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

**Alderton. WK., Cooper. CE., Knowles. RG.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357: 593-615.

**Bachi., F.** (2001). Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en ALGERIE. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.

**Banuls. A.L., M. Hide., Prugnolle. F.** (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 64: 1-109.

**Bauchaud.O., Izri. A.** (2008). Nouveaux antiparasitaire. *La revue de médecine interne.* 29S. S15-S17.

**Belazzoug. S.** (1986). Isolations of *leishmania major*, Yakimoff and Schokhor, 1914 From *Psammomus Obesus* Cretzschmar, 1928. (Rodentia Gerbillidae) in Algèria. *Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.* 77: 876.

**Belazzoug. S., Neal. RA.** (1986). Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to *Leishmania major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80:670-1.

**Belazzoug. S.** (1987). La leishmaniose canine en Algérie. *Maghreb. Vet.* 3: 11-13.

**Belazzoug. S., Ammar Khodja. A., Belkaid. M.,Tabet-Derraz. O.** (1985). la leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. *Bull Soc Path Ex.*78: 615-622.

**Belazzoug.S., Neal. R.A.**(1986). Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to *Leishmania major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80:670-1.

**Baldwin. T., Henri. S., Curtis. J., O'Keeffe. M., Vremec. D., Shortman. K., Handman. E.** (2003). Dendritic Cell Populations in *Leishmania major*-Infected Skin and Draining Lymph Nodes. *American Society for Microbiology.* 72 : 4.

**Belkaid. Y., Kamhawi. S., Modi. G., Valenzuela. J., Noben-Trauth. N., Rowton. E., Ribeiro. J., & Sacks. D.L.** (1998). Development of a natural Model of Cutaneous leishmaniasis: Powerful Effects of vector Saliva and saliva Preexposure on the Long-Term outcome of *leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. *J of Experimental Med.* 188(10): 1941-1953.

**Belkaid.Y., Butcher. B., Sacks. D.L.** (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol.* 28: 1389-400.

**Belkhodja.S., Zidane Gharbi.A.** (2009). Etude in vitro de la sensibilité des souches *Leishmania major* à la N-methyl Glucamine (Glucantime®) en Algérie. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en sciences biologique. 35P. Faculté des USTHB. Alger.

**Berman. J.D.** (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24:684–703.

**Bhattacharyya. S., Ghosh. S., Jhonson. P.L., Bhattacharya. S.K., Majumdar. S.** (2001a). Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infection and Immunity.* 69: 1499-1507.

**Bhattacharyya. S., Ghosh. S., Sen. R., Roy. S., & Majumdar. S.** (2001b). Selective impairment of protein kinase C isotypes in murine macrophage by *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 216 : 47-57.  
**Bogdan. C., Röllinghoff. M.** (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology.* 28: 121.

**Bogdan. C.** (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2: 907-16

**Bogitsh. B.J., Carter. CE., Oeltmann. TN.** (2005). Human Parasitology. Elsevier Academic Press; Burlington:. Blood and tissue protozoa I: hemaflagellates. p. 101-14. Chapter 6.

**Boudrissa. A., Cherif. K., Kherrachi. I., Benbetka. S., Bouiba. L., Boubidi. S.C., Benikhlef. R., Arrar. L., Hamrioui. B., Harrat. Z.** (2012). Extension de *Leishmania major* au nord de l'Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105:30-35.

**Brittingham. A., Morrison. C.J., McMaster. W.R., McGwire. B.S., Chang. K.P. , Mosser. D.M.** (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement

fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology*. 155: 3102-3111.

**Brouqui. P., Dabcourt. M., Dumont. H., Gallais. H., Raoult. D.** (1989) Données actuelles sur la leishmaniose viscérale. *Medt. Med.* 390: 23-27.

**Bryk. R., Wolff. DJ.** (1999). Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol Ther.* 84:157-78.

**Bussièras. J., Chermette. R.** (1992). *Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie.* Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie, p 186.

**Crane. BR., Rosenfeld. RJ., Arvai. AS., Ghosh. DK., Ghosh. S., Tainer. JA., Stuehr. DJ., Getzoff. ED.** (1999). N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *Embo J.* 18: 6271-81

**Crépel. F., Lamaire. G.** (1995). Le monoxyde d'azote. *Med./sci.* N. 1639; 1642

**Croft. S. L., Neal. R. A., Pendergast. W., & Chan. J. H.** (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.* 36:2633–2636.

**Croft. S.L., Snowdon. D., & Yardley.V.** (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38:1041-1047.

**Croft. S.L., Sundar. S., Fairlamba. H.** (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 19: 111-26

**Da Luz. R.I., Vermeersch. M., Dujardin. J.C., Cos. P., Maes. L.** (2009). *In vitro* sensitivity testing *leishmania*, clinical field isolate: preconditioning of promastogotes enhanced infectivity for hostcells. *Antimicrobial Agents Chmother.* 53(12): 5197-5203.

**Da Silva. R., Sacks. D.L.** (1987). Metacyclogenesis is a Major Determinant of *Leishmania* Promastigote Virulence and attenuation. 55(11): 2802-2806.

**Dana. M.** (1972). La Leishmaniose viscérale méditerranéenne et son diagnostic immunologique. *La Nouvelle Presse Médicale.* 1 :(20), 1363.

**DEDET. J.P.** (1996). Leishmaniose viscérale. *La revue du praticien*. 10: 35-38.

**Dedet. J.P.** (2001). Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique.

*Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. 8 : 506-510.

**Dedet. J.P.** (2009). Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique.

EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses. 8-506-A-10, 1-14.

**Del Giudice. P., Marty. P., Lacour. J.P., Perrin. P., Pratlong. F. & Haas. H.** (1998). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*, case report and review. *Arch Dermatol*. 134 : 193-198.

**Desjeux. P.** (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 95: 239-43.

**Desjeux. P., Piot. B., O'Neill. K. & Meert. J.P.** (2001). Co-infection a Leishmania/VIH dans le sud de l'Europe. *Méd Trop*. 61: 187-193.

**Ducrocq C., Servy C., Cudic M., Blanchard B.** (2001). Intervention du monoxyde d'azote, NO, et de ses dérivés oxydés, particulièrement chez les mammifères. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 79(2):95-102.

**Dujardin. J.C., Henriksson. J., Victoir. K., Brisse. S., Gamboa. D., Arevalo. J., Le Ray. D.** (2000). Genomic Rearrangements in Trypanosomatids: an Alternative to the "One Gene" Evolutionary Hypotheses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(4): 527-534.

**Eich. R.F., Li.T., Lemon. D.D., Doherty. D. H., Curry. S. R., Aitken. J. F., Mathews. A.J., Johnson. K. A., Smith. R. D., Phillips. G. N. Jr. Olson. J. S.** (1996) Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*. 35 : 6976-6983.

**Euzeby. B.** (2003). Les dermatoses parasitaires d'origine zoonosique dans les environnements de l'homme Editions Médicales Internationales. *Lavoisier*. 240 p.

**Euzeby. J.** (2008) Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris: *Lavoisier*. p818.

**FARAUT GAMBARELLI. F., PIARROUX. R., DENIAU. M., GIUSIANO. B., MARTY. P., MICHEL. G., FAUGERE. B., DUMON. H.** (1997). In Vitro and In

Vivo Resistance of *Leishmania infantum* to Meglumine Antimoniate: a Study of 37 Strains Collected from Patients with Visceral Leishmaniasis. *American Society for Microbiology*. 41 : 4.

**Feldman. P. L., Griffith. O. W., Stuehr. D. J.** (1993). The surprising life of nitric oxide. *C&EN, December*. 26-38.

**Filippi. C., Malherbe.L., Julia.V., Glaichenhaus.N.** (2001). L'immunité contre les leishmanies : Synthèse. *médecine/sciences*. 17: 1120-8.

**Ghafari. Y., Labarde. G.** (2003). Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines. DESSIST.

**Ghasemi. A., Hedayati. M., & Biabani. H.** (2007). Protein precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide and products by the Griess Assay. *JMSR*. 15(2): 29-32.

**SOLGI. G., KARIMINIA. A., Khosro ABDI., DARABI. M., GHAREGHZLOO. B.** (2006). Effects of combined therapy with thalidomide and glucantime on leishmaniasis induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Korean Journal of Parasitology*. P44.

**Ghosh. DK., Stuehr. DJ.** (1995). Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*. 34:801-7.

**Giraud. P., Ranque. J., Cabassu. H.** (1950). Epidémiologie de la Leishmaniose viscérale humaine méditerranéenne, en particulier dans ses rapports avec la leishmaniose canine. *Rev.Pathol.Comp.Hyg Gén.* 617: 282-30.

**Gramiccia. G.M., Gradoni. I., Orsini. S.** (1992). Decreased sensitivity to Meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania Infantum* isolated from dogs after several courses of dru treatment. *Annl Trop Med and parasitol* . 86; 613-620.

**Granger. D.L., Taintor. R.R., Boockvar. K.S., Hibbs. J.B.** (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological sample using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*. 298: 142-151.

**Grevelink. S.A., Lerner. E.A.** (1996). Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 34(2 Pt 1): 257-72.

**Grogl. M.** (1989). *Leishmania ssp*: development of pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Experimental parasitology*. 69, p: 78-90

**Harrat. Z., Addadi. K., Belkaid. M.** (1990). Tabet-Derraz O. Visceral Leishmaniasis in Algèria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990) *Bulletin de la Société de pathologie exotique*.85(4) : 296-301.

**Harrat. Z., Hamrioui. B. , Belkaid. M. , Tabet-Derraz. O.** (1995). Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie . *Bull Soc Pathol Exot*. T: 88., 180 -184.

**Harrat,Z., F. Pratlong, S. Belazzoug, J.M. Dereure, Deniau, J.A. Rioux, M. Belkaid and J.P. Dedet.** (1996). *Leishmania infantum* and *Leishmania major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**(6): 625-629.

**Harrat. Z., Belkaid. M.** (2003). Les leishmanioses dans l'algérois. Données épidémiologique. *Bull Soc Pathol Exot*. 96: 212-4.

**Harrat. Z., Boubidi. SC.,Pratlong. F., Benikhlef. R., Selt. B., Dedet. PJ., Ravel. C., Belkaid. M.** (2009). Description of a dermatropic leishmania close to *L.killicki* (Rioux, Lanotte and Pratlong 1986) in Algèria *Trans R. soc. Trop. Med. Hyg.* 103. 716-720.

**Hausladen. A., Stamler. J. S.** (1999) Nitrosative stress, *Methods Enzymol.* 300, 389-395.

**Holzmuller. P., Sereno. D., Lemesre. J.-L.** (2005). Lower Nitric Oxide Susceptibility of Trivalent Antimony-Resistant Amastigotes of *Leishmania infantum*. *American Society for Microbiology*. 4406-4409

**Izri. M.A., Bellazoug. S., Pratlong. F., & Rioux. J.A.** (1992). Isolement de *L.major* chez *Phlebotomus Papatasi* à Biskra (Algèrie), fin d'une épopée éco-épidémiologique. *Ann. Parasit. Hum. comp.* 1-31-2.

**Izri. M.A., Boujebla. Y., Dereure. J., Pratlong. F., Delalbre-Belmonte. A., Rioux. JA.** (1990). *Leishmania infantum* Mon-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie (Algèrie) *Ann.Parasit. Hum. Comp.* 65: 151-152.

**Janvier.F., Morillon.M., Olliaro.P.** (2008). Leishmaniose viscérale : Efficacité clinique et résistance aux différentes molécules. *Med Trop.* 68,97-103

**Jeannel. D., Tuppin. P, Bruckers. G., Danis .M., Gentilini.M.** (1991). Imported and autochthonous Kala-azar in France. *Br Med J.* 303: 336-8.

**KAGOUMI. A., ROUICHI. M., LAHRECH. T.** (1991). Mise au point sur le profil épidémiologique de la leishmaniose viscérale humaine au Maroc (1957-1989). *Maroc*

*Med.* XIII. 1: 5-10.

**Kbaier-Hachemi.H., Guerbouj.S., Turki-Manoubi.L., & Guizani.I.** (2011). *In vitro* growth Kinetics, differentiation and morphomological characterisaion of Tunisian *Leishmania infantum* parasit transaction of the royel. *Society of tropical Medicine and Hygiee.* 106: 20-25

**Kimutai. A., Kamau Ngure. P., Kiprotich-Tonui. W., Muita-Gieheru. M., & Bonareri-Nyamwamu. L.** (2009). Leishmaniasis in north and western Africa: A review. *Afr. J. Infect. Diseases.* 3(1): 14-25.

**Knowles. RG. Moncada. S.** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *BiochemJ.* 298 (Pt 2): 249-58.

**Kuhlencord.A., Maniera.T.,Eibl. H., & Unger. C.** (1992). Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 36:1630–1634.

**Kurey. I., Kobets. T., Havelková. H., Slapničková. M., Quan. L., Trtková. K., Grekov. I., Svobodová. M., Stassen. A. P., Hutson. A., Demant. P., Lipoldová Marie.** (2009). Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania* major infection. *Springerlink.com.* 61:619–633.

**Lagardere.B** (1983). *Les Difficultés diagnostiques du Kala-Azar en France Rev. Prat.* 33 : 1249-1251.

**Lagardere. B., Chevalier. B., Cheriet. R.** (1992). Le Kala- Azar. *Ann. Pédiatr. (Paris).* 39(3): 159-164.

Lambertz. U., Judith. M.S., Nandan.D., Robert McMaster.W., Clos.J., Leonard J. Foster., Neil. E. (2012). Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology.* (6):887-99.

**Le Fichoux. Y., Marty. P., Kubar. J.** (1999). Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet J.P. Ed. Les leishmanioses. Paris : *Ellipses.* p190-203.

**Le Fichoux. Y., Rousseau. D., Ferrua. B., Ruette. S., Lelievre. A., Grousson. D., & J. Kubar.** (1998). Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against

established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 654–658.

**LIRA. R., DOHERTY. M., MODI. G., SACKS. D.** (2000). Evolution of Lesion Formation, Parasitic Load, Immune Response, and Reservoir Potential in C57BL/6 Mice following High- and Low-Dose Challenge with *Leishmania major*. *Laboratory of Parasitic Diseases*.

**Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, et al.** (1998). Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Di.* 177: 1687–95.

**Mazelt. L.** (2004). La leishmaniose canine dans le bassin méditerranéen Français Université Pierre et Marie Curie, Paris (France). P: 2, 5, 6.

**Minodier. P., Retornaz., K, Horelt. A., Garnier. JM.** (2003). Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Fundam Clin Pharmacol.* 17: 183-188.

**Murphy. M.P.** (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1411, 401-414.

**Myler. P.J., & Fasel. N.** (2008). *Leishmania: after the genome. british ed: Caister Academic Press.*

**Myler. P.J., Sisk. E., McDonagh. P.D., Martinez-Calvillo. S., Schnauffer. A., Sunkin. S.M., Yan. S., Madhubala. R., Ivens. A., Stuart. K.** (2000). Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* 28(5):527-31.

**Nadau. Q.** (2005). *Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine Lack dans le test d'intra-dermo-réaction de la leishmaniose canine.* Thèse d'exercice. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 117 p.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** (1984). The leishmaniasis. WHO Tech Rep Ser 701

**Ouellette M, Olivier M, Sato S, Papadoupoulou B.** (2003). Le parasite *Leishmania* à l'ère post génomique. *Medecine & Sciences.* 19, 900- 909

**Pelletier. I., Sato. S.** (2002). Specific recognition and cleavage of galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope. *J Biol Chem.* 277: 17663-70.

**Reithinger. R.**, et al. (2007). *Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis.* 7(9): p. 581-96.

**Roitt. I., Brostoff. J., Male. D.** (2003). *Immunologie. 3ème Edition Deboeck.* P: 160.

**Sato. S.** (2003). Galectin as a molecule of danger signal, which could evoke immune response to infection. *Trends Glycosci Glycotechnol* (sous presse).

**Sacks D. & Kamhawi S.** (2001) . Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55 : 453-483.

**Schmidt. HH., Hofmann. H., Schindler. U., Shutenko. ZS., Cunningham. DD., Feelisch. M.** (1996). No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* /93: 14492-7.

**Sereno. D., Cavalryra. M., Zemzoumi. K., Maquaire. S., Ouaisi. A., & Lemesr. J L.** (1998). Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* Used as an *in vitro* Model To Investigate Pentavalent Antimony Mode of Action. 42(12):3097-3102.

**Slappendel. R.J., Ferrer. L.** (1998). Leishmaniasis. In: GREENE CE, editor. Infectious diseases of the dog and the cat. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders. P450-456.

**Solgi. G., Kariminia. A., Abdi. K., Darabi. M., Ghareghozloo. B.** (2006). Effects of combined therapy with thalidomide and glucanase on leishmaniasis induced by *Leishmania major* in BALB/c mice. *Korean J Parasitol.* 44(1):55-61.

**Stuehr. DJ., Kwon. NS., Nathan. CF., Griffith. OW., Feldman. PL., Wiseman. J.** (1991). N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 266: 6259-63.

**Sundar. S., Rosenkaimer. F., Makharkia. M. K., Goyal. A. K., Mandal. A. K., Voss. A., Hilgard. P., & Murray. H. W.** (1998). Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.* 352: 1821-1823.

**Tacchini-Cottier. F., Zweifel. C., Belkaid. Y., et al.** (2000). An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* 165: 2628-36.

**Takur. CP.** (1984). Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar Kala-Azar (including post Kala-Azar dermal leishmaniasis). *Trans r Soc Trop Med Hyg.* 78: 391-8. **Turco. SJ.** (1999). Adversarial relationship between the *Leishmania*

lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol.* 21: 597-600.

**Vickerman.K., Preston. TM.** (1976). Comparative cell biology of the kinitoplastid flagelletes. *Biology of the kinetoplastida. Ed. WCA Lumsden, DA Evans. New York: Academic Press I, 35-130.*

**Vladimirov.V., Badalova.J.T., Svobodova.M., Havelkova.H., Augustinus.A., Blazkova.H., Demant.P., & Lipoldova.M.** (2003). Different Genetic control of cutaneous and Visceral disease after *Leishmania major* infectio in mice. 71(4): 2041-2046.

**Werry. M.** (1995) Protozoologie médicale. Edition De Boeck Université. 123-136.

**World Health Organization.** (2000). Leishmaniose et les co-infections Leishmania / HIV. Aide mémoire N°11.

**Zilberstein. D., Shapira. M.** (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 48: 449-70.

PDF Created by www.nuance.com

# Annexe 1

**Tableau I :** Caractéristiques des trois types de NO-synthase humaine (Sennequier et al., 1998).

« Modifié ajout de la ligne des cellules immune qui synthétise chaque (NOS) (Bogdan, 2001) »

	<b>NOS-I</b> Neuronale (n NOS)	<b>NOS-II</b> Inductible (i NOS)	<b>NOS-III</b> Endothéliale (e NOS)
Type	Constitutive	Inducible	Constitutive
Localisation cellulaire	Cytosol	Cytosol	Cytosol, Membrane, Mitochondries
Masse Moléculaire en kDa	160	130	133
Localisation du gène humain	Chromosome 12, région 12q24	Chromosome 17, région 17 q11.2	Chromosome 7, région 7q35-36
Activation	Augmentation de la [Ca <sup>2+</sup> ]	Expression stimulée par cytokines et/ou endotoxines	Augmentation de la [Ca <sup>2+</sup> ]
Cellule immunitaire qui le synthétise	Cellules T souris	Macrophages rat et Homme /Cellules de Langerhans, souris/ Cellules NK rate souris/ Cellules NK sanguines Humaines/ Cellules B leucémielymphoïde chronique	Macrophages alvéolaires rat/ Cellules NK sanguine humaines / Cellules T leucémiques Homme/

## Annexe 2

**Tableau II :** Caractéristiques des souches utilisées

Forme clinique	Espèce	Origine	Localisation	Année d'isolement
LIPA 443	L.major	Homme	Tébessa	2013
LIPA 339	L.major	Homme	Tébessa	2013
LIPA 445	L.major	Homme	Batna	2013
LIPA 175/11	L.major	Homme	Biskra	2011
LIPA 100/09	L.major	Homme	M'sila (M'hir)	2009

## Annexe 3

### Matériel non biologique

#### ➤ Appareillage

- Etuve à CO<sub>2</sub> à 37 °C
- Etuve à 24 °C
- Hotte à flux laminaire
- Bain-marie
- Microscope optique
- Microscope inversé
- Balance de précision
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- pH-mètre
- Agitateur

#### ➤ Petit matériel

- pied à coulisse gradué

- boite de dissection
- des tubes Eppendorf , tubes conique, cryotubes à congélation
- plaques à 96 puits à fond plat
- chambre LabTek à huit compartiments
- cellule de Thomas
- micropipette, pipettes Pasteur stériles à usage unique.
- seringues, aiguilles intradermique G30

➤ **Produits et consommables**

- Eau physiologique à 0,9%
- colorant « GIEMSA » et « Bleu de trypan »
- Antibiotique : Pénicilline et Streptomycine
- Di-éthyle éther
- méthanol
- huile à émersion
- Phorbol-12 Myristate-13 Acétate (PMA)
- Dimethyl sulfoxyde (DMSO)
- Isopropanol 50% -SDS 50%
- MTT (sel de tétrazolium) (10mg/ml).
- N-methyl Glucantine (glucantime®)
- réactif de GRIESS
- Na HEPES à 0.2 M
- Nitrite Na NO<sub>2</sub> à 150 mM
- YMA, Pseudomonase à 10<sup>6</sup> CFU

## Milieux de culture

Pour l'isolement, l'enrichissement des souches, et la réalisation des différents tests biologiques 4 milieux de cultures ont été utilisés :

**Milieu NNN** (Nicolle Mac Neal Novy 1904), un milieu semi solide qui permet l'isolement et le maintien des parasites

**Milieu CCS** (Cœur Cerveau Sang), un milieu semi solide de culture en masse pour l'enrichissement des parasites.

**Milieu RPMI** (Roswell Park Memorial Institute 1640), un milieu liquide supplémenté de 10% de SVF (sérum de vœu fœtal). Pour l'entretien des cellules THP1 et l'enrichissement des parasites.

**Milieu LIT** (Liver Infusion Tryptose) , un milieu solide utilisé pour le clonage des parasites

### Préparation de Milieu de cultures

#### 1. Milieu NNN

##### Composition:

Gélose :Bacto Agar Difcor (10g)

NaCl (6g)

Eau distillée stérile (1000ml)

Sang de lapin (10à20%)

##### Préparation :

-la gélose est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80 C. le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation. Après distribution dans des tubes à essai de 8ml et stérilisation (autoclave 120 C pendant 20min); la conservation se fait à +4°C. Le sang de lapin qui obtenu par ponction cardiaque est recueilli sur citrate de sodium à 10. Après ajout de 250 000 U de pénicilline, et conservé à +4 C.La gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain-marie de 45 C,Le sang est alors incorporé à la gélose (2ml de sang pour 8 ml de gélose),

Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation de ce milieu est de mois à +4 C.

## 2. milieu CCS

### Composition

Gélose : Brain Heart Infusion (26g)

Eau distillée stérile (500g)

### Préparation

La gélose est dissoute dans l'eau distillée puis portée à ébullition. Elle est répartie ensuite dans des flacons (5-10 et 20 ml/flacon) ou dans les boîtes de roux à raison de 100ml/boîte, destinées à la culture en masse qui seront stériliser dans un autoclave à 120 c pendant 10min. La conservation est faite à +4 C (un mois maximum).

-Le sang de lapin est ajouté de la même manière que dans la préparation du milieu NNN. la gélose est liquéfiée dans un bain-marie à 45 C. Le sang est ajouté à raison de 2-5 ml dans les flacons et à raison de 10ml du sang dans les boîtes de roux. Après homogénéisation les flacons sont refroidis et la conservation se fait à + 4 C.

## 3. Milieu RPMI 1640 + %10 SVF

### Composition

RPMI 1640 (16,4 gr)

Eau distillée stérile (1000ml)

### 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 puis ajouter 2g de HEPES et 3 g bicarbonate de sodium et 50 UI/ml de pénicilline et 50ug/ml de streptomycine, puis complété avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml.

Filtrer le milieu avec un filtre de 0.22 um et additionner aseptiquement du sérum de veau foetal à 10%. Conserver le milieu à + 4C pendant 1 mois.

## **N.B**

La stérilité des trois milieux décrits ci-dessus, peut être vérifiée en plaçant un tube ou un flacon à l'étuve à 37 C pendant 48 heures

### **4. Milieu LIT**

#### **Composition**

Sang de lapin (30ml)

Gélose (60ml)

RPMI à 10% SVF (10ml), Milieu 199 (Medium) M199 (10 ml)

#### **Préparation**

Le sang de lapin obtenu par ponction cardiaque est recueilli sur citrate de sodium à 10 plus les antibiotiques, est ajouté au milieu RPMI à 10% SVF et au M199. Ce mélange est distribué dans des tubes en raison de 5 ml. La gélose est fondue en mettant les tubes dans de l'eau bouillante puis incorporé au mélange (5ml de mélange pour 5 ml de gélose). Le milieu est immédiatement distribué en alternance dans des plaques de 96 puits en raison de 200 ul/puits. Les plaques sont conservées aseptiquement à +4 C.

## **Annexe 4**

### **La numération cellulaire**

Nous avons utilisé pour cela la cellule de Thoma, c'est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connue ; c'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage. Le volume de comptage est déterminé par la surface de quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

### **Remplissage de la cellule de numération**

Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22\*22mm est faire adhérer parfaitement la lamelle au plateau latéraux : pour cela il faut placer la lamelle sur ces plateaux, puis exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance. Placer la cellule de comptage sur une surface plane, homogénéiser les suspensions cellulaires, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de l'embout légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate forme centrale quadrillée.

Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulle d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération. Après utilisation, la lamelle et la cellule de numération sont émergées dans un bain d'eau javellée pendant 10 min, puis rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec une gaze ou un papier (sans frotter en particulier au niveau du quadrillage)

### **Numération**

Observer à l'objectif \*10 pour repérer la position du quadrillage, vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter et observer par la suite à l'objectif \*40 pour réaliser le comptage. Compter parmi les 16 carreaux les cellules contenues dans 6 carreaux du quadrillage en Z.

PDF Create! 4 Trial  
www.nuance.com

## Calcul de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire de la suspension de cellule est calculée par la formule suivante :

(nombre de cellules / 6) x 16x (1/dilution) x 10<sup>4</sup> cellules / ml

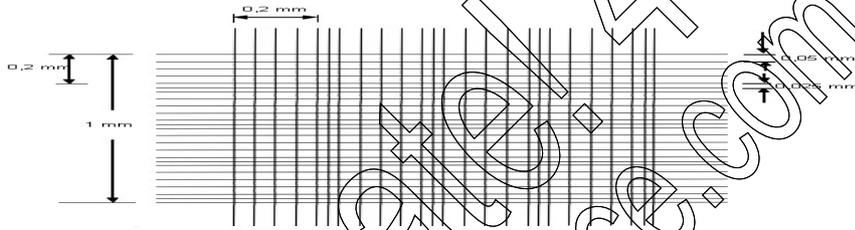
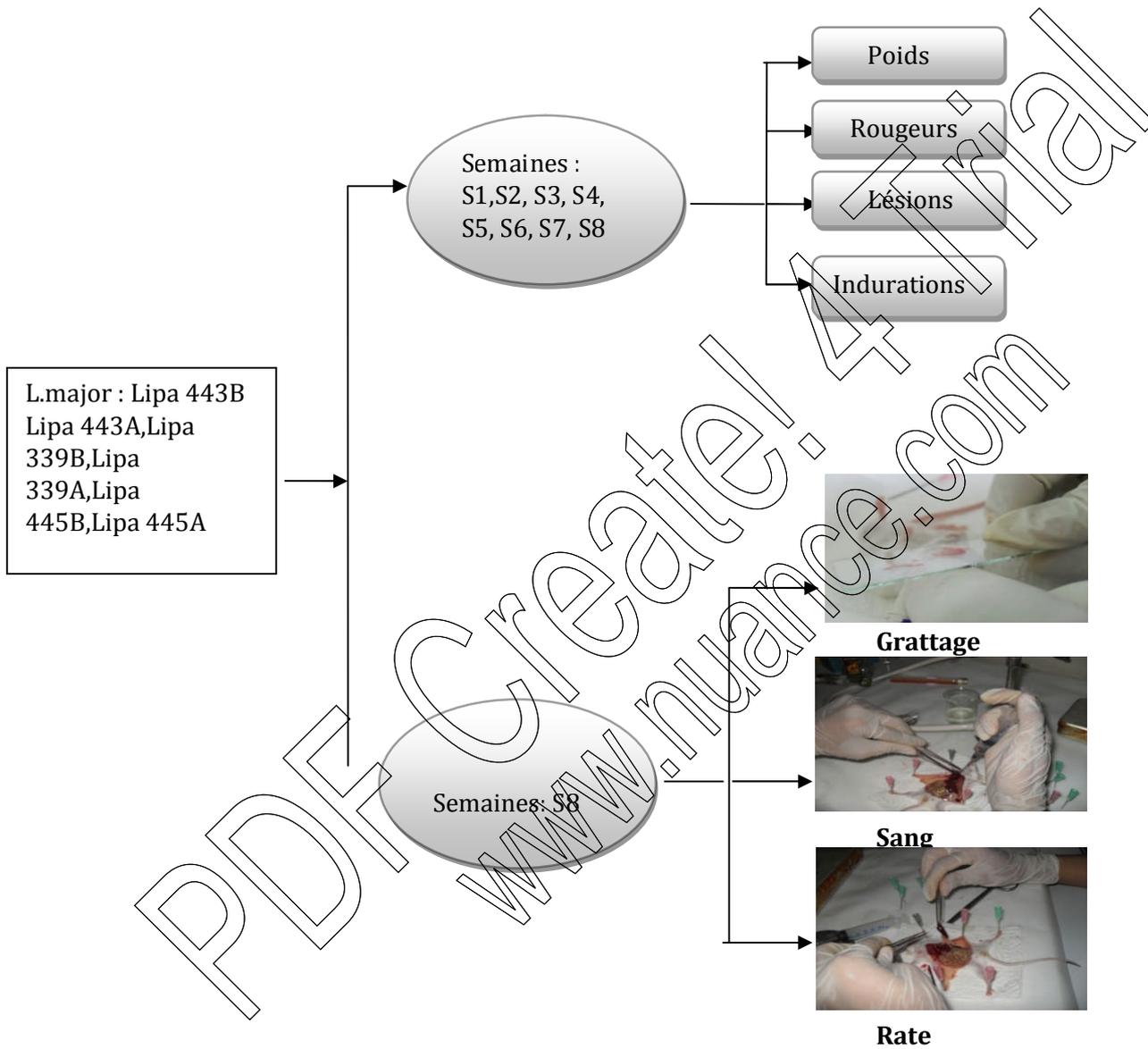


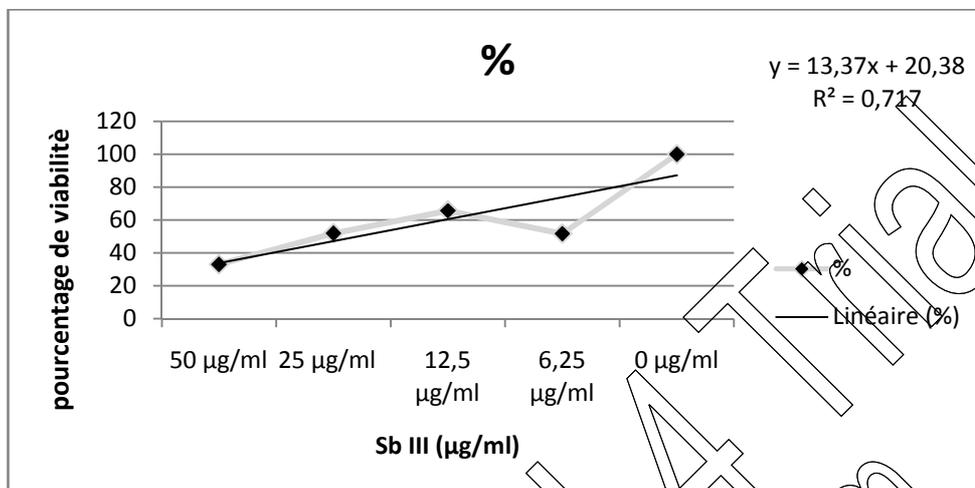
Figure 36: Quadrillage de la cellule de thoma vu sous microscope photonique

## Annexe 5 : monitoring



**Figure 37:** schéma récapitulatif du protocole adopté dans le suivi de la cinétique d'infestation *in vivo* de six souches

## Annexe 6 courbe tendance



**Figure 38:** courbe de tendance en fonction du pourcentage de viabilité du parasite à la présence de différente concentration du traitement

## Annexe 7

### Coloration GEMSA

#### Préparation du colorant à 10%

Rajouter à 9 volumes d'eau, un volume de colorant Giemsa

#### Fixation

Fixer les lames à colorer avec de l'alcool à 100%, pendant 30 secondes.

#### Coloration

Déposer quelques gouttes du colorant sur les lames et laisser agir pendant 30 minutes, rincer à l'eau du robinet et laisser sécher.

## Annexe 8 :

Préparation des solutions de dosage NO

### Na HEPES à 0.2M

H2O2D (200 ml)

Na HEPES (10.4g)

### Nitrite NA NO2 à 150 mM

Na NO2 (2.07g)

H2O2D (200 ml)

### YMA

DMEM 11

NA MOPS à 250mM (5.78g)

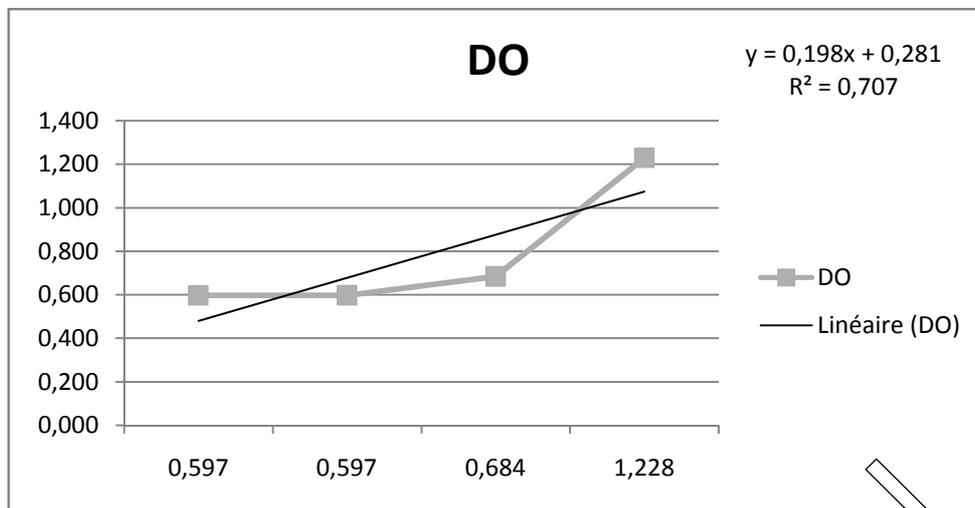
2O2D à 15 mM (3g)

-Souche de pseudomonas aeruginosa est diluée à  $5 \times 10^6$  cfu (Colony-forming unit) conservée, à -80 °C (Granger, 1996)

## Annexe 9 : dosage du NO

Tableau VI : le tableau du courbe étalon de nitrites

Nitrites ( $\mu$ M)	0	37.5	75	150
Moyenne des DO	0.59	0.6	0.68	1.22



**Figure 39:** courbe étalon de nitrite

**Annexe 10 :**

Tableau VII: tableau représentatif de profil de sensibilité des souches avec leur degré de virulence.

souches	Profil de sensibilité au traitement		Degré de virulence
LIPA 443	R	S	↗ ↘
LIPA 339	S	S	↙ ↘
LIPA 445	R	R	↗ ↗

PDF Create! 4 Trial  
[www.nuance.com](http://www.nuance.com)