

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou
Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques Département de
biochimie et microbiologie
Institut Pasteur d'Algérie



MÉMOIRE DE FIN DU DEUXIÈME CYCLE
UNIVERSITAIRE



En vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Option : Biotechnologie microbienne

Thème

**ETUDE DE LA SPÉCIFICITÉ ET DE LA SENSIBILITÉ DE LA HRM 7ARN SL DANS
L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE *LEISHMANIA*.**

Présenté par : **M^{elle} HAMOUDI Dehbia**
M^{elle} HADID Anthinia

**Soutenu publiquement le 27 septembre 2023 devant la commission
d'examen**

Président	Mr SEBBANE Hillal Maitre de conférences B UMMTO.
Promotrice	Mme EDDAIKRA-LAAMA Naouel, Maitre de recherche IPA.
Co-Promoteur	Mr HOUALI Karim, Maitre de conférences A UMMTO.
Examineur	Mr MSELA Amine, Maitre de conférences B UMMTO.

2022-2023

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, on souhaite adresser nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation et ont permis, par leur soutien et leurs conseils, de le mener à bien.

C'est avec un grand plaisir que nous exprimons notre gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme Eddaikra Naouel** Maître de Recherche et Chef de service au Laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'institut Pasteur d'Alger, pour son encadrement, sa disponibilité, son professionnalisme, ses compétences et ses conseils qui nous ont guidés dans l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude.

Nous tenons à remercier notre Co-promoteur **Mr Houali Karim**, Maître de Conférence à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour son orientation judicieuse et pour nous avoir permis d'effectuer notre travail au meilleur potentiel qu'il soit

Nous tenons à remercier également :

Notre présidente du jury **Mr Sebban Hillal** maître de conférences, et professeur au département de biologie à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Notre examinateur **Mr Msela Amine**, Maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir accepté d'examiner notre manuscrit.

Nos plus sincères remerciements au Directeur d'IPA pour avoir accepté de nous accueillir au sein du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations de Delly Brahim.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à **Mme Ben Ahmed Djillali** responsable de spécialité et maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son aide inestimable, son suivi lors de notre parcours de Master, ses encouragements et ses conseils, ainsi que son omniprésence lors de toutes nos demandes et incompréhensions.

Nos remerciements à toute l'équipe de service d'éco-épidémiologie parasitaire au sein de l'institut Pasteur et plus particulièrement à Mme Ben EL djouzi Asia pour son suivi lors de notre stage pratique et ses explications inestimables.



Dédicaces

À mes parentes : Nulles dédicaces ne peuvent exprimer ce que je leur dois,

Je dédie cet événement marquant de ma vie à ma chère Maman qui nous a quitté trop tôt et mon cher papa, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

À ma sœur Serina pour son encouragement permanent, et son soutien moral,

À mes chers frères, Boukhalifa et Saïd, pour leur appui et leur encouragement,

Ainsi qu'à mon cher ami et mon frère Massi

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Enfin je remercie mon binôme, Anthinia, qui a contribué à la rédaction de ce modeste travail

Merci d'être toujours là pour moi



Dehbia



Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail,

*A ma chère mère, qui me donne toujours l'esprit de vivre cessé de prier
pour moi*

*A mon cher père, pour ces encouragements, son soutien, surtout pour son
amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes
études.*

A mes deux frères Nadjib et Nouri

A mes chers grands parents

A tous mes oncles et tantes surtout Hassina et Nadia

A mes chères amies, Melissa et Sabrina

*Enfin je remercie mon binôme, Dehbia, qui a contribué à la rédaction de
ce modeste travail*

Anthinia



Résumé

La leishmaniose constitue un problème de santé publique en Algérie. Des procédures de diagnostic et d'identification précises, rapides et sensibles sont cruciales pour la détection de l'infection et la caractérisation de l'espèce de leishmanie responsable, afin de fournir un traitement précis, un pronostic précis et des mesures de contrôle de santé publique appropriées. Aujourd'hui, plusieurs méthodes et techniques de biologie moléculaire ciblant les gènes qui sont utilisés dans l'identification des espèces *Leishmania* tel que la PCR qui est une méthode la plus couramment utilisée, le séquençage, la RFLP, MLEE.

L'objectif de ce travail, est d'étudier la sensibilité et la spécificité de la technique HRM dans l'identification des différentes espèces de *Leishmania* circulantes en Algérie, à savoir *L. major*, *L. infantum* et *L. killicki*. Est-ce que la HRM7 ARN SL représente une bonne alternative pour la MLEE dans l'identification de ces trois espèces de *Leishmania* ?

Pour cela, nous avons réalisés plusieurs essais avec un large panel de souche *Leishmania* qui représente les trois espèces : *L. infantum* ; *L. killicki* et *L. major*. Enfin Pour la validation de protocole HRM une dernière manipulation a été faite sur d'autre souche pour confirmer la fiabilité de ce test avec les échantillons étudiant. Nos résultats ont permis d'obtenir des températures de fusion de 88.08 ± 0.18 pour *L. major*, 89.19 ± 0.65 pour *L. infantum* et enfin 88.54 ± 0.40 *L. killicki*.

Des études plus poussées s'imposent afin de permettre une reproductibilité des résultats lors des différents études avec un panel de souches plus larges et avec d'autres amorces grâce à la technologie du désigne d'amorces.

Mots –clés : *Leishmania*, identification moléculaire, HRM, PCR-RFLP

Abstract

Leishmaniasis is a public health problem in Algeria. Precise, rapid and sensitive diagnostic and identification procedures are crucial for the detection of infection and characterization of the responsible leishmania species, to provide accurate treatment, accurate prognosis and appropriate public health control measures. Today, several molecular biology methods and techniques targeting genes that are used in the identification of Leishmania species such as PCR which is one of the most commonly used method, sequencing, RFLP, MLEE.

The objective of this work is to study the sensitivity and specificity of the HRM technique in the identification of the different circulating Leishmania species in Algeria, namely *L. major*, *L. infantum* and *L. killicki*. Is HRM7 RNA SL a good alternative for MLEE in the identification of these three Leishmania species?

For this, we have made several tests with a large panel of Leishmania strain that represents the three species: *L. infantum*; *L. killicki* and *L. major*. Finally For the validation of HRM protocol a last manipe was made on other strain to confirm the reliability of this test with the samples studied. Our results yielded melting temperatures from 88.08 0.18 for *L. major*, 89.19 0.65 for *L. infantum* and finally 88.54 0.40 *L. killicki*.

Further studies are needed to allow reproducibility of the results in the different studies with a wider panel of strains and with other primers thanks to the technology of the designated primers.

Keywords: Leishmania, molecular identification, HRM, PCR-RFLP

ملخص

يعتبر داء الليشمانيات مشكلة صحية عامة في الجزائر. تعتبر إجراءات التشخيص والتعريف الدقيقة والسريعة والحساسة أمراً بالغ الأهمية للكشف عن العدوى وتوصيف أنواع الليشمانيا المسؤولة، لتوفير علاج دقيق وتشخيص دقيق وتدابير مناسبة لمراقبة الصحة العامة. اليوم، العديد من طرق وتقنيات علم الأحياء الجزيئي التي تستهدف الجينات المستخدمة في تحديد أنواع الليشمانيا مثل PCR وهي واحدة من أكثر الطرق استخداماً، التسلسل، RFLP، MLEE.

الهدف من هذا العمل هو دراسة حساسية وخصوصية تقنية إدارة الموارد البشرية في تحديد أنواع الليشمانيا المختلفة المتداولة في الجزائر، وهي *L. major* و *L. infantum* و MLEE بديل جيد لـ HRM7 RNA SL هل *L. killicki*. في تحديد أنواع الليشمانيا الثلاثة هذه ؟

لهذا، أجرينا العديد من الاختبارات باستخدام لوحة سلالات الليشمانيا الكبيرة التي تمثل الأنواع الثلاثة *L. infantum* ؛ *L. killicki* و *L. major*. أخيراً، للتحقق من صحة بروتوكول إدارة الموارد البشرية، تم إجراء اختبار نهائي على سلالات أخرى لتأكيد موثوقية هذا الاختبار بالعينات المدروسة. أظهرت نتائجنا ذوبان درجات الحرارة عند 0.18 88.08 لـ *L. major* و 0.65 89.19 لـ *L. infantum* وأخيراً 0.40 88.54 لـ *L. killicki*.

هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات للسماح بإمكانية تكرار النتائج في الدراسات المختلفة مع لوحة أوسع من السلالات ومع البرايمر الأخرى بفضل تقنية البرايمر المعينة.

الكلمات الرئيسية: الليشمانيا، التعريف الجزيئي، إدارة الموارد البشرية، PCR-RFLP,HRM

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ARN : Acide Ribonucléique.
- BET : bromure d'éthidium.
- Ech : Echantillon.
- INSP : Institut Nationale de la Santé Publique
- HRM : high resolution melting
- Lipa : leishmania institut pasteur d'algerie.
- L : Leishmania.
- LC : Leishmaniose cutanée.
- LV : Leishmaniose viscérale.
- LCD : Leishmaniose cutanée diffuse.
- LCL : Leishmaniose cutanée localisée.
- LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse.
- MON : Montpellier.
- MLEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis.
- NNN : Novy. Mc Neal et Nicolle.
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
- PCR : Polymerase chain reaction.
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium.
- SVF : Sang de vœux fœtal.
- DMSO : Diméthylsulfoxyde.
- Tm : Températures de fusion.

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison des outils moléculaires utilisés pour les études épidémiologiques de la leishmaniose méditerranéenne.	21
Tableau II : Caractéristiques des souches de références de <i>Leishmania</i> utilisées dans la mise au point de la HRM.	23
Tableau III : Résultats des températures de fusions des trois espèces de <i>Leishmania</i> et leurs moyennes et écarts types.....	54
Tableau IV : les quinze souches cultivés et extraits de leur ADNs.....	62
Tableau V : Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR ITS1.	64
Tableau VI : Programmation de l'amplification PCR de la région ITS1.....	65
Tableau VII : Volumes des réactifs pour la RT-PCR sonde TaqMan.....	65
Tableau VIII : La Programmation du SMART cycleur pour la sonde Taqman.....	65
Tableau IX : Volume des réactifs de la PCR-HRM.	66
Tableau X : Programmation de la PCR-HRM.	66
Tableau XI : les différentes souches des trois espèces de <i>Leishmania</i> et leurs informations, utilisées lors de l'optimisation des tests HRM.	67
Tableau XII : Les charges parasitaires après leurs récoltes et quantification.	68
Tableau XIII : les concentrations et rapports des différentes souches par spectrophotométrie simpli Nano Biochrom.	68

Listes des figures

Figure 1 : Classification mise à jour des espèces de Leishmania, les espèces pathogènes humaines sont écrits en gras, les espèces de l'ancien monde sont surligné en bleu et celle du nouveau monde en rouge, NB : les noms entre Guillemets ne sont pas considérés comme formelles.	6
Figure 2 : Forme Promastigote.	7
Figure 3 : Forme Amastigote.....	7
Figure 4 : Situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le monde.....	10
Figure 5 : Situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale dans le monde.....	10
Figure 6 : Distribution géographique de la leishmaniose en Algérie due à <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> et <i>L. tropica</i>	11
Figure 7 : Schématisation du mécanisme d'édition chez les kinétoplastidés, ...	13
Figure 8 : Carte génétique des gènes d'ADNr.	14
Figure 9 : la structure des max cercle de Leishmania (<i>L. major</i>)	16
Figure 10 : représentation schématique des étapes d'extraction d'ADN des leishmanies par phénol/chloroforme.	26
Figure 11 : Illustration de l'étape de la lyse parasitaire.....	27
Figure 12 : illustration de la suite d'extraction (purification et élution de l'ADN des Leishmania)	29
Figure 13 : Schéma de la Région ITS.....	31
Figure 14 : préparation des mélanges post PCR pour le gel d'agarose.....	32
Figure 15 : placement des différents ADN des espèces leishmanias dans les puits du gel d'agarose	32
Figure 16 : Différentes formes des promastigotes observées sous microscope au grossissement X40.	36
Figure 17 : Amplification de l'ADN de <i>L. killicki</i> , <i>L. major</i> et <i>L. infantum</i> analysés par électrophorèse.	38
Figure 18 : Résultats de l'électrophorèse des ADN de <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> et <i>L. killicki</i> sur gel de qualité 0.8 %.	39
Figure 19 : résultat de la qPCR dans le SmartCycleur	40
Figure 20 : courbe de dissociation codée par couleur des 3 souches marqueurs : bleu : LIPA 431(88.39) (<i>L. infantum</i>) ; rouge : LIPA 544 (88.06) (<i>L. major</i>) ; mauve : LIPA 07/05 (88.68) (<i>L. killicki</i>).	41
Figure 21 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour les souches marqueurs LIPA 07/05, LIPA 544 et LIPA 431.....	42
Figure 22 : regroupement courbes de dissociation codées par couleur pour chaque souche a testé : bleu (LIPA 431 MON 24, LIPA 474 MON80, LIPA 390 MON 1) ; vert (LIPA 07/05 et LIPA 10/05) ; rouge (lame 375 et lame 383) ; orange (ech 37) inconnue et grenat (ech positive).	42
Figure 23 : courbes de dissociation des 3 zymodèmes de <i>L. infantum</i> : MON 24 (LIPA 431) ; MON80 (LIPA 474) ; MON1 (LIPA 390).....	43
Figure 24 : courbes de dissociation de <i>L. killicki</i> (LIPA 10/05 ; LIPA 07/05) et de l'échantillon 37. ...	44
Figure 25 : courbe de dissociation des souches <i>L. infantum</i> : LIPA 250L ; LIPA 472 ; LIPA 497 ; LIPA 979 ; LIPA 1046 ; LIPA 1108 ; LIPA 1111 ; LIPA 1112 ; LIPA 1117 ; LIPA 1119 ; LIPA 1125 ; LIPA 2091.	45
Figure 26 : courbe de dissociation des souches <i>L. infantum</i> : LIPA 270 ; LIPA 1119 ; LIPA 1116 ; LIPA 147.	45
Figure 27 : courbe de dissociation des souches <i>L. infantum</i> : LIPA 270 ; LIPA 1119 ; LIPA 1116 ; LIPA 147.	46
Figure 28 : Courbe de dissociation des souches <i>L. infantum</i> : LIPA 209 (87.96° ; LIPA 268(88.01) ; LIPA 1010 (88.05) ; LIPA 2091(89.38)	46

Figure 29 : courbe de dissociation des souches <i>L. infantum</i> : LIPA 2091 ; LIPA 835 ; LIPA 1118 ; LIPA 1345.	47
Figure 30 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour les souches : LIPA 2091 ; LIPA 835 ; LIPA 1118 ; LIPA 1345.....	47
Figure 31 : courbe de dissociation codée par couleurs des 3 souches : bleu (270/11) ; rouge (330/13) et orange (10/05).	43
Figure 32 : courbes de dissociation des 3 souches <i>de L. killckii</i> (LIPA 10/05).	49
Figure 33 : courbe de dissociation des souches LIPA 633/23,LIPA 428 et LIPA 10/05	49
Figure 34 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour 9 souches : Lipa 270/11, Lipa 330/13, Lipa 10/05, Lipa 270/11, Lipa 428, Lipa 633/26, Lipa 10/05, Lipa 10/05, Lipa 10/05.	50
Figure 35 : courbe de dissociation des souches de prélèvement : LC 12/23P, LC 14/23P et LC 25/23P et la souche marqueur	51
Figure 36 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose des souches : LC 12/23P, LC 14/23P et LC 25/23P et les souches marqueurs (Lipa 431, Lipa 544, Lipa 07/05).....	51
Figure 37 : la distribution des différentes souches selon leurs températures de fusion.....	52
Figure 38 : la distribution de différentes souches <i>Leishmania infantum</i> selon les températures de fusion codée par couleurs et formes en fonction des zymodèmes MON-1 ; MON-24 ; MON 80.	53
Figure 39 : La distribution des différentes souches de <i>L. killickipar</i> un code de couleur attribué pour les mêmes références en fonction de leur température de fusion.	54

Table de matière

Résumé	i
Abstract.....	ii
ملخص	iii
Liste des abréviations	iv
Liste des tableaux	v
Listes des figures	vi
I. Introduction.....	2

Synthèse Bibliographique

1. L'agent pathogène responsable (<i>Leishmania</i>).....	5
1.1. Taxonomie et classification du parasite.....	5
1.2. Morphologie du parasite <i>Leishmania</i>	7
2. Le vecteur.....	7
3. Espèces réservoirs	8
4. Cycle évolutif et transmission du parasite.....	8
5. Formes cliniques	9
5.1. Leishmaniose cutanée LC.....	9
5.2. Leishmaniose viscérale LV/ KALA AZAR	9
6. Répartition géographique	9
6.1. Dans le monde	9
6.2. En Algérie.....	11
7. Structure génomique de <i>Leishmania</i>	12
7.1. Génome nucléaire	12
7.2. Génome kinétoplastique	12
8. Détection de <i>Leishmania</i> dans les infections	13
8.1. Méthodes parasitologiques	13
8.2. Méthodes sérologiques	14
9. Marqueurs moléculaires	14
9.1. ADN chromosomique.....	14
9.2. ADN non chromosomique.....	16
10. Outils moléculaire utilisés dans l'étude du polymorphisme et distinction de <i>Leishmania spp</i>	18
10.1. Distinction au niveau du genre.....	18
10.2. Distinction au niveau de l'espèce	18
11. Typage des souches de <i>Leishmania</i>	20

11.1.	Analyse biochimique des isoenzymes (MLEE)	20
11.2.	Multi locus sequence typing (MLST)	20
11.3	Le typage microsatellite multilocus (MLMT)	20

II. Matériels et Méthodes

1.	Matériels biologiques	23
1.1.	Souches	23
2.	Méthodes	23
2.1	Culture parasitaire.....	23
2.2	Récolte des parasites cultivés sur milieu RPMI	24
2.3	Numération des leishmanies	24
2.4	Extraction de l'ADN.....	24
2.4.2	Méthode d'extraction par phénol-chloroforme	24
2.5	Extraction par le Kit Qiagen	21
2.5	Quantification de L'ADN (Dosage spectrophotométrique)	28
2.6	Réaction d'amplification du gène ITS1 (PCR classique).....	30
2.6.1	Principe.....	30
2.6.2	Préparation du mélange réactionnel de la PCR.....	30
2.6.3	Visualisation de produit de PCR classique par électrophorèse	31
2.7	Contrôle de la qualité des ADN extraits par détermination de la charge parasitaire par PCR quantitative.....	32
2.7.1	Principe.....	32
2.7.2	Mode opératoire	32
2.8	Analyse qualitative de l'ADN : gel de qualité.....	33
2.9	PCR - HRM (Hight résolution melting) de la région SL 7ARN	33
2.9.1	Principe.....	33
2.9.2	Mode opératoire	33
2.9.3	Optimisation de la HRM	34

III Résultats..... 36

1.	Résultat de la culture parasitaire	36
2.	Résultat de la récolte et de la numération des parasites	36
3.	Résultat de la quantification de l'ADN	37
4.	Identification du genre <i>Leishmania</i>	37
4.1	Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose	37
4.2	Résultats de l'électrophorèse sur gel de qualité.....	37
5.	Résultats de la quantification par la PCR en temps réel (CR)	39

6. Résultat d'identification des espèces <i>Leishmania</i> par PCR- RFLP ciblant la région ITS1 des gènes ARNr	40
7. Résultat d'identification des espèces <i>Leishmania</i> par PCR- HRM ciblant la région ARN 7SL des gènes ARNr	41
7.1 Mise au point de la PCR-HRM	41
7.2 La distribution des différentes souches selon leurs températures de fusion	52
III Discussion	56
IV Conclusion	60
<i>ANNEXE</i>	61
<i>Bibliographie</i>	69

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

I. Introduction

Les leishmanioses sont un ensemble d'infections parasitaires très différentes sur le plan de manifestations cliniques, de la gravité de l'évolution et de la répartition géographique. Le seul lien justifiant ce regroupement est d'ordre zoologique, qui est due à un protozoaire flagellé faisant partie de la famille des *Trypanosimidae* et appartenant au genre *Leishmania*, et qui sont transmises par de petits insectes diptères hématophage, les *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde, *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde. En outre, les leishmanioses constituent un problème majeur de santé publique marqué par une augmentation continue des taux de mortalité et d'incidence au cours des dernières décennies, La plupart des cas sont observés au Brésil, en Afrique de l'Est et en Inde. On estime que 50 000 à 90 000 nouveaux cas de LV surviennent chaque année dans le monde et que seuls 25 % à 45 % de ces cas sont notifiés à l'OMS (OMS 2022) Cette maladie présente un fort potentiel épidémique et un fort taux de mortalité et Environ 95 % des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale (OMS 2022).

En Algérie, l'incidence de la leishmaniose cutanée, croît régulièrement dans la région occidentale du pays depuis plusieurs années, note un bulletin de l'Observatoire régional de la santé d'Oran (Promed, 2019). Un document récent indique que l'incidence de cette maladie a augmenté de 0,6 pour 100 000 habitants en 2014 à 2,8 pour 100 000 habitants en 2019 (ORS, 2019).

Le nombre de cas dans les 10 wilayas de la région ouest est passé de 46 en 2014 à 251 en 2019, la wilaya de Saïda étant la plus touchée (26,5 / 100 000 habitants), suivie des wilayas de Tiaret (10,5 / 100 000), Sidi Bel-Abbes (1,7 / 100 000) et Tissemsilt (1,3 / 100 000). La tranche d'âge des moins de 14 ans est la plus touchée par cette infection, avec une atteinte plus fréquente des hommes (Bulletin de l'Observatoire régional de la santé d'Oran, 2019).

Pour ce qui est du nord est d'Algérie, La grande Kabylie est connue depuis longtemps comme étant le foyer le plus actif de la L.V. et de la L.C.N. (Dedet et al., 1977), ce foyer regroupe à lui tout seul près de 50% des cas de leishmaniose recensées en Algérie (Harrat et al., 1995). La fréquence des leishmanioses varie d'une région à l'autre. Dans la wilaya de Tizi Ouzou, la maladie s'est révélée, ces dernières années, beaucoup plus répandue et beaucoup plus importante qu'on le croyait jusqu'ici avec un taux de prévalence de 0,59% leishmaniose cutanée au sein des services de maladies infectieuses et de dermatologie de C.H.U de Tizi Ouzou, entre janvier 2011 et décembre 2017 (Djouzi, Rachida 2018).

Or si les manifestations cliniques des leishmanioses, les cycles épidémiologiques, les différentes techniques de diagnostic immunologiques et moléculaires sont maintenant connues, c'est assez paradoxalement l'agent pathogène, l'élément commun de ces parasitoses qui laisse subsister le plus d'incertitudes et la systématique des leishmanies suscitent encore à l'heure actuelle de vives controverses.

Diverses méthodes moléculaires ont été mises au point (Weyers, 2016) pour détecter les parasites *Leishmania* dans les échantillons cliniques basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) telles que, la PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), analyse par PCR en temps réel. Ces méthodes utilisent généralement des gènes microsatellites comme cibles d'amplification tels que : l'ADN des kinétoplastides (ADNk), les séquences télomériques, l'espaceur transcrit interne (ITS1) (Schönian et al., 2003), les protéines de choc thermique telles que HSP70 (Christopher G. Evans et al 2011) et HSP60. De cette grande variété de cibles moléculaires, ITS1 et HSP70 ont été les marqueurs les plus utilisés en raison de leur abondance dans le nombre de copies à travers le génome de *Leishmania*, ce qui augmente la sensibilité des tests. Cependant, les méthodes traditionnelles présentent de multiples inconvénients, notamment des procédures longues qui entraînent un risque accru de contamination de l'ADN, l'interprétation et le traitement de données complexes, une faible sensibilité, un coût élevé et une réactivité croisée.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel des gènes ARN 7SL et ITS1 dans le génotypage des trois (3) espèces de *Leishmania* présentes dans le Nouveau Monde grâce à l'utilisation de la PCR en temps réel suivie de la fusion à haute résolution (HRM).

Dans la première partie, y aurait une présentation bibliographique de l'agent pathogène et sa classification, ainsi que les principales maladies provoquées par ce dernier qui sont les leishmanioses et leur distribution géographique.

Dans une deuxième partie, des méthodes de diagnostic et de traitements ont été détaillés afin de bien comprendre les différentes techniques utilisées pour la discrimination de l'ADN des différentes espèces de leishmanias de l'ancien et nouveau monde, et cela par la RT-PCR, PCR-RFLP et enfin une étude HRM.

Dans une troisième partie, intitulée matériels et méthodes, y aurait un suivi complet de nos manipulations au laboratoire d'éco épidémiologie de l'IPA, débutant de l'observation microscopique jusqu'à la discrimination des profils génotypique de nos trois espèces *Leishmania.major*, *Leishmania.killicki*, et *Leishmania.infantum* par les différentes techniques moléculaires.

Enfin, dans la dernière partie un résumé de notre mémoire complète se traduira par l'interprétation de nos résultats et l'étude de la spécificité et de la sensibilité de la ARN 7SL HRM ainsi qu'une comparaison avec les différents résultats obtenue lors de l'utilisation de l'ITS1 lors de la PCR-RFLP.

CHAPITRE I :

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

II. Synthèse Bibliographique

Les espèces du genre *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) sont les organismes responsables de la leishmaniose, ainsi ces protozoaires unicellulaires parasites sont généralement transmis entre hôtes vertébrés par la piqûre de phlébotomes femelles suceuses de sang (Diptera, Psychodidae). Environ 20 espèces de *Leishmania* infectent les mammifères et nombre d'entre eux peuvent provoquer la leishmaniose humaine. Des formes infectantes mobiles du parasite (promastigotes métacycliques) se développent dans les intestins de phlébotomes vecteurs compétents, qui les inoculent dans la peau des mammifères. Ils y sont ingérés par les cellules du système phagocytaire mononucléaire (système réticulo-endothélial). Chez l'homme la maladie peut se présenter sous 3 formes : la forme viscérale (LV), la forme cutanée (LC) de type localisée (LCL) ou diffuse (LCD), et la forme muco-cutanée (LCM). Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces de *Leishmania* possédant des tropismes distincts pour les organes profonds, la peau ou les muqueuses de la face ; ainsi que de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

1. L'agent pathogène responsable (*Leishmania*)

1.1. Taxonomie et classification du parasite

Les parasites *Leishmania* appartiennent au Royaume Protista (**Haeckel, 1866**), Classe Kinetoplastea (**Honigberg, 1963 modif. Vickerman, 1976**), Sous-classe Metakinetoplastina (**Vickerman, 2004**), Ordre Trypanosomatida (**Kent, 1880**), Famille Trypanosomatidae (**Döfle, 1901**), Sous-famille (**Guillaume Odonne (2011)**) Leishmaninae et genre *Leishmania* (**Ross, 1903**).

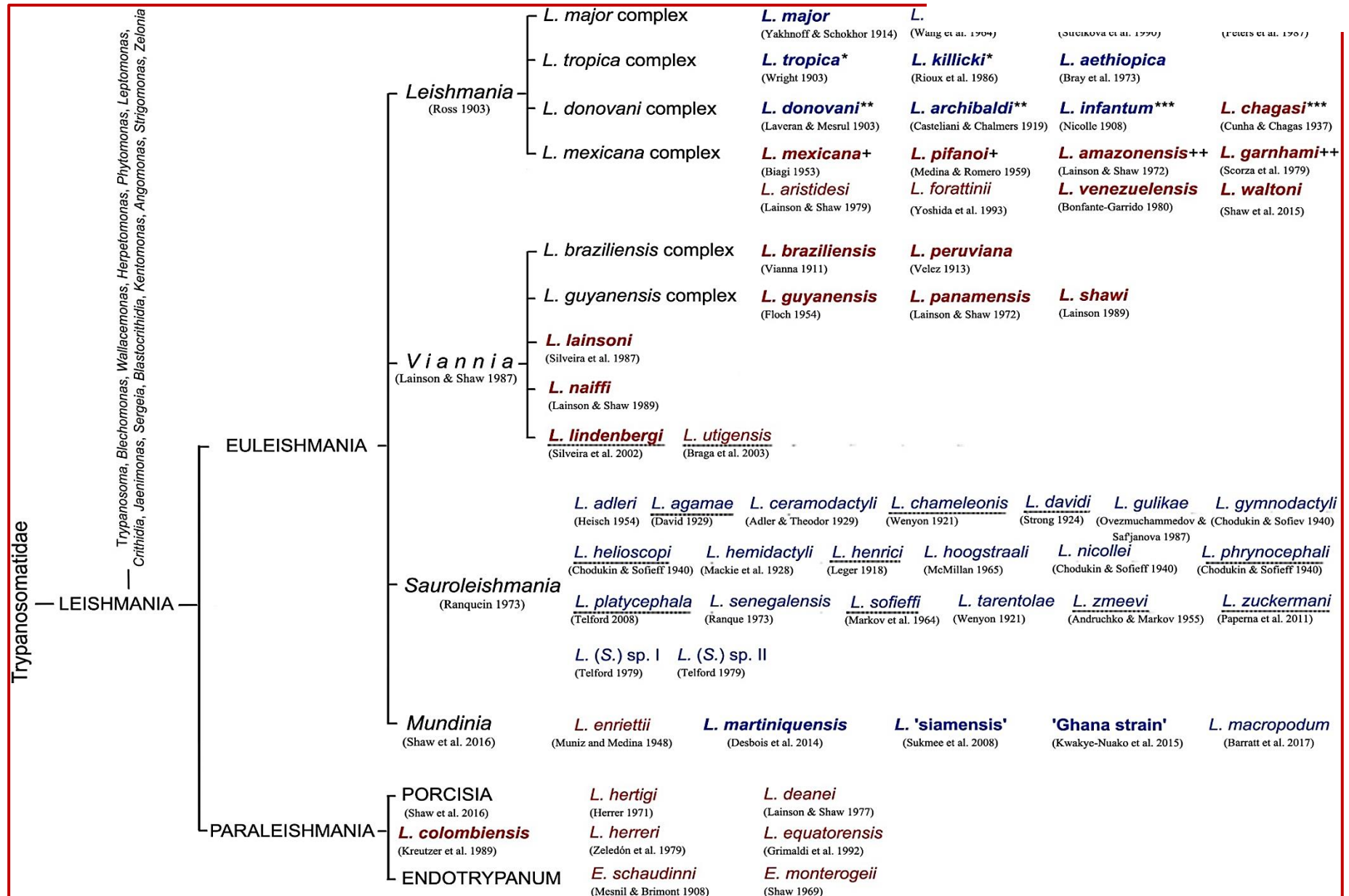


Figure 1 : Classification mise à jour des espèces de *Leishmania* (Mohammad Akhoundi 2017), les espèces pathogènes humaines sont écrits en gras, les espèces de l'ancien monde sont surligné en bleu et celle du nouveau monde en rouge, NB : les noms entre Guillemets ne sont pas considérés comme formelles.

1.2. Morphologie du parasite *Leishmania*

Le parasite est un protozoaire flagellé tissulaire qui présente au cours de son cycle deux stades évolutifs distincts (Nadou, 2005) :

Les promastigotes (Dedet, 2009) sont des parasites extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif du phlébotome femelle. Les promastigotes présentent un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20µm de longueur et de 1 à 4µm de largeur, prolongée par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20µm (Boussaa, 2008) (**Fig.2**), et qui émerge de leur pôle antérieur (**Louis, 2009**). Les promastigotes possèdent plusieurs stades morphologiques dont la plus importante est la forme méta-cyclique qui est la forme infectieuse du parasite (**Bates, 2007**).

Dans ces formes parasitaires, le kinétoplaste est une partie spécialisée du compartiment mitochondrial qui contient l'ADN de cet organe, est situé entre le noyau et la base du flagelle (**Louis, 2009**).

Les amastigotes (étymologiquement = sans flagelle), nichent à l'intérieur des macrophages des mammifères (Boussaa, 2008) (**Fig.3**), au sein de vacuoles dites parasitophores. A ce stade, les leishmanies deviennent ovoïdes ou sphériques et mesurent 2 à 3µm de diamètre (**Badriah Alkathiri., (2016) (Dedet, 2009; Boussaa, 2008; Banuls et al., 2007; Pratt et David, 1981; Garnham, 1965).**

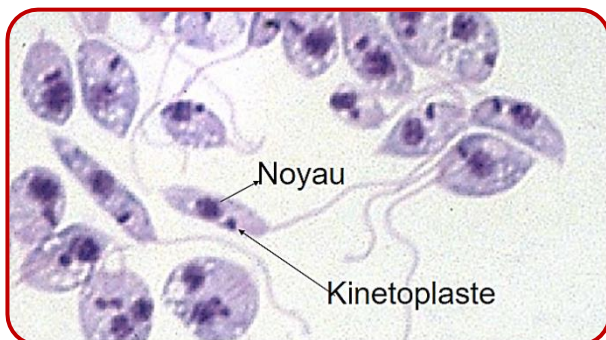


Figure 2 Forme Promastigote (**Abdelkader Zeroual 2022**).

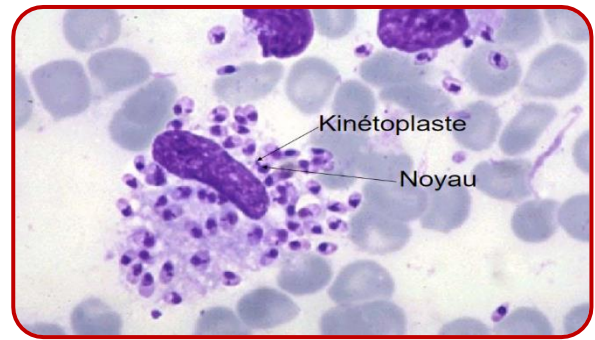


Figure 3 : Forme Amastigote (**Abdelkader Zeroual 2022**)

2. Le vecteur

Le phlébotome ou mouche des sables est un petit diptère de 2 à 3 mm (Pierre et Bernard, 2019) de la famille des Psychodidae appartenant au genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde, et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (Faraj et Himmi, 2020), et il est capable de passer les mailles d'une moustiquaire (Pierre et Bernard, 2019). Le phlébotome représente le vecteur exclusif dans la transmission des leishmanioses (Zhang et Matlashewski, 2001), Seule la

femelle est hématophage pique aussi bien l'homme que les animaux, les promastigotes s'y attachent à son épithélium intestinal (Bachi, 2006), où ils se multiplient et se différencient en forme méta cyclique infestantes qui est transmise à l'hôte mammifère (Rønsted et al., 2002).

3. Espèces réservoirs

Les leishmanioses cutanées ou viscérales se présentent sous deux formes éco épidémiologiques : zoonotique et anthroponotique. Dans forme zoonotique, les mammifères sauvages ou domestiques (surtout le chien) interviennent en tant que réservoirs naturels (O.M.S, 2014), où l'être humain joue le rôle d'hôte facultatif lorsqu'il s'expose accidentellement au cycle de transmission. Ensuite, la forme anthroponotique (O.M.S, 2014) est caractérisée par la présence d'un seul réservoir qui est aussi source d'infection : l'homme (Dedet, 1999 ; Desjeux, 2001, Ouellette *et al.* 2003 ; Desjeux 2004).

4. Cycle évolutif et transmission du parasite

La leishmaniose est transmise à l'hôte définitif par la piqûre du phlébotome femelle, en injectant sa larve au stade infectieux, promastigotes métacycliques, pendant le repas de sang, ces dernières qui sont virulentes sont inoculés dans le derme d'un mammifère lors d'une prochaine pique (SACKS, 2001 ; DEDET, 2009), ce qui engendre une vasodilatation et une immunodépression locale favorable à l'installation du parasite (OLIVEIRA *et al.* 2013) atteignent la plaie de piqûre sont phagocytées par les macrophages puis se transforment en amastigotes, les amastigotes se multiplient dans les cellules infectées et atteignent différents tissus, suivant l'espèce de *Leishmania* qui est impliquée.

Les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang sur un hôte infecté quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes (Valério-Bolas et al., 2019; Oualha et al., 2019; Loría et Andrade, 2020). Dans l'intestin du phlébotome, les parasites se différencient en promastigotes, qui se multiplient et se différencient en promastigotes métacycliques et migrent dans la trompe du phlébotome (Estevez, 2009).

5. Forme clinique

Près de 20 espèces du genre *Leishmania* (L.) évoluant dans des systèmes hôtes-parasites spécifiques sont pathogènes pour l'homme (OMS, 2010).

Les leishmanioses peuvent se manifester sous plusieurs formes cliniques dont deux principales formes : viscérale (LV), cutanée (LC). Ces pathologies diffèrent dans leur gravité et leur impact en santé publique (OMS, 1990).

5.1. Leishmaniose cutanée LC

Les leishmanioses cutanées se manifestent par l'apparition de petits nodules au niveau de la peau puis évoluent jusqu'à la destruction globale des tissus muqueux qui peut persister pendant des mois ou même des années dans certains cas avant que les lésions ne guérissent spontanément et laissent des cicatrices plates, hypo-pigmentées et atrophiques (**Pearson et al ;1996Aoun et al., 2014**). Bien que la LC guérisse habituellement et ne menace pas la vie, le patient infecté peut être psychologiquement et socialement endommagé.

5.2. Leishmaniose viscérale LV/ KALA AZAR

La forme la plus grave, et potentiellement mortelle en absence de traitement. Elle est habituellement causée par *L. donovani* ou *L. infantum* (**chelsea et al., 2022**). Les symptômes cliniques incluent la fièvre, les douleurs abdominales, la diarrhée, l'anémie, la perte de poids, la splénomégalie, l'hépatomégalie et la cachexie (**GUERIN et al., 2002**). La LV est également apparue comme une infection opportuniste chez les patients infectés par le VIH ou autres affections immunodéprimantes (**Pearson et al., 1996**).

6. Répartition géographique

6.1. Dans le monde

En 2021 Plus de 95% des nouveaux cas de LC notifiés provenaient de la Région de la Méditerranée orientale (79%) et de la Région des Amériques (17%). La Région de la Méditerranée orientale et l'Algérie constituent un foyer éco-épidémiologique, car elles notifient à elles deux 82% (181 971) de tous les nouveaux cas de LC. Neuf pays (Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Irak, Pakistan, Pérou, République arabe syrienne et République islamique d'Iran) ont notifié >5000 cas de LC chacun, pour un total de 195 283 cas, ce qui représente >85% des cas signalés à l'échelle mondiale (**OMS 2021**) (**fig.4**).

En ce qui concerne la LV, Il existe 3 foyers éco-épidémiologiques de la LV : l'Afrique de l'Est (Érythrée, Éthiopie, Kenya, Ouganda, Somalie, Soudan et Soudan du Sud), qui compte 66% de tous les cas signalés dans le monde ; le sous-continent indien (Bangladesh, Inde et Népal), avec 12% des cas ; et le Brésil, avec 16% des cas. Quatre pays (Brésil, Kenya, Inde et Soudan) ont notifié >1000 cas de LV chacun, représentant à eux seuls 68% de tous les cas signalés dans le monde (**OMS 2021**).

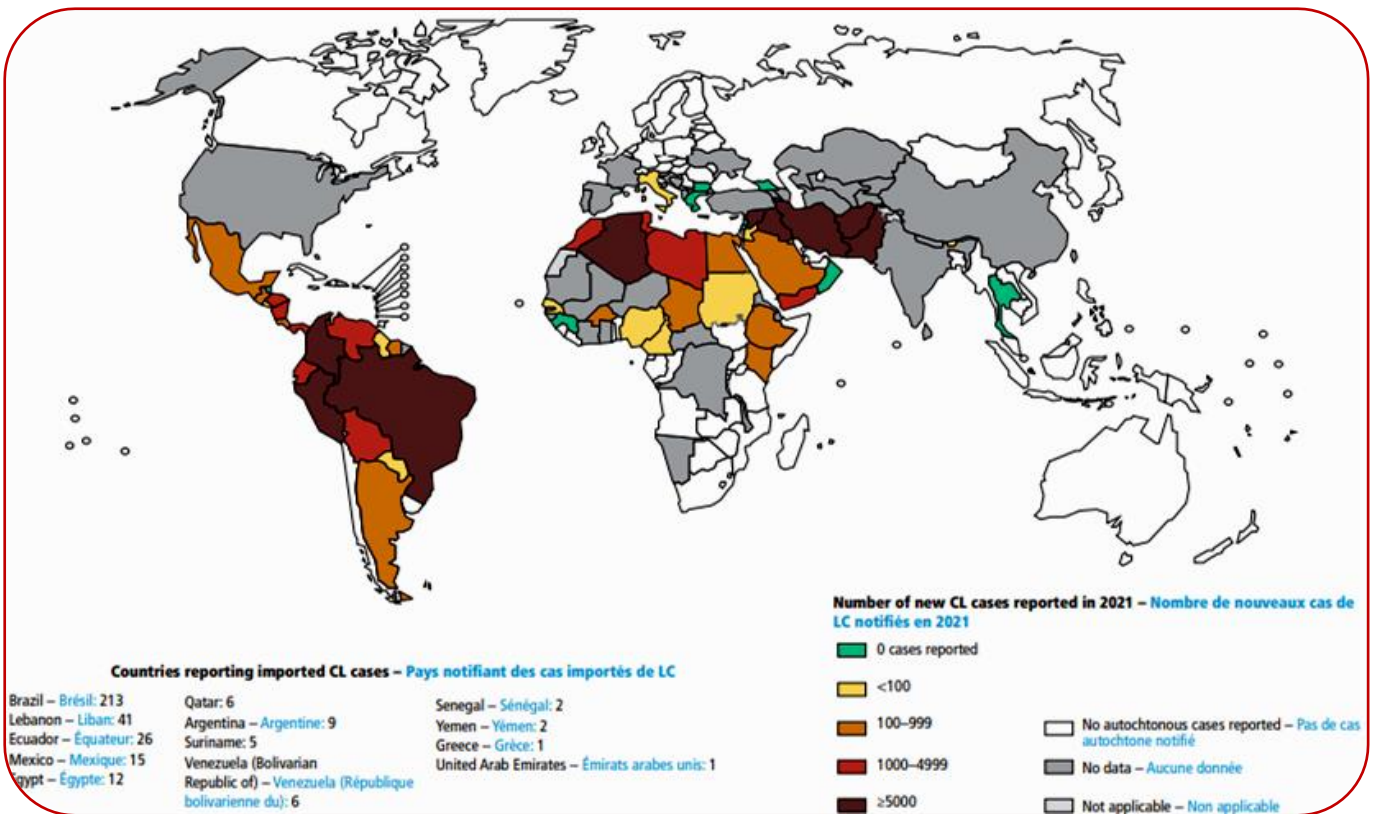


Figure 4 : Situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le monde (OMS, 2021).

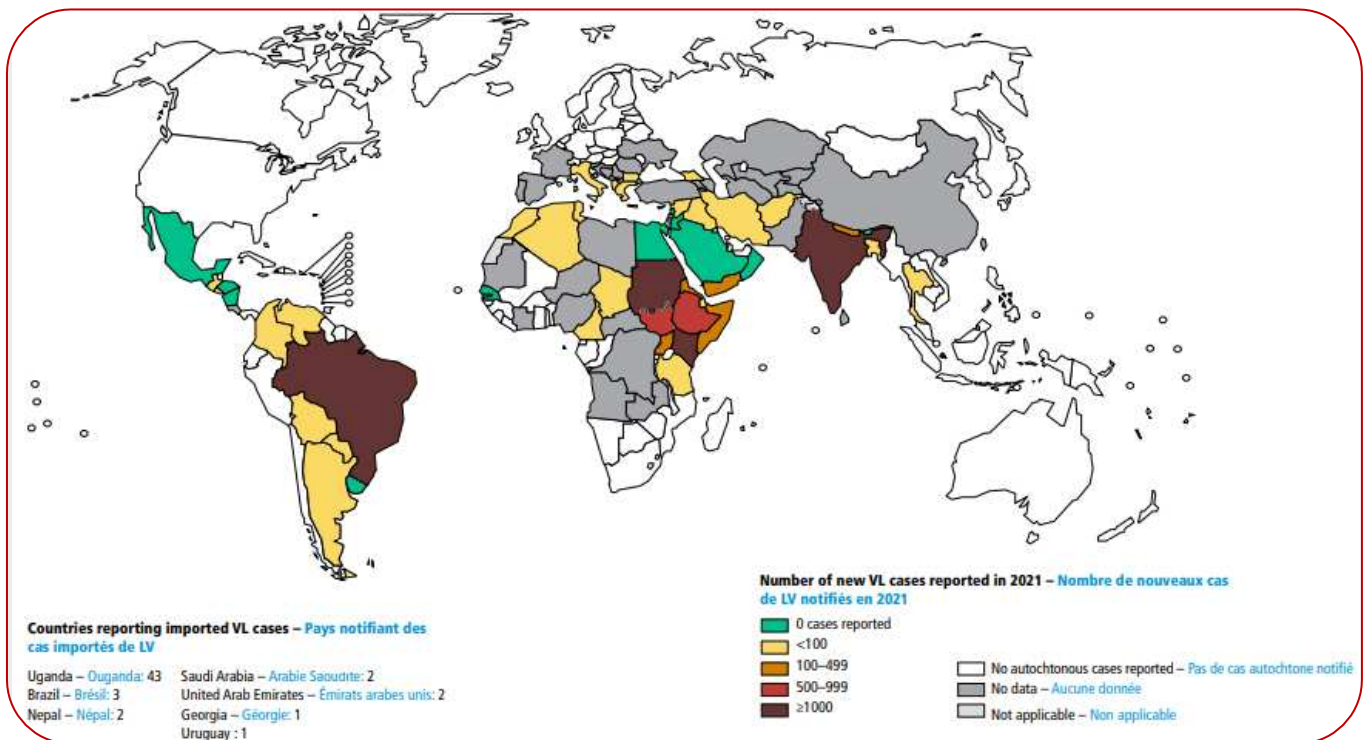


Figure 5 : Situation épidémiologique de la leishmaniose viscérale dans le monde (OMS, 2021).

6.2. En Algérie

Deux types de leishmanioses sont présentes en Algérie, la Leishmaniose cutanée et LC et *L. Viscérale*. La LC Zoonotique causée par *L. major* est répartie sur les zones arides et semi arides (Harrat et al., 2009). Les foyers anciennement connus sont Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest (IZRI et al., 1992), pour ce qui est de la leishmaniose cutanée du Nord (LCN) engendré par *L. infantum* s'étend tout au long du littoral et du Tell algérien et sa répartition géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale, allant d'Oran, Tlemcen à Ouest jusqu'à Annaba, Sétif, Collo à l'Est (Cherif, 2014).

La leishmaniose viscérale quant à elle, s'étend sur tout le Nord du pays au niveau des étages bioclimatique humide et subhumide (Figure 6) (Icheboudene, 2018). Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de la LCZ. Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% de cas. Le plus intéressant était l'identification de *L. tropica* pour la première fois au centre nord et nord-ouest de l'Algérie chez des patients algériens n'ayant jamais quitté le territoire national (Djouzi, 2018).

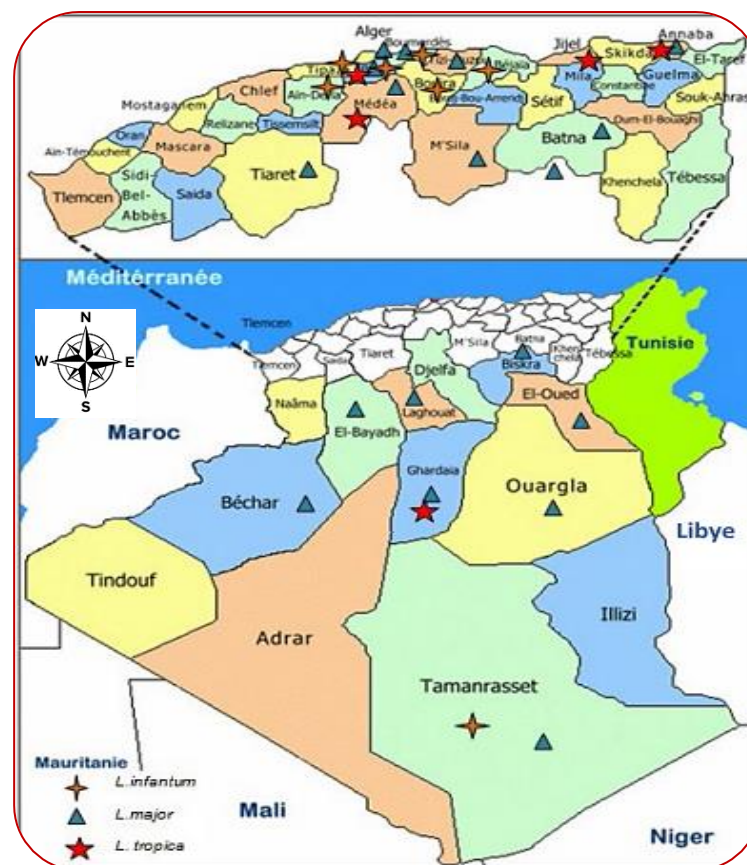


Figure 6 : Distribution géographique de la leishmaniose en Algérie due à *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*. (SAS 2019).

7. Structure génomique de *Leishmania*

7.1. Génome nucléaire

Le génome nucléaire de *Leishmania* est organisé en 36 chromosomes et la taille est estimée à 36 +/- 1Mb par génome haploïde (**Winker et al, 1996**). Une particularité caractérise ces chromosomes, ils ne se condensent pas au cours du cycle cellulaire (**Vickerman et al...1970**), ce qui complique la visualisation des chromosomes, cependant, à l'aide d'une électrophorèse en champs pulsé, on a pu visualiser les chromosomes des leishmanies.

La structure de ces chromosomes semble comparable à celle des autres protozoaires, avec un noyau central et de longues étendues de séquences répétées télomériques et subtelomériques (**Blaineau et al, 1991**). Au niveau des télomères, on retrouve 6×10^5 séquences d'ADN hexamériques répétées en tandem (CCCTAA) n. Ces régions télomériques comportent un seul site de coupure pour l'enzyme de restriction Bal 31 (**Van et al, 1984**). L'une des principales caractéristiques du génome des Leishmanies est sa richesse en G/C (guanine / cytosine) qui peut atteindre en moyenne 60%, et peut être supérieure dans les régions codantes (**Alvarez et al, 1994**). Peu complexe, le génome comporte 60 à 65% des séquences uniques, 13 % des séquences moyennement répétées, et environ 12% de séquences fortement répétées (**Ouellette et al, 2003**).

7.2. Génome kinétoplastique

Le génome kinétoplastique équivalent du génome mitochondrial des mammifères représentant 5% à 25% de l'ADN cellulaire est constitué de deux catégories de molécules d'ADN circulaires, les maxi cercles et les mini cercles (**Simpson 1987**), peuvent avoir des unités convergentes ou une combinaison d'unités convergentes et divergentes (**Myler et al ,2000**).

Les maxi-cercles impliqués dans les phénomènes « d'Editing » (insertion / délétion d'uridine) de l'ARN (**Kabb et al, 2001**) (**Gott, 2003**), et les maxi-cercles codant pour les ARN guides et les ARN ribosomiques. Ce mécanisme « d'Editing » commun à tous les kinétoplastides, permet d'exprimer les transcrits des maxi-cercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités, la formule « insertion » d'uridine semble être majoritaire à tel point que la taille du transcrit final peut quasiment avoir doublée (**Lodish et al, 2000**).

Mécanisme d'édition de l'insertion et de la suppression de U dans les mitochondries des trypanosomes. Les enzymes qui exécutent chacune des étapes de l'édition de l'insertion et de la suppression de U dans les mitochondries des trypanosomes sont présentées dans la (**Fig.7**).

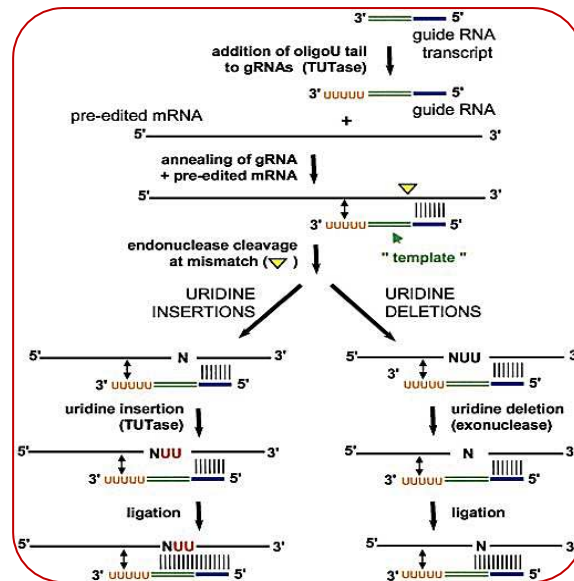


Figure 7 : Schématisation du mécanisme d'édition chez les kinétoplastidés, Une insertion (voie de gauche) ou délétion (voie de droite) d'uridines. (Gott, 2003) (■) Le site de clivage de l'ARNm pré-édité en amont du duplex d'ancrage est représenté, (■) la région de guidage, (▽) la région d'ancrage, (U) la queue oligo.

8. Détection de *Leishmania* dans les infections

Afin de détecter les espèces *Leishmania* au sein d'une infection, différentes méthodes parasitologique, sérologique et moléculaires basées sur des marqueurs moléculaires spécifiques aux espèces sont utilisées.

8.1. Méthodes parasitologiques

Tels que l'examen microscopique basé sur des frottis de biopsie de lésions dans le cas de LC et d'aspiration de la rate, de la moelle osseuse et ganglions lymphatiques pour la LV.

La présence des parasites directement est aussi possible par la culture, qui a pour but de révéler la présence des parasites directement et augmenter leur nombre dans les milieux de cultures. Le prélèvement est généralement ensemencé sur gélose au sang NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) (Pearson, 1996). D'autres milieux peuvent être utilisés tels que les milieux d'Evans, de Tobie, Schneider et le RPMI-1640 (Mihoubi, 2006).

Par ailleurs, d'autres méthodes sont utilisées, tel que le test Monténégro, le xénodiagnostic, ainsi que la PCR conventionnelle.

8.2.Méthodes sérologiques

Les techniques sérologiques sont très utilisées dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale et canine. Elles sont basées sur l'identification des anticorps sériques (Izri et Bellazoug, 2007 ;Dedet, 2009). La LV et la leishmaniose canine s'accompagnent d'une réponse humorale, avec une apparition de titre élevé d'anticorps circulants (Alvar *et al.*, 2004).

Deux tests sont principalement utilisés : Le test Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbentAssay) et le test d'Immunofluorescence indirecte (IFI). Il s'agit de techniques sensibles et spécifiques surtout en ce qui concerne la leishmaniose viscérale (Izri et Bellazoug, 2007 ; Dedet, 2009).

9. Marqueurs moléculaires

9.1.ADN chromosomique

9.1.1 ADN ribosomique (ADNr)

Les gènes de l'ARN ribosomal qui se présentent sous forme de multiples copies répétées tête-bêche en tandem, se situe principalement sur le chromosome 27. C'est dans ce dernier que se trouve les régions ITS idéale pour le typage des espèces cause de leur variabilité (Schönian *et al.*, 2001 , Kuhls *et al.*, 2005).

La grande sous unité ribosomique (LSU) de l'ADNr est composé de ARNr 28S ;5,8S et 5S dont le gène est transcrit séparément par l'ARN Pol (III), tandis que la petite sous-unité ribosomique (SSU) contient de l'ARN 18S, afin de produire les ARNr 18S et 5,8 et 28S de (LSU) de (SSU) codés par cistron ribosomal qui est transcrit par l'ARN poly I(Torres-Machorro *et al.*, 2010).

L'unité d'ADNr après traitement des transit et suppression des espaceurs transcrits internes ITS et externes ETS est composé d'une région intergénique qui est constitué d'un espaceur non transcrit NTS et d'un ETS (Sollner-Webb et Mougey, 1991).

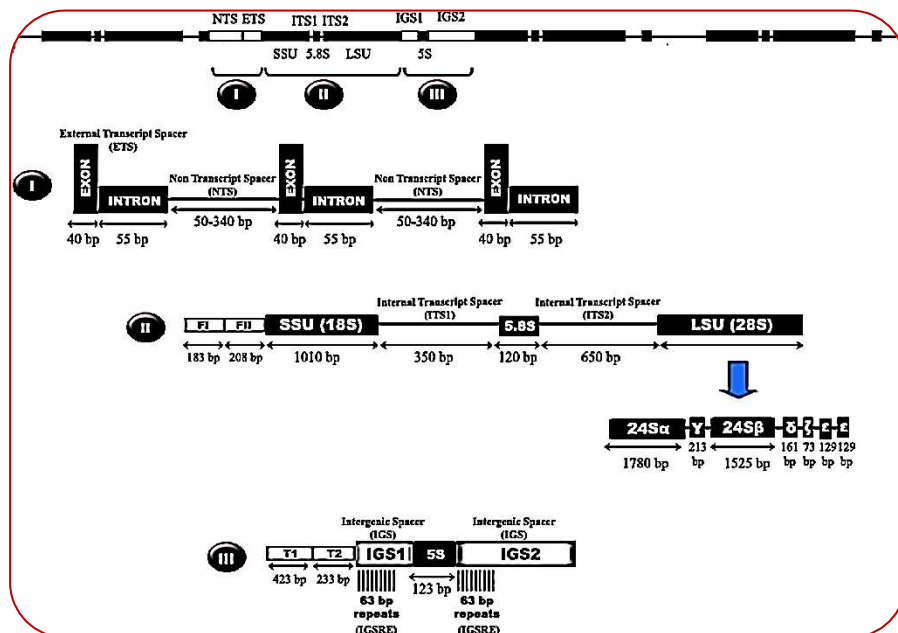


Figure 8 : Carte génétique des gènes d'ADNr (Akhoundi 2017)

- **Unité de transcription d'ARN ribosomal**

ARNr 18s ARN structural de la petite sous-unité ribosomale. C'est une unité de référence pour reconstruire des relations phylogénique grâce à sa haute conservation génique.

ARNr 5,8s Composant non codant du LSU ribosomique qui fait du précurseur 45s qui contient également les ARNr 18s et 28s.

ARNr 28s Ribosome, qui catalyse la formation de liaisons peptidiques. *Leishmania* sont composés de 2 grandes molécules (24s α et 24s β) et 4 petite molécules d'ARNr (Y, ζ , δ , ϵ) (Soto et al., 2004).

ARNr 5s Composant structurel et fonctionnel du LSU du ribosome, rarement utilise en phylogénie moléculaire en raison de son faible contenu informationnel (Paule et White, 2000).

- **Espaceur transcrit interne : ITS 1\ITS2**

L'espaceur transcrit interne ITS est l'ADN espaceur non codant situer entre les ARNr de la petite et grande sous-unités ribosomales, ils sont considérés comme cible lors du typage du sous genre *Viannia*. La région ITS1 est comprise entre les gènes de l'ARNr 18s et ARNr 5,8s (Schönian et al., 2003) et composé de 50 à 350 pb, c'est une région cible pour PCR *Leishmania* en raison de sa haute conservation tandis que son polymorphisme permet de différencier les espèces telle que *L. aethiopico*, *L. tropica*, *L. major*, *L. turanica* et les complexes d'espèces telles que *L. donovani*, *L. mexicana* (Cupolillo et al., 1995, Schönian et al., 2001, Schönian et al., 2003, Mauricio et al., 2004, Odiwuor et al., 2011).

La région ITS2 avec une longueur de 50 à 650 pb, situé entre les gènes 5,8s RNA et LSU ARNr, son amplification a révélé des différences substantielles entre l'ancien et nouveau monde et les complexes d'espèces.

- **Région d'espacement intergénique (IGS)**

Les régions d'espacements intergéniques IGS est un élément génomique moins conservé que les gènes d'ARNr, et sa taille varie selon les espèces à l'exception de *Sauro leishmania* et *Leishmania* (Orlando et al., 2002) dont les la taille des IGS se rapproche ce qui les placent comme étant l'éléments appropriée de l'évolution entre les espèces étroitement apparentées de *Leishmania*.

- **Les gènes mini-exon (ARN leader épisse, ARNSL)**

Ce sont des protistes kinetoploystides présent dans 200 copié répétées en tandem (Zelazny et al., 2005, Azmi et al., 2010), chacune de ces parties principales : en premier, un mini Exon

transcrit de 39Pb hautement conservé entre les régions 1 à 9 et 21 à 39(Sturm et al. 2001), pèsent à l'extrémité 5' des ARNm ce qui le désigne comme un bon candidat pour quantifier l'expression des gènes. En second **un intron** modérément conserve de 55 à 101Pb. Et enfin, **un espaceur** excrément variable non transcrit qui permet l'identification entre les espaces de l'ancien et nouveau monde.

- **L'espaceur transcrit externe (ETS)**

Situe à l'extérieur de l'ARN structurel sur un transcrit précurseur commun, Espaceur étroitement lie à l'ITS d'une taille de 1kb assez similaire entre les différentes espèces de *Leishmania* : *L. amazonis*, *L. chagasi* (syn *L. infantum*), *L. donovani*, mais tout aussi différente ce que permet la distinction entre *Sauroleishmania* et *Leishmania* (Uiana et al., 1996).

- **Espaceur non transcrit (NTS)**

L'espaceur d'ARNr, qui désigne la machinerie de la transcription. (Sollner-Webb et Mougey, 1991).

9.2.ADN non chromosomique

9.2.1. ADN kinétoplastique mitochondrial

En raison de la nature variable des séquences mini et maxi cercle de l'ADN c'est la cible idéale pour la détection et le typage de *Leishmania* (Jara et al., 2013).

- **Maxi cercles d'ADNk**

Le maxi cercle est constitué d'une région conservée qui code pour les protéines et l'ARNr et d'une région variable non transcrite (VR), celle-ci est composée de longues séquences répétées riche en GC entrecoupé et de courte répétition riche en AT. Le maxi cercle qui code pour la sous-unité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, et une sous-unité ribosomale et 2ARNr (12 et 9s) cela dit ils codent 3 cadres de lecture ouverte non attribué MURF1, 2, 4 codant pour des protéines. Les gènes des maxi cercles divergent au niveau de conservation vont de la sous- unité COI cytochrome oxydase hautement conservé à la COIII le moins conservé (Ibrahim et Barker, 2001).

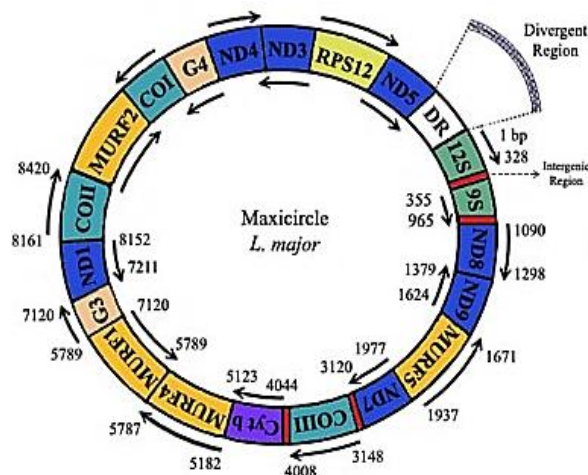


Figure 9 : la structure des max cercle de Leishmania (L. major)

➤ Les éléments génétiques les plus importants des maxi cercles :

- **ARN métoribosomiques 9S et 12S** : Ce sont des ARNr mitochondriaux les plus courts connu et hautement conservé parmi ces flagelles.
- **La cytochrome oxydase (CO)I, II, III** : Forment les 3 sous-unités du complexe enzymatique terminal de la chaîne respiratoire, le gène COI est d'une organisation originale du fait qu'il est codée sur le brin opposé du Maxi cercle par rapport aux autres, pour ce qui est de l'étude des relations phylogénétique des espèces de *Leishmania* ils ont utilisées le gène le moins conserver COI pour l'analyse des variations au sein du complexe *L. donovani*.
- **MURFS et ND** : La variation des gènes MURFS ronds leur but inconnu et donc inconvenients en diagnostic, ainsi que la réduction du complexe Trypanosomicide ND dans des conditions de culture exclu l'implication du gène ND1 du complexe NADH déshydrogénase dans la catalyse (**Verner et al., 2015**).
- **Cytb** : Sous unité côté du complexe cytochrome réductase et cytochrome b (Cytb), séquence conserver d'où l'utilité dans le typage moléculaire (**Luyo-Acero et al., 2004, Kato et al., 2007, Yang et al., 2013**).
- **Région divergente (Dr)** : Représente des deux types de séquences répétées, de langue répétition riche en GS qui alternent avec des séquences de courtes répétition région AT et de 12 kb chez *L. major* (**Flegontov et al., 2006**).
- **ARN guide (ARNg)** : Joue un rôle dans l'insertion et la délation précise des uridines dans 12 des 18 transcrit du Maxi cercle (**Estévez et Simpson, 1999 , Lukeš et al., 2005**).
- **Mini cercles d'ADNk : structure L. major.**

C'est petit cercle représente 95 % de la masse totale de l'ADNK, car ce sont des milliers de copie par cellule qui sont spécifiques à chaque espèce, ce qu'il est de potentiel cible pour la détection de *Leishmania* dans des échantillons sinologique à faible charge parasitaire.

Chaque mini cercle est constitué d'une à quatre régions conserver de 150 à 200 Pb codant pour un seul ARN guide (CSB, I, II, III) qui sont de longueur variable dans tout le genre *Leishmania*, mais ces derniers ne peuvent identifier *Leishmania* qu'au niveau, sous générique, par contre la région variable des mini cercles peut être utilisé pour une discrimination précise entre les espèces de *Leishmania* et entre les souches (**Smyth et al., 1992, Piarroux et al., 1993, Minodier et al., 1997, Morales et al., 2001, Salotra et al., 2001, Lachaud et al., 2002, Gangneux et al., 2003, Jirku et al., 2006**).

10. Outils moléculaire utilisés dans l'étude du polymorphisme et distinction de *Leishmania spp*

10.1. Distinction au niveau du genre

La différenciation au niveau du Genre est basée en général soit sur l'amplification de l'ADN kinétoplastique, ou une petite séquence de l'ADN ribosomale précédemment citées. Les amorces du kDNA et SSU rDNA permettent l'identification des Trypanosomatidae comme : *Leishmania*, *Sauroleishmania* et *Trypanosoma*. Ces amorces sont utilisées dans la PCR en temps réel afin de déterminer la charge parasitaire dans les échantillons des patients.

10.2. Distinction au niveau de l'espèce

10.2.1 PCR-RFLP

La PCR-RFLP est l'une des techniques de génotypage les plus connues et les plus utilisées. Elle est basée sur la comparaison de la longueur des fragments de restriction d'une région bien déterminée du génome préalablement amplifié par PCR afin de déterminer le polymorphisme au niveau des sites de restriction des endonucléases au niveau de l'allèle.

Cette approche permet la détection et l'identification des espèces de *Leishmania* en ayant recours à différents gènes cibles tels que : les gènes de l'ARN ribosomiaux, les gènes mini-exon et l'ADN kinétoplastique. Son pouvoir discriminatif avec différentes cibles a été prouvé dans plusieurs études en particulier lorsqu'elles sont appliquées à ITS1 (Schönian et al., 2003) et mini-exon (Minodier et al., 1997) ou la hsp70 (Montalvo et al., 2012), mais les bandes sont parfois très complexes à analyser et elle requiert une grande quantité d'ADN et son coût relativement élevé (Marfurt et al., 2003, Akhoundi et al., 2013).

10.2.2 PCR quantitative

La PCR quantitative (ou qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces) (Mol Aspects Med., 2006)

10.2.3 PCR-HRM

La HRM (High Resolution Melt, Courbe de Fusion à Haute-Résolution) permet de distinguer des amplicons (produits PCR) variant d'un minimum de 1 base... (Avec plus ou moins de difficulté selon que la mutation concernée est une transversion A/T ou un INDEL par exemple). Cette technique est l'alliance de machine qPCR permettant un contrôle fin de la

température et d'agents intercalants de l'ADN saturants et moins « toxiques » pour la PCR comme peut l'être l'Eva Green (Nasereddin et Jaffe, 2010) (Hernández et al., 2014).

10.2.4 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)

C'est une technique basée sur une PCR pour amplifier des fragments d'ADN en utilisant seulement une courte amorce choisie arbitrairement (Toledo et al., 2002). Le fragment d'ADN est amplifié si les deux sites d'hybridation sont proches (distance inférieure à 3 kb) l'un de l'autre sur les brins opposés. Les produits d'amplification obtenus sont généralement analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Zemanová et al., 2004). Cette technique permet la discrimination entre les espèces de *Leishmania* et l'estimation des relations génétiques à l'échelle inter et intraspécifique (Botilde et al., 2006).

Le problème de la technique RAPD vient du fait qu'elle est particulièrement sensible à la concentration initiale d'ADN lors de l'amplification (Schönian et al., 1996). Ainsi il peut facilement y avoir des variations d'intensité entre bandes même si elles sont présentes chez différentes souches (Eisenberger et Jaffe, 1999).

10.2.5 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Les AFLP sont des marqueurs moléculaires nucléaires qui mettent en évidence un polymorphisme de sites de restriction et un polymorphisme d'hybridation d'amorce arbitraire. Ils sont reproductibles et révèlent un grand nombre de locus qui sont répartis régulièrement sur le génome et très polymorphes. Elle se repose sur trois phases successives : une digestion-ligation, une amplification pré-sélective et une amplification sélective, ainsi comparable à RAPD.

10.2.6 LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification)

C'est une méthode de diagnostic rapide, précise et rentable pour les maladies infectieuses notamment le diagnostic des *Leishmania* sp. C'est une méthode d'amplification d'acide nucléique simple et rapide, développée exclusivement par Eiken Chemical Co., Ltd et qui amplifie l'ADN avec une spécificité, une efficacité et une rapidité élevées dans des conditions isothermes (Khan et al., 2012), (Ghasemian et al., 2014) (Sriworarat et al., 2015). Elle se caractérise par l'emploi de quatre amorces spécifiquement conçues qui reconnaissent un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible. La réaction utilise une ADN polymérase dotée d'une activité de déplacement du brin, et se déroule à une température constante avoisinant les 65°C/1 heure. Les opérations d'amplification et de détection de la séquence cible peuvent ainsi être effectuées en une seule étape (Notomi et al., 2000).

11. Typage des souches de *Leishmania*

11.1. Analyse biochimique des isoenzymes (MLEE)

En épidémiologie C'est la technique « gold standard » pour l'identification des parasites *Leishmania* aux niveaux spécifiques et sub spécifiques et pour les études sur la diversité génétique. Son champ d'action consiste à marquer la mobilité électrophorétique (**Jamjoom et al., 2004**). Des enzymes codées par les gènes de ménages. Ainsi, les parasites sont identifiés par leur profil enzymatique (**Rioux et al., 1990**) et sont regroupés en unités taxonomiques appelé zymodèmes, dont chacun se compose de toutes les souches présentant exactement les mêmes profils pour tous les systèmes enzymatiques de l'étude. Et cela par deux techniques l'électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques et l'iso électrofocalisation (IEF).

Cependant, cette technique est très exigeante, elle a besoin de culture en masse des parasites *Leishmania* parasites avec une grande quantité de protéines ce qui la rend assez coûteuse (**Schönian et al., 2010**).

11.2. Multi locus sequence typing (MLST)

Elle consiste en un séquençage de plusieurs régions génétiques spécifique non liés appelés locus, après les avoir amplifiés par PCR, cette méthode possède un pouvoir étendu pour différencier des échantillons dans lesquels le nombre total de biomarqueurs distinct est important.

11.3 Le typage microsatellite multilocus (MLMT)

Les microsatellites (SSR : Simple Sequence Repeats) sont des répétitions en tandem de motifs d'ADN qui permettent le développement de marqueurs hautement polymorphes (variation basée sur le nombre de répétitions), multi-alléliques et co-dominants (distinction des homozygotes et hétérozygotes). Cette variation est en raison des mutations lors de la réplication de l'ADN impliquant des "slippage" de l'ADN polymérase (**Jamjoom et al., 2004, Schwenkenbecher et al., 2006, Schönian et al., 2010**).

Le génome leishmanie est relativement riche en séquences microsatellite, Ces Marqueurs ont été utilisés avec succès pour la caractérisation et la détection de la variation génétique pour quelques souches appartenant au Genre *Leishmania* : *L. donovani*/ *L. infantum* complexe *L. major* *L. tropica* et pour les espèces du sous-genre *L. Viannia* (**Oddone et al., 2009**).

Tableau I : Comparaison des outils moléculaires utilisés pour les études épidémiologiques de la leishmaniose méditerranéenne (Emna siala et al, Tunis Med. 2022).

Cible	Isoenzyme	Empreinte	ADNk	Cpb/gp 63	ITS1	Gènes de ménages	Microsatellites
Méthodes	MLEE	DNA-FP	PCR-RFLP	PCR-RFLP	Séquençage	Séquençage MLST	Analyse fragment MLMT
Résolution							
Espèce	+	+	-	+	+	+	-
Clade	+	+	-	+	+	+	+
Souche	-	(+)	+	(+)	(+)	-	+
Type d'échantillons	Culture	Culture	Échantillon clinique	Échantillon clinique	Échantillon clinique	Échantillon clinique	Échantillon clinique
Reproductibilité	Bonne	Pauvre	Pauvre	Bonne	Bonne	Bonne	Bonne
Comparaison inter laboratoire	Possible avec la même méthodologie	Difficile	Difficile	+	+	+	+
Haut débit	-	-	-	-	+	+	+

« + » : oui ; « - » : non ; « (+) » : signifie un pouvoir discriminatoire limité pour la différenciation des souches en fonction des espèces étudiées.

CHAPITRE II :

MATÉRIELS ET

METHODES

III. Matériels et méthodes

La partie expérimentale de ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie dans le but de déterminer la spécificité et sensibilité de la HRM dans l'identification des espèces de *Leishmania*.

1. Matériels biologiques

1.1. Souches

Toutes les espèces parasites de *Leishmania* utilisées ont été décongelée à partir de la Cryo banque du laboratoire d'Eco épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'institut pasteur d'Alger, après avoir été conservé dans de l'azote liquide. Les caractéristiques de souches utilisées sont présentes dans le **tableau II**. De plus quinze (15) souches ont été utilisées dont six (6) souches de *L.killicki*, cinq (5) souches de *L. infantum*, quatre (4) souches de *L.major* (**annexe 1**).

Tableau II : Caractéristiques des souches de références de *Leishmania* utilisées dans la mise au point de la HRM.

Code IPA de la souche	Référence OMS des souches	Origine des souches	Formes Cliniques	Espèces
LIPA 330/13	MHOM/DZ/2013/LIPA 330/13	Msila	LC	<i>L. major</i>
LIPA 270/11	MHOM/DZ/2011/LIPA 270/11	Tizi Ouzou	LV	<i>L. infantum</i>
LIPA 10/05	MHOM/DZ/2005/LIPA 10/05	Ghardaia	LC	<i>L. killicki</i>

2. Méthodes

2.1 Culture parasitaire

Les milieux de culture préparés pour la culture et l'enrichissement des leishmanies sont : le milieu semi solide NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté de 10% de SVF (sérum de vœu fœtal), préparés au niveau de laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire IPA.

Les cultures ont été maintenues sur milieu NNN dans une étuve à 25°C puis contrôlées sous microscope à un grossissement G x 40 tous les 5 à 6 jours. Elles ont été ensuite repiquées sur le milieu RPMI supplémenté de 10 % de SVF et deux (2) gouttes d'urines pour obtenir une concentration de plus de 5 millions de parasites par récolte utilisée par la suite pour les extractions de l'ADN.

2.2 Récolte des parasites cultivés sur milieu RPMI

Les cultures riches et les parasites de bonne mobilité ont subis 4 lavages par centrifugation à 3000 tr/min à 4°C pendant 15min en intercalant avec 3 lavages par du PBS (phosphate-buffered saline). Une quantité équivalente à celle du surnageant jeté après chaque centrifugation, a été ajoutée aux culots observés, afin de rincer les cellules et enlever toute trace de milieu.

2.3 Numération des leishmanies

Les parasites sous leurs forme promastigotes sont immobilisées avec du formol (1µl de la suspension parasitaire plus 9 µl de formol). Les parasites de chaque souche sont comptés sous microscope photonique au grossissement Gx40 sur un champ de vision de cinq carreaux de la cellule Thoma. Le nombre de parasite par ml de la suspension a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Nombre de parasite/ml} = \frac{n}{5} \times 16 \times \frac{1}{d} \times 10^3$$

n : nombre total de parasite compté, 5 : nombre de carreaux compté. 16 : nombre de carreaux de la cellule Thoma., d : facteur de dilution. 10³ : volume initial de la suspension parasitaire.

2.4 Extraction de l'ADN

2.4.2 Méthode d'extraction par phénol-chloroforme

Cette étape de travail permet d'extraire l'ADN des culots parasitaires des différentes espèces de *Leishmania* nécessaire pour les méthodes qui suivent, ciblage de séquences ITS et de son amplification.

L'extraction par solvant est souvent utilisée afin d'éliminer les contaminants de l'ADN qui doit impérativement être purifié à partir de matériels biologiques dans des conditions optimales de qualité et de quantité, la méthode la plus couramment utilisée est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Cette méthode repose sur la différence de solubilité entre les acides nucléiques, des protéines et les lipides dans deux phases non miscibles : la phase organique de phénol chloroforme et la phase aqueuse (souvent le tampon de lyse) (Denis et al., 2018).

La première étape d'extraction au phénol permet de déprotéiniser l'échantillon en séparant les protéines qui sont précipitées à l'interface, les débris cellulaires et lipidiques qui se retrouvent

dans la phase phénolique hydrophobe et les acides nucléiques qui se retrouvent dans la phase aqueuse. L'utilisation dans une seconde étape du chloroforme sur la phase aqueuse permet d'éliminer toute trace de contamination phénolique. Une fois isolé dans la phase aqueuse, les acides nucléiques sont précipités avec de l'éthanol. Le culot d'ADN est solubilisé dans le tampon TE (**Annexe2**) ou de l'eau.

- **La lyse parasitaire**

Un volume de 200 µl de tampon de lyse a été ajouté avec 12,5 µl de SDS (sodium dodecyl sulfate) 10%, et 20 µl de protéinase K, dans chacun des trois micro tubes, qui ont été mélangé à l'aide d'un vortex et incubés toute une nuit à 55 C°.

- **Extraction phénol-chloroforme**

Après incubation, Les lysats des suspensions parasitaires ont été transférés dans des tubes Eppendorfs stériles de 1.5ml sous une hotte chimique, puis un volume de 500ul de phénol chloroformes/Alcool isoamylique a été additionné dans chaque tube. Ils ont été ensuite incubés pendant 5min jusqu'à l'obtention d'un liquide laiteux qui a été centrifugé à son tour à 5000 tours/min pendant 15min. Par la suite, la phase supérieure a été transférée dans nouveaux microtubes.

- **Précipitation de l'ADN**

Pour la précipitation de l'ADN, un volume de l'acétate de sodium équivalent à 1/10 du volume de la phase supérieur a été ajouté à la phase supérieure, ainsi que 500ul d'éthanol absolu. Les tubes ont été centrifugés à 12000/min pendant 15mins. Après la centrifugation, le surnagent a été jeté suivi par l'ajout de 500ul de l'éthanol à 70% dans chaque tube, suivi d'une centrifugation à 1200 tours/min pendant 15min. Enfin séchage des tubes à température ambiante sur papier absorbant pendant une nuit après élimination de tout le surnagent. Le lendemain, 100 µl de TE ont été ajouté, et les tubes ont été congelées à -20C° pour la conservation. Afin d'évaluer la concentration des ADN extraits, nous avons précédé à une lecture des densités optique (DO) par spectrophotométrie.

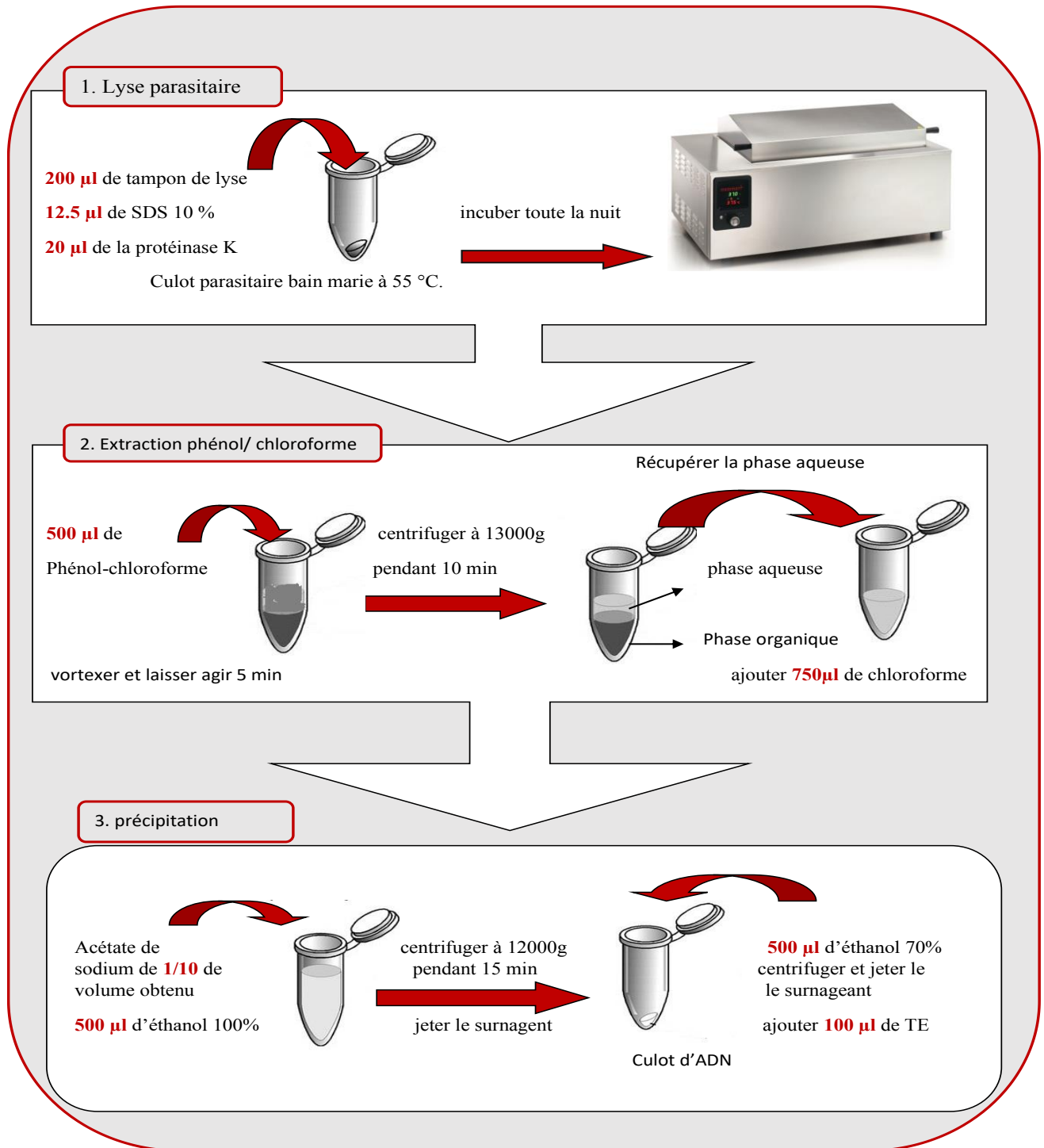


Figure 10 : représentation schématique des étapes d'extraction d'ADN des leishmanies par phénol/chloroforme.

2.5 Extraction par le Kit Qiagen

Cette étape de manipulation permet d'extraire l'ADN des culots parasitaires des différentes espèces de *Leishmania* nécessaire pour les méthodes qui suivent, ciblage de séquences ITS et de son amplification.

La technique consiste à dégrader les membranes cellulaires en émulsionnant leurs lipoprotéines à l'aide d'un détergent, ensuite faire précipiter l'ADN (Etienne, 2000). Dans le présent travail, l'extraction d'ADN est réalisée à l'aide d'un Kit spécial QIAamp (kit QIAGEN®, Hilden, Germany)

- **Lyse parasitaire**

Un volume de 200 µl de tampon de lyse cellulaire AL qui cassent les tissus, les cellules et membranes nucléaires, a été ajouté au culot parasitaire. Le AL contient du chlorure de guanidium. Nous avons aussi ajouté 20 µl de protéinase K une protéase sérine à large spectre, très efficace dans la digestion des protéines pendant la préparation des acides nucléiques. Elle agit en catalysant la dégradation des protéines cellulaires en les divisant en petits peptides et acides aminés, ont été ajoutés dans chacun des 12 micros tubes puis ont été mélangés à l'aide d'un vortex et incubé toute une nuit à 55 °C (fig. 12).

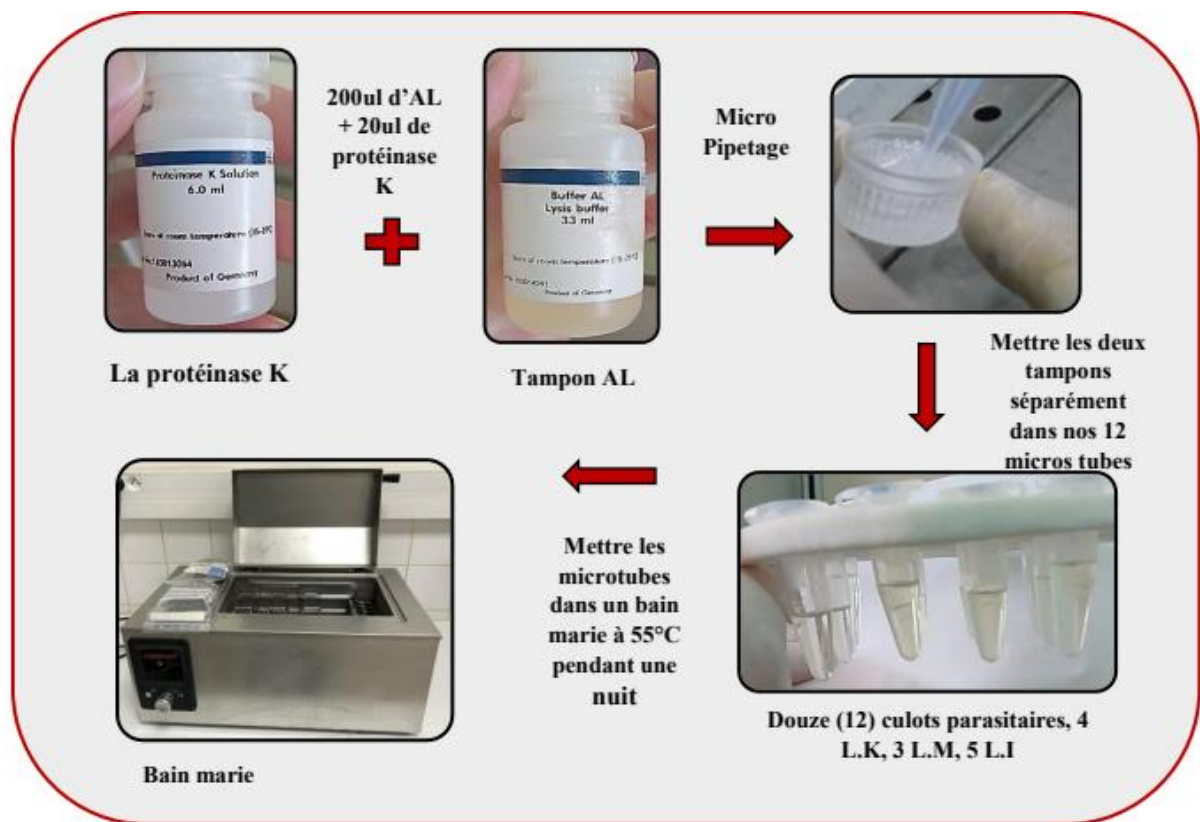


Figure 11 : Illustration de l'étape de la lyse parasitaire

- **Procédure de purification et de lavage**

Après incubation au bain-marie, nos échantillons ont subi une autre incubation à 70°C pendant 10 min dans une surface chauffante pour éliminer la protéinase K ajouté au préalable lors de la lyse afin d'éviter la dénaturation de notre ADN, puis mélanger à l'aide d'un vortex pour remettre le liquide en suspension. Par la suite un volume 200ul d'Ethanol a été additionné dans chaque tube permettant ainsi de précipiter l'ADN et formation de complexe inactifs pour maîtriser le tampon de lyse AL, le contenu de chaque tube Eppendorf a été transvasé dans une colonne à filtre Qiagen d'environ 700ul étiquetés au préalable avec la référence de chaque souche correspondante et centrifuger à 8000 tours pendant 1min à 4°C.

Au cours de la première étape de lavage 500 µl d'AW1 a été ajouté à nos filtres collecteurs après s'être débarrasser des précédents, ce qui a permet l'élimination des contaminants de l'ADN fixé dans la membrane de la colonne suivit d'une centrifugation à 8000 tours pendant 1min à 14°C, jeter les éluât et remplacer avec des nouveaux filtres collecteurs. Dans la deuxième étape de lavage le même volume de tampon 500 µl d'AW2 a été ajouté aux filtres à colonnes et centrifuger à 8000 tours pendant 3 min à 25°C. Les éluas ont été jetés puis remplacés encore par de nouvelles colonnes et centrifugés à sec pendant 1min à 13000 tours, les filtres ont été récupérés et placés dans des nouveaux micro tubes.

- **Elution de l'ADN**

L'ADN est remis en suspension à partir de colonnes de spin ou de tubes à échantillon séchés avec l'ajout d'un tampon d'élution pour une élution de meilleure qualité qu'avec l'eau sans nucléase, dont le pH est plus faible et qui peut ne pas être adéquate pour hydrater les molécules poids de l'ADN. Pour l'élution maximale de l'ADN et un stockage stable pendant des années au réfrigérateur ou au congélateur, un volume de 50 µl de solution d'élution AE a été ajouté à chacun des microstubes et enfin centrifugé à 8000 tours pendant 1 min (figure 13).

2.5 Quantification de L'ADN (Dosage spectrophotométrique)

Le dosage spectrophotométrie nous permet d'évaluer la qualité de nos ADN extraits et s'ils sont légitimes à l'amplification par PCR.

Les bases purines et pyrimidines constituant l'ADN et l'ARN absorbent fortement à la longueur d'onde de 260 nm, la qualité et la quantité des ADN purifiés peuvent être évalué à la fin de l'extraction par dosage de l'absorbance au spectrophotomètre (DOUAOUDI, 2019). La mesure de l'absorbance au spectrophotomètre permet un dosage de l'ADN à condition que celui-ci soit pur et en quantité suffisante. L'absorbance à 260nm permet de quantifier l'ADN, la mesure de l'absorbance à 280nm permet d'estimer la présence de contaminants protéiques ;

la mesure de l'absorbance à 230 nm permet d'estimer la présence de contaminants phénoliques. Une solution pure d'ADN doit avoir un ratio d' A_{260nm}/A_{280nm} compris entre 1 et 2 (une ratio inférieure à 1, indique une contamination protéique), une ratio A_{260nm}/A_{230nm} compris entre 2 et 2,2 (une ratio inférieure à 2 indique une contamination par des sucres, de phénol ou des sels).

Une goutte de la suspension d'ADN est déposée dans l'endroit spécifié sur l'appareil, après l'avoir réglé à 0 avec le tampon d'étalonnage puis sélectionner acide désoxyribonucléique et lire la DO. Pour ce travail, la DO a été mesurée pour chacun des tubes à l'aide du SimpliNanoBiochrom.

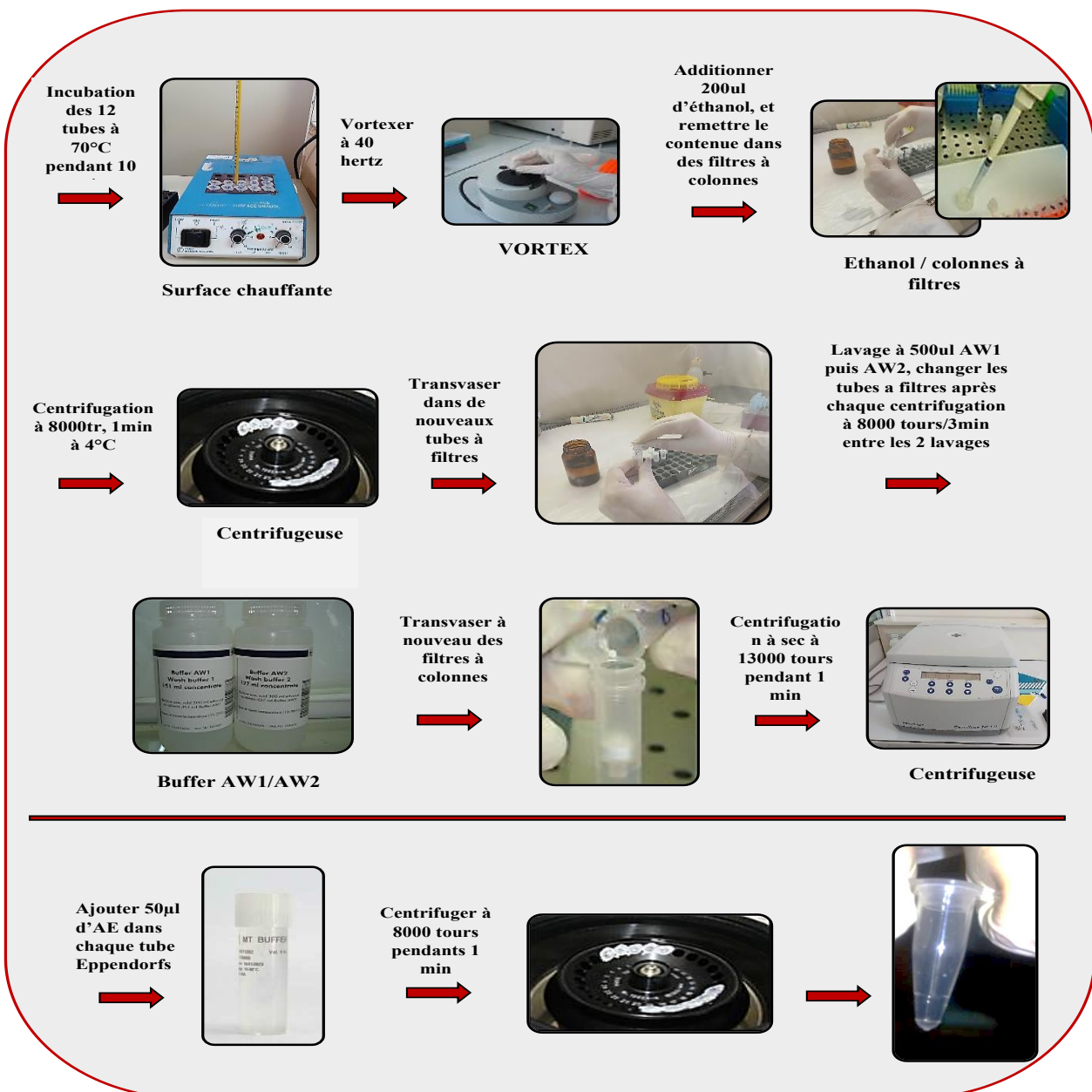


Figure 12 : illustration de la suite d'extraction (purification et élution de l'ADN des *Leishmania*)

2.6 Réaction d'amplification du gène ITS1 (PCR classique)

Cette étape consiste en l'amplification de la région Cible ITS1 qui va permettre d'avoir une quantité assez importante et utilisable pour l'identification des différentes espèces de *Leishmanias*

2.6.1 Principe

La PCR (polymerase chain reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN d'intérêt. Cette technique consiste en une série de 20-40 changement de température, appelés cycles. Chaque cycle repose sur 3 étapes : la dénaturation de l'ADN à 95 °C, l'hybridation de l'amorce à l'ADN simple brin à une température environ 55°C et enfin l'élongation grâce à l'action d'ADN polymérase à 72 °C (Denis Tagu, 2018).

2.6.2 Préparation du mélange réactionnel de la PCR

Le mélange réactionnel de la PCR est appelé le mix. Cette étape doit se faire sous des conditions aseptiques dans une pièce isolée et sous une hotte, pour éviter toute contamination de ce mix. Le volume des différents constituants du mélange réactionnel dépend du nombre de réactions à effectuer, La concentration et le volume individuel des différents réactifs ainsi que leurs rôles sont inscrits dans le tableau en annexe.

Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, puis 20µl de ce mélange est distribué dans chaque tube Eppendorf, spécifique à la PCR (thermocycleur) avec 2.5 µl de l'ADN à tester. Alors que le témoin positif doit contenir 20µl de mix et 2.5µl de l'ADN positif et pour le témoin négatif 20µl de mix plus 2.5µl d'eau distillé stérile. Pour pallier l'incertitude sur le pipetage, la quantité de mix préparer doit être un peu supérieure au nombre de réactions. Une fois le mélange réalisé, les tubes sont brièvement agités avec le vortex, et déposés dans un thermocycleur.

▪ Choix de la cible et programme de la PCR ITS1

Dans cette étude, la région ciblée pour une amplification est la séquence ITS de l'ADN ribosomique (Espaceur interne transcrit), qui est une portion située entre les gènes de la petite et de la grande sous-unité de l'acide ribonucléique ribosomique. Pour cela, la PCR a été réalisée en utilisant l'amorce LITSR : 5'-CTTG GATCATTTTCCGATG-3' et L5.8S 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAT T-3' (**fig. 15**). Le programme utilisé est en annexe.

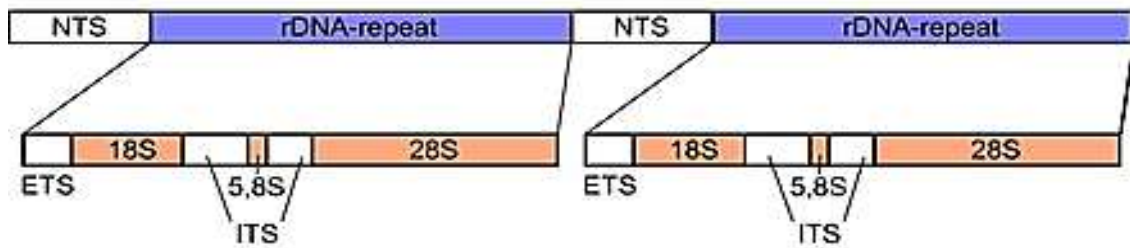


Figure 13 : Schéma de la Région ITS

2.6.3 Visualisation de produit de PCR classique par électrophorèse

C'est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique sur gel d'agarose ceci permet la séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques.

- **Préparation du gel**

Un gel d'agarose à 1.5% a été réalisé. Une quantité de 1.5 g d'agarose a été pesé, dissoute dans 100ml de tampon TBE (Tris Borate-EDTA) et chauffer environ 2 min dans un micro-onde. Laisser refroidir puis un volume de 6.5 ml de BET (Bromure d'Ethidium) lui a été ajouté. Le mélange a été coulé dans une cuve sur laquelle ont été placés des peignes, dont les empreintes sur le gel constituées les puits de dépôt des échantillons.

- **Dépôt des produits PCR**

Après polymérisation du gel, déposé dans chaque puits 7µl d'ADN mélangé avec 3µl du Bleu de bromophénol, les trois derniers puits sont respectivement pour le témoin positif, le témoin négatif (5µl de mix et 3 µl de bleu bromophénol) et le marqueur de poids moléculaire (p50). Afin que la migration puisse avoir lieu, un courant électrique doit passer dans le gel. Pour cela, on branche les électrodes de la cuve à l'alimentation pour que les dépôts soient du côté cathode en appliquant une tension de 110 volts pendant environ 40 minutes. Couper l'alimentation à la fin de la migration (**fig. 16 et 17**).

- **Visualisation de l'ADN**

La révélation des bandes d'ADN se fait par un Trans-illuminateur dans une chambre noire. Il s'agit d'une simple visualisation des bandes d'ADN sur une table UV, la révélation se fait grâce au bromure d'éthidium, les bandes d'ADN amplifiées apparaissent fluorescentes avec une couleur rouge-orangée.

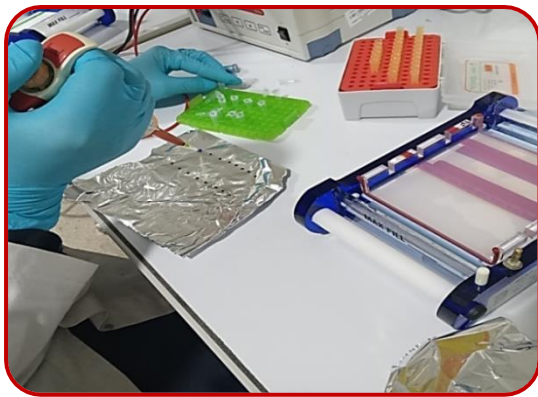


Figure 14 : préparation des mélanges post PCR pour le gel d'agarose

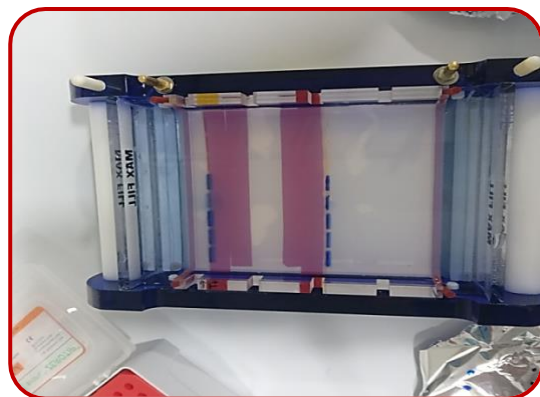


Figure 15 : placement des différents ADN des espèces leishmanias dans les puits du gel d'agarose

2.7 Contrôle de la qualité des ADN extraits par détermination de la charge parasitaire par PCR quantitative

2.7.1 Principe

Ce procédé permet de détecter et /ou de quantifier la présence de l'ADN des trois espèces *L. major*, *L. killicki*, *L. infantum* dans les tissus cellulaires en utilisant une sonde marquée (sonde Taqman) *Leishmania* spp. Ce sont des sondes marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur E (reporter), et à leur extrémité 3' par un suppresseur S (quencher). Le suppresseur s'inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, quand la sonde s'hybride à sa cible (amplicon), elle est alors hydrolysée par l'ADN polymérase pendant l'élongation. Dans ce cas, le fluorochrome émetteur se sépare du suppresseur. L'automate émet donc un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées.

2.7.2 Mode opératoire

Un master mix a été utilisé dans cette RT-PCR, avec les primers et la sonde. Le mélange réactionnel est en annexe. Les tubes ont été chargés dans un SMARTCYCLEUR pendant 2h pour la réaction d'amplification des brins d'ADN.

2.8 Analyse qualitative de l'ADN : gel de qualité

Suite à l'extraction des échantillons et pour avoir une idée de la qualité d'extraction et d'évaluer l'état de dégradation de l'ADN, une électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8% a été réalisée. Dans cette méthode, un colorant fluorescent (bromure d'éthidium) est ajouté au gel et les bande de gel sont visualisées sous la lumière UV (**Annexe3**).

2.9 PCR - HRM (Hight résolution melting) de la région SL 7ARN

L'analyse de fusion à haute résolution (HRM) est une technique relativement nouvelle pour la caractérisation directe des amplicons PCR dans un système fermé. La HRM représente une technique qui est basée sur les courbes de fusion de l'ADN bicaténaire. Elle autorise la détection d'une variation d'une séquence en évaluant la cinétique de fusion des amplicons en fonction de la température (**Karen Leroy et al, 2014**).

Le SYBER Green I est un composé organique aromatique de formule chimique C₃₂H₃₇N₄S, appartenant au groupe des cyanines asymétriques (fluorophores). Il a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Par conséquent, il est utilisé comme agent fluorescent en biologie moléculaire, en particulier lors de la réalisation de HRM.

2.9.1 Principe

La technique HRM repose sur l'intégration d'un fluorochrome intercalant à l'ADN amplifié (**M. Chomaratet et F. Breysse, 2011**). A la fin d'une PCR, les structures doubles brin sont saturées par le fluorochrome et l'émission de la fluorescence est donc maximale. Ensuite, une augmentation progressive et programmée de la température provoque la fusion des brins d'ADN. Cette séparation entraîne le relargage de fluorochrome, ce qui réduit la fluorescence. Ainsi, à une séquence d'ADN donnée correspond, pour une montée en température standard, une fluorescence spécifique représentée par une courbe de fusion (**Prat , 2022**).

2.9.2 Mode opératoire

Un fragment de 119 pb situé dans le gène ARN7SL a été amplifié pour une analyse HRM ultérieure en utilisant l'amorce sens *CI7SLF* (5'-ACGTGGACCAGCGAGGGT-3') et l'amorce anti sens *QRI7SLR* (5'-CGGTTCCCTCGCTTCAAC- 3'). La PCR-HRM a été réalisée dans un appareil de PCR en temps réel (MiqPCR). Un volume total de 20µl contenant dans chaque tube 18µl de mix et 2µl d'ADN, et les quantités de mélange réactionnel pour un seul

échantillon sont représentées dans le **tableau VI (annexe)**. L'acquisition des données de fluorescence et la construction des profils de dissociation ont été réalisées à l'aide du logiciel (MiqPCR).

2.9.3 Optimisation de la HRM

• Identification des principales espèces de *Leishmania* par la HRM 7 ARN SL

Pour une meilleure optimisation et ajustement du protocole de la HRM (phase de la mise au point, les tests d'analyses et enfin test de validation), plusieurs essais ont été appliqués en utilisant un panel plus large et représentatif de 74 souches de références hébergées par le laboratoire d'éco-épidémiologie de l'institut pasteur représentant trois (3) espèces distinctes, afin de tester la spécificité de la HRM 7ARN SL des trois principales souches de l'ancien monde (**Tableau VIII annexe**). Le tableau présente toutes les souches utilisées, y compris les informations indiquant si les échantillons ont été utilisés comme référence, comme validation ou pendant les essais de reproductibilité. Tous les échantillons ont été préalablement caractérisés pour déterminer l'espèce par MLEE et/ou séquençage de l'ADN pour la cible 7ARN SL. Au total, 74 tests à partir de souches provenant de zones géographiques distinctes d'Algérie ont été évalués.

• Evaluation de la sensibilité et la reproductibilité de la HRM 7ARN SL

Afin de tester la sensibilité et la reproductibilité de la HRM 7ARN SL, un sous-ensemble de (4) quarts échantillons des trois espèces de *Leishmania killicki* (LIPA10/05), *Leishmania major* (LIPA633/23) et *Leishmania infantum* (LIPA474, LIPA428) des dilutions de l'ADN extrait ont été réalisées en ajoutant le tampon d'élution AE. Chaque dilution comprenait la solution pure, 1/5^{ème} (1µl d'ADN + 4 µl de tampon AE) et 1/10^{ème} (1µl d'ADN + 9 µl de tampon AE) et le témoin négative qui permet de valider la spécificité de la réaction et la ligne de base utilisée pour le calcul du T_m. Une PCR-HRM a été réalisé pour chaque dilution dans le MIC.

• Evaluation des profils d'électrophorèses des produits HRM 7ARN SL

Pour permettre une évaluation des profils des courbes HRM observés lors des différentes manipulations, plusieurs électrophorèses ont été appliquées utilisant ces mêmes produits de la PCR-HRM 7 ARN SL afin de déduire si y avait une concordance entre les profils de migrations (nombre et poids) des amplicons.

CHAPITRE III :

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

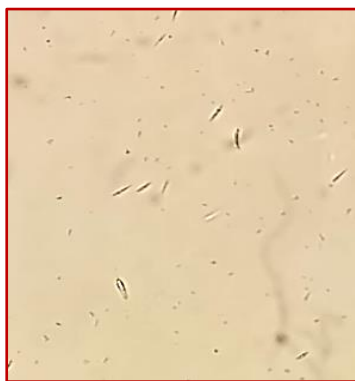
IV. Résultats

Le présent travail a pour principal objectif d'étudier la sensibilité et la spécificité de la HRM 7ARN SL dans l'identification de nos trois espèces de *Leishmania* circulante en Algérie, à savoir *Leishmania killicki*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*.

1 Résultat de la culture parasitaire

Observation microscopique : L'observation à l'état frais au cours des différents contrôles a démontré un organisme avec un cytoplasme transparent, un noyau gris volumineux, un kinétoplaste ainsi qu'un flagelle propre. Cette observation a permis la visualisation de l'état physiologique du parasite (mobilité, croissance, libre ou en rosace, stress) et absence ou présence de contamination dans le milieu (**Fig.16**).

Les souches appartenant à *Leishmania major* ont montré une croissance rapide (4 jours) après leurs mises en culture dans le milieu NNN puis RPMI 1640, contrairement aux souches *Leishmania killicki* et *Leishmania infantum* qui étaient plus lentes entre 6 voir 7 jours, ce qui a conduit à l'utilisation de 2 gouttes d'urines de chèvre afin de booster la repousse des parasites et aucune contamination n'a été observé au cours des différents contrôles.



A : Promastigotes libres



B : Promastigotes en rosasses



C : Promastigotes en amas dû à un stress

Figure 16 : Différentes formes des promastigotes observées sous microscope au grossissement X40 (photos originales).

2 Résultat de la récolte et de la numération des parasites

Les souches repiquées sur le milieu RPMI 1640 à 10% puis leurs culots récoltées et quantifiées ont montré une richesse différente qui variée entre 4×10^6 et 6×10^7 (tableau 4) et

cela est peut-être due au différent niveau de repousses des parasites malgré l'utilisation d'urine de chèvre pour tous les tubes à RPMI.

3 Résultat de la quantification de l'ADN

Nos résultats ont montré que trois échantillons contenant les souches LIPA 270/11, LIPA 330/13 et LIPA 10/05 qui correspondent aux tubes 4 avec un ratio inférieur à 1 ; tube 14 avec une ration de 1,093 et tube 15 avec une ration 1,25 respectivement ont été contaminés par des protéines, (tableau 5).

Ensuite, huit échantillons contenant les souches LIPA 270/11, LIPA 330/13 et LIPA 10/05, qui correspondent aux tubes 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14 présentent des ratios inférieures à deux (2) ce qui indique une contamination par du phénol ou sucres (tableau 5).

Par ailleurs, le tube trois (3) contenant LIPA 270/11, et le tube 12 contenant LIPA 10/05 ont présenté des concentrations minimales, qui étaient trop faibles pour être détectées par les rapports 260/280 et 260/230 respectivement du spectrophotomètre afin que les résultats soient fiables.

4 Identification du genre *Leishmania*

L'identification des espèces a été réalisée aux moyens de techniques moléculaire incluant l'amplification par PCR de la région intergénique non codante ITS1 des gènes ARNr, pour la deuxième partie elle consiste en l'amplification de la séquence ARN 7SL par PCR-HRM sur des parasites entretenues en cultures *in vitro* et typé comme appartenant aux espèces *L.major*, *L.killicki*, et *L.infantum*.

4.1 Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose

Et pour cette étude, une première PCR a été faite ciblant l'amplification de la région ITS1 en utilisant les deux amorces ITSF et ITSr, LITSr : 5'-CTTG GATCATTTTCCGATG-3' et L5.8S 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAT T-3'.

Ainsi après visualisation du gel d'agarose à 1,5% sous UV, cette recherche effectuée par PCR s'est avérée négative pour l'ensemble de souches utilisées incluant le témoin positif (**fig.17**), d'après le profil obtenu, on note une inhibition qui pourrait bloquer l'éventuelle amplification de l'ADN parasitaire.



Figure 17 : Amplification de l'ADN de *L. killicki*, *L. major* et *L. Infantum* (qui n'a pas marché/le gel est vide) analysés par électrophorèse.

D'après les premiers résultats d'électrophorèse des amplicons de *Leishmania killicki*, *Leishmania major* et *Leishmania infantum* (**fig.17**), il a été procédé à une deuxième électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% mais en augmentant le pH de la solution de TBE (Tris, Borate, EDTA) à pH ~ 8 afin d'assurer une meilleure migration. Mais malgré les efforts fournis, les mêmes résultats que lors de la première électrophorèse ont été observés, ils se sont avérés négatifs pour l'ensemble de souches utilisées incluant le témoin positif.

4.2. Résultats de l'électrophorèse sur gel de qualité

Après les deux tentatives de PCR sur gel d'agarose 1,5% avec des résultats négatifs. Il a été observé des résultats positifs incluant les tubes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 sur le gel de qualité à 0.8% utilisant les ADN extraits sans amplification par PCR qui correspondent respectivement à LIPA 270/11, LIPA 330/13, LIPA 270/11, LIPA 270/11, pour le 6ème tube (unknown) sa référence a été perdu lors de la manipulation à cause d'un problème technique LIPA 10/05, LIPA 270/11, LIPA 270/11, LIPA 330/13, LIPA 10/05, LIPA 10/05 ; voir (**Fig. 18**).

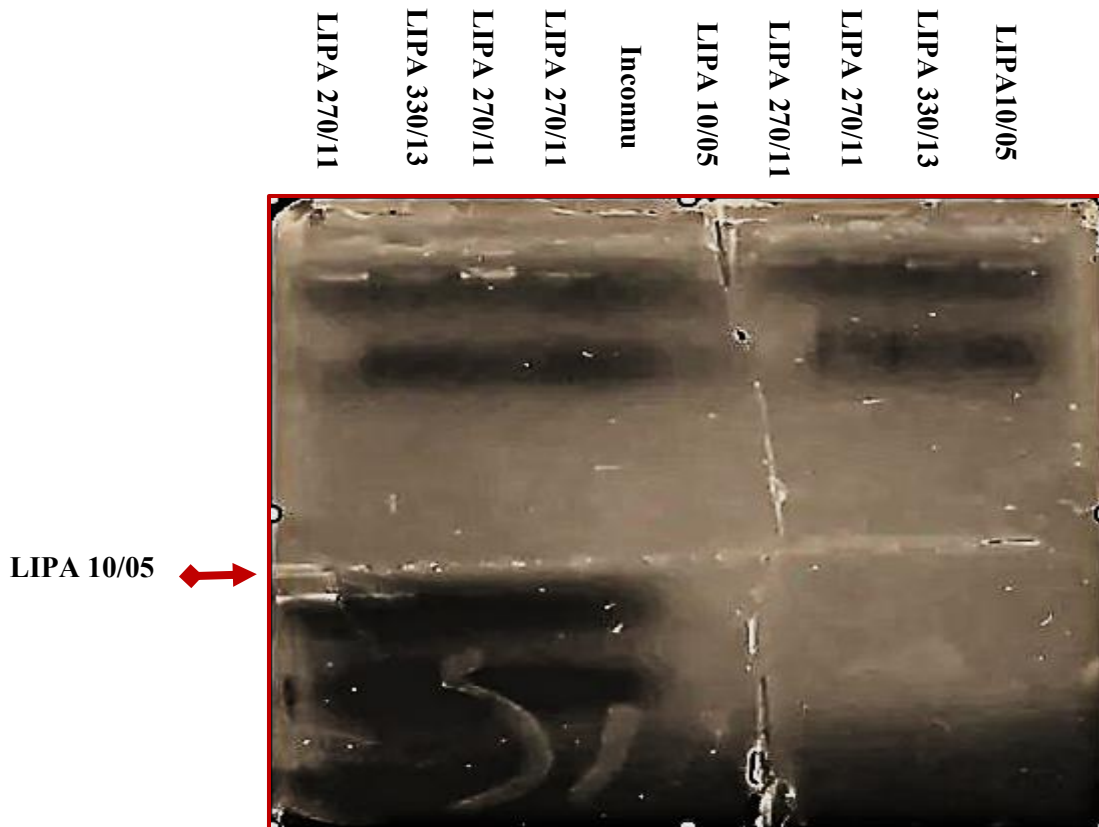


Figure 18 : Résultats de l'électrophorèse des ADN de *L.major*, *L.infantum* et *L.killicki* sur gel de qualité 0.8 %.

5 Résultats de la quantification par la PCR en temps réel (CR)

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

Les 15 tubes d'ADN extraits à partir des souches de *Leishmania major*, *Leishmania Killicki* et *Leishmania infantum*, en excluant une souche de *Leishmania major* (le tube numéro 2 à cause du manque de la quantité nécessaire utilisable pour les techniques qui suivent), ont été quantifiés avec un appareil de PCR en temps réel (Smart Cycleur Cepheid), après avoir été au préalable mis en contact avec la sonde TaqMan et l'amorce spécifique de la région ciblée (ITS1), ITSF: 5'-CTTG GATCATTTTCCGATG-3' et ITS; L5.8S 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAT T-3'.

Des résultats positifs et des amplifications de la région des ITS1 a été observés dans onze échantillons 11 incluant le témoin positif, des copies de la région ont été amplifié selon le Smart Cycleur pour les tubes d'échantillons 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 (fig. 19).

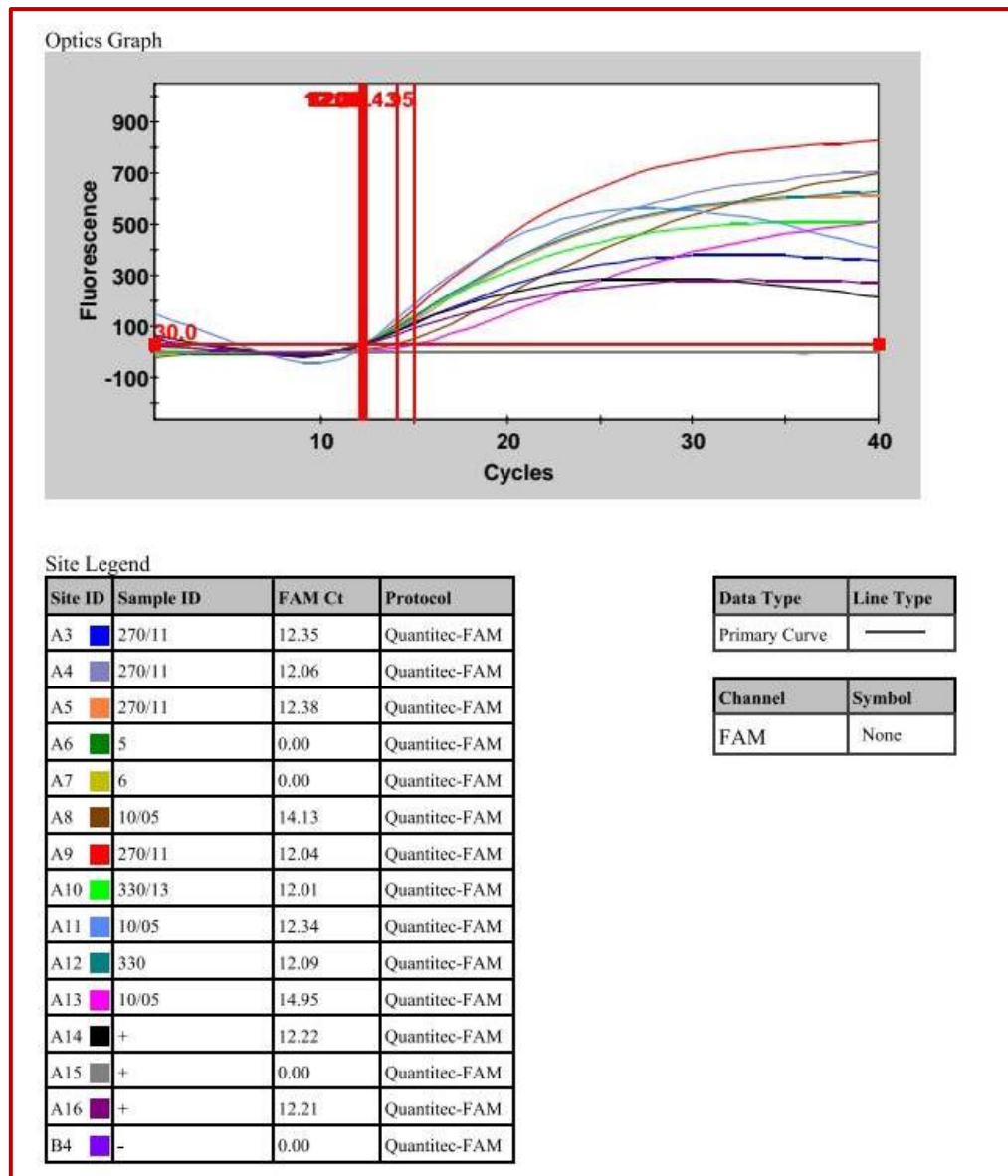


Figure 19 : résultat de la qPCR dans le SmartCycleur

6 Résultat d'identification des espèces *Leishmania* par PCR- RFLP ciblant la région ITS1 des gènes ARNr

La région ITS1 qui sépare les deux gènes ssu ARNr et 5.8s ARNr varie selon l'espèce de *Leishmania* par la taille et la séquence nucléotidique, cette dernière permet de révéler la présence du parasite *Leishmania* dans un échantillon donné après amplification par un couple d'amorces spécifique. Après l'amplification par PCR de la séquence ITS1 des souches *Leishmania* spp.

7 Résultat d'identification des espèces *Leishmania* par PCR- HRM ciblant la région ARN 7SL des gènes ARNr

7.1 Mise au point de la PCR-HRM

La configuration de la réaction PCR-HRM a été établie par plusieurs étapes d'optimisation qui comprenaient spécifiquement l'ajout de concentration adéquates du fluorochrome SYBER GREEN I et des deux amorces (CJ7SLF, QRT7SLR).

Pour obtenir des conditions optimales, les expériences ont d'abord été réalisées sur des ADN extraits à partir des trois espèces de référence *L.major*, *L.infantum*, *L.killiki*, lors du premier essai et la mise au point de l'appareil PCR-HRM, les résultats ont montrés des pics de fusions basés sur les différentes températures de fusion de nos espèces de références (**fig.20 et fig. 22**).

Des électrophorèses sur gel à 1.5% pour les produits de la HRM ont été réalisées pour voir la concordance des pics avec les bandes et leurs résultats seront représentés sous chaque courbe de fusion.

▪ Résultats des figures 20/21

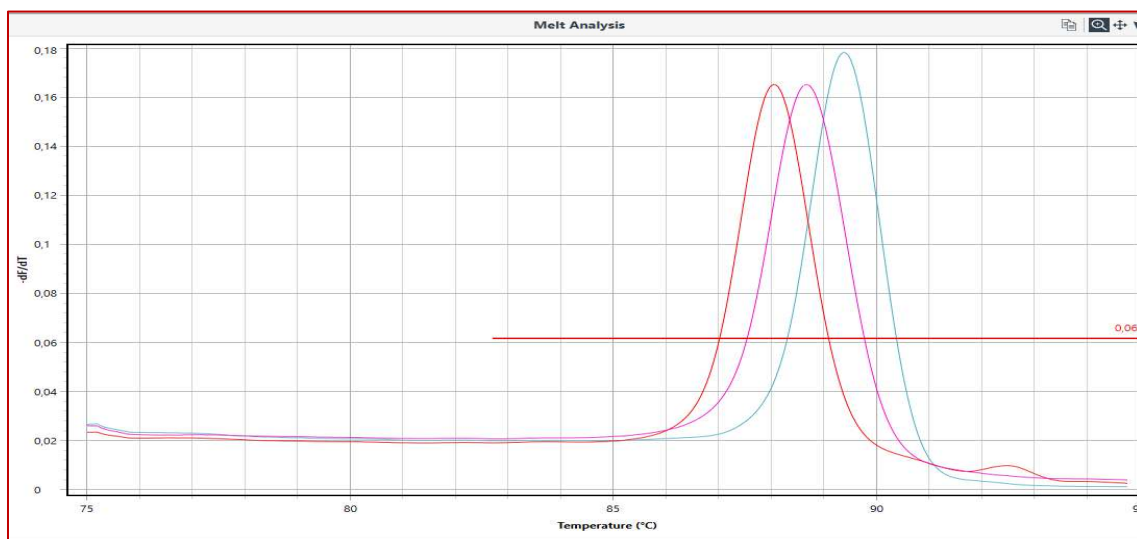


Figure 20 : courbe de dissociation codée par couleur des 3 souches marqueurs : bleu : LIPA 431(88.39) (*L. infantum*) ; rouge : LIPA 544 (88.06) (*L. major*) ; mauve : LIPA 07/05 (88.68) (*L. killiki*).

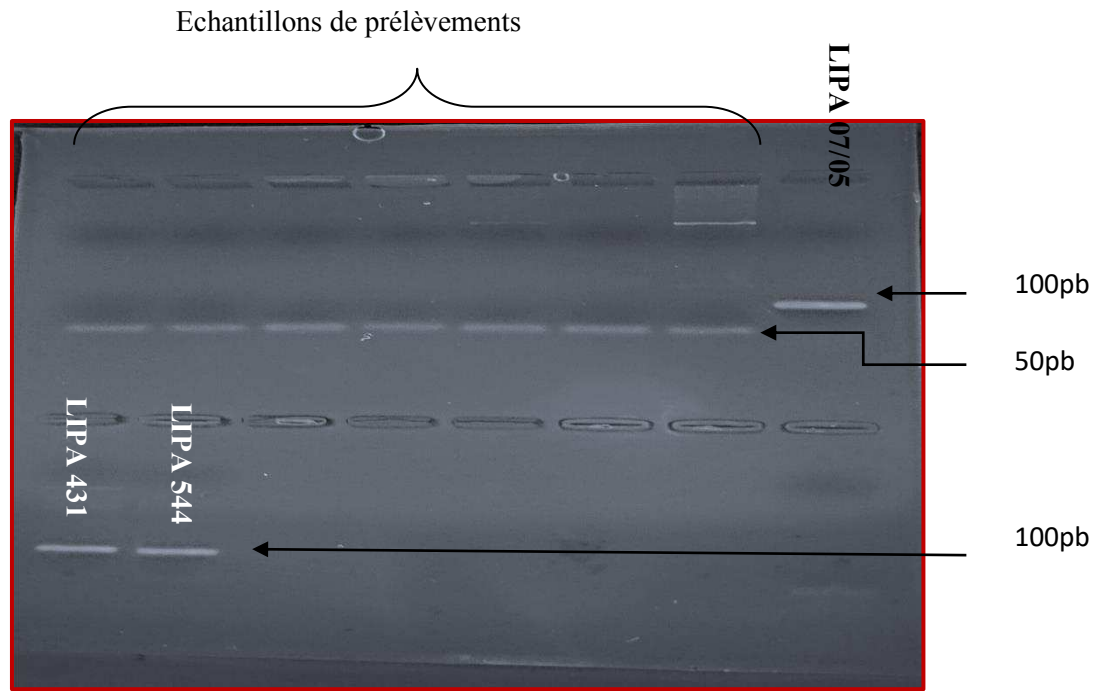


Figure 21 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour les souches marqueurs LIPA 07/05, LIPA 544 et LIPA 431.

Les résultats de l'électrophorèse sur gel des produits de la HRM : LIPA 07/05, LIPA 544 et LIPA 431 qui ont données une seule bande pour chaque échantillon se concorde avec le nombre de pic pour les courbes de températures de fusion. (Figure 2).

■ Résultats de la figure 3 :

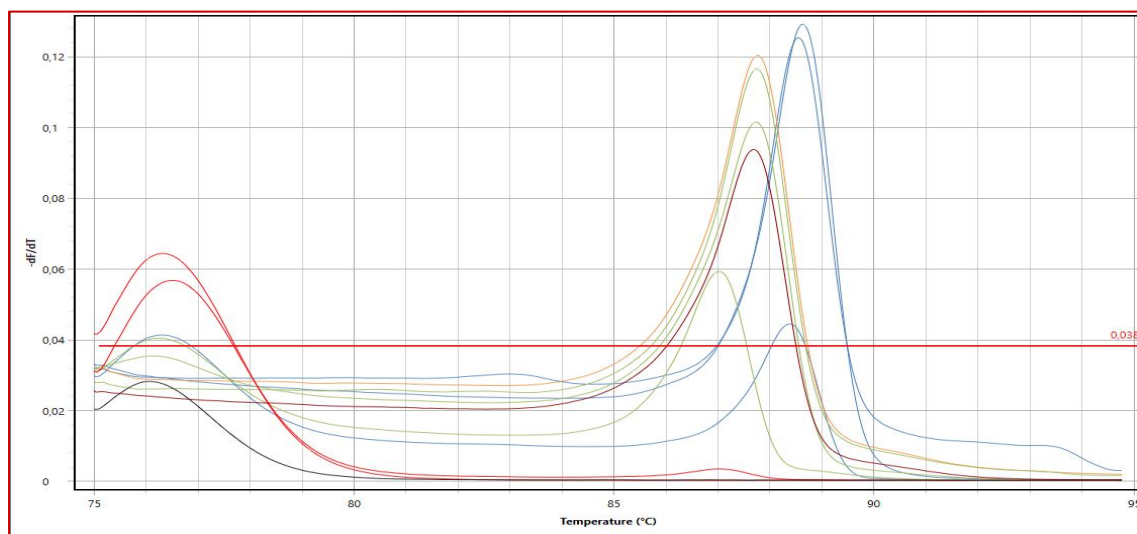


Figure 22 : regroupement courbes de dissociation codées par couleur pour chaque souche a testé : bleu (LIPA 431 MON 24, LIPA 474 MON80, LIPA 390 MON 1) ; vert (LIPA 07/05 et LIPA 10/05) ; rouge (lame 375 et lame 383) ; orange (ech 37) inconnue et grenat (ech positive).

Les courbes générées pour les 3 zymodèmes de *L. infantum* (LIPA 431, LIPA 474 et LIPA 390) ont montré de bonnes corrélations des profils de courbe HRM, et leurs T_m varient entre 88.37 à 88.62 °C (**figure 28**). Les souches (LIPA 10/05) avec une T_m de 87.01 et LIPA 07/05) avec une T_m de 87.73 °C, ce sont des *killicki* mais qui ont des T_m assez différentes. Tandis que l'échantillon 37 est un échantillon inconnu qui a donné une T_m 87.75°Cet qui correspond beaucoup plus à *L. killicki* qu'à *L. infantum* (**fig. 23**).

■ Résultats de la figure 23

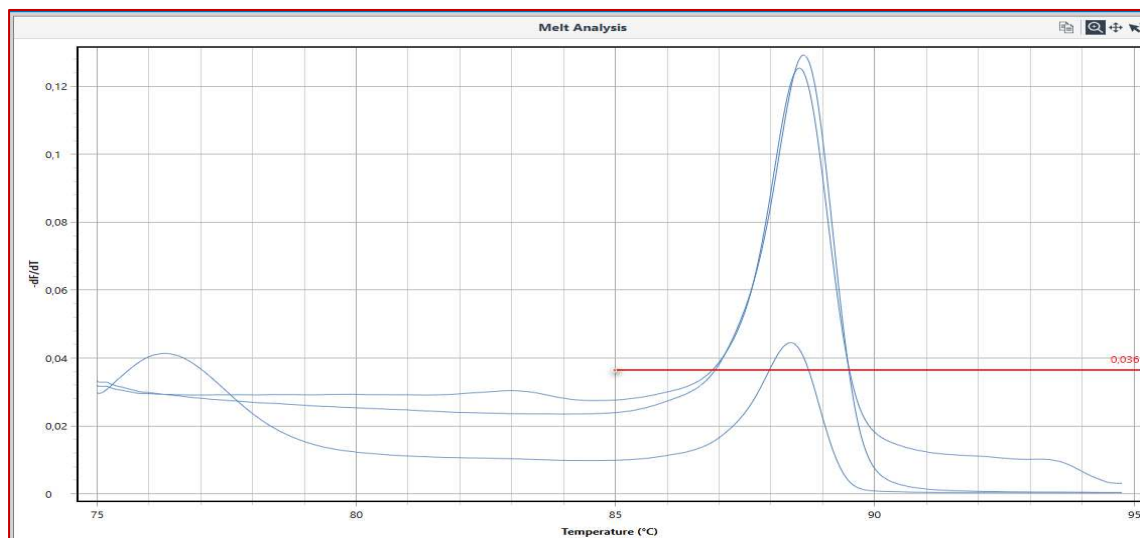


Figure 23 : courbes de dissociation des 3 zymodèmes de *L. infantum* : MON 24 (LIPA 431) ; MON80 (LIPA 474) ; MON1 (LIPA 390).

Des profils de courbes de fusion assez distinctifs, une superposition des trois souches étudiées avec un éventail de T_m entre (88.37 ; 88.62) cela nous laisse suggérer de typer ces trois références de souches comme étant de *Leishmania infantum*.

Le large spectre des températures de fusion observée chez l'espèce *L. infantum* comparé à la souche marqueur LIPA 544 de T_m de 89.39 peut être expliqué par les différents zymodèmes retrouvés dans cette espèce qui de huit (8) groupes contrairement aux autres espèces de *Leishmania*, ceci dit une différence de modèle de mobilité enzymatique donc différentes gènes de ménages qu'on peut suggérer comme étant de modeste polymorphisme aux sin des génomes de la même espèce.

■ Résultats de la figure 24

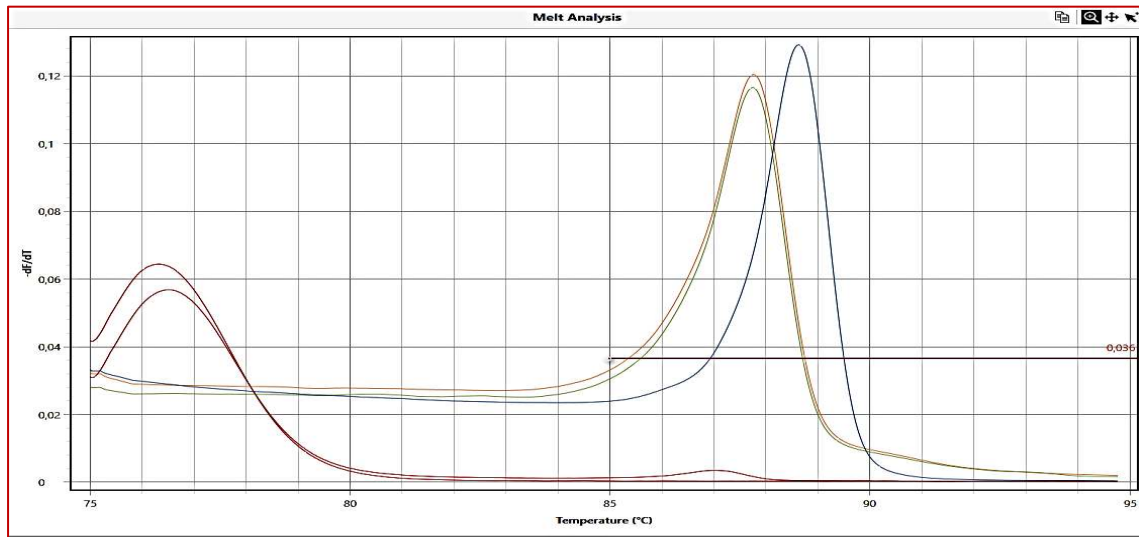


Figure 24 : courbes de dissociation de *L. killicki* (LIPA 10/05 ; LIPA 07/05) et de l'échantillon 37.

Les deux profils de courbes de fusion rouges représente des lames de *Leishmania major* qui ont données des températures de fusion assez lointaine (76.33 ; 76.51) de T_m de référence *L. major* LIPA544 (88.06), d'où l'importance de disposer des souches marqueurs des trois espèces à étudier pour permettre une comparaison.

Le pic orange ECH37 de t_m 87.75 se superpose presque parfaitement avec les deux courbes vertes de t_m s (87.73), 07/05(87.72) (**fig.24**) qui représente une souche de référence *L. killicki* confirmant que l'échantillon 37 inconnue est au final une souche de *leishmania killicki*.

■ Résultats des figures 25/26/27/28

Afin de s'assurer de la spécificité et de la reproductibilité des tests PCR-HRM, un panel de souche *Leishmania* représentant les trois espèces de référence (*L. major*, *L. infantum* et *L. killicki*) ont été testées dans des conditions différentes en réduisant la concentration de SYBER GREEN I ajoutés aux mix réactionnel. Les courbes générées par le logiciel micrper v2.12.7 sont représentées dans les figures suivantes (**Fig. 25, 26,27,28**).

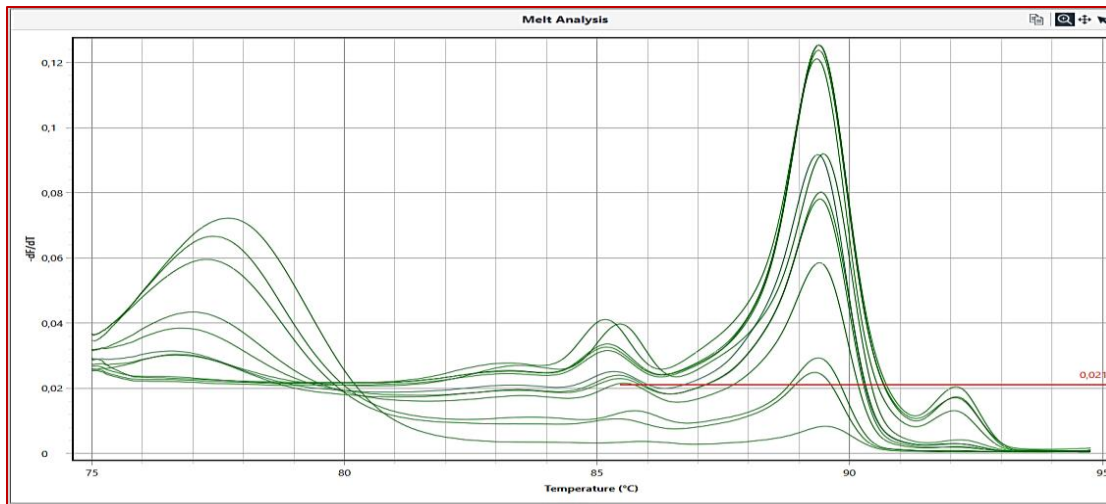


Figure 25 : courbe de dissociation des souches *L. infantum* : LIPA 250L ; LIPA 472 ; LIPA 497 ; LIPA 979 ; LIPA 1046 ; LIPA 1108 ; LIPA 1111 ; LIPA 1112 ; LIPA 1117 ; LIPA 1119 ; LIPA 1125 ; LIPA 2091.

Dans cet essai, nous avons utilisé que des souches *L. infantum* mais qui ont donnés des profils de dissociations différents et des Tm variables. Pour les souches (LIPA 250L ; LIPA 472 ; LIPA 497 ; LIPA 979 ; LIPA 1046 ; LIPA 1108 ; LIPA 1111 ; LIPA 1112 ; LIPA 1117 ; LIPA 1119 ; LIPA 1125 ; LIPA 2091) concordent entre elles et qui ont donnés des Tm qui varient entre 89.29 et 89.47 °C, et selon la Tm de la souche marqueur, ces souches se sont tous des *infantum* (**fig.25**), Cependant, pour les petites premières courbes qui sont apparus peuvent être dû à des excès d'amorce ou de SYBER green I.

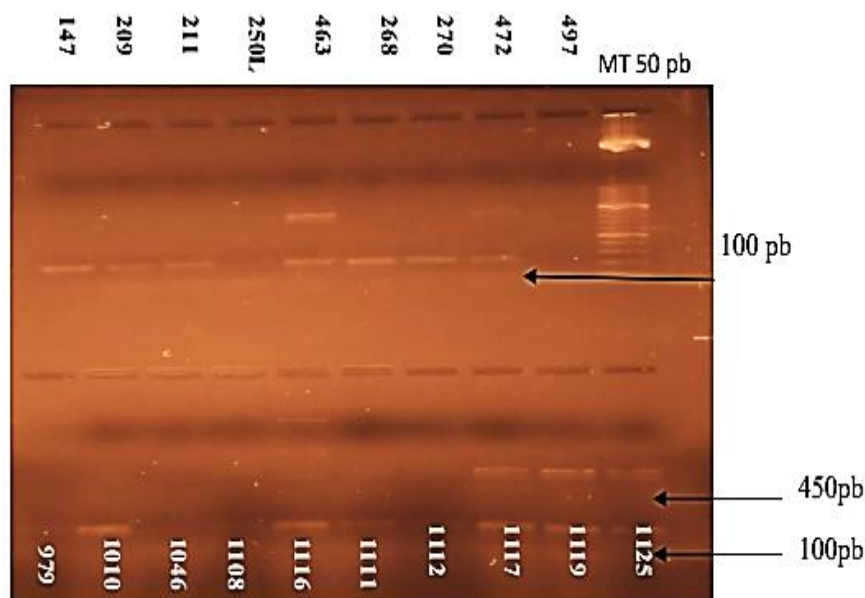


Figure 26 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour les souches : LIPA 250L ; LIPA 472 ; LIPA 497 ; LIPA 979 ; LIPA 1046 ; LIPA 1108 ; LIPA 1111 ; LIPA 1112 ; LIPA 1117 ; LIPA 1119 ; LIPA 1125 ; LIPA 2091 ; LIPA 209 ; LIPA 268 ; LIPA 1010 ; LIPA 1118 ; LIPA 270 ; LIPA 1116 ; LIPA 147.

Les résultats de ce gel(**fig26**), ne se concorde pas tous avec les pics des courbes de fusion. Cependant les souches LIPA 209 ; LIPA 147 ; LIPA 270 ; LIPA 250L qui sont représentées par un seul pic, ont révélé qu'une seule bande pour chacun, donc ces 4 souches se concorde avec les courbes de fusion.

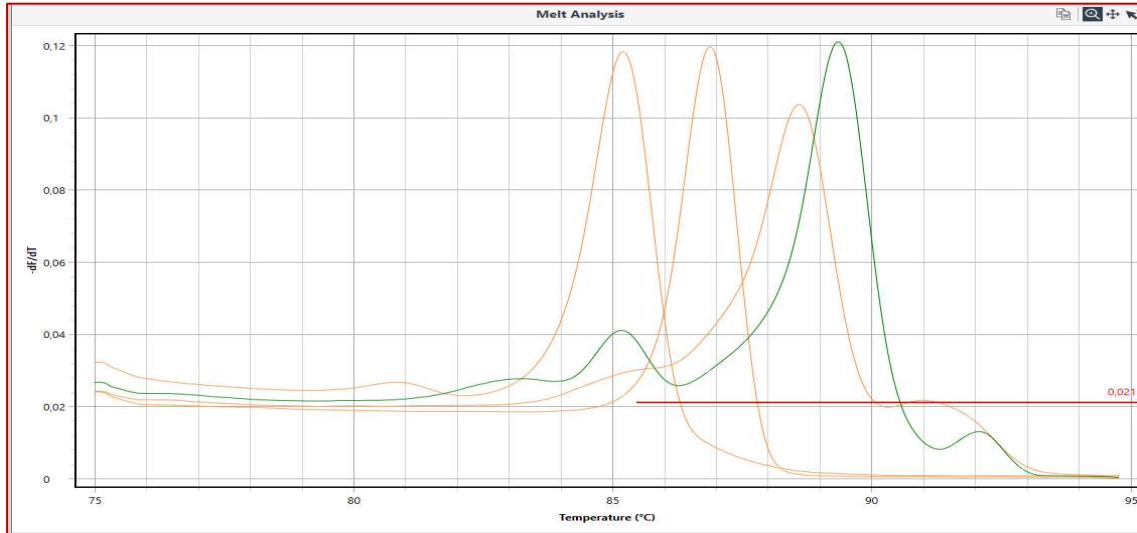


Figure 27 : courbe de dissociation des souches *L. infantum* : LIPA 270 ; LIPA 1119 ; LIPA 1116 ; LIPA 147.

Les souches LIPA 270 ; LIPA 1116 ; LIPA 147 ; LIPA 209 ; LIPA 268 ; LIPA 1010 ont données des profils atypiques qui ne se concordes pas avec la souche LIPA 1119 et LIPA 2091 qui ont été identifiés comme *L. infantum* (**fig.27 et fig. 28**). Cela est dû soit à des contaminations de l'Adn lors de la manipulation ou bien ce sont des variantes de *L. infantum*. Les souches LIPA 835 ; LIPA 1118 ; LIPA 1345 ont été similaires à *L. infantum* mais qui ont données plusieurs pics par rapport à LIPA 2091 qui a été identifié comme *L. infantum* (**fig. 29**).

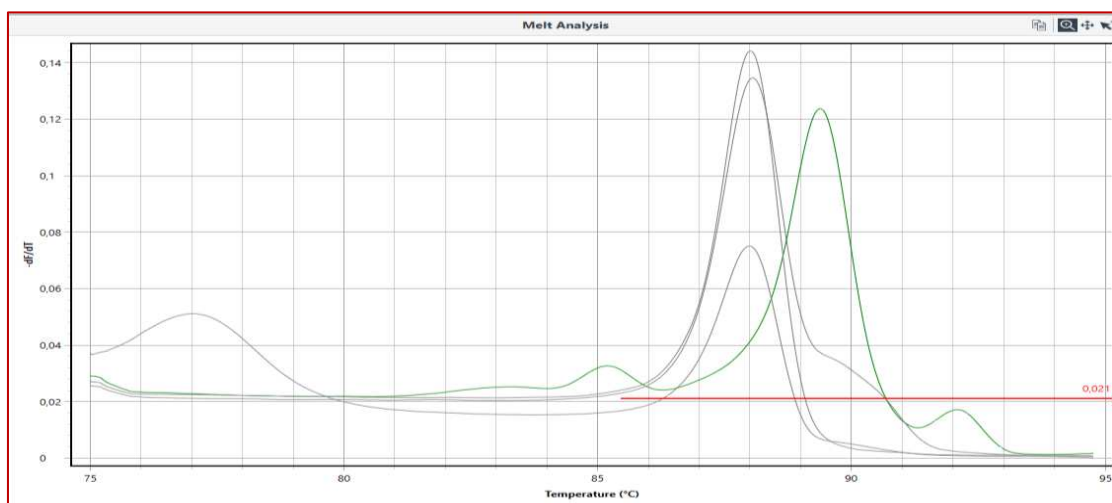


Figure 28 : courbe de dissociation des souches *L. infantum* : LIPA 209 (87.96° ; LIPA 268(88.01) ; LIPA 1010 (88.05) ; LIPA 2091(89.38)

LIPA1010 typé comme étant *L. infantum*, mais selon le profil de la courbe de fusion elle se superpose avec LIPA209 et LIPA268 qui sont des *L. major*, par conséquent elle s'avère également être une *L. major* avec une t_m de (88.05).

■ Résultats des figures 29/30

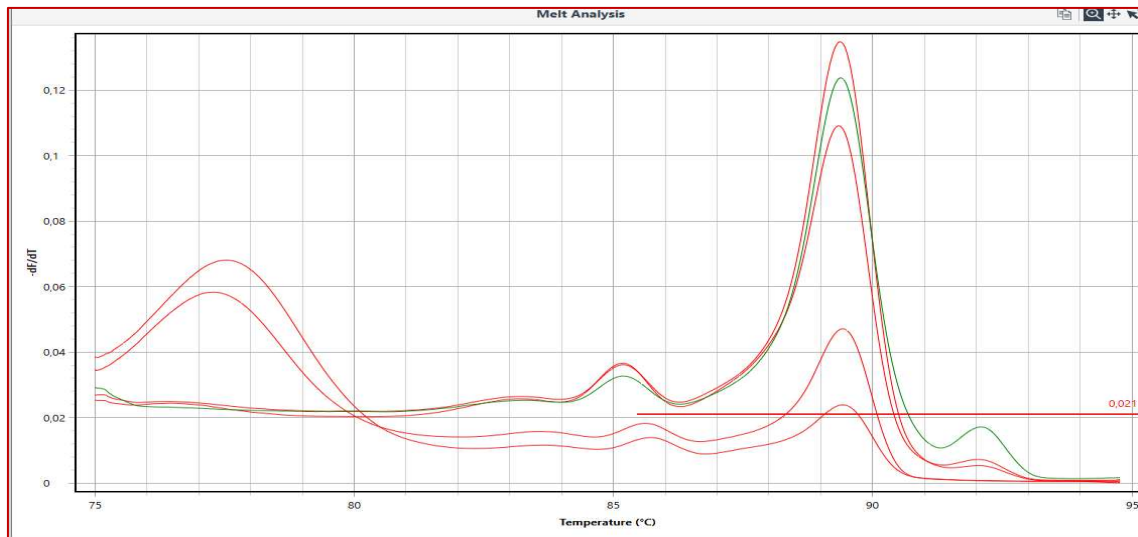


Figure 29 : courbe de dissociation des souches *L. infantum* : LIPA 2091 ; LIPA 835 ; LIPA 1118 ; LIPA 1345.

Une superposition des courbes de T_m presque parfaites 2091(89.38) ; 835 (89.34) ; 1118 (89.37), 1345 (89.41) ; 2091(89.40) des différentes souches de *Leishmania infantum* confirmant que HRM7ARNSL est un bon outil de typage moléculaire, malgré les fluctuations dans le nombre de pics observés qui sont dus aux différentes concentrations du produit du mix, et concorde avec les résultats de l'électrophorèse pst HRM dont chaque 2 pic représente deux bandes d'amplicons sur le gel d'agarose (**fig. 30**).

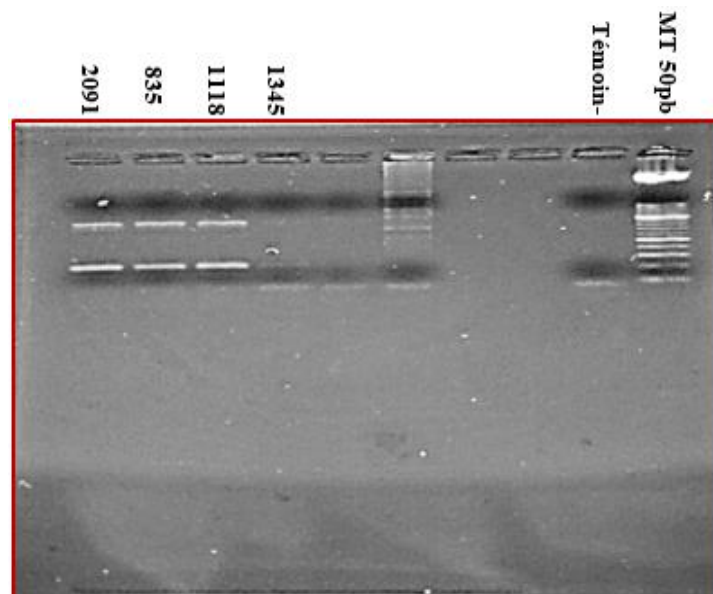


Figure 30 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour les souches : LIPA 2091 ; LIPA 835 ; LIPA 1118 ; LIPA 1345.

Les résultats de ce gel (**fig. 30**), se concordent avec le nombre de pic pour chaque courbe de fusion sauf la souche LIPA 1345 qui présente deux pics dans la courbe de fusion mais aucune bande n'a été révélée sur le gel.

■ Résultats de la figure 31

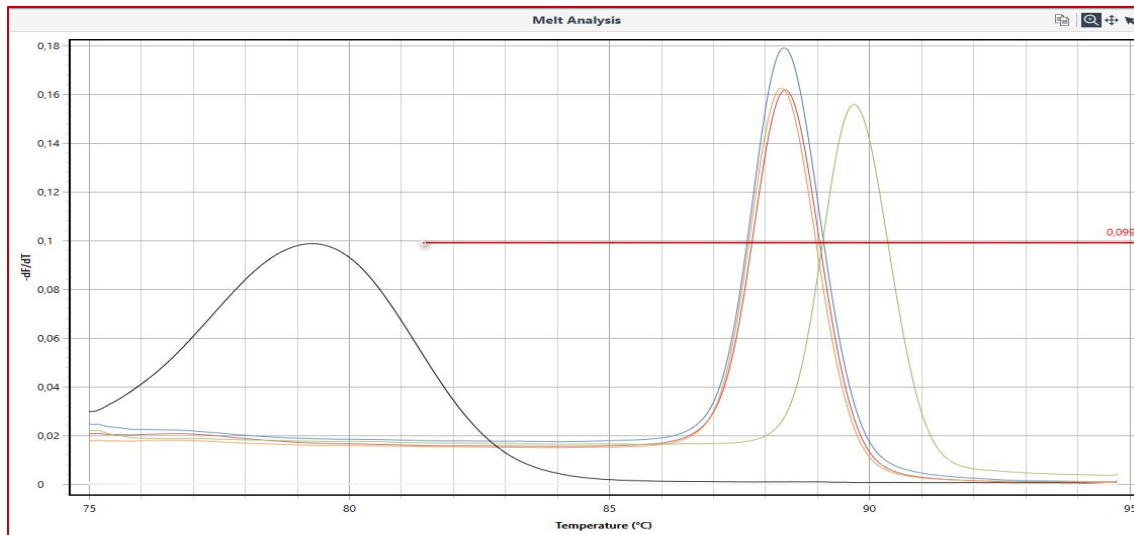


Figure 31 : courbe de dissociation codée par couleurs des 3 souches : bleu (270/11) ; rouge (330/13) et orange (10/05).

Un autre essaie été fait sur des souches *killicki* (LIPA 10/05) (3) ; *major* (LIPA 633/23) ; *infantum* (LIPA 270/11 et LIPA 428).

Les courbes générées pour les 3 souches de *L. killicki* se concordent et ont des Tm de 88.14 ; 88.36 et 88.24 °C (**fig. 32**). Pour LIPA633/23 c'est une souche qui avec un profil atypique, se superpose avec la *L. killicki* donc elle se peut être une *killicki*. Enfin pour la LIPA 428 qui a donné une Tm 89.54 °C se concorde avec les souches *infantum* qui ont été identifié auparavant (**fig. 33**).

■ Résultats de la figure 32

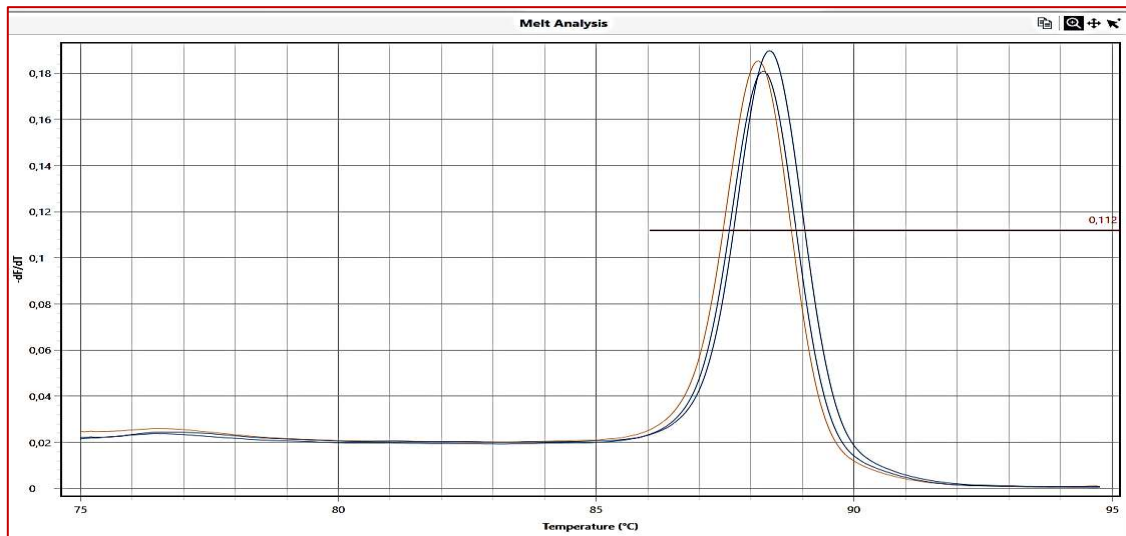


Figure 32 : courbes de dissociation des 3 souches de *L. killicki* (LIPA 10/05).

Superposition des trois souches de *L. killicki* avec des courbes de températures de fusion bien distinctes et définies sans fluctuation malgré des extractions d'ADN à des périodes de temps différentes démontre que 6ul de SYBER Green I et 0.5ul d'amorce suivent 2.5ul d'ADN sont un bon paramètre de mise au point de la manipulation de la HRM ARN 7SL *L. killicki*, ainsi que les t_m (88.14 ; 88.36, 88.24) sont des t_m représentatives de l'espèce *leishmania killicki*, qui converge parfaitement avec les résultats de l'électrophorèse de produit HRM démontrant une bande pour chaque souche de 150 pb.

■ Résultats de la figure 33/34

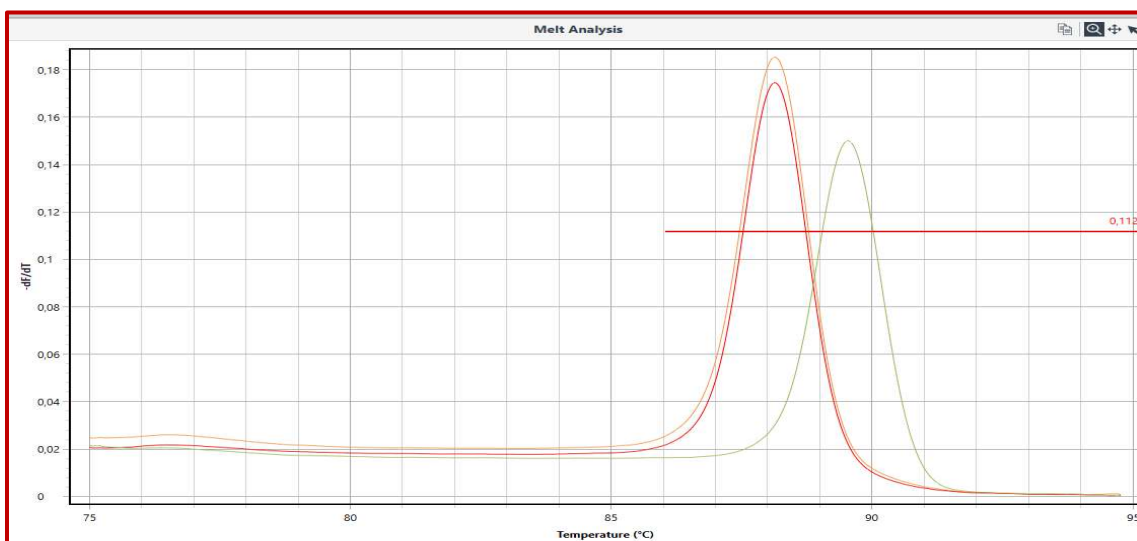


Figure 33 : courbe de dissociation des souches LIPA 633/23, LIPA 428 et LIPA 10/05

- On a eu un profil de courbes de fusion bien définies et cela est dû aux changements de paramètres de la HRM (concentration de SYBER Green...), mais y a une parfaite superposition de deux souches des espèces différentes 633/23 *L.major* (88.14), 10/05 *L.killicki* avec une tm de 88.14, cela indique que les deux espèces sont une seule espèce par conséquent 633/23 suggère que c'est une *L.killicki* 10/05 du moment que cette dernière est une souche marquer typer au préalable par MLEE, contrairement à la 633/23.

LIPA428 concorde avec le résultat de tm de *L.infantum* qui est d'une 89.54.

Les résultats de ce gel se concordent avec le nombre de pic représentée dans les courbes de fusion (**fig.34**).

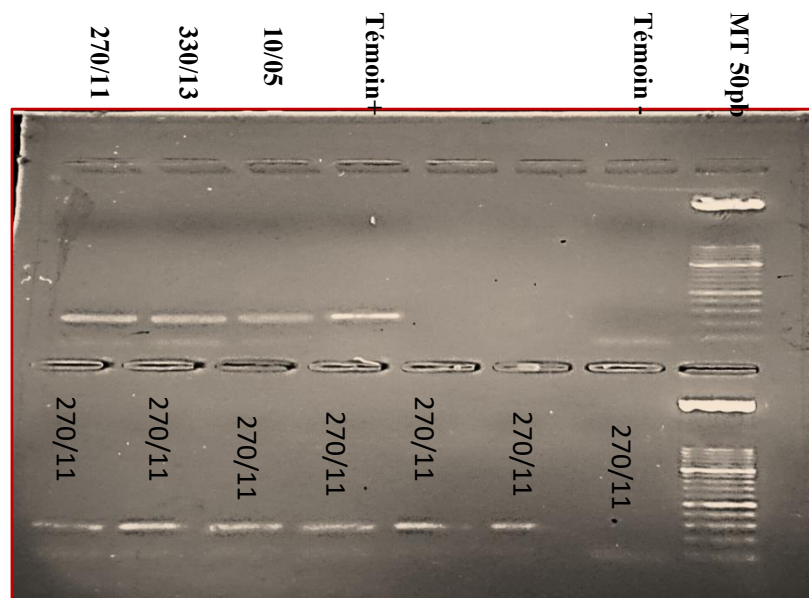


Figure 34 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose pour 9 souches : Lipa 270/11, Lipa 330/13, Lipa 10/05, Lipa 270/11, Lipa 428, Lipa 633/26, Lipa 10/05, Lipa 10/05, Lipa 10/05.

▪ Résultats des figures 35/36

Le dernier essai a été fait sur des échantillons des prélèvements : LC 12/23P, LC 14/23P et LC 25/23P et qui ont donnés des courbes qui ne se concordent avec aucune souche de *Leishmania*, cela signifie que les souches des prélèvements peuvent avoir une multitude de mélanges d'ADN (fig. 35).

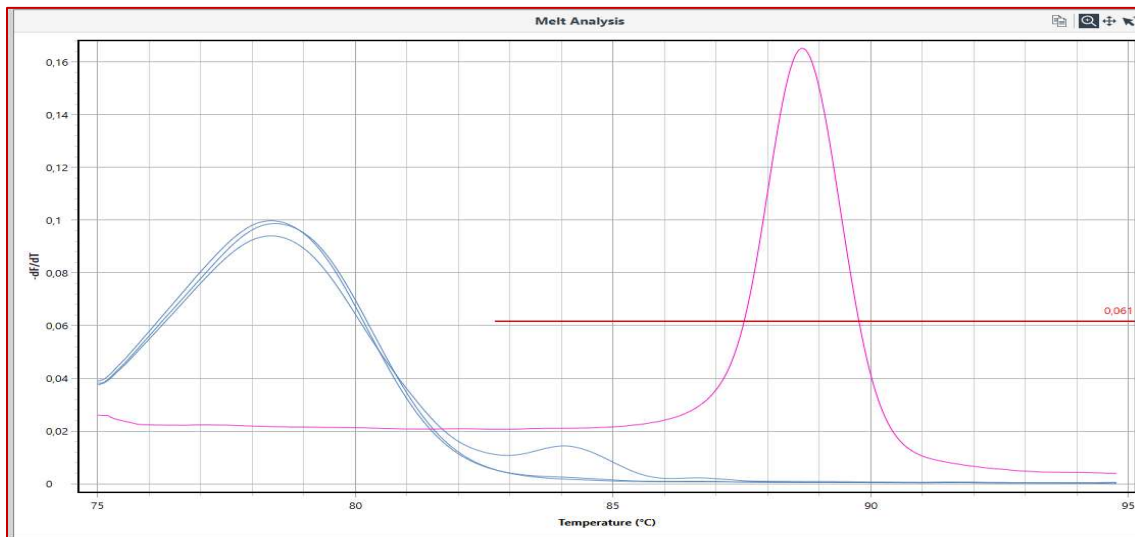


Figure 35 : courbe de dissociation des souches de prélèvement : LC 12/23P, LC 14/23P et LC 25/23P et la souche marqueur.

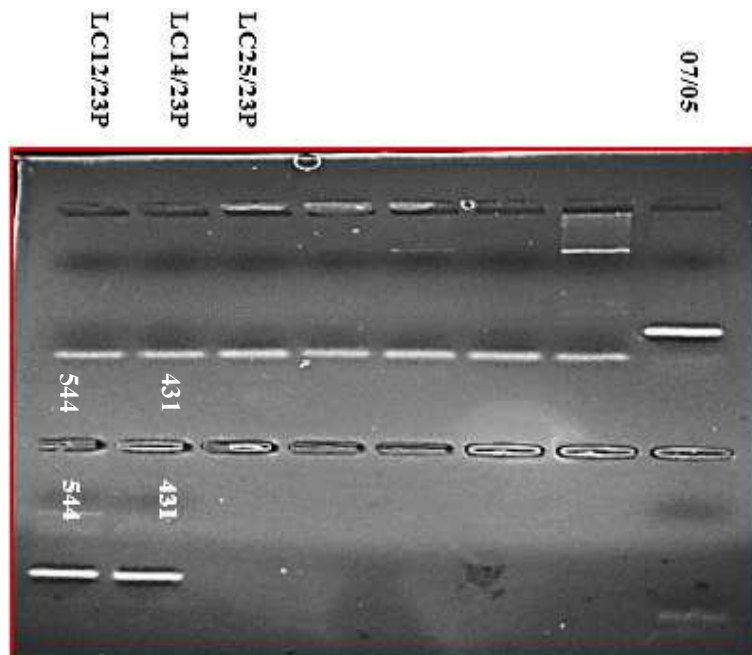


Figure 36 : résultats des produits de la HRM après leur révélation sur gel d'agarose des souches : LC 12/23P, LC 14/23P et LC 25/23P et les souches marqueurs (Lipa 431, Lipa 544, Lipa 07/05).

7.2 La distribution des différentes souches selon leurs températures de fusion

La distribution des Tms a été codée en couleur et représentée selon les trois espèces de *Leishmania*, qui ont été déterminé par le logiciel graph prisme 10. Pour une discrimination fiable, nous avons calculé la dispersion des valeurs de Tm et n'avons considéré que les différences de valeurs de Tm pour *L. killicki* et *L. infantum* supérieures à 0,3°C (Fig.37).

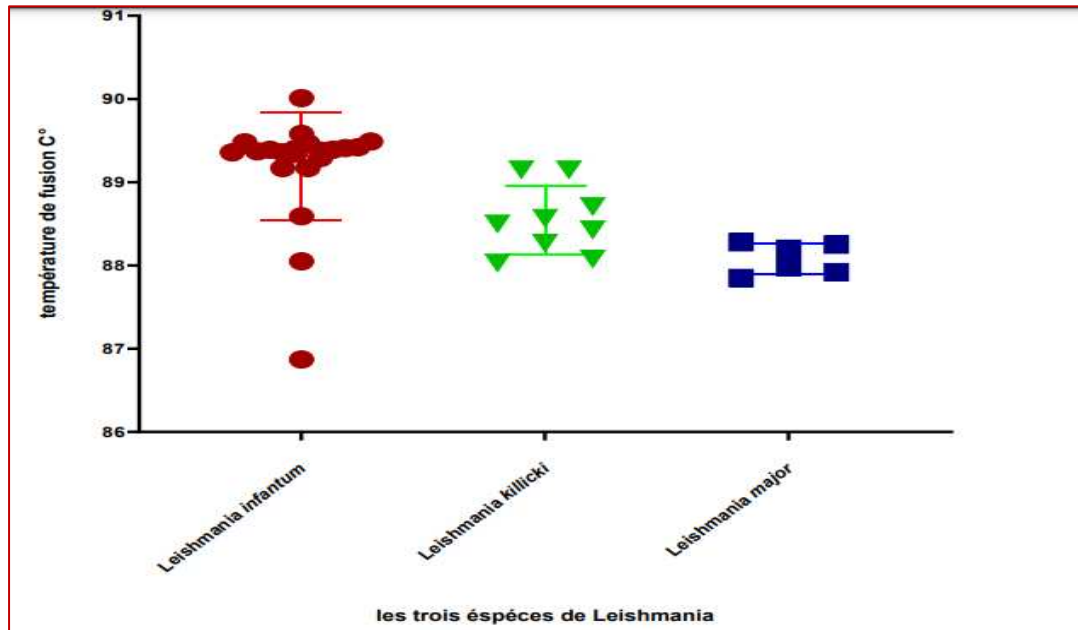


Figure 37 : la distribution des différentes souches selon leurs températures de fusion.

Cercle rouge : tms obtenues pour les différentes souches de *L. infantum*, **triangles verts** : tms obtenues pour les différentes souches de *L. killicki*, **carrés bleus** : tms obtenues pour les différentes souches de *L. major*.

- **Statistique descriptive :** Les barres qui interfèrent entre les différentes formes représentent la moyenne et l'écart type des différentes souches de chaque espèce représentée par la couleur de référence. La barre rouge mean with SD de *Leishmania infantum* avec une moyenne de 89.19 et un écart type de 0.65, la barre verte : mean with SD de *Leishmania killicki* avec une moyenne de 88.54 et un écart type de 0.40 et la barre bleue : mean with SD de *L. major* avec une moyenne de 88.08 et un écart type de 0.18.

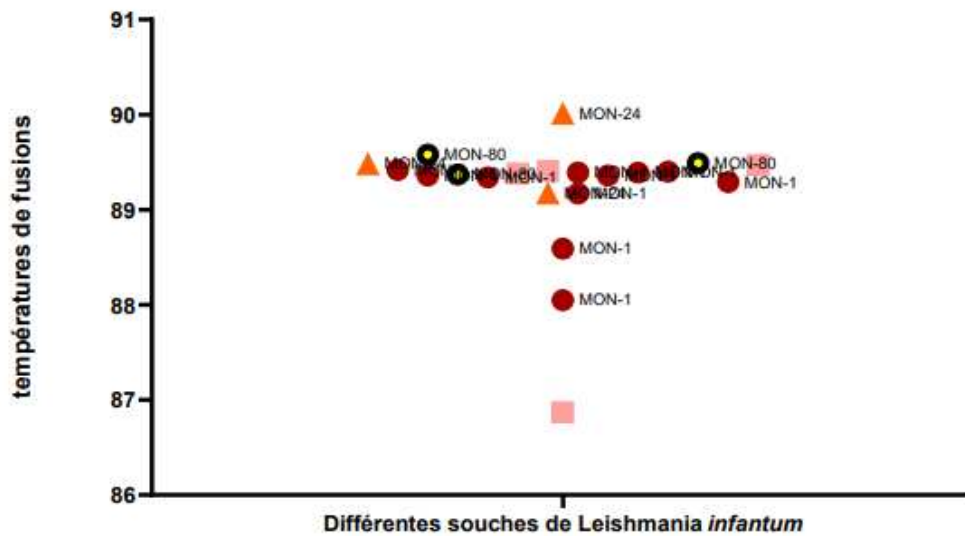


Figure 38 : la distribution de différentes souches *Leishmania infantum* selon les températures de fusion codée par couleurs et formes en fonction des zymodèmes MON-1 ; MON-24 ; MON 80.

Cercle rouge : zymodème MON-1 ; **cercle noir/jaune** : zymodème MON-80 ; **carré rose** : zymodème inconnu ; **triangle orange** : zymodème MON-24.

On peut déduire selon les courbes de températures de fusion de l'espèce *Leishmania infantum* (**fig. 38**) ainsi que la distribution des zymodèmes (différence de gènes de ménages) peut être considéré comme étant un polymorphisme (de modeste changement nucléotidique au niveau du génome de leishmania) ce qui explique le large panel de tm (MON-1 ; MON-24 ; MON-80) de *L.infantum* contrairement aux espèces avec un seul zymodème.

La distribution des Tm en fonction de zymodème montre que le zymodème MON-1 a un plus large spectre par rapport à MON-24 et MON-80. Ces deux derniers représentent des Tm presque similaires, et les espèces *L.infantum* avec les zymodèmes MON-1 et MON-80 ont tendance à avoir des tms assez proches voir similaires contrairement au zymodèmes Mon-24 avec des Tm assez variable entre 89.17 et 90.01.

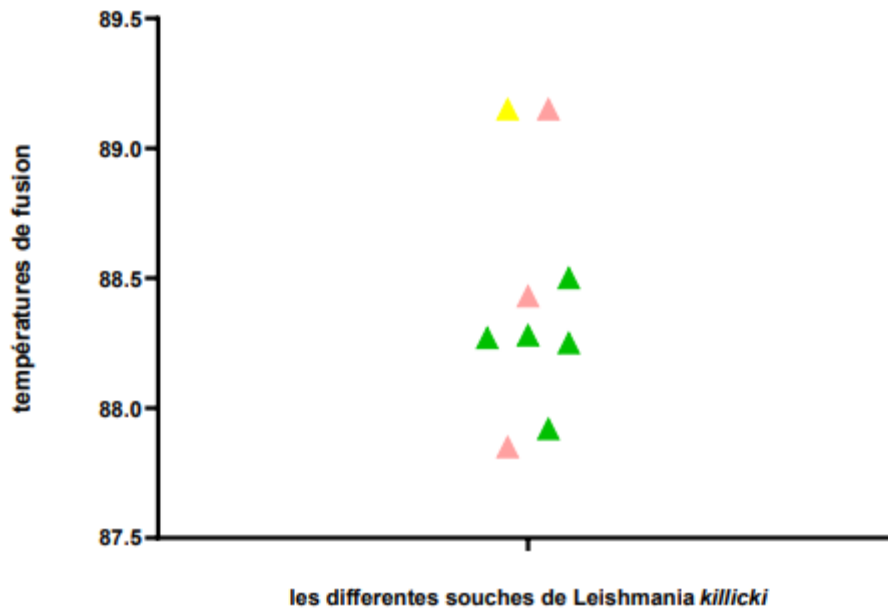


Figure 39 : La distribution des différentes souches de *L. killicki* par un code de couleur attribué pour les mêmes références en fonction de leur température de fusion.

Triangle vert : souches de référence 10/05 ; **triangle rose** : souches de référence 07/05 ; **triangle jaune** : la souche 11/05. Toutes ces dernières proviennent de Ghardaïa.

La distribution des tms des souches *L. killicki* présente une variété, ce qui montre que même les échantillons dont les résultats sont convergents peuvent présenter des Tm différentes. Cela peut être dû à un polymorphisme intra spécifique des espèces.

Les deux souches LIPA 10/05 et LIPA 07/05 se concorde entre elles.

Tableau III : Résultats des températures de fusions des trois espèces de *Leishmania* et leurs moyennes et écarts types

Espèces <i>Leishmanias</i>	Moyennes $\pm$ Ecart types
<i>Leishmania infantum</i>	89.19 ± 0.65
<i>Leishmania killicki</i>	88.08 ± 0.18
<i>Leishmania major</i>	88.54 ± 0.40

V. Discussion

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires provoquant des affections cutanées ou viscérales très invalidantes, voire mortelles si elles ne sont pas traitées. Elles évoluent dans des écosystèmes différents dont les évolutions cliniques divergent selon l'espèce du parasite en question, d'où l'importance de l'identification des espèces et la mise en place d'un diagnostic précis. (DEDET 2017)

Le diagnostic biologique repose principalement sur la mise en évidence du parasite à l'examen microscopique direct, son isolement en culture *in vitro* ou par les méthodes sérologiques. Cependant y a eu l'entrée des outils de la biologie moléculaire comme l'analyse iso enzymatique qui représente la méthode standard pratiquée pour l'identification des espèces *Leishmania* et leurs classifications, mais cette technique s'avère lourde à pratiquer et nécessite un équipement spécialisé. Après une longue utilisation des méthodes parasitologiques classiques, l'avènement de la méthode PCR a fourni une approche diagnostique puissante Andrew et al (2013) pour l'application des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des parasites. Diverses approches moléculaires basées principalement sur des techniques d'ADN ont été développées pour la détection et l'identification des parasites. Oryan et Zaker (1998)

Dans notre travail on s'est intéressée au développement et à la validation de méthodologie de détection, de quantification et de typage des espèces de *Leishmania* à la fois comme protocole pour laboratoire/bio banque pour le service de référence Zeina et al (1997) de l'institut pasteur d'Algérie ainsi que leurs collaborateurs mais également autant qu'outils de diagnostic à appliquer au matériel cliniques et cela par la technique de PCR ITS1 et PCR_HRM 7ARN SL, ce qui nous emmené à mettre en évidence les différentes espèces de *Leishmania* existantes en Algérie.

Dans un premier temps, une évaluation de l'apport des cultures de leishmanies sur milieu biphasique NNN provenant des différentes zones endémique de l'Algérie et cultivées à l'institut pasteur au niveau du laboratoire parasitologie, nous a permis de mettre en évidence le parasite *Leishmania* malgré les inconvénients de la culture *in vitro* tel que la surinfection bactérienne ou mycosique à des intervalle de durée de repousse assez stable pour les différentes souches variant de 4 à 7 jours pour des culots ayant des charges parasite entre 4×10^6 et 13×10^6 , ce qui est assez concordant avec des études précédentes.

Concernant les méthodes d'extractions de l'ADN des espèces de *Leishmania*, plusieurs méthodes ont été utilisées auparavant, comme la méthode du phénol/chloroforme, les kits commercialisés, ainsi que la lyse par des températures élevées. Pour notre part on a travaillé avec le mélange phénol/chloroforme et le Kit Qiagen afin d'évaluer la sensibilité de HRM et constater si la méthode d'extraction affectait les profils de courbes HRM. L'extraction d'ADN à partir du phénol/chloroforme a été utilisé avec succès par plusieurs auteurs (Porteous et Armstrong 1991; Tsai et Olson, 1991; Zhou et al., 1996; Portenous et al., 1997), car elle

permet d'obtenir de très bons résultats en qualité d'ADN mais une perte de quantité d'ADN peut se produire, mais ceci dit ce couple est très toxique et son utilisation nécessite une infrastructure appropriée, ainsi que l'étape de purification qui est assez délicate et qui risque des contaminations protéiques. Contrairement au kit qui est propre et sécurisé en matière d'utilisation mais c'est une méthode couteuse et lourde pour un laboratoire de recherche, pour ce qui est de la qualité de l'ADN extrait y a trop de divergence de résultats décrites par le Biochrom ce qui nous laisse dubitatifs sur sa fiabilité, donc on peut déduire qu'elles sont deux techniques équivalentes en matière de qualités d'ADN parasite extraits.

Dans un deuxième temps, ce qui concerne l'identification moléculaire des parasites, différentes techniques basées sur la PCR ont été utilisées auparavant afin de caractériser *Leishmania* cultivés. Les cibles les plus utilisées sont : ITS, les régions conservées des mini cercles des ADNs kinétoplastiques (Botilde et coll., 2006 ; Botilde ,Laurent , Quispe , Tintaya ,Chicarro , Cañavate , Cruz , Kuhls , Schönian , Dujardin). Pour ce qui est de la PCR ITS1, sa valeur taxonomique est largement validée dans la littérature. Dans ce travail, les PCR-RFLP ciblant les gènes ITS1 n'a pas pu être validée (absence des profils de digestions) pour les échantillons représentatifs des espèces de l'ancien monde malgré la présence et l'amplification de ces derniers après visualisation des cas positifs dans le gel de qualité ainsi que les différents Ct observés lors de la PCR en temps réel et cela peut être dû à la dénaturation de l'enzyme de restriction *HAE III* utilisée. En conséquent nous n'avons pas pu prouver la capacité de cet outil à être appliqués comme cible d'identification des espèces de *Leishmania*.

Afin d'exploiter les polymorphismes de l'ADN et la détermination des produits PCR issus de régions conservées (Alfonzo et coll., 1997JD Alfonzo, O. Thiemann , LX Simpson) en calculant la Température de fusion, un panel plus large d'échantillons a été préparés venant de différentes régions géographiques regroupant 3 espèces différentes. Nos résultats de la HRM 7ARN SL ont convergés avec les données de typage MLEE et séquençage des souches marqueurs utilisées ainsi que la moyenne de Tm issue de la comparaison des différentes souches d'une même espèces en fonction du graphprisme, particulièrement pour *Leishmania infantum* selon les graphes de dispersion des Tm avec un écart type de 0.1 Incluant des souches appartenant aux 3 Zymo dèmes (MON-1 ; MON-24 ; MON-80), mais des Tm assez dispersés pour *Leishmania major* et *Leishmania killicki* présentent une variété, ce qui montre que même les échantillons dont les résultats sont convergents peuvent présenter des Tm différentes Cela peut être dû à un polymorphisme intra spécifique des espèces.

Par conséquent nous avons comparé nos résultats à l'étude faites dans le gouvernorat situé dans le nord-ouest de la Tunisie d'EL KAF avec un matériel biologique de 27 souches leishmania isolé à partir des parasites cultivé in vitro représentant les espèces de l'ancien monde *L.major*, *L.killicki* et *L.tropica* afin de tester la spécificité de la HRM 7ARN SL, révélant une totale différence de température de fusion entre notre travail et les leurs pour une plage de Tm et moyenne $\pm$ SD de $73,67 \pm 0.20$ pour *L.major*, 72.67 ± 0.35 pour *L.infantum* et 73.04 ± 0.41 pour *L.tropica* contrairement à nos résultats qui proposent moyenne $\pm$ SD de 88.08 ± 0.18 pour *L.major*, 89.19 ± 0.65 pour *L.infantum* et enfin 88.54 ± 0.40 *L.killicki*, cela suggère que peut être le changement de des manipulateur ainsi que le matériels scientifique et

la moyenne du pipetage, peut avoir une influence sur la sensibilité de la HRM 7ARN SL comme il été déjà prouvé pour la HRM HSP70 qui a ciblé deux régions dans la protéine HSP70 une conservé et l'autre divergente, nécessitant la modification de plusieurs paramètres de réaction, y compris un protocole d'abaissement, qui a finalement amélioré l'amplification des cibles du gène de l'ARN 7SL. En outre, l'ajout de DMSO à améliorer les réactions PCR de l'ARN 7SL et de la HSP70. Des études antérieures ont utilisé des protocoles de PCR avec contact pour améliorer la spécificité et la formation de produits (**kuang Z et al., 2018 ; N King WD, Taylor SA, 2011**). Cette approche offre un moyen simple et rapide d'optimiser les PCR et répond spécifiquement aux limites inhérentes aux calculs de T_m , augmentant ainsi la sensibilité, la spécificité et la formation de produits (**Wu WM, Tsai HJ, 2005**). En outre, elle permet d'éviter dans une large mesure les longs processus d'optimisation et la reconception des amorces (**Korbie and all 2008**). Pour cela une étude plus poussée avec un nombre important de souches doit être refait afin d permettre la discrimination de ces espèces en fonction de leurs températures de fusion et la reproductibilité de la manipulation (**Zampieri RA et al., 2016 ; Talmi-Frank D, Nasereddin, 2010**)

Dans l'ensemble, le protocole HRM 7ARN SL décrit ici a identifié les espèces *Leishmania* avec précision et sensibilité importantes dans la majorité des cas de Leishmaniose en Algérie. Le test est simple et rapide, et son utilisation en clinique ou dans la recherche d'échantillons présente de nombreux avantages, comme un coût total inférieur pour l'identification d'un échantillon et d'autres caractéristiques qui facilitent son application et représente un candidat potentiel afin de surmonter les inconvénients de la technique standard MLEE pour réduire les couts élevés, augmenter le nombre d'échantillons à analyser par expérience. Il n'est pas nécessaire de procéder à un séquençage ou à un fractionnement sur gel pour analyser le produit, évitant ainsi la contamination du laboratoire par les produits PCR car ces produits sont jetés sans être manipulés. Cela réduit également le besoin de personnel qualifié pour analyser le profil de fractionnement d'un gel électrophorétique ou les données de séquençage pour fournir un résultat. Le test HRM présente également la possibilité de quantifier les parasites présents dans les échantillons car il s'agit d'une technique basée sur la PCR en temps réel.

CONCLUSION

VI. Conclusion

Les leishmanioses sont des zoonoses parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, transmises par la piqûre d'un insecte vecteur phlébotome femelle. Deux formes de leishmaniose coexistent à l'état endémique en Algérie : la forme cutanée due à *L. major* et *L. killicki*, et la forme viscérale due à *L. infantum*, cette dernière pose un réel problème de santé publique.

L'objectif de notre travail est d'étudier la sensibilité et la spécificité de la HRM 7ARN SL dans l'identification des trois espèces de *Leishmania* *L.killicki* ; *L.infantum* ; *L.major*.

A cet effet, nous avons cultivé plusieurs souches parasitaires. Au cours de notre étude, nous avons testé deux méthodes d'extraction d'ADN, la première en utilisant un solvant organique : le phénol chloroforme, l'autre en utilisant un kit commercialisé qui est le Kit Qiagen: qui a donné de meilleurs résultats pour les profils HRM. Mais compte tenu le coup financier, le phénol chloroforme représente une alternative pas chère mais très toxique, mais qui n'arrive pas à éliminer les contaminants protéiques.

Au cours de notre étude, cette technique a été utilisée pour la première fois en Algérie pour l'identification des espèces de *Leishmania*. Les résultats de la HRM avec l'amorce 7RNA SL, nous ont révélé la présence de *L.infantum* et *L.major* et *L.killicki* dans les régions endémiques d'Algérie (Gherdaia, Alger, Bouzariaa...). Les résultats des PCR et de la HRM nous ont permis de définir un Protocole de manipulation de HRM, en valorisant les différents paramètres de cette technique, ainsi que la discrimination des trois espèces principales de *Leishmania* en fonction des profils des courbes de fusion Tm.

Des études sur un échantillon plus grand de *Leishmania major* et *Leishmania killicki* et en utilisant également un autre fluorochrome moins sensibles aux saturation d'ADN comme EvaGreen, ainsi que l'investissement dans le designs d'amorces afin de cibler d'autres régions du génome de *Leishmania* et confirmer les analyses HRM avec d'autres techniques de typage comme PCR-RFLP pour comparer les concordance des résultats , seraient une des perspectives d'avenir afin de confirmer les résultats obtenus au cours de notre recherche.

En conclusion, le protocole PCR-HRM 7ARN SL décrit est une procédure peu coûteuse, fiable, facile à appliquer et potentiellement automatisée qui constitue une bonne alternative pour la détection, la quantification et l'identification des espèces de *Leishmania* dans des échantillons biologiques et cliniques.

ANNEXES

ET

RÉFÉRENCES

ANNEXE

Annexe1

Tableau IV : les quinze souches cultivés et extraits de leurs ADN

Numéro de tube	Références	Espèces
1	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
2	Lipa 330/13	<i>L. major</i>
3	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
4	Lipa 270/11	<i>L. infantum</i>
5	Lipa 270/11	<i>L. infantum</i>
6	Lipa 270/11	<i>L. infantum</i>
7	Lipa 330/13	<i>L. major</i>
8	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
9	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
10	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
11	Lipa 10/05	<i>L. killicki</i>
12	Lipa 270/11	<i>L. infantum</i>
13	Lipa 270/11	<i>L. infantum</i>
14	Lipa 330/13	<i>L. major</i>
15	Lipa 330/13	<i>L. major</i>

Annexe 2 : Les réactifs d'extraction

Phénol Chloroforme

1. Lyse des parasites

- 200 µl de tampon de lyse
- 12.5 µl SDS 10%
- 5 µl de la protéinase K
- Incuber toute la nuit a 55 C°

2. Extraction phénol chloroforme

Les étapes suivantes se feront sous la hotte chimie (sauf les centrifugations) ;

- On ajoute un volume égal de mélange phénol chloroforme / alcool iso amylique (25v/24v/1v) «500 µl».
- Mélanger les deux phases jusqu'à obtention d'un mélange laiteux (2 à 3 mn).
- Laisser agir 5 mn sur paillasse.
- Centrifuger à 13000g pendant 10 minutes.
- Récupérer la phase supérieure sans aspirer l'interphase, la transférer dans un nouveau tube de 2ml.

3. Précipitation

Mettre de l'acétate de sodium (1/10 du volume de notre échantillon ex : pour 200 µl de surnageant + 20 µl d'acétate de sodium).

- Ajouter deux fois le volume de l'éthanol absolu (500 µl).
- Centrifugation à 12000g à 4 C° pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant délicatement.
- Ajoutez 500 µl de l'Ethanol à 70 %.
- Centrifugation à 12000g à 4 C° pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant délicatement.
- Laisser sécher une nuit à température ambiante.
- Après une nuit de séchage ajouter 100 µL de TE.

Annexe 3 : L'électrophorèse sur gel de qualité

Réactifs

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

Préparation du gel d'agarose à 0,8%

- Peser 0,8g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après chauffage, mélanger au micro-onde jusqu'à obtention d'un liquide limpide, pour le refroidir, mettre le mélange sous l'eau courante puis ajouter 7µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne. Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE

Préparation pour la visualisation

Pour cela, 7µl d'ADN de chaque échantillon a été mélangé avec 3µl de tampon de charge puis les déposés dans les puits de gel. Ensuite, on branche les électrodes de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient de côté cathode en appliquant une tension de 110 V qui correspond à environ 40 min de migration. Enfin, lorsque le colorant chargé arrive près du front de migration, l'alimentation est coupée. La révélation des bandes d'ADN est accomplie en visualisant simplement la migration des bandes d'ADN sur une table UV d'un Trans-illuminateur dans une chambre noire

Annexe 4 : la PCR ITS

Tableau I : Concentrations et volumes des réactifs pour la PCR ITS1.

Produit	Rôle	Volume pour un échantillon
Buffer 10X	Milieu réactionnel	2.5 µl
dnTP	Elongation des deux brins d'ADN	2.5 µl
Mgcl2	Cofacteur positif de la Taq polymérase	1 µl
Primer 1	Le reverse et le foward	0.5 µl
Primer 2		0.5 µl
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN	0.125 µl
Eau distillée stérile	Pour l'équilibre	13 µl
Total mix	-	20.125 µl

**Figure** : Hotte à flux laminaire (IPA).

Tableau III : Programmation de l'amplification PCR de la région ITS1.

<i>Paramètres</i>	<i>Temps et température</i>	<i>Nombre de cycle</i>
Dénaturation initiale	95 °C pendant 5 min	1
dénaturation	95 °C pendant 20 sec	
Hybridation	53 °C pendant 30 sec	35
Elongation	72 °C pendant 1 min	
Elongation finale	72 °C pendant 6 min	1

Annexe 5 : PCR quantitative

Préparer le Mix de la PCR quantitative pour 13 échantillons d'ADN en ajoutant 84.5 µl d'eau distillée, 13 µl d'amorces PCR, 2µl sonde Taqman et 162.5 µl du master mix. Mélanger par pipetage de haut en bas. 22 µl du mélange PCR sont pipeté dans chaque microtube en ajoutant un volume de 5 µl d'ADN dans les tubes préalablement étiqueté avec les références de l'ADN de chaque espèce, en gardant un contrôle négatif constitué par le mélange réactionnel et de l'eau au lieu de l'ADN matrice ont été ajoutés.

Tableau IIII : Volumes des réactifs pour la RT-PCR sonde TaqMan.

Produit	Rôle	Volume pour un échantillon
Master mix	Remplace le kit	12.5 µl
Primer 1	La reverse	0.5 µl
Primer 2	Laforward	0.5 µl
Sonde Taqman	s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN cible	2 µl
Eau distillée stérile	Pour l'équilibre	6.5 µl
Total mix	-	22µl

Tableau IVI : La Programmation du SMART cycleur pour la sonde Taqman.

<i>Paramètres</i>	<i>Temps et température</i>	<i>Nombre de cycle</i>
Dénaturation initiale	50 °C pendant 2 min	1
dénaturation	95 °C pendant 15 min	40
Hybridation	95 °C pendant 5 sec	
Elongation	60 °C pendant 35 sec	1

Annexe 6 : PCR-HRM ARN7SL

- **Le principe de la HRM :**

La HRM (High Resolution Melting analysis) (Azmi, Nasereddin , Ereqat ,Schönian ,Abdeen, 2006) est une extension de l'analyse en courbe de fusion dont l'objectif principal est le criblage et l'identification de nouveaux variants sur un amplicon entier en utilisant uniquement des amorces spécifiques. Elle est basée sur le comportement de dissociation de l'ADN double brin en raison de l'augmentation de la température tout en mesurant la fluorescence de l'agent intercalant SYBR Green (Ceccarelli et coll., 2014M. Ceccarelli, Galluzzi ,Migliazzo , Magnani).

Tableau IX : Volume des réactifs de la PCR-HRM.

Mix	Volume pour un échantillon
H2O PCR grade	6.5 µl
Amorce R	0.5 µl
Amorce F	0.5µl
Master mix sybergreen	6µl
Echantillon (ADN)	2µl

En appliquant le protocole de Nasereddin et Jaff 2010 les conditions de réaction comprenaient les étapes suivantes (tableau IX) :

Tableau V : Programmation de la PCR-HRM (Nasereddin et Jaff, 2010).

	Température	Temps	Slope (°C/sec)
Dénaturation	95	15 min	20
Amplification (40 cycles)	95	5 s	20
	55	10 s	20
	72	2 min	20
Melting	75-95		0.1

Tableau VII : les différentes souches des trois espèces de Leishmania et leurs informations, utilisées lors de l'optimisation des tests HRM.

Référence	Code internationale	Forme clinique	Espèce	Zymodeme	Localisation
147	MCAN/DZ/86/LIPA147	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	BISKRA
250L	MCAN/DZ/90/LIPA250L	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	ALGER
270/11		LV	<i>L.infantum</i>		
330			<i>L.infantum</i>		
428	MHOM/DZ/95/LIPA428		<i>L.infantum</i>	MON-80	INCONNU
431	MHOM/DZ/95/LIPA431		<i>L.infantum</i>	MON-24	LAKHDARIA A
463			<i>L.infantum</i>		
472	MCAN/DZ/96/LIPA472	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	ZIRALDA
474	MCAN/DZ/96/LIPA474		<i>L.infantum</i>	MON-80	INCONNUE
497	MCAN/DZ/96/LIPA497	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	BOUZERIAA
835	MCAN/DZ/98/LIPA835	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
979			<i>L.infantum</i>	MON-1	MEDKA
1010	MCAN/DZ/00/LIPA1010	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1046	MCAN/DZ/00/LIPA1046	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1108	MCAN/DZ/00/LIPA1108	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1111	MCAN/DZ/00/LIPA1111	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1112	MCAN/DZ/00/LIPA1112	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1116	MCAN/DZ/00/LIPA1116	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1117	MCAN/DZ/00/LIPA1117	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
1119	MCAN/DZ/00/LIPA1119	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-1	INCONNU
Chien kika					
Chien P					
390			<i>L.infantum</i>		INCONNU
1118	MCAN/DZ/00/LIPA1118	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-80	INCONNU
1345	MCAN/DZ/02/LIPA1345	LVC	<i>L.infantum</i>	MON-24	
10/05	MHOM/DZ/05/LIPA10/0 5	LCH	<i>L.killicki</i>	MON-301	Ghardaïa
07/05	MHOM/DZ/05/LIPA07/0 5	LCH		MON-301	Ghardaïa
11/05	MHOM/DZ/05/LIPA11/0 5	LCH		MON-301	Ghardaïa
211					
209					
633/33					
330/13		LC			
233	IPAP/DZ/1989/LIP1233	Phlé b		MON-25	Biskra
544/17			<i>L.major</i>		
556/18					
557/18					

Annexe 7 : RESULTATS

Tableau VIII : Les charges parasitaires après leurs récoltes et quantification.

Echantillons	Référence	Etat clinique	Nombre de parasites (cellules/ml)
1	LIPA 10/05 (<i>L.killicki</i>)		13x 10 ⁶
3			10x 10 ⁶
8			10x 10 ⁶
9			13x 10 ⁶
10			18x 10 ⁶
11	LIPA 270/11 (<i>L.infantum</i>)		6x 10 ⁶
4			30x 10 ⁶
5			60x 10 ⁶
6			20x 10 ⁶
12			30x 10 ⁶
13	LIPA 330/13 (<i>L. major</i>)		4x 10 ⁶
2			5x 10 ⁶
7			8x 10 ⁶
14			7x 10 ⁶
15			4x 10 ⁶

Tableau VIII : les concentrations et rapports des différentes souches par spectrophotométrie simpli Nano Biochrom.

Echantillon	Référence	Concentration ng/μL	Rapport 260/280	Rapport 260/230
7	LIPA 10/05 (<i>L. killicki</i>)	46,5	2,067	2,214
11		5,5	2,2	5,5
12		3		3
13		0,5	-1	-0,25
15		46,5	1,824	0,439
1	LIPA 270/11 (<i>L. infantum</i>)	20	1,739	0,29
3		44	2,316	3,034
4		13	2,889	-26
8		26	2,261	2
9		7	1,75	1,4
2	LIPA 330/13 (<i>L. major</i>)	13,5	1,929	3
10		2,5	5	
14		5,5	1,571	0,268
5		29,5	1,093	0,578
6		7,5	1,25	0,238

- Abdelkader Zeroual (2022) La leishmaniose au Maroc : présentation, épidémiologie et stratégies de lutte
- Alain branger, m.-m. r. (2007). alimentation, securité et controle microbiologique. 210 page.
- Alborzi A, r. M. (2006). leishmania tropica isolated patient with visceral leishmaniasis in southern iran. *AmJ Trop Med hyg*, 74: 306-307.
- Almi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schöinian G, Töz SO, Jaffe CL et al. Détection et identification des *Leishmania* de l'ancien monde par analyse de fusion à haute résolution. *PLoS Negl Trop Dis*. 201
- Andrade HM, Reis AB, Dos santoSL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha. (2006). Utilisation de la PCR-RFLP pour identifier les espèces de *Leishmania* chez les chiens naturellement infectés. *Vétérinaire Parasito* , 140 (3–4):231–238.
- Andrew B., Jull., Natalie Walker., Sohan Deshpande., (2013). Traitement topique des plaies leishmaniennes. 28 February2013
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD005083.pub3>
- Antonia, A. W. (2018). Un test PCR en temps réel pour la quantification de la charge parasitaire dans les modèles murins de la leishmaniose.
- Aoki,JI, Muxel, SM, Zampieri, RA, Acuña, SM, Fernandes, JCR, Vanderlinde, RH, et al. (2017). Disponibilité de la L-arginine et activité de l'arginase : caractérisation de la perméase d'acide aminé 3 chez *Leishmania Amazonensis*.
- Aronson, NE, Joya, Californie (2019). Leishmaniose cutanée. *Infecter. Dis. Clin. Amérique du Nord*. 33(1), 101–117.
- Azizi, K., Rassi, Y., Moemenbellah-Fard, MD (2010). Détection Basée Sur La PCR De L'ADNk De *Leishmania Major* Dans *Phlebotomus Papatasi* Infecté Naturellement Dans Le Sud De L'Iran. *Trans. R. Soc Trop. Méd. Hyg*. 100(6), 440–442.
- Bachi, F. (2001). Amélioration des moyens diagnostique des leishmaniose en Algérie .Thèse de Doctorat en Sciences Médicales.Faculté de Médecine . Université d'Alger .
- Bachi. F (2006). Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. Service de biologie parasitaire, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie. *La Lettre de l'Infectiologue* - Tome XXI - n° 1 - janvier-février 2006; 9-15
- Bates,PA, Depaquit, J., Galati, EA, Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, MA, et al. (2015). Progrès récents dans la recherche sur les phlébotomes liés à la lutte contre la leishmaniose. *Parasitol. Vecteurs*.
- Botilde et coll., 2006 Y. Botilde, T. Laurent, Quispe, W. Tintaya, C. Chicarro, C. Cañavate, I. Cruz, K. Kuhls, G. Schöinian, JC Dujardin Comparaison de marqueurs moléculaires pour le typage des souches de *Leishmania infantum*

- Boussaa Samia (2008). Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc : effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des Phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. Doctorat Ecologie, Epidémiologie. Strasbourg 1 : 2008, Université Louis Pasteur
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. . *Journal of Molecular Endocrinology* , 169-193.
- Carré N, Collot M, Guillard P et al. (2010). La leishmaniose viscérale: Epidémiologie diagnostic. Traitement et prophylaxie. 127:p 121-148
- Ceccarelli et coll., 2014 M. Ceccarelli , L. Galluzzi , A. Migliazzo , M. Magnani Détection et caractérisation de la leishmanie (leishmania) et de la leishmanie (viannia) par PCR en temps réel basée sur le vert SYBR et analyse par fusion haute résolution ciblant l'ADN du minicercle des kinétoplastes.
- Chen, W., Martinez, G. and Mulchandani, A. (2000). Molecular beacons : A real time polymerase chain reaction assay for detecting Salmonella. *Analytical Biochemistry* .208: 166-
- Cherif Kamel (2014). Etude Eco-Epidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le Bassin du Hodna (M'SILA). Doctorat en Sciences. Université Ferhat Abbas-Sétif 1
- Corbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR pour une spécificité et une sensibilité accrue dans l'amplification PCR. *Protocole Nat.* 2008 ;172.
- Dédit, 1999 ; Desjeux, 2001, 2004 ; Ouellette et al, 2003 Aspects clinique et génétique des leishmanioses cutanée
- Dedet .J.P (2009). Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique Elsevier Masson Sas a-10: p508-506
- DEDET J.P (2017). Leishmanioses cutanée; in : «Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques». Dermatologie et médecine. Springer-Verlag, Paris.
- Denis tagu, c. m. (2006). *principes des techniques de biologie moléculaire* (éd. 2e édition).
- Denis tagu, Stéphanie Jaubert-Possamai, Agnès Méreau, coord. (2018). *principe des techniques de biologie moléculaires et génomique* (éd. 3e édition). france.
- E.A., C. C. (2001). Leishmaniasis as an Emerging Infection . 175-182.
- Elie C, C. J. (2008). A methodological framework to distinguish spectrum effects from spectrum biases and to assess diagnostic and screening test accuracy for patient populations: application to the Papanicolaou cervical cancer smear test. 8: 7.
- Elsevier-Masson, I.-l.-M. (2016). leishmaniose dans: association française des enseignants de parasitologie et micologie. 95-107.

- EMNA SIALA et al. (2022). La leishmaniose viscérale méditerranéenne : Actualités du diagnostic biologique.
- Estevez. Y (2009). Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure-activité
- EvensAC, Peacock CS, W orthey EA, Murphy L, Aggarwa G, Berriman M et al. (2005). *le génome du parasite kinétoplastide, leishmania major science*.309(5733) : 436-42.
- Faraj C., Himmi O., (2020). Liste actualisée des Phlebotominae (Diptera : Psychodidae) du ENTOMOLOGIE MÉDICALE Maroc.DOI 10.3166/bspe-2020-0107.
- Fortin,N. Y., Mulchandani, A. and Chen, W . (2001). Use of real time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of Escherichia coli O157:H7. *AnalyticalBiochemistry*.289: 281-288.
- François Le Pont. (1992). Leishmanioses et phlébotomes en B olivie (Vol. 144), p36.
- Guillaume Odonne (2011). Approche ethnopharmacologique comparative des traitements phytothérapeutiques de la leishmaniose en Amazonie. Application aux communautés Chayahuita (Pérou) et du haut et moyen Oyapock (Guyane française). Doctorat. Université des Antilles-Guyane.
- Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C. & Belkaid M. (2009). Description of Leishmania close to L.killicki (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria; Trans. R. Soc. Trop. Med. And Hyg, 103 716-720
- Hechemi louzir, k. a. (2013). les leishmanioses vues au travers du réseau international des instituts pasteurs .
- Higuera SL, G. F. (2013). Identification des unités de typage discret (DTU) de trypanosomacruzi grâce à la mise en œuvre d'un test de génotypage à haute résolution (HRM). . *Vecteurs parasites* , 112.
- Icheboudene K., Benzitouni A., Ravel C., Taharboucht Z., Zemmouriet M. & Bachi F., (2018). Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Algérie, par caractérisation moléculaire. *Option Bio*. 573-574 (29) : 6
- Idaikra.N. (2016, join). Etude de la chimiorésistance aux antimonies chez Leishmania en Algérie : Validation des tests in vitro et Développement de marqueurs moléculaires .
- IZRI M.A., BELAZZOUG S., PRATLONG F., & RIOUX J.A., (1992). Isolement de L. major chez Phlebotomus papatasi à Biskra (Algérie). *Ann Parasitol Hum Comp*, 67: 31-32
- IZRI. (2007). Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en algerie.

-
- Jaffe, A. N. (2010). Rapid Diagnosis of Old World Leishmaniasis by High-Resolution Melting Analysis of the 7SL RNA Gene. *Journal Of Clinical Microbiology* , 2240–2242.
 - John kaisermann, Milos Pawlowski, Yavor Mendel. (2020). *technique de biologie moléculaire II*.
 - K. Aknouche, F. Z. Aissat, A. Amrane, A. Ramaoune . (2013). leishmaniose viscérale chez les adultes infectés par le VIH-1.
 - K. Azmi, A. Nasereddin, S. Ereqat, G. Schöniar, Z. Abdeen Identification des espèces de Leishmania de l'Ancien Monde par PCR–RFLP du gène de l'ARN leader épissé à 7 et test de transfert de points inversé
 - Karen Leroy, Patricia de Cremoux John Libbey Eurotext. (2014). anomalies moléculaires des cancers: criblage thérapeutique. 289, (page 40).
 - Kelly, M., Su, C-Y., Schaber, C., Crowley, J.R., Hsu, F-F., Carlson, J.R., Odom, A.R. (2015). Malaria parasites produce volatile mosquito attractants.
 - Koltas IS, Eroglu F, Alabaz D, Uzun S (2014). the emergence of leishmania major and leishmania donovani in southern turkey .108: 154-158.
 - kouato, b. s. (2005). evaluation de diagnostic par pcr directe et pcr-elisa sur les ITS des trypanosomes pathogènes du bétail.
 - Kuang Z, 2018Zhang C, Pang H, Ma Y. Une méthode de fusion rapide à haute résolution pour la différenciation des espèces de *Leishmania* ciblant le gène *manquant*. Acta Trop. 2018 ; 178 : 103-6.
 - LeeflangMM, Bossuyt PM, Irwig L. (2009). Diagnostic test accuracy may vary with prevalence: implications for evidence-based diagnosis. J Clin Epidemiol.62(1): 5-12.
 - M. Akhoundi, Kuhls, A. Cannet , J. Votýpka , P. Marty , P. Delaunay , D. Sereno (2016). un aperçu historique de la classification, de l'évolution et la dispersion des parasite et phlébotomes.
 - Mohammed Akhoundi, (2017). Leishmania infections : Molecular targets and diagnosisMohammad Akhoundi 1, Tim Downing 2, Jan Votýpka 3, Katrin Kuhls 4, Julius Lukeš 5, Arnaud Cannet 6, Christophe Ravel 7, Pierre Marty 8, Pascal Delaunay 9, Mohamed Kasbari 10, Bruno Granouillac 11, Luigi Gradoni 12, Denis Sereno 13.
 - Mohammed Akhoundi (2017) Winker *et al*, 1996). (Vickerman *et al*...1970) (Blaineau *et al*, 1991). (Van *et al*, 1984) (Alvarez *et al*, 1994). Ouellette *et al*, 2003).(Simpson 1987),Kabbet *al*, 2001) (Gott, 2003),(Lodish *et al*, 2000).Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis
 - M. chomarat, F. Breysse. (2011, aout). technique d'analyse des courbes de fusion haute résolution(FHR) ou high resolution melting (HRM) en infectiologie. 207-211.

- Michael Eikmans , JianxinYang, BeritKemps-Mols, Marijke Spruyt-Gerritse, Jacqueline Anholts, François Claas. (2016) .La source du master mix vert SYBR détermine le résultat des réactions d'amplification des acides nucléiques
- M. krypuy, Ashour Ahmed , D Etemadmoghadam , SJ Hyland (2007). fusion haute résolution pour le balayage des mutations des exons 5à8 de TP53. p168.
- M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoberg, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, N. Zoric,(2006)« [The real-time polymerase chain reaction](#) » [[archive](#)], *Mol Aspects Med.*, 2006
- M. ouellette, M. Olivier, S. Sato et B. Papadopoulou (2003, octobre). le parasite leishmania à l'ère de la post-génomique. p900-909.
- Masson, G. B. (2006). Justifier les décisions médicales et maîtriser les coûts.
- MAZOUNI Siham, O. S. (2018, juillet). Etude de la diversité génétique des Leishmanias dans la wilaya de Tizi Ouzou.
- McKean PG, Denny PW, Knuepfer E, Keen JK, Smith DF. (2001). Changements phénotypiques associés à la suppression et à la surexpression d'une famille de gènes régulés par stade chez Leishmania. *Microbiol cellulaire*. 3: 511-23.
- M. Zemmour (2019) Épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Algérie à travers la caractérisation moléculaire Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Algeria through Molecular Characterization F. Bachi · K. Icheboudene · A. Benzitouni · Z. Taharboucht · M. Zemmouri (2019)
- Nadau. Q (2005). Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le test d'intradermoréaction de la leishmaniose canine. Doctorat vétérinaire. Université
- Nadia, b. (2017). aspects biologique, génétique et diagnostique de la leishmaniose dans la région d'annaba.
- OMS, h. a. (2017). la leishmaniose: actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la leishmaniose . p1-168.
- OMS 2021Figure de répartition géographique (Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2021, évaluation de l'impact de la pandémie de COVID-19)
- Organisation mondiale de la santé (OMS) (2014). Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la Région OMS de la Méditerranée orientale / Bureau régional de la Méditerranée orientale.
- Organisation, w. h. (2009, novembre). leishmaniasis in the european region, A WHO consultative intercountry meeting.
- Oryan A., et Zaker S.R., (1998). Effets de l'application topique de miel sur la cicatrisation des plaies cutanée chez le lapin. Zentralbl. Veterinarmed. A, 45 : 181-188

- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz J C, et al. (2007). *comparative genomic analysis of three leishmania species that cause diverse humain disease*. nat Genet.39:p839-847.
- Pierre Aubry., Bernard-Alex Gaüzère., (2019). Leishmanioses. Centre René La busquière, Institut de Médecine Tropicale, Université de Bordeaux (France). Mise à jour le 29/01/2020. www.medicinetropicale.com
- Prat, c. n. (2022, aout). génétique médicale. 145-146.
- Quitterie N,Odette ,Nadau C. (2015). Etude préliminaire de l'utilisation de la protéine LACK dans le test d'itra-dermo-réaction de la leishmaniose canine-sabatier. 116: p12-51.
- R. Coquoz,, J. Comte, D. Hall, T. Hicks , F Taroni. (2013). *preuve par l'adn: la génétique au service de la justice*.p45.
- Rønsted Nina., Mark Chase. W., Dirk C. Ablach., & Maria Angelica bello (2002). Phylogenetic relationships within Plantago (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid trnL-F sequence data. Botanical Journal of the Linnean Society, Volume 139(4), P 323-338. First published: 25 July 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00070.x>
- Schutz E, von Ahsen N. (2009). Facteurs d'influence des courbes de fusion du colorant dsDNA (haute résolution) et appel de génotype amélioré basé sur des considérations thermodynamiques. *Biochimieanale* , 385(1): p43–152.
- Sereno D, Lemesre JL. (1997). Formes d'amastigotes cultivées de manière axénique comme modèle in vitro pour l'étude d'agents antileishmaniens. 41: 972-6.
- Thomsen N, Ali RG, Ahmed JN, Arkell RM. (2012). Analyse de fusion haute résolution (HRMA); une alternative viable à l'électrophorèse sur gel d'agarose pour le génotypage de la souris. *PLoS One*.7(9).
- Toz SO,Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, Gunduz C, Ozbek Y. (2013). Une méthode basée sur ITS1-PCR en temps réel dans le diagnostic et l'identification des espèces de parasites leishmania à partir d'échantillons cliniques humains et canins en turquie. *PloSNegl Trop Dis* .7(5).
- Tse MY,2011 Ashbury JE, Zwingerman N, King WD, Taylor SA, Pang SC. Une méthode basée sur la fusion haute résolution (HRM) raffinée, rapide et reproductible, adaptée à la quantification de la méthylation globale des éléments répétitifs LINE-1. Notes de résolution BMC. 2011 ;4 :565
- Valério-Bolas Ana., Pereira Maria., Alexandre-Pires Graça ., Santos-Mateus David., Rodrigues Armanda., Rafael-Fernandes Mariana., Aurea Gabriel., Felipe Passero., Gabriela Santos-Gomes .(2019). Intracellular and extracellular effector activity of mouse neutrophils in response to cutaneous and visceral Leishmania parasites. Cell. Immunol. 335, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.11.003>.

- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. (2004). PCR-RFLP pour identifier *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* et *L. (Leishmania) amazonensis* responsables de la leishmaniose cutanée américaine. *Acta Trop* , 31–37.
- Wu WM, 2005 Tsai HJ, Pang JHS, Wang HS, Hong HS, Lee YS. Le programme de thermocyclage Touchdown permet une méthode robuste de typage du polymorphisme d'un seul nucléotide basée sur une réaction en chaîne par polymérase en temps réel spécifique à un allèle. *Biochimie anale*. 2005
- Wu Y, E. F. (2000). A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol BiochemParasito* , 345–57.
- Zampieri RA, Rasouli M, Shamsizadeh A. (2016). high resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of leishmania species. *ploSNegl Trop Dis* .74: 306-307.
- Zeina B., Zohra B.I., et al Assad S., (1997). Les effets du miel sur les parasites *Leishmania*. Une étude in vitro. *Trop. Doct.* 27 Suppl1: 36-38
- Zhang W.W., Matlashewski G., (2001) Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbille*,; 39(4): 935-48.