

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 des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et de Microbiologie



Mémoire de Master

Filière : Biologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Application de la QPCR dans l'étude
de la charge parasitaire au cours de
la résistance au traitement à la
leishmaniose cutanée.**

Présenté par

ALMABOUDI Yasmina

SAHEB Sarah

Composition du jury

M ^{me} SI-AHMED ZENNIA S.	Maître de Conférence B	Présidente
M ^{me} EDDAIKRA N.	Maître assistant (IPA)	Promotrice
M ^{me} TAZDAIT R.	Maître de Conférence B	Co-promotrice
M ^{me} SENANI-OULARBI N.	Maître assistant A	Examinatrice
M ^{me} MESSAOUDI-MOHAMDI D.	Maître assistant A	Examinatrice

Année universitaire : **2015 / 2016**

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 au Laboratoire de 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-promotrice **Mme Tazdait Rym**, Maitre de Conférence à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour son orientation judicieuse et pour nous avoir permis d'effectuer notre travail au sein de l'institut Pasteur d'Algérie.*

Nous tenons à remercier également :

*Notre présidente du jury **Mme Zenya. S** maitre 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 examinatrice **Mme Senani-Oularbi N et Messaoudi- Mohamdi D** , Maitres assistantes à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir accepté d'examiner notre manuscrit.*

*Nos plus sincères remerciements au **Dr Harrat Zoubir** pour avoir accepté de nous accueillir au sein du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et Génétique des populations de l'IPA.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à **Mme Kherachi ihcene** et **Mr Bouiba Lazhari** pour leur aide inestimable, leurs encouragements et leurs conseils.*

*Nos remerciements à toute l'équipe de service d'éco-épidémiologie parasitaire au sein du l'institut pasteur et plus particulièrement à **Mounir**.*

Dédicaces

Nous dédions ce modeste mémoire de fin d'études à nos parents, merci pour tout le soutien et l'amour que vous nous portez

A la mémoire de Nana

Puisses-tu reposer en paix

A nos frères

Idir Saheb, Kousseila et Yacine Almaboudi

A Samir

Pour sa patience, sa disponibilité et ses compétences

A nos amis

Ahmed et Sara, pour leur aide inestimable et Ouardouche pour son soutien moral.

A Saheb Chabane et Tesbia Yasmina

On ne les remerciera jamais assez pour leur amabilité, leur générosité, pour leur accueil chaleureux, et leur aide précieuse.

A Hakim et Latifa Saheb

Sans les quels cela n'aurait jamais été possible.

Sommaire

Liste des figures	i
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations.....	iv
Introduction	1
I. Revue bibliographique	3
I.1. Les leishmanioses	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Aspect clinique.....	3
I.1.2.1. La leishmaniose viscérale (LV)	3
I.1.2.2. La leishmaniose dermique post Kala-azar (LDPKA)	4
I.1.2.3. La Leishmaniose cutanée (LC)	4
I.1.2.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse.....	5
I.1.3. Répartition géographique.....	6
I.1.3.1. Dans le monde.....	6
I.1.3.2. En Afrique du nord	8
I.1.3.3. La leishmaniose en Algérie.....	8
I.1.4. Le parasite	10
I.1.4.1. Morphologie.....	11
I.1.4.2. Biologie du parasite	12
I.1.4.3. Génétique de Leishmania.....	12
I.1.5. Le vecteur de Leishmania	13
I.1.5.1. Le Réservoir de Leishmania	14
I.1.6. Le cycle de vie des leishmanies et mode de transmission	14
I.1.7. Diagnostic	16
I.1.8. Traitement	17
I.2. Modèles animaux de la leishmaniose.....	17
I.2.1. Génétique des BALB/c	17
I.2.2. Voies d'inoculation.....	18
I.2.3. Réponse immunitaire	18
II. Matériel et méthodes.....	21
II.1. Matériel biologique.....	21
II.1.1. Le parasite.....	21
II.1.2. Le modèle animal	21
II.2. Matériel non biologique.....	21

II.2.1. Appareillage.....	21
II.2.2. Les milieux de culture	22
II.2. Méthodes.....	22
II.2.1. Le parasite.....	23
II.2.1.1. Décongélation	23
II.2.1.2. Culture	23
II.2.1.3. Préparation de l'inoculum	23
II.2.2. Inoculation en intradermique oreille (IDO).....	23
II.2.3. Monitoring	24
II.2.4. Charge parasitaire des oreilles	24
II.2.5. Sacrifice et prélèvement d'organes.....	24
II.2.6. Détermination de la charge parasitaire par PCR quantitative.....	25
II.2.6.1. Extraction d'ADN.....	25
II.2.6.2. Electrophorèse sur gel d'agarose	26
II.2.6.3. Dosage de l'ADN	26
II.2.6.4. PCR quantitative.....	27
III. Résultats et discussion	29
III.1. Résultats	29
III.1.1. Phénotype externe	29
III.1.1.1. Variation du poids des souris	29
III.1.1.2. Évolution des indurations	32
III.1.1.3. Évolution des lésions.....	35
III.1.2. Phénotype interne	37
III.2.1. Charge parasitaire dans les oreilles	37
III.2.2. Évolution du poids des rates.....	39
III.1.3. Charge parasitaire des ganglions et des rates	39
III.1.3.1. Résultats de l'extraction de l'ADN des ganglions et des rates.....	40
III.2. Discussion	46
Conclusion.....	49
Annexe I : Milieux de culture et agents révélateurs.....	57
I.1. Milieux de cultures.....	57
I.1.1. Milieu et NNN	57
I.1.2. Milieu RPMI 10S	57
I.2. Coloration au May GrünwaldGiemsa (MGG)	58
I.3. Le SYBR Green I.....	58
I.4. Bromure d'éthidium (BET)	58
Annexe II : Réactifs.....	59

II.1. Composition du Gradient de Ficoll.....	59
II.2. Les réactifs d'extraction	59
II.2.1. Préparation de la solution PK	59
II.2.2. Tampon de lyse (pH = 3).....	59
II.2.3. Tampon d'éluion (pH = 8).....	59
II.2.4. Phenol-chloroform et isonyl alcool (25v, 24v, 1v).....	59
II.3. L'électrophorèse	60
II.3.1. Réactifs	60
II.3.2. Préparation du gel d'agarose à 0,8 %	60
II.4. PCR quantitative.....	60
Annexe III : Résultats	62
III.1. Les résultats du monitoring	62
III.2. Résultats de l'examen direct.....	67
III.3. Poids des rates	68
III.4. Résultats électrophorèse	70
III.5. Résultats NanoDrop	71
III.6. Résultat PCR quantitative	73

Liste des figures

Figure 1 : Leishmaniose viscérale avec une splénomégalie marquée (OMS).....	4
Figure 2 : Aspect de la LC causée par <i>L. infantum</i>	5
Figure 3 : Aspect de la leishmaniose cutanée localisée (OMS).	5
Figure 4 : Répartition géographique de la Leishmaniose dans le monde.....	7
Figure 5 : Leishmaniose cutanée en Afrique du nord (AOUN et al).	8
Figure 6 : Pourcentage des cas parmi la population algérienne (1998/2008) (ADEL et al). ..	10
Figure 7 : La Forme amastigote et promastigote de <i>Leishmania</i> sp.....	11
Figure 8 : Phlébotome hématophage.....	14
Figure 9 : Cycle biologique de <i>Leishmania</i> sp.....	16
Figure 10 : Modèle de développement Th1 / Th2. (SACKS et NOBEN).....	19
Figure 11 : Inoculation de leishmanies en IDO à une souris BALB/c (Photo originale).....	24
Figure 12 : PCR quantitative en temps réel avec le lightcycler 480 (photo originale).	28
Figure 13 : Evolution du poids des souris infectées par LIPA 339, LIPA 339R, LIPA 100 et des témoins négatifs en fonction du temps.....	30
Figure 14 : Evolution des Poids des souris infestées par les souches LIPA 443, LIPA 443R, LIPA 100 et des témoins négatifs en fonction du temps. (Notez témoin négatif dans la légende)	31
Figure 15 : Évolution du poids des souris infestées par les souches LIPA 445, LIPA 445R, LIPA 100/09 et des témoins négatifs en fonction du temps.....	32
Figure 16 : Évolution des Indurations d'oreille des souris infectées par LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100/09 en fonction du temps.	33
Figure 17 : Évolution des indurations d'oreille des souris infectées par LIPA 443, LIPA 443R et LIPA 100/09 en fonction du temps.	34
Figure 18 : Évolution des Indurations d'oreille des souris infectées par LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100 en fonction du temps.	35
Figure 19 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 339, LIPA 339R et LIPA 100 en fonction du temps.	35
Figure 20 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 443, LIPA 443R et LIPA 100/09 en fonction du temps.	36
Figure 21 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100/09 en fonction du temps.	37
Figure 22 : Charge parasitaire des oreilles des souches étudiées par 100 macrophages.....	38
Figure 23 : Variation du poids des rates de souris infectées par les différentes souches à la 8 ^e semaine post infection.....	39
Figure 24 : Résultats de la moyenne des scores de l'analyse qualitative de l'ADN total par électrophorèse sur gel d'agarose des ganglions et des rates	40
Figure 25 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des rates.	42
Figure 26 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des rates.	42

Figure 27 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des ganglions.	42
Figure 28 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des ganglions.	43
Figure 29 : Résultats des concentrations d'ADN total en fonction des souches et des organes.	43
Figure 30 : Droite d'étalonnage moyenne de régression Standard (de 76.105 à 760 parasites).	44
Figure 31 : Résultats des moyennes concentrations parasitaires dans les rates par QPCR.....	45
Figure 32 : Résultats des moyennes des concentrations parasitaires dans les ganglions par QPCR.	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de leishmania (ALVAR, 2001).	7
Tableau 2: Caractéristiques des souches de Leishmania major utilisées	21
Tableau 3 : La Programmation du thermocycleur pour JW 11-12 (NICOLAS et al., 2002)..	28
Tableau 4 : Test de comparaison de Tukey entre les souches LIPA 100/09, LIPA 339 et LIPA 339R.	33
Tableau 5 : Résultats de l'analyse statistique par le Test de Tukey entre les lésions des souches LIPA 100, LIPA 339 et LIPA 339R.	36
Tableau 6 : Résultats de l'analyse statistique par le Test de Tukey entre les charges parasitaires des oreilles des souches étudiées.	38
Tableau 7: Résultats des CT de l'étalon de Leishmania major.	44

Liste des abréviations

A : Absorption
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
BET : Bromure d'éthidium
CD : cellules dendritiques
cM : centimorgan
Ct : cycle threshold
dNTPS : Deoxynucleotide Triphosphates
DO : Densité optique
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
IDO : Injection dermique par l'oreille
IFN : Interféron
IL : Interleukine
INSP : Institut national de la santé publique
IPA : Institut Pasteur d'Algérie
LC : Leishmaniose cutanée
LCD : Leishmaniose cutanée diffuse
LCL : Leishmaniose cutanée localisée
LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse
LCN : Leishmaniose du nord
LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique
LDPKA : Leishmaniose dermique post kala azar
Log : Logarithme
LV : Leishmaniose viscérale
M : Molaire
MGG : May-Grünwald Giemsa
MHz : Méga hertz
NFAT : Facteur nucléaire de l'activation des lymphocytes T
nm : Nanomètre
NNN : Novy Nicolle Mc Neal
NO : Oxyde nitrique
OMS : Organisation mondiale de la santé
pb : Paire de base
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : amplification en chaîne par polymérisation
PM : Poids moléculaire
QPCR : Amplification en chaîne par polymérisation quantitative
rpm : Round per minute (Tour par minute)
RPMI : Roswell Park Memorial Institut
RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

STAT : Signaux transducteurs activateurs de la transcription

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T H_p : T helper

TAE : Tris Acide acétique EDTA

TCR : Récepteur de lymphocyte T

TE : Tampon d'élution

TGF : Facteur transformant de croissance

TLR : Toll-like

TNF : Facteur de nécrose tumorale

UV : Ultraviolets

V : Volt

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires transmissibles, dues à un protozoaire flagellé tissulaire du système réticulohistiocytaire du genre *Leishmania*, transmis aux mammifères vertébrés par la pique d'un diptère vecteur, le phlébotome. Elles font partie des nombreuses maladies parasitaires affectant l'homme, chez lequel les manifestations cliniques de l'infection sont différentes selon l'espèce de *Leishmania* et selon le statut immunologique de l'hôte. L'infection se manifeste par des lésions affectant le derme (Leishmaniose cutanée), ou les organes internes (Leishmaniose viscérale). La maladie a été classée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) parmi les plus importantes maladies tropicales négligées, et vient après la malaria en termes de mortalité par maladie parasitaires. Selon les estimations de l'OMS, il y aurait chaque année 1.3 millions de nouveaux cas et entre 20 000 et 30 000 décès.

L'Algérie, pays le plus touché du bassin méditerranéen et du Maghreb, est concerné aussi bien par la leishmaniose cutanée que viscérale. La situation épidémiologique des leishmanioses en Algérie est inquiétante. La maladie est en réémergence et la propagation semble être due à plusieurs facteurs dont les changements environnementaux, le statut immunitaires des hôtes et au développement de résistances aux différents traitements utilisés. L'ensemble de ces éléments pousse la communauté scientifique à étudier les facteurs qui régissent les échecs au traitement.

Leishmania major a été retenue pour la présente étude du fait de son tropisme cutané prononcé voire exclusif du point de vue clinique. Dans cette étude, nous allons explorer la relation entre la virulence de *Leishmania major* et les modalités de traitement par le Glucantime®. Comme l'exploration concernait surtout l'effet des modalités de traitement sur les parasites et son importance dans la dissémination des leishmanies, le choix d'un hôte expérimental, s'est porté sur les souris BALB/c, où 99% des gènes ont des équivalents humains. De plus la BALB/c est une lignée consanguine albinos, immunodéficente, qui présente une sensibilité à l'infection par les leishmanies (COURRET et al., 2003). Contrairement à la très grande majorité des souches de souris utilisées en laboratoire, les BALB/c sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection, ce qui en fait un modèle expérimental particulièrement bien adapté à l'étude de la leishmaniose.

Dans cette étude, nous allons étudier l'effet du traitement sur la virulence. Pour cela, nous allons comparer les phénotypes internes et externes chez la BALB/c, de souches isolées avant et après traitement, donc résistantes au traitement.

Notre choix pour évaluer la charge parasitaire dans les ganglions et rates s'est porté sur la technique de PCR en temps réel, par la détection et la quantification spécifique de l'ADN kinétoplastique de *L. major*.

Une première partie de notre travail sera relative à l'infestation des souris BALB/c par les souches étudiées et le suivi du phénotype externe de l'infection.

La deuxième partie concerne l'évolution du phénotype interne principalement par l'utilisation de la PCR quantitative.

I. Revue bibliographique

I.1. Les leishmanioses

Le parasite *Leishmania* fut observé par Sir William Leishman en 1900, dans des frottis de rate d'un soldat mort à Dum-Dum en Inde. En 1903, Charles Donovan, en poste dans un service médical indien, identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania Donovanii* en leur hommage (ROBERTS et JANOVY, 2000).

La relation entre le vecteur (phlébotome) et les symptômes a été révélée par l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie, dirigée à l'époque par les frères Edmond et Etienne Sergent et leurs collaborateurs. Les preuves expérimentales de la transmission de la leishmaniose cutanée ont été apportées en 1921, lorsque les frères Sergent contaminèrent un sujet sain en le faisant piquer par des phlébotomes récoltés dans le sud du pays. Presque parallèlement, des observations faites en Palestine et en Syrie par Adler et Theodor confirmèrent celles de l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie (BENALLAL et al., 2013).

I.1.1. Définition

Les leishmanioses sont des parasitoses du système monocytes-macrophages dont l'agent pathogène est un protozoaire flagellé, du genre *Leishmania*. Il s'agit d'anthropozoonoses dues à une pique de moucheron hématophage infecté, des Psychodidés, du genre *Phlebotomus*, (BOURDOISEAU et DENEROLLE, 2000). Cette maladie infectieuse zoonotique majeure est due au développement et à la multiplication du parasite principalement dans les cellules du système des phagocytes mononucléés. Elles causent des affections sous forme d'ulcères cutanés ou de lésions viscérales accompagnées d'autres symptômes.

La leishmaniose se décline sous trois formes cliniques principales : Viscérale (la plus sévère, souvent appelée Kala-azar), cutanée (la plus fréquente) et cutanéomuqueuse.

I.1.2. Aspect clinique

I.1.2.1. La leishmaniose viscérale (LV)

Maladie vectorielle causée par un parasite appartenant au genre *Leishmania* (BENALLAL et al, 2013). Également appelée Kala-azar. Sur le plan clinique, l'affection atteint préférentiellement l'enfant de moins de 5ans, et se manifeste par la triade symptomatique : fièvre irrégulière, pâleur cutanéomuqueuse et splénomégalie (Figure 1). À côté de ces signes majeurs, on peut retrouver : une hépatomégalie, des adénopathies périphériques, un

amaigrissement progressif et des signes hémorragiques (BELAZZOUG et al., 1985). La LV est mortelle en l'absence de traitement (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2016).



Figure 1 : Leishmaniose viscérale avec une splénomégalie marquée (OMS, 2016).

I.1.2.2. La leishmaniose dermique post Kala-azar (LDPKA)

Séquelle de la leishmaniose viscérale, elle se manifeste par une éruption maculaire, papuleuse ou nodulaire localisée sur le visage, la partie supérieure des bras, le tronc et d'autres parties du corps. On rencontre principalement cette forme en Afrique de l'Est et dans le sous-continent indien. La LDPKA survient généralement 6 mois, un an, ou plusieurs années après la guérison apparente du Kala-azar, mais elle peut également se déclarer avant. Les personnes qui en souffrent sont considérées comme une source potentielle du Kala-azar (OMS, 2016).

I.1.2.3. La Leishmaniose cutanée (LC)

La LC est la forme la plus fréquente et est aussi connue comme le classique bouton d'orient. Elle est causée par plusieurs espèces de *Leishmania*, chaque une ayant des réservoirs mammifères, des hôtes et des vecteurs spécifiques (AOUN et BOURATBINE, 2014). Toutes les espèces anthropophiles de *Leishmania* peuvent être responsables de leishmaniose cutanée, y compris les espèces habituellement viscérotropes comme *L. infantum* (Figure 2). Les signes cliniques de la LC varient selon l'espèce de *Leishmania* qui infecte, ceci-dit, une seule espèce peut provoquer des lésions avec plusieurs aspects chez la même personne (RICHARD et QUEIROZ, 1996). La leishmaniose cutanée présente des lésions cutanées, principalement des ulcères, sur les parties exposées du corps. Elle persiste des mois, voire même des années dans certains cas, la guérison est spontanée mais laisse des cicatrices définitives et des handicaps sévères.



Figure 2 : Aspect de la LC causée par *L. infantum*.

I.1.2.3.1. Leishmaniose cutanée localisée

Se manifeste le plus souvent, comme le montre la figure 3, par une lésion ulcéro-croûteuse, dite humide, parfois les lésions sont squameuses, sèches, dans le site de la piqure du diptère (AOUN et BOURATBINE, 2014).



Figure 3 : Aspect de la leishmaniose cutanée localisée (OMS, 2016).

I.1.2.3.2. Leishmaniose cutanée diffuse

Elle est rare, même dans les pays où *Leishmania* est endémique. La LCD peut cliniquement ressembler à la lèpre. Elle se présente initialement comme une papule rouge dans la zone d'inoculation. Après, elle se disperse comme des macules érythémateuses ou violacées non-ulcérées, et des plaques fortement infiltrées par des amastigotes. Le visage, les extrémités supérieures et inférieures et les fesses sont généralement les zones les plus affectées (DEDET, 2001).

I.1.2.4. La leishmaniose cutanéomuqueuse

C'est la forme la plus grave des LC. Elle détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. La plupart des cas de LCM se manifestent chez des patients qui ont développé précédemment un épisode de leishmaniose cutanée (OMS, 2016).

I.1.3. Répartition géographique

I.1.3.1. Dans le monde

La leishmaniose est présente dans les 5 continents et dans 98 pays. Elle est endémique dans 88 pays (Figure 4), avec plus 350 millions de personnes à risque et 12 millions de personnes infectées. L'incidence est estimée à 2 millions de nouveaux cas par an. Parmi ces 88 pays, 22 appartiennent au « nouveau monde » et 66 à « l'ancien monde ». Il y a 200 000 à 400 000 nouveaux cas de LV par an, avec 20 000 à 40 000 décès et 700 000 à 1 200 000 nouveaux cas de LC par an (OMS, 2012). Malgré la distribution géographique étendue, la leishmaniose humaine affecte plus particulièrement les populations vivant dans des conditions précaires en milieu rural ou suburbain.

La LV est fortement endémique dans le sous-continent indien et en Afrique de l'Est, où on rencontre principalement la leishmaniose dermique post Kala-azar (LDPKA), qui est une forme La LC. Environ 95 % des cas de LC surviennent dans les Amériques, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie (ALVAR, 2004). Plus des deux tiers des cas surviennent en Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Syrie et en Iran (SOTO, 2004). La LC diffuse est généralement causée par *L. mexicana* en Amérique et *L. aethiopica* dans le bassin méditerranéen, le Moyen Orient et l'Afrique (Tableau 1). Près de 90 % des cas de LCM surviennent au Brésil, dans l'État plurinational de Bolivie et au Pérou (OMS, 2016).

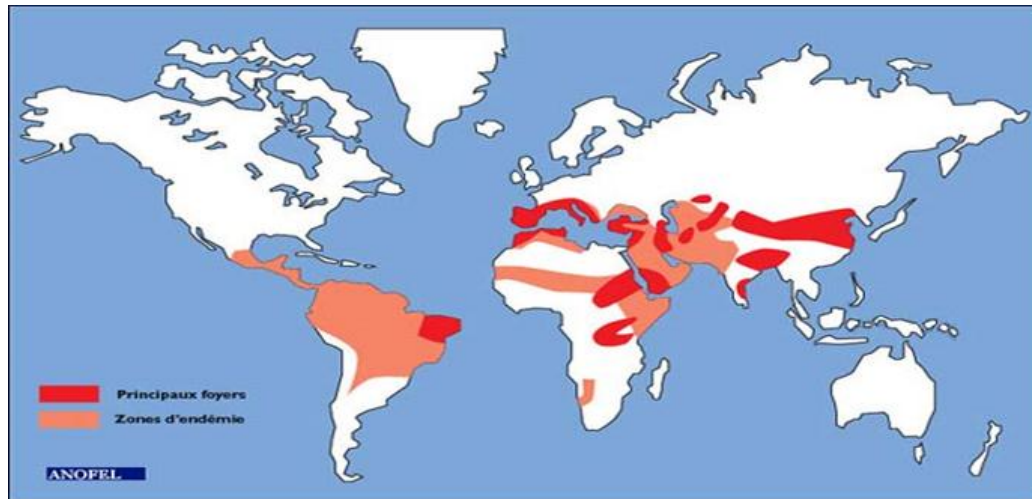


Figure 4 : Répartition géographique de la Leishmaniose dans le monde.

Tableau 1 : Rapport simplifié entre les syndromes, la distribution et les principales espèces de leishmania (ALVAR, 2001).

Syndrome	Distribution	Groupes d'espèces	Espèce
LC (bouton d'orient)	Ancien monde (Europe, Afrique, Asie)		<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i>
	Nouveau monde (Amériques)	Complexe <i>L.</i> <i>Mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazoniensis</i> <i>L. vinezuelensis</i>
LC / LCM (Leishmaniose tégumentaire américaine)	Nouveau monde	Complexe <i>L.</i> <i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>
LV (Kala-azar)	Ancien monde	Complexe <i>L.</i> <i>donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
	Nouveau monde	Complexe <i>L.</i> <i>donovani</i>	<i>L. chagasi</i>

I.1.3.2. En Afrique du nord

La leishmaniose cutanée est émergente en Afrique du Nord depuis les débuts des années 1980, avec une extension de la répartition géographique et une augmentation importante de l'incidence des cas qui dépasse les milliers de cas chaque année en Algérie, Lybie, Maroc et Tunisie. Cette incidence est plus faible en Egypte. Trois espèces de *Leishmania*, associées à des caractéristiques environnementales, épidémiologiques et cliniques distinctes, sont responsables de la maladie, à savoir *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica* (Figure 5).

L. major est, de loin, la plus fréquente en Algérie, Lybie et Tunisie avec plus de 90 % des cas enregistrés. La distribution de LC zoonotique (LCZ) se fait dans les étages bioclimatiques arides et sahariens, *Leishmania major* MON-25 est le seul zymodème responsable de la maladie, en Algérie un seul cas causé par *L. major* MON-269 a été identifié (TABBABI et al., 2010). Le rongeur *Psammomys obesus* est le réservoir principal de *L. major*. Il a été démontré qu'il était naturellement infecté en Lybie (ASHFORD, 1977) Algérie (BELAZZOUG, 1983 ; BOUDRISSA et al., 2012) et en Tunisie (BEN ISMAIL, 1987).

L. tropica est plus répandue au Maroc, où elle est responsable de 30 % à 40 % des cas dans certaines régions. L'incidence est de loin plus importante comparativement à la Tunisie, à l'Algérie et à la Lybie (AOUN et BOURATBINE, 2014).

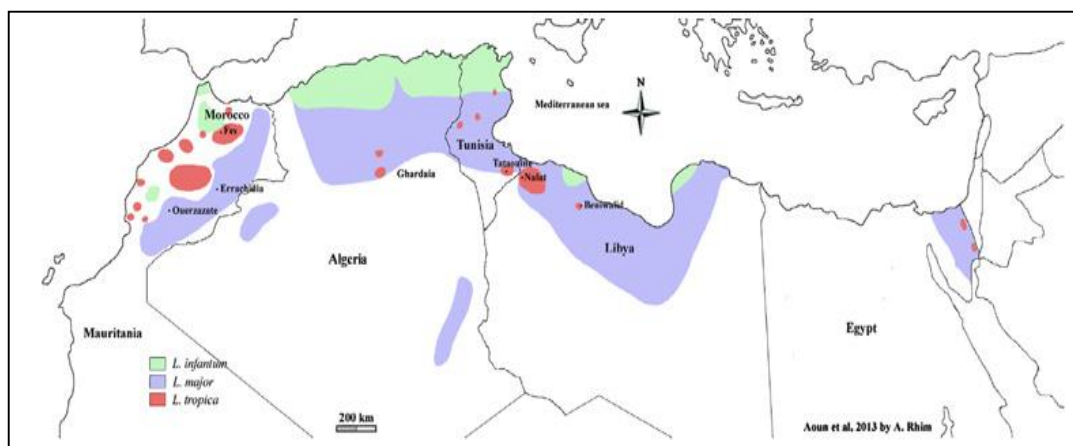


Figure 5 : Leishmaniose cutanée en Afrique du nord (AOUN et al, 2013).

I.1.3.3. La leishmaniose en Algérie

Les leishmanioses sévissent à un état endémo-épidémique en Algérie. Au nord il y a coexistence de la LV et de la LCN (Leishmaniose cutanée du nord) causées par *L. infantum* dans les étages bioclimatiques humides et subhumides, au sud la LCZ causée par *L. major* est présente dans les étages bioclimatiques arides et semi-arides.

La LV à *L. infantum* a été décrite pour la première fois par Lemaire en 1930 en Kabylie. Mille cinq cent soixante-deux cas (1562) de LV ont été signalés entre 1998 et 2008 dans les 48 wilayas de l'Algérie, d'après l'institut national de la santé publique (INSP), La figure 6 montre le pourcentage du total des cas de leishmaniose entre (1998-2008). En Algérie, la LV cause la leishmaniose méditerranéenne infantile. Le nombre moyen de cas est de 142 cas par an et le taux d'incidence annuel moyen est de 0,45 cas de LV pour 100 000 habitants. Mila, Bejaia, Illizi, Biskra, Bouira, Tizi-Ouzou et Sétif sont au-dessus du taux national moyen annuel d'incidence.

En plus de l'environnement rural, la présence de cas de LV pourrait être liée à la proximité des parcs naturels (Tizi-Ouzou et Bouira avec le parc Djurdjura, Bejaïa avec le parc Gouraya, Blida avec le parc Chréa, Mila avec le parc national de Taza et Illizi avec Tassili et le parc Najjer) (ADEL et al, 2014). Djelfa, El-Bayadh et Tindouf semblent être indemnes de la maladie depuis 1998. Biskra et Illizi, deux wilayas du sud, étaient respectivement les troisième et quatrième villes les plus infectées. LV reste principalement une maladie pédiatrique en Algérie (ADDADI et DEDET, 1976).

La LC à *L. major* a été décrite pour la première fois par Hamel en 1860 à Biskra. La LCN causée par *L. infantum* a été décrite pour la première fois par Bellazoug et al en 1986. L'Algérie est considérée par l'OMS comme étant le pays le plus touché par la LC au monde. Elle touche tous les âges, celle causée par *L. major* étant la forme dominante. Les foyers les plus actifs sont ceux de Biskra, Msila et Adrar. L'incidence des cas varie entre 10 000 à 40 000 cas par an. La répartition de la LC du nord se fait sur tout le littoral et le Tell algérien pendant toute l'année, les principaux foyers sont : Tizi-Ouzou, Ténès, Bordj Menaïel, Bouira et Alger. Un projet pilote visant à éliminer le principal aliment de ces rongeurs (Chenopodiaceae), autour des foyers dans un rayon de 300 m avant la saison de transmission a été entrepris dans la région de Msila en 2003, le nombre de cas a baissé de 1391 en 2003 à 965 en 2004 (CHERIF et al., 2012).

Seulement quelques cas de LC causés par *L. tropica* ont été reportés en 2005 à Ghardaïa (HARRAT et al., 2009).

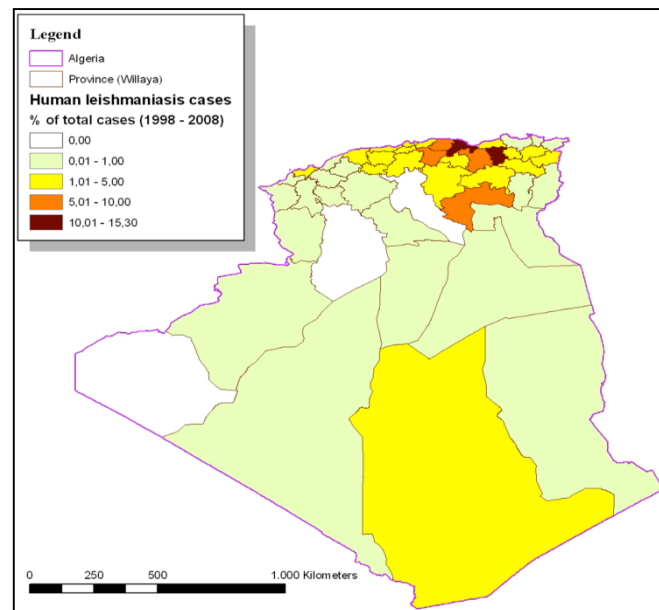


Figure 6 : Pourcentage des cas parmi la population algérienne (1998/2008) (ADEL et al, 2014).

I.1.4. Le parasite

Les Leishmanies sont des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*, et à la famille des trypanosomatidae, et à l'ordre des Kinetoplastida (GRANIER, 2013). Elles présentent au cours de leur cycle deux stades évolutifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré (Figure 7). Elles se multiplient aux deux stades par division binaire simple (DEDET, 2009). Elles sont caractérisées par la présence d'ADN mitochondrial regroupé en une masse unique appelée le kinétoplaste. Il s'agit d'un parasite intracellulaire obligatoire lorsqu'il est présent chez l'hôte vertébré (GRANIER, 2013).

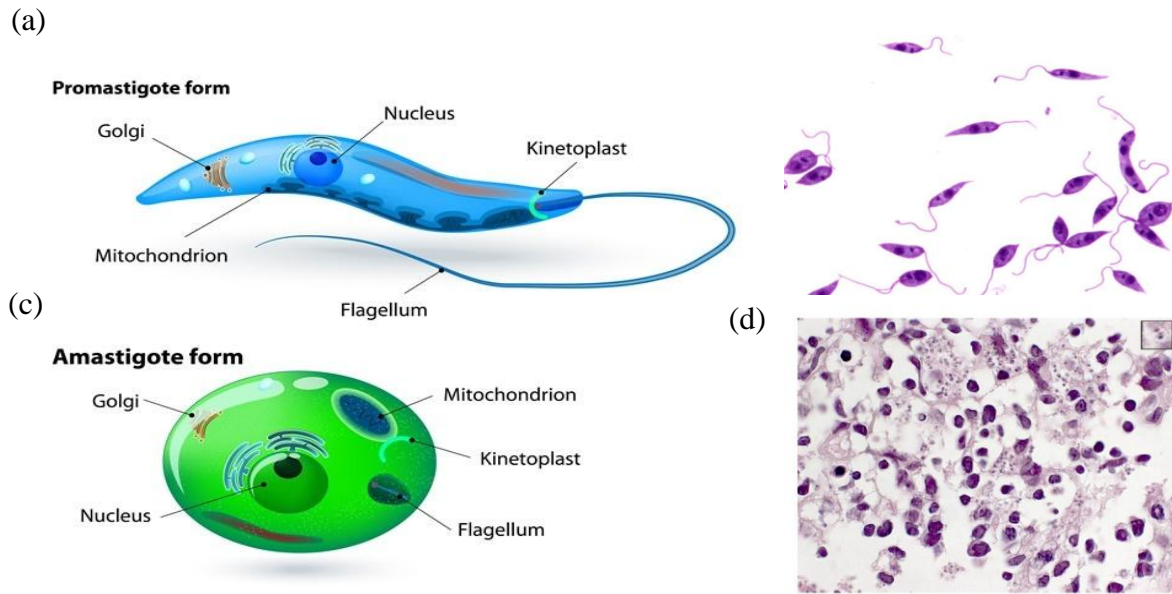


Figure 7 : La Forme amastigote et promastigote de *Leishmania* sp.

a) Forme promastigote ; b) Forme promastigote observée sous microscope optique ; c) Forme amastigote ; d) Amastigotes dans les macrophages.

I.1.4.1. Morphologie

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés qui se présentent chez leurs hôtes successifs (mammifères et insectes) sous deux stades morphologiques distincts : amastigotes intramacrophagiques chez les hôtes vertébrés dont l'homme et promastigotes libres dans l'intestin du phlébotome.

I.1.4.1.1. Forme amastigote

Immobile, intracellulaire dans les macrophages où elles se multiplient, ou extracellulaire après éclatement de ces derniers. Elle est rencontrée chez l'hôte vertébré notamment l'homme. Elle est de forme ovoïde, de 2 μm à 5 μm de longueur sur 2 μm de largeur, possède un noyau et une forme en bâtonnet juxta nucléaire qui est le Kinétoplaste, bien visible après coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa) (BAILEY et LOCKWOOD, 2007).

I.1.4.1.2. Forme promastigote

Elle est retrouvée dans le tube digestif du phlébotome femelle et dans les milieux de culture. C'est une forme allongée mesurant 10 μm à 25 μm de longueur sur 4 μm à 5 μm de largeur, très mobile grâce à un flagelle antérieur (BAILEY et LOCKWOOD, 2007). La forme promastigote métacyclique ne se divise plus, les leishmanies sont plus minces avec un long flagelle et hautement motiles. C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères.

I.1.4.2. Biologie du parasite

I.1.4.2.1. Reproduction asexuée

C'est principalement par une reproduction asexuée que se multiplient les leishmanies. Elles se multiplient par division binaire simple, qui débute par la naissance d'un flagelle fille. La division du noyau et celle du kinétoplaste viennent après. Les chromosomes non condensés se répartissent dans les noyaux fils par la migration le long d'un fuseau mitotique, sans que la cytodierèse n'ait lieu puisqu'elle survient en dernier et se fait selon l'axe longitudinal du parasite (ANTOINE, 1991).

I.1.4.2.2. Reproduction sexuée

De Meeus et ces collaborateurs en 2010 étayèrent l'hypothèse de reproduction sexuée grâce à leurs travaux sur des souches américaines de *Leishmania*. Ils ont montré que pour les différentes espèces étudiées, le génome des leishmanies porte la signature d'une reproduction sexuée assez importante (ROUGERON et al., 2010). Ce mode de reproduction reste à confirmer malgré les travaux de plusieurs auteurs comme LANOTTE et RIOUX, qui postulent l'hypothèse de l'échange du matériel génétique entre les parasites au stade promastigote (BASTIEN P et RAVEL C, 1999).

I.1.4.3. Génétique de *Leishmania*

I.1.4.3.1. ADN nucléaire

Leishmania est essentiellement diploïde. L'ADN est dépourvu d'introns et se découpe en grandes unités polycistroniques (BRITTO et al., 1998). Son génome est constitué en moyenne de 60 % de guanine et de cytosine (ALVAREZ et al, 1994). Le nombre de chromosomes est resté longtemps indéterminé en raison de l'absence de condensation de la chromatine du génome. Cependant, grâce au projet de séquençage de *leishmania major*, nous connaissons actuellement le génome dans sa quasi-totalité (94 %). La taille du génome est d'environ 35 mégabases, il est distribué sur environ 36 chromosomes (JUNQUEIRA et al., 1996). On estime à 8000 le nombre total des gènes. Le génome comporte 60 % à 65 % de séquences uniques, 13 % de séquences moyennement répétées et environ 12 % de séquences fortement répétées (VICKERMAN, 1976).

I.1.4.3.2. ADN kinétoplastique

Le kinétoplaste est considéré comme un ADN mitochondrial modifié (STILES et al., 1999). Il représente de 10 à 20 % de l'ADN total de la cellule, et est constitué de deux types de molécules d'ADN circulaire. (1) Les maxi-cercles (environ 10 à 30 par cellule), qui sont

équivalents à l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. En effet, ils codent pour des gènes classiques de la mitochondrie tels que les gènes de l'ARN ribosomique, les gènes de la chaîne de transport d'électrons (cytochrome oxydase, complexe NADH déshydrogénase...) mais également les gènes codant de petit ARN appelés ARN guide qui interviennent dans un processus très original de modification post transcriptionnel de la séquence d'ARN messenger appelé ARN-edding. (2) Les mini-cercles (de 5000 à 10 000 par cellule), entrelacées les uns dans les autres, constituent quant à eux un réseau complexe et compacte. Ils codent aussi pour les ARN guide mais, contrairement aux maxi-cercles, leur séquence est très variable non seulement d'une espèce à l'autre mais également au sein d'une même espèce (STILES et al., 1999).

I.1.5. Le vecteur de *Leishmania*

Les flagellés du genre *Leishmania* sont transmis par des insectes diptères de la famille des Psychodidae appartenant au genre Phlébotomus dans l'ancien monde, et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (RIPERT, 1996). Les phlébotomes sont les vecteurs exclusifs dans la transmission des leishmanioses. L'adulte mesure 2 mm à 5 mm de longueur. Il est d'aspect « bossu » et à peine coloré. Le corps, les ailes et les pattes sont velues, et les yeux sont nettement visibles (Figure 10). Les phlébotomes vivent dans les pays tempérés et tropicaux. Les adultes ont une activité crépusculaire et nocturne. Leur vol est silencieux. Seules les femelles sont hématophages. La piqûre est douloureuse car ces insectes dilacèrent les téguments avec leurs pièces buccales pour aspirer le sang (RIPERT, 1996). Elles s'alimentent par telmophagie de sang et de lymphe. Ce repas peut s'effectuer de manière interrompue, à la suite de plusieurs piqûres, sur le même individu ou sur des individus différents. Il faut noter que la salive inoculée est allergisante (érythème, douleur) et participe activement à l'installation et à la multiplication des leishmanies chez l'hôte vertébré (MARQUARDT, 1997 ; MONTEIRO et al., 2005). La longévité de ces insectes est de l'ordre de quelques mois. Un cycle gonotrophique complet dure environ six semaines. La femelle ne prend qu'un seul repas sanguin par cycle (LEGER et DEPAQUIT, 1999).



Figure 8 : Phlébotome hématophage.

I.1.5.1. Le Réservoir de Leishmania

Il est considéré comme un système écologique dans lequel la population de parasites peut rester indéfiniment. La majorité des espèces de *Leishmania* infestant l'homme implique généralement un rongeur ou un canidé (sauvage ou domestique) comme réservoir d'infection (OMS, 1984). Il existe un seul hôte pour une espèce de *Leishmania* dans un secteur déterminé. Il est possible que d'autres mammifères vivant dans le même biotope puissent être infectés, mais ces hôtes accidentels n'ont pas de rôle dans la survie à long terme de la population de parasites.

I.1.5.1.1. Réservoir anthroponotique

Dans le cas du Kala-azar indien, le réservoir est représenté par l'homme malade qui assure la pérennité de l'espèce. C'est un réservoir pour la forme viscérale à *L. donovani* et également pour la forme cutanée de *L. tropica* (DEREURE, 1999).

I.1.5.1.2. Réservoir zoonotique

Les hôtes réservoirs des leishmanioses zoonotiques sont des animaux sauvages et des animaux domestiques tels que le chien dans le cas de leishmaniose viscérale infantile et les rongeurs et canidés sauvages pour la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse. Il s'agit de zoonoses ou l'homme est atteint de façon accidentelle. Le réservoir de la leishmaniose viscérale en Algérie est représenté par le chien. Celui de la leishmaniose cutanée du sud est représenté par des rongeurs sauvages (*Psammomys* et *Meriones*) (DEREURE, 1999).

I.1.6. Le cycle de vie des leishmanies et mode de transmission

La leishmanie est un parasite dixène, dont le cycle nécessite deux hôtes. Le phlébotome est le vecteur biologique, qui abrite dans son tractus digestif la forme promastigote. Alors que le mammifère héberge la forme amastigote.

Le vecteur inocule la forme finale ou infectante du promastigote (forme métacyclique), au niveau du derme de l'hôte. Seules les femelles hématophages sont capables de transmettre le parasite pendant un repas de sang. Peu de temps après, le parasite est phagocyté par les macrophages, où il va se multiplier (ALVAR, 2004). C'est dans le macrophage que se produit la transformation du promastigote en amastigote, environ douze à vingt-quatre heures après l'inoculation. Les parasites qui se multiplient finissent par détruire les macrophages, relâchant ainsi les amastigotes qui vont pouvoir infecter les autres cellules.

La progression de l'infection dépend de l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte. Les macrophages infectés peuvent rester localisés dans la peau ou bien se disséminer à d'autres organes.

La possibilité de transmission de l'infection d'un hôte infecté à un nouvel hôte de la même espèce ou d'une espèce différente est en fonction de l'existence de vecteurs phlébotomes. Ces derniers pénètrent la peau de l'hôte sur deux à trois millimètres, déchirent le derme avec leurs pièces buccales pour créer un lac sanguin (telmophagie). Le cycle est complété lorsqu'un phlébotome prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant des *Leishmania*. De retour dans le tube digestif de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade procyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et motiles appelés nectomonades commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle. A partir du 7^{ème} jour, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum qui sépare l'intestin médian de l'avant du système digestif. Les nectomades se transforment alors en heptomades, qui sont plus petits et plus arrondis, et en promastigotes métacycliques qui eux, ne se divisent plus, sont plus minces avec un long flagelle et hautement motiles. C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des métacycliques vers l'oesophage, le pharynx et le proboscis (KILLICK-KENDRICK, 1990). Le cycle du parasite peut ainsi être résumé par la figure 11.

La transmission vectorielle est le principal mode de contamination. La présence du phlébotome conditionne la répartition de la maladie. Il existe également une transmission par échange de seringues chez les toxicomanes. Les transmissions transfusionnelles et congénitales restent exceptionnelles.

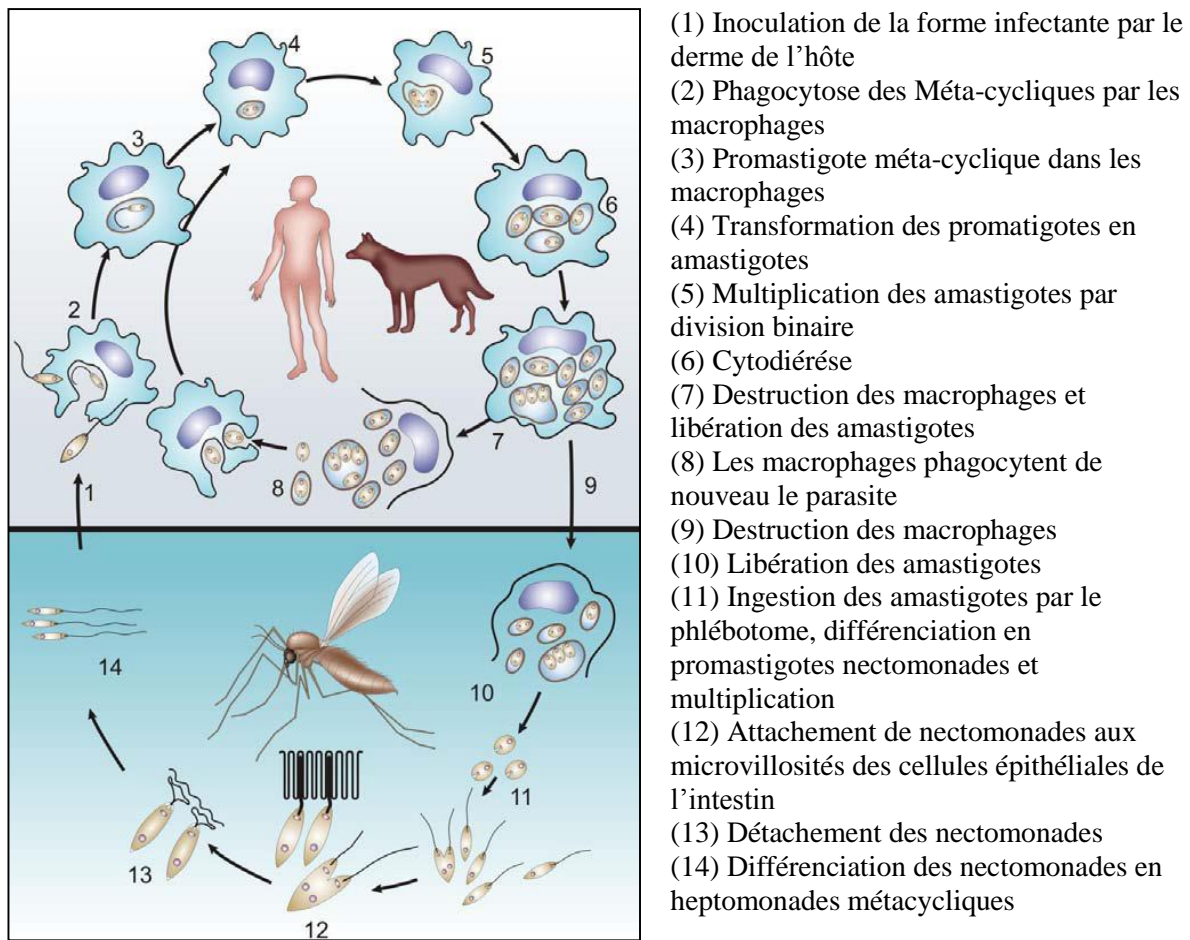


Figure 9 : Cycle biologique de *Leishmania* sp. (Anonyme).

I.1.7. Diagnostic

Le diagnostic de certitude des leishmanioses est apporté par la parasitologie : mise en évidence du parasite par microscopie (examen direct du frottis après coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa)), par la culture sur milieux spécifiques, milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal), par des techniques de biologie moléculaire (PCR et RFLP), ou par des techniques immunologiques (recherche d'anticorps circulants ou hypersensibilité retardée) (LE FICHOUX et al, 1999). Le diagnostic de la leishmaniose viscérale nécessite des prélèvements profonds (frottis médullaire). Alors que dans la LC, le prélèvement est superficiel au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion (grattage au vaccinostyle, à la curette, biopsie).

I.1.8. Traitement

Contre la forme viscérale, le principal traitement utilisé est l'Antimoniote de méglumine (Glucantime®). Il est administré par injection intra-musculaire ou intraveineuse. Alors que l'Amphotéricine B liposomale (AMBISOME®), et la Miltefosine®, sont administrées par voie orale.

La forme cutanée peut guérir spontanément, d'où l'abstention thérapeutique. Le Glucantime® peut être proposé en infiltrations périlésionnelles ou en intramusculaire, pour raccourcir l'évolution et minimiser les séquelles.

Alors que l'amphotéricine B (Fungizone®) est le premier traitement pour les patients adultes, Méglumine antimoniate (Glucantime®) jusqu'à ce jour reste le principal traitement pédiatrique contre LV en Algérie (GRADONI et al., 1995) et est disponible dans les hôpitaux. Les patients ne répondant pas sont traités avec la miltefosine ou l'amphotéricine B liposomale (Ambisome®) lorsqu'ils sont disponibles. Le coût élevé de ce dernier ne permet pas son utilisation comme médicament de première intention (GRADONI et al., 2008 ; MARTY, 2009).

I.2. Modèles animaux de la leishmaniose

Les modèles animaux sont des outils indispensables dans la recherche biomédicale. Les souris permettent aux chercheurs d'étudier la fonction de gènes particuliers à travers plusieurs générations de descendants pendant une période de temps raisonnable (GUENET et BOHOMME, 2003) et peuvent être facilement comparées à l'homme (JOHNSON, 2012). Les lignées de souris les plus utilisées sont les souris C57BL/6 et BALB/c. La BALB/c est une lignée consanguine albinos (à cause d'une mutation qui bloque la production de mélanine) et immunodéficiente. Contrairement à la très grande majorité des souches de souris utilisées en laboratoire, les souris BALB/c sont incapables de contrôler la multiplication des leishmanies et succombent à l'infection (ROLAO et al., 2003). Ces animaux constituent donc un modèle expérimental particulièrement bien adapté à l'identification des gènes impliqués dans le développement d'une réponse immunitaire (FILIPPI et al., 2001).

I.2.1. Génétique des BALB/c

Sur le plan génétique, la souris est très similaire à l'homme : 99 % de ses gènes présentent un gène homologue chez l'humain (GULER et al., 1996). La souris a 19 chromosomes, qui comportent environ 30000 gènes. Elle a un génome haploïde d'une taille de 3×10^9 paires de bases / 1600 cM (PANTHIER et al, 20015). Puisque la BALB/c est une lignée consanguine (inbred) donc la population est génétiquement homogène et assez stable dans le temps, c'est-à-

dire, tous les individus sont identiques, donc il n'y a pas de variance phénotypique d'origine génétique (ZENNER, 2008).

I.2.2. Voies d'inoculation

Il a été démontré que la charge parasitaire dans les différents organes dépend de la souche, de la voie d'inoculation ainsi que de la concentration de parasites administrés (ROSYPAL et al., 2005 ; OLIVEIRA et al., 2012 ; LOEUILLET et al., 2016). Selon le nombre de promastigotes injectés, l'infection provoque plus ou moins rapidement l'apparition de lésions cutanées au site de l'injection. Pour les espèces de *Leishmanies* viscérotropes, l'inoculation intradermique conduit à une maladie viscérale mais l'évolution de la maladie et la réponse immunitaire est plus lente qu'une inoculation intraveineuse (COLMENARES et al., 2003).

En évaluant plusieurs voies d'inoculation, Kaur et al ont montré que la voie sous-cutanée est moins efficace que la voie intradermique, intrapéritonéale et intracardiaques en termes de charge parasitaire dans les différents organes. Les voies sous-cutanées et intradermiques nécessitent des doses élevées de parasites mais provoquent une infection persistante, ceci dit elles restent les voies qui imitent le mieux l'infection naturelle (LOEUILLET et al., 2016).

I.2.3. Réponse immunitaire

Il apparait, dans la majorité des modèles expérimentaux et des situations cliniques étudiées, qu'en fonction de l'antigène stimulant, la réponse immunitaire effectrice repose tantôt sur la composante humorale, qui met en jeu la production d'anticorps par les lymphocytes B, tantôt sur la composante cellulaire (réactions d'hypersensibilité retardée, réactions cytotoxiques) pour lesquelles les cellules effectrices sont les lymphocytes T (ALEXANDER et al., 1999).

Les lymphocytes TH1 et TH2, qui représentent le stade ultime de la différenciation suite à la stimulation par l'antigène, dérivent de cellules dites THp (T helper) (CHATENOUD et BACH, 2012). Ainsi, dans le cas de l'infection murine par *Leishmania major* en fonction du fond génétique, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient soit en cellules TH1 soit en cellules TH2. Les souches de souris développant une réponse spécifique de l'antigène parasitaire qui est plutôt de type TH1 vont exprimer une forte réaction d'immunité cellulaire vis-à-vis du parasite, qui est protectrice et va contenir l'infection. En revanche, les souris développant une réponse TH2 expriment de forts titres d'anticorps spécifiques qui, eux, ne sont pas protecteurs d'où le décours léthal de l'infection chez ces individus.

Les souches résistantes, telles que la souris C57BL/6, guérissent spontanément après avoir développés une lésion cutanée et deviennent alors résistantes à une nouvelle infection, elles ont une réponse immunitaire de type TH1, les lymphocytes T CD4+ produisent principalement de l'IFN γ , IL-2 et IL12 (LOEUILLET et al., 2016 ; SAKS et al., 2000). En revanche, les souris de souche BALB/c développent une infection généralisée qui entraine leur mort en quelques semaines (ROLAO et al., 2003). Elles ont une réponse de type TH2 et produisent l'IL4 (ZWIGENBERG et al., 1990) et de l'IL10 (GROUX et al., 1999).

Après absorption de l'agent pathogène, les macrophages exercent leur activité leishmanicide par synthèse de l'oxyde nitrique (NO). Dans la rate, la charge parasitaire reflète la cinétique de la production de cytokines et l'activation des différentes classes de cellules immunitaires (BEN ISMAIL et al., 1987 ; ADDADI et DEDET, 1976).

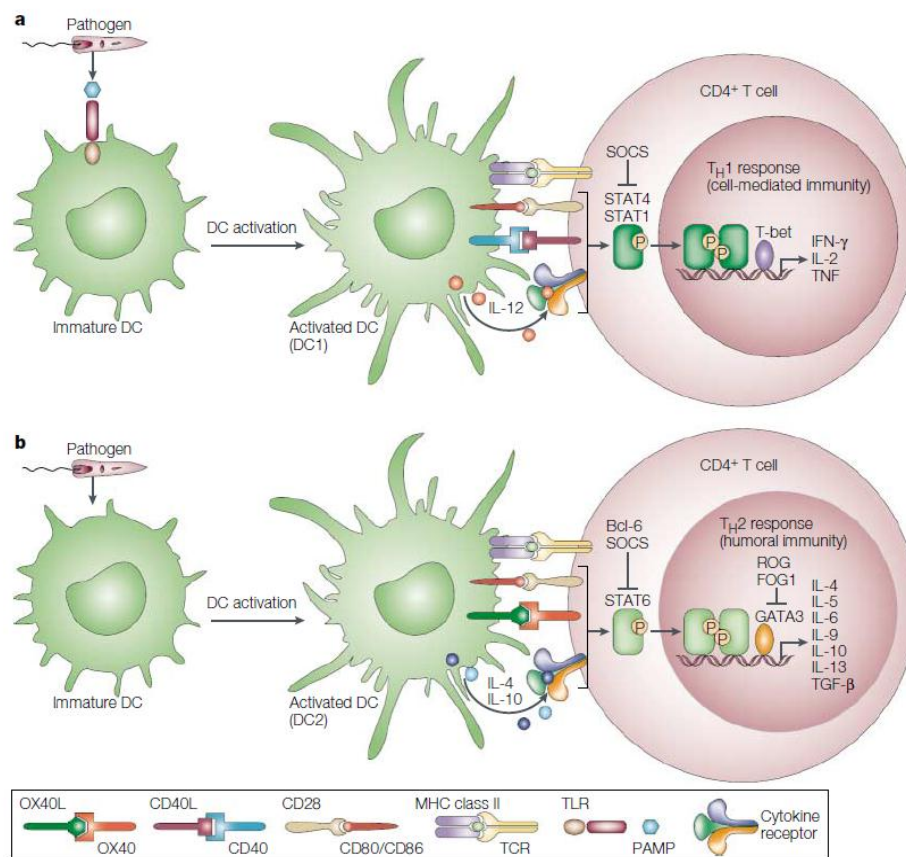


Figure 10 : Modèle de développement Th1 / Th2. (SACKS et NOBEN, 2002)

Pour la différenciation des cellules Th2 et Th1, les antigènes sont présentés aux cellules T CD4 + naïves par les cellules dendritiques (CD). L'interaction des molécules de co-stimulation avec leurs ligands respectifs (CD40-CD40L, OX40 OX40L et / ou CD80, CTLA4 / CD28), conjointement avec l'environnement locale de cytokines, favorisent la différenciation des cellules T naïves en l'interféron- γ (IFN- γ) sécrétant Th1, ou les cellules Th2 sécrétant l'interleukine-4 ou (IL-4). Les sous-ensembles

distincts des cellules dendritiques, connues sous le nom de CD1 et CD2 peuvent exister qui, à leur tour, sont respectivement la différenciation des cellules Th1 et Th2. a) Dans le développement des cellules Th1, certains agents pathogènes ou certains motifs moléculaires associés à des agents pathogènes, déclenchent les cellules présentatrices d'antigènes, par les récepteurs Toll-like (TLRs), pour sécréter IL-12, ce qui favorise la différenciation des cellules T naïves en cellules TH1 sécrétant IFN- γ . Les signaux transducteurs activateurs de la transcription 4 (STAT4) et STAT1, sont activés par l'IL-12 et l'IFN- γ , respectivement. T-bet, un facteur de transcription T-box est spécifique de Th1. b) Dans le développement des lymphocytes Th2, l'incapacité de l'antigène pour activer les CD4 pour produire de l'IL-12 résulte d'un défaut de la voie de différenciation des cellules Th2 en T naïves sécrétant IL-4. En outre, l'antigène et / ou l'environnement spécifique des tissus, pourraient activer les DCs pour produire IL-4 ou IL-10, ce qui induira le développement des cellules Th2. STAT6 est activée spécifiquement par la liaison aux récepteurs d'IL-4. Le facteur de transcription spécifique de Th2, GATA3 se lie aux sites de liaison GATA (AGATAG). Les facteurs c-Maf et NFATc (facteur nucléaire de l'activation des lymphocytes T) ont été également associés à la différenciation des Th2. Bcl-6, ROG (répresseur de GATA) et FOG1 (amis de GATA1) régulent négativement la différenciation des Th2 en réprimant l'activité de STAT6 et GATA3. La famille des suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS) inhibe les réponses Th1 et Th2 en bloquant l'activité de STAT. CTLA4, antigène cytotoxique des lymphocytes T 4; TCR, récepteur de lymphocyte T; Le TGF- β , facteur- β transformant de croissance; Le TNF, le facteur de nécrose tumorale.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Le parasite

Sept souches appartenant à l'espèce *Leishmania major* ont été utilisées dans nos expérimentations (tableau 2) : une souche marqueur (LIPA 100), 3 souches de LC isolées de patients avant traitement (LIPA 339, LIPA 443 et LIPA 445), et 3 souches isolées des mêmes patients après traitement (LIPA 339R ; LIPA 443Ret LIPA 445R). Toutes les souches proviennent de la Cryobanque du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Tableau 2 : Caractéristiques des souches de *Leishmania major* utilisées

Patient	Âge	Sexe	Phénotype des lésions	Localisation	Nbr. lésions	Souches	Traitement	Typage enz. et mol.
1	24	M	Sèche	Oreille	2	LIPA 339 LIPA 339R	Eau oxygénée	L. major MON 25
2	55	M	Sèche	Joue	1	LIPA 443 LIPA 443R	Eau oxygénée + Glucantime (injection périlésionelle)	L. major MON 25
3	31	M	Ulcerocrouteuse	Pied	1	LIPA 445 LIPA 445R	Eau oxygénée + Glucantime (injection intramusculaire)	L. major MON 25
Témoin	/	/	/	/	/	LIPA 100/09	/	L. major MON 25

II.1.2. Le modèle animal

48 souris femelles non pleines du Genre BALB/c issues de l'animalerie du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie, de poids variant entre 15 et 17 gr, ont été réparties en huit de 6 souris lots. Chaque lot a été infecté par l'une des souches utilisées. Le huitième lot étant le témoin négatif.

II.2. Matériel non biologique

II.2.1. Appareillage

L'équipement utilisé pendant notre travail est le suivant : Microscope optique (Motic) ; Bec benzène ; Incubateur (Immovensjouan) ; Bain marie (Mommert) ; Hotte à flux laminaire (Biohazard) ; Centrifugeuse (Eppendorf) ; Balance ; Pied à coulisse ; Balance de précision (Scaltec) ; Agitateur ; Vortex ; Hotte d'aspiration chimique (Biohazard) ;

Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA) ; Réfrigérateur ; Cuve d'électrophorèse ; Microonde ; Générateur de courant (Fisher brand) ; Spectrophotomètre (Nanodrop) ; Appareil de PCR en temps réel (Light cycler) ; pH-mètre (MettlerToledo) ; Agitateur magnétique ; Cages à rongeurs.

Petit matériel et consommables numérotez tous les titres et énumérez-les avec des tirets comme ci-dessus

Le petit matériel utilisé lors de ce travail est le matériel courant de laboratoire: pipetus ; lames porte objet ; Micropipettes (adaptées aux différents volumes à prélever) ; cellule de numération cellulaire de Thoma ; Seringues ; Trousse de dissection (ciseaux à pointe fine et pinces) ; spatules ; barreaux magnétiques ; plaque 96 puits ; parafilm.

Les réactifs ayant servi à cette étude sont : Acétate de sodium, agarose, alcool, Azote liquide, Biotéine, Bleu de Bromophenol, Bleu de trypan, Bromure d'ethidium, colorant May-GrünwaldGiemsa, Eau désilée, eau physiologique, Ethanol à 70°, Ethanol absolu, Ether, Ficoll, Formol, huile d'immersion, PBS (Phosphate buffered saline), Phenolchlorophorme, PK, RNase, SDS, tampon d'électrophorèse (Annexe II), tampon de lyse (Annexe II), Tris Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

II.2.2. Les milieux de culture

Les milieux de culture ayant servi à la croissance et la multiplication des souches étudiées sont : le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal) et le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institut) supplémenté de 10% de SVF (Sérum de veau fœtal) préparés au niveau du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire institut Pasteur Algérie (Annexe I).

II.2. Méthodes

Dans cette étude les souches de *Leishmania major* utilisées ont été extraites de trois patients ayant démontré une résistance naturelle aux traitements administrés, dans le but de comprendre l'effet des différentes modalités de traitement sur la virulence du parasite, des souris BALB/c, ont été infectées par les différentes souches isolées avant et après traitement, pour la détection et la quantification de la charge parasitaire de *Leishmania major* dans les ganglions et les rates par PCR quantitative.

L'analyse statistique des résultats obtenus a été effectuée avec le logiciel GraphPadPrism 5.03, les tests statistiques utilisés étant ANOVA et le post test comparatif de Tukey.

II.2.1. Le parasite

II.2.1.1. Décongélation

Les souches utilisées proviennent de la Cryobanque du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'Institut Pasteur d'Algérie. Elles ont été décongelées avant leur utilisation par chauffage à 37°C au bain marie, puisensemencé dans le milieu NNN.

II.2.1.2. Culture

II.2.1.2.1. Sur milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal)

Le milieu NNN est un milieu semi solide, à base de gélose de sang, utilisé pour l'isolement et l'entretien des leishmanies. Les prélèvements de malades (grattages ou biopsies) sontensemencés avec quelques d'eau physiologique à 9‰ et incubés à 25°C. Un examen hebdomadaire entre lame et lamelle est nécessaire afin d'avoir une estimation du nombre de parasites par champs pour assurer la pérennité de la souche, qui servira par la suite d'inoculum.

II.2.1.2.2. Sur milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institut)

Après 24h d'incubation à 25°C, les leishmanies, en phase exponentielle sont transférées du milieu NNN au milieu RPMI+SVF (Sérum de Veau Fœtal) à 10% (Annexe I).

II.2.1.3. Préparation de l'inoculum

II.2.1.3.1. Purification des métacycliques

Elle se fait par une centrifugation sur gradient de densité. Le gradient est composé de solutions de Ficoll à 5%, 10%, 20% et 40% (Annexe II). Une suspension parasitaire très concentrée est déposée délicatement au-dessus du gradient, puis centrifugée à 1300G pendant 15min.à 25°.Après centrifugation, un anneau intermédiaire est prélevé délicatement. La présence des formes métacycliques est contrôlée par un examen au microscope.

II.2.2. Inoculation en intradermique oreille (IDO)

Les inoculations ont été faites par une injection de 1000 parasites métacycliques, réalisée en intradermique au niveau du pavillon de l'oreille gauche des souris BALB/c. Le derme de l'oreille a été choisi comme site d'inoculation, car en plus d'être un site de transmission commun dans les réservoirs de rongeurs, il offre l'avantage que tous les événements dynamiques qui se produisent sur le site de l'infection ainsi que dans les compartiments interconnectés de l'épiderme et des ganglions lymphatique peuvent être facilement monitoré (BELKAID et al., 1996).

Les 7 groupes de souris BALB/c ont été infestés par les souches LIPA 100, LIPA 339, LIPA 339R, LIPA 443, LIPA 443R, LIPA 445 et LIPA 445R. Les souris sont ont été anesthésiées avec de l'ETHER, puis infectées en IDO (Figure 11). Pendant toute la durée de l'expérimentation, les souris ont été nourries ad libitum et ont été élevées dans des conditions standards de température et de luminosité.



Figure 11 : Inoculation de leishmanies en IDO à une souris BALB/c (Photo originale).

II.2.3. Monitoring

Pendant les 8 semaines post infection, un monitoring hebdomadaire est réalisé. Chaque semaine, toutes les souris infectées, sont pesées, leurs indurations et leurs rougeurs sont mesurées avec un pied à coulisse après vérification de la présence ou de l'absence de lésions internes, ou externes sur le pavillon de l'oreille infectée.

II.2.4. Charge parasitaire des oreilles

C'est la recherche et la quantification des leishmanies au niveau du point de l'inoculation. Elle consiste en un grattage au niveau du site d'inoculation. Trois appositions sont réalisées sur une lame porte objet pour chaque souris. Après séchage, les frottis sont colorés au GIEMSA (Annexe I). La charge parasitaire est estimée par comptage des parasites sous microscope optique au grossissement 100×10 . La charge parasitaire dans l'oreille a été estimée par le nombre de parasites par 100 macrophages infectés.

II.2.5. Sacrifice et prélèvement d'organes

La rate, les ganglions et l'oreille infectée sont prélevés afin d'évaluer la dissémination des parasites dans les tissus des différents organes. Les prélèvements sont faits à la 8eme semaine de l'infection.

Les souris ont été anesthésiées avec de l'éther afin de faciliter les appositions de l'oreille infecté. Elles sont ensuite euthanasiées pour le reste de l'expérimentation. Une fois Fixées sur

le dos à l'aide de 5 épingles enfoncées obliquement dans les extrémités des pattes et dans le museau, on réalise une incision (Faire une boutonnière) dans la peau de l'abdomen en avant des orifices anogénito-urinaires. A partir du point de boutonnière, la peau est incisée jusqu'au menton en évitant de couper la cage thoracique. Pour couper la peau au niveau des membres antérieurs et postérieurs, on réalise des incisions transversales. A l'aide d'une pince stérile la rate est détachée et mise dans de l'eau physiologique stérile supplémentée d'antibiotiques. Les ganglions drainants de l'oreille sont prélevés à l'aide d'une pince stérile. Les organes sont conservés à - 20°C, jusqu'à l'extraction d'ADN.

II.2.6. Détermination de la charge parasitaire par PCR quantitative

II.2.6.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires. L'extraction a été faite par Phénol Chloroforme.

II.2.6.1.1. Broyage des organes

La première étape est la lyse mécanique par broyage. 10mg de rate ont été broyé alors que les ganglions sont broyés entièrement. Le broyage est réalisé avec 100µl de tampon de lyse (Annexe II). Par ailleurs, une lyse thermique a été réalisée 2 fois dans l'azote liquide en alternance avec la lyse mécanique.

La digestion enzymatique a été réalisée toute la nuit à 55°C par 20µl de Protéine Kinase à 10mg/mL. De plus, 2,5µl de RNase ont permis la dégradation de l'ARN.

II.2.6.1.1.1. Déproteinisation de l'ADN

Afin de séparer les protéines des acides nucléiques, 200µl de phénol chloroforme ont été ajouté à chaque tube (Annexe II). Les tubes agités contenant deux phases non miscibles, sont centrifugés à 1200 g pendant 10min. La phase aqueuse est prélevée en évitant de prendre le phénol. Un second lavage au chloroforme est effectué par une centrifugation à 1200 g pendant 10min.

Le surnageant est prélevé et supplémenté de 2 volumes d'Ethanol absolu et 1/10 d'Acétate de sodium (3M), afin de concentrer les acides nucléiques et de les précipiter pour obtenir les méduses. Après une centrifugation de 1900 g pendant 15min à 4°C (1er lavage), un second lavage avec 200µl d'éthanol à 70°, était nécessaire. Une fois le lavage fini les tubes ont été vidés et laissés à sécher toute la nuit à température ambiante.

II.2.6.1.1.2. Elution de l'ADN

L'élution se fait avec 100µl de TrisEDTA (Annexe II), à température ambiante pendant 30min. Les ADN ont été alors stockés à - 20°C.

II.2.6.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

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. Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. L'électrophorèse sur gel fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique.

II.2.6.2.1. Préparation du gel

Pour la Visualisation et la vérification qualitative et quantitative de l'ADN extrait, une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0.5% a été réalisée.

II.2.6.2.2. Dépôt des échantillons

Après polymérisation du gel, Déposer dans chaque puit 1µl d'ADN mélangé avec une goutte du Bleu de bromophénol, les trois derniers puits sont respectivement pour le témoin positif, le témoin négatif et le marqueur de poids moléculaire. 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 de manière à ce que les dépôts soient de côté cathode en appliquant une tension de 78V/60MHz pendant environ une heure. Couper l'alimentation à la fin de la migration.

II.2.6.2.3. 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 apparaissent fluorescents avec une couleur rouge-orangée.

II.2.6.3. Dosage de l'ADN

La quantification de l'ADN extrait est effectuée par spectrophotométrie, en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop. L'ADN peut être mesuré directement dans des solutions aqueuses (sous forme diluée ou non diluée) en mesurant l'absorption A (également définie comme étant la densité optique, DO). La concentration d'acides nucléiques est généralement

déterminée par une mesure effectuée à 260 nm, l'absorbance maximale d'une solution d'ADN est fixée à 260 nm, contre un échantillon appelé « blanc », qui est le tampon d'éluion (TE).

Les protéines absorbent également à 260 nm mais les acides aromatiques des protéines absorbent à 280 nm. Ainsi, le rapport $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ constitue un moyen d'apprécier d'éventuelles contaminations de la solution d'ADN « ratio ». L'ADN pur devrait avoir un ratio compris entre 1,8 et 2. Un ratio supérieur à 2 est le signe d'une contamination par de l'ARN ; alors qu'un inférieur à 1,7 est le signe d'une contamination par des protéines.

L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 2,2 (DESJARDINS et CONKLIN, 2010).

II.2.6.4. PCR quantitative

La PCR quantitative, ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction de polymérisation en chaîne permettant de mesurer la quantité d'ADN initiale. Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction (PABINGER et al., 2014). Le SYBR green I (Annexe I) est l'agent le plus fréquemment utilisé. Il s'intercale dans la molécule d'ADN, la fluorescence est émise lorsqu'il se lie à l'ADN sous sa forme double brin (BARBAU-PIEDNOIR et al., 2010). Le profil d'une réaction PCR classique se fait en 3 Phases. La Phase de bruit de fond, où la quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent. La phase exponentielle, où la quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. On assiste durant la phase exponentielle au doublement du nombre de produits PCR à chaque cycle. Et enfin, la phase plateau débute lorsque les constituants de la PCR (en particulier la Taq polymérase) deviennent limitant.

Nous décrivons ici un procédé hautement sensible et spécifique permettant de détecter et / ou de quantifier *L. major* dans les tissus de souris en utilisant les amorces JW11 (5' - CCTATTTTACACCAACCCCGT-3') et JW12 (5' -GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'). Ces amorces amplifient des fragments de 120 pb de l'ADN kinétoplastique des mini-cercles de *L. major* (NICOLAS et al., 2002)

La PCR en temps réel fait le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus (POITRAS ET HOUDE, 2002).

Mode opératoire

On prépare une concentration de $10 \times$ la solution des amorces de PCR. Préparer le Mix de la PCR en ajoutant $3 \mu\text{l}$ d'eau distillée, $2 \mu\text{l}$ d'amorces PCR et $10 \mu\text{l}$ du master mix. Mélanger par pipetage de haut en bas. $15 \mu\text{l}$ du mélange PCR sont pipeté dans chaque puit de la Plaque Multiwell LightCycler 480. Ajouter $5 \mu\text{l}$ de la matrice d'ADN.

On a réalisé des dilutions en série de l'ADN de *L. major* avec des concentrations finales allant de $7,6.10^6$ parasites à 760 parasites. Un contrôle négatif constitué par le mélange réactionnel et de l'eau au lieu de l'ADN matrice ont été ajoutés. Centrifugeuse la plaque multipuits à $1500 \times g$ pendant 2 min (3000 tours par minute). La plaque a été chargée dans un LightCycler® 480 (Figure 13). La Programmation du thermocycleur pour JW 11-12 figure dans le tableau 2 (ROCHE, 2005)

Tableau 3 : La Programmation du thermocycleur pour JW 11-12 (NICOLAS et al., 2002).

Paramètres	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95 °C	4 min	30
Dénaturation	64 °C	1 min	
Hybridation	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation finale	72 °C	10 min	



Figure 12 : PCR quantitative en temps réel avec le lightcycler 480 (photo originale).

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats

Afin de caractériser la relation entre l'échec au traitement au cours de la leishmaniose cutanée et la virulence des souches de *Leishmania*, nous avons étudié les phénotypes externe et interne induit par 6 souches isolées de 3 malades atteints de LC et qui n'ont pas répondu au traitement. Le modèle utilisé pour notre étude est la souris BALB/c qui a été inoculé en intradermique oreille. Pendant huit semaines, nous avons collectées les données hebdomadaires relatives aux phénotypes externes, soit le poids des souris, la taille des indurations, et la taille des lésions. Les données relatives au phénotype interne (charge parasitaire des oreilles, des ganglions drainants de l'oreille infectée et de la rate), ont été explorées à la fin de l'expérimentation. Les résultats des phénotypes internes et externes l'infection de souris BALB/c par les souches isolées avant et après traitement ont été comparé à un témoin positif infecté par LIPA100/09 et un témoin négatif non infecté.

III.1.1. Phénotype externe

III.1.1.1. Variation du poids des souris

Les variations du poids des témoins négatifs ont été minimales. Les souris infectées par les souches provenant du 1er patient (LIPA 339 et LIPA 339R) en comparaison avec la souche marqueur LIPA 100/09, ont montré des variations notables pour LIPA 339R à la 3ème et à la 4ème semaine (figure 13). L'analyse statistique par ANOVA à un facteur des moyennes des poids des souris infestées par les souches LIPA339 et LIPA339R et celles des témoins, n'a pas montré de différence significative, avec une valeur $P= 0.404$ ($P<0.05$).

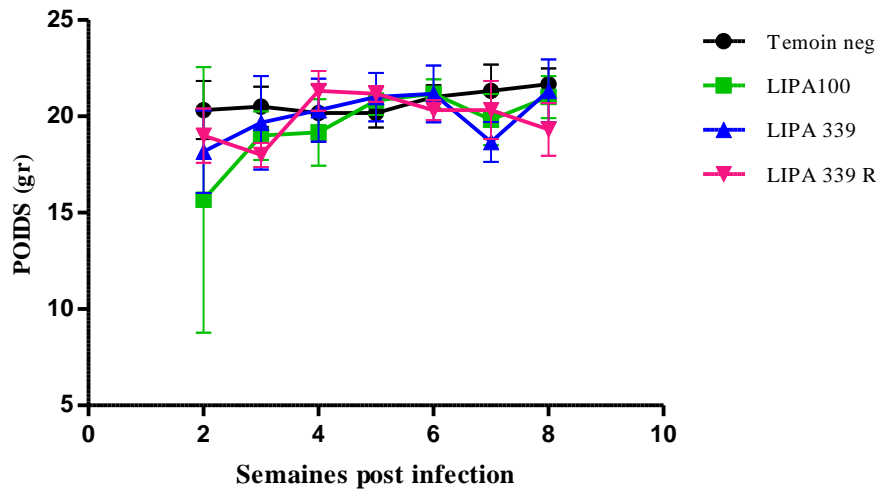


Figure 13 : Evolution du poids des souris infectées par LIPA 339, LIPA 339R, LIPA 100 et des témoins négatifs en fonction du temps.

Concernant les souches provenant du 2^{ème} patient (LIPA 443 et LIPA 443R), on note que l'évolution du poids des souris infectées par LIPA 100/09 et LIPA 443 est la même durant les 5 premières semaines. Pour LIPA 443R, on constate des variations à la 4^e et 5^e (Figure 14). L'analyse statistique par ANOVA à un facteur, des moyennes des poids des souris, n'a pas montré de différence significative avec une valeur de $P = 0,344$ ($P < 0,05$).

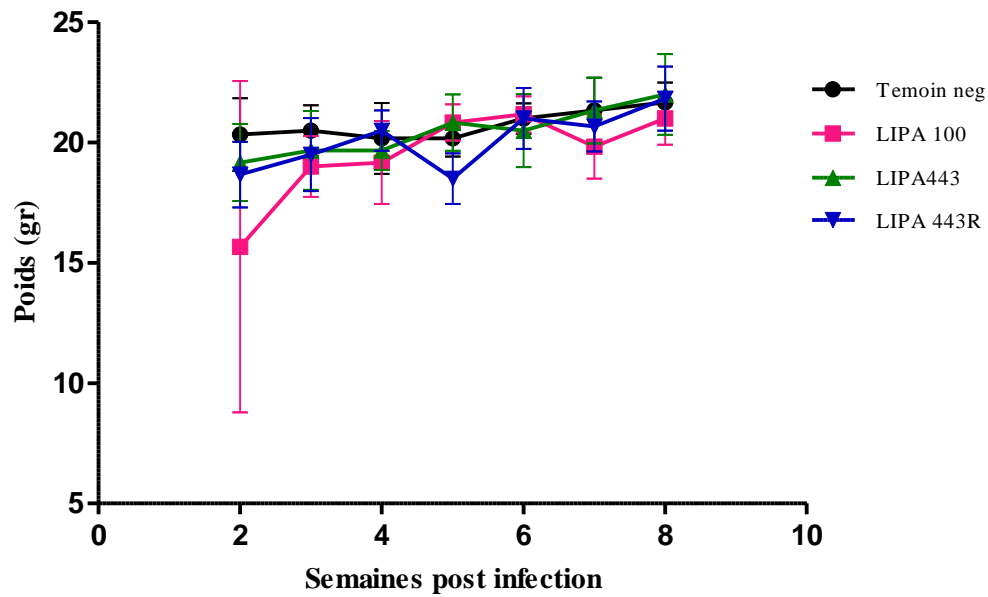


Figure 14 : Evolution des Poids des souris infestées par les souches LIPA 443, LIPA 443R, LIPA 100 et des témoins négatifs en fonction du temps. (Notez témoin négatif dans la légende)

Pour les souches provenant du 3^{ème} patient (LIPA 445 et LIPA 445R), on constate des variabilités dans les poids de souris infectés (figure 15). L'analyse statistique par ANOVA à un facteur, des moyennes des poids des souris a démontré l'absence de différence significative entre les moyennes des 4 échantillons avec une valeur de $P=0.0885$ ($P<0.05$).

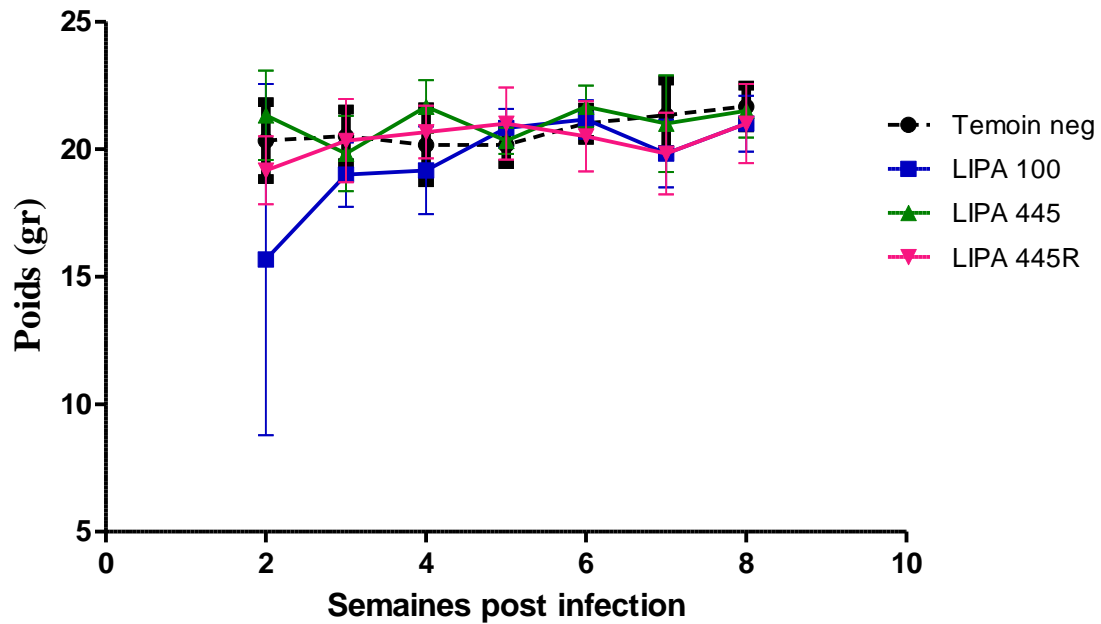


Figure 15 : Évolution du poids des souris infestées par les souches LIPA 445, LIPA 445R, LIPA 100/09 et des témoins négatifs en fonction du temps.

Le test ANOVA n'a pas démontré de différence significative de poids entre toutes les souris infectées par les différentes souches étudiées et les témoins positif et négatif. Nous concluons que le poids des souris n'est pas influencé par les souches inoculées au cours de l'expérimentation.

III.1.1.2. Évolution des indurations

Le premier signe d'infestation par *L. major* inoculé dans les oreilles des souris BALB/c s'est manifesté sous forme d'indurations.

Pour les souches provenant du premier patient (LIPA 339 et LIPA 339R), nous avons constaté que les indurations des souris infestées par la souche LIPA 339R, sont très faibles comparativement à celle mesuré chez les souris infestées par la souche LIPA 339 et celles de LIPA 100. Les souris infestées par la souche LIPA 339 présentent des indurations qui apparaissent à partir de la 3^{ème} semaine. Elles sont très importantes, même supérieures à celles des souris infestées par LIPA 100/09 (Figure 16).

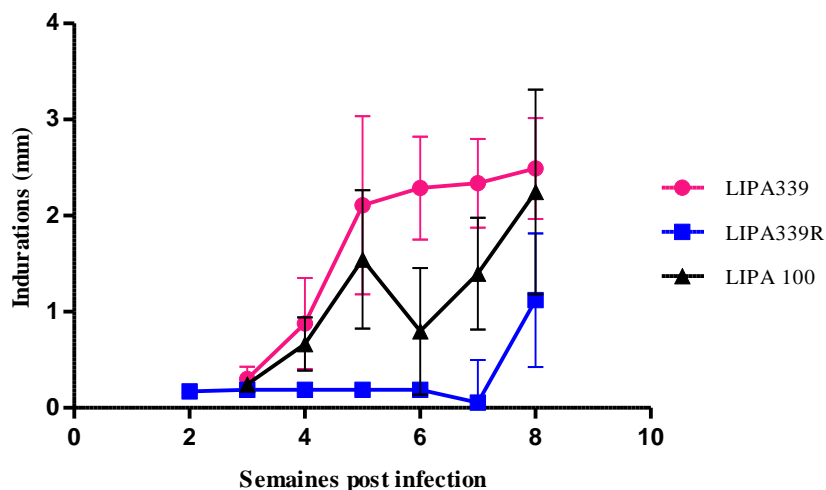


Figure 16 : Évolution des Indurations d'oreille des souris infectées par LIPA 339, LIPA 339R et LIPA 100/09 en fonction du temps.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur de ces résultats a révélée une différence significative avec une valeur de $P=0.0119$ ($P<0.05$). Une comparaison entre les souches LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100/09 avec le test non paramétrique de Tukey confirme qu'il y a une différence fortement significative entre LIPA 339, LIPA 339R (Tableau 4).

Tableau 4 : Test de comparaison de Tukey entre les souches LIPA 100/09, LIPA 339 et LIPA 339R.

Tukey's Multiple Comparison Test	MeanDiff,	q	Significant? $P < 0,05?$	Summary	95% IC of diff
LIPA339 vs LIPA339R	1,433	5,376	Yes	**	0,3615 to 2,504
LIPA339 vs LIPA 100	0,5839	2,111	No	ns	-0,5279 to 1,696
LIPA339R vs LIPA 100	-0,849	3,186	No	ns	-1,920 to 0,2224

(ns : Non significatif, IC : Intervalle de confiance).

Ces résultats démontrent que la souche LIPA 339 est plus virulente et a un développement plus rapide comparativement à LIPA 339R.

Pour les souches provenant du 2ème patient (LIPA 443 et LIPA 443R), on note d'après la figure 17, que les indurations des souris infestées par la souche LIPA 443 augmentent à partir de la 3^e semaine, alors que celles des souris infestées par la souche LIPA 443R n'augmentent qu'à partir de la 4^e semaine. À partir de la 6^e semaine les deux groupes de souris ont des indurations très proches et inférieures à celles des souris infestées par LIPA 100/09.

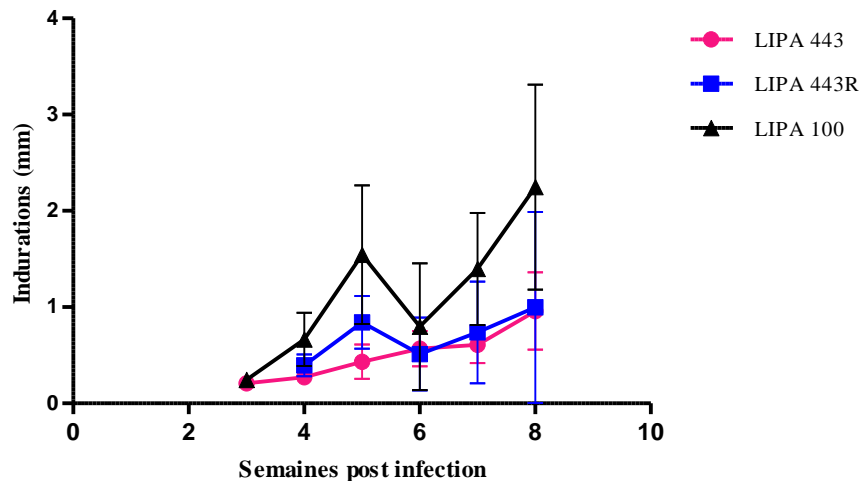


Figure 17 : Évolution des indurations d’oreille des souris infectées par LIPA 443, LIPA 443R et LIPA 100/09 en fonction du temps.

L’analyse statistique par ANOVA à un facteur, n’a pas montré de différences significatives entre les moyennes des indurations de ces 3 groupes de souris, avec une valeur de $P=0.0928$ ($P<0.05$).

Pour les souches provenant du 3^{ème} patient (LIPA 445 et LIPA 445R), la figure 18 montre l’apparition des indurations à la 3^e semaine pour toutes les souches. L’analyse statistique par ANOVA à un facteur, démontre qu’il n’y a pas de différence significative entre les indurations entre ces 3 groupes de souris infestées par les souches LIPA 100/09, LIPA 445 et LIPA 445R avec une valeur de $P=0,0991$ ($P<0,05$).

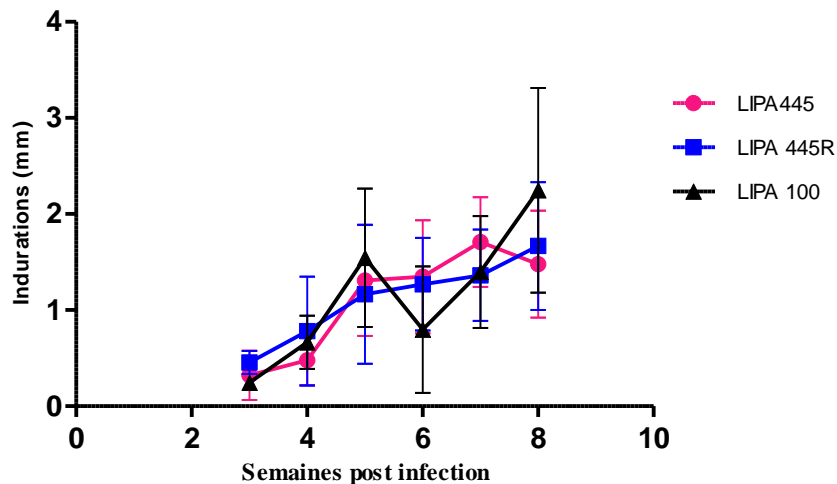


Figure 18 : Évolution des Indurations d'oreille des souris infectées par LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100 en fonction du temps.

III.1.1.3. Évolution des lésions

Pour les souches provenant du 1er patient (LIPA 339 et LIPA 339R), la figure 19 montre que les lésions chez les souris infestées par LIPA 339 apparaissent à la 4^{ème} semaine, alors que celles qui sont infectées par LIPA 339R, n'apparaissent pas avant la 6^{ème} semaine. Les lésions de LIPA 339 sont beaucoup plus importantes que celles de LIPA 339R. Elles sont même supérieures à celles mesurées chez les souris infestées par LIPA 100/09.

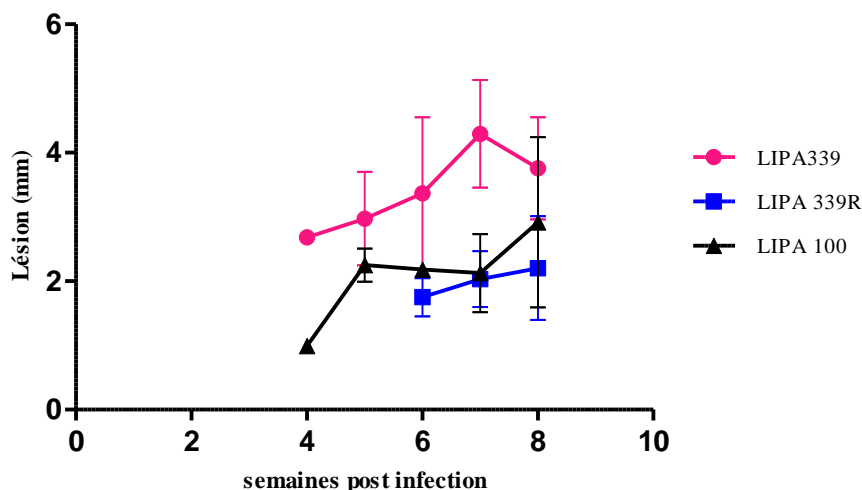


Figure 19 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 339, LIPA 339R et LIPA 100 en fonction du temps.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur, de ces résultats, a montré une différence très significative avec une valeur de $P = 0,0092$ ($P < 0.05$). Le test non paramétrique de Tukey a

révéla une différence significative entre LIPA 339 vs. LIPA 339R et LIPA 339 vs LIPA 100 (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de l'analyse statistique par le Test de Tukey entre les lésions des souches LIPA 100, LIPA 339 et LIPA 339R.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
LIPA339 vs LIPA 339R	1,42	4,543	Yes	*	0,2082 to 2,632
LIPA339 vs LIPA 100	1,322	4,884	Yes	*	0,2725 to 2,371
LIPA 339R vs LIPA 100	-0,09807	0,3137	No	ns	-1,310 to 1,114

(ns : Non significatif, IC : Intervalle de confiance).

Les souches provenant du 2^{ème} patient (LIPA 443 et LIPA 443R), ont montré que les lésions des souris infectées par LIPA 443R, apparaissent à la 4^{ème} semaine alors que celle LIPA 443 n'apparaissent qu'à la 6^{ème} semaine (Figure 20). L'analyse statistique par ANOVA à un facteur de ces résultats, n'a pas montrée de différence significative entre les lésions de ces 3 groupes de souris, avec une valeur de P = 0,6612 (P < 0,05).

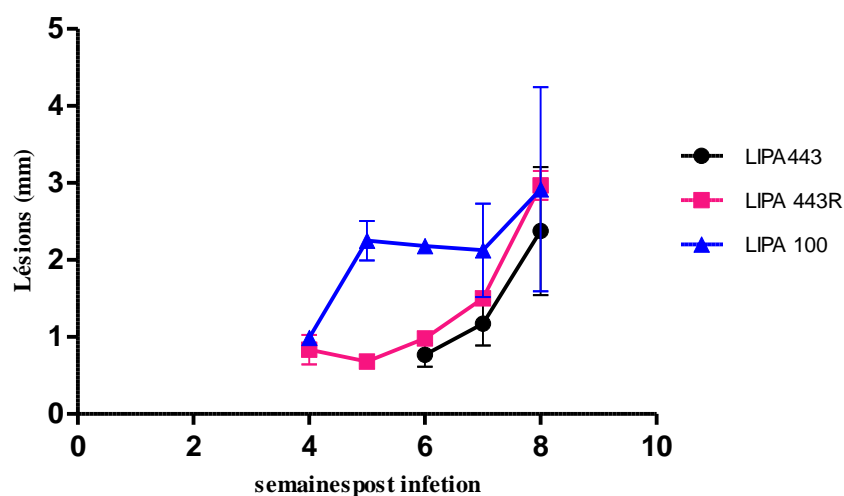


Figure 20 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 443, LIPA 443R et LIPA 100/09 en fonction du temps.

Pour les souches provenant du 3^{ème} patient (LIPA 445 et LIPA 445R), la figure 21 montre l'apparition de lésions importantes chez les souris infectées par LIPA 445 LIPA 445R à la 4^{ème} semaine, qui reste stables jusqu'à la 6^{ème} semaine, à partir de laquelle les lésions augmentent pour les souris infestées par LIPA 445 et diminuent à la 8^{ème} semaine. Alors que chez les souris infestées par LIPA 445R les lésions sont plus importantes que celles du témoin LIPA 100/09.

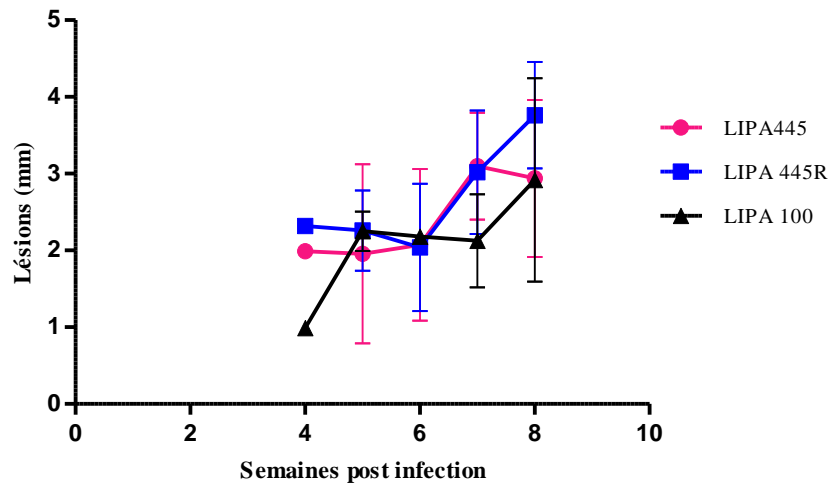


Figure 21 : Évolution des lésions d'oreille des souris infectées par LIPA 445, LIPA 445R et LIPA 100/09 en fonction du temps.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur de ces résultats n'a pas montré de différence significative entre les moyennes des lésions entre ces 3 groupes de souris, avec une valeur de $P = 0,3968$ ($P < 0,05$).

III.1.2. Phénotype interne

III.2.1. Charge parasitaire dans les oreilles

La charge parasitaire au niveau du site d'inoculation des 6 souches étudiées et de la souche témoin positif, est présentée sous forme d'histogramme (Figure 22). On remarque que la charge parasitaire des souches extraites avant traitement (LIPA 339 et LIPA 443) est plus importante que celle des souches après traitement (LIPA 339R et LIPA 443R). Alors qu'on constate le contraire pour LIPA 445R qui est la souche traitée et qui présente une charge parasitaire plus conséquente que celle de LIPA 445.

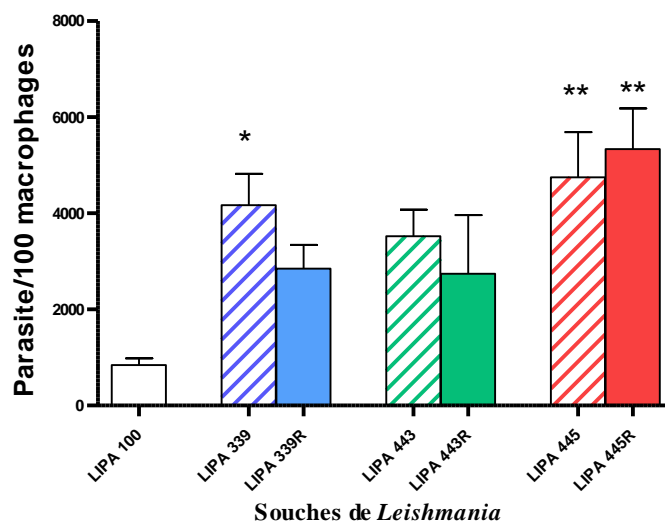


Figure 22 : Charge parasitaire des oreilles des souches étudiées par 100 macrophages.

L'analyse statistique ANOVA à un facteur a montré une différence significative avec une valeur de $P = 0,0041$ ($P < 0,05$). Une comparaison entre la charge parasitaire des souches avec le test non paramétrique de Tukey confirme qu'il y a une différence significative entre LIPA 100/09 vs LIPA 445 et entre LIPA 100/09 vs LIPA 445R (Tableau 6).

Tableau 6 : Résultats de l'analyse statistique par le Test de Tukey entre les charges parasitaires des oreilles des souches étudiées.

Test de Turkey	Écart moyen	q	Significativité $P < 0,05$?	95% CI d'écart.
LIPA 100 vs LIPA 339	-3330	4,512	Non	-6672 to 12,20
LIPA 100 vs LIPA 339R	-2006	2,882	Non	-5157 to 1145
LIPA 100 vs LIPA 443	-2681	3,853	Non	-5832 to 469,9
LIPA 100 vs LIPA 443R	-1904	2,579	Non	-5246 to 1439
LIPA 100 vs LIPA 445	-3910	5,619	Yes	-7061 to -758,7
LIPA 100 vs LIPA 445R	-4497	6,093	Yes	-7839 to -1155
LIPA 339 vs LIPA 339R	1324	1,794	Non	-2018 to 4666
LIPA 339 vs LIPA 443	648,8	0,879	Non	-2693 to 3991
LIPA 339 vs LIPA 443R	1427	1,834	Non	-2096 to 4949
LIPA 339 vs LIPA 445	-579,8	0,7855	Non	-3922 to 2762
LIPA 339 vs LIPA 445R	-1167	1,5	Non	-4690 to 2356
LIPA 339R vs LIPA 443	-675,4	0,9706	Non	-3826 to 2476

LIPA 339R vs LIPA 443R	102,3	0,1386	Non	-3240 to 3445
LIPA 339R vs LIPA 445	-1904	2,736	Non	-5055 to 1247
LIPA 339R vs LIPA 445R	-2491	3,375	Non	-5833 to 851,0
LIPA 443 vs LIPA 443R	777,7	1,054	Non	-2565 to 4120
LIPA 443 vs LIPA 445	-1229	1,766	Non	-4380 to 1922
LIPA 443 vs LIPA 445R	-1816	2,46	Non	-5158 to 1526
LIPA 443R vs LIPA 445	-2006	2,718	Non	-5349 to 1336
LIPA 443R vs LIPA 445R	-2594	3,333	Non	-6116 to 929,5
LIPA 445 vs LIPA 445R	-587,2	0,7956	Non	-3929 to 2755

III.2.2. Évolution du poids des rates

On note que le poids des rates infectées par les souches après traitement est plus important que celui obtenu par les souches non traitées, à l'exception de LIPA 339 dont le poids des rates est élevé dans le cas de l'infection par la souche non traitée (Figure 23). L'ANOVA a un facteur n'a pas révélé de différence significative entre le poids des rates avec $P = 0,0189$ ($P < 0,05$).

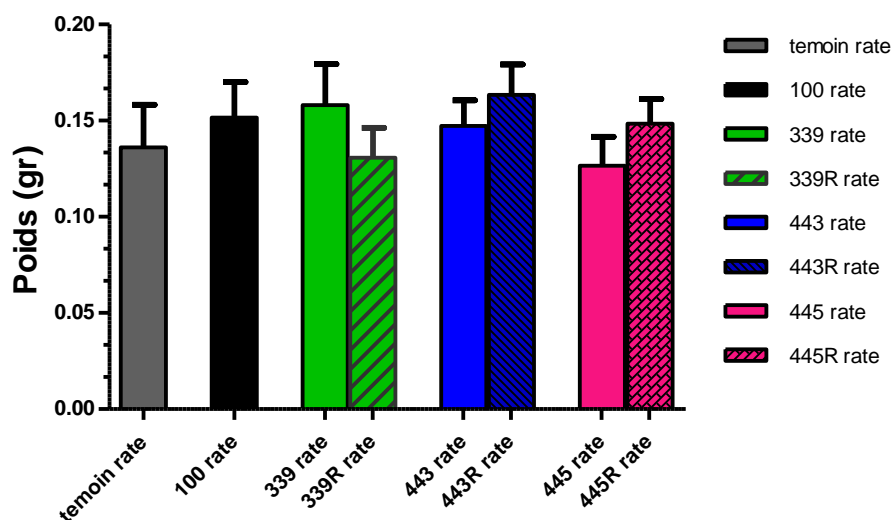


Figure 23 : Variation du poids des rates de souris infectées par les différentes souches à la 8^e semaine post infection.

III.1.3. Charge parasitaire des ganglions et des rates

Afin de d'évaluer la dissémination des parasites des souches isolées avant et après traitement, dans les souris BALB/c, les ganglions drainants du site d'inoculation et de la rate ont été prélevés, et leur charge parasitaire a été déterminée par une PCR quantitative. Les

organes ont subi une extraction d'ADN par la méthode phénol chloroforme. La qualité et la quantité d'ADN obtenus ont été testées par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN total, et par NanoDrop.

III.1.3.1. Résultats de l'extraction de l'ADN des ganglions et des rates.

III.1.3.1.1. Analyse qualitative de l'ADN extrait par électrophorèse sur gel d'agarose

Pour l'évaluation qualitative de l'ADN total extrait à partir des différents échantillons, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose. L'évaluation des résultats des électrophorèses a été réalisée sur la base d'une analyse des scores. Le score 1 est attribué pour une bande ayant des bruits de fond, le score 2 pour une bande pas très nette et le score 3 pour une bande nette de bonne qualité.

Nous avons noté que la moyenne des scores de l'ADN total obtenue par extraction avec phénol chloroforme à partir des rates, était globalement élevée, particulièrement pour LIPA 339 et LIPA 339R (Figure 24).

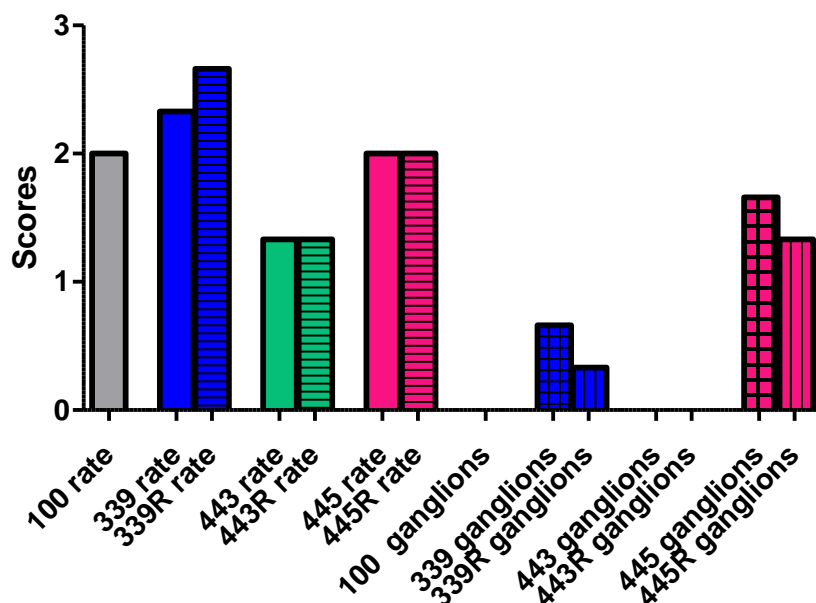


Figure 24 : Résultats de la moyenne des scores de l'analyse qualitative de l'ADN total par électrophorèse sur gel d'agarose des ganglions et des rates.

III.1.3.1.2. Analyse qualitative et quantitative par NanoDrop.

La mesure de la densité optique sur un spectrophotomètre nous a permis d'évaluer le rendement et d'estimer la pureté de l'ADN total extrait. Ce rendement a été analysé par deux ratios, A260/A230 et A260/A280 pour les échantillons de rates et de ganglions.

Nos résultats ont montré que deux échantillons de ganglions de souris infectées par les souches LIPA 339 et LIPA 445 ont été contaminés par des ARN (Figure 28), alors que deux échantillons (LIPA 100/09 et LIPA 443R) de ganglions et de rates ont été contaminés par des phénols (Figure 25 et Figure 27). Un seul échantillon (LIPA 443) a présenté des contaminations par des protéines (Figure 26). Par ailleurs, 11 échantillons ont présenté des concentrations inférieures à 250 ng/mL, qui étaient trop faibles pour être détectées par le NanoDrop et pour que les résultats soient fiables.

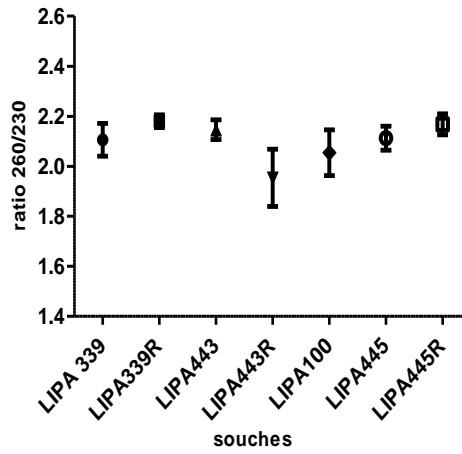


Figure 25 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des rates.

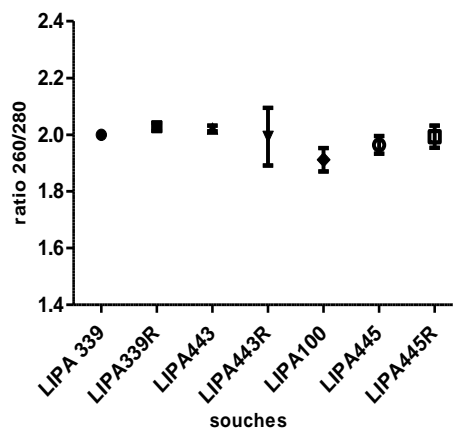


Figure 26 : Ratios 260/280 de l'ADN extrait des rates.

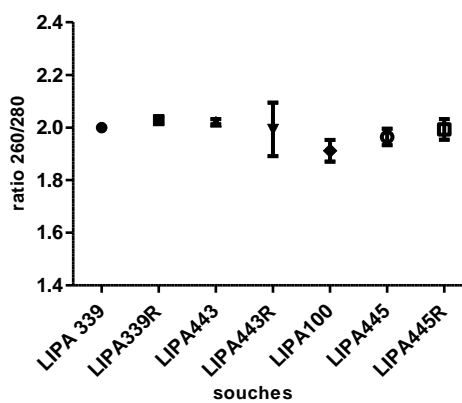


Figure 27 : Ratios 260/280 de l'ADN extrait des ganglions.

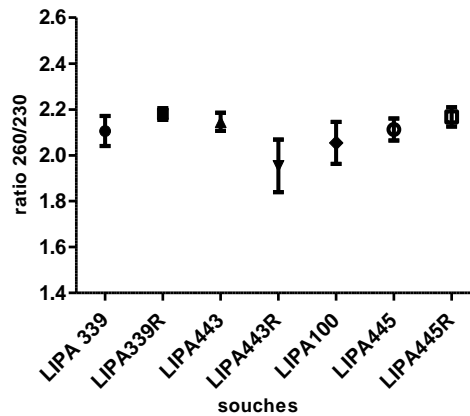


Figure 28 : Ratios 260/230 de l'ADN extrait des ganglions.

Les concentrations d'ADN total extrait à partir des rates sont plus importantes que celles des ADN extraits à partir des ganglions. Les concentrations les plus importantes sont celles de LIPA 443R et LIPA 100/09 (Figure 29). L'analyse statistique par ANOVA à un facteur de ces résultats, n'a pas montré de différence significative entre les concentrations d'ADN total extrait à partir des rates et des ganglions infectées par les différentes souches avec respectivement $P = 0,4437$ ($P < 0,05$) et $P = 0,7999$ ($P < 0,05$).

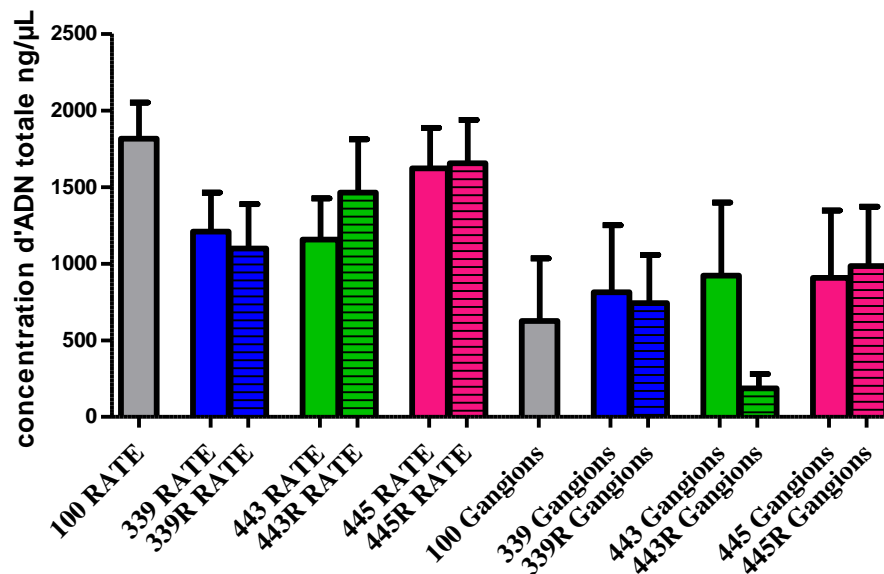


Figure 29 : Résultats des concentrations d'ADN total en fonction des souches et des organes.

III.1.3.1.3. Quantification par qPCR

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 cet échantillon.

Les ADN extraits à partir des ganglions et des rates de souches de *Leishmania major* isolées avant et après traitement ont été quantifiés avec un appareil de PCR en temps réel (Lightcycler ROCHE), après avoir été au préalable mis en contact avec le fluorophore SYBR GREEN et l'amorce spécifique de la région ciblée (JW11 et JW12). Par ailleurs, afin de déterminer la concentration d'ADN de *Leishmania* présent dans nos échantillons, nous avons établi une courbe Étalon à partir de dilutions en série d'ADN de *L. major* avec des concentrations de 7.6×10^6 à 7.6×10^2 parasite par réaction (Tableau 7). La droite de régression a été établie à partir des CT obtenu sur light cycler, en fonction de Logarithme des concentrations de la souche étalon (Figure 30).

Tableau 7: Résultats des CT de l'étalon de *Leishmania major*.

Ct	Concentration parasite	Log concentration
20,905	7600000	6,88081359
25,46	760000	5,88081359
27,89	76000	4,88081359
29,2	7600	3,88081359
32,385	760	2,88081359

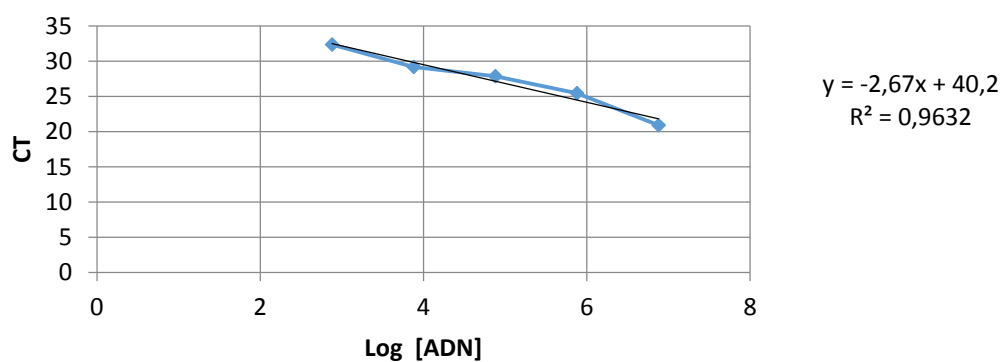


Figure 30 : Droite d'étalonnage moyenne de régression Standard (de $76 \cdot 10^5$ à 760 parasites).

À partir de la droite d'étalonnage standard obtenu par régression linéaire ($Y = -2.67X + 40.2$), nous avons calculé les moyennes des charges parasitaires dans les ganglions et les rates. Les concentrations d'ADN parasitaires obtenus ont présenté une grande variabilité pour les rates et les ganglions (Figure 31, Figure 32). Le test ANOVA à un facteur n'a pas montré de différence significative entre les concentrations d'ADN d'organes extraits et quantifiés par qPCR, avec $P = 0,3207$ ($P < 0,05$).

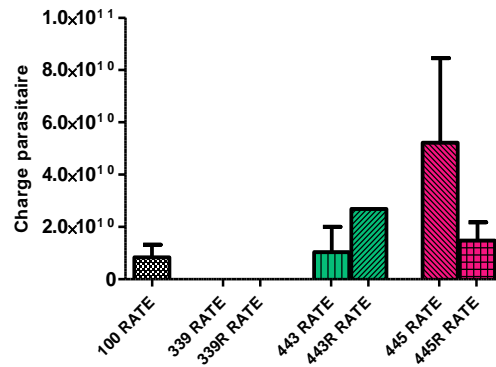


Figure 31 : Résultats des moyennes concentrations parasitaires dans les rates par QPCR.

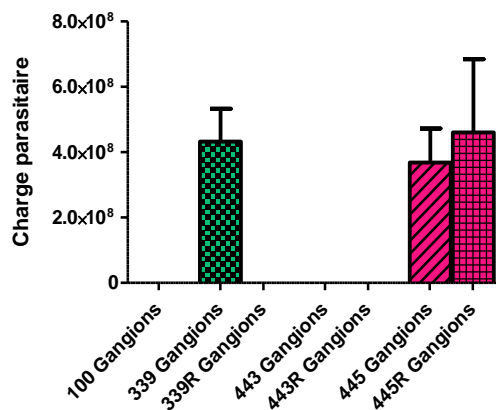


Figure 32 : Résultats des moyennes des concentrations parasitaires dans les ganglions par QPCR.

III.2. Discussion

La résistance au traitement au cours de la leishmaniose est de plus en plus fréquente. Elle se manifeste avec une variabilité qui peut aussi bien dépendre de l'hôte, du parasite que de la molécule administrée. En Algérie, l'antimoine pentavalent est la principale molécule utilisée. Elle est administrée de manière variable selon la gravité de la maladie au cours de la LC. Notre travail a pour principal objectif de comparer la virulence de 6 souches résistantes au traitement de la LC. De plus, nous avons aussi vérifié la possibilité de l'existence d'un lien entre la virulence de ces souches sur un modèle animal et la résistance à trois modes de traitement : par eau oxygéné, par Glucantime® en infiltrations et par Glucantime® en intramusculaire.

À travers les résultats des phénotypes externes et internes obtenus, on remarque concernant LIPA 339, que le phénotype virulent de la souche non traitée est plus marqué que celui de la souche traitée et se traduit par l'intensité des indurations, des lésions, et de la charge parasitaire au niveau de l'oreille infectée, qui étaient plus importants chez les souris infectées par la LIPA 339 que celles qui étaient infectées par la LIPA 339R. Nos résultats révèlent une dissémination du parasite à partir du point d'inoculation, confirmée par une charge parasitaire plus importante de LIPA 339 dans les ganglions. Cela correspond à une charge similaire pour les deux souches dans les rates, cependant la charge parasitaire de la souche traitée a montré une diminution avérée qui pourrait être expliquée par une réponse immunitaire secondaire qui se produit dans la rate.

La souche traitée par l'antimoine pentavalent en périlésionnelle LIPA 443R, semble avoir un phénotype très virulent, cela se traduit par des indurations, des lésions, et des charges parasitaires au niveau des rates et des ganglions plus importantes que celles des souris infectées par la souche non traitée LIPA 443. La concentration de LIPA 443 sur le site de l'inoculation, est plus grande que celle de LIPA 443R, ce qui suggère que cette dernière a une dissémination plus rapide, toutefois cette concentration est relativement faible. Selon BELKAID et al., (2000), il y a une augmentation transitoire du nombre de neutrophiles immédiatement après l'inoculation, le nombre et les différents types de leucocytes sédimentent et reste inchangé. L'hypothèse serait que les macrophages recrutés dans le site de l'inflammation soutiennent la multiplication des amastigotes de la souche non traitée et prennent le dessus sur la souche traitée.

LIPA 445R semble être plus virulente du point de vue du phénotype interne que la LIPA 445, cela se confirme par les concentrations parasitaires dans les oreilles et dans les ganglions

qui sont beaucoup plus importantes chez la souche traitée, ce qui pourrait être dû au fait qu'elle emprunte la circulation lymphatique pour sa dissémination, contrairement à LIPA 445 qui est présente dans les rates à de très fortes concentrations, et qui emprunterait la circulation sanguine. Les charges parasitaires élevées dans les ganglions et les rates seraient dues à la résistance de la souche au traitement administré au patient dont elle a été extraite. Cette résistance au traitement pourrait s'expliquer par une durée insuffisante du traitement, par l'utilisation de monothérapie ou bien serait due à l'utilisation de produits de mauvaise qualité. (SUNDER et al., 2001).

La comparaison du phénotype externe et interne des souches traitées et non traitées, montre que l'intensité de la charge parasitaire ainsi que la dissémination du parasite sont liés au caractère virulent de la souche.

La variation des poids des souris résulte de l'augmentation du poids des rates associée à une charge parasitaire élevée. Nos résultats montrent que le parasite se propage, se multiplie et s'accumule dans la rate en augmentant le poids de cette dernière, ce qui concorde avec OTT et al., 1967. Cependant il n'y a aucune différence significative entre les poids des rates infectées par les souches traitées et non traitées.

Une bonne corrélation a été observée entre le diamètre des lésions et la charge parasitaire ce qui nous a permis de démontrer que la taille des lésions est un facteur révélateur de la charge parasitaire. Ce résultat s'accorde bien avec les travaux de LIRA et al., (2000).

Nos résultats ont permis de retrouver des parasites au niveau des lésions (LOUZIR, 1998), des ganglions et de la rate pour les souches traitées et non traitées. Les travaux de KUREY et al., (2009) et de NICOLAS et al., (2000), ont montré que les parasites se disséminent dans les organes et jusqu'au bout de la queue de la souris BALB/c et persiste jusqu'à 3 mois dans la rate. La variation trouvée dans le nombre de parasites dans la rate et les ganglions dans les différents groupes expérimentaux, est probablement liée à la réponse immunitaire des animaux et par le fait que les parasites ne se distribuent pas uniformément dans les organes. Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont évalué le parasitisme dans les organes par d'autres méthodes (DEA-AYUELA et al., 2007 ; RICA-CAPELA et al., 2003 ; REQUENA et al., 200 ; MELBY et al., 2001).

Nous avons confirmé l'hypothèse de STAUBER et al., (1955) que la voie intra cutanée induit un parasitisme supérieur dans la rate et par conséquent une infection plus rapide et plus

efficace, ce qui suggère que cette voie pourrait être la plus appropriée pour l'obtention d'une infection forte et progressive.

LIPA 339R a présenté un caractère moins virulent que celui de la souche avant traitement, il semblerait que la désinfection de l'oreille du patient, avant l'extraction des souches, par de l'eau oxygénée ait réduit la virulence du parasite. Ceci dit les injections périlésionelles et intramusculaires du Glucantime® additionné à de l'eau oxygénée n'ont pas affecté la virulence des parasites. À travers les résultats que nous avons obtenus, il ressort que les modalités de traitement de *L. major* n'influencent pas la virulence des parasites. Le traitement par le Glucantime®, ne semble pas avoir d'effet sur la virulence des souches de *Leishmania major* étudiées. La résistance au Glucantime® est très importante en Algérie, pourrait s'expliquer par l'utilisation trop systématique de cette molécule, qui aurait favorisé la sélection de souches résistantes.

Conclusion

La leishmaniose cutanée est une maladie parasitaire fortement endémique en Algérie. Le principal moyen de lutte contre cette maladie est le traitement par l'antimoine pentavalent. De plus en plus de résistances au traitement sont rencontrées par nos thérapeutes. Et en absence de vaccin, il est plus que vital de comprendre les raisons de ces échecs au traitement.

Les échecs au traitement sont multifactoriels. Ils peuvent aussi bien être dus au parasite, qu'à l'hôte, au vecteur, qu'au médicament.

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressé à la relation possible entre l'échec au traitement par le Glucantime®, les modalités de traitement par le Glucantime®, et à la virulence des souches au cours de la LC. Cette relation a été vérifiée à travers l'étude chez la BALB/c du phénotype externe et interne de souches de *Leishmania major* isolée avant et après traitement.

Nos résultats montrent que l'infection à *L. major* chez les souris BALB/c se traduit par une augmentation des lésions de l'oreille et l'augmentation de la charge parasitaire dans le site d'inoculation, dans les ganglions lymphatiques, et dans la rate.

Il semblerait que le traitement de l'oreille du patient par de l'eau oxygénée, avant le prélèvement des souches, ait réduit la virulence de LIPA 339R. Les variations des charges parasitaires dans les ganglions et la rate seraient dues à la réponse immunitaire des souris ainsi qu'à la répartition non homogène des parasites dans les différents organes.

Les résultats de la quantification par QPCR de la charge parasitaire dans les ganglions et la rate n'ont pas montré de différence significative entre les souches traitées et non traitées. Les injections périlésionnelles et intramusculaires du traitement n'ont pas affecté de manière significative la virulence des parasites. On en déduit donc que l'intensité de la charge parasitaire ainsi que la dissémination des parasites, ne sont pas liées aux modalités de traitement mais plutôt au caractère virulent de la souche. Toutes les souches utilisées dans cette étude, à l'exception des témoins, ont montrées une résistance au Glucantime®, qui ne semble pas influencer la virulence des souches *Leishmania major* étudiées. Cette résistance pourrait être causée par l'utilisation de monothérapie, ce qui favoriserait la sélection de souches résistantes.

La technique de PCR en temps réel s'est révélée comme un bon outil pour l'évaluation précise de la charge parasitaire de *Leishmania in vivo*. Elle a permis la détection et la

quantification spécifique de l'ADN kinétoplastique de *L. major*. Cette technique utilisée par plusieurs auteurs pour diagnostiquer la maladie chez l'homme et de surveiller son évolution chez le modèle animal, est plus qu'indispensable dans l'étude des charges parasitaires de *Leishmania*.

Bien que cette étude n'ait pas permis de trouver un lien entre la virulence de *L. major* et la résistance à l'antimoine pentavalent, des études complémentaires sur un échantillonnage plus important sont nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Références bibliographiques

- Addadi K, Dedet J, 1976. Epidémiologie de la Leishmaniose en Algérie. Enquête des cas cliniques de Leishmaniose viscérale infantile de 1965 à 1974) Bulletin de la société de pathologies exotiques 69 :68-75.
- Alvarez f, Robello C, Vignalim M. 1994. Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. Mol Bio Evol 11, 790-802.
- Amel adel, Amel Boughoufalah, Claude Saegerman, Redgi De Deken, Zahida Bouchene, Abdelkrim Soukehal, Dirk Berkvens, Marleen Boelaert, 2014. Epidemiology of visceral Leishmaniasis : an update. Plos one Vol 9, issue 6, 1-10).
- Antoine J-C. Lang T. Prina E. 1999. Biologie cellulaire de Leishmania ; in « les Leishmanioses » Dedet JP ed. Ellipses. 249, 63-70.
- Ashford RW, Schnur LF, Chance ML, Samaan SA, Ahmed HN. 1977. Cutaneous Leishmaniasis in the Libyan Arab Republic : preliminary ecological findings . Annals of Tropical Medicine and parasitology, 71(3), 265-271.
- BAILE . M, Lockwood, D, 2007. Cutaneous leishmaniasis. FRCP Clinics in Dermatology, 25, 203-211.
- Bastien P, Ravel C, 1999. Le génome de leishmania structure et plasticité. Les leishmanioses. Ellipses. 249, 63-70.
- Belazzoug S, Addadi K, Mokrani T, Hafirassou B, Hamrioui B, Belkaid M. 1985. La leishmaniose viscérale en Algérie. Etude des cas hospitalisés entre 1975-1984. Ann.Soc.Belge.Med.Trop.65, 329-335.
- Belazzoug S, Addadi K, Mokrani T, Hafirassou N, Hamirioui B, Belkaid M, 1983. Nouveau foyer de leishmaniose cutanée à M'sila (Algérie). Infection naturelle de *Psammomys obesus* (Rodentia, Gerbillidae). Bulletin de la société de pathologie Exotique et de ses filiales, 76(2).146-149.
- Belkaid M, Harrat Z. La leishmaniose en algérie. Mise au point. Rev MedPhar 1997 : 43-6.
- Ben Ismail R, Gramiccia M, Gradoni L, Helal H, Ben Rachid MS. 1987. Isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* in Tunisia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81(5), 749.
- Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi I, Benbetka S, Bouiba L, Boubidi SC, Benikhlef R, Arrar L, Hamrioui B, Harrat Z, 2012. Extension de *Leishmania major* au Nord de l'Algérie. Bulletin de la société de pathologie Exotique, 105(1), 30-35.
- Bourdoiseau G et Denerolle Ph 2000. Traitement de la leishmaniose canine : actualité. Revue Méd. Vét. 151, 5, 395-400).
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, 200. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice Clin Diagn Lab Immunol 8: 828–831.
- Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J.F., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M., 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8, 828–831
- [Britto C](#), [Ravel C](#), [Bastien P](#), [Blaineau C](#), [Dedet JP](#), [Wincker P](#), 1998. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between old world and new world
- Cherif k, Boudrissa A, Cherif MH, Harrat Z. 2012. Programme sociale pour le contrôle de la leishmaniose cutanée zoonotique à Msila, Algérie. Santé Publique, 24(6), 511-522).
- Christian RIPERT, 1996. Epidémiologie des maladies parasitaires-tome 1. 392 p.

Références bibliographiques

- Christophe Filippi, Laurent Malherbe, Valérie Julia et Nicolas Glaichenhaus, 2001. L'immunité contre les leishmanies médecine/sciences 2001 ; 17 : 1120-8. m/s n° 11, vol. 17.
- Colmenares M, Ahmed S, Soongl, Goldsmith-Pestana K, Menstermann L, Molina R, McMahan-Pratt D, 2003. Intradermal infection modal for pathogenesis and vaccin studie f murine viscéral Leishmaniasis. Infect.Immun. 71, 401-410.
- Corinne Loeuillet, Anne-Laure Bañuls and Mallorie Hide, 2016. Study of Leishmania pathogenesis in mice : experimental considerations. **DOI:** 10.1186/s13071-016-1413-9.
- Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edward-Jones, A. J. Fox, and B.
- David Saks, Nancy, Noben-Trauth, 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Review Volume 2. 845-858. doi:10.1038/nri933.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Alunda JM, Bolas-Fernandez F, 2007. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. Vet Res Commun 31: 703–717.
- Dedet J.P, 2009. Leishmanies, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-506-A-10.
- Dedet JP., 2001. Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, 8 :506-510.
- Dereure J, 1999. Réservoir des leishmanies. Les leishmanioses. Ellipse. 249. 109-127.
- Elodie Barbau-Piednoir, Antoon Lievens, Guillaume Mbongolo-Mbella, Nancy Roosens [Email author](#), Myriam Sneyers, Amaya Leunda-Casi, Marc Van den Bulcke, 2010. Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G. et al. Eur Food Res Technol 230: 383. doi: 10.1007/s00217-009-1170-5.
- Garnier, T., Mäntylä, A., Järvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., Croft, S., 2007. In vivo
- Gradoni L, Bryceson A, Desjeux P, 1995. Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. Bulletin of the World Health Organization 73: 191–197.
- Gradoni L, Soteriadou K, louzir H, Dakkak A, Ozensoy Toz S, et al, 2008, Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. Tropical Medicine and International Health 13: 1272–1276.
- Granier Marie, 2013. Etude de la perception du vaccin contre la leishmaniose par les vétérinaires et les propriétaires de chiens en zone d'enzootie sur le territoire de France métropolitaine. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Présentée et soutenue publiquement devant l'université Paul-Sabatier de Toulouse.
- Groux, H. A transgenic modal to analyze the immunoregulatory role of IL10 secreted by antigen-presenting cell. G immunol. 162, 1723-1729.
- Guler, Mehmet L ; Gorham, James D ; Hsieh, Chyi-Song ; Mackey, Aaron G ; et al, 1996. Génétic suceptibility to Leishmania. Science 271. 5251.
- Harrat Z, Boubidi SC, Pratloug F, Benikhlef R, Selt B, Dedet JP, Ravel C, Belkaid M. 2009. Description of a dermatotropic Leishmania close to *L.killicki*.
- Harrat Z, Haddadi K, Belkaid M, Tabet-Derraz O(1992) Algérie Recensement des cas le Leishmaniose (période1985-1990). Bulletin de la société de pathologies exotiques 85 :296-301.
- Harrat Z, Haddadi K, Belkaid M, Tabet-Derraz O, 1992. Algérie Recensement des cas le Leishmaniose (période1985-1990). Bulletin de la société de pathologies exotiques 85 :296-301.

Références bibliographiques

- [Iryna Kurey](#), [Tetyana Kobets](#), [Helena Havelková](#), [Martina Slapničková](#), [Lei Quan](#), [Kateřina Trtková](#), [Igor Grekov](#), [Milena Svobodová](#), [Alphons P. Stassen](#), [Alan Hutson](#), [Peter Demant](#), et [Marie Lipoldová](#), 2009. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. 61(9): 619–633.
- James Alexander, Abhay R, Satoskar, David G, Russell, 1999. Leishmania species: Modals of intracellular parasitisme. Journal of cell science 112, 2993-3002.
- Jean-Jacques Panthier, Xavier Montagutelli et Jean-Louis Guénet. Mouse Genetics, 2015. DOI 10. 1007/978-3-662-44287-6.
- JL Guénet et F. Bohomme, 2003. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model Trends in genetics, Volume 19.
- Jorge Alvar , Iván D. Vélez, Caryn Bern, Mercé Herrero, Philippe Desjeux, Jorge Cano, Jean Jannin, Margriet den Boer , the WHO Leishmaniasis Control Team ; 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.
- Jorge P. Alvar Ezquerro, 2001. Las Leishmeniasis: De la biología al control. Centro Colaborador de l'OMS para Leishmaniasis Servicio de Parasitología Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III Madrid, 2ª edición. 1-200.
- Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P, 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 90: 129–132. doi: 10.1016.
- K. Aoun et A. Bouratbine, 2014. Cutaneouse leishmaiasis in North Africa: a riview. Institut Pasteur de Tunis, laboratoire de parasitologie, 13 PI Pasteur, PB 74, Tunis 1002, Tunisia.
- K. Benallal, B Gassem, L Bouiba, G Depaquit, Z Harrat, 2013. Entomology investigation following the resurgence of human viscéral Leishmaniasis in southern Africa.
- K. Benallal, B Gassem, L Bouiba, G Depaquit, Z Harrat; 2013. Entomology investigation following the resurgence of human viscéral Leishmaniasis in southern Africa. Actrop 3143 1-4.
- Kaczmarek. 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 39:1553–1558.
- Killick-Kendrick R, 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis : a review. Medical and Veterinary Entomology 4: 1–24.
- [le Fichoux Y](#), [Quaranta JF](#), [Aufeuve JP](#), [Lelievre A](#), [Marty P](#), [Suffia I](#), [Rousseau D](#), [Kubar J](#), 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. 37(6):1953-7.
- Leger N, Depaquit J. 1999. Les phlébotomes ; In : Dedet JP , editor. Les Lishmanioses. Paris : Ellipses. P.89-108.
 - leishmania genomes. 222(1):107-17.
- Lionel Zenner, 2008. Gestion des lignées expérimentales: de la génétique aux statuts sanitaires. L'exemple de la souris. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon UMR 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie. Commission Spécialisée Avicole INRA Paris.

Références bibliographiques

- [Lira R¹](#), [Méndez S](#), [Carrera L](#), [Jaffe C](#), [Neva F](#), [Sacks D](#), 1998. *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. 89(3):331-42.
- Logan, J. M. J., K. J. Edwards, N. A. Saunders, and J. Stanley. 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:2227–2232.
- Louzir, H., P. C. Melby, A. Ben Salah, H. Marrakchi, K. Aoun, R. Ben Ismail, and K. Dellagi, 1998. Immunological determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* 177:1687±1695.)
- Luc Nicolas, Eric Prina, Thierry Lang, and Geneviève Milon, 2002. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 1666–1669, Vol. 40, No. 5.
- Luc Nicolas, Sacha Sidjanski, Jean-Herve Acolle, and Genevi, 2001. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: A study with laboratory mice. p. 6561±6566. vol. 68, no. 12.
- Lucienne Chatenoud et Jean-François Bach, 2012. *Immunologie 6^e édition*. Lavoisier. Page 168-170.
- Marty P, Pomares-Estran C, Hasseine L, Delaunay P, Haas H, et al, 2009. Leishmaniasis in France: an update. *Archives de Pédiatrie* 16Suppl 2S96–S100.
- Mary Johnson, 2012. *Protein Quantitation*. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States. ISSN : 2329-5139.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE, 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166: 1912–1920.
- Monteiro E M, França-Silva J C, Costa R T, Costa D C, Barata R A, Paula E V, Machado-Coelho G L L, Rocha M F, Fortes-Dias C L, Dias E S, 2005. Leishmaniose visceral : estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 147-152.
- Nadia das Dores Moreira, Juliana Vitoriano-Souza, Bruno Mendes Roatt, Paula Melo de Abreu Vieira, Henrique Gama Ker, Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Claúdia, Martins Carneiro, Marta de Lana, Alexandre Barbosa Reis, Rodolfo Cordeiro Giunchetti, 2012. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS ONE* 7(10). 10.1371.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1666–1669.
- Nuno Rolao, Claudia Melo, Lenea Campino, 2003. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Tropica* 123-126
- Oliveira DM, Costa MAF, Chavez-Fumagalli M, Valadares DG, Duarte MC, Costa LE, Martins VT, Gomes RF, Melo MN, Soto M, Tavares CAP, Coelho EAF, 2012. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res.* 2012;110:1277–85.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2016.

Références bibliographiques

- Ott KJ, Hanson WL, Stauber LA, 1967. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol* 53: 641–645.
- Philippe Desjardins, Deborah Conklin, 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/2565.
- POITRAS ET HOUDE, 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11
- Poitras, E. et Houde, A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2 (2) : 2-11.
- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chioccola, V.L., Tempone, A.G., 2011. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Experimental Parasitology* 128, 111–115.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C, 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 269–281.
- Rica-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89: 163–169.
- Richard D. Pearson and Anastacio de Queiroz Sousa, 1996. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 22, No. 1, pp. 1-11 ; in : K. Aoun et A. Bouratbine, 2014. Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. Institut Pasteur de Tunis, laboratoire de parasitologie, 13 PI Pasteur, PB 74, Tunis 1002, Tunisia.
- RNL Sénégal, 2004. *Manuel de procédures des techniques de laboratoires d'analyses médicales*. 1^{ère} édition. Ministère de la Santé et de la Prévention Médicale. 97 p.
- Roberts, L.S. and Janovy, J.J. Gerald D. Schmidt & Larry S, 2000. Roberts Foundations of Parasitology. McGraw-Hill Higher Education, Boston ; in : DJEZZAR-MIHOUBI Ilhem. 2006. Etude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire Ben Baddis de Constantine
- Roche Applied Science, 2005. LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master.
- ROCHE, 2005
- Rolao N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L, 2007. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol* 115: 270–276.
- Rosalia Lira, Mark Doherty, Govind Modi, and David Sacks, 2000. Evolution of Lesion Formation, Parasitic Load, Immune Response, and Reservoir Potential in C57BL/6 Mice following High- and Low-Dose Challenge with *Leishmania major*. *68(9)*. 5176–5182.
- Rosypal AC, Zajac AM, Troy GC, Lindsay DS, 2005. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 130:19–27.
- S.A.Miller, D.D.Dykes and H.F.Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* Volume 16 Number 3 1988

Références bibliographiques

- Shyam Sundar S, Gupta NK, Nagar, Lanka, Varanasi, 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Pages 849–854. 1365-3156.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H, 2004. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. Oxford Journals Medicine & Health Clinical Infectious Diseases. Volume 38, Issue 9. Pp. 1266-1272.
- Stauber L, 1955. Leishmaniasis in the hamster. In “Some Physiological Aspects and Consequences of Parasitism,” (W. H. Cole, ed.), Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, 76–90.
- Stephan Pabinger, Stefan Rödiger, Albert Kriegner, Klemens Vierlinger, Andreas Weinhäusel, 2014. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Health & Environment Department, Molecular Diagnostics, AIT – Austrian Institute of Technology, Muthgasse 11, 1190 Vienna, Austria.
- Stiles J. K., Hickey P. I., Shah P. H. et Maede, J. C., 1999. Génomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. Annals of tropical medicine and parasitology, 93, 781-807. Studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60, 802–810.
- Tabbabi A, Ghrab J, Aoun K, Ready PD, Bouratbine A, 2011. Habitats of the sandfly vectors *Leishmania tropica* and *L. major* in a mixed focus of cutaneous leishmaniasis in southeast Tunisia. Acta Tropica, 119(2–3), 131–137.
- Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T, 2008. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. Diagn Microbiol Infect Dis 61: 23–30.
- Vickerman K, 1976. The Diversity of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans, *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 1-34.
- Virginie Rougeron, Thierry De Meeûs, Sandrine Kako Ouraga, Mallorie Hide, Anne-Laure Bañuls, 2010. “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. PLoS Pathog 6(8): e1001004. doi:10.1371/journal.ppat.1001004.
- Weery M. 1995. Protozoologie médicale. Edition De Boeck Université, 123-136.
- William H. Marquardt, 1997. Biology of disease vectors. 0-12-473276-3.
- Woo, T. H. S., B. K. C. Patel, M. Cinco, L. D. Smythe, M. A. Norris, M. L. Symonds, M. F. Dohnt, and J. Piispanen. 1999. Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. J. Microbiol. Methods 35:23–30.
- World Health Organisation, 2000.
- Zwigenberg, K, Harms, G, Pedrosa, C, Sandkamp, B, Neifer, S, 1990. Determinants of the immune response in visceral Leishmaniasis: Evidence of predominance of endogenous interleukin 4 over IFN γ production. Clin. Immunol. Immunopathol. 57, 242-249.

Annexe I : Milieux de culture et agents révélateurs

I.1. Milieux de cultures

I.1.1. Milieu et NNN

Composition : Gélose (10 g bacto agar diffco), NaCl (6 g), eau distillée stérile (100 ml), sang de lapin (10 % à 20 %).

Préparation :

La gélose Bacto agar est ajouté à la solution de NaCl chauffée à 80 °C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissolution ; après distribution dans des tubes à essai de 8 ml et stérilisation (à l'autoclave 120 °C pendant 20 minutes), la conservation se fait à +4 °C.

Le sang de lapin : est obtenu par ponction cardiaque, il est recueilli sur citrate de sodium à 10 % après ajout de 250000 unités de pénicilline, la conservation se fait à +4 °C.

Le mélange gélose-sang : la gélose est fondue en mettant les tubes dans un bain marie de 45 °C, le sang est ensuite incorporé à la gélose (2 ml de sang pour 8 ml de gélose). Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation se fait à +4 °C.

I.1.2. Milieu RPMI 10S

Composition :

RPMI1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (16,4 g), eau distillé stérile (1000 mL).

Préparation :

Mesurer environ 900 mL d'eau distillée et tout en le soumettant à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissolution sans chauffer puis ajouter 2 mL de L-Glutamine, 50 UI/mL de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine, ajuster le Ph à 7 et compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 mL.

Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm et additionner aseptiquement le sérum de veau foetal à raison de 10 %. La conservation se fait à +4 °C.

I.2. Coloration au May GrünwaldGiemsa (MGG)

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

Fixation :

- Placer la lame du frottis sur un support horizontal au-dessus d'un bac de coloration.
- Verser sur la lame 5 gouttes de colorant May-Grünwald pur de façon à recouvrir complètement le frottis. Laisser agir 3 minutes. Laver à l'eau tamponnée (à défaut utiliser l'eau de robinet).

Coloration au Giemsa :

- Préparer une dilution du Giemsa au dixième (1/10) avec de l'eau tamponnée (eau neutre)
- Recouvrir le frottis de la solution diluée
- Laisser agir 20 mn
- Laver à l'eau

Séchage :

- Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier filtre.
- Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis. (RNL Sénégal, 2004).

I.3. Le SYBR Green I

C'est un composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il a la capacité de se lier aux acides nucléiques et d'émettre une fluorescence. Il est de ce fait utilisé en biologie moléculaire comme agent fluorescent, notamment lors de la réalisation de PCR quantitatives.

I.4. Bromure d'éthidium (BET)

Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée.

Annexe II : Réactifs

II.1. Composition du Gradient de Ficoll

- Ficoll à 5 % (1ml de Ficoll + 19ml de PBS) ;
- Ficoll à 10 % (2ml de Ficoll + 18ml de PBS) ;
- Ficoll à 20 % (4ml de Ficoll + 16ml de PBS) ;
- Solution de Ficoll à 40 % (8ml de Ficoll + 12ml de PBS).

Composition de la solution mère :

- 200 mL à 40 % de Ficoll
- 80 mL de Ficoll
- 120 mL de RPMI

II.2. Les réactifs d'extraction

II.2.1. Préparation de la solution PK

- EDTA 0,5 M : 20 mL
- SDS à 10 % : 10 mL
- H₂O bidistillé : 100 mL
- 100 mg de PK

II.2.2. Tampon de lyse (pH = 3)

- 0,5 M EDTA

II.2.3. Tampon d'éluion (pH = 8)

- Tris-HCl 1 mM : 20 mL
- EDTA 0,5 mol : μ L
- H₂O : 170 mL
- 200 mL de TE

II.2.4. Phenol-chloroform et isonyl alcool (25v, 24v, 1v)

- SDS 10 % : pH = 7,5
- 10 g + 90 mL H₂O

II.3. L'électrophorèse

II.3.1. Réactifs

- TAE IX (Tris Acide acétique EDTA) dilué une fois (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, et 1 mM EDTA).
- BET (Bromure d'éthidium).

II.3.2. Préparation du gel d'agarose à 0,8 %

- Prendre 0,8 g d'agarose et l'ajouter à 100 mL de TAE IX,
- Chauffer le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide, refroidir le mélange en le mettant sous l'eau courante ensuite ajouter 7 μ L de BET,
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne,
- Après polymérisation du gel, retirer le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

II.4. PCR quantitative

Préparation du mix :

Tableau 1 : Les conditions PCRJW11-12 sont résumées dans le tableau suivant :

	Concentration finale	Volume [μ L] pour l'échantillon
H₂O	/	13,3
dNTP	0,2 mM	1,5
Tampon	1 \times	4
Mgel2	1,5 mM	5
Amorce 1	0,5 μ M	1
Amorce 2	0,5 μ M	1
Solution Q	0,5 \times	10
Taq polymérase	2 u	0,2

Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés. Tous les constituants sont mélangés dans un tube Eppendorf, 18 μ L de ce mélange est déposé dans chaque tube de barrette de 8 spécifique à la PCR (thermocycleur). En plus des échantillons, nous avons :

- Un témoin négatif : contient 2 μ L d'eau distillée stérile plus 17 μ L de mix.
- Un témoin positif : contient 2 μ L de l'ADN positif plus 18 μ L du mix.

L'échantillon contient 2 μ l d'ADN extrait ajouté de 18 μ l de mix. Le volume total de chaque microtube (échantillon témoin) est de 20 μ L.

La méthode de préparation du mix est similaire à celle de la PCR standard, à l'exception de l'ajout de la sonde marquée. Le mélange réactionnel contient de l'ADN TaqPolymerase, un tampon de réaction, le mélange de dNTP (avec dUTP au lieu de dTTP), le colorant SYBR Green I, et MgCl₂.

Après avoir préparé le mélange réactionnel d'après le protocole expérimental de NICOLAS, 2002, en additionnant des sondes fluorescentes et des primers ainsi que l'ajout des ADN des échantillons et du témoin positif, le mix est mis dans un appareil de PCR quantitative en temps réel. Il s'agit d'un appareil de type Light Cycler-rapide, couplé à un spectrophotomètre, ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

Annexe III : Résultats

III.1. Les résultats du monitoring

Tableau 2 : Évolution du Poids des souris infectées par les différentes souches et des témoins négatifs en fonction du temps post infection.

Semaine	Poids (gr)							
	LIPA 339	LIPA 339R	LIPA 443	LIPA 443R	LIPA 445	LIPA 445R	Témoins négatifs	LIPA100
S2	20	19	21	17	18	20	20	20
	20	19	17	20	22	18	23	21
	17	18	18	17	22	21	19	18
	20	21	19	19	22	20	19	18
	17	17	19	20	21	18	21	19
	15	20	21	19	23	18	20	16
S3	22	19	21	22	20	22	19	17
	21	18	20	18	21	22	21	20
	19	18	19	19	20	18	22	19
	16	18	18	20	21	20	20	18
	18	18	22	18	20	21	20	20
	22	17	18	20	17	19	21	20
S4	21	21	20	20	22	20	23	18
	19	21	20	20	21	21	20	18
	19	23	19	22	23	21	20	20
	21	21	21	21	22	22	19	21
	19	22	19	20	20	19	20	21
	23	20	19	20	22	21	19	17
S5	22	21	20	20	20	21	20	20
	21	21	20	18	21	22	21	21
	20	21	21	17	20	19	20	21
	22	21	23	18	21	21	20	21
	22	21	20	19	20	23	21	22
	19	22	21	19	20	20	19	20
S6	21	20	19	21	22	22	22	21
	22	21	23	19	21	21	21	22
	19	20	21	22	22	19	21	21
	20	21	21	22	21	22	21	22
	23	20	20	20	23	19	20	21
	22	20	19	22	21	20	21	20
S7	19	20	20	22	23	18	21	19
	19	19	21	21	22	18	20	21
	20	23	21	21	23	20	24	19
	17	19	24	21	19	22	21	21
	19	20	21	20	19	20	21	21
	18	21	21	19	20	21	21	18
S8 :Jour du sacrifice	23	19	21	23	20	22	22	21
	20	21	22	21	23	23	22	23
	22	20	25	23	22	20	22	21
	21	19	22	23	21	22	20	21
	23	17	22	20	22	19	22	20
	19	20	20	21	21	20	22	20

Tableau 3 : Moyennes des poids des souris infestées par LIPA 339, 339R et 100, en fonction du temps post infection.

Semaines	Témoign négatif		LIPA100		LIPA 339		LIPA 339 R	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
2	20,33	1,506	18,67	1,789	18,17	2,137	19	1,414
3	20,5	1,049	19	1,265	19,67	2,422	18	0,6325
4	20,17	1,472	19,17	1,722	20,33	1,633	21,33	1,033
5	20,17	0,7528	20,83	0,7528	21	1,265	21,17	0,4082
6	21	0,6325	21,17	0,7528	21,17	1,472	20,33	0,5164
7	21,33	1,366	19,83	1,329	18,67	1,033	20,33	1,506
8	21,67	0,8165	21	1,095	21,33	1,633	19,33	1,366

Tableau 4 : Moyennes des poids des souris infestées par LIPA 443, 443R et 100, en fonction du temps post infection.

Semaines	Témoign négatif		LIPA 100		LIPA443		LIPA 443R	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
2	20,33	1,506	18,67	1,789	19,17	1,602	18,67	1,366
3	20,5	1,049	19	1,265	19,67	1,633	19,5	1,517
4	20,17	1,472	19,17	1,722	19,67	0,8165	20,5	0,8367
5	20,17	0,7528	20,83	0,7528	20,83	1,169	18,5	1,049
6	21	0,6325	21,17	0,7528	20,5	1,517	21	1,265
7	21,33	1,366	19,83	1,329	21,33	1,366	20,67	1,033
8	21,67	0,8165	21	1,095	22	1,673	21,83	1,329

Tableau 5 : Moyennes des poids des souris infestées par LIPA 445, 445R et 100, en fonction du temps post infection.

Semaines	Témoign négatif		LIPA 100		LIPA 445		LIPA 445R	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
2	20,33	1,506	18,67	1,789	21,33	1,751	19,17	1,329
3	20,5	1,049	19	1,265	19,83	1,472	20,33	1,633
4	20,17	1,472	19,17	1,722	21,67	1,033	20,67	1,033
5	20,17	0,7528	20,83	0,7528	20,33	0,5164	21	1,414
6	21	0,6325	21,17	0,7528	21,67	0,8165	20,5	1,378
7	21,33	1,366	19,83	1,329	21	1,897	19,83	1,602
8	21,67	0,8165	21	1,095	21,5	1,049	21	1,549

Tableau 6 : Mesures des indurations de l'oreille gauche des souris infectées en fonction du temps post infection.

Semaine	Induration						
	LIPA 339	LIPA 339R	LIPA 443	LIPA 443R	LIPA 445	LIPA 445R	LIPA100
S2	/	0/0.22 0.19/0.10	/	/	/	/	/
S3	0.14 0.41 0.19 0.35 0.41	0.19	0.20 0.21 0.21 0.21 0.21	/	0.23 0.26 0.19 0.25 0.16 0.84	0.37 0.54	0.19 0.23 0.22 0.29 0.30
S4	0.9 0.5 0.4 1.4 1.5 0.57	0.36 0.30 0.39 0.26 0.33 0.40	0.37 0.24 0.28 0.3 0.23 0.20	0.4 0.38 0.39 0.20 0.55 0.45	0.18 0.67 0.67 0.8 0.3 0.26	0.73 1.86 0.44 0.88 0.38 0.4	0.91 0.66 0.30 0.36 0.85 0.91
S5	2.77 2.73 1.62 3.26 1.23 1.04	0.27 0.6 0.92 0.44 0.51 0.5	0.30 0.33 0.38 0.79 0.4 0.4	1.20 0.98 0.71 0.80 0.96 0.4	1.95 0.73 1.50 0.47 1.58 1.62	2.25 0.26 0.95 1.73 0.66 1.14	0.5 0.76 2.20 1.95 1.94 1.92
S6	2.23 2.48 1.52 2.94 1.84 2.71	0.36 1.18 1.22 0.89 1.3 0.3	0.91 0.57 0.4 0.6 0.5 0.43	0.31 1 1 0.3 0.28 0.19	2.15 0.68 1.45 1.8 0.7 1.3	1.13 1.36 0.4 1.66 1.33 1.74	0.94 1.35 1.07 0.35 -0.31 1.38
S7	2.64 2.00 2.91 1.62 2.4 2.46	0.87 1.41 1.22 0.6 2.29 0.33	0.6 0.9 0.49 0.65 0.68 0.33	0.27 0.72 0.36 1.37 1.40 0.3	2.18 1.98 0.95 1.76 2.02 1.36	2.07 1.22 1.52 1.4 0.6 1.36	1.75 1.22 0.4 1.86 1.22 1.94
S8 : Jour du sacrifice	3.20 1.95 2.81 2.66 2.5 1.82	1.52 1.33 1.66 0.73 1.6 0.40	0.9 0.38 0.6 1.35 1.25 1.28	0.23 0.40 2.25 0.4 0.4 2.3	2.18 1.8 1.05 1.4 1.78 0.66	2.14 1.79 1.84 0.5 2.37 1.37	3.21 1.8 3.71 2.41 0.98 1.37

Tableau 7 : Moyennes des indurations pour les souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA339et LIPA 339R.

Semaines	LIPA339		LIPA339R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
2	/	/	0,17	0,06245	/	/
3	0,3	0,1269	0,19	0	0,246	0,04722
4	0,8783	0,4746	0,19	0	0,665	0,2759
5	2,108	0,9276	0,19	0,05404	1,545	0,7208
6	2,287	0,5355	0,19	0,05404	0,7967	0,6582
7	2,338	0,4619	0,05404	0,4447	1,398	0,5815
8	2,49	0,5246	1,12	0,6957	2,247	1,065

Tableau 8 : Moyennes des indurations pour les souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA443et LIPA 443R.

SEMAINES	LIPA443		LIPA443R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
3	0,208	0,004472	/	/	0,246	0,04722
4	0,27	0,06066	0,395	0,1143	0,665	0,2759
5	0,4333	0,1793	0,8417	0,2741	1,545	0,7208
6	0,5683	0,1843	0,5133	0,3794	0,7967	0,6582
7	0,6083	0,1916	0,7367	0,5276	1,398	0,5815
8	0,96	0,402	0,9967	0,9925	2,247	1,065

Tableau 9 : Moyennes des indurations pour les souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA445et LIPA 445R.

SEMAINES	LIPA445		LIPA 445R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
3	0,3217	0,2567	0,455	0,1202	0,246	0,04722
4	0,48	0,2628	0,7817	0,5655	0,665	0,2759
5	1,308	0,5756	1,165	0,7235	1,545	0,7208
6	1,347	0,5876	1,27	0,4819	0,7967	0,6582
7	1,708	0,4674	1,362	0,4751	1,398	0,5815
8	1,478	0,5561	1,668	0,6653	2,247	1,065

Tableau 10 : Mesures des lésions de l'oreille gauche des souris infectées en fonction du temps post infection.

Semaines	Lésions						
	LIPA 339	LIPA 339R	LIPA 443	LIPA 443R	LIPA 445	LIPA 445R	LIPA 100
S1	/	/	/	/	/	/	/
S2	/	/	/	/	/	/	/
S3	/	/	/	/	/	/	/
S4	2.68	/	/	0.97 0.7	1.99	2.32	0.99
S5	2.46 3.49	/	/	0.68	0.63 2.82 2.42	1.89 2.63	1.94 2.5 2.14 2.42
S6	3.79 2.8 1.83 4.97 4.29 1	3,79 2,8 1,83 4,97 4,29 2,54	0.8 0.6 0.9	0.98	2.47 2.8 0.95	2.94 1 2.84 1.65 1.77	2.155 2.145 2.275 2.28 2.055
S7	3,36 4,635 4,02 3,39 5,02 5,34	1,745 2,53 1,82	1,5 1,02 1	1,5	4,085 2,675 3,08 2,55	4,25 2,635 3,29 2,79 2,13	1,85 2,07 1,51 2,07 3,13
S8	3,56 2,655 4,665 4,465 4,115 3,085	1,315 1,995 2,245 3,26	3,49 2,085 1,515 2,41	2,835 3,1	3,52 2,045 1,72 4,155 3,25	3,68 3,675 2,79 4,735 3,93	2,9 4,975 2,84 2,6 1,28

Tableau 11 : Moyennes des lésions de l'oreille gauche des souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA339et LIPA 339R.

Semaines	LIPA339		LIPA 339R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
4	2,68	0	/	/	0,99	0
5	2,975	0,7283	/	/	2,25	0,2579
6	3,37	1,181	1,75	0,2989	2,182	0,0955
7	4,294	0,8369	2,032	0,4332	2,126	0,6062
8	3,758	0,7948	2,204	0,8064	2,919	1,325

Tableau 12 : Moyennes des lésions de l'oreille gauche des souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA 443 et LIPA 443R.

Semaine	LIPA443		LIPA 443R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
4			0,835	0,1909	0,99	0
5			0,68	0	2,25	0,2579
6	0,7667	0,1528	0,98	0	2,182	0,0955
7	1,1730	0,2831	1,5	0	2,126	0,6062
8	2,375	0,8303	2,968	0,1874	2,919	1,325

Tableau 13 : Moyennes des lésions de l'oreille gauche des souris infestées par les souches LIPA 100, LIPA 445 et LIPA 445R.

Semaine	LIPA445		LIPA 445R		LIPA 100	
	M	SD	M	SD	M	SD
4	1,99	0	2,32	0	0,99	0
5	1,957	1,166	2,26	0,5233	2,25	0,2579
6	2,073	0,9867	2,04	0,8302	2,182	0,0955
7	3,098	0,6961	3,019	0,803	2,126	0,6062
8	2,938	1,024	3,762	0,6953	2,919	1,325

III.2. Résultats de l'examen direct

Tableau 14 : Charge parasitaire par 100 macrophages dans les oreilles des souris infestées pour les différentes souches

LIPA 100	LIPA 339	LIPA 339R	LIPA 443	LIPA 443R	LIPA 445	LIPA 445R
1273	3600	2021	3914	5510	3635	3341
537	3383	4710	1550	511	2004	4988
1051	3590	2966	3763	881	4456	7427
762	6115	2088	4950	4080	6996	5600
587		2454	3439	/	6668	/

Tableau 15 : Moyenne de la Charge parasitaire par 100 macrophages dans les oreilles des souris infestées

Souches	moyenne	SD
LIPA 100	842	313,8
LIPA 339	4172	1299
LIPA 339R	2848	1107
LIPA 443	3523	1240
LIPA 443R	2746	2442
LIPA 445	4752	2097
LIPA 445R	5339	1688

III.3. Poids des rates**Tableau16** : Les poids des rates des souris infestées et des témoins négatifs

Souche	Témoins négatifs	100	339	339R	443	443R	445	445R
Le poids des rates (gr)	0,126	0,165	0,182	0,144	0,133	0,173	0,125	0,156
	0,132	0,135	0,15	0,122	0,135	0,137	0,111	0,163
	0,158	0,165	0,162	0,15	0,163	0,172	0,141	0,144
	0,106	0,128	0,126	0,124	0,147	0,175	0,113	0,15
	0,158	0,165	0,17	0,114	0,158	0,16	0,143	0,129

Tableau17: Moyennes des poids des rates des souris infestées et des témoins négatifs.

Souches	Moyennes	SD
Témoins	0,136	0,02227
LIPA 100	0,1516	0,01851
LIPA339	0,158	0,02135
LIPA339R	0,1308	0,0154
LIPA 443	0,1472	0,01339
LIPA 443R	0,1634	0,01588
LIPA 445	0,1266	0,01506
LIPA 445R	0,1484	0,01293

Tableau 18 : Test de Tukey pour les poids des rates.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0,05?	95% CI of diff.
temoin rate vs 100 rate	-0,0156	2,032	No	-0,05081 to 0,01961
temoin rate vs 339 rate	-0,022	2,866	No	-0,05721 to 0,01321
temoin rate vs 339R rate	0,0052	0,6773	No	-0,03001 to 0,04041
temoin rate vs 443 rate	-0,0112	1,459	No	-0,04641 to 0,02401
temoin rate vs 443R rate	-0,0274	3,569	No	-0,06261 to 0,007806
temoin rate vs 445 rate	0,0094	1,224	No	-0,02581 to 0,04461
temoin rate vs 445R rate	-0,0124	1,615	No	-0,04761 to 0,02281
100 rate vs 339 rate	-0,0064	0,8336	No	-0,04161 to 0,02881
100 rate vs 339R rate	0,0208	2,709	No	-0,01441 to 0,05601
100 rate vs 443 rate	0,0044	0,5731	No	-0,03081 to 0,03961
100 rate vs 443R rate	-0,0118	1,537	No	-0,04701 to 0,02341
100 rate vs 445 rate	0,025	3,256	No	-0,01021 to 0,06021
100 rate vs 445R rate	0,0032	0,4168	No	-0,03201 to 0,03841
339 rate vs 339R rate	0,0272	3,543	No	-0,008006 to 0,06241
339 rate vs 443 rate	0,0108	1,407	No	-0,02441 to 0,04601
339 rate vs 443R rate	-0,0054	0,7034	No	-0,04061 to 0,02981
339 rate vs 445 rate	0,0314	4,09	No	-0,003806 to 0,06661
339 rate vs 445R rate	0,0096	1,25	No	-0,02561 to 0,04481
339R rate vs 443 rate	-0,0164	2,136	No	-0,05161 to 0,01881
339R rate vs 443R rate	-0,0326	4,246	No	-0,06781 to 0,002606
339R rate vs 445 rate	0,0042	0,5471	No	-0,03101 to 0,03941
339R rate vs 445R rate	-0,0176	2,292	No	-0,05281 to 0,01761
443 rate vs 443R rate	-0,0162	2,11	No	-0,05141 to 0,01901
443 rate vs 445 rate	0,0206	2,683	No	-0,01461 to 0,05581
443 rate vs 445R rate	-0,0012	0,1563	No	-0,03641 to 0,03401
443R rate vs 445 rate	0,0368	4,793	Yes	0,001594 to 0,07201
443R rate vs 445R rate	0,015	1,954	No	-0,02021 to 0,05021
445 rate vs 445R rate	-0,0218	2,84	No	-0,05701 to 0,01341

III.4. Résultats électrophorèse

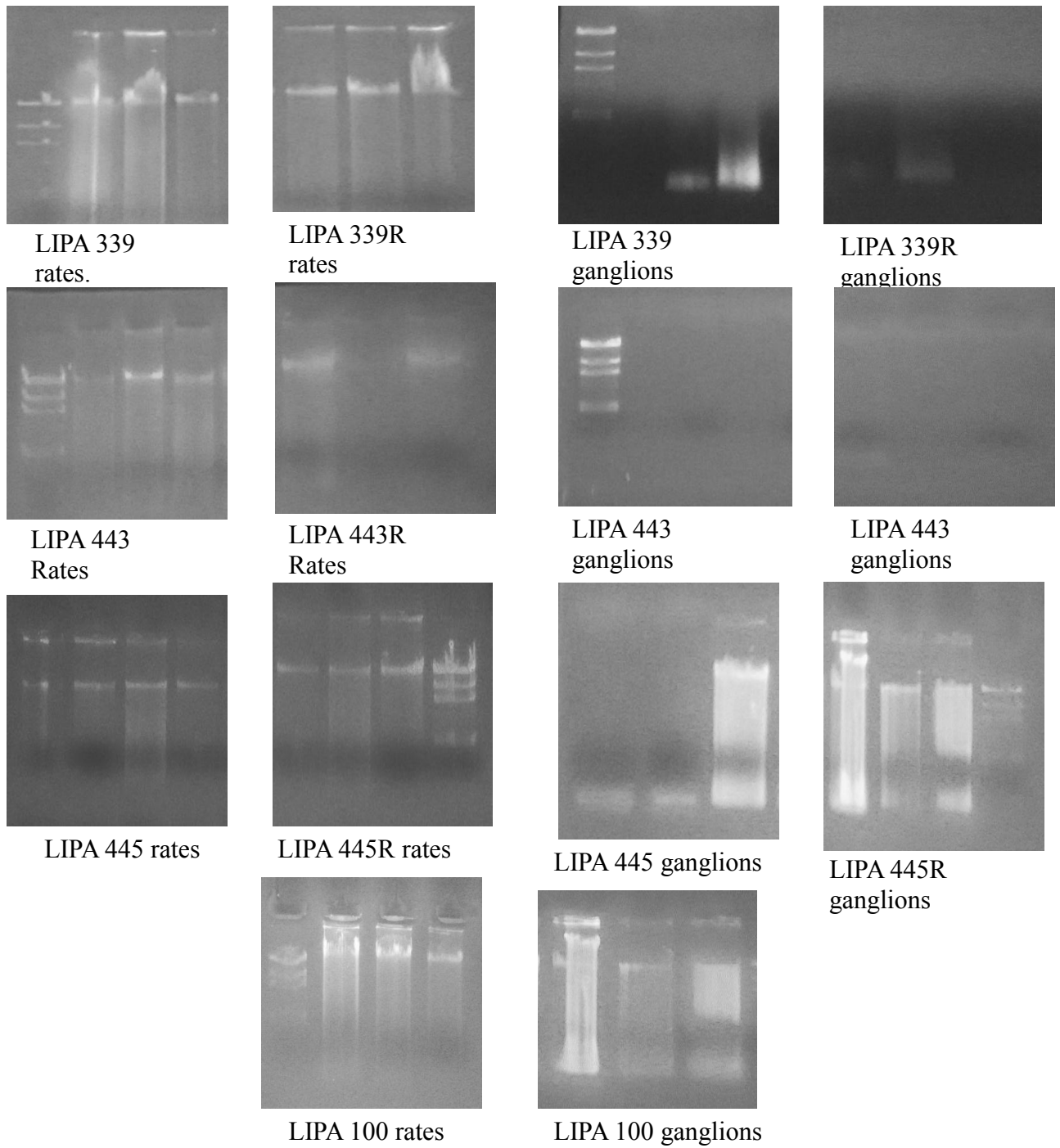


Figure 1 : Résultats des électrophorèses sur gèle d'agarose.

III.5. Résultats NanoDrop

Tableau 19 : Résultats obtenus par NanoDrop

Les échantillons		DO 260/280	DO 260/230	Concentration
La souche	L'organe d'extraction			
LIPA 339	Rate1	2	2	1056.97
LIPA 339	Rate3	2	2	1377
LIPA 339	Rate5	2	2	370
LIPA 339	Rate7	2.0	2.3	1322.97
LIPA 339	Rate 9	2.0	2.23	1924
LIPA 339R	Rate11	2.08	2.189	387.75
LIPA 339R	Rate13	2.04	2.18	801.95
LIPA 339R	Rate15	2.02	2.13	854.19
LIPA 339R	Rate17	2.0	2.27	1395
LIPA 339R	Rate19	2.0	2.132	2059.75
LIPA 443	Rate31	2.02	2.22	761.61
LIPA 443	Rate33	2.04	2.05	1250.54
LIPA 443	Rate35	2.05	2.26	1095.47
LIPA 443	Rate37	2.0	2.1	2119.7
LIPA 443	Rate39	2.0	2.1	554
LIPA 443R	Rate41	2.104	2.08	1563.65
LIPA 443R	Rate43	2.10	2.13	318.53
LIPA 443R	Rate45	2.16	1.8	1175.83
LIPA 443R	Rate47	1.6	1.58	2381.4
LIPA 443R	Rate49	2.0	2.18	1876
LIPA 100	Rate61	2.02	2.18	1331.01
LIPA 100	Rate63	1.959	2.18	2117.01
LIPA 100	Rate65	1.91	2.2	1154.23
LIPA 100	Rate67	1.9	1.99	2162
LIPA 100	Rate69	1.77	1.72	2309
LIPA 445	Rate86	2.04	2.132	947.10
LIPA 445	Rate88	1.89	2.2	1019.46
LIPA 445	Rate90	2	2.09	2068.18
LIPA 445	Rate92	2.0	2.2	1910
LIPA 445	Rate94	1.89	1.939	2168
LIPA 445R	Rate96	2.06	2.25	642.06
LIPA 445R	Rate98	2.065	2.25	1560.77
LIPA 445R	Rate100	1.85	2.052	2235.78
LIPA 445R	Rate102	2.0	2.2	1724.47
LIPA 445R	Rate104	1.99	2.084	2117
LIPA 339	Gg21	2.2	1.3	9.09
LIPA 339	GG 22	2.08	2.05	1698.5
LIPA 339	GG23	2.03	2.08	2038.76
LIPA 339	GG24	2.4	2.2	254
LIPA 339	GG25	1.4	2.0	72.09
LIPA 339R	GG26	2.2	2.137	273.65
LIPA 339R	GG27	2.06	2.23	512.31
LIPA 339R	GG28	1.45	1.8	38.30

LIPA 339R	GG29	2.0	2.2	1785
LIPA 339R	GG30	2.1	2.23	1103.7
LIPA 443	GG51	2.34	2.13	90.38
LIPA 443	GG52	1.58	1.48	34.22
LIPA 443	GG53	1.906	1.947	2183.96
LIPA 443	GG54	2.2	2.22	329
LIPA 443	GG55	2.0	2.11	1976
LIPA 443R	GG56	2.243	2.2	310.62
LIPA 443R	GG57	1.869	1.19	8.2
LIPA 443R	GG58	2.4	2.239	75.04
LIPA 443R	GG59	2.3	2.3	43.89
LIPA 443R	GG60	2.0	2.2	494.51
LIPA 100	GG81	2.002	1.049	5.83
LIPA 100	GG82	2.820	0.907	13.17
LIPA 100	GG83	2.195	1.8	182.55
LIPA 100	GG84	2	2.2	769
LIPA 100	GG85	1.93	2.0	2160
LIPA 445	GG106	2.476	2.127	231.96
LIPA 445	GG 107	2.280	2.138	389.76
LIPA 445	GG108	2.010	2.208	1661.51
LIPA 445	GG109	2.7	2.25	17.36
LIPA 445	GG110	1.84	1.84	2236
LIPA 445R	GG111	2.00	2.073	2109.55
LIPA 445R	GG112	2.117	2.291	721.64
LIPA 445R	GG113	2.09	2.191	1629.66
LIPA 445R	GG114	-3	103	4
LIPA 445R	GG115	2.2	2.3	460

Tableau 20 : La moyenne des ratio obtenus pour les ganglions :

	260/230		260/280	
	M	SD	M	SD
339	1,926	0,3576	2,022	0,3758
339R	2,119	0,1825	1,962	0,2953
443	1,977	0,295	2,005	0,2918
443R	2,026	0,469	2,162	0,2204
100	1,591	0,5795	2,189	0,366
445	2,113	0,1606	2,261	0,3462
445R	22,37	45,07	1,081	2,283

Tableau 21 : La moyenne des ratios obtenue pour les rates :

	260/230		260/280	
	M	SD	M	SD
339	2,106	0,1472	2	0
339r	2,18	0,05698	2,028	0,03347
443	2,146	0,08933	2,022	0,0228
443r	1,954	0,2557	1,993	0,227
100	2,054	0,2054	1,912	0,09245
445	2,112	0,1076	1,964	0,0695
445r	2,167	0,09352	1,993	0,08686

Tableau 22 : La comparaison de la moyenne des concentrations d'ADN totale :

Souches	Organes	Rates	Ganglions
339		1210,188	814,488
339R		1099,728	742,592
443		1156,264	922,712
443R		1463,082	186,452
100		1814,65	626,11
445		1622,548	907,318
445R		1656,016	984,97

III.6. Résultat PCR quantitative

Tableau 23 : Charge parasitaire quantifie les ganglions des souris infestées obtenues par QPCR

	Ganglions		
	Ct	Log concentration	Concentration (parasite/ganglions)
LIPA339	16,9	8,72659176	532833793
	17,45	8,52059925	331588340
LIPA 339R	35	1,94756554	88,6268968
	35	1,94756554	88,6268968
	35	1,94756554	88,6268968
LIPA 443	35	1,94756554	88,6268968
	35	1,94756554	88,6268968
LIPA 443R	35	1,94756554	88,6268968
	35	1,94756554	88,6268968
LIPA100	32,93	2,72284644	528,258437
	32,68	2,8164794	655,3592
LIPA 445	17,71	8,42322097	264984807
	17,04	8,6741573	472234056
LIPA 445R	16,61	8,83520599	684236114
	17,84	8,37453184	236881877

Tableau 24 : Charge parasitaire quantifiée des rates des souris infester obtenues par QPCR

	RATES			
	Ct	Log concentration	Concentration (parasite/10mg de rate)	Concentration (parasite/rate)
LIPA 339	35	1,94756554	88,6268968	1613,00952
	35	1,94756554	88,6268968	1329,40345
	35	1,94756554	88,6268968	1435,75573
	35	1,94756554	88,6268968	1116,6989
LIPA339R	35	1,94756554	88,6268968	1276,22731
	35	1,94756554	88,6268968	1081,24814
	35	1,94756554	88,6268968	1329,40345
LIPA 443	19,6	7,71535581	51922525,1	700954089
	15,93	9,08988764	1229950520	2,0048X10 ¹⁰
LIPA 443R	15,66	9,19101124	1552427173	2,6857X10 ¹⁰
LIPA 100	16,14	9,01123596	1026209321	1,6932X10 ¹⁰
	15,94	9,08614232	1219389138	1,6462X10 ¹⁰
	29,84	3,88014981	7588,39296	125208,484
	31,41	3,29213483	1959,45291	25080,9973
LIPA 445	15,51	9,24719101	1766814730	1,9965X10 ¹⁰
	14,11	9,77153558	5909293768	8,4503X10 ¹⁰
LIPA445R	16,5	8,87640449	752323269	1,0833X10 ¹⁰
	15,43	9,27715356	1893012833	2,8395X10 ¹⁰
	17,22	8,60674157	404335220	5215924343

Tableau 25 : Moyennes de la charge parasitaire dans les ganglions et les rates.

	RATES		GG	
	MOYENNE	SD	MOYENNE	SD
339	88,63	0	$2,161 \times 10^8$	262700000
339R	88,63	0	88,63	0
443	$2,564 \times 10^8$	544700000	88,63	0
443R	$3,105 \times 10^8$	694300000	88,63	0
100	$4,491 \times 10^8$	618800000	340,2	295,1
445	$1,535 \times 10^9$	2562000000	$1,843 \times 10^8$	229000000
445R	$6,099 \times 10^8$	783100000	$2,303 \times 10^8$	322600000

Application de la QPCR dans l'étude de la charge parasitaire au cours de la résistance au traitement à la leishmaniose cutanée.

Résumé : Afin de caractériser la relation entre les différentes modalités de traitement au cours de la leishmaniose cutanée et la virulence des souches de *Leishmania*, nous avons étudié les phénotypes externes et internes des souris infectées par six souches isolées de trois malades atteints de LC, avant et après traitement. Le modèle utilisé pour notre étude est la souris BALB/c.

À partir d'une culture de ces 6 souches de *Leishmania major* arrivée en phase stationnaire, un enrichissement en promastigotes métacycliques a été effectué par la méthode de gradient de Ficoll. Mille parasites ont été injectés par voie intradermique au centre de la face interne du derme de l'oreille chez 48 souris femelles BALB/c. Les souris ont été monitorées pendant sept semaines. La présence des lésions est vérifiée et les poids des souris mesurés. À la 8^{ème} semaine, les souris sont sacrifiées. La charge parasitaire a été évaluée dans les ganglions lymphatiques et la rate. L'ADN a été extraits par phénol chloroformes des tissus prélevés (rates et ganglions). Une PCR quantitative en temps réel a été réalisée par un LightCycler® 480 en utilisant les amorces JW11 et JW12.

Ce travail, fondé sur la quantification par PCR en temps réel (PCRq) de l'ADN kinétoplastique (ADNk) du parasite dans la rate et les ganglions, a permis de montrer que l'intensité de la charge parasitaire, ainsi que la dissémination des parasites, ne sont pas liées aux modalités de traitement, mais plutôt au caractère virulent de la souche.

Mots clé : leishmaniose cutanée ; virulence ; *Leishmania major* ; promastigotes ; métacycliques ; PCR en temps réel ; ADN kinétoplastique.

Application of PCR in studying the parasite load during treatment resistance to cutaneous leishmaniasis.

Summary: To characterize the relationship between the different treatment modalities in cutaneous leishmaniasis and virulence of *Leishmania* strains, we studied the external and internal phenotypes of mice infected by 6 strains isolated from 3 CL patients before and after treatment. The model used for this study is the BALB/c mice.

From a culture of these 6 strains of *Leishmania major* at stationary phase, enrichment by metacyclic promastigotes was done using the Ficoll gradient method. A thousand parasites were injected intradermally in the center of the internal face of the ear dermis of 48 BALB/c female.

Mice were monitored for seven weeks. The presence of lesions was checked, and the change in their weight measured. At the 8th week, the mice were sacrificed. The parasite burden of *Leishmania* in lymph nodes and spleen was performed after tissues lysis and DNA extracting by phenol chloroforms. The quantitative real-time PCR was achieved by using LightCycler® 480 and JW11, JW12 primers.

This work, based on quantification by real-time PCR (qPCR) of parasite kDNA in spleen and lymph nodes, has shown that the intensity of the parasitic load and the spread of the infection are not related to the treatment modalities, but rather to the strain virulent character.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; virulence; *Leishmania major*; promastigotes; metacyclic ;real-time PCR; kADN.