

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou  
Faculté des sciences Biologiques et Agronomiques



## THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat  
En Sciences Biologiques  
Option : BIOCHIMIE

## THEME

**Etude de la chimiorésistance aux antimoniés chez *Leishmania* en  
Algérie : Validation des tests *in vitro* et Développement de  
marqueurs moléculaires**

Présenté par

**Mme EDDAIKRA LAAMA Naouel**

Soutenu le : 27/06/2016

Devant le Jury

Pr. BOUKHAMZA Mohamed	Président	Professeur à l'UMMTO
Dr. AIT OUDHIA Khatima	Directrice de Thèse	Maître de Conférences A Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Pr. MOULTI-MATI Farida	Co-directrice	Professeur à l'UMMTO
Pr. ACHOUR Nassima	Examinatrice	Maitre de conférences A à l'UMMTO
Dr GHALMI Farida	Examinatrice	Maître de Conférences A Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Dr. BITAM Idir	Examineur	Maître de Conférences A Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger
Dr SERENO Denis	Invité	Maitre de recherche IRD Montpellier

*A ma chère Maman  
qui nous a quitté trop tôt*

## Remerciements

Je remercie le Professeur BOUKHEMZA Mohamed de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse, qu'il puisse trouver ici l'expression de ma considération.

Je remercie le Dr AIT OUDHIA Khatima Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse et de m'avoir soutenu, aidé et encouragé tout au long de ces cinq années. Je lui témoigne toute ma reconnaissance.

Toute ma gratitude va à Mme MOULTI MATI Farida, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour avoir codirigé ce travail, pour ces précieux conseils, son aide et la rigueur dont elle a fait preuve. Merci pour votre soutien, votre écoute et votre disponibilité.

Tous mes remerciements vont à Mme ACHOUR Nassima Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner cette thèse.

Mes plus vifs remerciements au Dr BITAM Idir Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, pour avoir bien voulu m'accorder de son temps pour examiner ce travail

Je remercie aussi le Dr GHALMI Farida, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, et j'exprime toute ma gratitude pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.

A notre invité le Dr SERENO Denis, Maître de Recherche à l'Institut de Recherche et de Développement de Montpellier, j'adresse mes plus vifs remerciements, et ma profonde gratitude, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir codirigé, conseillé, aidé, et ouvert l'esprit sur toutes les facettes de ce travail de recherche. J'ai énormément appris en travaillant à ses côtés et nos discussions ont toujours été très enrichissantes. Il m'a permis d'obtenir la Bourse BEST de l'IRD qui a financé les séjours de pratique effectués à l'IRD, me permettant de faire aboutir ce travail de thèse, qu'il soit le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

Je remercie aussi le Dr OURY Bruno, Chargé de Recherche à l'Institut de Recherche et de Développement de Montpellier, pour m'avoir soutenu et aidé tout au long de mes séjours dans le laboratoire de l'équipe MIVEGEC de l'IRD de Montpellier.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude à Mr Didier FONTENILLE pour m'avoir accueillie dans l'équipe MIVEGEC et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

Au Dr HARRAT Zoubir, Directeur de Recherche et chef du laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire à l'Institut Pasteur d'Algérie, j'exprime toute ma reconnaissance pour ces encouragements, son soutien, et sa précieuse aide, qui a permis à ce travail d'aboutir.

Merci au Professeur MATI de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour son aide inestimable et ces précieux conseils.

Je remercie mon amie et sœur Mme BENIKHLEF Razika, Chercheur Biologiste au laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire à l'Institut Pasteur d'Algérie, pour m'avoir aidé, soutenue et encouragé, et pour sa précieuse collaboration à ce travail de thèse. Je lui souhaite le prix NOBEL.

Mes plus chaleureux remerciements vont à ma très chère amie Mme KHERACHI Ihcène Chercheur Biologiste au laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire à l'Institut Pasteur d'Algérie, pour sa précieuse aide, sa présence et ces conseils.

A toute l'équipe du Laboratoire d'Ecoépidémiologie Parasitaire pour leur aide, leur soutien et leurs encouragements, plus particulièrement à nos Chercheurs Biologistes : Merci à tous, A Mr GARNI Rafik, Melle BENBETKA Sihem, Mr BENALLAL Kamel, Mme BENCHRIFA Souad, Mr BOUIBA Lazhari, Mme MEZAI Ghania, Mr CHEBLI Adlane, et à Mounir

Je ne remercierai jamais assez ma famille : mon frère Abdelbari, mes sœurs Atika et Khaoula et particulièrement mon papa. Merci infiniment pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance sans faille. Vous m'avez toujours encouragée dans mes choix : je vous dois en grande partie d'en être là aujourd'hui.

Merci à ma très chère tante Batoul et à mes oncles Khaldi et Hmida ; et à mes cousins Djamel, Amine, Hamza et Fatma Zohra

J'adresse mes sentiments d'amitié les plus sincères à mes chères amies, Rachida, Fatima et Hayate, qui ont toujours été présentes et m'ont accompagnées durant toutes ces années.

A mon cher et tendre époux, pour sa patience, son soutien et ces encouragements : Merci à toi Abdelkrim. Tu m'as redonné confiance dans les moments de doute, l'envie et le moral dans les moments de découragement.

Et enfin, un grand Merci à mes chères petites princesses Kaouther Adila et Maroua Ihcène pour m'avoir éclairées et réconfortées tout au long de ces années de labeur.

# Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale

## 1<sup>ère</sup> Partie : Synthèse bibliographique

INTRODUCTION GENERALE .....	15
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	2
1. Le parasite <i>Leishmania</i> .....	3
1.1. Biologie du parasite .....	3
1.2. Génome de <i>Leishmania</i> .....	5
1.2.1. L'ADN nucléaire .....	5
1.2.2. L'ADN kinétoplastique .....	5
1.3. Morphologie du parasite et cycle évolutif .....	6
1.3.1. La forme extracellulaire promastigote .....	6
1.3.2. La forme intracellulaire amastigote .....	8
1.3.3. Vecteur .....	8
1.3.4. Réservoir .....	8
1.3.5. Cycle évolutif du parasite et transmission .....	10
1.4. Classification et Répartition géographique de <i>Leishmania</i> .....	10
1.5. Approches moléculaires dans l'étude l'épidémiologie et la génétique des populations de <i>Leishmania</i> .....	11
2. La Leishmaniose .....	12
2.1. Les Manifestations cliniques .....	12
2.1.1. Leishmaniose asymptomatique .....	15
2.1.2. Leishmaniose cutanée .....	15
2.1.3. Leishmaniose muco-cutanée .....	17
2.1.4. Leishmaniose viscérale .....	17
2.2. Les composants épidémiologiques de la leishmaniose en Algérie .....	18
2.2.1. Leishmaniose viscérale et cutanée humaine en Algérie .....	19
2.2.2. La leishmaniose canine en Algérie .....	22
2.2.3. Epidémiologie de la leishmaniose dans les pays voisins de l'Algérie .....	23
2.3. Diagnostic .....	24
2.4. Vaccins .....	25
2.5. Traitements .....	25
2.5.1. L'antimoine .....	26
2.5.2. Amphotéricine B .....	27
2.5.2.1. Les formulations lipidiques de l'Amphotéricine B .....	28
2.5.3. La Miltefosine .....	28
2.5.4. La Paromomycine .....	28
2.5.5. La Pentamidine .....	29
2.6. Contrôle et prévention .....	29
3. Mode d'action et Mécanismes de résistance aux drogues .....	30

3.1.	L'Antimoine .....	30
3.2.	Amphotéricine B .....	31
3.1.	La Pentamidine .....	33
3.2.	La Miltefosine.....	33
3.3.	La paromycine .....	33
4.	La réponse immunitaire de <i>Leishmania</i> : mécanisme de contrôle parasitaire et d'évasion .....	34
4.1.	Inoculation des parasites et apoptose.....	34
4.2.	Evasion au système du complément. ....	34
4.3.	Modulation de l'apoptose des neutrophiles et la stratégie du cheval de Troie....	34
4.4.	Mécanismes de survie dans le phagosome et le phagolysosome .....	35
4.4.1.	Les différents types de macrophage. ....	35
4.4.2.	Phagocytose par les macrophages et fusion phagosomes – lysosomes.....	37
4.4.3.	La différenciation intracellulaire des promastigotes en amastigotes .....	37
4.5.	Implication de virus de <i>Leishmania</i> dans la sévérité de l'infection. ....	39
5.	Modèles murins de la leishmaniose.....	39
5.1.	Modèle de la LC.....	39
5.1.1.	Le patrimoine génétique des souris .....	40
5.1.2.	Le contrôle immunitaire de l'infection .....	40
5.1.3.	Le génotype parasitaire .....	41
5.1.4.	La dose parasitaire.....	41
5.1.5.	Le site d'inoculation.....	41
5.1.6.	Influence de la salive du phlébotome .....	43
5.2.	Modèle de la LV .....	43
5.2.1.	Le patrimoine génétique de la souris .....	43
5.2.2.	Le contrôle immunitaire de l'infection .....	43
5.2.3.	L'origine du tissu et le génotype parasitaire .....	44
5.2.4.	La voie d'inoculation et la dose parasitaire .....	44
5.2.5.	La salive du phlébotome.....	45

## 2<sup>ème</sup> Partie : Partie Expérimentale

1.	MATERIEL ET METHODES .....	46
1.1.	Matériel.....	46
1.1.1.	Souches.....	46
1.1.2.	Animaux.....	47
1.2.	Méthodes .....	48
1.2.1.	Etude de l'Epidémiologie de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie 48	
1.2.2.	Culture des promastigotes <i>in vitro</i> .....	48
1.2.3.	Décongélation des souches .....	48
1.2.4.	Clonage sur milieu LIT .....	48
1.2.5.	Dynamique de croissance des souches cutanées <i>in vitro</i> .....	49
1.2.6.	Caractérisation isoenzymatique des souches de <i>Leishmania</i> étudiées .....	49
1.2.7.	Caractérisation moléculaire des souches étudiées : PCR RFLP .....	50
1.2.8.	Etude de la sensibilité de <i>Leishmania</i> à l'antimoine <i>in vitro</i> .....	51
1.2.8.1.	1.2.8.1. Sensibilité des formes promastigotes .....	51

1.2.8.2.	Sensibilité des formes amastigotes : Test d'infection intra-macrophagique à partir de promastigotes .....	52
1.2.9.	Détermination du Cutoff (seuil de sensibilité) .....	53
1.2.10.	Etudes des marqueurs de résistance à l'antimoine sur un modèle murin (la souris BALB/c).....	53
1.2.10.1.	Infestation <i>in vivo</i> et suivi.....	53
1.2.10.2.	Traitement .....	54
1.2.10.3.	Evolution de l'infection (charge parasitaire) .....	54
1.2.11.	Caractérisation de l'infection par des souches de <i>Leishmania major</i> susceptible à l'antimoine <i>in vitro</i> .....	55
1.2.12.	Caractérisation de l'infection par des souches de <i>Leishmania major</i> naturellement résistantes à l'antimoine .....	57
1.2.13.	Mise au point d'un modèle pharmacologique de <i>L. killicki</i> .....	58
1.2.14.	Analyse statistique .....	59
2.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	60
2.1.	Evolution de la susceptibilité à l'antimoine en fonction de la situation épidémiologique de la leishmaniose en Algérie .....	60
2.1.1.	Mise à jour des données épidémiologiques de la leishmaniose passées et actuelles.....	60
2.1.1.1.	Résultats de l'analyse de 30 ans de données Epidémiologique sur la leishmaniose en Algérie .....	61
2.1.2.	Résultats de la susceptibilité des souches à l'antimoine .....	65
2.1.2.1.	La détermination du Cutoff (seuil de susceptibilité) .....	65
2.1.2.2.	Evaluation du temps d'incubation des formes promastigotes .....	66
2.1.2.3.	Résultats de la susceptibilité à l'antimoine selon les espèces de <i>Leishmania</i> et la forme clinique .....	67
2.1.2.4.	La susceptibilité spatiotemporelle à l'antimoine sur 3 décennies.....	69
2.1.2.5.	L'analyse épidémiologique de la susceptibilité à l'antimoine en fonction du profil isoenzymatique : comparaison de 2 foyers Algérien et Français. ....	70
2.1.3.	Discussion .....	71
2.2.	Etude des marqueurs de résistance à l'antimoine sur un modèle murin : la souris BALB/c .....	78
2.2.1.	Résultats de l'étude de la dynamique de croissance des souches cutanées <i>in vitro</i> .....	78
2.2.2.	Caractérisation de l'infection des souris BALB/c par des souches de <i>Leishmania major</i> susceptible à l'antimoine <i>in vitro</i> .....	81
2.2.2.1.	Phénotype externe .....	81
2.2.2.2.	Phénotype interne .....	86
2.2.2.3.	Discussion .....	89
2.2.3.	Caractérisation de l'infection par des souches de <i>Leishmania major</i> naturellement résistante à l'antimoine .....	94
2.2.4.	Développement d'un modèle animal de leishmaniose cutanée à <i>Leishmania killicki</i> et son application en pharmacologie expérimentale.....	100
2.2.4.1.	Discussion .....	107
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	109
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
	ANNEXES	

## RÉSUMÉ

Les leishmanioses sont un groupe de maladies à transmission vectorielle responsables de problèmes de santé publique dans de nombreuses régions endémiques dans le monde. L'arsenal thérapeutique étant relativement réduit, les antimoniés constituent le traitement de première intention dans la plupart des pays dont l'Algérie. De nombreux cas d'échec thérapeutique ont été décrits en Algérie faisant craindre une émergence de la résistance du parasite. Par conséquent, un besoin urgent d'informations sur l'état de la susceptibilité à l'antimoine des parasites et des souches de *Leishmania* en Algérie est obligatoire. Ces connaissances vont non seulement mettre la lumière sur l'apparition de la résistance à l'antimoine, mais aussi sur des facteurs sous-jacents de déclenchement de résistances naturelles dans les populations de *Leishmania*. Le but étant de permettre la mise en place d'un système de surveillance visant à diagnostiquer les souches résistantes à l'antimoine en Algérie.

Cette étude comprend deux grandes parties. Une première relative à l'évolution épidémiologique de la résistance à l'antimoine pendant 30 ans (1984-2013) à travers l'étude de 106 souches de *Leishmania major*, *L. infantum* et *L. killicki* isolées en Algérie comparées à un groupe de 20 souches de *L. infantum* isolées en France. La deuxième partie s'intéresse à l'étude des différents aspects de la résistance de *Leishmania* à l'antimoine sur un modèle murin génétiquement homogène. A cet effet, nous avons pu explorer différents facteurs qui régissent la susceptibilité à l'antimoine *in vitro* et *in vivo* à la recherche de marqueurs et qui pourraient permettre une surveillance efficace de la résistance à l'antimoine en Algérie.

De l'ensemble de nos résultats, ressort un fait important : la baisse de susceptibilité aux drogues. Cette apparition de résistance pourrait être un phénotype intrinsèque et/ou acquis. Nos résultats sur un large panel d'espèce nous ont permis d'établir et de valider un seuil IC50 à l'antimoine, déterminant un statut de susceptibilité des souches. Ce seuil pourrait être utilisé dans des études épidémiologiques à grande échelle dans un pays endémique tel que l'Algérie. Les résultats de susceptibilité des promastigotes à l'antimoine, en fonction des espèces et des formes cliniques, ont montré une grande variabilité, avec cependant une clusterisation en fonction des espèces.

L'étude de la sensibilité à l'antimoine chez la souris BALB/c, nous a permis de caractériser le phénotype de l'infection des souches de *L. major* sensibles et résistantes au SbV, *in vitro* et de présumer la virulence comme facteur sélectif de résistance ou de sensibilité au Glucantime. Cependant, les souches naturellement résistantes à l'antimoine ont exprimé un phénotype différent. L'étude de l'infection de *L. killicki*, a montré quant à elle un phénotype plus lent que *L. major* et qui nous a permis de mettre au point un modèle pharmacologique.

Mots clefs : *Leishmania*, Epidémiologie, antimoniés, résistance, modèle animal, BALB/c.

## Abstract

Leishmaniasis are a set of vector-borne parasitic diseases responsible for public health problem in several endemic areas. There is relatively small therapeutic arsenal and antimony are the first line treatment in most regions including Algeria. Cases of treatment failure have been reported in Algeria suggestive of emergence of parasite resistance. Therefore, an urgent need of knowledge on the state of susceptibility to pests and antimony *Leishmania* strains in Algeria are required. This knowledge will shed light not only on the appearance of an antimony resistance in this area, but also on the natural resistance triggering factors behind antimony in populations of *Leishmania*. The goal is the establishment of a protocol in public health policy, for the diagnosis of strains resistant to antimony in Algeria.

Our study has two main parts. A first on the Epidemiological evolution of antimony resistance in 30 years through the study of 106 *Leishmania major* strain, *L. infantum* and *L. killicki* isolated in Algeria, we have an out-group of 20 *L. infantum* strains isolated in France. In the second part, we studied different aspects of the resistance of *Leishmania* to antimony in a mouse model that is genetically homogeneous. Through this study, we were able to explore the different factors governing antimony susceptibility *in vitro* and *in vivo*, looking for markers that would allow effective monitoring of antimony resistance in Algeria.

From all of our results, spring one important fact: the decline in susceptibility to drugs and the emergence of resistance that could be an intrinsic and/or acquired phenotype. Our results on a broad panel of species allowed us to validate the use of cutoff calculated antimony IC50, like a selection tool, which could be used in epidemiological studies on large scale in endemic countries such as Algeria. The results of promastigotes antimony susceptibility depending on the species and clinical forms between 1984 and 2013, showed great variability, but with a clustering according to species.

The study of sensitivity to antimony in a mouse model, BALB/c mice, allowed us to characterize the infection of SbV sensitive and resistant strains to *L. major in vitro* and presumed virulence as selective factor of resistance and sensitivity Glucantime. However, naturally resistant strains antimony, expressed a different phenotype. While the study of the resistance of *L. killicki* showed, a slower phenotype than *L. major* and allowed us to develop a pharmacological model.

Keys words: *Leishmania*, Epidemiology, antimony, resistance, animal model, BALB/c.

## Liste des figures

Figure 1: Chronologie des réalisations historiques les plus importantes dans la technologie du microscope et dans l'étude de <i>Leishmania</i> spp.	P4
Figure 2 : L'ADN kinétoplastique de <i>Leishmania</i> (Photographie par microscopie électronique)	P6
Figure 3: Morphologie et développement de la forme promastigote et amastigote de <i>Leishmania</i> .	P7
Figure 4 : Photo d'une femelle de <i>Phlebotomus papatasi</i> au cours du repas sanguin	P9
Figure 5 : Cycle évolutif de <i>Leishmania</i> spp.	P11
Figure 6 : Taxonomie du genre <i>Leishmania</i> basée sur le typage isoenzymatique (MLEE)	P14
Figure 7 : Différentes formes cliniques de la leishmaniose. (a) LC, (b) LMC, (c) LV.	P16
Figure 8 : Situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le Monde (WHO 2013)	P16
Figure 9 : Situation épidémiologique de la leishmaniose Viscérale dans le Monde (WHO 2013)	P18
Figure 10 : Représentation schématique des composants du cycle évolutif de la LC en Algérie	P20
Figure 11: Distribution de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie.	P21
Figure 12 : Evolution de la leishmaniose canine sur une période de 100 ans en Algérie	P22
Figure 13 : Polymorphisme enzymatique du complexe L. infantum humain et canin dans le bassin méditerranéen.	P23
Figure 14 : Formule chimique des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose.	P26
Figure 15 : Représentation schématique du mode d'action de l'antimoine	P32
Figure 16: Les mécanismes de résistance de <i>Leishmania</i> à l'Amphotéricine B.	P32
Figure 17 : Stratégie du cheval de Troie de l'infection par <i>Leishmania</i> de l'hôte mammifère	P36
Figure .18: L'Exosome de <i>Leishmania</i> cible la machinerie de signalisation de la cellule hôte pour créer un environnement pro-parasitaire anti-inflammatoire propice à l'invasion de <i>Leishmania</i> et la mise en place d'une infection.	P38
Figure 19 : Représentation schématique de la région ITS	P51
Figure 20 : Planning général de l'infection intramacrophagique	P53
Figure 21 : Schéma expérimental de la Caractérisation de l'infection par des souches de <i>Leishmania major</i> susceptible à l'antimoine <i>in vitro</i>	P56
Figure 22 : Schéma expérimental de la Mise au point du modèle pharmacologique de l'infection par <i>L. killicki</i> .	P59
Figure 23 : Distribution de l'Incidence et du nombre de cas total par décennie de la leishmaniose viscérale en Algérie	P62
Figure 24 : Evolution de l'incidence et du nombre de cas de la leishmaniose viscérale en Algérie de 1981 à 2013	P62
Figure 25 : Distribution de l'Incidence et du nombre de cas total par décennie de la leishmaniose cutanée en Algérie	P63
Figure 26 : Evolution de l'incidence et du nombre de cas de la leishmaniose cutanée en Algérie de 1981 à 2013	P63
Figure 27: Distribution du nombre de cas de LC et de LV par étage bioclimatique sur une période de 30 ans	P68
Figure 28: Détermination du seuil de susceptibilité des IC50 des Promastigotes au SbIII	P64
Figure 29: Droite de corrélation des IC50 entre les susceptibilités au SbIII et au SbV	P65
Figure 30 : Résultats de susceptibilité au SbIII des formes promastigotes pendant 24, 48 et 72 heures	P66
Figure 31 : Résultats de la susceptibilité à l'antimoine selon les espèces de <i>Leishmania</i> et la forme clinique	P66
Figure32 : Résultats de la susceptibilité à l'antimoine trivalent par étage bioclimatique de la leishmaniose en Algérie.	P68

Figure 33 : Résultats de l'Evolution de la susceptibilité à l'antimoine trivalent dans le temps sur 3 décennies	P70
Figure 34: Résultats de l'analyse épidémiologique de la susceptibilité à l'antimoine trivalent en fonction du profil isoenzymatique	P71
Figure 35: Comparaison de la susceptibilité à l'antimoine trivalent de deux foyers de leishmaniose à <i>L. infantum</i> MON 1 : Algérie et France.	P71
Figure 36 : Cinétique de croissance des souches de <i>L. major</i> selon leur sensibilité au SbIII	P79
Figure 37 : Evolution des indurations des oreilles des Balb/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.	P82
Figure 38 : Photos des indurations apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par (A) LIPA 100/09 à S6 et par (B) LIPA 175/11 à S5.	P82
Figure 39 : Evolution des rougeurs des oreilles des Balb/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.	P83
Figure 40 : Photos des rougeurs apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par (A) LIPA 100/09 à S6 et par (B) LIPA 175/11 à S5.	P83
Figure 41 : Evolution des lésions externes des oreilles des Balb/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.	P84
Figure 42 : Photos des lésions externes apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par (A) LIPA 100/09 à S6 et par (B) LIPA 175/11 à S5.	P84
Figure 43 : Evolution des lésions internes des oreilles des Balb/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.	P85
Figure 44: Photos des lésions internes apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par (A) LIPA 100/09 à S6 et par (B) LIPA 175/11 à S5.	P85
Figure 45 : Evolution de la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®	P86
Figure 46 : Evolution de la charge parasitaire dans les ganglions drainants des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.	P87
Figure 47 : Evolution des charges parasitaires dans les rates des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.	P88
Figure 48 : Evolution du poids des rates des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.	P89
Figure 49 : Résultats du Typage par PCR-RFLP	P95
Figure 50 : Capacité infectieuse <i>in vivo</i> des souches de <i>Leishmania major</i> chez la souris BALB/c.	P97
Figure 51 : Charge Parasitaire dans les oreilles des souris BALB/c.	P98
Figure 52 : Charge parasitaire <i>In vivo</i> dans les ganglions lymphatiques (A) et la rate (B) des souris of BALB/c.	P99
Figure 53 : Evolution Clinique des lésions d'oreilles de souris BALB/c	P101
Figure 54 : Evolution des lésions après infection des BALB/avec <i>Leishmania killicki</i> ou <i>Leishmania major</i> .	P102
Figure 55 : Charge parasitaire mesurée dans les oreilles de souris BALB/c infectées par <i>Leishmania killicki</i> ou <i>Leishmania major</i> .	P103
Figure 56: Effet du traitement par le Glucantime® sur les indurations des oreilles des souris infectées par <i>Leishmania major</i> (a) ou <i>Leishmania killicki</i> (b) et sur l'index des indurations (c)	P105
Figure 57 : Charge parasitaires suite au traitement par l'antimoine des oreilles souris infectées par <i>Leishmania major</i> (a) ou <i>Leishmania killicki</i> (b) et évolution de l'index de charge parasitaire (c)	P106

## Liste des tableaux

Tableau I : Les Vecteurs prouvés et suspectés de la leishmaniose dans l'ancien et le nouveau monde	P9
Tableau II : Questions épidémiologiques qui seront abordés par les outils de différenciation des espèces et des souches de <i>Leishmania</i>	P13
Tableau III : Influence du site d'inoculation sur la taille de la lésion et la réponse immunitaire au cours de la LC	P42
Tableau IV: les caractéristiques des 106 souches isolées à partir de prélèvement humains, canins, de rongeurs et de phlébotomes d'Algérie et de France	P47
Tableau V : Caractéristiques des souches de <i>L. major</i> étudiées <i>in vivo</i>	P55
Tableau VI : Répartition des lots de souris pour la caractérisation de la susceptibilité à l'antimoine de <i>L. major</i>	P56
Tableau VII : Caractéristiques des souches naturellement résistantes à l'antimoine	P57
Table VIII : Caractéristiques des souches isolées et de leurs typages	P95
Tableau IX: Résultats de la susceptibilité à l'antimoine des promastigotes et amastigotes intracellulaires	P96
Table X : Détection de l'ADN parasitaire de <i>L. major</i> et <i>L. killicki</i> dans divers tissus de la souris BALB/c.	P104

# Liste des Abréviations

ACR2 an homolog of the yeast arsenate reductase

AmpB: Amphotéricine B

AQP: Aquaporine

CD: cellule dendritique

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNRL :Centre national de référence leishmania

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

DO : Densité optique

F6P: Fructose 6 phosphate

i.p. : intrapéritonéale

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

IDO : Intra dermique oreille

IDO : Intra dermique oreille

IFN- $\gamma$  : Interféron  $\gamma$

IL: Interleukine

INF: Interferon

iNOS : NO synthase

INSP : institut national de santé publique

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

L. : *Leishmania*

L. Can : Leishmaniose canine

LC : Leishmaniose cutanée

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LCN : leishmaniose cutanée du nord

LCS : leishmaniose cutanée du sud

LCZ : leishmaniose cutanée zoonotique

LIPA : leishmania institut pasteur d'Algérie

LPG : Lipophosphoglycan

LT :lymphocyte T

LTH : lymphocyte T helper

LV : leishmaniose visceral

MGG : may-Grunewald giemsa

MLEE: Multilocus Enzyme Electrophoresis

ND: non défini

NNN :Novy Nicolle Mc Neal

NO : Monoxyde d'azote

OD : oreille droite

OG : oreille gauche

OMS : organisation mondiale de la santé

P. : Phlebotomus

PN : polynucléaires neutrophiles

PRMI : Roswell Park Memorial Institute

Rpm : tour par minute

SbIII : Antimoine trivalent

SbV : Antimoine pentavalent

SSG : Sodium stibogluconate

SVF : Sérum de veau fœtal

TDR1 Thiol Dependent Reductase

TGF-" : Transforming growth factor "

TNF : facteurs de nécroses tumorales

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

VP : Vacuole parasitophore

WHO : World Health Organisation

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les leishmanioses sont des parasitoses complexes provoquées par des protozoaires parasites du genre *Leishmania*. Le parasite *Leishmania* se multiplie en tant qu'amastigote intracellulaire dans le phagolysosome des macrophages des vertébrés. Il est transmis par la pique d'un phlébotome où il prolifère en tant que promastigote extracellulaire. Les manifestations cliniques des leishmanioses sont diverses. Elles vont de la leishmaniose cutanée (LC), cutanéomuqueuse qui sont plus ou moins mutilantes, à la maladie viscérale létale (LV). Ces différentes expressions de la maladie dépendent des espèces infectantes et de la réponse immunitaire de l'hôte.

Les leishmanioses sont largement répandues dans le monde. Dans de nombreux pays, l'augmentation des facteurs de risque font de cette protozoose un important problème de santé publique. Elles sévissent majoritairement en Amérique Latine, autour du bassin Méditerranéen, en Asie et au Moyen-Orient. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la maladie touche plus de 12 millions de personnes et induit entre 20 000 à 40 000 décès par an (ALVAR *et al.*, 2012). L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de la LC et de la LV. Plus de 21 000 cas de la forme cutanée ont été enregistré en 2010, avec un important impact sur la santé publique (REM, 2010)

Les moyens de lutte contre les leishmanioses humaines sont basés essentiellement sur l'administration d'agents chimiothérapeutiques chez les patients symptomatiques. A ce jour, il n'existe pas de vaccin efficace pour cette maladie et la chimiothérapie demeure la principale voie de traitement. Pour toutes les formes de leishmanioses, le traitement de première ligne est basé sur une drogue contenant de l'antimoine qui est le Glucantime®. Cette dernière a été développée au cours des années cinquante du siècle dernier, et est parfois inefficace et/ou inadapté. Ainsi, les dérivés de l'antimoine voient leur utilisation limitée dans plusieurs zones endémiques du fait des échecs thérapeutiques rencontrés.

Au cours de ces dernières années, de nombreux cas de résistance à l'antimoine pentavalent ont été rapportés (LIRA *et al.*, 1999). En Inde, plus de 65% des patients déjà traités ne répondent plus au traitement en raison de la résistance au traitement. (SUNDAR *et al.*, 2000 ; JHA 2006). De ce fait, l'OMS a fait de l'étude de la résistance de la leishmaniose aux drogues l'une de ces principales priorités. L'échec thérapeutique pendant le traitement de l'antimoine est un problème bien connu. La résistance de l'antimoine n'est pas le seul facteur qui conduit à l'échec thérapeutique. En effet, des facteurs qui sont liés à l'hôte (immunosuppression ou malnutrition), le médicament lui-même (lots ou contrefaçon des médicaments), les espèces de *Leishmania*, et même le praticien (traitement incomplet et manque de suivi), jouent également un rôle dans la résistance aux médicaments des parasites et l'échec du traitement (CROFT *et al.*, 2006 ; AIT OUDHIA *et al.*, 2011). La découverte récente que la résistance à l'antimoine de souches de *Leishmania donovani* Népalaises, a montré une augmentation du fitness. Ce qui fait de l'étude de ces souches une priorité visant à mieux comprendre la susceptibilité d'antimoine des parasites *Leishmania* (VANAERSCHOT *et al.*, 2010). Le fitness ou pouvoir de survie est définie comme étant la capacité d'un individu ou d'un génotype à survivre, se reproduire et infecter. Cette définition se réfère au génotype de l'individu, ce qui

signifie que les changements dans le phénotype peuvent conduire à un coût du Fitness. Malheureusement, dans la plupart des régions du monde, aucune information n'est disponible sur la sensibilité de *Leishmania* à l'antimoine. Cette information est cruciale pour faire face au risque de sélection et la transmission de parasites résistants aux médicaments, en particulier dans les zones où l'antimoine est la seule alternative chimiothérapeutique.

Ce n'est qu'à partir de 1986 que les premiers cas d'échecs au traitement de la leishmaniose cutanée furent rapportés en Algérie. En association à ces échecs au traitement, des souches résistantes à l'antimoine ont été isolées (BELAZZOUG & NEAL, 1986). Beaucoup plus récemment une étude sur la leishmaniose canine a démontré la circulation de souches responsables de la leishmaniose viscérale, résistantes à l'antimoine *in vitro* (AIT OUDHIA *et al.*, 2012). Les formulations à l'antimoine restent le traitement de première attention pour toutes les formes de la leishmaniose en Algérie.

Ce travail de thèse a pour principal objectif, une exploration de l'état de susceptibilité à l'antimoine des souches Algériennes, et la détermination de leur fitness. Ces connaissances permettront de mettre la lumière non seulement sur l'importance de la résistance à l'antimoine dans cette région, mais aussi sur les facteurs sous-jacents liés à son déclenchement dans les populations naturelles de *Leishmania*. A partir de l'ensemble de tous ces éléments, et de ces investigations, il se fera une mise en place de protocoles dans la politique de santé publique, visant à sélectionner des marqueurs permettant de diagnostiquer les souches résistantes à l'antimoine en Algérie.

Notre étude comprend deux grandes parties. Une première relative à l'évolution Epidémiologique de la résistance à l'antimoine en Algérie au cours de ces 30 dernières années. Cette étude a nécessité une mise à jour de la situation épidémiologique de la leishmaniose au cours de cette période. Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de différents aspects de la résistance de *Leishmania* à l'antimoine sur un modèle murin, qui est génétiquement homogène. Ce dernier représente un modèle de choix pour une meilleure compréhension des mécanismes et la recherche de marqueurs. Quatre volets ont été abordés dans cette deuxième partie : Dans un premier volet, nous avons étudié la dynamique de croissance des souches responsable de la LC, à savoir *L. major* et *L. killicki* afin de déterminer la capacité de ces souches à se développer *in vitro* en fonction de leur susceptibilité à l'antimoine. Dans un deuxième et troisième volet, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité des phénotypes externes (début de la maladie, virulence de l'inoculum, taille des lésions et des indurations), et des phénotypes internes (dissémination de la maladie), au cours de la LC à *L. major* pour des souches qui exprimaient des susceptibilités à l'antimoine, sensibles et résistantes *in vitro*. Par la suite, nous avons caractérisé des souches qui sont naturellement résistantes au Glucantime® isolées après échec au traitement chez des sujets immunocompétents. Dans le quatrième volet, nous avons développé un modèle animal qui nous permet d'étudier les bases de la physiopathologie et les aspects immunologiques de l'infection causée par *L. killicki* et d'évaluer son application en pharmacologie expérimentale.

## **1<sup>ère</sup> Partie**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les leishmanioses sont un complexe de maladies parasitaires avec un spectre varié de manifestations, et sont provoquées par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Ce parasite intracellulaire obligatoire infecte de nombreuses espèces mammifères dont l'homme. Le parasite se multiplie dans les cellules mononuclées phagocytaires des mammifères et est transmis par la pique d'un insecte vecteur qui est le phlébotome. Chez l'homme la maladie peut se présenter sous 3 formes : la forme viscérale (LV), la forme cutanée (LC) de type localisée (LCL) ou diffuse (LCD), et la forme muco-cutanée (LCM). Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces de *Leishmania* possédant des tropismes distincts pour les organes profonds, la peau ou les muqueuses de la face ; ainsi que de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Plus de 20 espèces de *Leishmania* sont pathogènes chez l'homme et plus de 30 espèces de phlébotomes sont des vecteurs (DEDET, 2009). Par ailleurs, il existe une vingtaine d'espèces de *Leishmania* qui affecte les reptiles. Ces espèces sont regroupées dans un sous-groupe appelé *Sauroleishmania*. L'espèce la plus connue de ce groupe est *L. tarentolae*, utilisé dans l'étude de la résistance à l'antimoine *in vitro* (OUELETTE *et al.*, 2003).

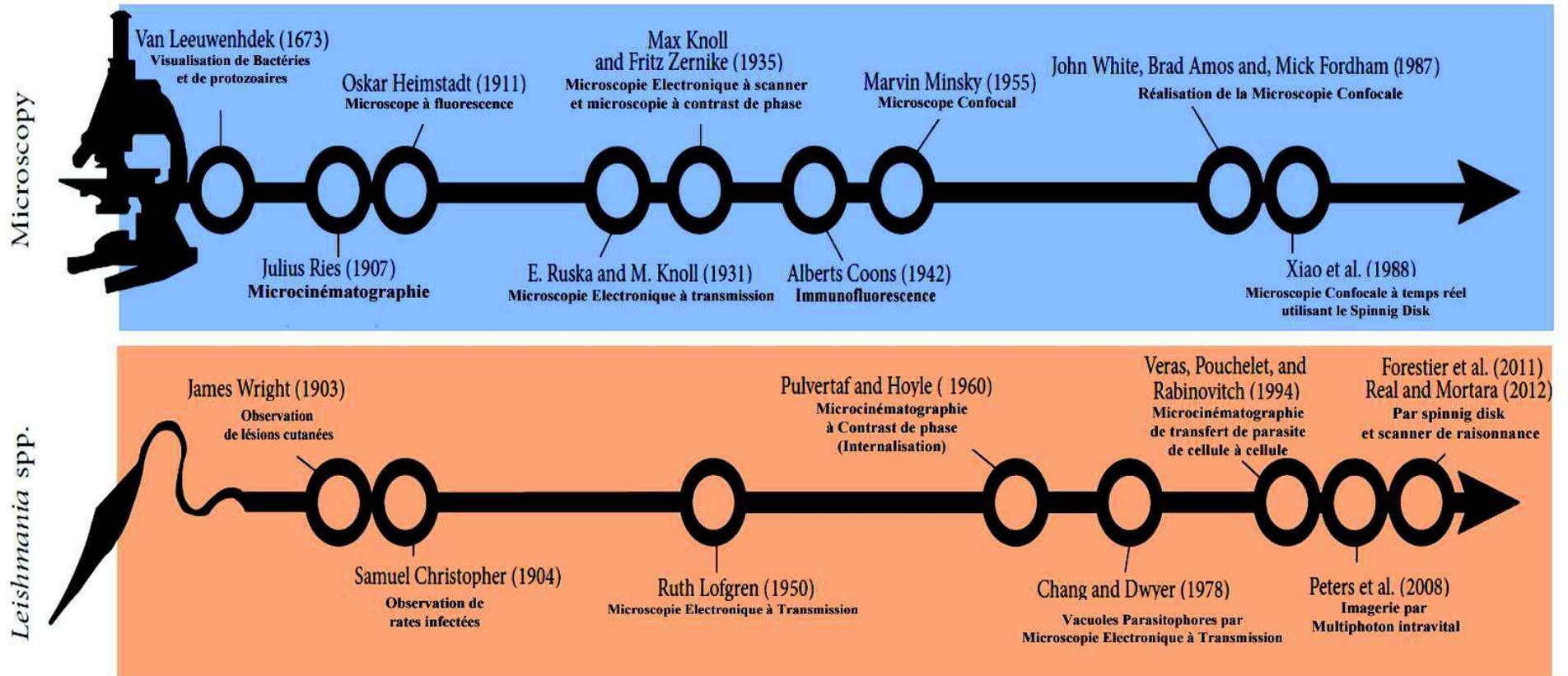
## **1. Le parasite *Leishmania***

### **1.1. Biologie du parasite**

Le parasite *Leishmania* est un protozoaire flagellé appartenant à l'ordre des Kinetoplastidés et à la famille des trypanosomatidés. Il a été décrit pour la première fois en 1903 de manière indépendante par William Leishman et Charles Donovan, d'où le nom de l'espèce responsable de la LV *Leishmania donovani* (figure 1). L'ordre des *Kinetoplastidae* regroupe un ensemble d'eucaryotes unicellulaire flagellés qui se distingue par la présence d'une organelle nommée le kinétoplaste. L'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule et du flagelle est fournie par le kinétoplaste qui est une mitochondrie géante. La famille des *Trypanosomatidae* regroupe plusieurs espèces dites hémoflagellés dont le genre *Trypanosoma* et *Leishmania* respectivement responsables de la maladie du sommeil et de la leishmaniose, sont les plus importants.

Le cycle de vie de *Leishmania* implique un hôte mammifère réservoir, et un insecte vecteur du genre *Phlebotomus* (vieux Monde : Afrique, Asie et Europe) ou *Lutzomia* (Nouveau Monde : Amérique centrale et Amérique du sud).

Les leishmanies sont des organismes principalement diploïdes avec des caractéristiques uniques qui les différencient des autres eucaryotes, tel que l'ancrage des protéines membranaires GPI, les glycocomes, le kinétoplaste, l'Édition et l'organisation de l'ADN mitochondrial, la transcription polycistronique et le transsplicing (TOLEDO *et al.*, 2010). Bien que l'échange sexuel a été démontré dans le stade infectant les invertébrés, on considère que la division de *Leishmania* se fait par partition binaire (AKOPYANTS *et al.* 2009 ; ROUGERON *et al.*, 2009).



**Figure 1: Chronologie des réalisations historiques les plus importantes dans la technologie du microscope et dans l'étude de *Leishmania* spp.** La découverte de l'agent étiologique de la leishmaniose, un parasite protozoaire de la famille trypanosomatidae, et la conceptualisation de son cycle de vie ont été établis à partir d'observations clés en conformité avec les postulats et les paradigmes de l'infection et la pathogenèse de Koch: identifier et isoler les micro-organismes, les cultiver *in vitro* , et d'établir un lien de causalité avec la maladie. (FLORENTINO *et al*, 2014)

L'une des caractéristiques uniques de ces parasites est leur capacité à modifier le nombre de copies des gènes individuels ou encore d'un groupe de gènes, des chromosomes et même l'ensemble du génome. Cette plasticité génétique permet d'amplifier le nombre de copies de gènes spécifiques, un avantage qui garantit l'utilisation par *Leishmania* de ces « copies supplémentaires » pour augmenter les taux du produit du gène (TOLEDO *et al.*, 2010). L'achèvement du séquençage du génome de trois espèces de *Leishmania* : *L. infantum*, *L. major* et *L. Viannia brasiliensis* a permis une meilleure compréhension de la biologie du parasite (PEACOCK *et al.*, 2007). La comparaison de leurs séquences génétiques, ainsi que la connaissance de leur plasticité génétique, constituent un outil fantastique permettant non seulement l'amélioration de la compréhension de la biologie du parasite en lui-même, mais aussi l'identification et la validation des cibles médicamenteuses (PONTE SUCRE, 2013).

## **1.2. Génome de *Leishmania***

### **1.2.1. L'ADN nucléaire**

Le génome de *Leishmania* varie de 29Mb pour *L. amazonensis*, à 33 Mb pour *L. major*, *L. infantum* et *L. braziliensis* (PEACOCK *et al.*, 2007 ; REAL, 2013). Il est organisé en un nombre variable de chromosomes : 34 pour *L. amazonensis* et *L. mexicana*, 35 chez *L. braziliensis*, et 36 pour *L. major*, *L. donovani*, et *L. infantum* (REAL, 2013). Malgré la variabilité pathogénique des différentes espèces de *Leishmania* et la différence dans leur tropisme tissulaire, leur génome est remarquablement similaire, montrant un haut degré de conservation dans l'architecture et le contenu génique (PEACOCK *et al.*, 2007 ; REAL, 2013).

L'ADN des leishmanies est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques (MYLER *et al.*, 2000). Il est très riche en G/C puisqu'il est de 60% en moyenne (ALVAREZ *et al.*, 1994), et contient assez peu de séquences répétées (OUELETTE *et al.*, 2003). L'état de ploïdie de *Leishmania* s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie. En effet, des doubles knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique (SOUZA *et al.*, 1994). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation), ou des amplifications chromosomiques ont été mis en évidence (DUJARDIN, 2000).

### **1.2.2. L'ADN kinétoplastique**

Il constitue 10 à 20 % de l'ADN total (SIMPSON *et al.*, 1987), et renferme deux types d'ADN : les minicercles impliqués dans les phénomènes « d'editing » (insertion/délétion d'uridine) de l'ARN et les maxicercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques (KABB *et al.*, 2001 ; GOTT, 2003) (figure 2). Ce mécanisme « d'editing », commun à tous les kinétoplastidés, permet d'exprimer les transcrits des maxicercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités.



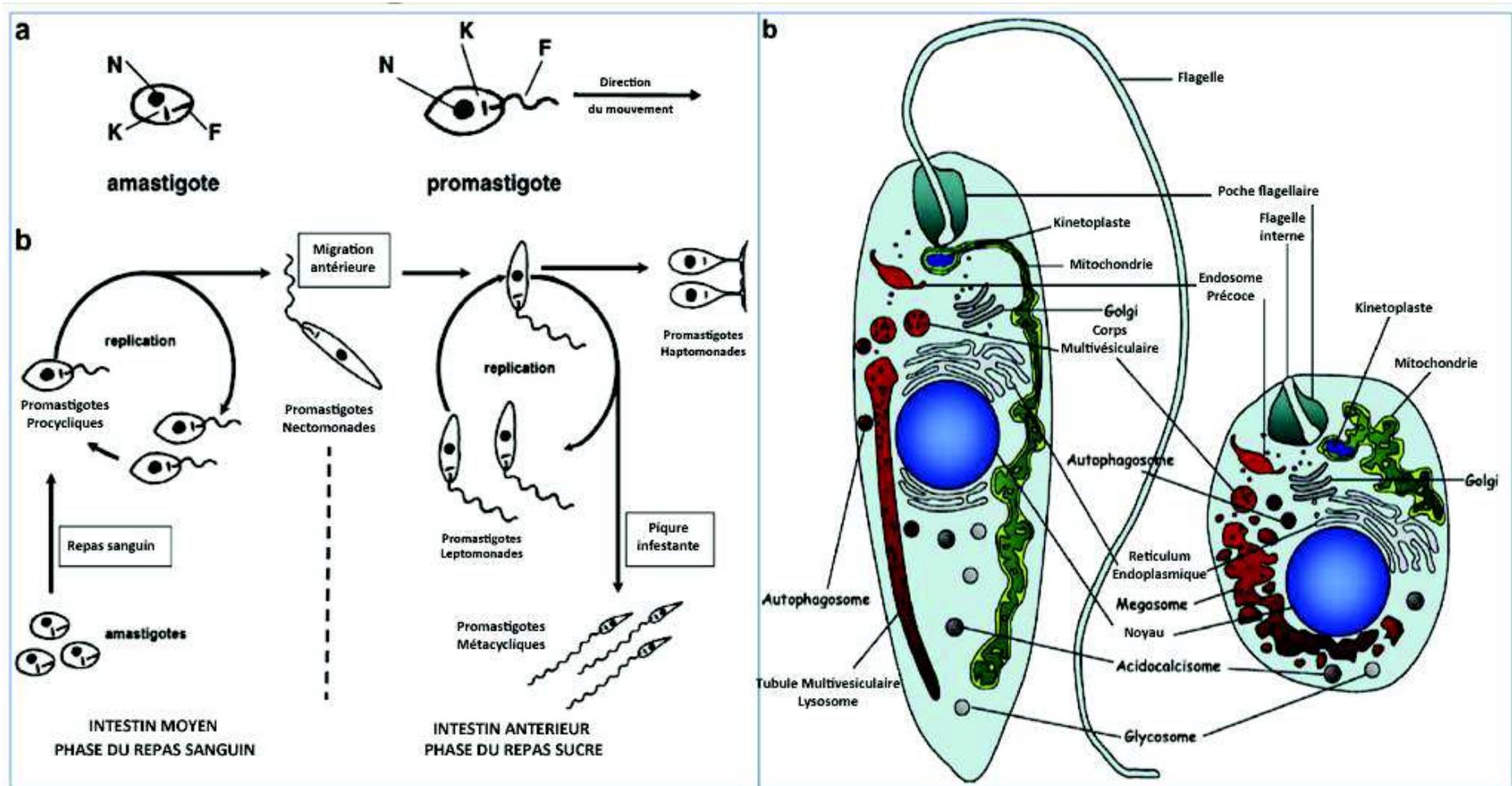
**Figure 2 : L'ADN kinétoplastique de *Leishmania*(BANULS *et al.*, 2007)**  
Cet ADN constitue un réseau de milliers de minicercles et de maxicercles  
(Photographie par microscopie électronique)

### **1.3. Morphologie du parasite et cycle évolutif**

Toutes les espèces de *Leishmania* sont morphologiquement similaires et possèdent 2 stades de développement au cours de leur cycle : la forme amastigote qui réside à l'intérieur des cellules réticulo-endothéliales de l'hôte vertébré et la forme promastigote qui se multiplie dans le tube digestif du phlébotome.

#### **1.3.1. La forme extracellulaire promastigote**

Elle est de forme allongée (11-20  $\mu\text{m}$ ), flagellée et mobile, et se retrouve au niveau de l'insecte vecteur. Suite à l'ingestion de parasites amastigotes par le phlébotome au cours d'un repas sanguin, la forme amastigote se transforme en forme promastigote. Certains facteurs, tels que la température et le pH semblent contrôler cette différenciation du stade amastigote au stade promastigote. La température est de 37°C et le pH entre 4,5-5 au sein du phagolysosome de l'hôte mammifère, et elle est de 25°C avec un pH légèrement alcalin chez l'insecte vecteur (BATES,07). Le stade promastigote possède plusieurs stades morphologiques dont le plus important est la forme métacyclique, qui est la forme infectieuse du parasite (figure3a et 3b).



**Figure 3 : Morphologie et développement de la forme promastigote et amastigote de *Leishmania*.** (a) La morphologie des amastigotes et promastigotes, chaque forme possède un noyau (N), un kinetoplaste (K), et un flagelle (F). (b) La séquence développementale de 5 formes promastigotes : procycliques, nectomonades, leptomonades, haptomonades et metacycliques, (c) représentation schématique des organites intracellulaires des formes promastigotes et amastigotes (BATES, 2007, BESTIERO *et al.*, 2007)

### 1.3.2. La forme intracellulaire amastigote

Cette forme intracellulaire ronde de 4 à 5  $\mu\text{m}$ , dénué de flagelle survit dans l'environnement du phagolysosome (Figure 3c). La différenciation promastigote–amastigote se produit au cours d'un changement d'environnement (de 25°C et pH légèrement alcalin chez l'insecte vecteur à 37°C et pH 4,5-5 au sein du phagolysosome) (BATES, 2007). La multiplication des amastigotes de manière active au sein de la vacuole phagolysosomale, fait éclater les macrophages, puis infectent d'autres cellules. Cette théorie de l'éclatement est présumée comme mécanisme principal en raison du grand nombre d'amastigotes présents dans le phagolysosome, mais des études ont suggéré que le parasite pouvait manipuler le mécanisme d'exocytose du macrophage afin de favoriser sa libération sans augmenter la réaction inflammatoire qu'induit un éclatement (RITTIG,2000).

### 1.3.3. Vecteur

Les phlébotomes sont de petits insectes hématophages de la famille des Psychodidae appartenant à l'ordre des diptères. Ils mesurent de 2 à 3 mm. Leurs couleurs varient du gris argent à noir, et leurs ailes ont une forme caractéristique de « V » au repos (figure4). Au moins 10% des espèces ont été incriminées en tant que vecteurs de la leishmaniose, dont 30 avec une capacité vectorielle démontrée (BATES, 2007). De plus chaque espèce vectrice est spécifique d'une espèce de *Leishmania* (tableau I)

Chez le vecteur, les promastigotes s'attachent à l'épithélium intestinale, où ils se multiplient et se différencient en forme métacycliques infestantes qui est transmise à l'hôte mammifère. Cet attachement est crucial pour compléter le cycle de vie et afin d'éviter que le parasite soit éliminé avec les fèces. Des Lipophosphoglycannes (LPG) de surface des promastigotes interviennent dans cette adhérence et possède une structure polymorphique qui suggère un rôle déterminant des LPG dans la spécificité des espèces de *Leishmania* vis-à-vis du vecteur (SACKSet al., 2000; SACKS, 2001).

### 1.3.4. Réservoir

Les réservoirs naturels de *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclés. Les mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres, selon les espèces de *Leishmania* : carnivores, rongeurs, marsupiaux édentés, primates ou périssodactyles (Annexe 1). Dans certains cas, tel que la LV à *L. donovani* et la LC à *L. tropica*, l'homme est l'unique réservoir (DEDET, 2009).



**Figure 4 :** Photo d'une femelle de *Phlebotomus papatasi* au cours du repas sanguin

**Tableau I:** Les Vecteurs prouvés et suspectés de la leishmaniose dans l'ancien et le nouveau monde (SACKS, 2001, DEDET, 2009).

Vecteurs prouvés et suspectés	Parasite	Formes cliniques*	Réservoir	Distribution géographique
<i>P. alexandri</i>	<i>L. donovani</i>	LVA, PKDL	Homme	Chine
<i>P. argentipes</i>				Inde, Népal, Bangladesh
<i>P. martini, P. perniciosus</i>				Afrique de l'Est
<i>P. ariasi, P. orientalis</i>	<i>L. infantum</i>	LVZ, LCZ	Chien	Europe du Sud
<i>P. perniciosus, P. langeroni</i>				Méditerranée de l'Est
<i>P. chinensis, P. major</i>				Chine
<i>P. papatasi</i>	<i>L. major</i>	LCZ	Rongeur, Gerbille	Moyen orient
<i>P. papatasi</i>				Asie du Sud
<i>P. papatasi, P. duboscqi</i>				Afrique
<i>P. sergenti</i>	<i>L. tropica</i>	LCA ; LR	Homme	Moyen orient
				Asie du Sud
				Afrique
<i>P. longipes, P. pedifer</i>	<i>L. aethiopica</i>	LC ; LCM ; LCD	Hyracoides	Afrique de l'Est
<i>P. sergenti</i>	<i>L. killicki</i>	LC	inconnue	Afrique du nord
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>L. chagasi</i>	LVZ ; LCZ	Rongeurs	Amérique centrale et du Sud
<i>Lu. Olmeca</i>	<i>L. mexicana</i>	LCZ ; LCD	Rongeurs	Amérique centrale et du Sud
<i>Lu. flaviscutellata</i>	<i>L. amazonensis</i>	LCZ ; LCD	Rongeurs Echimyde	Amérique centrale et du Sud
<i>Lu. wellcomei, Lu. carrerae</i>	<i>L. V. braziliensis</i>	LC ; LCM	Mammifères	Amérique centrale et du Sud
<i>Lu. umbratilis, Lu. anduzei</i>	<i>L. V. guyanensis</i>	LC	Opossums, paresseux, fourmiliers	Amérique centrale et du Sud
<i>Lu. Trapidoi</i>	<i>L. V. panamensis</i>	LC	Opossums, singe	Amérique centrale et du Sud

\*LVA : leishmaniose viscérale anthroponotique, PKDL : post kala-azar leishmaniose dermique, LVZ : leishmaniose viscérale zoonotique, LCZ : leishmaniose cutanée zoonotique, LCA : leishmaniose cutanée anthroponotique, LCM : leishmaniose cutanée muco-cutanée, LCD : leishmaniose cutanée diffuse, LR : leishmaniose récidivante.

### 1.3.5. Cycle évolutif du parasite et transmission

Le phlébotome s'infecte au cours de son repas sanguin en piquant un mammifère parasité, puis ultérieurement transmet le parasite à un mammifère sain (figure 5).

Le mode de pique des phlébotomes est particulièrement adapté à la capture du parasite intracellulaire dans la peau. Il dilacère les tissus et absorbe de l'ecchymose résultante (telmophagie). Dans le tube digestif du vecteur, les amastigotes absorbés en même temps que le repas sanguin se transforment en promastigotes dans les heures qui suivent, puis s'échappent de la membrane péritrophique. Ils subissent un cycle dans la lumière du tube digestif de l'insecte. Ils comportent de nombreuses divisions mitotiques, deux étapes de fixation à l'épithélium de la muqueuse intestinale et une phase de migration vers la partie antérieure digestive, où a lieu la métacyclogenèse.

Les promastigotes métacycliques qui sont virulents sont inoculés dans le derme d'un mammifère lors d'une prochaine pique (SACKS, 2001 ; DEDET, 2009). Les substances actives contenues dans la salive de l'insecte provoquent une vasodilatation et une immunodépression locale favorable à l'installation du parasite (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

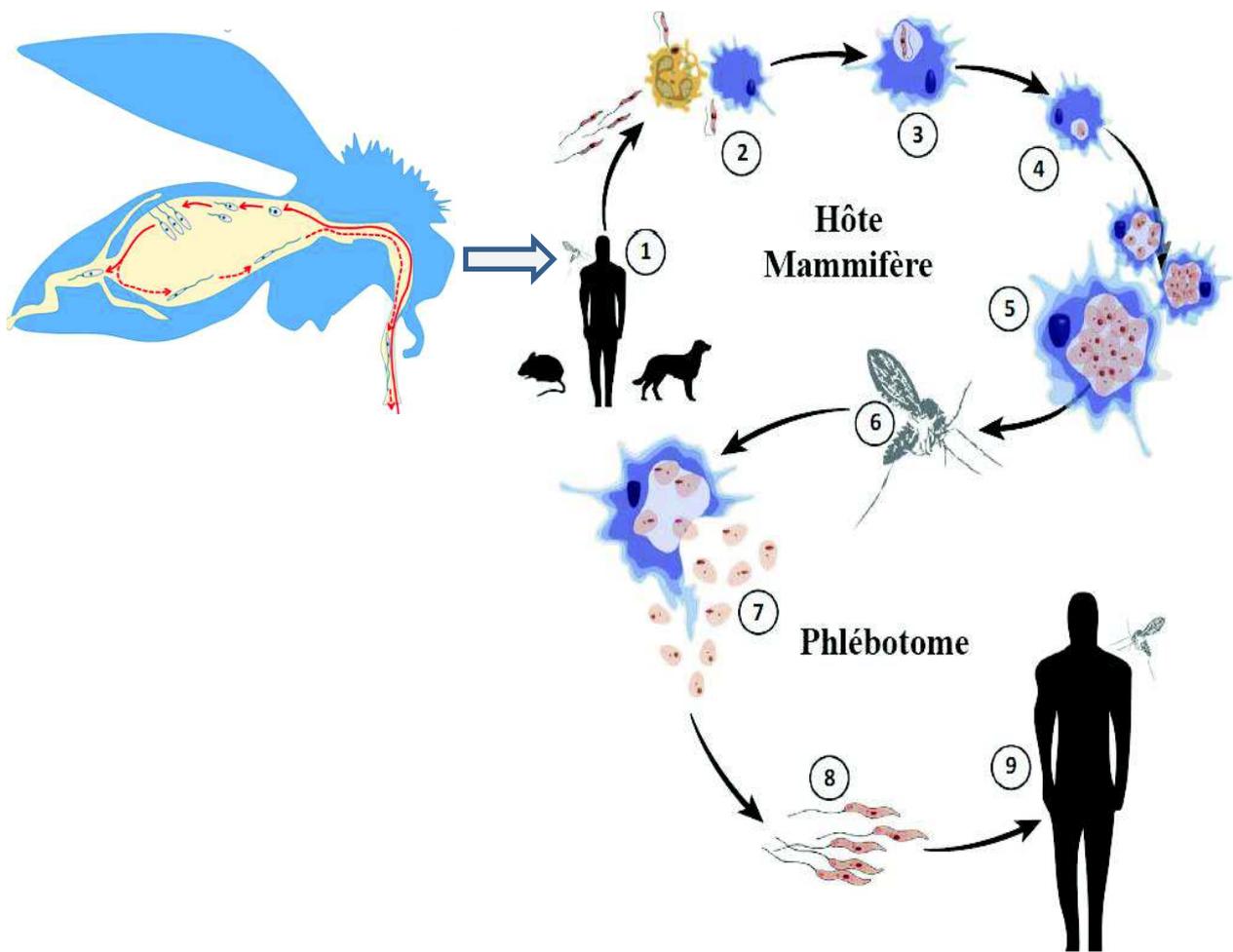
D'autres voies exceptionnelles sont retrouvées chez les immunodéprimés qui s'infectent lors d'échanges de seringues, ce qui explique le taux élevé de LV à *L. infantum* dans le sud de l'Europe (ALVAR et JIMENEZ, 1994).

### 1.4. Classification et Répartition géographique de *Leishmania*

La niche écologique de *Leishmania* se divise en deux grandes régions géographiques, soit l'Ancien-monde (sud de l'Europe, Afrique, Asie) et le Nouveau-monde (Amérique centrale et Amérique du Sud).

Selon l'endroit où le parasite se développe dans l'intestin de l'insecte vecteur (partie centrale ou postérieure respectivement), on classe l'espèce *Leishmania* en deux sous-genres, *Leishmania* et *Vianna*, (BANULS *et al.*, 2007).

Le sous-genre *Leishmania* est retrouvé dans les deux régions, tandis que le sous-genre *Vianna* est exclusif au Nouveau-monde. De plus, l'insecte vecteur du genre *Phlebotomus* est prédominant dans l'Ancien-monde tandis que le genre *Lutzomyia* est confiné au Nouveau-monde. Les deux sous genres *Leishmania* et *Vianna* sont eux-mêmes divisés en complexes. La taxonomie du genre *Leishmania* est représenté dans la figure 6 (SCHONIAN *et al.*, 2010 ; VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015). Cette classification était basée initialement sur des critères d'identification extrinsèques tels que la morphologie, la distribution géographique et les manifestations cliniques. La classification des différentes espèces *Leishmania* est dorénavant mieux définie grâce aux analyses immunologiques, biochimiques et génétiques (BANULS *et al.*, 2000 ; HIDE *et al.*, 2001 ; RIOUX *et al.*, 1990 ; SCHONIAN *et al.*, 2010).



**Figure 5 :** Cycle évolutif de *Leishmania* spp. (CANTACESSI *et al.*,2015 modifié)

(1) Les parasites envahissent les macrophages et les granulocytes (2 et 3) et se développent en amastigotes à l'intérieur du phagolysosome (4) les stades amastigotes se répliquent dans le phagolysosome par simple division, (5) les macrophages contenant des amastigotes sont ingérés par le phlébotome pendant le repas de sang (6); les parasites sont libérés par les macrophages infectés au sein de l'intestin moyen du phlébotome (7) , où ils se transforment en promastigotes procycliques. Ensuite, les parasites migrent vers la valve stomoeal (de l'intestin moyen antérieur) et se transforment en différents sous-types qui forment les promastigotes métacycliques (8). Ces stades infectieux sont ensuite libérés dans un nouvel hôte mammifère lors d'un repas de sang ultérieur (9).

### 1.5. Approches moléculaires dans l'étude l'épidémiologie et la génétique des populations de *Leishmania*

Ses approches moléculaires sont utilisées de plus en plus dans les études épidémiologiques de leishmanioses viscérales et cutanées. Plusieurs marqueurs moléculaires permettant de résoudre les différences génétiques entre *Leishmania* à des niveaux d'espèces et la souche ont été développés pour aborder des questions clés génétiques épidémiologiques et démographiques.

Pour l'étude épidémiologique de *Leishmania*, la technique taxonomique de référence est le typage isoenzymatique (Multilocus Enzyme Electrophoresis : MLEE) 1984 ; (RIOUX *et al.*, 1990 ; WHO, 1990). Elle reste une technique de choix pour l'identification des espèces et les études de diversités génétiques (BANULS *et al.*, 2007). La MLEE détecte les allèles des gènes conservés par les différences de mobilité électrophorétique des enzymes pour lesquelles ils codent.

Depuis l'avènement de la PCR, de nombreux outils moléculaires permettant de distinguer les espèces ont été publiés (tableau II). Ces outils vont de technique d'empreintes génétiques telles que la PCR RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragment de restriction), à la MLST (multilocus sequence typing), où il s'agit d'examiner les séquences nucléotidiques de plusieurs locus codant des gènes de ménage (housekeeping genes) ou des fragments de gènes de ménage (judicieusement choisis au départ).

Le typage microsatellite multilocus (MLMT), est potentiellement l'approche phylogénétique la plus puissante et va, très probablement, remplacer MLEE à l'avenir (ALURU *et al.*, 2015). La microsatellite Multi typage (MLMT) est capable de discriminer en dessous du niveau de zymodème et semble être le meilleur candidat pour devenir la technique de référence pour la distinction de souches.

Des études génétiques de Population ont révélé par MLMT structure population géographique et hiérarchique dans *L. tropica*, *L. major* et le complexe *L. donovani*. L'existence d'hybrides et de flux de gènes entre populations de *Leishmania* suggère que la recombinaison sexuelle est plus fréquente qu'on ne le pensait. Cependant, sachant que outils analytiques ont besoin d'être améliorée, des bases de données accessibles doivent être créés et soutenus pour intégrer les données obtenues par différents chercheurs. Cela permettrait des analyses globales et aider à éviter les biais dans les analyses en raison de la petite taille des échantillons.

## **2. La Leishmaniose**

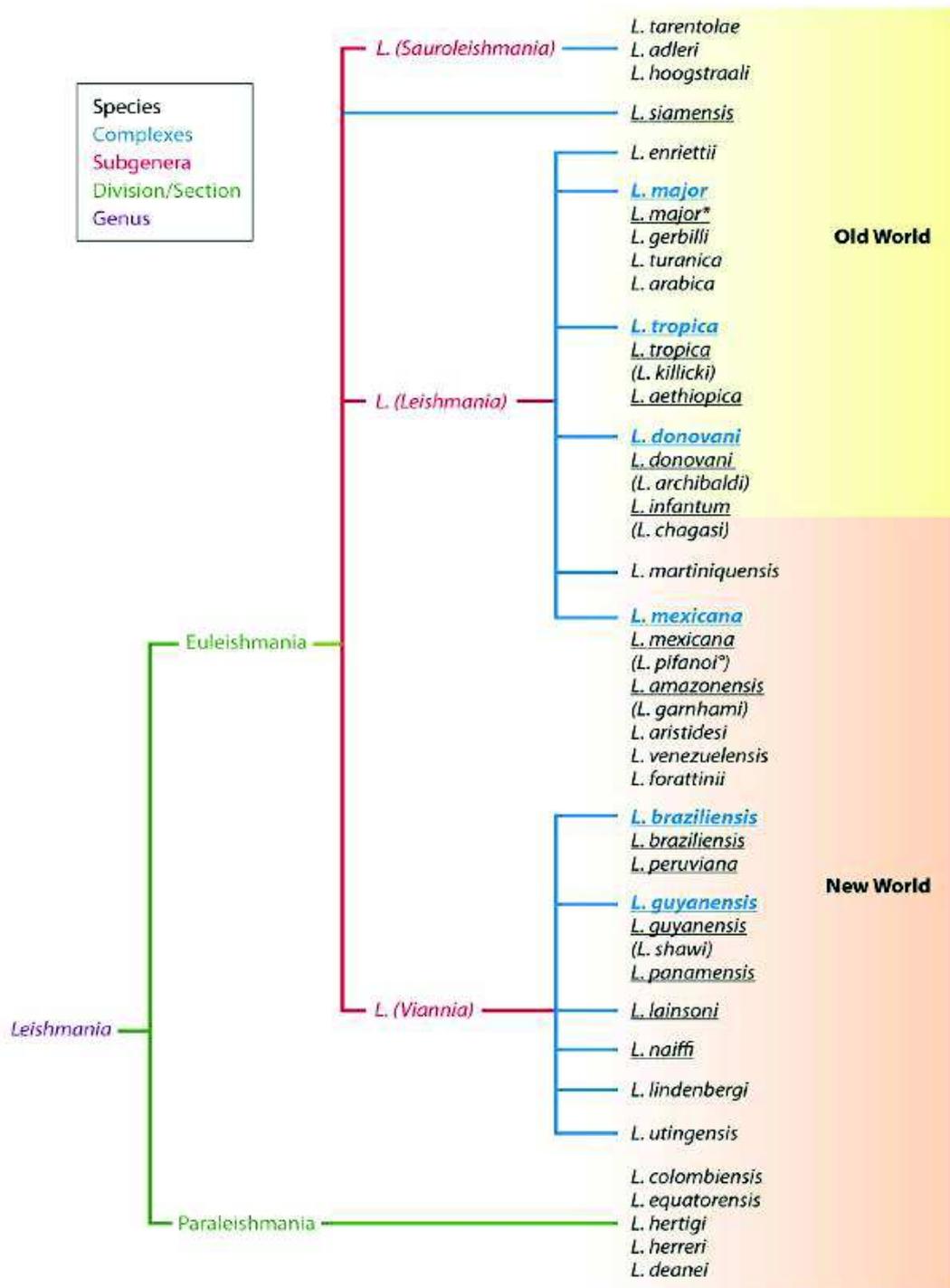
### **2.1. Les Manifestations cliniques**

Les manifestations cliniques associées à l'infection causée *Leishmania* sont variables (figure 7). Elles peuvent être asymptomatiques, comme elles peuvent être létales. Plusieurs facteurs tel que l'espèce infectante, le vecteur, le statut immunitaire de l'hôte, son âge, son statut nutritionnel, le site d'inoculation, et la dose de l'inoculum, ainsi que le background génétique de l'hôte, influencent le développement de la pathologie. (AKILOV *et al.*, 2007 ; BOGDAN, 2012). Heureusement, les cas de guérison spontanée au cours de LC sont communs. Cependant, une défaillance du système immunitaire conduit à une multiplication non contrôlée du parasite, et à des formes graves de la maladie.

**Tableau II :** Questions épidémiologiques abordés par les outils de différenciation des espèces et des souches de *Leishmania* (BANULS *et al.*, 2007).

	MLEE	Espèce spec.PCR	Genre Espèce. PCR (Espèces id par RFLP, Hybridation, séquençage, HRM)	RFLP PCR minicercle ADNk	MLST	MLMT
<b>Typage des espèces</b>						
L'identification des espèces sympatriques et importés	X	(X)	X		X	
L'identification des espèces associée à l'échec du traitement	X	(X)	X		X	
Identification de nouveaux hôtes réservoirs non humain	X	X	X		X	
Incrimination de nouveaux vecteurs phlébotomes	X	X	X		X	
Détection de nouveaux parasites-insectes-host-combinaisons	X	X	X		X	
La détection des hybrides	X				X	
<b>Le typage des souches</b>						
Comparaison des souches isolées à partir de différents hôtes	X			X		X
Différenciation entre cycle de transmission zoonotique et anthroponotiques	X			X		X
Identification de nouveaux génotypes de mammifères et d'insectes hôtes	X			X		X
Identification des origines des nouveaux génotypes	X					X
Rechercher génotypes liés à la résistance aux médicaments				X		X
Différenciation entre la persistance ou la ré-inoculation des rechutes				X		X
Détection des épidémies	X			X		X
Identification des sources de <i>Leishmania</i>	X					X
Test pour la structure de la population des espèces de <i>Leishmania</i>						X
Test de flux génétique entre les populations et pour les hybrides	X					X

**Abréviations :** MLEE : électrophorèse enzymatique multilocus, RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction, MLST : multilocus sequence typing; MLMT : multilocus typage microsatellites. (X) une application limitée.



**Figure 6 :** Taxonomie du genre *Leishmania* basée sur le typage isoenzymatique(MLEE)

Les différents niveaux sont indiqués par leurs couleurs respectives. Plusieurs espèces (en noir) sont regroupés en « complexes d'espèces », ou « complexes » (en bleu), de sorte que le complexe est nommé d'après l'une de ses espèces. Les espèces soulignées sont celles retrouvées chez l'homme et les animaux domestiques. Les noms des espèces entre parenthèses ne sont pas reconnus comme des entités séparées par la plupart des auteurs, et font partie des espèces inscrites dessus d'eux. *L. chagasi* est le synonyme de *L. infantum* dans le nouveau monde, certaines souches de *L. pifanoi* sont plus proches de *L. amazonensis* que de *L. mexicana*. (\*) Certains auteurs rapportent des espèces *L. major*-like du nouveau Monde (SCHONIAN *et al*, 2010 ; VAN DER AUWERAET DUJARDIN, 2015).

### 2.1.1. Leishmaniose asymptomatique

La leishmaniose peut être asymptomatique chez les sujets immunocompétents, avec des espèces responsables de la LV (*L. infantum*, *L. donovani* et *L. chagasi*) (BADARO *et al.*, 1986 ; EVANS *et al.*, 1992 ; PEARSON et SOUSA, 1996).

### 2.1.2. Leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée (LC) est la forme la plus courante de la leishmaniose (Figure 8). Elle est caractérisée par une ou plusieurs lésions qui se développent quelques semaines ou quelques mois après la pique du vecteur. La lésion débute habituellement sous la forme d'une petite papule rougeâtre pouvant progresser en nodule érythémateux, en induration, en plaque squameuse ou en ulcération (AMEENS, 2010 ; DAVID et CRAFT, 2009, DOWLATI, 1996) (Figure 7). Bien que cette infection puisse causer de graves cicatrices chez certains patients, elle ne met pas la vie de ceux-ci en danger et peut même se résorber de façon spontanée après quelques mois (MARSDEN, 1984). D'autres manifestations cliniques exceptionnelles sont associées à la LC. La leishmaniose récidivante (ou leishmaniasis recidivans) se caractérise par le développement d'une nouvelle papule autour d'une vieille lésion précédemment guérie (DOWLATI, 1996). Ce variant clinique plutôt rare est habituellement attribuable à *L. tropica*, mais quelques cas causés par *L. braziliensis* ont également été rapportés (OLIVIERA-NETO *et al.*, 1998).

Dans l'Ancien Monde, *L. major* et *L. tropica*, sont les deux principales espèces rencontrées. Elles ont tendance à engendrer une infection moins sévère pouvant guérir plus rapidement (DAVID & CRAFT, 2009). Toutefois, les infections causées par *L. aethiopica*, qui surviennent en grande partie en Afrique de l'Est, ont tendance à dégénérer en leishmaniose cutanée diffuse ou en leishmaniose muco-cutanée (AMEENS, 2010). Dans le Nouveau Monde, les espèces du complexe *L. mexicana* et du sous-genre *L. Viannia* sont responsables des leishmanioses cutanées. Chez les espèces du sous-genre *L. Viannia* l'infection peut se propager et dégénérer en leishmaniose muco-cutanée (AMEENS, 2010).



Figure 7 : Différentes formes cliniques de la leishmaniose. (a) LC, (b) LMC, (c) LV.

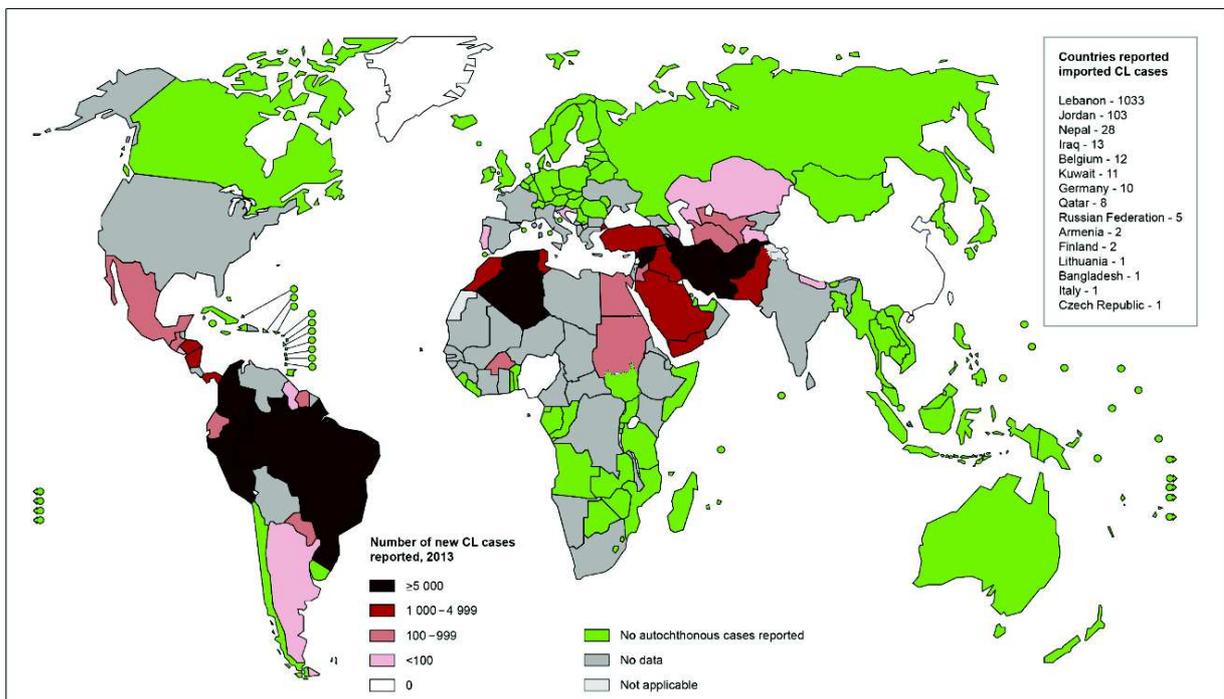


Figure 8 : Situation épidémiologique de la leishmaniose cutanée dans le Monde (WHO 2013)

### 2.1.3. Leishmaniose muco-cutanée

Elle survient chez 1 à 10 % des patients dans le nouveau monde (figure 7), présentant une leishmaniose cutanée causée par un membre du sous-genre *L. Viannia* et se manifeste généralement entre 1 à 5 ans après la guérison (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005 ; WEIGLE et SARAVIA, 1996).

Au cours de la leishmaniose muco-cutanée, les parasites se disséminent aux muqueuses de la zone oro-naso-pharyngée. Il se produit alors des lésions métastatiques destructrices et des réactions immunitaires hyper-inflammatoires. Cette pathologie doit impérativement être traitée, car la destruction des muqueuses est très débiliteuse pour la personne infectée et peut même mettre sa vie en danger s'il y a obstruction du pharynx et/ou du larynx (FRANKE *et al.*, 1990). Le mode de dissémination du parasite aux muqueuses demeure encore mal compris. Toutefois, de l'ADN kinétoplastidique (ADNk) de *Leishmania* a été amplifié à partir d'échantillons de muqueuses non affectées de patients présentant des leishmanioses cutanées actives causées par différentes espèces du sous-genre *L. Viannia* (FIGUEROA *et al.*, 2009). De plus, il a récemment été suggéré que les souches de *L. guyanensis* infectées par le *Leishmania* RNA virus-1 (LRV1), un virus à ARN double brin, ont une plus grande propension à former des métastases que les souches non-infectées, en effet, le LRV1 induit une réponse immunitaire pro-inflammatoire qui rend les souris plus susceptibles à l'infection par *L. guyanensis* et accroît la persistance du parasite chez l'hôte (IVES *et al.*, 2011).

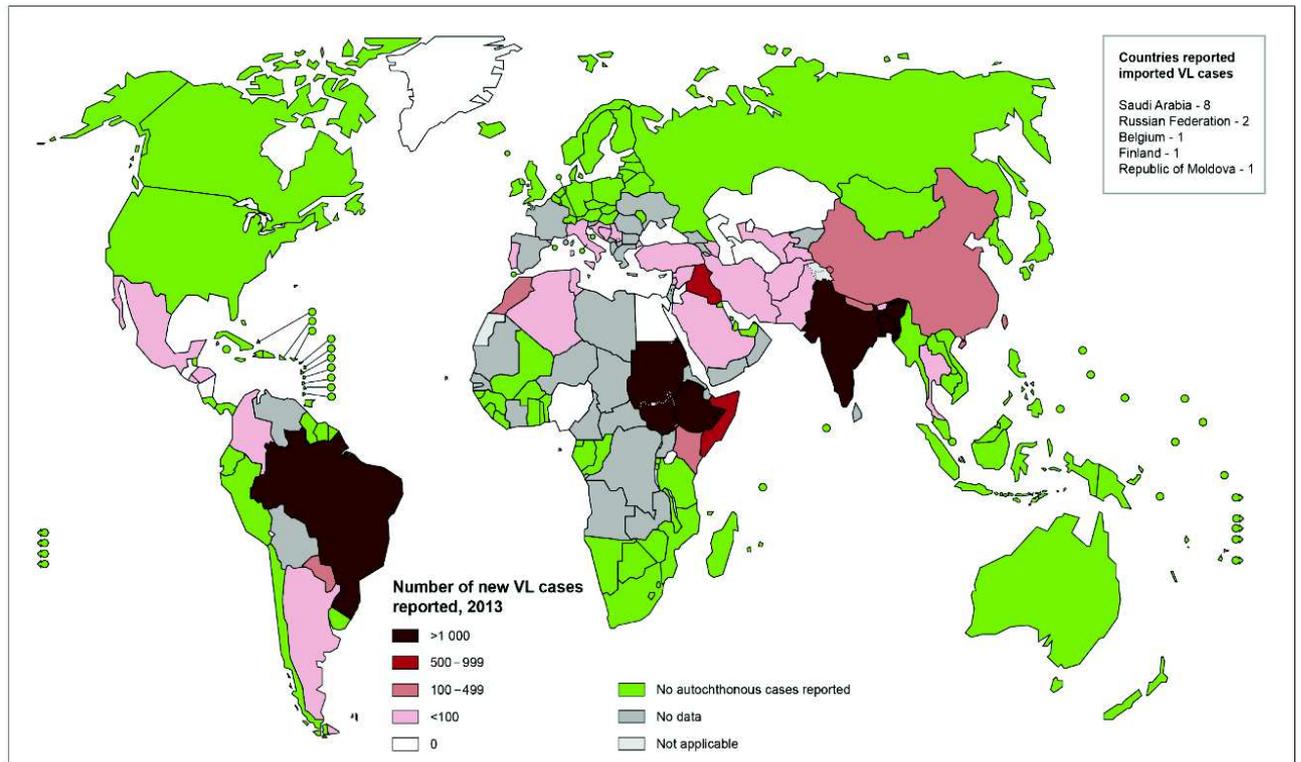
### 2.1.4. Leishmaniose viscérale

Aussi connue sous le nom de kala-azar (la maladie noire). Ce type de leishmaniose se développe des mois, voire des années après l'inoculation du parasite et constitue la forme la plus sévère de la maladie. Elle est presque toujours fatale en l'absence de traitement. Les symptômes cliniques incluent entre autres la fièvre, les douleurs abdominales, la diarrhée, l'épistaxis, la splénomégalie, l'hépatomégalie et la cachexie (GUERIN *et al.*, 2002). Elle existe aussi bien dans l'ancien Monde que dans le nouveau monde (figure 9) et plus de 90% des cas sont retrouvés dans 6 pays : Bangladesh, Brésil, Ethiopie, Inde, Soudan, and Soudan du sud) (KEVRIC *et al.*, 2015).

Les principaux agents de la LV sont *L. donovani* en Inde, en Asie et en Afrique de l'Est, par *L. infantum* dans la région méditerranéenne et en Asie et par *L. chagasi* en Amérique (DESJEUX, 2001, GUERIN *et al.*, 2002). D'autres espèces, comme *L. tropica* au Moyen-Orient et *L. amazonensis* en Amérique du Sud, peuvent occasionnellement être impliquées dans le développement de la leishmaniose viscérale (MURRAY *et al.*, 2005).

Suite à la guérison de la leishmaniose viscérale, la complication la plus fréquente est l'apparition d'une leishmaniose dermique post-kala azar (PKDL). En effet, cette dernière survient dans les 6 mois suivant la guérison dans 50 à 60 % des cas au Soudan et de 2 à 3 ans post-guérison dans 5 à 10 % des cas en Inde (ZIJLSTRA *et al.*, 2003). Les manifestations

cliniques associées à la PKDL se limitent à la présence de macules hypo-pigmentées, de plaques érythémateuses et de lésions papulo-nodulaires qui ont tendance à devenir chroniques (ZIJLSTRA *et al.*, 2003). Contrairement aux cas répertoriés en Inde qui doivent obligatoirement être traités, une guérison spontanée survient fréquemment chez les cas non-sévères retrouvés au Soudan (ZIJLSTRA *et al.*, 1995).



**Figure 9 :** Situation épidémiologique de la leishmaniose Viscérale dans le Monde (WHO 2013)

## 2.2. Les composants épidémiologiques de la leishmaniose en Algérie

La leishmaniose est une maladie parasitaire qui affecte plus de 12 millions de personnes dans le monde, et dans plus de 98 pays. En Algérie, la leishmaniose se présente sous deux formes : la forme cutanée et la forme viscérale. Actuellement, la LC constitue un sérieux problème de santé publique en Algérie, qui place ce pays en deuxième position après l'Afghanistan en termes d'incidence de la maladie (ALVAR *et al.*, 2012, WHO 2010).

La première description de la leishmaniose en Algérie a été effectuée par les frères Sergent il y a plus d'un siècle (SERGENT & SERGENT, 1910). En Algérie, trois formes distinctes de leishmanioses sont rencontrées : la Leishmaniose cutanée, la leishmaniose viscérale et la leishmaniose canine.

### 2.2.1. Leishmaniose viscérale et cutanée humaine en Algérie

L'agent responsable de la forme zoonotique de la LC (LCZ) est *L. major*. En Algérie, la leishmaniose cutanée à *Leishmania major* pose un problème de santé publique. C'est une maladie saisonnière qui s'exprime entre octobre et mars et qui sévit en mode endémique. Autrefois dénommée "clou de Biskra", décrite pour la première fois par Hamel en 1860, elle sévit à l'état endémo-épidémique sur toute la frange nord saharienne correspondant à l'étage bioclimatique aride et semi-aride. Elle est retrouvée dans le Sahara et dans les régions steppiques (Figure 10, 11). L'incidence de cette forme était de plus de 20 000 cas en 2010 (REM, 2010). Deux variants isoenzymatiques de *L. major* ont été rapportés en Algérie, le zymodème MON-25 et MON-269 (HARRAT *et al.*, 1996, PRATLONG *et al.*, 2009). L'insecte vecteur pour la LC à *L. major* est *Phlebotomus papatasi* (IZRI *et al.*, 1992) et les réservoirs sont des rongeurs sauvages des régions désertiques et steppiques : *Psammomys obesus* et *Meriones shawi* (BELAZZOUG 1983, BELAZOUG 1986). Par ailleurs, il a été rapporté récemment que le hérisson pouvait être naturellement infecté par *L. major* (THOMAS PEREZ *et al.*, 2014).

Récemment, un nouveau foyer de LC cutanée est apparu dans la localité d'El M'hir, située sur le versant nord de cette chaîne. Les souches originaires de patients et de rongeurs *Psammomys obesus* n'ayant jamais quitté la région s'identifient toutes à *L. major* MON-25 (BOUDRISSA *et al.*, 2012). On note la prolifération de ce rongeur habituellement inféodé aux chotts des régions steppiques et sahariennes dans le sous-bassin d'El M'hir. Les prospections entomologiques ont montré la prédominance de deux espèces de Phlébotomes : *Phlebotomus papatasi* et *P. perniciosus*. Le premier est reconnu comme vecteur de *L. major* dans le Sahara Algérien. Ce qui met en évidence l'extension de *L. major* des zones arides vers les zones semi-arides de la vallée de la Soummam. L'impact des changements climatiques et particulièrement du phénomène de la désertification de la région steppique au nord Sahara pourrait jouer un rôle dans la propagation de cette maladie (BOUDRISSA *et al.*, 2012).

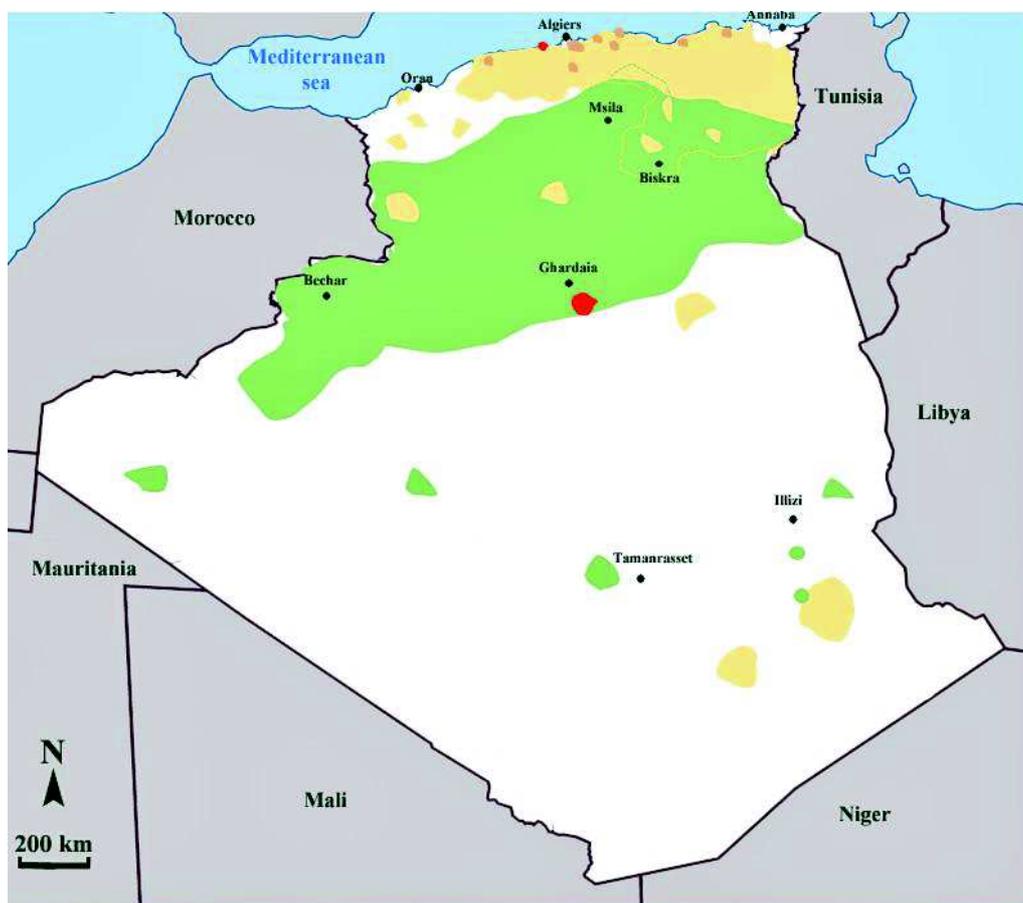
Dans la partie sud du pays et plus particulièrement dans l'Oasis de Ghardaïa, il existe une forme chronique de LC dont l'agent responsable est *L. killicki* appartenant au complexe *L. tropica*. *L. killicki* se retrouve en sympatrie avec *L. major* dans cette région (HARRAT *et al.*, 2009; GARNI *et al.*, 2014). L'incidence annuelle est estimée à moins de 100 cas par an. Le vecteur de *L. killicki* est *Phlebotomus sergenti* (BOUBIDI *et al.*, 2011) et on suspecte le rongeur Goundi *Massoutiera mzabi*, d'être le réservoir, puisque un rongeur proche de ce dernier, *Ctenodactylus gundii* a été trouvée naturellement infecté par *L. killicki* en Tunisie (JAOUADI *et al.*, 2011)

Dans la partie nord du pays, on retrouve à l'état sporadique une LCZ provoquée par *L. infantum*. L'insecte vecteur est *Phlebotomus perfiliewi* (IZRI et BELAZOUG, 1993), et le chien est le réservoir de *L. infantum* MON-24 (BENIKHLEF *et al.*, 2004).

La forme viscérale de la leishmaniose est provoquée par *L. infantum*, et se retrouve principalement dans la partie nord du pays. Des foyers actifs sont localisés dans la région de Kabylie, ainsi que dans le Nord Est, dans les wilayas de Jijel et de Constantine. D'autres cas ont

aussi été rapportés récemment dans le Sud du pays, dans le Tassili N'ajjer (wilaya d'Ilizi) et dans le Hoggar (wilaya de Tamanrasset) (BENALLAL *et al.*, 2014). L'insecte vecteur de *L. infantum* au cours de la LV est *Phlebotomus perniciosus* et les canidés, principalement le chien sont les principaux réservoirs. Le chacal a été retrouvé naturellement infecté par *L. infantum* MON-1 (HARRAT *et al.*, 1996 ; BESSAD *et al.*, 2012).

La co-infection leishmaniose cutanée SIDA est beaucoup moins fréquente que la co-infection leishmaniose viscérale-SIDA. Plusieurs cas de LC chez des immunodéprimés VIH, ont été rapportés en Algérie (AMMAR-KHODJA *et al.*, 1990). Les manifestations cliniques sont des lésions graves extensives pouvant toucher les muqueuses et dont l'évolution est lente avec possibilités de récives.



**Figure 10:** Distribution de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie.  
(●) *L. major* LC, (●) *L. infantum* LV, (●) *L. infantum* LC, (●), *L. killicki* LC.

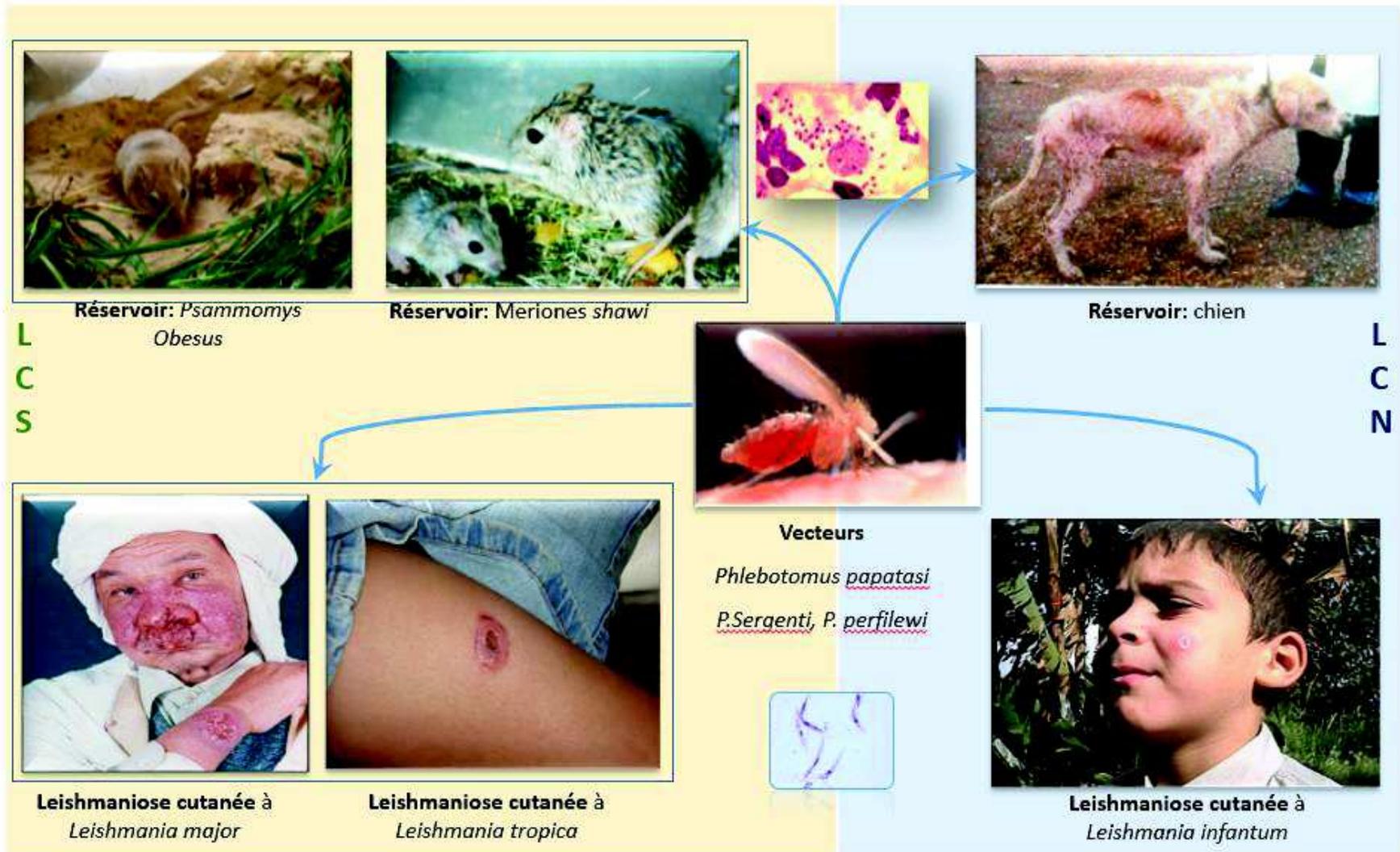
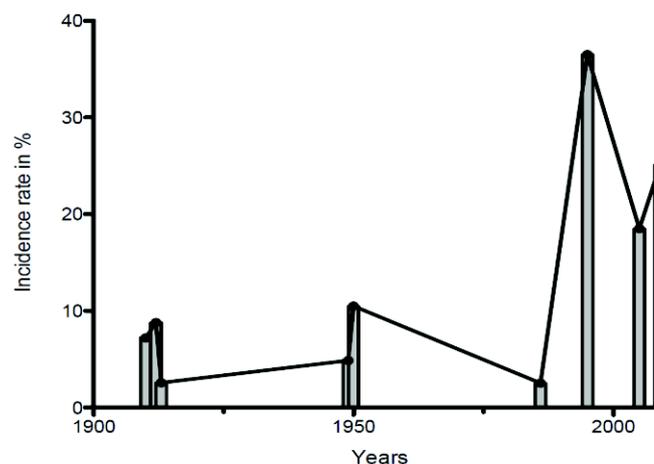


Figure 11 : Représentation schématique des composants du cycle évolutif de la LC en Algérie.

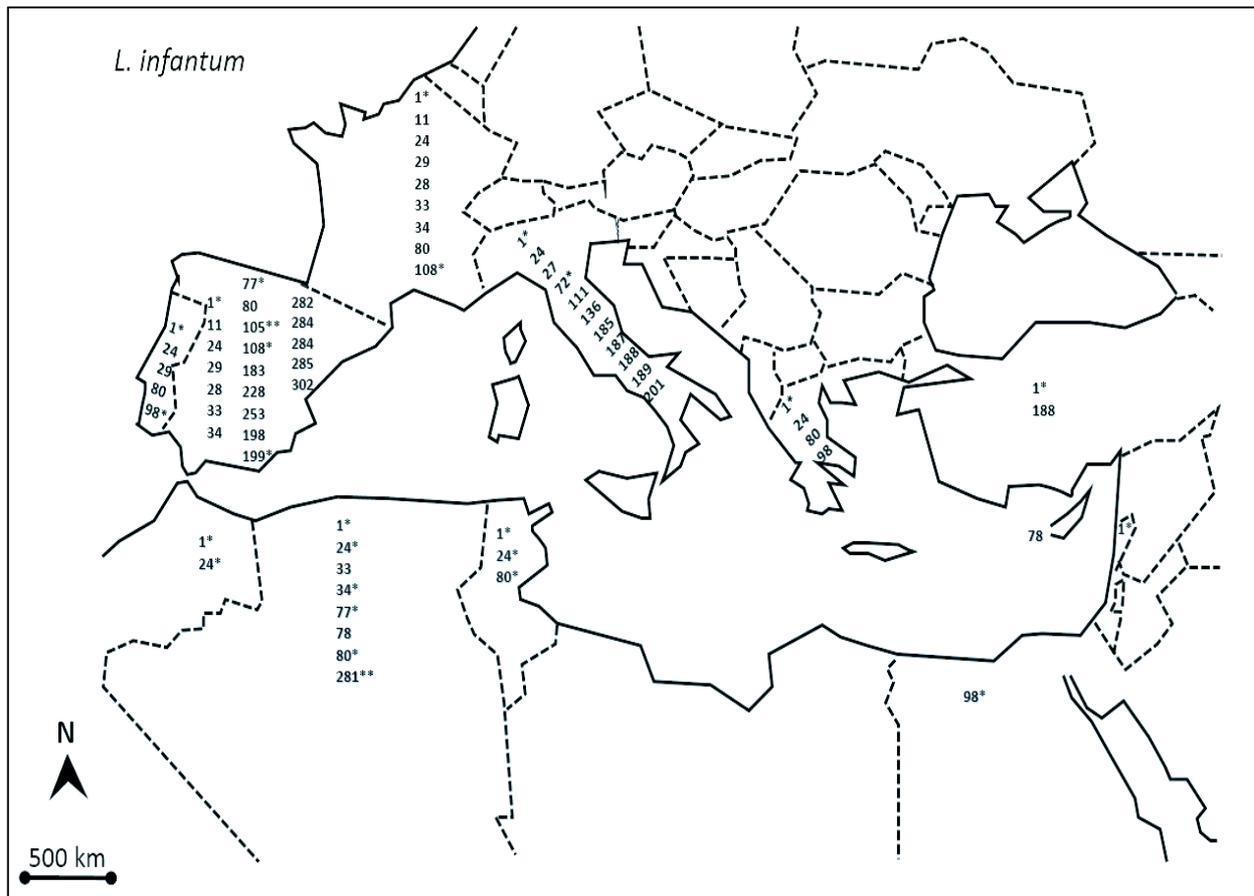
### 2.2.2. La leishmaniose canine en Algérie

Le rôle majeur du chien dans le cycle de vie de *Leishmania infantum* au cours de la LV est reconnu depuis 1908. Diverses espèces de phlébotomes appartenant au genre *Phlebotomus* agissent comme vecteurs du parasite (KILLICK KENDRICK, 1999). La leishmaniose canine (L. Can) est une maladie cosmopolite avec une large distribution dans le monde entier, principalement dans les zones tropicales, mais aussi dans les zones tempérées de l'Afrique du Nord, en Europe et en Asie (ALVAR *et al.*, 2004). La maladie a été signalée dans presque tous les pays du bassin Méditerranéen, avec des prévalences relativement variables. En Algérie, bien que la prévalence enregistrée soit en dessous de 11%, une augmentation de la prévalence de 25.1% a été rapportée en 2006 (AIT OUDHIA *et al.*, 2009).

Cette augmentation de la prévalence de L. Can a été suivie d'une augmentation des cas de leishmaniose humaine. Dans la région d'Alger, par exemple, le nombre annuel de cas de leishmaniose viscérale et cutanée humaine a augmenté de 12,2% entre 1990 et 1997 (AIT OUDHIA *et al.*, 2009 ; PRATLONG *et al.*, 2013). Comme le montre la figure 12, jusqu'aux années 80, la prévalence de l'infection chez les chiens à Alger a toujours été inférieure à 10%. Ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que la prévalence a augmenté de façon marquée, avec une valeur supérieure à 20%. Ce changement peut être principalement expliqué par les changements environnementaux simultanés et dramatiques qui ont eu lieu en Algérie, en particulier l'urbanisation sauvage incontrôlée qui a eu lieu au cours des dernières années. Cette nouvelle urbanisation a conduit à une prolifération de chiens autour des maisons et l'enlèvement de la végétation naturelle peut avoir entraîné la prolifération des vecteurs. Six zymodemes de *L. infantum* L. Can ont été identifiés en Algérie : MON-1, MON-24 à Alger, MON-34 et MON-77 en Grande Kabylie et MON-281 (HARRAT et BELKAID, 2003 ; BENIKHLEF *et al.*, 2004 ; AIT OUDHIA *et al.*, 2009 ; CHAARA *et al.*; 2014). La figure 13 montre une vue exhaustive des zymodèmes de *L. infantum* isolées chez l'homme et chez le chien, autour du bassin méditerranéen.



**Figure 12 :** Evolution de la leishmaniose canine sur une période de 100 ans en Algérie



**Figure 13 :** Polymorphisme enzymatique du complexe *L. infantum* humain et canin dans le bassin méditerranéen.

(\*) sur les 37 zymodèmes retrouvés chez l’homme, 12 seulement sont retrouvés chez le chien : MON-1, MON-11, MON-24, MON-27, MON-30, MON-34, MON-77, MON-98, MON-108, MON-267, MON-278 and MON-281.

### 2.2.3. Epidémiologie de la leishmaniose dans les pays voisins de l’Algérie

Les aspects épidémiologiques de la leishmaniose en Algérie sont influencés par ceux des pays voisins, en raison du déplacement important de population, et bien que le nombre de cas de leishmaniose viscérale et cutanée déclarés soit en dessous de la réalité, certaines données bibliographiques sur la situation épidémiologique de la Tunisie et du Maroc, sont intéressantes à être rapportées.

**En Tunisie,** les composantes épidémiologiques de la leishmaniose et son évolution sont similaires à celle de l’Algérie. La LV est endémique dans le nord du pays, cependant le nombre de cas est important. Il était autour de 100 cas/an entre 1996 et 2003. Avec plusieurs milliers de cas, la LC provoquée par *L. major* est un important problème de santé publique. Elle se produit généralement dans le centre et le Sud-Ouest de la Tunisie, dans les régions arides et semi-arides. Certains auteurs ont rapporté que dans certains villages, plus de 60% de la population était infectée (ALVAR *et al.*, 2012, AOUN & BOURABTINE 2014).

**Au Maroc**, la LV est endémique dans le Rift et les montagnes qui le bordent. Entre 2006 et 2008, plus de 150 cas/an ont été enregistrés. Depuis 1976, la LC à *L. major* qui était sporadique, est devenue endémique au Maroc. Des flambés soudaines de la maladie se sont produites dans le Sud et dans le Sud Est des montagnes de l'Atlas, et semblent s'être déplacées par vagues de l'Ouest à l'Est en quelques années. Dans les années 80, plus de 20 000 cas ont été recensés dans cette région. En 2001, le Ministère Marocain de la santé a enregistré 2028 cas de LC à *L. major* et *L. tropica*. Parmi les 3 espèces responsables de LC (*L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*), *L. tropica* est celle qui possède la plus grande distribution. En 2008, le nombre de cas a doublé, puisque 3414 cas ont été rapportés (ALVAR *et al.*, 2012, RHAJAOUI 2012).

### 2.3. Diagnostic

La LC peut être diagnostiquée par un examen direct des parasites fait à partir de grattages de lésions, ou de biopsies colorées par des colorants tel que le Giemsa. Les formes amastigotes sont faciles à observer sur des lésions actives ou récentes. La PCR est utilisée pour le diagnostic dans les pays où elle est disponible. Par ailleurs, les différentes espèces de *Leishmania* peuvent aussi être cultivées sur des milieux spécifiques, et certaines espèces sont difficiles à isoler. Les milieux les plus utilisés pour l'isolement et l'entretien des souches de *Leishmania* sont : NNN (Novy-MacNeil-Nicole), BHI (brain–heart infusion), EMTM (Evan's modified Tobie's medium), Milieu de Grace et Milieu de Schneider (PAN *et al.*, 1993).

L'inoculation des animaux tel que les hamsters peuvent aussi être utilisée, surtout lorsque le prélèvement est contaminé. Le diagnostic *in vitro* nécessite de 5 à 30 jours, alors que l'inoculation *in vivo* peut prendre quelques mois.

L'identification des espèces et sous espèces peut se faire par l'analyse des isoenzymes (MLEE), par PCR RFLP, ainsi que par des techniques immunologiques qui utilisent les anticorps monoclonaux (BANULS *et al.*, 2007). Parmi les tests les plus connus, le test de peau Montenegro consiste en une injection intradermique au niveau de l'avant-bras d'un mélange d'antigènes de *Leishmania* provoquant une induration chez les personnes positives. Bien que ce test soit spécifique, il est difficilement utilisable en zones endémiques, car il ne peut faire la distinction entre une infection passée, active ou asymptomatique (VIANA *et al.*, 2011). Certains tests d'agglutinations, comme le test d'agglutination direct (DAT), peuvent également être utilisés. Le test DAT, qui ne requiert que très peu de technologies, est facile d'utilisation, mais il est difficilement applicable dans les régions où plusieurs espèces de *Leishmania* sont présentes, car il est spécifique pour une seule espèce à la fois avec très peu de réactivité croisée (HAILU, 2002).

La LV peut elle aussi être diagnostiquée par les mêmes techniques que la LC. Les amastigotes peuvent se trouver dans le sang, dans les aspirations et biopsies de la rate, ainsi que dans la moelle osseuse, et les ganglions lymphatiques. La PCR, culture et inoculation animal (hamster), sont particulièrement utiles lorsque les parasites sont en petit nombre. Des tests

sérologiques, tel que l'IFI (immuno fluorescence indirecte) et l'ELISA peuvent être aussi utilisés dans le diagnostic. Le test de Montenegro est généralement négatif au cours de la LV, bien que des réactions positives peuvent être observées après guérison de la maladie.

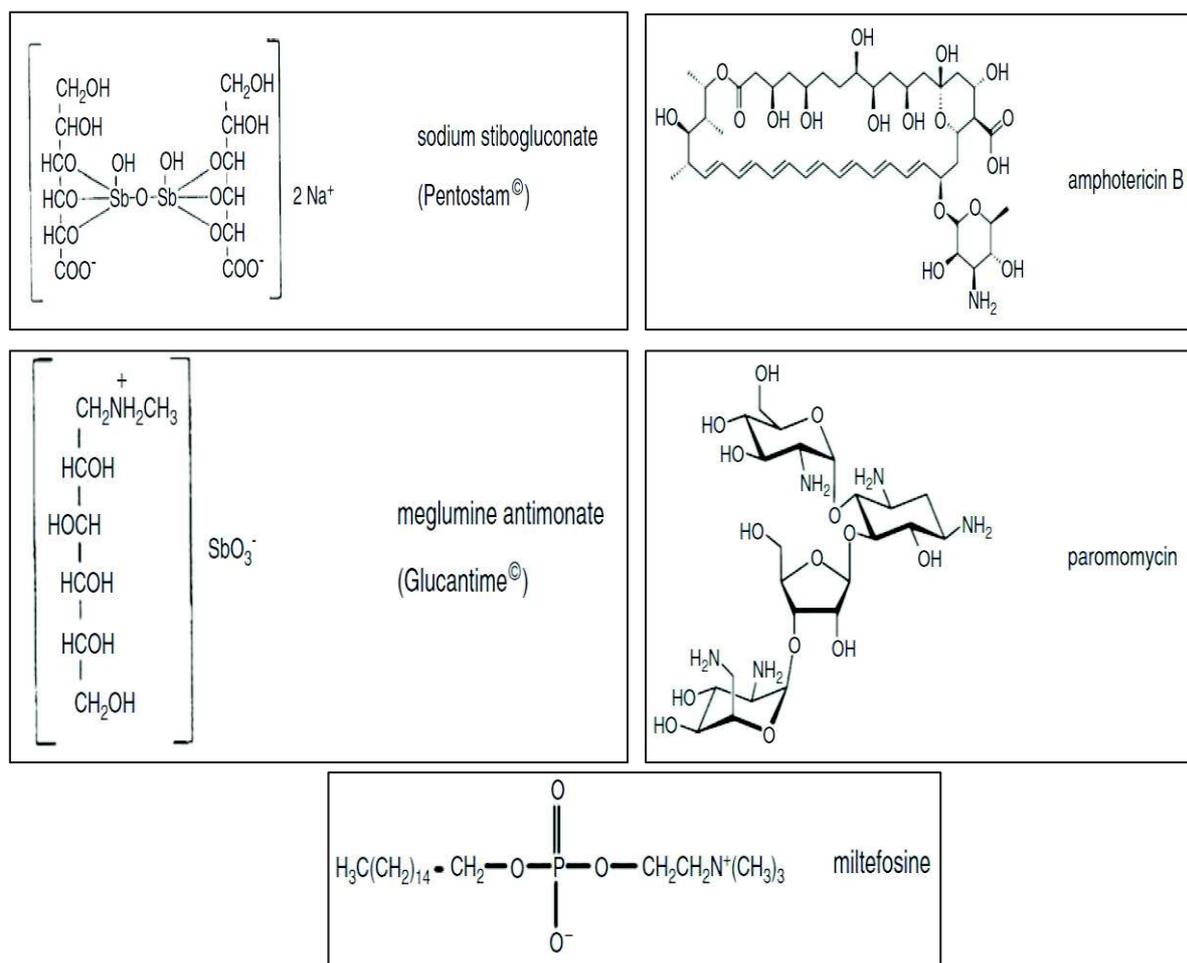
#### **2.4. Vaccins**

Il n'existe pas de vaccin permettant de se prémunir contre les infections causées par le parasite *Leishmania* chez l'humain. Cependant, un vaccin contenant l'antigène du ligand du fucose-mannose (FML), isolé pour la première fois chez *L. donovani* (PLATNIK *et al.*, 1989), est disponible. Il est commercialisé depuis 2004 au Brésil sous l'appellation Leishmune, afin de prévenir et de contrôler la leishmaniose viscérale canine (NOGUEIRA *et al.*, 2005). L'immunisation des chiens contre la leishmaniose viscérale dans certaines régions endémiques du Brésil a indirectement permis de réduire l'incidence des leishmanioses viscérales humaines en diminuant le nombre de chiens infectés pouvant servir de réservoir pour le parasite (PLATNIK *et al.*, 2009).

Bien que la leishmanisation soit une méthode controversée, elle est encore utilisée de nos jours dans certains pays tel que l'Afghanistan, l'Irak, l'Iran, Israël et l'Ouzbékistan (KEDZIRSKI *et al.*, 2006 ; KHAMESIPOUR *et al.*, 2005). Cette méthode de sensibilisation manque de standardisation et comporte des risques élevés de complications. Plusieurs groupes cherchent actuellement des moyens de contourner ces inconvénients, car l'inoculation de parasites vivants atténués ou tués demeure une méthode relativement efficace pour la prévention des leishmanioses cutanées (MODABBER, 1995 ; KHAMESIPOUR *et al.*, 2005 ; TABBARA *et al.*, 2005). Une autre approche intéressante consiste à utiliser des préparations à base de parasites vivants de *L. tarentolae*, une espèce non pathogène pour les mammifères, afin de stimuler le système immunitaire. Cette méthode a été utilisée avec succès pour immuniser des souris susceptibles qui ont par la suite développé une réponse immunitaire protectrice de type Th1 contre *L. donovani* (BRETON *et al.*, 2005).

#### **2.5. Traitements**

En l'absence de vaccin efficace contre la leishmaniose, le contrôle de cette maladie est directement lié aux agents chimiothérapeutiques. Le traitement de première ligne pour soigner cette infection est constitué des dérivés de l'antimoine pentavalent, tandis que les traitements de seconde ligne incluent la pentamidine, l'amphotéricine B, la miltéfosine et la paromomycine (Figure 14). Des problèmes liés à la résistance, à la toxicité et aux coûts élevés de ces traitements mettent en évidence le besoin criant de nouvelles molécules thérapeutiques.



**Figure 14** : Formule chimique des principales molécules utilisées dans le traitement de la leishmaniose (PONTE SUCRE,2013).

### 2.5.1. L'antimoine

L'antimoine pentavalent (SbV), est le principal traitement utilisé dans le monde depuis plus de 75 ans. Il a été introduit pour la première fois en 1945, après avoir été synthétisé chimiquement à partir d'une mixture d'acide stibonique et gluconique plutôt qu'une seule molécule (ROYCHOUDHURY *et al.*, 2008).

Pour toutes les formes de la leishmaniose deux formes de SbV sont utilisées : le stibogluconate de sodium (Pentostam<sup>®</sup>, GSK) et l'antimoniote de méglumine (Glucantime<sup>®</sup>, Rhone-Polenc) (Figure 14) (BERMAN, 2003). Le premier étant utilisé dans les pays anglosaxon alors que le deuxième est utilisé dans les pays francophones et hispaniques (AMATO *et al.*, 2008). Une forme générique du stibogluconate de sodium moins chère et plus efficace a été produite en Inde (MOORE *et al.*, 2001 ; RITMEIJER *et al.*, 2001).

Le SbV peut être aussi bien administré par voie intraveineuse que par voie intramusculaire. La dose recommandé par l'OMS est de 20mg/kg/jour pendant 20 jours consécutifs

(VANLERBERGHE *et al.*, 2007). Cependant son utilisation a plusieurs contre-indications : les patients doivent être hospitalisés 3 à 4 semaines et les effets secondaires sont fréquents (GUERIN *et al.*, 2002). Parmi les effets secondaires, on retrouve : douleurs abdominales, vomissement, nausées, diarrhée, fatigue, éruption, démangeaisons, fièvre, toux, défaillance hépatique, ainsi qu'une néphrotoxicité et cardiotoxicité (FREZARD & DEMICHELI, 2010). Par ailleurs, le SbV provoque fréquemment des pancréatites qui sont responsables de nausées et de douleurs abdominales. Heureusement, des effets secondaires plus graves tels que des arythmies et fibrillations ventriculaire et atriales ne se produisent que rarement. Le SbV est contre indiqué chez des patients souffrant de myocardite, d'hépatite et de pancréatite.

Bien que le SbV soit efficace dans plus de 95% des cas dans la majorité des pays endémiques, des échecs au traitement augmentent dans certaines régions tel que le nord du Bihar en Inde. Dans cette région plus de 65% des sujets n'ayant jamais été traité au SbV sont résistants au traitement (HAILU *et al.*, 2005 ; CROFT *et al.*, 2006). Ces rechutes après un traitement inadéquat permettraient de sélectionner des mutants résistants qui sont retransmis dans les foyers anthroponotiques. La majorité des cas de résistance résulte d'un sous dosage thérapeutique (<10 mg/kg/jour), et d'une réduction de la période de traitement recommandé. Les réponses variables dans différentes zones géographiques peuvent également être expliquées par l'existence de sous-espèces avec sensibilité variable aux médicaments. Et bien que cette réponse a souvent été démontré par des méthodes moléculaires, on ne connaît que très peu sur sa variabilité régionale qui n'a pas été évaluée de manière adéquate (AMATO *et al.*, 2008).

### **2.5.2. Amphotéricine B**

L'Amphotéricine B (AmB) est un macrolide polyène (Figure 14) isolé de *Streptomyces nodosus*. Il est utilisé pour le traitement des infections fongiques systémiques et est très efficace pour le traitement de la leishmaniose. En Inde où la résistance au traitement par l'antimoine est très importante, l'AmB a été administré à raison de 0,75 – 1 mg/kg pendant 15 à 20 de perfusions quotidiennes, avec des taux de réussite autour de 97%. Bien qu'aucune résistance primaire n'ai encore été décrites, des cas de rechutes occasionnelles (1%) ont été observées (SINGH *et al.*, 2006).

L'AmB est utilisée comme traitement de deuxième intention pour la LV, en cas d'échec de la thérapie à l'antimoine (MURRAY, 2001 ; SUNDAR & CHATTERJEE 2006). L'inconvénient majeur de l'utilisation de l'AmB étant sa toxicité, qui peut être significative. Suite aux perfusions des réactions tel que la fièvre, frissons, thrombophlébite, dysfonctionnement rénal, sont communes. Des réactions plus occasionnelles sont aussi observée tel que des myocardites, hypokaliémie sévère, et décès (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006). Bien que ce traitement nécessite de longues périodes d'hospitalisation, il représente cependant l'alternative de choix dans des régions de forte résistance au SbV.

### **2.5.2.1. Les formulations lipidiques de l'Amphotéricine B**

Les effets toxiques de l'AmB ont été largement atténués par l'introduction de formulations lipidiques (VAN GRIENSVEN & BOELAERT, 2011). Le Désoxycholate a été remplacé par d'autres lipides qui masquent le monomère AmB, en réduisant ainsi sa toxicité. La toxicité est réduite de manière significative en raison d'une faible absorption par les reins. Ces derniers étant les principaux organes cibles des effets secondaires. Par ailleurs, l'efficacité de l'AmB est maintenue étant donné que les formulations lipidiques ont tendance à être absorbées de façon préférentielle par les cellules réticulo-endothéliales.

Il existe actuellement trois formulations commerciales : L'AmB liposomale Ambisome<sup>®</sup>, un complexe lipidique Abelcet<sup>®</sup> et une dispersion colloïdale Amphocil<sup>™</sup> (SINGH *et al.*, 2006 ; SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

L'Ambisome<sup>®</sup> possède le plus haut index thérapeutique et une licence dans plusieurs pays européens et aux USA. Le traitement de la LV se fait par une administration par voie intraveineuse à raison de 18 – 24 mg/kg pendant 10 jours (ROSENTHAL *et al.*, 2009). Bien que la durée de l'hospitalisation soit courte, le coût élevé du produit restreint son utilisation par les pays en voie de développement (SINGH *et al.*, 2006 ; SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

### **2.5.3. La Miltefosine**

La Miltefosine (MIL), est aussi connue sous le nom de l'hexadécylphosphocholine (figure 14). C'est un alkyl phospholipide qui a été développé au départ comme agent antitumoral et qui s'est avéré très efficace contre la LV (OUELLETTE *et al.*, 2004). Cette molécule représente une avancée majeure puisqu'elle représente le premier médicament oral efficace contre la LV. La posologie est de 100–150 mg/jour pendant 28 jours avec un taux global de guérison de 94%.

Les principaux effets secondaires sont des troubles gastro-intestinaux légers à modérés (vomissements, diarrhée). D'autres effets secondaires tels que l'augmentation des enzymes hépatiques et une toxicité rénale peuvent être observés, mais qui restent réversibles (SINGH & SIVAKUMAR 2004 ; SUNDAR & CHATTERJEE, 2006). Par ailleurs, ce produit s'est avéré sûr et efficace en pédiatrie. Le principal inconvénient de cette drogue est son effet tératogène.

### **2.5.4. La Paromomycine**

La Paromomycine (aminoside, monomycine) est un aminoglycoside (figure 14), qui a été isolé dans les années cinquante à partir des filtrats de *Streptomyces krestomuceticus*. Il est actif aussi bien sur les bactéries Gram+, Gram- que sur les protozoaires. Au cours des années 90, le Tropical Disease Research (TDR), a développé la paromomycine, et plusieurs essais cliniques ont été réalisés en utilisant une formulation parentérale pour la LV et les deux formulations topiques et parentérales pour LC (DAVIDSON *et al.*, 2009 ; JHINGRAN *et al.*, 2009). Les effets indésirables

associés à l'administration parentale sont une toxicité cochléaire et rénale, mais dont la fréquence est très faible aux doses thérapeutiques chez les patients LV. De plus, aucune néphrotoxicité n'a été rapporté, l'ototoxicité est fréquemment rencontré (<1%), et une légère douleur au site d'injection a été le seul effet secondaire fréquemment rapporté chez 50% des patients (CHAPPUIS *et al.*, 2007 ; DAVIDSON *et al.*, 2009). Le traitement consiste en des injections journalières de 15 mg/kg pendant 21 jours avec un taux de réussite de 93% pour la LV (SINGH *et al.*, 2006).

Pour la LC, des résultats encourageants ont été obtenus en utilisant une formulation topique contenant 15% de Paromomycine et 12% de chlorure de benzéthonium de méthyle, un désinfectant qui a des propriétés inhibitrices de la croissance des promastigotes et des amastigotes (MITROPOULOS *et al.*, 2010).

La Paromomycine est actuellement le médicament anti-leishmanien le moins cher, le plus efficace, et le mieux toléré, disponible et qui a été proposé comme une alternative injectable à l'amphotéricine-B en Inde et en tant que substitut potentiel de l'antimoine dans le monde (MURRAY *et al.*, 2005).

#### **2.5.5. La Pentamidine**

La Pentamidine (Figure 14) est un dérivé synthétique de l'amidine qui a été le premier médicament utilisé pour les patients LV résistant au SbV. Le schéma thérapeutique est typique de 4 mg / kg par voie parentérale, trois fois par semaine pendant 3-4 semaines (SINGH & SIVAKUMAR, 2004 ; SINGH *et al.*, 2006). La Pentamidine a été utilisé avec succès à la fin des années 70 et au début des années 80 avec des taux de guérison élevés (98,8%), et sans rechute. Son efficacité a progressivement diminué depuis les années 80 à un taux de guérison de 70%. Le médicament a été souvent associé à des effets indésirables graves chez 30-50% des sujets traités (BALANA-FOUCE *et al.*, 1998), tels que le diabète sucré insulino-dépendant, hypotension, hypoglycémie, modifications électrocardiographiques, et la mort (SINGH *et al.*, 2006 ; MITROPOULOS *et al.*, 2010). En raison de cette toxicité, son utilisation comme médicament anti-leishmanienne était limitée, à l'exception d'une utilisation très occasionnelle comme un médicament de deuxième ligne quand les antimoniés se sont avérés inefficaces (CROFT & COOMBS, 2003).

La Pentamidine est maintenant totalement abandonnée comme traitement de deuxième ligne en raison de sa toxicité et de l'émergence de la résistance à ce produit (SINGH & SIVAKUMAR, 2004).

#### **2.6. Contrôle et prévention**

La lutte contre les leishmanioses consiste à agir sur les différents maillons de la chaîne de transmission afin de rompre le cycle évolutif du parasite. L'action au niveau de l'homme

consiste au traitement de tous les cas de leishmaniose diagnostiqués. De plus, les individus vivant en zone d'endémie, doivent se protéger de la piqûre des phlébotomes, en appliquant sur la peau des produits répulsifs tels que le diéthyltoluamide, en utilisant des moustiquaires imprégnées d'insecticides (Permethrine ou Deltamethrine) et en portant des vêtements protecteurs longs.

L'action au niveau du réservoir consiste en l'abattage des chiens errants. Un dépistage de masse doit être fait reposant sur la sérologie, et en cas de positivité, les chiens doivent être abattus. L'alternative collier Scalibor (colliers imprégnés d'insecticides), doit être utilisée chez les chiens vivant en zone d'endémie. De plus, il faut mettre en place un système de surveillance permanent, par l'inscription des chiens sur un registre et rendre obligatoire un permis de possession.

Pour les méthodes de lutte contre les rongeurs, elles doivent être adaptées à la biologie de chaque espèce et elles consistent en : La destruction des terriers et l'élimination des chénopodiacées pour *Psammomys obesus* qui se nourrit exclusivement de ces plantes, le traitement des terriers avec des graines empoisonnées de phosphore de zinc pour *Meriones schawi*, et la lutte contre le vecteur. Pour ce dernier le DDT reste l'insecticide de choix à cause de son faible coût, de son efficacité élevée, et de sa longue durée de rémanence et de sa relative innocuité. La lutte anti vectorielle consiste en une pulvérisation d'insecticides à effet rémanent en intra et péri-domiciliaire. Cependant la lutte contre les larves des phlébotomes est très difficile vu leurs caractères terricoles ce qui les rend inaccessibles.

### **3. Mode d'action et Mécanismes de résistance aux drogues**

#### **3.1. L'Antimoine**

Malgré l'utilisation d'antimoine depuis des décennies, le mécanisme d'action n'est encore pas entièrement compris, et certains aspects cruciaux du métabolisme de l'antimoine restent à caractériser. Il est généralement admis que le l'antimoine pentavalent (SbV) est une pro-drogue qui requiert une réduction biologique sous forme d'antimoine trivalent (SbIII), pour exercer son activité anti-leishmanienne. Cependant, son site d'action spécifique au niveau du macrophage et/ou de l'amastigote, et son mécanisme exact de réduction (enzymatique ou non enzymatique) reste controversée (ROBERTS *et al.*, 1995 ; ROYCHOUDHURY & ALI, 2008).

Afin d'être actif, l'antimoine doit entrer dans le macrophage, et à travers la membrane phagolysosomale agir contre le parasite intracellulaire, et bien que la voie d'entrée du SbV ne soit pas connue, on pense qu'il entre via une protéine qui reconnaît la moitié d'un semblant de sucre (ASHUTOSH *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'une fois que la réduction se produit dans le macrophage, le SbIII doit être transporté dans le parasite, grâce aux propriétés des aquaporines qui sont des protéines membranaires qui permettent le transport des petits

solutés neutres, et plus particulièrement à l'aquaporine 1 chez *Leishmania* (GOURBAL *et al.*, 2004).

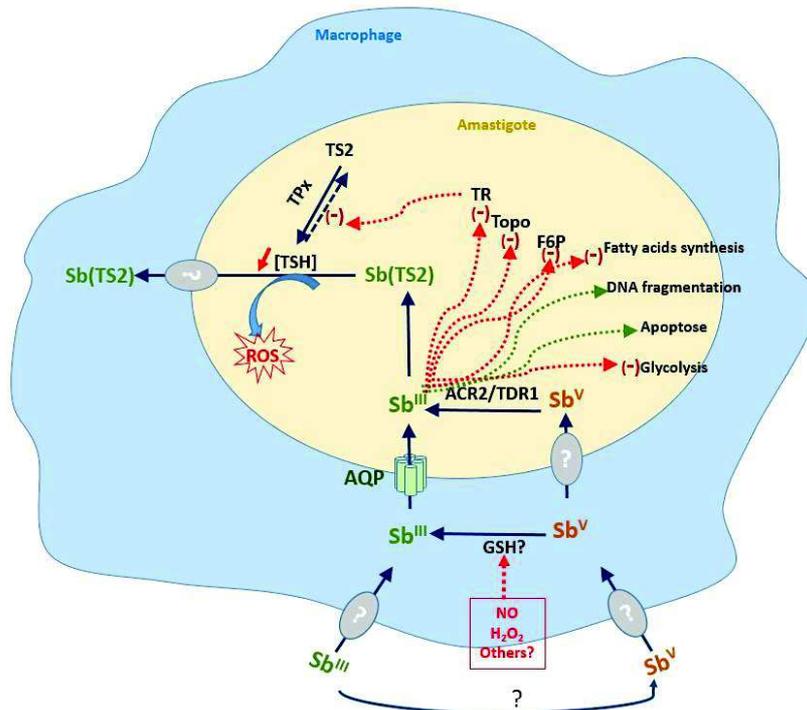
Par ailleurs, aussi bien le SbV, que le SbIII peuvent s'accumuler dans le parasite, et comme les deux formes n'entrent pas par la même voie, il reste à caractériser la voie d'entrée du SbV. La bio-activation de l'antimoine reste incertaine. Une étude a montré que la réduction se produisait chez l'amastigote (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001), alors que d'autres études suggèrent que la réduction se ferait dans le macrophage (ROBERTS *et al.*, 1995 ; EPHROS *et al.*, 1999). Selon OUELLETTE *et al.* 2004, bien que ses résultats ne soient pas compatibles, il est possible que la réduction du SbV en SbIII se produisent aussi bien dans la cellule hôte que dans le parasite (figure 15).

Deux voies non enzymatique thiol dépendante permettant la réduction du SbV en SbIII spécifique du parasite ont été proposées, l'une étant spécifique du parasite (Trypanothione) et l'autre spécifique du macrophage (Glycylcystéine) (FREZARD *et al.*, 2001 ; FERREIRA *et al.*, 2003). Par ailleurs d'autres études ont suggérées la participation d'enzymes spécifique du parasite tel qu'une thiol dépendante réductase (TDR1) (DENTON *et al.*, 2004), et d'une antimoine réductase (ACR2) (ZHOU *et al.*, 2004). La TDR1 qui utilise le glutathion comme agent réducteur est très abondante dans la forme amastigote ; alors que l'ACR2 requiert le glutathion et la glutaredoxine comme cofacteurs pour l'activité enzymatique (ZHOU *et al.*, 2004).

### **3.2. Amphotéricine B**

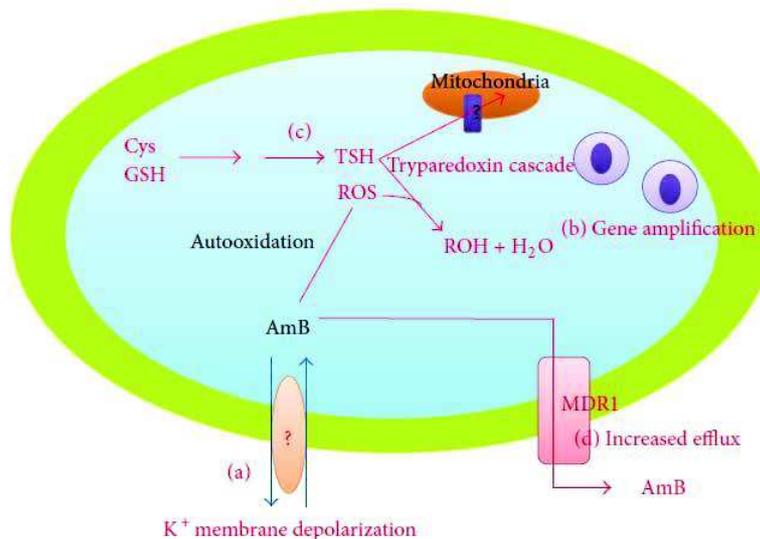
Les macrolides de polyènes se lient à l'ergostérol, le stérol principal des cellules fongiques et des membranes de la cellule de *Leishmania* (figure 16). Des pores transmembranaires sont formés entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire et l'afflux d'ions, conduisant ainsi à la mort de la cellule fongique / parasitaire (BALANA- FOUCE *et al.*, 1998; AMATO *et al.*, 2008).

L'AmB est aussi toxique par sa liaison de faible affinité au cholestérol des membranes des cellules de mammifères (SINGH & SIVAKUMAR 2004). L'échec au traitement est rarement observé (MOORE & LOCKWOOD, 2010). Cependant, il a été démontré expérimentalement qu'une résistance à l'AmB était possible par des changements de la composition membranaire en stérols (AL-MOHAMMED *et al.*, 2005).



**Figure 15: Représentation schématique du mode d'action de l'antimoine**

Le SbIII et SbV peuvent induire la production du NO et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui sont nuisibles pour les parasites intracellulaires. L'entrée du SbV dans le parasite se fait par un transporteur inconnu, alors que celle du SbIII se fait à travers une aquaporine AQP1. A l'intérieur de *Leishmania* le SbV est réduit en SbIII par l'action des réductases ACR2 et TDR1. Le SbIII peut inhiber plusieurs enzymes tel que la Fructose 6 Phosphatase (F6P), la Trypanothione réductase (TR). Le SbIII interfère avec la défense antioxydante du parasite par l'inhibition de la TR et la formation du complexe SbIII-TSH activement exporté. TPx, Tryparedoxine, TSH, Trypanothione réduit; TS2, Trypanothione oxydé; Sb(TS)2, SbIII conjugué au trypanothione



**Figure 16 : Les mécanismes de résistance de *Leishmania* à l'Amphotéricine B (KAUR & RAJPUT, 2014)**

- (a) Changements de la fluidité membranaire induit le blocage de l'entrée de médicament à l'intérieur de la cellule.
- (b) L'amplification des gènes confère une résistance
- (c) L'activation de la cascade tryparedoxine prévient les dommages oxydatifs provoqué par la drogue.
- (d) augmentation de l'efflux des drogues à travers diverses pompes membranaires tel que MDR1.

### 3.1. La Pentamidine

Le mode d'action et les mécanismes de résistance de la pentamidine sont encore mal compris. La mitochondrie semble être une cible importante qui interfère avec la synthèse de l'ADN, modifiant ainsi la morphologie du kinétoplaste, avec fragmentation de la membrane mitochondriale, tuant ainsi le parasite (GOTO & LINDOSO, 2010). Chez les promastigotes résistants à la pentamidine *in vitro*, on retrouve une réduction de l'accumulation des drogues dans la mitochondrie et le cytoplasme (MUKHERJEE *et al.*, 2006).

### 3.2. La Miltefosine

Les études réalisées à ce jour ont utilisé des souches résistantes à la miltefosine (MIL) induite en laboratoire puisqu'aucun isolat résistant n'a été encore signalé. (SEIFERT *et al.* 2003 ; PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Parmi les mécanismes de résistance possibles, la réduction de l'absorption du médicament, un efflux rapide du médicament, et / ou des changements dans la perméabilité de la membrane plasmique. Une réduction de l'accumulation intracellulaire de la MIL a été associée à une surexpression du gène MDR1 de la P-Glycoprotéine (PONTE SUCRE, 2013).

Les parasites résistants à la Miltefosine présentent une diminution du contenu en stérol rendant la membrane plasmique plus rigide en raison de la présence de plus de chaînes de phospholipides saturés (SAINT-PIERRE-CHAZALET *et al.*, 2009).

### 3.3. La paromycine

Bien que le mécanisme d'action de la Paromomycine ne soit pas totalement compris, l'interférence avec les ribosomes mitochondriaux, l'induction d'un dysfonctionnement respiratoire mitochondriale et la dépolarisation de la membrane ont été impliqués.

Le potentiel membranaire mitochondriale a été diminué de manière significative après 72 h d'exposition à la Paromomycine, ce qui indique que cet organe peut être la cible de la drogue (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010). Après la liaison de la Paromomycine à la surface du parasite, l'internalisation semble se faire par endocytose. Une fois dans la cellule, le médicament pénètre dans la mitochondrie, ce qui provoque un dysfonctionnement respiratoire de la nature métabolique (MAAROUF *et al.*, 1997 ; JHINGRAN *et al.*, 2009). Un autre mécanisme d'action de la Paromomycine se fait par l'inhibition de la synthèse protéique en interagissant avec la sous-unité de l'ARN ribosomal (PONTE SUCRE, 2013).

#### **4. La réponse immunitaire de *Leishmania* : mécanisme de contrôle parasitaire et d'évasion**

Dès que le phlébotome pique l'hôte mammifère, il se produit une dégradation tissulaire, nécessitant une réparation. Les macrophages et neutrophiles vont être recrutés au niveau du site d'inoculation, indépendamment de la présence d'agents infectieux. Au cours de cette réparation tissulaire, les parasites vont s'installer et se développer dans les phagolysosomes des macrophages (RITTIG & BOGDAN, 2000). Ces derniers sont une niche très intéressante pour le parasite car ils possèdent une longue durée de vie, leur laissant amplement le temps de se transformer sous forme amastigote et de se multiplier.

##### **4.1. Inoculation des parasites et apoptose.**

Des études effectuées avec les phlébotomes, ont estimé qu'environ 600 à 1 000 parasites, fortement enrichis en métacycliques, étaient libérés par l'insecte lors d'un repas sur membrane en laboratoire (ROGERS *et al.*, 2004). En plus des parasites infectieux, l'*inoculum* contient des parasites morts ou apoptotiques, de la phosphatidyle sérine, et des composés de la salive de l'insecte qui vont avoir un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte mammifère. Par ailleurs, des virus et des bactéries peuvent aussi être transmis par les phlébotomes en même temps que le parasite (KAYE, & SCOTT, 2011).

##### **4.2. Evasion au système du complément.**

Cette évasion est différemment effectuée en fonction des espèces de *Leishmania*. Dans le cas de *L. major*, les promastigotes procycliques sont sensibles à la lyse par le complément, alors que les métacycliques qui ont des flagelles deux à trois fois plus long empêchent l'ancrage du complexe C5b-C9 du complément, et ainsi la lyse cellulaire (SACKS, 1992). Pour *L. donovani*, il se produit une fixation préférentielle du C3bi, inhibant la lyse par le complément (PUENTES *et al.*, 1989) et favorisant l'opsonisation. La GP63, dix fois plus abondante chez les métacycliques que chez les procycliques, participe à la conversion du C3b en C3bi. De plus, plusieurs protéines kinases du parasite inhibent la cascade de réaction du complément par phosphorylation de ses composés (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998). Une infection silencieuse des macrophages par les promastigotes métacycliques se fait sans activer le système immunitaire.

##### **4.3. Modulation de l'apoptose des neutrophiles et la stratégie du cheval de Troie.**

C'est uniquement au sein des cellules phagocytaires mononucléées que *Leishmania* se différencie, se multiplie et survit sur du long terme. Bien que, les neutrophiles infiltrent rapidement le site d'inoculation et phagocytent les parasites, ces derniers ne se multiplient pas, et ne se différencient pas au sein des neutrophiles (LAUFS *et al.*, 2002). Les neutrophiles qui deviennent apoptotiques sont alors phagocytés par l'intermédiaire de récepteurs qui n'induisent pas l'établissement de défense antimicrobienne au sein des macrophages,

permettant ici encore une entrée silencieuse des parasites au sein du phagosome des macrophages (KAYE & SCOTT, 2011). Les parasites se servent des neutrophiles comme cheval de Troie pour entrer dans les macrophages (Figure 17). Cependant, les neutrophiles arrivent à éliminer en partie *Leishmania* en sécrétant le piège extracellulaire des neutrophiles (NET, de l'anglais *neutrophil extracellular traps*), qui est constitué d'un piège fibreux d'ADN, d'histones et de granules protéiques relargués par le neutrophile lors de leur lyse (GUIMARAES *et al.*, 2009).

Durant les premières heures de l'infection, les cellules dendritiques phagocytent également *Leishmania*, mais les macrophages sont la population cellulaire infectée dominante après 24h (PETERS *et al.*, 2008). Une fois dans le phagolysosome des macrophages, *Leishmania* se transforme en sa forme amastigote afin de s'adapter à son nouvel environnement et de proliférer. La multiplication de *L. major* et *L. donovani* se fait dans des petites vésicules contenant un seul amastigote alors que pour les espèces du Nouveau Monde, la prolifération a lieu dans une seule vésicule remplie d'amastigotes (CASTRO *et al.*, 2006). Afin d'éviter la détection par le système immunitaire et d'augmenter les chances de transmission à un nouvel insecte, *Leishmania* doit maintenir une balance rigoureuse entre prolifération et discrétion. Pour les espèces de viscéralisation (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), la prolifération est synchronisée à la dissémination du lieu de piqûre aux organes internes, tels que le foie, la rate et la moelle osseuse (BOGDAN, 2008). La multiplication des parasites provoque la lyse de la cellule immunitaire et les amastigotes ainsi libérés vont alors être phagocytés par d'autres cellules phagocytaires et continuer leur prolifération.

#### **4.4. Mécanismes de survie dans le phagosome et le phagolysosome**

##### **4.4.1. Les différents types de macrophage.**

Les infections parasitaires au niveau du derme sont principalement contrôlées par une réponse immunitaire adaptative. Les cellules T CD4<sup>+</sup> constituent la population cellulaire effectrice la plus importante dans les infections par *Leishmania* et dirigent la réponse de l'hôte à l'infection. Chez l'homme et la souris, les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être subdivisées en au moins deux sous-groupes de cellules T helper (Th) polarisées, Th1 et Th2, en fonction de leur sécrétion de cytokines (MAURER *et al.*, 2009). Ce sont ces cytokines qui vont dicter la maturation des macrophages.

L'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), sécrété par des cellules Th1 ou Natural Killer (NK), va activer la voie classique. Ces macrophages, tissulaires, possèdent une activité microbicide et sont nécessaires pour contrer les infections à *Leishmania*. Alors que les Th2 vont sécréter les IL-4 qui vont activer la voie alterne, produisant ainsi des macrophages impliqués dans la réparation tissulaire, sans activité microbicide. La sécrétion d'IL-10 par des cellules T régulatrices participe à la maturation des macrophages « régulateurs », spécialisés dans la réponse anti-inflammatoire de l'organisme (MOSSER & EDWARDS, 2008). Seuls ces deux derniers types

d'activation produisent des macrophages non microbicides, permissifs aux infections par *Leishmania*. La résistance ou la susceptibilité aux infections à *L. major* est donc respectivement associée au développement d'une réponse immunitaire à dominance Th1 ou Th2 (MOUGNEAU *et al.*, 2011 ; FILARDY *et al.*, 2011).

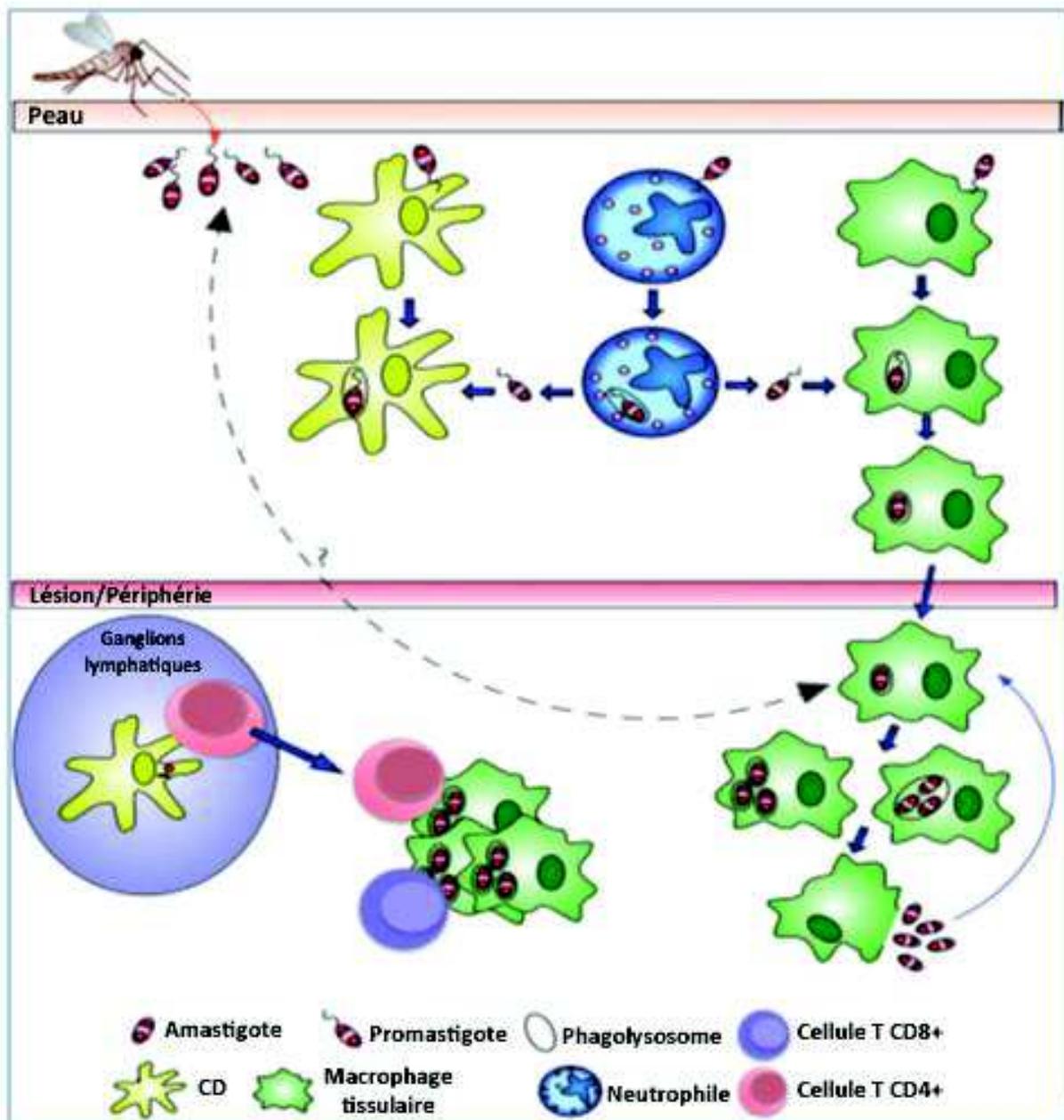


Figure 17 : Stratégie du cheval de Troie de l'infection par *Leishmania* de l'hôte mammifère (CD : cellule dendritique) (BEATTIE & KAYE, 2011)

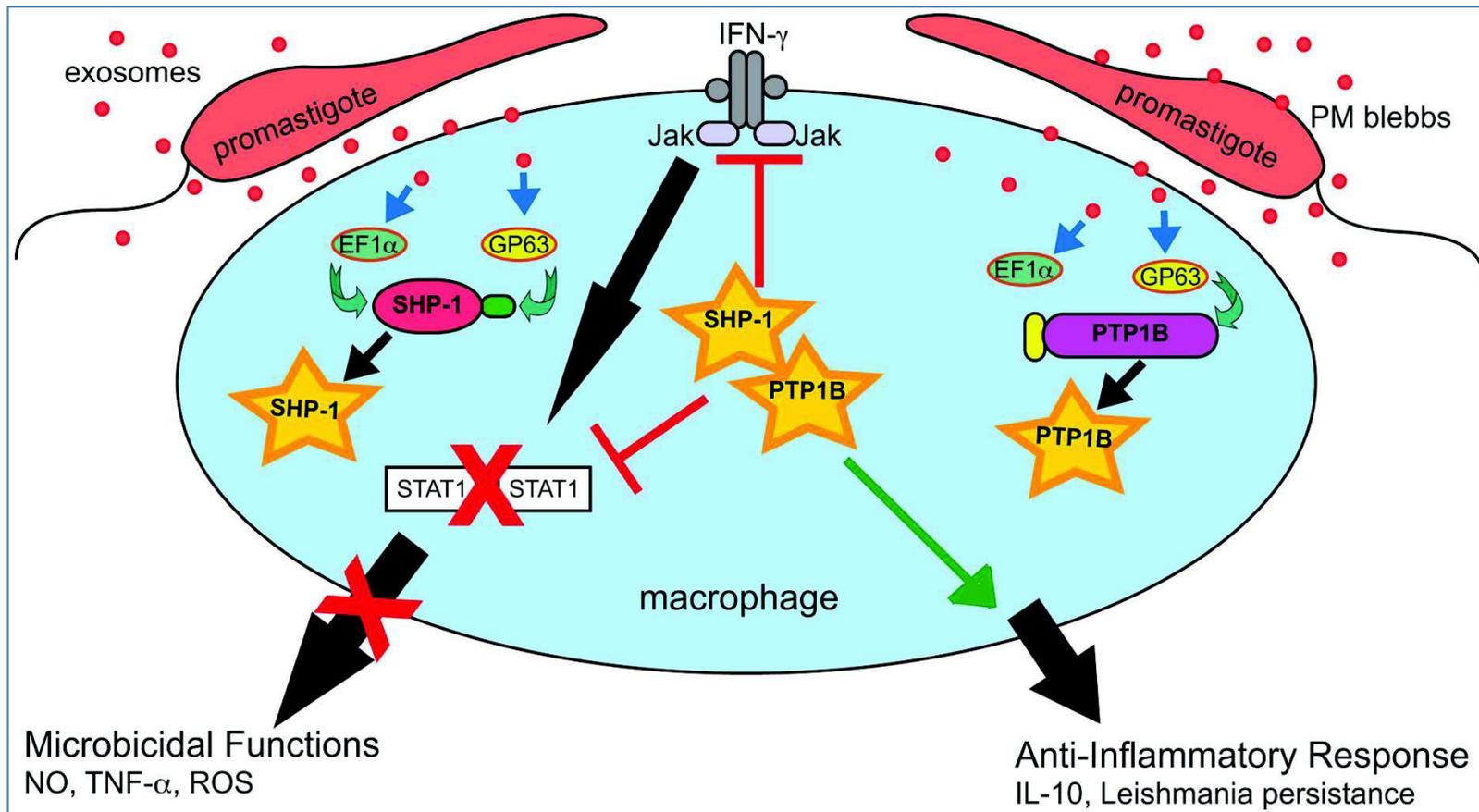
#### 4.4.2. Phagocytose par les macrophages et fusion phagosomes – lysosomes.

Pour les promastigotes, les récepteurs membranaires du macrophage interagissent avec les molécules de surface du parasite. Les protéines GP63 et LPG interagissent directement avec les récepteurs de la cellule immunitaire CR1 et CR3, ou indirectement suite à l'opsonisation du parasite. CR3 semble favorisé puisqu'il lie le C3bi, et de plus, il ne provoque pas de stress oxydatif pendant la phagocytose (MOSSER & EDELSON, 1985). Les récepteurs aux fibronectines, au mannose-fructose, ou encore à la protéine C réactive interviennent également (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998). Alors que pour les amastigotes, les molécules de surface sont différentes de celles des promastigotes métacycliques. Le système immunitaire a eu le temps de mettre en place une réponse immunitaire humorale et les amastigotes peuvent être phagocytés en utilisant les récepteurs Fc du macrophage, suite à l'opsonisation du parasite par des anticorps spécifiques (GUY & BELOSEVIC, 1993). La phagocytose de *Leishmania* par le macrophage est un mécanisme qui reste silencieux favorisant la survie du parasite (CUNNINGHAM, 2002). Suite à l'attachement, les parasites sont internalisés dans la vacuole parasitophore (ou phagosome) via des pseudopodes générés par le macrophage (RITTIG & BOGDAN, 2000).

Par ailleurs, il a été montré que les exosomes sécrétés par les parasites pouvaient libérer des facteurs de virulence au sein du cytoplasme des macrophages et contribuer à la pathogénicité (figure 18). Leur rôle immunosuppresseur a été démontré chez la souris, en inhibant la production de TNF- $\alpha$  et stimulant celle de l'IL-10 (SILVERMAN *et al.*, 2010). Les domaines lipidiques des macrophages semblent avoir un rôle dans la pénétration des facteurs de virulence de *Leishmania* dans le cytosol. *L. donovani* est capable d'interférer sur la présentation antigénique des macrophages en modulant ces microdomaines et inhiber la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes (WINBERG *et al.*, 2009). Ce ralentissement de la fusion va permettre aux métacycliques d'initier leur différenciation en amastigotes, une forme plus résistante aux hydrolases concentrées dans le lysosome. La transformation de promastigote en amastigote, associée à l'arrêt de l'expression de LPG par le parasite, est concomitante à l'arrêt de l'inhibition de la fusion lysosome-phagosome (DESJARDINS & DESCOTEAUX, 1997).

#### 4.4.3. La différenciation intracellulaire des promastigotes en amastigotes

La fusion des phagosomes aux lysosomes et la chute de PH qui en résultent, ainsi que le changement de température du vecteur à celle de l'hôte mammifère, semblent cruciales pour la survie du parasite. La température de l'insecte vecteur est généralement de 25°C et le pH est relativement basique, autour de 8.0 dans l'intestin de l'insecte. Au sein du phagolysosome d'organismes thermostables, la température est plus constante et plus élevée (34°C à 37°C chez l'homme en fonction de la pénétration dermique ou viscérale), le pH acide se situe entre 4.5 – 6.0 et les parasites sont en plus exposés aux attaques oxydatives (BEATTIE & KAYE, 2011). Ces changements initient la transformation des promastigotes métacycliques en amastigotes,



**Figure .18 : L'Exosome de *Leishmania* cible la machinerie de signalisation de la cellule hôte pour créer un environnement pro-parasitaire anti-inflammatoire propice à l'invasion de *Leishmania* et la mise en place d'une infection.** L'Exosome délivre des effecteurs tel que la GP63 et l'EF-1α, qui ciblent la cellule hôte, dont les macrophages. Il en résulte l'activation de plusieurs protéines tyrosine phosphatases, tel que la SHP-1 et la PTP1B. Il en résulte une destruction du signal de traduction avec inhibition des fonctions microbicides du macrophage (SILVERMAN & REINER, 2012).

avec une forte atrophie du flagelle, une réduction de la taille de la cellule, son arrondissement et un remaniement des protéines membranaires. Les nutriments disponibles varient entre l'intestin des insectes et le phagolysosome des macrophages, demandant également des adaptations métaboliques de *Leishmania* entre stades promastigotes et amastigotes (BRINGAUD *et al.*, 2006 ; NADERER & MC CONVILLE, 2008).

#### **4.5. Implication de virus de *Leishmania* dans la sévérité de l'infection.**

Les parasites *Leishmania* sont eux-même parasitables. Chez quelques parasites d'Amérique du sud (sous-genre *Viannia*), *Leishmania* contient un virus à double brin d'ARN de la famille des *Totiviridae* : LRV1 (pour *Leishmania RNA virus 1*) (SALINAS *et al.*, 1996 ; STUART *et al.*, 1992). Celui-ci modifie la virulence des parasites ainsi que la métastase parasitaire (HARTLEY *et al.*, 2012).

Le développement d'une leishmaniose mucocutanée est en général observé après la guérison d'une lésion primaire et est associé à une réponse inflammatoire incontrôlée. Il a été démontré que des parasites *L. guyanensis* infectés par LRV1 stimulaient la production de molécules pro-inflammatoires par les macrophages, tel que TNF- $\alpha$  par exemple. Cette réponse au virus est effectuée via le récepteur TLR3 (pour *Toll-like receptor 3*), un récepteur de l'ARN double-brin situé notamment sur la membrane de la vacuole parasitophore. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'ARN viral est libéré par les parasites lysés rapidement après l'infection et que la liaison de l'ARN viral avec TLR3 induit la production de cytokines augmentant la réponse inflammatoire et exacerbant ainsi la maladie (IVES *et al.*, 2011). Cette récente découverte nécessite plus de données pour définir l'importance épidémiologique et clinique de ce phénomène.

## **5. Modèles murins de la leishmaniose**

Les modèles animaux ont toujours joué un rôle essentiel dans l'exploration et la caractérisation de la physiopathologie de la maladie, l'identification des cibles, et dans l'évaluation *in vivo* de nouveaux agents thérapeutiques et des traitements. Au cours de la leishmaniose, il est capital de comprendre comment les souches résistantes au traitement et virulentes diffusent et sont contrôlés par le système immunitaire de l'hôte. Différents aspects immunologiques et thérapeutiques de la LC et de la LV ont été étudié chez les modèles animaux, tel que la souris, le hamster, les chiens, et les primates.

### **5.1. Modèle de la LC**

Afin d'étudier la LC, plusieurs modèles animaux ont été mis au point. Les parasites sont généralement injectés par voie intradermique dans le coussinet plantaire, la base de la queue ou dans le pavillon de l'oreille. L'inoculum varie selon le mode de l'injection puisqu'il peut être

très faible pour l'intradermique oreille (de 100 à 1000 parasites) (BELKAID *et al.*, 1998), alors que pour les sites d'injection les concentrations doivent être plus importantes ( $10^5$  à  $10^7$  parasites).

### 5.1.1. Le patrimoine génétique des souris

Les études sur le phénotype de l'infection chez des souris consanguines ayant un patrimoine génétique différent ont permis l'identification de plusieurs locus impliqués dans la lutte contre les infections. L'analyse de la taille des lésions dans la descendance des croisements entre les souris résistantes et sensibles après une infection par voie intradermique avec *L. tropica* a conduit à l'hypothèse selon laquelle la sensibilité (C57BL/6 x BALB/c) ou la résistance (C3H/HeN x P/J) à la LC peuvent être contrôlés par un locus unique avec des influences mineures par d'autres gènes (DE TOLLA *et al.*, 1981 ; FORTIER *et al.*, 1984). Toutefois, le fait que tous les animaux présentant des lésions cutanées ne développeront systématiquement une infection suggère que des gènes différents peuvent être impliqués dans ces deux formes de la maladie (LOEUILLET *et al.*, 2016).

### 5.1.2. Le contrôle immunitaire de l'infection

Pour la LC induite par *L. major*, le type de réponse immunitaire Th1 ou Th2 sont respectivement associées à la résistance ou à la sensibilité, (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Alors qu'au cours de la LV à *L. donovani*, on observe une réponse mixte Th1 / Th2 au cours de l'infection. En effet, chez les souris résistantes (C57BL / 6), nous observons une réponse de type Th1, associée à une production de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL12. Par ailleurs, peu de parasites restent viables au niveau du site d'inoculation grâce à la présence de cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> qui produisent de l'IL10 (BELKAID *et al.*, 2002). A l'inverse, chez les souris sensibles (BALB / c), il se développe une réponse de type Th2 avec production de l'IL4, conduisant à l'apparition de lésions non contrôlées et à une dissémination de l'infection dans les viscères. Les cellules T régulatrices qui produisent les cytokines IL4 et IL10 jouent également un rôle dans l'expansion de la maladie, ou dans la régulation de la population Th2 (BELKAID, 2003). Chez ces souris, la gravité des lésions est aussi associée à la production d'IL 17 qui favorise la migration des neutrophiles et ainsi la progression lésion (LOPEZ *et al.*, 2009). Dans les modèles murins de la LC, plusieurs types de cellules sont retrouvées dans les lésions : les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles, les lymphocytes, les mastocytes, et les cellules NK (LIMA *et al.*, 1996 ; BELKAID *et al.*, 2000, MCEL RATH *et al.*, 1987, CANGUSSU *et al.*, 2009). Ces cellules jouent un rôle dans les différentes phases de l'infection: (i) la phase silencieuse (pas de formation de la lésion ou la détection de l'inflammation), l'invasion parasitaire des macrophages et des neutrophiles cutanées; (ii) le développement d'une lésion associée à la migration et l'activation des cellules du système immunitaire inné (les mastocytes, les neutrophiles, les monocytes); (iii) une lésion involutive avec la migration des cellules dendritiques et des lymphocytes T; et (iv) en phase chronique caractérisée par la

résolution des lésions et parasites associés à la persistance, principalement dans les macrophages, et une immunisation à vie (BELKAID *et al.*, 2000).

### **5.1.3. Le génotype parasitaire**

Peu de travaux ont abordé l'impact de la variabilité naturelle de la virulence de différentes souches de *L. major* dans le même modèle de souris et la réponse immunitaire associée. Au cours d'une infection de deux clones issus de la même souche de *L. major*, Li et col ont constaté que le clone S2 non virulent caractérisé par une guérison spontanée des lésions, n'a pas été corrélée avec sa capacité d'infecter les macrophages, ni avec la dose inoculée, mais plutôt avec des facteurs parasitaires (LI *et al.*, 1997).

L'étude des résultats de l'infection chez des souris BALB / c inocuées avec 19 souches *L. major* (12 à partir de la Tunisie, zymodème 25 et 7 du Moyen-Orient, zymodème 26, 68, 70 ou 103) ont révélé une grande hétérogénéité de la gravité de la maladie (taille de la lésion du coussinet plantaire) (KEBAÏER *et al.*, 2001).

### **5.1.4. La dose parasitaire**

La dose inoculée peut influencer sur la réponse immunitaire et ainsi que sur la gravité de la LC, et ce en fonction du patrimoine génétique de la souris. Chez des souris sensibles BALB/c, des doses élevées ( $10^5$  à  $10^7$  parasites) conduisent à une infection persistante associée à une réponse immunitaire Th2, alors que de faibles doses ( $10^1$  ou  $10^2$  parasites) induisent une réponse Th1 et pourraient donc être utilisés dans des études de vaccination. Cependant, une « séroconversion » peut se produire 9 à 18 mois après l'infection. Avec des doses intermédiaires ( $10^3$ - $10^4$  parasites), une réponse immunitaire mixte Th1-Th2 est observée.

Chez les souris résistantes C57BL/6, le développement des lésions est observé uniquement avec des doses élevées ( $10^6$ - $10^7$  parasites). L'inoculation de faibles doses (100 promastigotes métacycliques) au niveau d'un site cutané (par exemple, le derme de l'oreille) est recommandée pour imiter la transmission naturelle, et induit deux phases distinctes de la maladie (BELKAID *et al.*, 2000, LIRA *et al.*, 2000). Tout d'abord, une phase cliniquement silencieuse se produit pendant les 4 à 6 premières semaines. Elle se caractérise par l'absence de lésions et de l'augmentation de la charge parasitaire. Pendant la deuxième phase, les lésions se développent (induration du coussinet plantaire) associée à une infiltration de cellules immunitaires sur le site de l'infection. Concomitamment, les cellules Th1 se développent dans les ganglions lymphatiques drainant, conduisant finalement à la réduction de la charge parasitaire et à la guérison des lésions.

### **5.1.5. Le site d'inoculation**

Dans les études expérimentales de la LC, seule la voie d'inoculation intradermique est utilisée, mais à différents sites : patte arrière, pavillon de l'oreille et de base de la queue (tableau III). Selon le site d'inoculation, les signes cliniques (taille de la lésion et la réponse immunitaire)

diffèrent nettement. En outre, le profil de production de cytokines ne permet pas toujours d'expliquer la gravité de la maladie (NABORS & FARELL, 1994 ; BALDWIN *et al.*, 2003).

Chez les souris BALB /c, des lésions graves qui ne cicatrisent pas ont été observées quel que soit le site d'inoculation (NABORS & FARELL, 1994 ; BALDWIN *et al.*, 2003). Ils ont été associés à une réponse immunitaire Th2 classique. Chez les souris SWR, l'inoculation à la base de la queue conduit au développement de grandes lésions qui ne guérissent pas, alors que les lésions guérissent après l'inoculation dans le coussinet plantaire (NABORS & FARELL, 1994). Contre toute attente, l'inoculation à la base de la queue induit une réponse immunitaire de type Th1, qui est normalement associée à des lésions cicatrisantes.

Cette dichotomie a également été observée chez les souris résistantes, telles que la souche C57BL/6J. Après l'inoculation dans le pavillon de l'oreille, la réponse Th1 classique a été associée à l'apparition de petites lésions cicatrisantes. A l'inverse, l'inoculation du parasite à la base de la queue, induit une réponse Th2 qui était inattendue associée à la guérison des lésions (BALDWIN *et al.*, 2003). Ainsi, en plus de la concentration de l'inoculum et du patrimoine génétique de la souris, le site d'infection affecte également la gravité de la LC.

**Tableau III : Influence du site d'inoculation sur la taille de la lésion et la réponse immunitaire au cours de la LC (LOEUILLET *et al.*, 2016)**

Site d'inoculation	Souche de souris	Site de lésion	Réponse Th1	Réponse Th2
<b>Coussinet plantaire</b>	BALB/c	+++	+	+++
	SWR	+	+++	+
	C57BL/6J	+/-	ND	ND
<b>Pavillon de l'oreille</b>	BALB/c	+++	-	++
	C57BL/6J	+	++	-
	DBA/2	+/-	-	+/-
	C3H/HeN	-	+/-	+
	CBA/H	-	-	+/-
<b>Base de la queue</b>	BALB/c	++	-	++
	C57BL/6J	+/-	+	+
	DBA/2	++	-	-
	C3H/HeN	+	++	-
	CBA/H	+/-	-	-
	BALB/c	++	+	+++
	C57BL/6J	-	ND	ND
SWR	++	+	+/-	

### **5.1.6. Influence de la salive du phlébotome**

La salive de *Phlebotomus papatasi* peut aussi augmenter la taille de la lésion, mais avec un effet moins prononcé que la salive de *L. longipalpis* (THEODOS & RIBEIRO, 1991). En outre, l'inoculation chez les souris CBA résistantes des parasites avec la salive de *P. papatasi* conduit non seulement à des lésions plus grande taille, mais aussi à une charge parasitaire plus élevée dans les lésions, associée à une modulation de la réponse immunitaire : diminution des facteurs Th1 et l'augmentation de la production des IL4 associée à la réponse Th2 (MBOW *et al.*, 1998).

Lorsqu'on mime l'infection naturelle par l'injection d'une faible dose de parasites dans le derme de l'oreille, la co-inoculation de la salive de *P. papatasi* favorise le développement précoce des lésions et une parasitémie plus élevée, aussi bien la BALB/c que chez la C57BL/6 (BELKAID *et al.*, 1998). Il en résulte une réponse de type Th2 et une production d'IL4.

## **5.2. Modèle de la LV**

### **5.2.1. Le patrimoine génétique de la souris**

La susceptibilité et la résistance à l'infection par *Leishmania* chez l'homme et chez la souris sont réglementées par des déterminants génétiques (BLACKWELL *et al.*, 2009). Le patrimoine génétique de la souris influence l'infection par *Leishmania*. Bien que les souris BALB/c ne mourront pas de LV (différemment des humains non traités), elles peuvent être utilisées pour étudier les changements immuno-pathologiques qui surviennent au cours de la LV. En effet, les souris BALB/c présentent les caractéristiques cliniques de la LV humaine, tels que l'hépatosplénomégalie ou la destruction du tissu splénique. Cependant, le résultat d'une infection dépend également de la capacité des souris infectées à induire une réponse immunitaire de type Th1, et dépend aussi de la voie d'inoculation et de la dose injectée.

### **5.2.2. Le contrôle immunitaire de l'infection**

D'un point de vue immunologique, la principale caractéristique de la LV est sa spécificité d'organe. En effet, des études chez la souris ont souligné que les principaux tissus répondant (rate et du foie) présentent des profils distincts en terme de réponse immunitaire et de contrôle des parasites. Lors d'une injection en intraveineuse chez les souris BALB/c, plus de 95% des promastigotes de *L. infantum*, sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages phagocytaires issus de la zone marginale de la rate (ENGWERDA & KAYE, 2000). Après phagocytose de l'agent pathogène, les macrophages exercent leur activité leishmanicide par la synthèse du NO. Au cours de l'infection, la charge parasitaire est progressivement contrôlée (MELBY *et al.*, 2001) avec un pic de parasitémie à la 8<sup>ème</sup> semaine d'infection (SMELT *et al.*, 1997).

Dans la rate, la cinétique de la charge parasitaire reflète la cinétique de la production de cytokines et l'activation des différentes classes de cellules immunitaires. Au début de l'infection (4 premières semaines), la réplication du parasite est associée à l'incapacité des cellules du système immunitaire à produire IFN- $\gamma$  et IL2, alors que la production d'IL4 ou d'IL5 est conservée (MURRAY *et al.*, 1987 ; KAYE *et al.*, 1991). A l'inverse, l'IL10 et le TGF $\beta$  sont produites respectivement par les cellules de la zone marginale de la rate et de la pulpe rouge. L'IL10 et TGF $\beta$  pourraient contribuer à l'établissement de l'infection et la réplication du parasite (MELBY *et al.*, 2001). Après les 4 premières semaines de l'infection, les cellules T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T et les NK, récupèrent leur capacité à produire IFN $\gamma$ , favorisant ainsi l'activité microbicide macrophage avec la synthèse de NO et le contrôle de la formation de granulomes dans le foie, ce qui induit à une réduction des charges parasitaires (MURRAY *et al.*, 1987). En synergie avec l'IFN $\gamma$ , l'IL17A contribue également à l'activation des macrophages avec la production de NO, conduisant à l'élimination des parasites (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Néanmoins, l'infection dans la rate est maintenue au cours de la LV. Cette persistance du parasite peut être due à une production soutenue TGF $\beta$  par les cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Treg) qui contribue à l'immunosuppression (RODRIGUES *et al.*, 2009).

### **5.2.3. L'origine du tissu et le génotype parasitaire**

L'influence de l'état immunitaire de l'hôte sur la virulence de la souche est pas bien connue. En effet, les souches isolées chez des patients immunodéprimés présentent soit une virulence élevée (ELIAS *et al.*, 2007) ou faible (BAPTISTA *et al.*, 2007). Il est difficile d'étendre les résultats expérimentaux obtenus dans des modèles de souris obtenus avec une souche *Leishmania* donnée à une autre souche, même si elles sont génétiquement apparentées ou responsable de la même forme clinique. Par conséquent, il est essentiel d'analyser tous les nouveaux isolats leur réponse immunitaire correspondante chez les souris. De telles études sont particulièrement recommandées pour les parasites qui causent de grandes épidémies ou bien pour responsable de formes de leishmanioses non-pathogènes et silencieuses chez les humains. Des études prospectives dans les zones endémiques sont également importantes pour mieux comprendre la base de la réponse immunitaire protectrice chez l'homme et de développer des traitements spécifiques et plus efficaces.

### **5.2.4. La voie d'inoculation et la dose parasitaire**

Plusieurs voies d'inoculation ont été testées. Il semble que la charge parasitaire dépend non seulement de la dose parasitaire inoculée, mais aussi de la voie d'injection choisie. Bien que les voies sous-cutanées ou intradermiques imitent les voies d'infection naturelle, elles nécessitent des doses élevées de parasites pour provoquer une bonne infection persistante. Des doses plus faibles peuvent être recommandées pour les protocoles de vaccination parce que la réponse immunitaire générée semble être suffisante pour la protection à long terme.

Une étude a rapporté que la voie intrapéritonéale conduit à une importante homogénéité de l'infection en terme de charge parasitaire et donc peut-être plus appropriée pour étudier de nouveaux isolats (ROLAO *et al.*, 2004). A l'inverse, la voie intraveineuse conduit à des charges parasitaires hétérogènes chez les animaux et, par conséquent, des erreurs d'interprétation des résultats pourraient se produire lorsque les analyses sont effectuées sur des animaux mis en commun.

#### **5.2.5. La salive du phlébotome**

Les parasites *Leishmania* sont classiquement injectés dans la peau avec la salive par un phlébotome infecté lors d'un repas de sang. Pour les études de la LV, l'utilisation de la salive de phlébotome s'est essentiellement centrée sur son effet modulateur sur la réponse immunitaire ou en tant que candidat vaccinal plutôt que sur son influence sur les résultats de l'infection primaire (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

**2<sup>ème</sup> partie**

**PARTIE EXPERIMENTALE**

## 1. MATERIEL ET METHODES

La partie expérimentale de cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire et Génétique des populations de l'Institut Pasteur d'Algérie, ainsi qu'au sein de l'Unité mixte de recherche IRD 224 MiVegec (Maladies infectieuses et Vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) (France).

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Souches

Toutes les souches de LC et LV, de rongeurs et phlébotomes proviennent du centre national de référence de la leishmaniose (Institut Pasteur d'Algérie). Elles ont été conservées dans la cryobanque du laboratoire d'Eco épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'IPA, dans de l'azote liquide.

Les souches de *Leishmania infantum*, *L. major* et *L. killicki* utilisées ont été isolées au cours du diagnostic de la leishmaniose à partir de prélèvement humains, de rongeurs et de phlébotomes, par le personnel médical.

Pour la LC humaines et de rongeurs, le prélèvement a été fait à partir d'un grattage de la lésion, alors que pour le phlébotome, les glandes salivaires et l'abdomen d'une femelle gorgée a été mise en culture.

Dans le cas des LV, des prélèvements de moelle osseuse étaient nécessaires pour l'isolement de la souche.

Par ailleurs, 24 souches canines ont été isolées par des vétérinaires, de chiens naturellement infectés entre novembre 2006 et juin 2008, dans différentes régions d'Alger. Les souches d'origine canines ont été isolées à partir des ganglions lymphatiques et de biopsie à partir des chancres d'inoculation nasale.

Les isolats Français ont été sélectionnés de la cryobanque du centre national de référence des leishmanioses de Montpellier. Ces dernières étaient originaires d'un foyer proche de Montpellier et de Béziers.

La sensibilité à l'antimoine *in vitro* a été déterminée après quatre passages après l'isolement de la souche.

L'identification des espèces a été réalisée par une électrophorèse des iso-enzymes et par une PCR-RFLP (RIOUX *et al.*, 1990 ; EL TAI *et al.*, 2001). L'identification des espèces a été reconfirmée pour toutes les espèces incluses dans ce travail.

Par ailleurs, la sensibilité de 3 clones obtenus de 2 souches, qui ont été clonés sur milieu LIT, a été déterminée.

La proportion des souches étudiées pour chaque espèce a été choisie sur la base de la prévalence relative des espèces dans les régions fortement endémiques. Cent six souches (106) ont été testées en sensibilité des formes promastigotes à l'antimoine trivalents (SbIII) et amastigotes à l'antimoine Pentavalents (SbV) : 37 LC humaine, 21 LV humaine, 24 Leishmaniose canine, 3 souches de phlébotomes et 3 souches de rongeurs. Pour les souches originaires de France, 16 souches canines et 2 souches de phlébotomes ont été évaluées (Annexe 2). Le nombre de souches de chaque espèce testée en sensibilité à l'antimoine est résumé dans le tableau IV.

**Tableau IV : Les caractéristiques des 106 souches isolées à partir de prélèvement humains, canins, de rongeurs et de phlébotomes d'Algérie et de France**

Hôte	Forme clinique	Espèce	Nombre	Origine Géographique	Zymodème	Période d'isolation
Humain	LV	<i>L. infantum</i>	21	Algérie	MON 1 MON 80	1980 - 2012
Humain	LC	<i>L. infantum</i>	09	Algérie	MON 24 MON 80	2009 - 2013
Chien	L. Can	<i>L. infantum</i>	24 + 16	Algérie France	MON 1 MON 281	2006 – 2008 1974 - 2006
Humain	LC	<i>L. major</i>	20	Algérie	MON 25	2009 - 2013
Rongeurs	LC	<i>L. major</i>	03	Algérie	MON 25	1982 - 2006
Phlébotomes	-	<i>L. major</i>	03	Algérie	MON 25	1989
Phlébotomes	-	<i>L. infantum</i>	02	France	MON 1	1984
Humain	LC	<i>L. killicki</i>	08	Algérie	MON 301	2005 - 2011

### 1.1.2. Animaux

Les souris BALB/c femelles utilisées sont issues de l'élevage de l'animalerie du Laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations de l'IPA. 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. Au moment de l'expérimentation, les souris étaient âgées de 6 semaines, non pleines, avec un poids entre 18 à 20 g. Le projet a été approuvé par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'IPA

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Etude de l'Epidémiologie de la leishmaniose viscérale et cutanée en Algérie**

Les études épidémiologiques et cliniques conduit par l'institut Pasteur d'Algérie depuis le début des années 80, ont contribué à l'établissement d'une collection de souches et à sa caractérisation sur la base du profil isoenzymatique : zymodème (HARRAT *et al.*, 1996, BENIKHLEF *et al.*, 2004 ; AIT OUDHIA *et al.*, 2011). Ces variables épidémiologiques et ressources démographiques : incidence de la LC et de la LV, foyer de transmission, année de pic d'incidence, ont été analysés pour faire ressortir les associations épidémiologiques.

- **Collecte des données sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie**

A cet effet, toutes les données ont été collectées à partir des notifications de cas officielles de LC et de LV sur une période de 30 ans entre 1984 et 2013. Notre principale source d'information est la base de données épidémiologique de l'Institut National de Santé Publique (INSP). Les données de l'INSP sont basées sur un suivi continu des déclarations des structures de santé de l'ensemble du territoire algérien c'est à dire les établissements de santé publique, les hôpitaux publics et les centres hospitalo-universitaire.

### **1.2.2. Culture des promastigotes *in vitro***

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont : le milieu semi solide NNN (Novy Nicolle Mc Neal), le milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté de 10% de SVF (sérum de vœu fœtal), le sérum de Lapin (SLP) et le milieu LIT (annexe 3) préparés au niveau de laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire IPA

### **1.2.3. Décongélation des souches**

Toutes les souches de notre échantillon ont été décongelées à partir de la banque de souches de l'IPA qui se trouve dans l'azote liquide. Chaque souche a étéensemencé sur milieu NNN et SLP. Après une semaine d'incubation les souches sont clonées sur milieu LIT et repiquées sur NNN puis sur RPMI 1640 complet pour constituer 5 stabilats qui ont été recongelés dans l'azote liquide.

### **1.2.4. Clonage sur milieu LIT**

Le clonage sur milieu LIT permet d'obtenir à partir d'une leishmanie une colonie qui représente un clone de la souche. Une goutte de la suspension de la souche décongelée et ayant subi un passage, a étéensemencé sur une boîte de gélose LIT. Après une semaine d'incubation dans une boîte humide, 5 colonies représentant 5 clones seront prélevés et repiqués sur 500 µl de RPMI 1640 complet.

Après 3 passage sur RPMI 1640 complet, une induction de métacyclogenèse est effectuée par incubation pendant 24h dans du RPMI 1640 complet pH 5,4. Les formes métacycliques ainsi obtenues seront utilisées pour le test de sensibilité au SbV et pour l'infestation *in vivo*.

### **1.2.5. Dynamique de croissance des souches cutanées *in vitro***

Pour l'étude de la cinétique de croissance des souches cutanées, quinze (15) souches de *L. major* et ; huit (8) souches de *L. killicki*, ont été cultivées sur RPMI supplémenté de 10% de SVF. Les cultures riches et les parasites de bonne mobilité ont été concentrés à partir de NNN, puis ont subis 2 lavages à l'eau physiologique puis centrifugées à 2000g pendant 10 min et ensuite ont été repiquées sur RPMI+ SVF 10%. La concentration de départ était de  $10^6$  parasite/ml. Un comptage journalier pendant 5 jours pour *L. major* et 14 jours pour *L. killicki*, avec la cellule de numération de Thoma (annexe 4), a été effectué pour établir les courbes de croissance (annexe 5).

### **1.2.6. Caractérisation isoenzymatique des souches de *Leishmania* étudiées**

La caractérisation isoenzymatique a été effectuée par électrophorèse sur gel d'amidon selon RIOUX (1990). Cette méthode est basée sur l'utilisation de 15 systèmes enzymatiques de *Leishmania* et est aussi connue sous le nom de MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis). Elle permet d'étudier les variations de mobilité électrophorétique, pour une protéine de même fonction enzymatique, entre différents organismes. La mobilité reflète la charge primaire de la protéine puisque la mobilité est due à la charge électrique globale de l'enzyme. Seules les mutations ponctuelles qui altèrent la charge de l'enzyme sont détectables par cette méthode, permettant de mettre en évidence les variations génomiques entre les espèces de *Leishmania*.

- **Préparation des extraits enzymatiques**

Les culots des souches cultivées dans un milieu d'enrichissement (CCS) et dans le RPMI complet, sont lysés par choc thermique dans l'azote liquide. La suspension est alors centrifugée à 12 000 g à +4°C pendant 20 min. Le surnageant enzymatique est prélevé et conservé dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation.

- **Les enzymes étudiées**

Les 15 systèmes enzymatiques utilisées par le centre de référence de *Leishmania* de l'institut Pasteur d'Algérie sont : la Malate déshydrogénase (MDH), EC 1.1.1.37; l'enzyme Malique (ME), EC 1.1.1.40; l'Isocitrate déshydrogénase (ICD), EC 1.1.1.42; la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (PGD), EC 1.1.1.44; la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), EC 1.1.1.49; la Glutamate déshydrogénase (GLUD), EC 1.4.1.3; la NADH Diaphorase (DIA), EC 1.6.2.2; la Purine nucléoside phosphorylases 1 (NP<sub>1</sub>), EC 2.4.2.1. la Purine nucléoside phosphorylases 2 (NP<sub>2</sub>) EC 2.4.2.\*; la Glutamate-oxaloacetate transaminases (GOT<sub>1</sub> and GOT<sub>2</sub>),

EC 2.6.1.1; la Phosphoglucosyltransférase (PGM), EC 5.4.2.2; la Fumarate hydratase (FH), EC 4.2.1.2; la Mannose-phosphate isomérase (MPI), EC 5.3.1.8; et la Glucose phosphate isomérase (GPI), EC 5.3.1.9.

- **L'Électrophorèse et révélation**

Les migrations électrophorétiques sont réalisées sur Gel d'Amidon. Les conditions de migration : tampon utilisé, durée, et voltage dépendent du système enzymatique étudié (Annexe 2). A la fin de la migration, les bandes spécifiques de chaque enzyme sont révélées selon leur substrat spécifique (Annexe 6).

Après électrophorèse, les enzymes contenues dans les extraits protéiniques sont révélées par une « tache colorée » appelée électromorphe. Celui-ci correspond à la distance parcourue par l'enzyme dans un gel d'amidon à un pH déterminé. Dans le cas des déshydrogénases, le produit de la réaction colorée est un précipité bleu de formazan. Le zymodème est établi après obtention de 15 électromorphes correspondant aux 15 isoenzymes utilisés. On définit par "zymodème" l'ensemble des souches présentant le même profil enzymatique.

### 1.2.7. Caractérisation moléculaire des souches étudiées : PCR RFLP

- **Extraction**

Après une culture sur milieu RPMI à 10% de SVF, l'ADN des souches étudiées et des souches de référence, a été extrait avec le kit QiaAmp DNA mini Kit Qiagen, en respectant les conditions du fournisseur. L'ADN extrait a ensuite été aliquoté par volume de 30 µl et conservé à -20°C jusqu'à réalisation de la PCR.

Pour les organes, un broyage a été nécessaire avant de faire une extraction au Phénol Chloroforme. (Annexe 2).

- **Polymerase chain reaction (PCR)**

Le fragment ribosomal transcrit (ribosomal internal transcribed spacer1 : ITS1), est amplifié selon le protocole décrit pour LITSR et L5.8S (SCHONIAN *et al.*, 2003). Les amorces utilisées (Figure 19) sont LITSR, 5'- CTGGATCATTTTCCGATG-3' et LITSV, 5' - ACACTCAGGTCTGTAAAC-3' (EL TAI *et al.* 2001). Les réactions de PCR (25µl) contenaient 2.5 µl d'ADN purifié, mélangé à un tampon contenant du MgCl<sub>2</sub> (300µM), un mix des dNTP (200µM), LITSR et L5.8S (500 nM) et 2U de Taq DNA polymérase (Invitrogen). Les conditions de PCR sont celles décrites par SCHONIAN *et al.* (2003). Les produits PCR (10µl), sont alors visualisés sur gel d'agarose à 1%, coloré par le bromure d'éthidium, et comparés à un témoin positif, un témoin négatif (H<sub>2</sub>O) et des marqueurs de poids moléculaire PM.

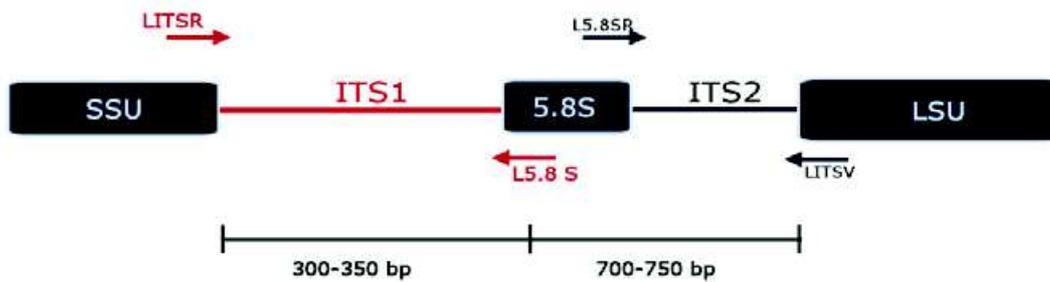


Figure 19 : Représentation schématique de la région ITS

- **Digestion**

Un volume de 10µl de l'amplicon de la région ITS est digéré avec l'enzyme HaeIII pendant 2h à 37°C, selon les recommandations du fabricant. Les fragments de restrictions sont alors séparés sur un gel d'agarose à 2% pendant 2 à 4 h dans un tampon Tris Borate (90 mM Tris borate/0.2 mM EDTA) et visualisés sous UV après coloration par le bromure d'éthidium

### 1.2.8. Etude de la sensibilité de *Leishmania* à l'antimoine *in vitro*

#### 1.2.8.1. Sensibilité des formes promastigotes

La suspension parasitaire ajustée à 10<sup>6</sup> parasite/ml a été cultivée sur milieu SDM 79 à 10%, pendant 72h à 26 °C, en présence de SbIII à des concentrations de 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 et 6,25 µg/ml. Chaque expérience a été réalisée en quintuplicate. De plus, pour valider les 72 heures d'incubations, certaines souches ont été testées à trois temps d'incubation (24, 48 et 72 heures).

- **Lecture MTT**

La révélation a été effectuée à l'aide d'un sel de tétrazolium MTT. Ce dernier met en évidence les parasites vivants grâce à la réduction en bleu de formazon détectable au spectrophotomètre sous l'action de la succinate tétrazolium réductase présente dans la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules métaboliquement actives. Un volume de 10 µl de MTT à 10mg/ml, a été ajouté dans chaque puits. Après une incubation à 37°C pendant 4h, 100 µl d'Isopropanol 50%-SDS 50% sont ajoutés. Les plaques ont été incubées sous agitation pendant 30 min. Le mélange d'isopropanol-SDS confère aux protéines parasites une charge négative, qui permet une bonne lecture au spectrophotomètre à 550nm (SERENO *et al.*, 1997).

- **L'analyse par cytométrie à Flux**

La viabilité et la croissance des promastigotes ont été déterminées par la cytométrie à Flux. Pour cela 5 µl de la suspension parasitaire sont dilués dans 500 µl de PBS (pH 7,2). L'iodure de propidium a alors été ajouté à une concentration finale de 1 µg/ml, et les cellules ont alors été analysées par une lecture sur le cytomètre à Flux (Facsalibur™; Becton Dickinson), pendant

52 sec. La concentration parasitaire est déterminée en utilisant des courbes étalons avec des concentrations de parasites ont été représentées graphiquement en fonction du nombre moyen de cellules comptées par le cytomètre après 52 s (VERGNES *et al*, 2005)

#### **1.2.8.2. Sensibilité des formes amastigotes : Test d'infection intra-macrophagique à partir de promastigotes**

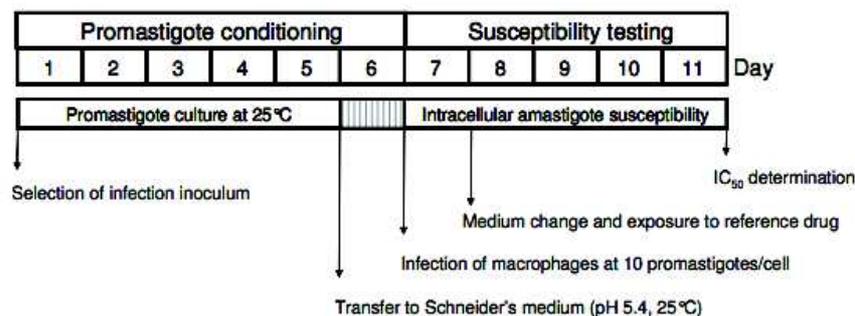
Les effets du Glucantime® sur la croissance de *Leishmania spp* dans une lignée de monocytes humains ont été évalués selon la méthode de GEBRE HIWOT (1992). Les parasites sous leur forme promastigotes ont été inoculés aux THP1, qui avaient été préalablement transformés en macrophages grâce à un agent mutagène qui est le PMA (Figure 20).

La préparation des parasites pour l'infection doit se faire 6 jours avant l'infestation. Pour cela, une culture dense de parasites sur milieu RPMI à 10% de SVF, et en fin de phase exponentielle, a été ajustée à  $10^6$  cell/ml dans 5 ml final de RPMI complet et Incubée à 26°C pendant 5 jours. La différenciation des monocytes THP-1 en macrophages doit se faire 2 jours avant l'infestation. Les cellules THP1 sont une lignée cellulaire cultivée en suspension sur milieu RPMI à 10% de SVF. La transformation des THP1 en macrophages a lieu sur une culture de 3 à 4 jours ajustée à  $5 \times 10^5$  cellules/ml. La viabilité des THP1 est contrôlée avec le bleu de Trypan qui colore les cellules mortes. L'agent mutagène nécessaire à cette transformation doit être ajouté pour une concentration finale de 20 ng/ml. Les THP1 sont alors distribués à raison de 200µl/puits dans des chambre Labtek et incubés pendant 48h à 37°C à 5% CO<sub>2</sub>.

Un jour avant l'infestation, les parasites ont été transférés en milieu RPMI acide pH 5,4 et incubés 24h à 26°C pour l'obtention des métacycliques. Les parasites ont été alors ajustés à  $5 \times 10^6$  cellules/ml dans le RPMI complet (ratio 10:1), et distribués à raison de 200µl/puits. Une incubation de 24 h à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> pour les souches viscérales est nécessaire (34°C pour les souches cutanées).

Une fois les 24 heures écoulées, et après plusieurs lavages, 200 µl/puits de RPMI complet (non traité) sont ajoutés ou à différentes dilutions des drogues à tester (diluées dans le RPMI complet). Pour le SbV les dilutions étaient de 100 – 50 – 25 - 12,5 et 0 µg/ml final. Après une incubation de 2 à 5 jours à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, les lames ont été lavées et fixées avec du méthanol et colorées au Giemsa. Pour le comptage, les puits ont été retirés et l'index parasitaire a été calculé après une observation à l'immersion selon la formule suivante :

$$\text{Index parasitaire IP} = \% \text{ macrophages infectés} \times \text{nb d'amastigotes} / \text{macrophages}$$



**Figure 20 : Planning général de l'infection intramacrophagique**  
(INOCENCIO DA LUZ *et al.*, 2009)

### 1.2.9. Détermination du Cutoff (seuil de sensibilité)

Le cutoff est la concentration seuil inhibitrice de 50% des cellules (IC<sub>50</sub>) qui sépare les souches résistantes des souches sensibles. Le cutoff des souches de LC et LV sensibles et résistantes à l'antimoine trivalent sur les formes promastigotes *in vitro*, a été déterminé par une application web : cutoff finder analysis using R version 2.15.0 (2012-03-30) (<http://molpath.charite.de/cutoff/>) (BUDCZIES *et al.*, 2012).

Pour l'antimoine pentavalent (SbV), les valeurs des cutoffs des souches LC et LV ont été déterminées par extrapolation sur la droite de régression linéaire entre les IC<sub>50</sub> du SbIII et IC<sub>50</sub> du SbV.

### 1.2.10. Etudes des marqueurs de résistance à l'antimoine sur un modèle murin (la souris BALB/c)

L'étude de la résistance au traitement sur un modèle murin, qui est génétiquement homogène, représente un modèle de choix pour une meilleure compréhension des mécanismes de résistance à l'antimoine. Afin de rechercher des marqueurs de résistance à l'antimoine chez la BALB/c, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité des phénotypes externe (début de la maladie, virulence de l'inoculum, taille des lésions et des indurations), et des phénotypes internes (dissémination de la maladie), au cours de la LC.

La caractérisation du phénotype de virulence et de la réponse au traitement par le Glucantime® ont été réalisées dans un premier temps, en fonction de la susceptibilité des souches de *L. major* à l'antimoine *in vitro*. Par la suite, le comportement de ces souches cutanées naturellement résistantes est étudié sur un modèle murin et enfin, la validité du modèle *L. killicki* est démontrée en tant que modèle pharmacologique de la LC.

#### 1.2.10.1. Infestation *in vivo* et suivi

Au cours des 3 études réalisées sur le modèle murin, la même méthodologie d'infestation et de suivi ont été effectués.

- **Préparation de l'inoculum**

Après culture sur milieu NNN puis transfert sur milieu RPMI+SVF 10%, les suspensions parasitaires en phase exponentielle ont subi trois lavages avec de l'eau physiologique à 2000 g pendant 10 min. Une purification des formes métacycliques a été effectuée sur un gradient croissant de Ficoll de 40 ; 20 ; 10 et 5% dans du RPMI. Les formes métacycliques qui forment un ménisque entre 5 et 10% ont été récupérées, et leur concentration a été ajusté à  $10^6$  parasites /ml (SPÄTH *et al.*, 2001).

- **Inoculation**

Les inoculations ont été faites par une injection de  $10^3$  parasites métacycliques, réalisée en intradermique au niveau du pavillon de l'oreille gauche des souris BALB/c (BELKAID *et al.*, 1998).

- **Monitoring**

Un suivi hebdomadaire de l'infestation des souris infectées, des témoins non infectés, a été effectué pendant plusieurs semaines post infestation. Le monitoring a consisté en la pesée des animaux et la mesure des indurations (épaisseur de l'oreille), diamètre des rougeurs et des lésions à l'aide d'un pied à coulisse électronique (annexe 2).

#### **1.2.10.2. Traitement**

Quelques jours avant le début du traitement, les souris ont été pesées de façon à déterminer précisément les doses à injecter. Les solutions de SbV (N-méthylglucamine antimoniate) ont été préparées stérilement pour toute la durée du traitement, dans un volume final de 200  $\mu$ l et diluées dans du PBS. Elles ont été ensuite aliquotées puis conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Chaque jour de traitement, les solutions ont été décongelées à température ambiante, avant d'être injectées. Des infiltrations intra-lésionnelles ont été effectuées tous les 5 jours pendant 2 semaines à une concentration de 28 mg/Kg de poids (schéma thérapeutique recommandé en Algérie et par l'OMS).

#### **1.2.10.3. Evolution de l'infection (charge parasitaire)**

Pour le suivi de l'évolution de l'infection et la détermination de la charge parasitaire, nous avons sacrifié 5 souris de chaque lot pour chaque point étudié.

La charge parasitaire au niveau du point de l'inoculation a été faite par grattage, suivi d'appositions à partir de l'oreille grattée sur une lame porte objet. Les frottis séchés ont été colorés au GIEMSA (annexe 2). La charge parasitaire dans l'oreille a été estimée par le nombre de parasites par 100 macrophages infectés.

Pour déterminer la charge parasitaire dans les organes, nous avons utilisé la méthode de microtitration modifiée, fondée sur la culture pour la quantification des parasites (BUFFET *et al.*, 1995).

Après avoir anesthésié les souris à l'éther, la rate et les ganglions lymphatiques drainant de l'oreille infectée, ont été prélevés aseptiquement pour déterminer la charge parasitaire. Ces derniers ont été pesés, homogénéisés avec un broyeur dans 1ml de RPMI +SVF 10%. Des dilutions au 1/4 en série allant de 1 à 7 ont été préparées dans des microplaques de 96 puits contenant 200µl de LIT dans chaque puits. Après 7 et 15 jours d'incubation à 26°C, la plaque était examinée au microscope optique inversé à un grossissement de Gx40. Le titre final étant la dernière dilution pour laquelle le puits contenait au moins un parasite. Le nombre de parasites par gramme de rate ou par ganglion (charge parasitaire) a été calculé comme suit :

**Parasite/ gr d'organe = (inverse de la dernière dilution positive x 200) x 5 / poids organe en gr.**

#### **1.2.11. Caractérisation de l'infection par des souches de *Leishmania major* susceptible à l'antimoine *in vitro***

Deux souches appartenant à l'espèce *Leishmania major*, sensible et résistante à l'antimoine *in vitro*, LIPA 100/09 et LIPA 175/11 respectivement, ont été choisies pour l'infestation *in vivo* chez les souris BALB/c. Les caractéristiques de chaque souche sont données dans le **tableau V**

**Tableau V : Caractéristiques des souches de *L. major* étudiées *in vivo***

<b>Code OMS de la souche</b>	<b>Espèce</b>	<b>Origine des patients</b>	<b>Susceptibilité à l'antimoine</b>
MHOM/DZ/ 09/LIPA 100/09	<i>L. major</i>	Msila	sensible
MHOM/DZ/11/LIPA 175/11	<i>L. major</i>	Msila	résistante

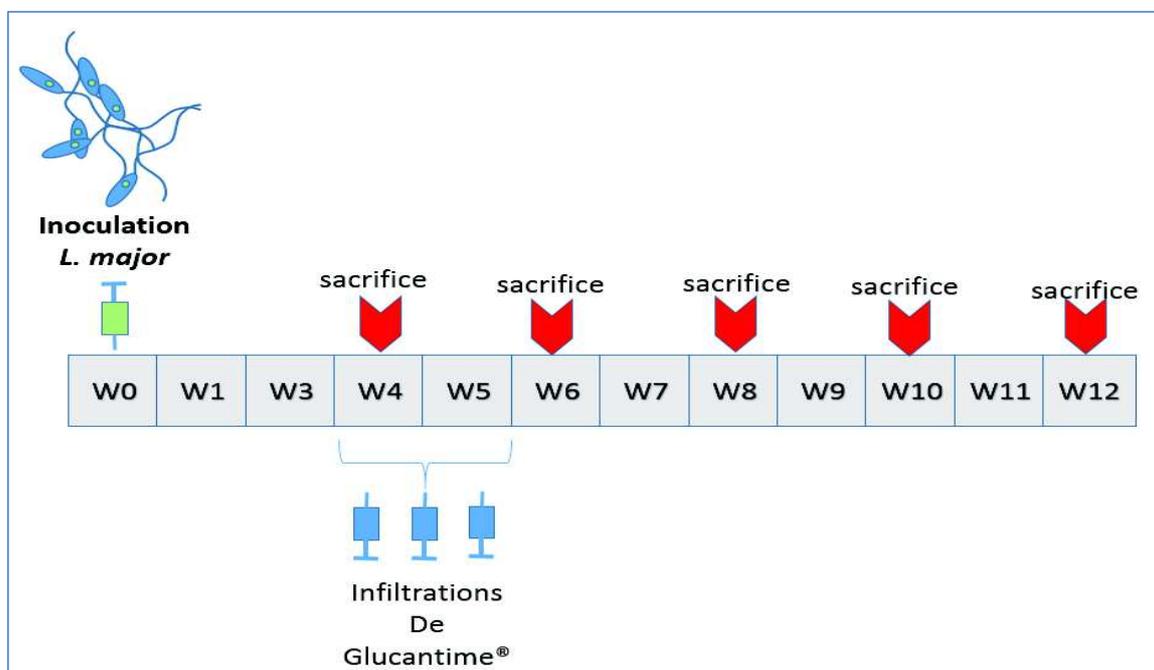
Les souris infestées ont été divisées en 5 lots : **lot 1** des souris témoins négatifs non infestées et non traitées, **lot 2** des souris infestées par la souche résistante et traités par le Glucantime®, **lot 3** des souris infestées par la souche résistante et non traitées au Glucantime®, **lot 4** des souris infestées par la souche sensible et traités par le Glucantime®, **lot 5** des souris infestées par la souche sensible et non traitées au Glucantime® (Tableau VI).

**Tableau VI : Répartition des lots de souris pour la caractérisation de la susceptibilité à l'antimoine de *L. major***

Groupe I (souris infectées par la souche résistante) LIPA 175/11	Lot1 :25 témoins (T)	Lot2 :25souris traitées (RTr)	Lot3 :25 souris non traitées (R)
Groupe II (souris infectées par la souche sensible) LIPA 100/09	Lot1 :25 témoins (T)	Lot4 :25souris traitées (STr)	Lot5 :25 souris non traitées (S)

Un monitoring hebdomadaire a été effectué jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine. A partir de la 4<sup>ème</sup> semaine post inoculation, les lots 3 et 4 ont été traités par le Glucantime®. Des infiltrations intra-lésionnelles ont été effectuées tous les 5 jours pendant 2 semaines à une concentration de 28 mg/Kg de poids (schéma thérapeutique recommandé en Algérie et par l'OMS).

Afin de déterminer la présence des parasites dans ces organes et la charge parasitaire de ces derniers, nous avons sacrifié 5 souris de chaque lot traité, non traités et des témoins, toutes les quatre semaines puis toutes les 2 semaines après l'injection du traitement : Semaines 4, 6, 8, 10 et 12 (Figure 21).



**Figure 21 : Schéma expérimental de la Caractérisation de l'infection par des souches de *Leishmania major* susceptible à l'antimoine *in vitro***

### 1.2.12. Caractérisation de l'infection par des souches de *Leishmania major* naturellement résistantes à l'antimoine

Trois patients ayant des lésions à l'oreille, la joue ou au pied, ont nécessité une consultation dans le centre médical de la province de Batna. Cette zone est bien connue zone endémique de la leishmaniose cutanée causée par *L. major*. Pour confirmer le diagnostic clinique effectué, les parasites ont été recueillis par raclage des bords de la lésion et aspiration de l'exsudat avec une seringue stérile. Le matériel biologique a été ensuite transféré stérilement dans le milieu NNN additionné de pénicilline et de streptomycine, pour l'isolement de la souche. Après 15 jours six souches ont été isolées et stockées dans la cryobanque de l'Institut Pasteur d'Algérie, dans de l'azote liquide (-196°C). Les caractéristiques de ces souches figurent dans le tableau VII. Par ailleurs, nous avons utilisé une souche contrôle sensible à l'antimoine (MHOM/DZ/09/LIPA100/09).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'identification des espèces des souches isolées par typage isoenzymatique (MLEE) et par PCR RFLP. Les sensibilités des formes promastigotes au SbIII et des formes amastigotes en intramacrophagique au SbV, ont été déterminé *in vitro*

**Tableau VII : Caractéristiques des souches naturellement résistantes à l'antimoine**

Patient	Age (années)	Sexer	Phénotype des lésions	Localisation	Nombre de lésions	Souches
1	24	M	Sèche	Oreille	2	LIPA 339 LIPA 339 R
2	55	M	Sèche	Joue	1	LIPA 443 LIPA 443R
3	31	M	Ulculo-croûteuse	Pied	1	LIPA 445 LIPA445R
Témoin						LIPA 100/09

Dans un deuxième temps, pour l'étude *in vivo*, huit groupes de 5 souris BALB/c âgées de 6 semaines, provenant de l'animalerie de l'IPA, ont été utilisées pour l'étude de la virulence des 6 souches isolées et en comparaison avec une souche contrôle (LIPA 100/09) : 6 groupes des souches étudiées, un groupe contrôle positif, et groupe contrôle négatif. L'inoculation de  $10^3$  des formes métacycliques a été faite en intradermique dans le pavillon de l'oreille gauche. Pour le suivi du phénotype externe des souches, un monitoring hebdomadaire a été effectué jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine. Une méthode de score a été utilisée pour le suivi de l'infection, basée

sur les rougeurs, indurations et diamètre des lésions, avec un pied à coulisse électronique (Fisherbrand) (SCHUSTER *et al.*, 2014).

A la fin de l'expérimentation, toutes les souris ont été sacrifiées par le Diéthyle Ether, après un grattage de l'oreille. La rate et les ganglions lymphatiques ont été récupérés aseptiquement pour la détermination de la présence des parasites par PCR et la charge parasitaire par la méthode de la dilution limite.

### **1.2.13. Mise au point d'un modèle pharmacologique de *L. killicki***

Afin d'établir un modèle animal de la LC provoquée par *L. killicki*, nous avons comparé l'aspect et les indurations des lésions après inoculation de *L. killicki* (LIPA 281/11) et de *L. major* (LIPA 100/09), en intradermique dans les oreilles des souris BALB/c

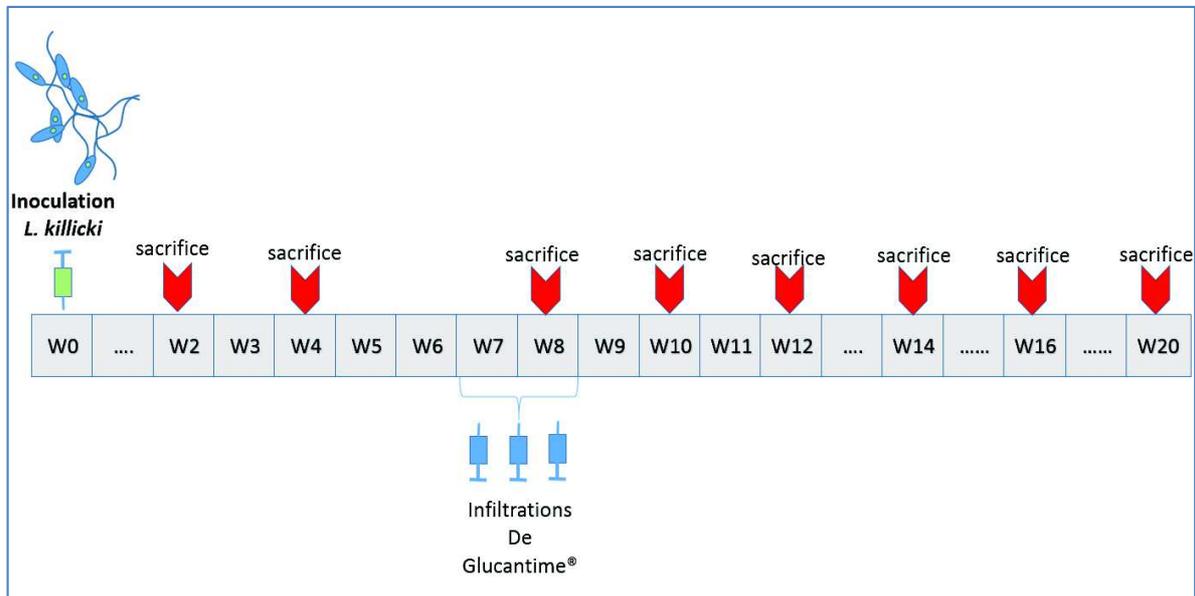
Afin de faire le suivi du développement du phénotype externe de ces souches, nous avons utilisé 3 groupes de souris : 5 souris pour le groupe témoin non infecté, 5 souris pour le groupe infecté par *L. major*, et 5 souris pour le groupe infecté par *L. killicki*.

Les infections ont été suivies pendant 12 semaines post inoculation pour *L. major*, et 30 semaines post inoculation pour *L. killicki*. Le monitoring post inoculation des indurations s'est fait aux semaines 2, 4, 6, 10 et 12 pour *L. major* et aux semaines 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, et 30 pour *L. killicki*. Les résultats sont exprimés par la différence en induration entre l'oreille infectée de l'oreille non infectée (contrôle interne).

Après avoir euthanasié les souris, et afin de comparer la capacité de dissémination de *L. major* à celle de *L. killicki* dans les organes internes, la présence de l'ADN parasite a été recherché aux semaines 2, 4, 8 et 12 pour *L. major*, et 2, 4, 8, 12, 16 et 20 pour *L. killicki* (Figure 22). Les organes étudiés sont les ganglions lymphatiques, la rate et le foie. A la 12<sup>ème</sup> semaine, un aliquot de chaque échantillon d'organe a été ensemencé sur milieu LIT, et incubé pendant 4 semaines pour isoler des parasites vivants à partir de ces organes.

Dans une première tentative d'exploration de la capacité de ce nouveau modèle *in vivo* murin de l'infection par *L. killicki*, à être utilisé pour le screening d'agents anti-leishmaniens, nous avons comparé les résultats d'un traitement par le Glucantime® sur le modèle *L. major* et le modèle *L. killicki*. Les souris infectées ont été traitées pendant 2 semaines par des infiltrations péri-lésionnelles, à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour *L. major* et la 8<sup>ème</sup> semaine pour *L. killicki*. Pour toutes les expériences, les traitements n'ont commencé qu'à partir du moment où les infections étaient évidentes pour les deux espèces. Deux jours avant le début du traitement, les souris ont été divisées en deux groupes pour chaque espèce : un groupe traité et un groupe non traité. Une mesure hebdomadaire de l'épaisseur des oreilles a été effectuée jusqu'à la fin du traitement. L'efficacité du traitement a été calculée par l'index des indurations d'oreilles selon la formule suivante :

**Index des indurations d'oreilles** = moyenne des charges parasitaires des oreilles non traitées/  
moyenne des charges parasitaires des oreilles traitées



**Figure 22 : Schéma expérimental de la Mise au point du modèle pharmacologique de l'infection par *L. killicki*.**

#### 1.2.14. Analyse statistique

Les données de l'étude épidémiologique de la première partie ont été compilées sur Microsoft Excel et analysées par Prism 5 (GraphPad, Inc). Les ratio d'incidence (SIR), nous ont permis de faire une comparaison entre les différentes wilaya en prenant nationale d'incidence comme référence, au cours des 3 décennies étudiées. Les souches de *Leishmania* utilisées ont été sélectionnées par une technique d'échantillonnage aléatoire. L'analyse par ANOVA à un facteur, nous a permis de comparer les différences de susceptibilité à SbIII et SbV, des souches de *Leishmania* Algérienne, selon leur forme clinique, les espèces, les zymodèmes et leur distribution spatio-temporelle. Les tests de Kruskal-Wallis et de Dunnet ont été utilisés comme post Test pour des comparaisons multiples lorsque l'ANOVA était significative. Les différences de susceptibilité au SbIII et SbV pour les souches LC et LV pour deux décennies, ont été analysées par le test non paramétrique de Mann-Whitney. La corrélation entre les susceptibilités au SbIII et SbV a été évaluée sur la base du test de Spearman. Une valeur de  $p > 0.05$  a été considéré comme significative

Les données d'études sur le modèle murin de lésions et de charge parasitaire sont exprimées en moyenne  $\pm$  l'écart type pour des groupes de n échantillons. L'analyse des variances (ANOVA), a utilisé 2 post tests : Bonferroni et Student sur Graph Pad Prism Software (Graph Pad, San Diego, California, USA).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent travail a pour principal objectif d'étudier la chimiorésistance aux antimonies en Algérie. L'Algérie est l'un des pays les plus endémiques de la LC et de la LV. Plus de 21 000 cas de LC ont été enregistré en 2010, avec un important impact sur la santé publique. Pour toutes les formes de leishmanioses, le traitement de première ligne est basé sur une drogue contenant de l'antimoine qui est le Glucantime®. Cette dernière a été développée au cours des années cinquante du siècle dernier. Ce n'est qu'à partir de 1986 que les premiers cas d'échecs au traitement furent rapportés au cours de la LC. En association à ces échecs au traitement, des souches résistantes à l'antimoine ont été isolées. Néanmoins, en Algérie les formulations à l'antimoine restent le traitement de première attention pour toutes les formes de la leishmaniose. Par conséquent, une exploration de l'état de susceptibilité à l'antimoine des souches Algériennes à l'antimoine est plus que nécessaire.

Ce travail de thèse comporte deux parties relatives à l'étude de chimiosensibilité à l'antimoine en Algérie. La première aborde l'aspect *in vitro*, et une deuxième partie relative à l'étude *in vivo*.

Dans un premier temps, nous allons analyser les résultats des données épidémiologiques de la leishmaniose cutanée et viscérale, et la susceptibilité des souches circulantes en Algérie à l'antimoine au cours de ces 30 dernières années. Ces résultats nous permettront de déterminer l'évolution spatiotemporelle de cette susceptibilité à l'antimoine, et la validation du test de sensibilité à l'antimoine *in vitro*.

Dans un deuxième temps, nous allons étudier le comportement des souches cutanées sur un modèle murin la souris BALB/c selon leur susceptibilité à l'antimoine pour déterminer des marqueurs de résistance *in vivo*. Deux aspects seront abordés : celui des souches résistantes à l'antimoine *in vitro*, et celui des souches naturellement résistantes. Et enfin, nous allons démontrer la validité du modèle de LC de *L. killicki*, que nous avons mis au point, en tant que modèle pharmacologique de la LC.

### 2.1. Evolution de la susceptibilité à l'antimoine en fonction de la situation épidémiologique de la leishmaniose en Algérie

#### 2.1.1. Mise à jour des données épidémiologiques de la leishmaniose passées et actuelles

Une grande partie des publications relative à la distribution et de l'épidémiologie de la leishmaniose cutanée et viscérale en Algérie date des années 80 et 90 (BELLAZOUG *et al.*, 1985 ; HARRAT *et al.*, 1992 ; HARRAT *et al.*, 1996). L'évolution de la situation épidémiologique au cours de ces dernières années a connu des flambés de la LC et une importante baisse de la LV. Afin de pouvoir lier les différents aspects de la résistance au traitement de la leishmaniose, il est plus que nécessaire de situer la situation et l'évolution réelle de la LC et LV sur 3 décennies de 1984 à 2013.

### 2.1.1.1. Résultats de l'analyse de 30 ans de données Epidémiologique sur la leishmaniose en Algérie

Les leishmanioses sont des maladies à déclaration obligatoire en Algérie, l'institut national de santé publique (INSP) recense les cas de LC et LV depuis 1980, les relevés épidémiologiques mensuels (REM) publiés par l'INSP depuis le début des années 80 nous ont permis d'évaluer l'évolutions des 2 formes de leishmanioses sévissant en Algérie (LC et LV).

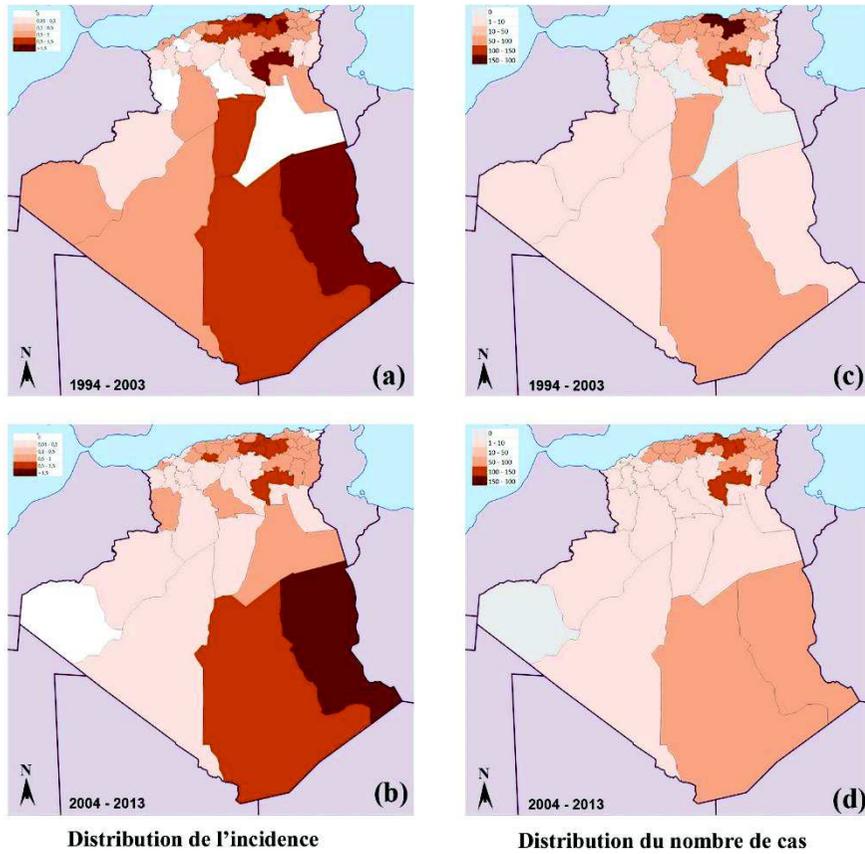
Entre 1984 et 2013, il y a eu plusieurs pics de LV en 1985, en 1998, et en 2010. Le maximum de cas a été atteint en 1998 avec 310 cas, soit une incidence de 1,02 cas pour 100 000 habitants. Par ailleurs, nous avons noté une recrudescence de la maladie en 2010 avec 121 cas, mais avec une incidence plus faible de 0,34 cas pour 100 000 habitants.

Pour la distribution par wilaya, on note que bien que le nombre de cas a diminué et que la LV a disparu de certaines wilayas. Par contre, il y a eu recrudescence dans les foyers du Sud Est(Tamanrasset), alors que dans les foyers du nord tel que celui de Bouira et de Tizi Ouzou, il y a eu une baisse notable du nombre de cas et l'incidence est passé en 20 ans de 1,55 à 0,28 pour Tizi Ouzou; et de 1,43 à 0,79 pour Bouira. Depuis 1980, le taux d'incidence pour 100000 habitant a beaucoup augmenté puisqu'il est passé de 0,23 en 1980 à 1,02 en 1998, puis a atteint un pic de 0,34 en 2010 pour rechuter en 2013 à 0,12 (figure 23, 24)

Les données des REM de l'INSP portant sur la LC entre 1981 et 2013, montrent que les pics du nombre de cas sont cycliques. Entre 1981 et 2013, cinq pics ont été rapportés en 1983, 1986, 1997, 2005 et 2010, le plus important étant celui de 2005 où plus de 25000 cas ont été répertoriés. Les taux d'incidence les plus importants correspondent aux années des pics épidémiques. En 2005, un pic d'incidence de 78 cas pour 100 000 habitants a été rapporté. Les zones les plus touchées restent localisé dans les hauts plateaux dans les zones arides et semi arides

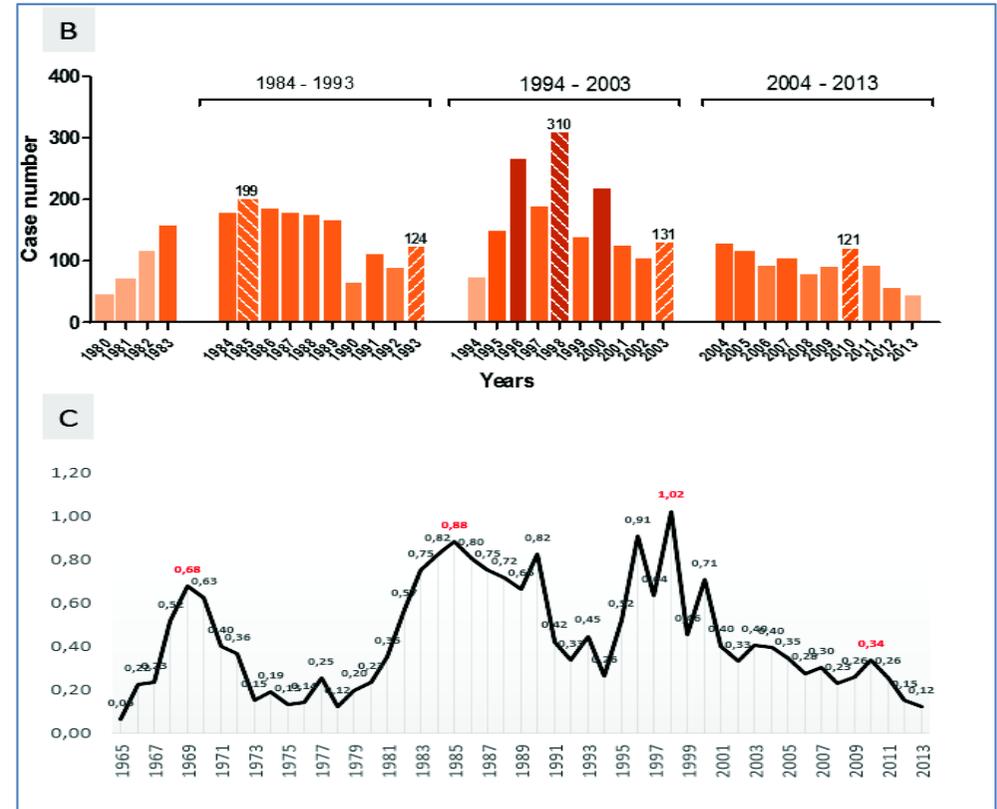
Pour la LC, l'évolution du nombre de cas par wilaya montre qu'entre 2004 et 2013 la maladie s'est étendue vers le nord et le sud, les wilayas ayant le plus grand nombre de cas étant Batna, Biskra et M'sila (BOUDRISSA *et al.*, 2012). Entre 2010 et 2013, la maladie a légèrement régressé dans le nord, mais reste importante dans les hauts plateaux et le sud, le taux le plus important a été atteint dans la wilaya de Biskra.

Les taux d'incidence de la LC sont quant à eux très important par rapport à ceux de la LV. En 1991, le taux d'incidence était de 15 cas pour 100000 habitants est passé à 14,44 en 1997, et a atteint 78,05 au cours de l'épidémie de 2005. Un nouveau pic d'incidence a été atteint en 2010 avec 58,93 cas pour 100000 habitants. Pour la LV le taux d'incidence le plus important a été atteint en 1997 avec 1,02 cas pour 100 000 habitants (Figure 25, 26).



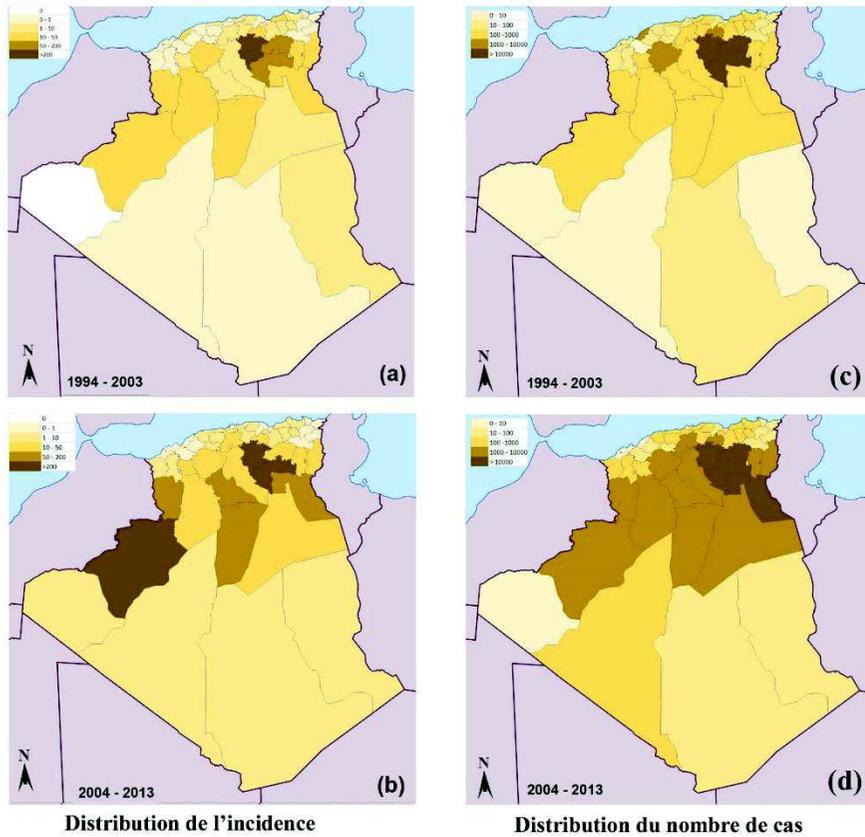
**Figure 23 : Distribution de l'Incidence et du nombre de cas total par décennie de la leishmaniose viscérale en Algérie**

(a) Incidence de 1994 à 2003, (b) Incidence de 2004 à 2013, (c) Nombre de cas de 1994 à 2003, (d) Nombre de cas de 2004 à 2013

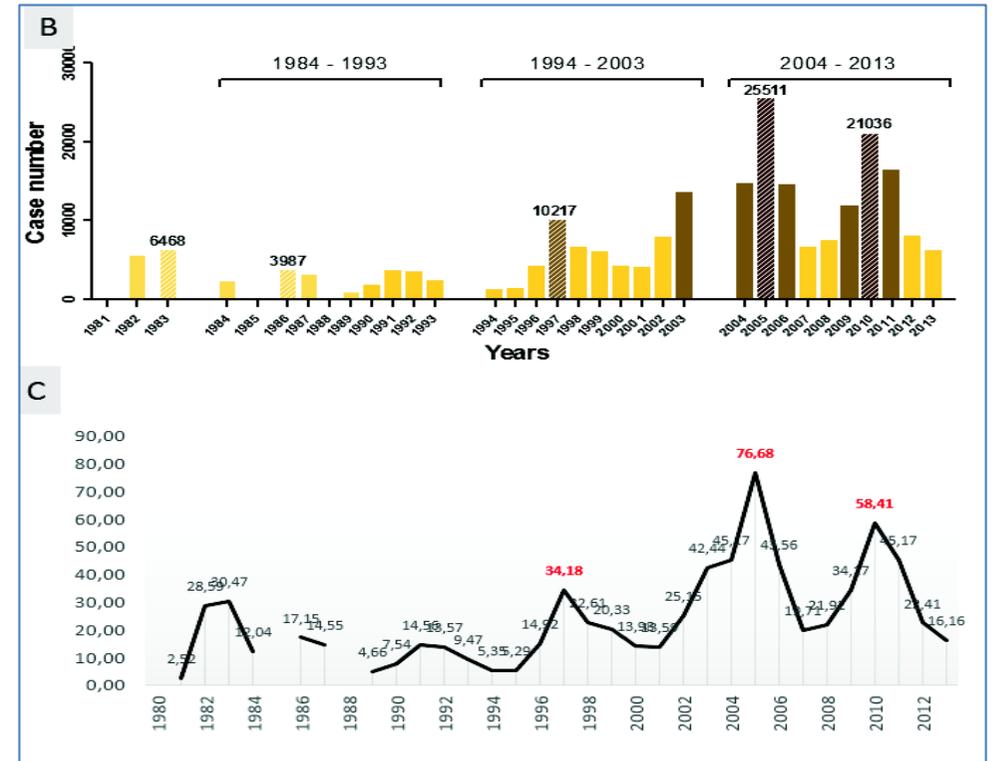


**Figure 24 : Evolution de l'incidence et du nombre de cas de la leishmaniose viscérale en Algérie de 1981 à 2013**

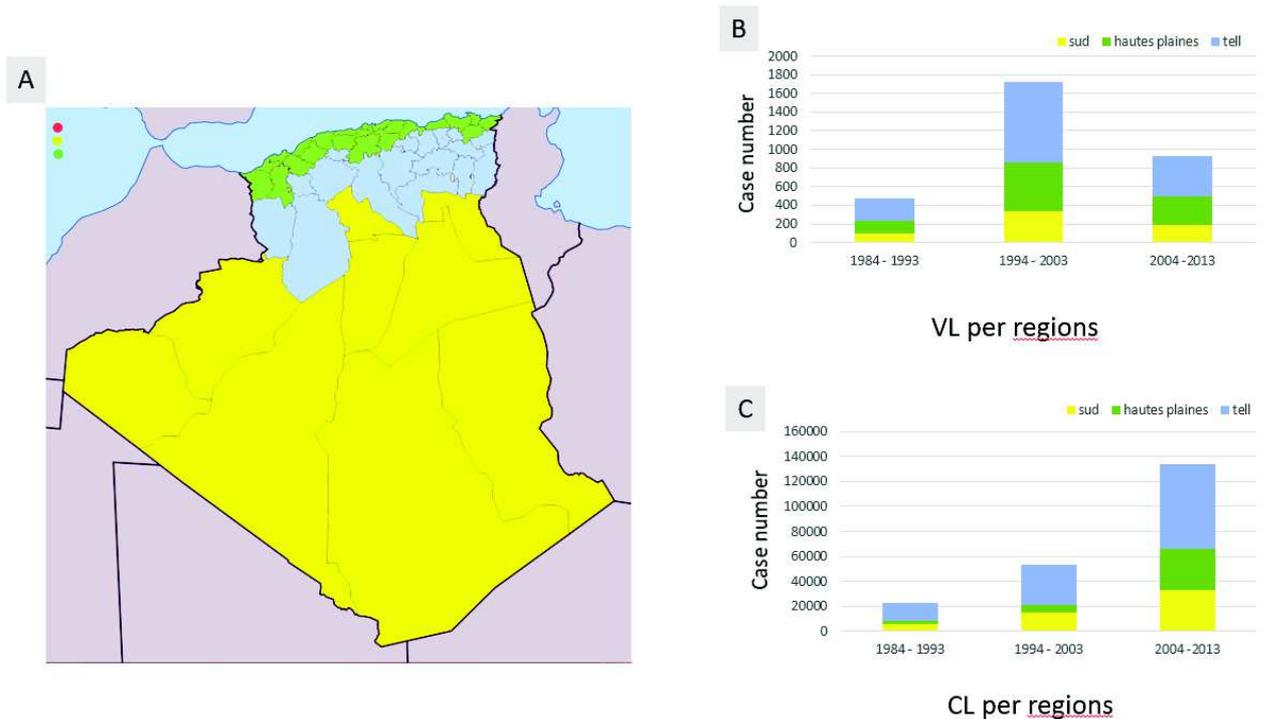
(B) Evolution du nombre de cas de 1981 à 2013, (C) Incidence pour 100 000 habitants de 1981 à 2013



**Figure 25 : Distribution de l'Incidence et du nombre de cas total par décennie de la leishmaniose cutanée en Algérie**  
 (a) Incidence de 1994 à 2003, (b) Incidence de 2004 à 2013, (c) Nombre de cas de 1994 à 2003, (d) Nombre de cas de 2004 à 2013



**Figure 26 : Evolution de l'incidence et du nombre de cas de la leishmaniose cutanée en Algérie de 1981 à 2013**  
 (B) Evolution du nombre de cas de 1981 à 2013, (C) Incidence pour 100 000 habitants de 1981 à 2013



**Figure 27: Distribution du nombre de cas de LC et de LV par étage bioclimatique sur une période de 30 ans**

(A) Etages bioclimatique de l'Algérie, (B) Distribution de la LV par région et par décennie, (C) Distribution de la LC par région et par décennie

Par étage bioclimatique, on remarque que pour la LC, il y eu un accroissement du nombre de cas dans toutes les régions et surtout dans le sud. Alors que, la LV a connu une augmentation entre 1994 et 2003 dans toutes les régions, pour diminuer au cours de la dernière décennie. Le nombre de cas le plus important se retrouvant dans le nord (tell) (Figure 27).

Il est certain que les fluctuations importantes du nombre de cas d'une année sur l'autre constituent le caractère épidémiologique dominant de la plupart des formes de leishmaniose.

Cependant, la réalité de la situation épidémiologique des leishmanioses en Algérie est difficile à cerner. L'augmentation de l'incidence de cette affection peut être réelle ou tout simplement liée à une augmentation du nombre de cas recensés, les deux hypothèses ne s'excluant pas.

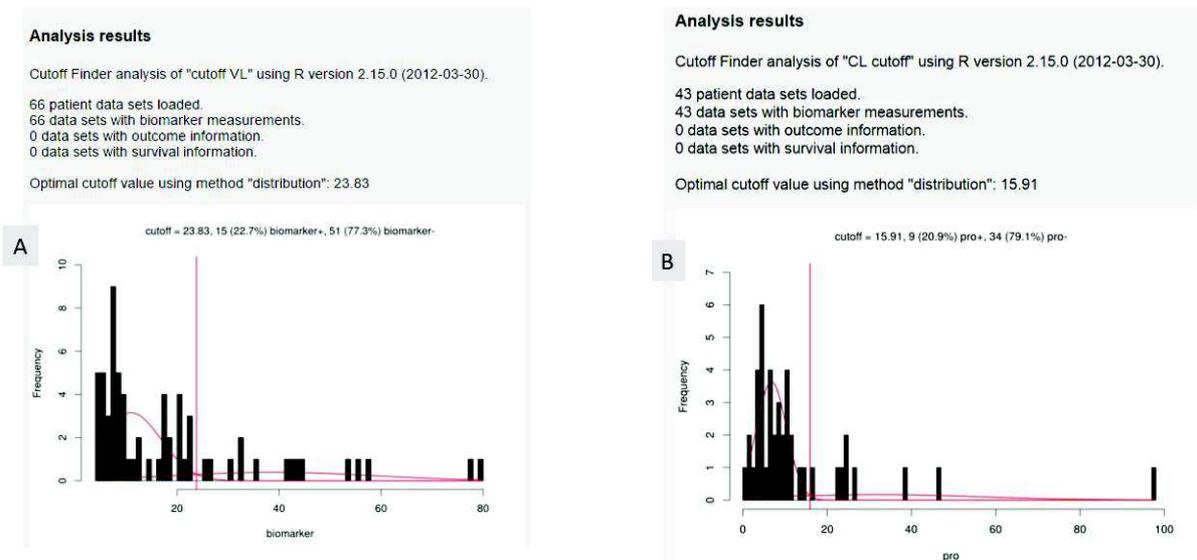
En effet, les facteurs de risque de transmission sont réunis pour une extension des anciens foyers et l'apparition de nouveaux avec une augmentation du nombre de cas. Parmi ces facteurs, les facteurs socio-économiques, notamment le caractère primitif du logement et le manque d'hygiène ; les projets agricoles, la mise en valeur des terres entraînant des transformations écologiques ; l'intrusion dans le cycle zoonotique de populations non immunisées pour exploiter les terres mises en valeur.

## 2.1.2. Résultats de la susceptibilité des souches à l'antimoine

### 2.1.2.1. La détermination du Cutoff (seuil de susceptibilité)

L'analyse du cutoff nous a permis de déterminer le seuil de susceptibilité (cutoff) des promastigotes au SbIII, pour les deux formes cliniques de la leishmaniose présentes en Algérie, en utilisant la méthode de distribution.

Tous les résultats obtenus par l'étude de sensibilité à l'antimoine trivalent SbIII pour l'ensemble de nos souches, sont représentés par les IC50, ont été analysés par l'application du cutoff (Figure 28A & 28B). Les valeurs optimales de cutoff pour les souches de LC et de LV étaient respectivement de 15,91  $\mu\text{g/ml}$  et 23,83  $\mu\text{g/ml}$  de SbIII. L'analyse de corrélation entre la susceptibilité du SbIII et SbV, des formes promastigotes et amastigotes respectivement, a montré une très bonne corrélation. L'analyse de corrélation par le test de Spearman, de susceptibilité à l'antimoine de toutes les souches, s'est révélée statistiquement fortement significative (\*\*\*) pour chaque drogue ( $P < 0.0001$ ). L'effet attribuable était très intéressant ( $r = 0.486$ ).



**Figure 28: Détermination du seuil de susceptibilité des IC50 des Promastigotes au SbIII**  
(A) Pour la LC, (B) Pour la LV

La projection de la ligne régression sur l'axe de SbV a permis de déterminer le seuil de susceptibilité à l'antimoine des formes amastigotes (Figure 29). Ce dernier était respectivement de 50 µg/ml et de 30 µg/ml de SbV pour les souches de LV et de LC. Les deux tiers des souches ont été évaluées en susceptibilité à l'antimoine *in vitro* pour les deux formes soit 68% (73/106). Sur la base du cutoff calculé et déduit, 75% (55/73) des souches expriment la même susceptibilité au SbIII et au SbV.

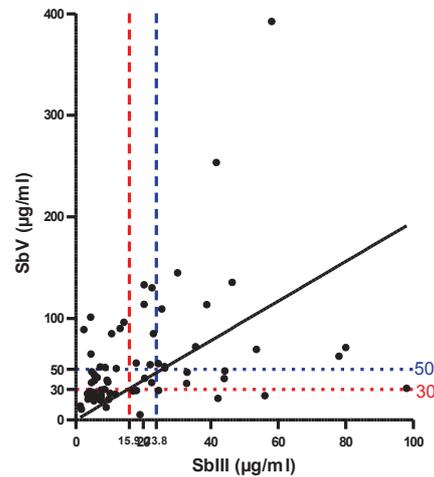


Figure 29 : Droite de corrélation des IC50 entre les susceptibilités au SbIII et au SbV

### 2.1.2.2. Evaluation du temps d'incubation des formes promastigotes

Afin de comparer et de valider les 3 jours de temps d'incubation, nous avons fait une analyse comparative des IC50 du SbIII, avec différents temps d'incubation : 24h, 48h, 72h. Nos résultats ont montré une meilleure corrélation à 3 jours d'incubation, entre les IC50 au SbIII des formes promastigotes et les IC50 au SbV des formes amastigotes (Figure 30).

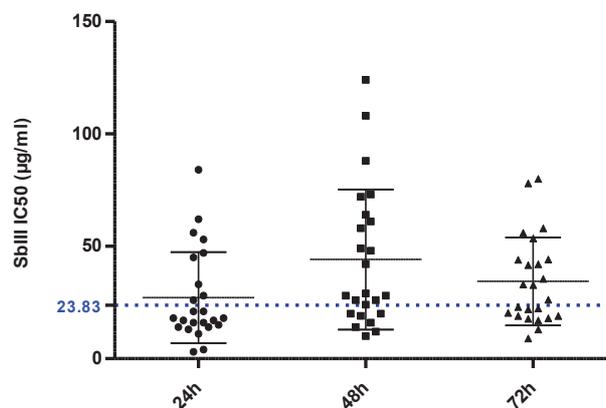


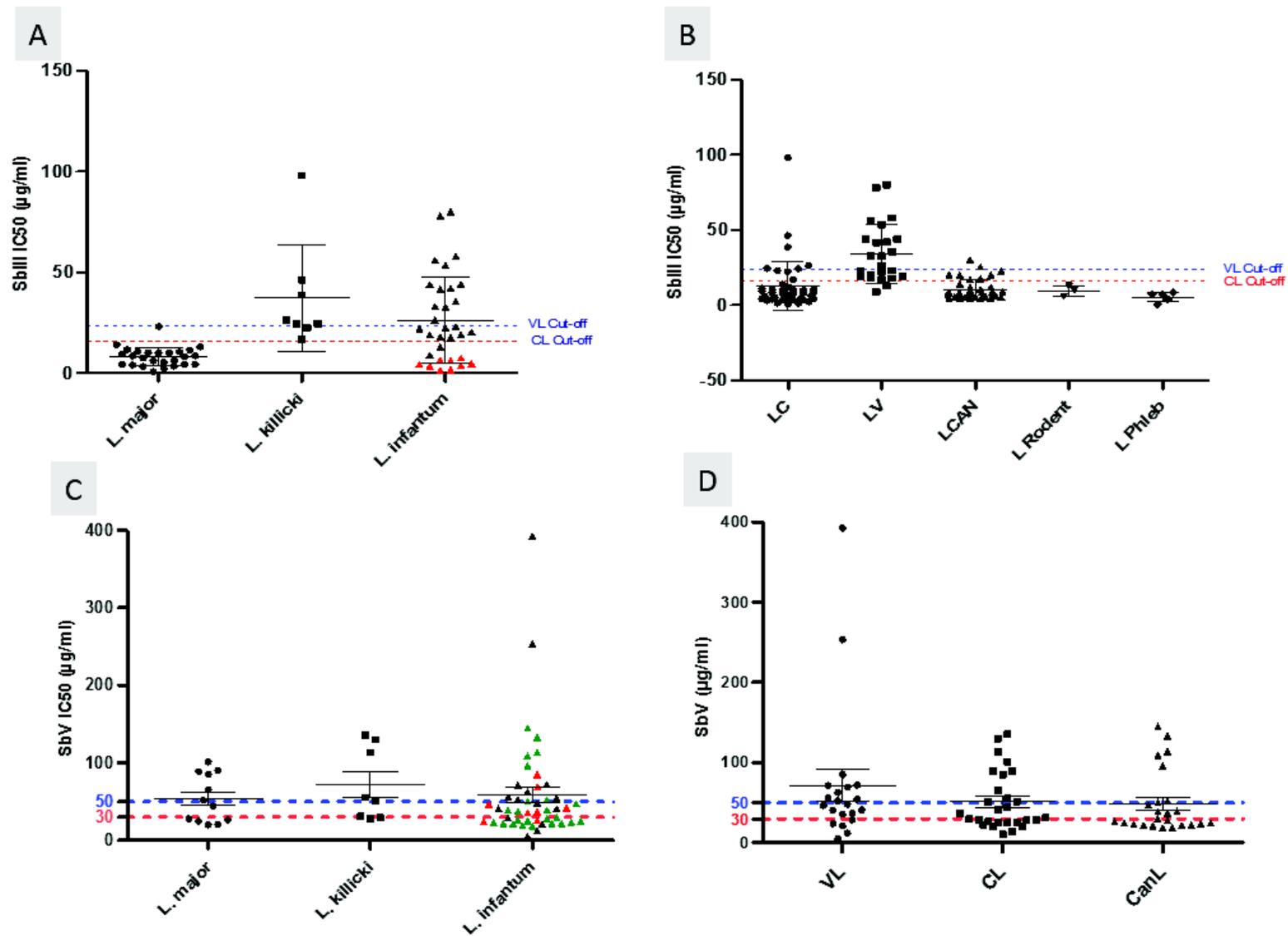
Figure 30 : Résultats de susceptibilité au SbIII des formes promastigotes pendant 24, 48 et 72 heures

### 2.1.2.3. Résultats de la susceptibilité à l'antimoine selon les espèces de *Leishmania* et la forme clinique

Les susceptibilités au SbIII et SbV diffèrent entre les souches d'une même espèce et entre les espèces et les formes cliniques (Figure 31). L'analyse de la variance a montré que les souches de *L. infantum* et de *L. killicki* sont significativement beaucoup moins sensibles au SbIII, en comparaison avec les souches de *L. major* avec une valeur de  $p < 0.001$  (Figure 31A, 31B). L'analyse de la variance en fonction des seuils de susceptibilités à l'antimoine calculés *in vitro*, a montré que pour l'espèce *L. killicki* nous retrouvons les proportions les plus élevées de susceptibilités à l'antimoine pour les formes promastigotes et amastigotes (100%, 8/8), suivi par *L. infantum* (71%, 37/52), alors que *L. major* semble avoir le taux de concordance le plus faible (25%, 3/12). Selon le seuil de susceptibilité (cutoff), plus de la moitié des souches sont résistantes au SbV (53%, 39/74), alors qu'un tiers des souches sont résistantes au SbIII (30%, 27/91).

En fonction des formes cliniques, l'analyse de la variance a montré que les souches LV sont moins susceptibles au SbIII que les formes cutanées avec respectivement 66% (16/24) pour les LV et 23% (10/43) pour les LC (Figure 31C, 31D). Le test de Tukey des comparaisons multiples, a révélé une différence fortement significative entre les deux formes cliniques ( $p < 0.0001$ ). La susceptibilité au SbIII des souches isolées de vecteurs et de rongeurs était en dessous du seuil du cutoff, alors que 8% des souches canines étaient résistantes au SbIII.

Par ailleurs, la susceptibilité au SbIII et au SbV était la même pour les deux tiers des souches ayant la même forme clinique (66%, 49/74). En fonction du cutoff, les souches les plus résistantes au SbV sont viscérales (57%, 12/21), suivies des souches cutanées (44%, 19/43). En comparaison, les souches canines ont exprimé le taux le plus faible de résistance au SbV (33%, 8/24). Il est important de noter qu'une souche de *L. major* résistante au SbV a été isolée chez le réservoir de la LC *Meriones shawi* (91µg/ml SbV IC50).

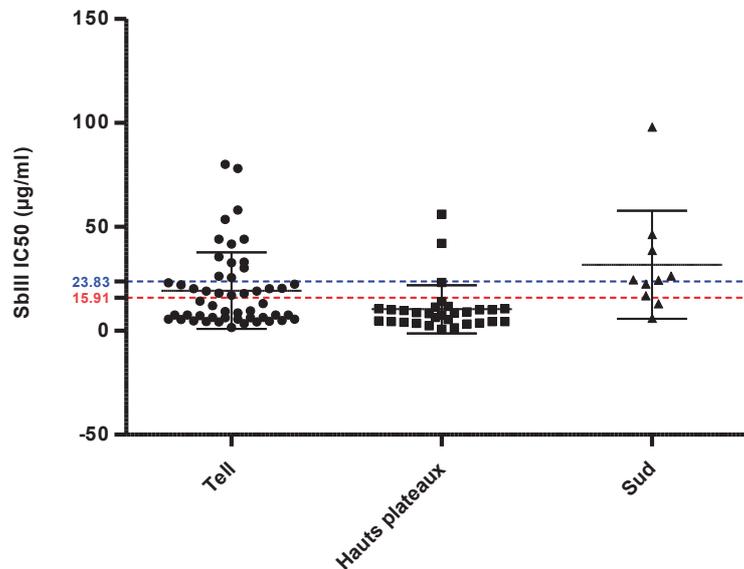


**Figure 31 : Résultats de la susceptibilité à l'antimoine selon les espèces de *Leishmania* et la forme clinique**

(A) IC50 SbIII en fonction des espèces, (B) IC50 SbIII en fonction des formes cliniques, (C) IC50 SbV en fonction des espèces, (D) IC 50 SbV en fonction des formes cliniques

#### 2.1.2.4. La susceptibilité spatiotemporelle à l'antimoine sur 3 décennies

L'analyse des variances de la susceptibilité au SbIII et SbV, des souches viscérales et cutanées, des 3 étages bioclimatiques de l'Algérie sur 3 décennies, a montré que les souches provenant du Sud sont devenues significativement résistantes entre 2004 et 2013 avec une valeur de  $p < 0.01$  (Figure 32).



**Figure 32 : Résultats de la susceptibilité à l'antimoine trivalent par étage bioclimatique de la leishmaniose en Algérie.**

Entre 1994 et 2003, une fréquence élevée de résistance aux deux drogues (SbIII et SbV), a été retrouvée pour les souches LV (75%, 6/8). Cependant la résistance des souches cutanées à l'antimoine a augmenté au cours de la dernière décennie (80% pour SbV et 40% pour SbIII) (Figure 33A, 33B).

Il est important de noter que les souches provenant des hauts plateaux, qui sont le principal foyer endémique, forment un cluster en dessous du cutoff de susceptibilité à l'antimoine de la LV et de la LC. Une petite partie des souches apparaît comme étant résistante à l'antimoine (figure 33). Alors que dans la région du Tell, d'où sont originaire la majorité de nos souches, la susceptibilité à l'antimoine présente une très grande variabilité, avec une médiane inférieure au cutoff (13 µg/ml).

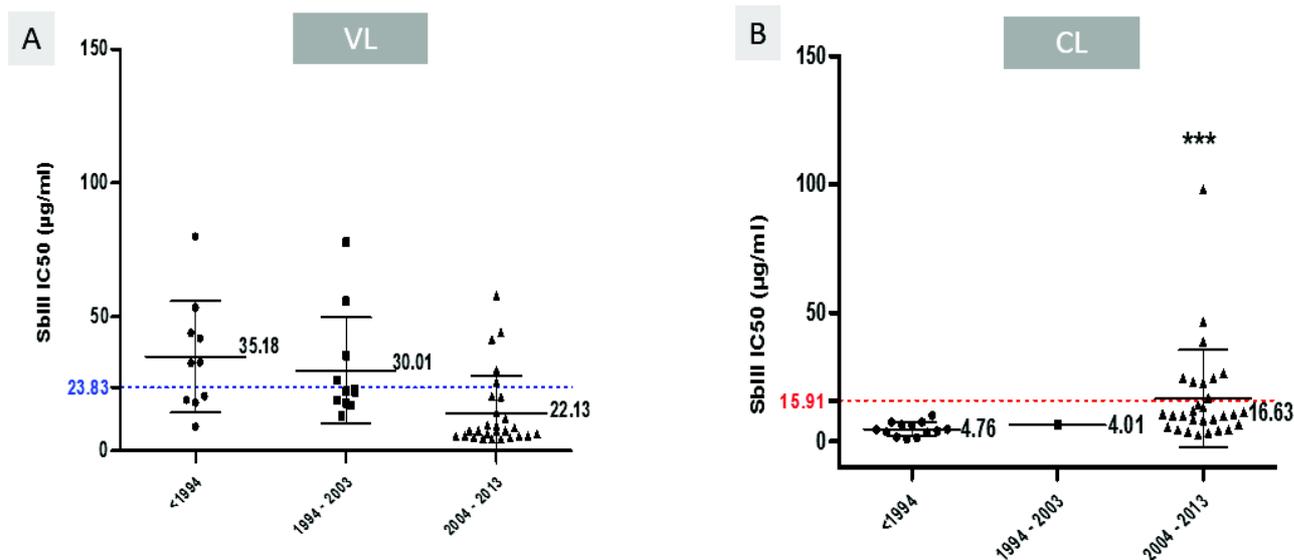


Figure 33 : Résultats de l'Evolution de la susceptibilité à l'antimoine trivalent  
En fonction du temps sur 3 décennies  
(A) LV, (B) LC

#### 2.1.2.5. L'analyse épidémiologique de la susceptibilité à l'antimoine en fonction du profil isoenzymatique : comparaison de 2 foyers Algérien et Français.

La variabilité des formes cliniques de la leishmaniose en Algérie a été mise en relief par l'analyse moléculaire du profil isoenzymatique des souches étudiées. L'analyse des zymodèmes a permis d'identifier 6 zymodèmes (Figure 34). Quatre zymodèmes appartiennent au complexe *L. infantum* (MON1, MON 80, MON 24, MON 281), un au complexe *L. major* (MON25), et un au complexe *L. killicki* (MON301). L'analyse de la variance ANOVA, du polymorphisme isoenzymatique et de la susceptibilité au SbIII, c'est avérée significative avec une valeur de  $p < 0.01$ . Le test de Tukey des comparaisons multiples, a montré une différence particulièrement significative entre les souches du zymodème de *L. killicki* MON 301 et les souches appartenant aux zymodèmes des autres souches cutanées : *L. major* MON 25 et *L. infantum* MON 24.

Un out-groupe de souches Françaises a été utilisé pour comparer la sensibilité à l'antimoine de deux régions du bassin méditerranéen avec des profils épidémiologiques différents. Toutes les souches Françaises étudiées appartenaient au zymodème MON 1. La susceptibilité à l'antimoine des souches Françaises était très faible et clustérisée en dessous du cutoff (Figure 35). Le test t non paramétrique a montré une différence fortement significative entre les deux pays ( $p < 0.001$ ). Par ailleurs, la susceptibilité à l'antimoine des souches du complexe *L. infantum* MON1 est très importante en Algérie, puisque 35% des souches sont résistantes au SbIII.

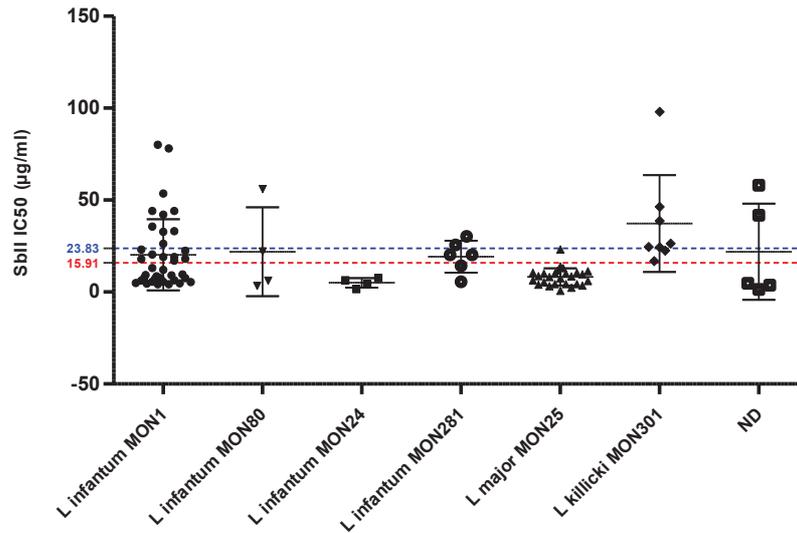


Figure 34: Résultats de l'analyse épidémiologique de la susceptibilité à l'antimoine trivalent en fonction du profil isoenzymatique

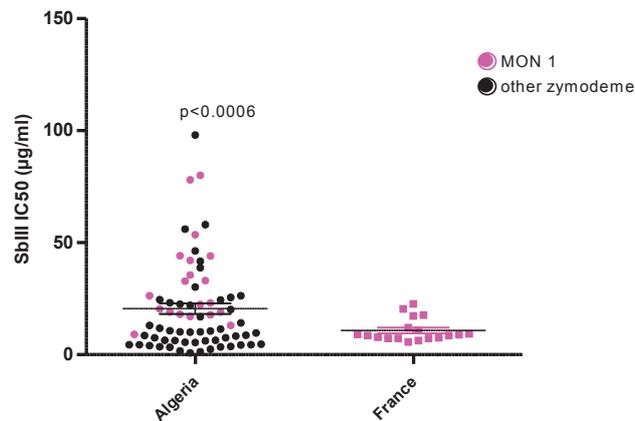


Figure 35 : Comparaison de la susceptibilité à l'antimoine trivalent de deux foyers de leishmaniose à *L. infantum* MON 1 : Algérie et France.

### 2.1.3. Discussion

L'analyse épidémiologique de la susceptibilité de *Leishmania sp.* à l'antimoine en Algérie est aussi multifactorielle que les agents responsables de la maladie, et de ces différentes formes cliniques. L'originalité de ce travail vient du fait qu'il explore tous les aspects de la leishmaniose en Algérie à travers une mise à jour des différents composants épidémiologiques sur une période de 30 ans, avec un intérêt particulier accordé au lien qui les relie à la résistance

du parasite à l'antimoine. Les résultats de cette étude nous ont fourni un profil détaillé de la susceptibilité de la N-méthyl glucamine pour les 3 espèces de *Leishmania* présentes en Algérie : *L. infantum*, *L. major* et *L. killicki*, selon leur profil et diversité épidémiologique, phénotypique et isoenzymatique. Cette étude était plus qu'une urgence d'autant plus que le Glucantime® est le seul traitement utilisé depuis plus de 50 ans dans un pays fortement endémique de la leishmaniose tel que l'Algérie.

L'épidémiologie de la leishmaniose est dynamique, et la maladie a été signalée comme ré-émergente et se propageant dans plusieurs régions (DESJEUX 2001 ; DUJARDIN 2006). Le contrôle de l'escalade de la maladie dépend de trois principaux facteurs : les changements environnementaux d'origine humaine, le statut Immunitaire (co-infection VIH) et les échecs aux traitements ainsi que la résistance aux drogues (DESJEUX 2001 ; DUJARDIN 2006 ; SCHONIAN *et al.*, 2008). Notre étude sur la résistance à l'antimoine en Algérie ne peut pas être dissociée des autres facteurs qui contrôlent la maladie. En effet, ces différents facteurs de risque s'influencent mutuellement et varie d'une région à une autre.

L'analyse de nos résultats sur l'évolution spatiotemporelle de la maladie sur une période de 30 ans, a montré que notre pays a connu plusieurs pics épidémiques de la LC et de la LV, le plus important étant celui de la LC en 2005 avec plus de 25 000 cas. Le caractère endémique de la maladie en Algérie, oblige les autorités de santé à lutter par tous les moyens contre la maladie. La première barrière étant le traitement par l'antimoine. L'Algérie applique les schémas de traitements recommandés par l'OMS, et le médicament est délivré gratuitement. Cependant, il n'y a que les deux tiers des sujets atteints de LC qui sont traités. D'autres moyens de lutte sont aussi utilisés et que la lutte contre le vecteur par des aspergions d'insecticide, ou bien par la destruction des terriers de rongeurs (CHERIF *et al.*, 2012 ; BOUDRISSA *et al.*, 2012). Bien que des campagnes de lutte anti vectorielles ont eu lieu suite au pics épidémiques de la LC, la maladie continue à connaître des flambées périodiques et on a même noté une extension de la LC à *L. major* vers le Nord (BOUDRISSA *et al.*, 2012).

Des études récentes ont mis en cause la circulation de souches résistantes à l'antimoine chez le chien en Algérie (AIT OUDHIA *et al.*, 2012) et dans d'autres pays du bassin méditerranéen (MAIA *et al.*, 2013, JEDDI *et al.*, 2014). Les premières explorations de résistance au traitement par le Glucantime remontent à 1986 (BELLAZOUG *et al.*, 1986). Au cours d'une enquête dans une région fortement de la LC à *L. major*, les auteurs avaient mis en évidence la présence de souches résistantes à l'antimoine. Des enfants ayant reçu 60mg/ml de meglumine antimoniate pendant 15 jours, n'ont pas montré de différence significative de réponse au traitement par rapport à ceux qui ont reçu un placebo. L'étude de la susceptibilité des souches isolées *in vitro* sur le modèle intramacrophagique, a permis de trouver des IC50 entre 18 et 52 µg/ml de SbV, alors que l'IC 50 de la souche référence *L. donovani* était de 6 µg/ml de SbV.(BELLAZOUG, 1986).

Au cours de notre étude, la réponse clinique au traitement par l'antimoine dans différents contextes géographiques a suggéré des différences dans l'efficacité des drogues en fonction

des espèces responsables de la maladie. Nos résultats de l'analyse *in vitro* de la susceptibilité à l'antimoine, ont montré que *L. killicki*, qui est une nouvelle espèce récemment découverte dans la région endémique de la LC de Ghardaïa (HARRAT *et al.*, 2009), est résistante à l'antimoine. Cette région qui est l'une des régions les plus endémique de la LC à *L. major*, a connus de fortes flambés de la maladie au cours de ces dernières années, et on suppose que la pression médicamenteuse est responsable de l'émergence de souches résistante à l'antimoine. D'autres facteurs intrinsèques de la souche pourraient avoir un rôle dans l'émergence de cette résistance, puisque plusieurs sur des souches appartenant au complexe *L. tropica* sont résistantes à l'antimoine (HADIGHI *et al.*, 2006).

Les résultats de la susceptibilité du complexe *L. major in vitro* sont beaucoup moins importants que ceux de *L. killicki* chez l'homme. Alors que chez le réservoir une souche *L. major* très résistante a été isolée à partir du Mériens (90,01 µg/ml de SbV). Des études antérieures sur la susceptibilité de *L. major* à l'antimoine, ont mis en relief une grande variabilité dans les sensibilités (FIRDOUS *et al.*, 2009 ; POLAT & KUTLUBAY, 2014 ; BENNIS *et al.*, 2015)

Pour le complexe *L. infantum*, une étude précédente sur la leishmaniose canine en Algérie, a démontré la circulation de souches *L. infantum* résistance au traitement. Ces résultats correspondent à nos résultats de résistance à l'antimoine de 70% des souches isolées chez l'homme. Il est important de noter qu'en Algérie, les chiens ayant une leishmaniose canine sont généralement euthanasiés. Les cas de LV humaines sont bien suivis en Algérie. La gravité de la maladie et la toxicité du traitement, nécessitent une hospitalisation jusqu'à la fin du traitement. En cas d'échec au traitement par le Glucantime®, d'autres molécules telles que l'Amphotéricine B sont utilisées. Par ailleurs, il a été démontré que la résistante à l'antimoine peut être transmise par les vecteurs (SEBLOVA *et al.*, 2014), on suppose qu'un nombre important de souches résistantes à l'antimoine circulent et pourraient potentiellement être transmises à l'homme.

Les données cliniques associées aux échecs aux traitements et le degré d'exposition aux drogues devraient être combinés aux analyses *in vitro* de la susceptibilité à l'antimoine pour déterminer les facteurs de risque et l'importance de la pharmacocinétique dans l'augmentation de la susceptibilité. Le degré d'exposition à la drogue, combiné à des essais cliniques seraient plus que nécessaires pour faire ressortir les facteurs de risque, d'autant plus que l'identification des espèces et leur profil à l'antimoine ne sont pas recherchés dans un examen de routine.

La résistance au traitement au cours de la leishmaniose est multifactorielle, puisque d'une part elle dépend de la réponse clinique de l'hôte, et d'autre part du phénotype de virulence et de résistance du parasite. Mais, l'un des problèmes les plus importants est le non suivi des modalités de traitement. En Algérie plusieurs cas d'échecs au traitement par le Glucantime® ont été rapportés aussi bien au cours de la LC que de la LV chez des sujets immunocompétents (ZAIT *et al.*, 2012 ; ADEL *et al.*, 2014).

La LC qui est la forme bénigne de la maladie, mais qui laisse des cicatrices indélébiles pose un sérieux problème. Le nombre de cas est sous-estimé, et plus du tiers des malades ne se font pas soigner. En fait, les praticiens ne suivent pas toujours les protocoles recommandés par l'OMS. De plus le non-respect de la durée du traitement peut être dû aussi au malade qui ne veut plus suivre la thérapeutique qui nécessite un déplacement vers la structure de santé et parfois une hospitalisation en cas de lésions multiples.

Par ailleurs, la population à risque de la maladie est très importante. Les résultats de l'évolution spatiotemporelle montrent que la population Algérienne a connu une forte augmentation durant ces 30 dernières années. L'incidence de la LC est très importante dans les wilayas de Msila, Biskra et Bechar avec un maximum de 488 cas pour 100 000 habitants pour la wilaya de Biskra entre 2004 et 2013. En plus de la population autochtone, ces régions subissent un mouvement de troupe important augmentant ainsi les risques de dissémination de la maladie. Dans une enquête dans la région de Batna de 2009 à 2014, plus de 25% du personnel militaire ont eu la LC (BENSGHIR *et al.*, 2015).

Les résultats de susceptibilité à l'antimoine, ont révélé des souches résistantes au SbIII et SbV aussi bien au cours de la LC, de la LV, et la L. Can. Nos résultats montrent bien que le phénotype résistant est bien présent dans les souches algériennes, et que la résistance aux agents antimicrobiens *in vitro* ne reflète pas forcément la réponse clinique individuelle. Alors que certains travaux ont montré que le risque ou la fréquence d'échec thérapeutique augmente en fonction de la concentration minimale inhibitrice IC50 (BROCHU *et al.*, 2003 ; BHAT *et al.*, 2007 ; FERNANDEZ *et al.*, 2012). Le caractère zoonotique de la transmission de la leishmaniose en Algérie, ne permet pas forcément d'expliquer le schéma de transmission des souches résistantes. Dans la forme anthroponotique de la leishmaniose tel qu'en Inde où le plus grand nombre de cas résistants au traitement par l'antimoine a été rapporté, les souches circulent entre les humains, sans passer par un réservoir, puisque l'homme constitue lui-même un réservoir (SUNDAR *et al.*, 2000 ; SINGH *et al.*, 2006). La substitution de l'antimoine par la Miltéfoïne a réduit considérablement les échecs au traitement de la LV à *L. donovani* (SUNDAR *et al.*, 2006). Ces résultats ont permis d'attribuer cette résistance à l'antimoine à la pression de sélection de la drogue qui a été démontré *in vitro* (CROFT, 2006 ; ASHUTOSH *et al.*, 2007 ; VANAERSCHOT *et al.*, 2013). Dans le cas de leishmaniose zoonotique, la pression de sélection de la drogue ne devrait pas être présente chez le réservoir, et par conséquent les parasites résistants ne devraient émerger que chez les sujets traités. Ils seraient difficilement transmis chez le réservoir, sauf si le mécanisme de résistance possède un impact sur la physiologie du parasite (PONTE SUCRE, 2013 ; VANAERSCHOT *et al.*, 2013).

Malgré les moyens de lutte mis en œuvre contre la leishmaniose en Algérie, on retrouve des pics épidémiques, et dans le panel des souches isolées aux cours de ces périodes, nous avons remarqué l'augmentation significative des souches cutanée résistante à l'antimoine, surtout au niveau du Tell et dans le Sud. Alors que les souches cutanées du Nord appartenant au complexe *L. infantum* sont plutôt sensibles au SbIII et SbV. La forte prévalence des souches résistantes aux traitements *in vitro* doit être sous-estimée, surtout que le suivi après le

traitement n'est pas toujours réalisé, ce qui ne peut que favoriser la sélection de souches résistantes.

L'évaluation *in vitro* de la susceptibilité des souches isolées à des drogues anti leishmanienne repose sur l'évaluation quantitative de la survie intracellulaire des amastigotes après exposition des cellules hôtes infectées aux médicaments correspondants (VERMEERSCH *et al.*, 2009 ; DE MUYLDER *et al.*, 2011). De nombreuses études sur des souches isolées de patients traités dans des régions endémiques, ont montré une augmentation de prévalence des valeurs des IC50 directement liée aux résultats des traitements de ces patients, mais reste cependant controversées (NATERA *et al.*, 2007 ; RIJAL *et al.*, 2007). Par ailleurs, le seuil de susceptibilité (cutoff), représente aussi un sérieux problème puisqu'il n'y a pas de consensus entre les différentes études, et que diverses souches références sont utilisées. L'une des méthodes les plus utilisées est celle de YARDLEY *et al.* (2006), mais dont le principal problème est la standardisation des souches références utilisées, d'où la difficulté de son application.

L'analyse du cutoff des IC50 des souches Algériennes, nous a permis de déterminer un seuil de susceptibilité (cutoff) pour les formes promastigotes au SbIII de 15,91 µg/ml et au SbV de 23,83 µg/ml, pour la LC et la LV en utilisant la méthode de distribution (BUDCZIES *et al.*, 2012). Ces résultats nous ont permis de réaliser une définition plus précise du phénotype sensible (S) et résistant (R) à l'antimoine, puisque la majorité des études ne prennent en compte que la sensibilité des amastigotes uniquement (SbV) ou des promastigotes uniquement (SbIII). En considérant la susceptibilité du SbIII et le SbV, une définition plus précise du phénotype de susceptibilité à l'antimoine est possible. Le phénotype S/S est associé à la guérison, le phénotype R/R à la non réponse au traitement, et le R/S au phénotype intermédiaire (DA LUZ *et al.*, 2009). Une étude complémentaire qui prendra en compte la réponse Clinique permettrait de confirmer cette hypothèse. Cependant, notre étude sur un large panel d'espèces nous a permis de valider une utilisation du cutoff calculé comme un premier outil de sélection des souches qui pourrait être utilisé dans des études épidémiologiques à grandes échelle dans des pays endémiques tel que l'Algérie.

De plus, l'un des autres paramètres à prendre en considération dans le screening des composés leishmanicides est le temps d'incubation. Nos résultats nous ont permis de confirmer le choix des 72 heures d'incubation pour le test de sensibilité du SbIII sur les formes promastigotes. Il est vrai que la durée d'incubation n'est pas toujours standardisée et qu'elle va de 48 à 72 heures (DUTTA *et al.*, 2005 ; GANGULY *et al.*, 2006). Nos résultats ont montré qu'au bout de 48h les IC50 étaient différentes de celles des 72 heures. Ces résultats ne sont possibles que si la croissance des souches de *Leishmania* est homogène. Cette croissance diffère selon le tropisme des souches et des espèces (KBAIER-HACHEMI *et al.*, 2012). L'étude de la cinétique de croissance des souches cutanées abordées plus tard dans notre travail de thèse le montre bien. Aussi il est important de standardiser les cinétiques de croissance pour avoir des résultats homogènes sur les Promastigotes utilisés pour le test SbIII. Ces derniers doivent être en phase exponentielle, alors que les ceux utilisés pour l'infestation

intramacrophagique doivent être en phase stationnaire et riche en formes métacycliques infectantes (NATERA *et al.*, 2007 ; DA LUZ *et al.*, 2009).

L'analyse de la susceptibilité des souches algériennes étudiées en fonction de leur origine géographique a bien montré qu'il y avait eu une augmentation de la résistance à l'antimoine dans les souches cutanées du Sud, et que les souches viscérales provenant du Nord ont des sensibilités variables. Afin de mieux comprendre les variantes qui régissent cette susceptibilité, nous avons comparé la sensibilité d'antimoine de souches provenant de deux zones géographiquement distinctes qui diffèrent en terme d'histoire de la consommation d'antimoine de la région : Alger (basse pression de l'antimoine dans le réservoir canine) et les Cévennes (antimoine est largement utilisé pour traiter la leishmaniose canine depuis les années 80). Toutes les souches appartenaient au zymodème *L. infantum* MON 1. Nos résultats ont fait ressortir une différence fortement significative entre les deux régions, et à notre grande surprise la région qui subit le moins la pression médicamenteuse est celle où nous avons retrouvés le plus de souches résistantes (Algérie).

Dans le bassin méditerranéen, plusieurs études ont signalé une résistance clinique liée à l'infection par des souches *L. infantum*, associé à une faible susceptibilité à l'antimoine en France (FARAUT-GAMBARELLI *et al.*, 1997) et en Espagne (CARRIO *et al.*, 2001). Dans la partie occidentale de la méditerranée, où les chiens qui sont le réservoir de la maladie sont traités avec l'antimoine, la sélection de souches résistantes a été rapportée (CARRIO *et al.*, 2002). En France, le traitement à l'antimoine au cours de la leishmaniose canine est utilisé depuis les années 70, alors que la souche la plus ancienne a été isolée en 1974. Toutes les souches Françaises étaient sensibles au SbIII (en dessous du cutoff), alors que 35% des souches Algériennes sont ressorties résistantes à l'antimoine trivalent. Ces résultats suggèrent que la pression de l'antimoine appliquée n'a pas d'effet significatif sur la susceptibilité à l'antimoine des souches appartenant au zymodème MON 1. Cependant, il ne faut pas oublier que plusieurs zymodèmes de *L. infantum* sont retrouvée chez le chien en Algérie (BENIKHLEF *et al.*, 2004 ; AIT OUDHIA *et al.*, 2011), et que récemment le MON 281 découvert en 2010, a révélé un phénotype très résistant à l'antimoine (AIT OUDHIA *et al.*, 2012). Les facteurs sous-jacents de sélection de ces souches restent inconnus et nécessiteront de plus amples investigations.

Notre analyse de la susceptibilité à l'antimoine des promastigotes, en fonction des espèces et des formes cliniques isolées entre 1984 et 2013, a montré une grande variabilité. Nous avons remarqué une clusterisation en fonction des espèces. Le complexe *L. infantum* possède une susceptibilité variable dans les formes viscérales à MON 1, alors que dans les formes cutanées à MON 24, la susceptibilité à l'antimoine est en dessous du cutoff. Une analyse comparative entre les zymodèmes des différentes souches cutanées a montré une différence significative, faisant ressortir le phénotype résistant des souches du MON 301 de *L. killicki*. Dans des études antérieures, des résistances aux antimoniées ont été rapportées comme étant fortement

associés (AIT OUDHIA *et al.*, 2012 ; FERNANDEZ *et al.*, 2014). Bien que le phénotype de sensibilité aux antimonies ne semble pas directement lié au profil isoenzymatique, nos résultats montrent que la MLEE peut fournir des marqueurs potentiellement exploitables pour des applications épidémiologiques et des décisions cliniques. Ces populations peuvent également donner un aperçu des mécanismes impliqués dans leurs susceptibilités divergentes à l'antimoine qui peut être pertinents et utiles selon les espèces.

De l'ensemble de nos résultats, ressort un fait important : la baisse de susceptibilité aux drogues et l'apparition de résistance peut être un phénotype intrinsèque et/ou acquis. Une souche avec une susceptibilité intrinsèque faible ou tolérante peut devenir totalement résistante (ROJAS *et al.*, 2006 ; OBONAGA *et al.*, 2014, FERNANDEZ *et al.*, 2014). Néanmoins, compte tenu de la longue histoire de l'utilisation de la monothérapie en Algérie, des éléments de transmission zoonotique de la maladie, et des souches déjà rapportées comme cliniquement résistantes, la discrimination intrinsèque et / ou acquise des bases du phénotype de sensibilité aux médicaments reste difficile. La résistance intrinsèque à des médicaments spécifiques résultant de l'absence de la cible moléculaire correspondant comme on le voit en particulier des groupes phylogénétiques des bactéries n'a pas encore été observée pour les médicaments antileishmaniens. La monothérapie pourrait amplifier la résistance intrinsèque, ainsi que les mécanismes acquis. Le coût biologique ou l'avantage de perte de sensibilité et sa transmission vont influencer les politiques et pratiques de traitement, avec un impact considérable sur la sensibilité aux médicaments des populations de *Leishmania* en Algérie.

A travers cette étude, il ressort une synergie spécifique entre les facteurs de risque étudiés, et le caractère épidémiologique de la résistance aux antimonies et la nature des défis qu'ils posent pour les programmes de contrôle locaux. Et bien que les antimonies ne sont plus utilisés comme traitement de première ligne dans plusieurs pays du sous-continent indien, nous pouvons encore tirer de nombreuses leçons de l'expérience avec ce médicament par rapport à (1) la spéculation de l'avenir du peu d'autres médicaments disponibles et (2) de la conception et la mise en œuvre des stratégies adéquates de surveillance pour surveiller leur efficacité.

## **2.2. Etude des marqueurs de résistance à l'antimoine sur un modèle murin : la souris BALB/c**

L'étude de différents aspects de la résistance au traitement à l'antimoine sur un modèle murin, qui est génétiquement homogène, représente un modèle de choix pour une meilleure compréhension des mécanismes et la recherche de marqueurs. Au cours de cette étude notre choix c'est porté sur la souris BALB/c qui est génétiquement susceptible à la maladie. Quatre volets seront abordés dans ce chapitre : Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à l'étude de la dynamique de croissance des souches responsables de la LC, à savoir *L. major* et *L. killicki* afin d'étudier la capacité de ces souches à se développer *in vitro* en fonction de leur susceptibilité à l'antimoine.

Dans un deuxième et troisième volet, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité des phénotypes externes (début de la maladie, virulence de l'inoculum, taille des lésions et des indurations), et des phénotypes internes (dissémination de la maladie), au cours de la LC à *L. major* pour des souches qui exprimaient des susceptibilités à l'antimoine, sensibles et résistantes *in vitro*. Par la suite cette variabilité on a caractérisé des souches qui sont naturellement résistantes au Glucantime® isolées après échec au traitement chez des sujets immunocompétents.

Le dernier volet, va nous permettre de démontrer la validité du modèle *L. killicki* que nous avons mis en place, en tant que modèle pharmacologique de la LC.

### **2.2.1. Résultats de l'étude de la dynamique de croissance des souches cutanées *in vitro***

Les résultats de la cinétique de croissance des souches *L. major* selon la sensibilité des souches au SbIII (sensibles, intermédiaires, résistantes), sont regroupés dans la figure 36.

Les cinétiques de croissance des souches apparaissent différentes. Certaines souches ont une croissance lente tel que LIPA 100/09 et LIPA 99/09 et LIPA 136/10, alors que d'autres souches tel que LIPA 98/09, LIPA 102/09 et LIPA 175/11 montrent une croissance plutôt rapide. La majorité des souches sont en début de phase stationnaire de J3. à J5. Bien que la croissance soit en phase exponentielle pour certaines souches, on note une diminution de la mobilité des leishmanies et un arrondissement des formes qui montre des cellules en début d'apoptose.

Une analyse statistique par ANOVA sur les 3 catégories de souches selon leur sensibilité au SbIII, et leur cinétique de croissance n'a pas montré de différence significative à l'intérieur de ces trois groupes. On note sur la figure 36(a) que LIPA 137/10 et LIPA 98/09 ont la même cinétique, bien que LIPA 137/10 soit 2 fois plus résistante que LIPA 98/09. Pour les souches sensibles, LIPA 102/09 et LIPA 103/09 ont la même allure de croissance avec des IC50 très proches, respectivement de 16 et 19µg/ml.

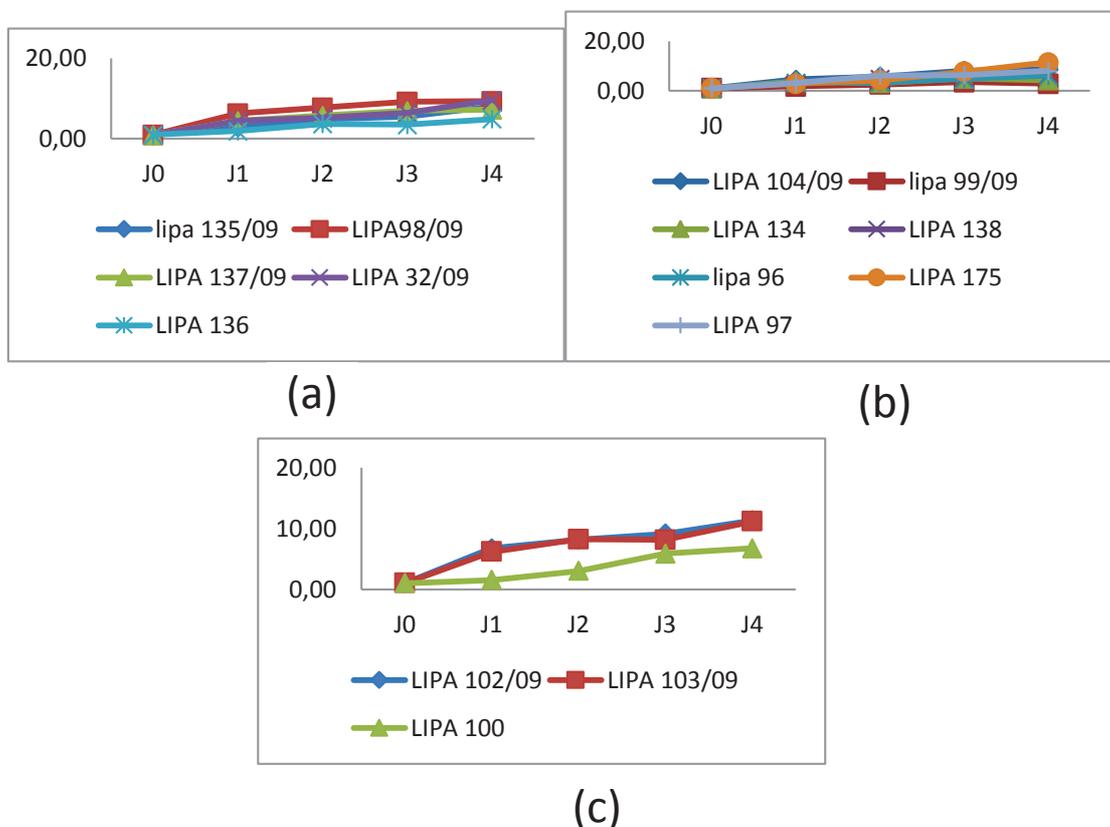
Par ailleurs, la dynamique de croissance des formes promastigotes des souches de *L. killicki* isolées depuis 2005 en Algérie à l'IPA, a été exploré sur milieux NNN et RPMI à 10% de SVF

avec différentes concentrations initiales. L'objectif étant d'utiliser au mieux la cinétique de croissance pour une étude plus efficace de *L. killicki*.

La cinétique de croissance des 8 souches de *L. killicki* semble beaucoup plus lente que celle de *L. major*, et les formes métacycliques n'apparaissent que tardivement. Elles sont retrouvées à J10 et même plus tard.

Selon les concentrations initiales, nos résultats ont montré qu'à une Concentration initialement (Ci) de  $10^4$  sur RPMI, la croissance est particulièrement lente et stable. Cependant on note des viabilités très importantes, atteignant les 75 à 85%. Alors que pour une Ci de  $10^6$ , la croissance est plutôt rapide, mais avec une viabilité moins importante et une phase stationnaire très courte, en raison d'une consommation rapide du milieu. La croissance à  $10^5$  est moins importante qu'à  $10^6$  mais elle est plus lente et avec une viabilité plus intéressante (figures en annexe).

Sur le milieu RPMI, milieu très riche en éléments nutritifs, la croissance de *L. killicki* à  $10^5$  apparaît comme étant plus avantageuse et idéale pour une utilisation en test de sensibilité aux drogues ou pour une production de formes métacycliques sur une période de culture plus longue. Si au contraire, l'utilisation des souches doit se faire sur une courte durée, une Ci de  $10^6$  est plus favorable.



**Figure 36 :** Cinétique de croissance des souches de *L. major* selon leur sensibilité au SbIII  
(a) Résistantes, (b) intermédiaires, (c) sensibles

En raison de son bas prix et de sa préparation facile, le NNN est beaucoup plus utilisé dans la production des parasites obtenus à partir de moelle, de biopsie de la rate, ou bien par un grattage de la peau. Alors que le RPMI, milieu liquide et plutôt cher, permet de produire une grande quantité de parasites en très peu de temps (OZBLIGI *et al.*, 1995, NASIRI *et al.*, 2013)

L'allure des courbes de croissance sur NNN est presque similaire entre les souches pour les deux Ci étudiées ( $10^5$  et  $10^6$  cellules/ml). Le NNN, milieu d'isolement, favorise une croissance homogène, plutôt que rapide quel que soit la concentration de départ. Son utilisation est plus indiquée pour l'entretien des souches avant d'entamer les cultures sur RPMI à 10% de SVF.

Une comparaison de la viabilité et du pic de croissance entre les 8 souches de *L. killicki* a montré que sur NNN et à une Ci de  $10^5$ , nous rencontrons 3 groupes avec des pic à J3 (LIPA 281/11), J5 (LIPA 279/11, LIPA 11/05, LIPA 14/05) et J8 (LIPA 281/11, LIPA 282/11, LIPA 283/11, LIPA 10/05). Alors qu'avec une Ci de  $10^6$  nous ne retrouvons que 2 groupes à J3 et J8 avec respectivement LIPA 279/11 LIPA 07/05, LIPA 11/05 et LIPA 14/05 pour le premier groupe, et LIPA 281/11, LIPA 282/11, LIPA 283/11 et LIPA 10/05 pour le deuxième groupe.

Sur milieu RPMI, une comparaison entre le maximum de viabilité atteint et les pics de croissance des 8 souches, pour les 3 concentrations étudiées ( $10^4$ ,  $10^5$  et  $10^6$ ), a révélé deux groupes pour  $10^4$  à J2 et à J5, 2 groupes pour  $10^5$  à J3 et J6 et 2 groupes pour  $10^6$  à J3 et J6.

La cinétique de croissance des souches *L. killicki* a révélé deux phases exponentielles : une précoce entre J2 et J4 et une phase tardive vers J8, et ce quel que soit le milieu ou la concentration de départ. Cette cinétique semble différente de celle de *Leishmania tropica* qui connaît un pic de croissance à J8 pour le NNN et à J10 pour le RPMI pour une Ci de  $0,7 \times 10^6$  promastigotes/ml. Pour une utilisation optimale des milieux de culture NNN et RPMI, nos résultats ont montré qu'en moyenne, une concentration de départ de  $10^5$  cellules/ml de milieu permettrait d'obtenir un maximum de croissance avec un taux élevé de formes métacycliques entre J2 et J3 ou bien entre J6 et J8.

La comparaison de la cinétique de croissance entre les souches résistantes au SbIII et les souches sensibles a permis par l'analyse statistique de caractériser des groupes homogènes par l'égalité des moyennes obtenues par l'ANOVA à un facteur. Les résultats de ce test montrent qu'il n'existe pas de différences significatives entre la cinétique de croissance des différents groupes classés selon leurs sensibilités à l'antimoine trivalent, donc la vitesse de croissance n'est pas considérée comme un facteur déterminant de la sensibilité ou de la résistance au SbIII pour *L. major* et *L. killicki*.

Il ressort de l'ensemble des paramètres de cultures étudiés qu'une étude complémentaire sur les différences morphologiques des parasites présentes pendant le cycle de croissance est indispensable afin de pouvoir identifier des marqueurs moléculaires et spécifiques à chaque étape du développement.

## 2.2.2. Caractérisation de l'infection des souris BALB/c par des souches de *Leishmania major* susceptible à l'antimoine *in vitro*

### 2.2.2.1. Phénotype externe

Afin de comparer les phénotypes externes de deux souches de *L. major* de susceptibilité différente à l'antimoine : souche résistante LIPA 175/11 et souche sensible LIPA 100/09, les indurations, le diamètre des rougeurs, le diamètre des lésions, ont été mesurés chaque semaine.

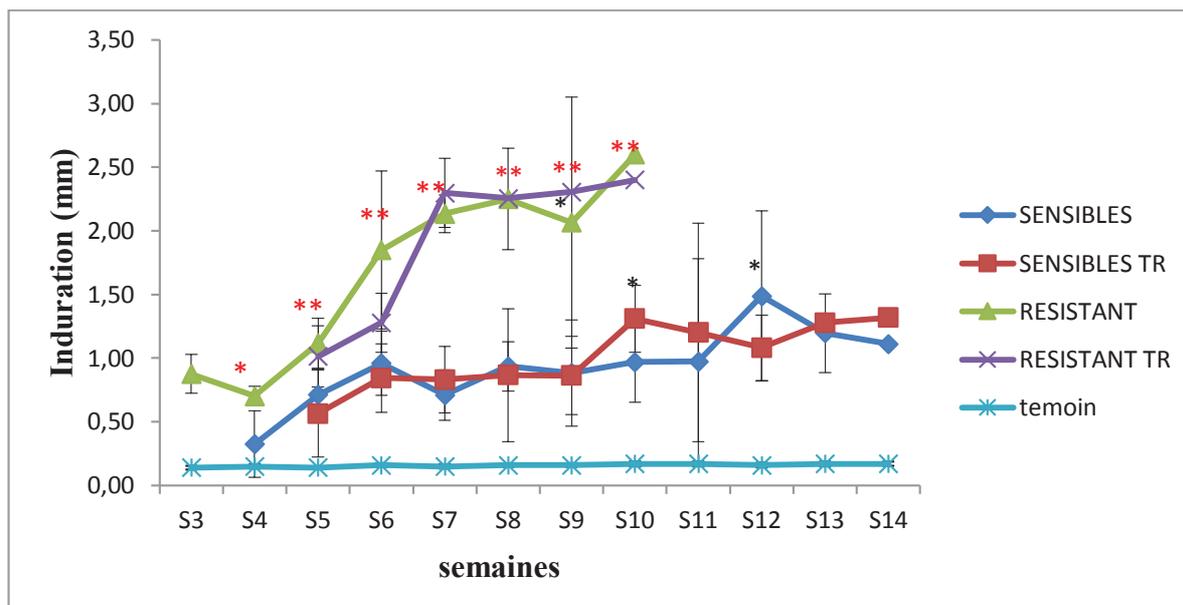
- **Les indurations**

Le premier signe d'infestation par *L. major* inoculé dans les oreilles des souris BALB/c se manifeste sous forme d'indurations. On remarque l'apparition de ces dernières dès la 3<sup>ème</sup> semaine pour la souche résistante (LIPA 175/11). En revanche, les indurations de la souche sensible (LIPA 100/09), ne sont apparues que vers la quatrième semaine et étaient moins importantes (figure 37, 38).

L'analyse statistique des indurations par le test de Student a été faite entre la souche sensible et souche résistante, pendant le traitement c'est-à-dire de S4 à S8 et après traitement de S9 à S14. Une différence significative entre les valeurs d'indurations des souris infectées par la souche sensible et la souche résistante, a été observée de la semaine S4 à S10. Les indurations variaient entre 0,28mm et  $1,3 \pm 0,50$  mm pour la LIPA 100/09, et entre 0,77 mm et  $2,47 \pm 0,42$  mm pour la LIPA 175/11. Cette différence montre que la souche résistante possède un phénotype externe plus virulent que celui de la souche sensible au Glucantime®.

On note que le traitement n'a pas d'effet notable sur les indurations de la souche sensible entre S5 et S14. Les courbes d'indurations sont presque similaires. Et bien qu'on remarque une différence à S10 et S12, la comparaison des moyennes par le test de Student n'a pas montré de différence significative ( $p < 0.05$ ).

Par contre, des indurations plus importantes et progressives sont notées pour les lots des souris traités et non traités de la souche résistante LIPA 175/11 entre S5 et S10. Le traitement réduit très significativement les indurations ( $P < 0.001$ ). Le phénotype résistant au Glucantime® de la souche ressort en fin de traitement à S8, où les indurations sont pratiquement les mêmes entre les lots traités et non traités. Alors qu'à S9, il existe une différence significative entre les 2 lots, avec des indurations plus importantes pour le lot traité.



**Figure 37 : Evolution des indurations des oreilles des souris BALB/c post infection par des souches sensibles et résistantes avant et après traitement par le Glucantime®.**

(\* différence significative  $\alpha < 5\%$ , \*\* différence hautement significative  $\alpha < 1\%$ ).



(A)



(B)

**Figure 38 : Photos des indurations apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par LIPA 100/09 (A) à S6 et par LIPA 175/11 (B) à S5.**

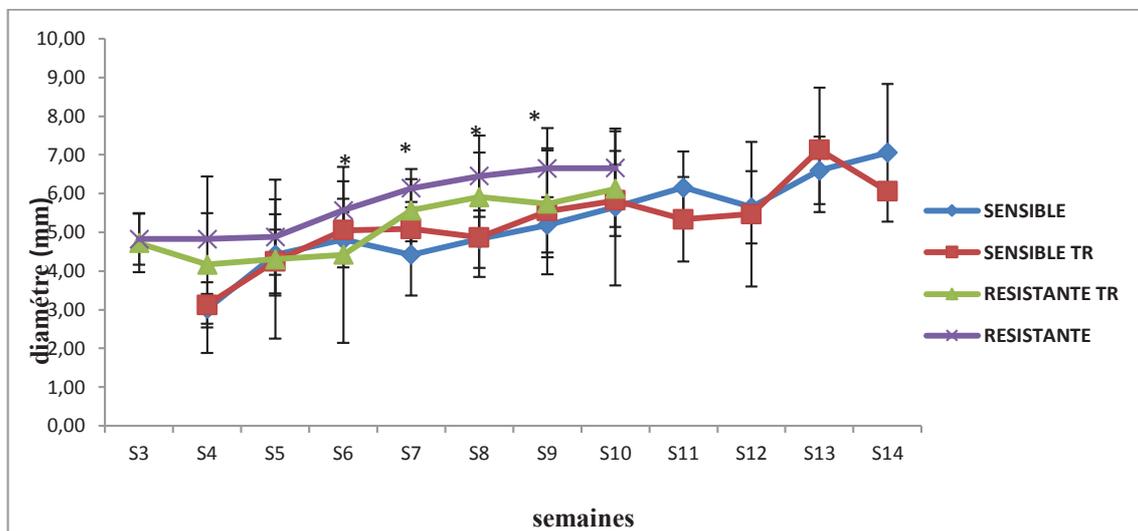
- **Les rougeurs**

L'apparition de l'inflammation est exprimée aussi sous forme de rougeur au niveau du site d'inoculation. Tout comme les indurations, les rougeurs se manifestent plus tôt (S3) chez les souris infestées par la souche résistante LIPA 175/11 que celles infestées par la souche sensible LIPA 100/09, qui se manifeste à S4 (figure 39, 40).

Le diamètre des inflammations est plus marqué dans le lot de souris infectées par la souche résistante qui varie de 4,4mm jusqu'à  $6,66 \pm 0,9$  mm, tandis que le lot infecté par la souche sensible montre des diamètres plus réduits qui varient entre 3mm et  $5,6 \pm 0,96$  mm. Pour la souche résistante, les lots traités et non traités présentent des valeurs de rougeurs proches qui varient entre 4,5mm et  $6,1\text{mm} \pm 1,1$  pour la souche résistante traitée et entre 4,4mm et

6,6 ± 0,9 mm pour celle qui n'est pas traitée. Les mêmes résultats sont retrouvés pour la souche sensible. L'analyse statistique par ANOVA, des lots traités et non traités de la souche sensible a montré qu'il n'y avait pas de différence statistique entre ces groupes. Et bien qu'on note une diminution des rougeurs à S7, on ne trouve pas de différence significative. Bien au contraire, de S8 à la fin du traitement, les oreilles avaient des rougeurs plus importantes que celles des non traitées.

Pour la souche résistante, le diamètre des rougeurs augmente au cours du traitement, mais son intensité est moins importante chez les traités, et ce jusqu'à S10, c'est-à-dire 2 semaines après la fin du traitement. Une analyse statistique par ANOVA entre les lots au cours du temps, puis par le test de Student, a montré une différence significative entre les lots traités et non traités en faveur du traitement de S6 à S9.



**Figure 39 : Evolution des rougeurs des oreilles des souris BALB/c post infection par des souches sensibles et résistantes avant et après traitement par le Glucantime®.**

(\* différence significative  $\alpha < 5\%$ , \*\* différence hautement significative  $\alpha < 1\%$ ).



(A)



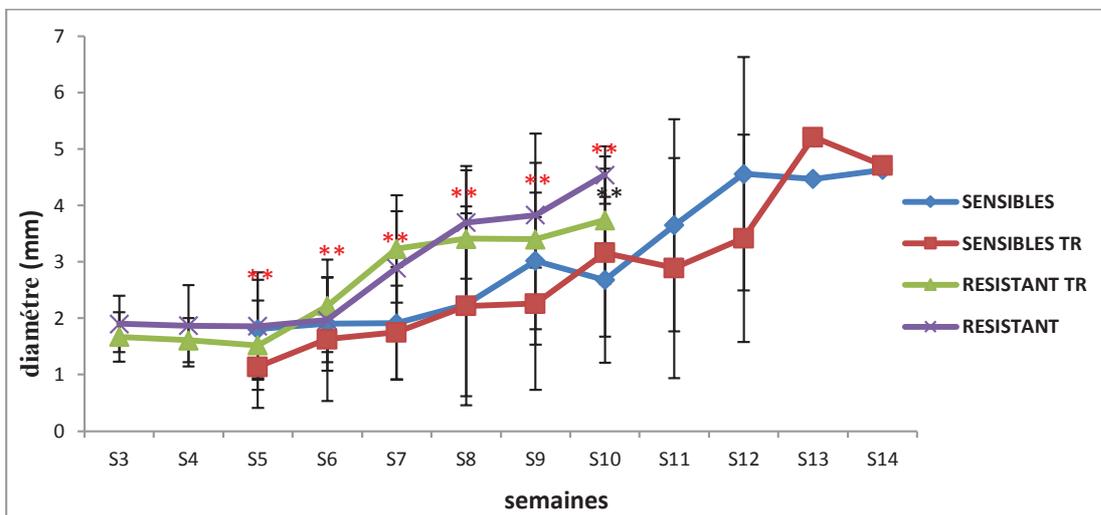
(B)

**Figure 40 : Photos des rougeurs apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par LIPA 100/09 (A) à S6 et par LIPA 175/11 (B) à S5.**

- **Les lésions externes**

Les lésions externes sont apparues au même temps que les rougeurs pour la souche résistante. Cette dernière a montré une lésion importante dès la troisième semaine avec un diamètre moyen de 1,9 mm et qui augmente avec le temps jusqu'à déformation totale de l'oreille infectée. Tandis que celles de la souche sensible sont apparues plus tardivement à la cinquième semaine de l'infestation et elles ont une allure moins importante que celles de la souche résistante (figure 41, 42).

Cette différence entre l'apparition et l'évolution des lésions a été analysée par le test de Student, pendant et après le traitement. Les résultats montrent une différence hautement significative entre la souche sensible et la souche résistante de S5 à S10. L'effet du traitement apparaît à S7 où on note une diminution significative des lésions externes par rapport aux lots non traités sensibles et résistants. Cet effet se poursuit pour la souche résistante jusqu'à S10, avec une différence très significative ( $p < 0.01$ ).



**Figure 41 : Evolution des lésions externes des oreilles des BALB/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.**

(\* différence significative  $\alpha < 5\%$ , \*\* différence hautement significative  $\alpha < 1\%$ ).



(A)



(B)

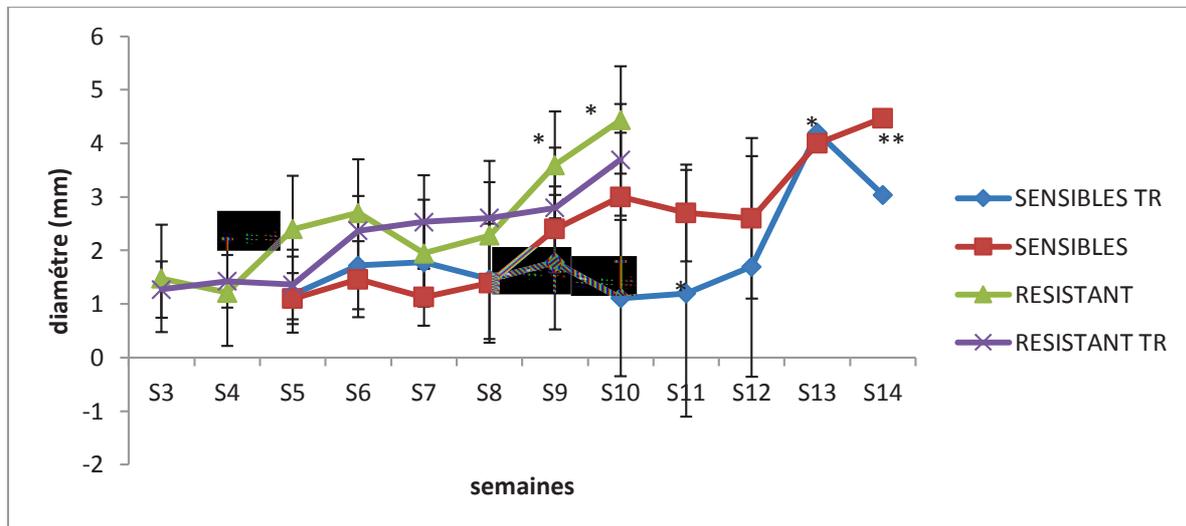
**Figure 42 : Photos des lésions externes apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par LIPA 100/09 (A) à S6 et par LIPA 175/11 (B) à S5.**

- **Les lésions internes**

Les lésions internes sont apparues en même temps que les lésions externes. Les souris infestées par la LIPA 175/11 ont développé des lésions beaucoup plus tôt, dès la troisième semaine. Les lésions de LIPA 100/09 n'ont été mesurables qu'à partir de la cinquième semaine (figure 43, 44).

Il y'a pas d'effet du traitement des lésions internes de la souche résistante à S5 et S6, et pour la souche sensible de S5 et S7 à la différence entre traitées et non traitées de la souche sensible devient notable à partir de S8 c'est-à-dire à la fin du traitement.

D'après le test T une différence très significative est observée de S9 à S10 et à S14 entre les lésions causées par la LIPA 100/09. Par ailleurs, nous avons enregistré des différences significatives à S11 et S14. Alors que pour LIPA 175/11, on note une différence très significative à S9 et S10.



**Figure 43 : Evolution des lésions internes des oreilles des BALB/c post infection par des souches sensible et résistante avant et après traitement par le Glucantime®.**

(\* différence significative  $\alpha < 5\%$ , \*\* différence hautement significative  $\alpha < 1\%$ ).



(A)



(B)

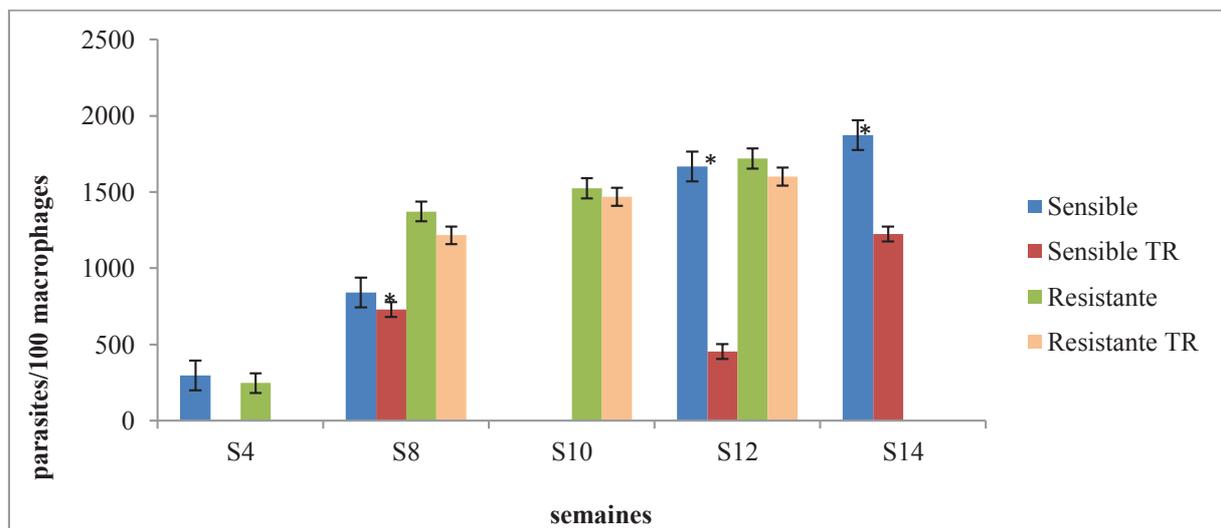
**Figure 44 : Photos des lésions internes apparues sur l'oreille des souris BALB/c infectées par LIPA 100/09 (A) à S6 et par LIPA 175/11 (B) à S5.**

### 2.2.2.2. Phénotype interne

- Les grattages

La charge parasitaire au niveau du site d'inoculation est présentée sous forme d'histogramme pour les deux souches sensible et résistante (figure 45). On remarque que cette charge est presque identique pour les deux souches avant le traitement à S4. Après traitement, la souche sensible à l'antimoine montre une légère diminution de la charge parasitaire qui débute à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine et qui devient plus importante à S12. Cette baisse de la charge parasitaire est aussi observée pour la souche résistante avant et après traitement. Une comparaison statistique par le test de Student montre une différence très significative entre le lot infecté par la souche sensible et lot sensible traité à partir de S12 et jusqu'à S14. Le traitement semble plus efficace sur la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation bien après la fin du traitement. Alors que pour la souche résistante une légère diminution de la charge parasitaire avec une différence significative est observée à S8 à la fin du traitement (figure 45).

La charge parasitaire a été évaluée au niveau du site d'inoculation, puis comparée au diamètre des lésions mesurées sur les différents lots de souris. On observe une corrélation positive entre la progression du diamètre des lésions et le nombre de parasites existants pour les deux souches étudiées LIPA 175/11 et LIPA 100/09 traitées et non traitées.



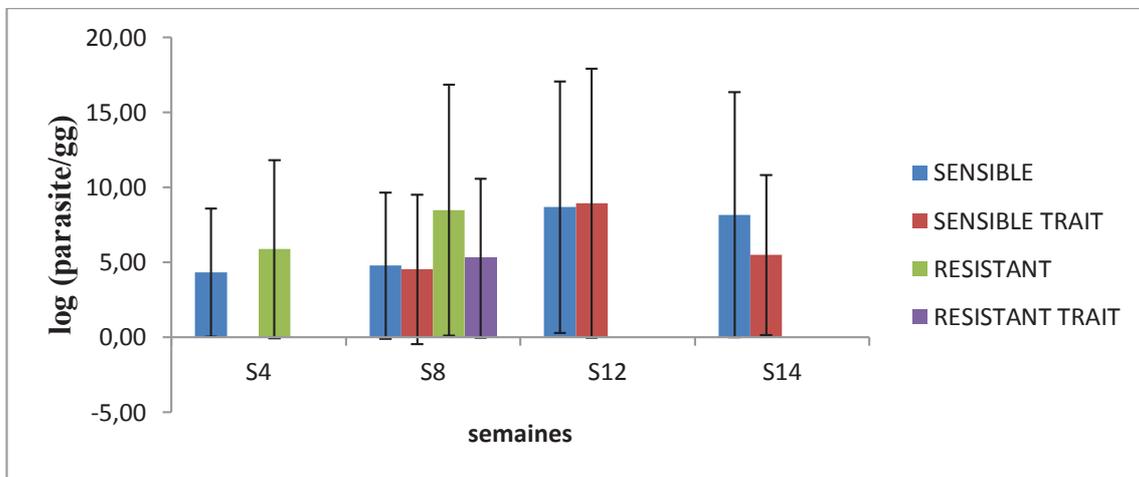
**Figure 45 : Evolution de la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®**

(\* différence significative  $\alpha < 5\%$ ).

- **Charge parasitaire dans les ganglions**

Des charges parasitaires similaires et importantes sont observées à la quatrième semaine dans les ganglions des souris infectées par la LIPA 175/11 et la LIPA 100/09. Cependant, en S8, la charge parasitaire dans les ganglions des souris infectées par la LIPA 100 est plus élevée que celle observée dans les ganglions des souris infectées par LIPA 175/11. On ne note pas de différence importante entre les charges parasitaires de la souche sensible à S12, alors qu'une petite diminution à S14 est notée (Figure 46).

A la fin du traitement, en S8, on note une charge importante et plus élevée pour les ganglions des souris non traité par rapport à celle des souris traitées de la souche sensible. En revanche, on constate un petit effet du Glucantime® sur la souche résistante à S8.



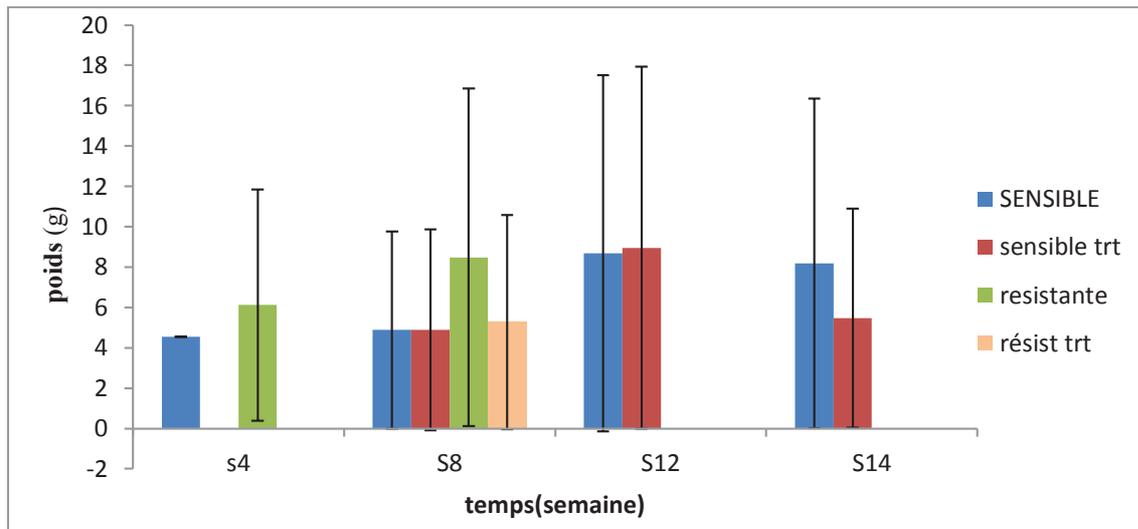
**Figure 46 : Evolution de la charge parasitaire dans les ganglions drainants des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.**

- **Charge parasitaire des rates**

Nous avons enregistré une charge parasitaire dans les rates des souris infectées par la souche résistante et sensible à partir de S4. Cette charge était plus élevée chez les souris infectées par la LIPA 175 que chez celles infestées par la LIPA 100/09.

En S8, la charge des rates des souris infestées par la LIPA 100/09 semble demeurer stable, alors qu'une augmentation importante est notée pour la liapa175/11.

En revanche en S8 la charge parasitaire semble être similaire pour les souris traitées et non traitées infestées par la LIPA 100/09 alors qu'une différence est enregistrée entre la charge des souris non traitées qui est plus élevée que celle des souris traitées infectées par la LIPA 175/11. En S12, une légère différence est notée pour le lot traité et non traité des souris infectées par LIPA 100/09, alors qu'elle connaît une diminution chez le lot traité en S14 (Figure 47).



**Figure 47 : Evolution des charges parasitaires dans les rates des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.**

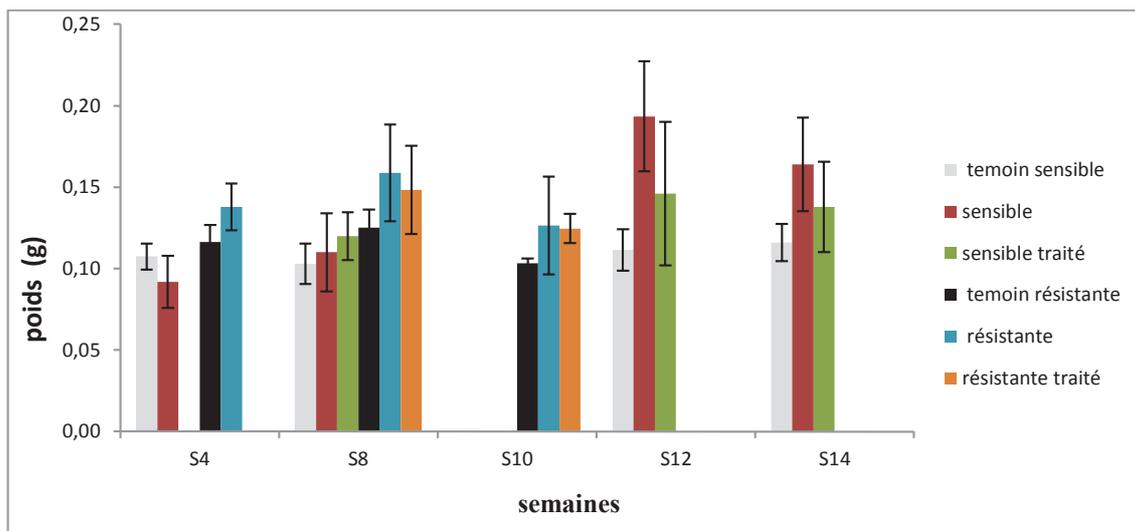
- **Poids des rates**

Une comparaison entre les rates des témoins et des rates des souches étudiées, a montré une splénomégalie à S4 pour la LIPA 175 /11 et à S8 pour la LIPA 100.

A partir de S8 les rates des LIPA 100 ont été moins importantes que celle de LIPA 175/11, cependant en S10 le poids semble diminuer pour la souche 175/11. En S12, la splénomégalie est très importante est connaît une légère diminution en S14 (figure 48).

Pour la souche sensible, en S8 avant l'arrêt du traitement, la splénomégalie est légèrement élevée chez les souris traitées que chez les non traitées. Par ailleurs, un poids de rates très important est noté chez les non traités par rapport aux traités qui a connu une augmentation en S12 par rapport en S8. Cependant une légère diminution en S14 a été enregistrée pour les deux lots avec un poids plus élevé chez les non traités.

Pour la souche résistante, une splénomégalie importante a été enregistrée pour les lots traités et non traités en S8 à la fin du traitement, avec un poids plus élevé chez le lot non traité. Cependant, une diminution de ces derniers a été enregistrée en S10 avec un poids similaire pour les deux lots.



**Figure 48 : Evolution du poids des rates des souris post infection par les souches sensible et résistante au Glucantime®.**

### 2.2.2.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons comparé pour la première fois, l'étendue et la distribution dans le temps de 2 souches de *L. major*, une sensible et une résistante à l'antimoine. Nous avons aussi suivi la diffusion du parasite avant et après traitement par le Glucantime®. Après administration intradermique de  $10^3$  promastigotes de *L. major* métacycliques dans une oreille, la présence du parasite et de leur charge ont été estimées dans le site d'inoculation, dans les ganglions lymphatiques drainant et la rate.

#### Phénotype externe

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 monitorés (BELKAID *et al.*, 1998 ; BELKAID *et al.*, 2000).

Nos résultats montrent que l'infection à *L. major* chez les souris BALB/c se traduit par une augmentation des lésions de l'oreille, l'augmentation de la charge parasitaire dans le site d'inoculation, dans les ganglions lymphatiques, et dans la rate. Nous avons aussi noté une augmentation du poids des souris et une splénomégalie. Ces données confirment que nos 2 souches *L. major* algériennes résistante et sensible induisent une forme progressive de la maladie qui provoque des lésions destructrices, qui ne guérissent pas (LIRA *et al.*, 1998).

A travers les résultats du phénotype externe obtenu, on remarque que le phénotype virulent de la souche résistante est plus marqué que celui de la souche sensible et se traduit par une apparition précoce de l'inflammation à S3. L'intensité des indurations, des rougeurs et lésions était plus importante chez les souris infectées par la LIPA 175/11 que celles qui étaient

infectées par la LIPA 100/09. La progression de ces symptômes provoqués par la souche résistante était plus rapide que ceux provoqués par la souche sensible.

Après administration du traitement, on observe d'une part, une diminution significative de l'inflammation, de l'induration et des lésions chez le lot de souris infectée par la LIPA 100/09, ce qui correspond avec les résultats de sensibilité au SbIII de cette souche obtenue *in vitro*. D'autre part, la souche LIPA 175/11 qui possède un profil intermédiaire vis à vis du SbIII s'est révélée résistante au SbV *in vivo*. Et bien que le traitement ait été administré pendant 4 semaines, nous n'avons pas pu obtenir de réduction des indurations, rougeurs et lésions. Ce phénomène peut être expliqué par les différents mécanismes de résistance développés par le parasite afin d'inhiber la réduction de l'SbV en SbIII et/ou empêcher la pénétration de ce dernier dans les phagolysosomes (CROFT *et al.*, 2006 ; ASHUTOSH S. *et al.*, 2007 ; SERENO *et al.*, 2007).

### **Phénotype interne**

Afin d'étudier le tropisme et la croissance tissulaire spécifique des 2 souches sensible et résistante à l'antimoine à *L. major* chez des souris BALB /c, nous avons déterminé la charge parasitaire dans l'oreille, les ganglions lymphatiques et la rate à différents intervalles après l'infection. Nos résultats confirment que les 2 souches *L. major* sensible et résistante, diffuse à la rate et y persiste pour longtemps (jusqu'à S14 pour la souche sensible).

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), et BELKAID *et al.*, (2002).

Afin d'évaluer l'efficacité de l'antimoine sur la dissémination du parasite, nous avons aussi comparé la cinétique de dispersion du parasite des deux souches sensibles (trt /non trt) et résistante (trt /non trt) dans les organes à partir du site d'inoculation.

Nos résultats ont permis de retrouver des parasites au niveau des ganglions et de la rate avant et après le traitement. 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. Il a aussi été montré qu'un petit nombre de leishmanies peut persister dans le ganglion lymphatique drainant, dans la rate, et dans certains cas sur le site de l'ancienne lésion même après sa guérison chez la souris B10D2.

La comparaison du phénotype externe et interne des 2 souches sensible et résistante, montre que l'intensité de la charge parasitaire ainsi que la dissémination du parasite sont liées au caractère virulent de la souche.

Avant le traitement : nos résultats révèlent une dissémination du parasite à partir du point d'inoculation à S4 confirmée par une charge parasitaire presque identique pour les deux

souches sensible et résistante avant le traitement au point d'inoculation. Cela correspond à une charge plus importante et similaire dans les ganglions pour les deux souches. Alors qu'une charge plus importante est enregistrée chez les souris infectées par la LIPA 175/11 que chez celles infectées par la LIPA 100/09 au niveau de la rate. Ces résultats concordent avec les travaux antérieurs de NICOLAS *et al.*, (2000), qui ont montré que la voie de dissémination dépend de la voie d'inoculation.

Dans le présent travail, en quantifiant la charge parasitaire à de multiples points dans le temps, et en particulier pendant la phase primaire de l'infection, nous avons retrouvé un nombre important de parasites dans le site d'inoculation, dans les ganglions drainant ce site et dans la rate. Cet aspect survient en début de la formation de la lésion. Selon BELKAID *et al.*, 2000, la quiétude du site d'inoculation est appuyée par la constatation que, hormis une augmentation transitoire du nombre de neutrophiles immédiatement après l'injection de l'aiguille, le nombre et les différents types de leucocytes sédimentent sur le derme, et reste inchangé au cours des 4 premières semaines après l'infection. L'hypothèse serait que les macrophages recrutés dans le site de l'inflammation soutiennent la multiplication des amastigotes.

Le traitement semble plus efficace sur la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation bien après la fin du traitement pour les souris infectées par la LIPA 100/09, où la souche sensible à l'antimoine montre une légère diminution de la charge parasitaire qui débute à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine et qui devient plus importante à S12. Cependant à S14 une recrudescence de la parasitémie a été enregistrée au niveau du site d'inoculation. Selon Sundar (SUNDAR *et al.*, 2001), 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. Alors que pour la souche résistante, une légère diminution de la charge parasitaire avec une différence significative a été observée à S8 à la fin du traitement. Cette différence n'est pas significative à S12, confirmant la résistance de cette souche *in vivo*.

A la fin du traitement de la souche sensible (S8), la charge parasitaire des ganglions est plus importante chez les souris non traitées par rapport à celle des souris traitées. En revanche, on constate un petit effet du Glucantime® sur la souche résistante à S8 en fin de traitement. La 12<sup>ème</sup> semaine a été marquée par une diminution de la charge parasitaire pour les deux lots TRT et non TRT avec une charge importante pour les non traités chez les souris infectées par la LIPA 100/09 donc le traitement a un petit effet. Cependant la charge parasitaire de la souche sensible a montré une diminution avérée qui est expliquée par la réponse immunitaire qui se produit dans les ganglions lymphatiques, siège de l'immunité secondaire. La persistance de parasites a été mise en parallèle avec une expression soutenue de l'oxyde nitrique par l'enzyme NO synthase (iNOS), et le traitement des souris avec un inhibiteur sélectif de l'iNOS entraîne une répllication massive des parasites dans les tissus et provoque une recrudescence de la leishmaniose cutanée selon NICOLAS *et al.*, (2000).

En revanche en S8 la charge parasitaire dans la rate semble être similaire pour les souris traitées et non traitées infestées par la LIPA 100/09 donc le traitement n'a pas montré d'effet en cette période en S8. Alors qu'une différence a été enregistrée entre la charge des souris non traitées qui étaient plus élevées que celle des souris traitées infectées par la LIPA 175/11 (Traitement efficace). En S12, une légère différence est notée pour le lot traité et non traité des souris infecté par LIPA 100/09, alors qu'elle connaît une diminution chez le lot traité en S14 (traitement efficace).

La variation des poids des souris résulte de l'augmentation du poids des rates associées 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 phénomène est observé précocement chez les souris infectées par la souche résistante par rapport à celles infectées par la souche sensible. Cette différence pourrait être attribuée à la virulence de la souche résistante à l'antimoine.

La chimiothérapie actuelle de la leishmaniose est loin d'être satisfaisante et est mise en question par l'émergence généralisée de la non-réponse de la drogue, par le coût, et par la longue durée du traitement. De plus, des molécules telle que l'antimoine pentavalent, la pentamidine, l'amphotéricine B et la miltefosine, ont comme inconvénients des administrations répétées en parentérale et leur toxicité. La variation de l'efficacité du traitement peut être due à des facteurs tels que l'interaction médicament-hôte la réponse immunitaire, la différence dans la pharmacocinétique des médicaments, et la variation intrinsèque de la sensibilité de *Leishmania spp.* à ces médicaments. La présente étude, a fourni des informations précieuses concernant les modèles de sensibilité aux médicaments dans le contexte de la sensibilité naturelle des isolats algériens de *L. major* par rapport au Glucantime® *in vivo* et *in vitro*.

L'étude de la sensibilité de *L. major* à l'antimoine trivalent *in vitro* nous a permis de classer les souches en 3 catégories : sensible, intermédiaire et résistante. Nous n'avons retrouvé que 20% des souches qui étaient sensibles au SbIII, et sachant que la sensibilité au SbV est plus importante que celle au SbIII. On peut supposer que la résistance au Glucantime® est importante chez *L. major* en Algérie. Par ailleurs, l'étude de la cinétique de croissance en fonction de la sensibilité à l'antimoine de *Leishmania major*, n'a pas montré de relation significative entre la cinétique et la résistance des parasites au traitement.

L'étude de la sensibilité à l'antimoine, *in vivo* chez la souris BALB/c, nous a permis de caractériser l'infection des souches de *L. major* naturellement sensibles et résistantes au SbV. Notre travail nous a permis de déterminer la virulence comme facteur sélectif de résistance et de sensibilité au Glucantime. Des paramètres tel que l'apparition précoce des symptômes (rougeurs, indurations, lésions et poids), leur intensité, ainsi que la dissémination rapide du parasite à partir du site d'inoculation vers les différents organes (ganglions drainant et rates) chez les souches résistantes, sont fortement liés à la sensibilité à l'antimoine. De plus, la comparaison du phénotype externe et interne des 2 souches sensible et résistante, montre

que l'intensité de la charge parasitaire ainsi que la dissémination du parasite sont liées au caractère virulent de la souche.

Le traitement par le Glucantime® sur notre modèle animal, semble très peu efficace sur la souche résistante. La dissémination du parasite est ralentie, mais la progression de la maladie semble plus rapide après l'arrêt du traitement. La souche sensible répond plus rapidement au traitement. Ce dernier diminue significativement la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation, mais reste non curatif. 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 molécules de mauvaise qualité.

A travers les résultats que nous avons obtenus sur l'étude de la sensibilité de *L. major* *in vitro* et *in vivo*, il ressort que la résistance au Glucantime® est très importante en Algérie. L'utilisation trop systématique de cette molécule a favorisé la sélection de souches résistantes. Cette proportion grandissante de résistance aux traitements est actuellement alarmante, il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques responsables de l'infection et de la sensibilité ou résistance de *L. major* à l'antimoine, d'autant plus que nos résultats ont montré un lien entre la virulence et la résistance au Glucantime®.

L'exploration de la réponse immunitaire associée à cette résistance, et la recherche de l'expression de molécules de virulence, permettrait une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de résistance à l'antimoine, et la sélection de molécules d'intérêt vaccinal.

### 2.2.3. Caractérisation de l'infection par des souches de *Leishmania major* naturellement résistante à l'antimoine

En Algérie, ainsi que dans la plupart des régions du monde, les antimoniés pentavalents (SbV) sont considérés comme les médicaments de première ligne pour traiter toutes les formes de la leishmaniose. Néanmoins l'absence de réponse au traitement est un problème bien connu dans la plupart des pays endémiques de la leishmaniose (HADIGHI *et al.*, 2006; POURMOHAMMADI *et al.*, 2011, MOHAMMADZADEH *et al.*, 2013, BELLAZOUG & NEAL, 1986). En Algérie, les lignes directrices du protocole thérapeutique des patients atteints de leishmaniose cutanée ont été mises en œuvre et publié par le ministère de la santé sur la base des recommandations de l'OMS. Pour toutes les formes de leishmaniose cutanée, le traitement consiste en l'administration de 20 mg / kg / jour de Glucantime® pendant 15 jours, par injection intramusculaire, lorsque les lésions sont multiples ou si la lésion est située sur le visage. Pour une lésion unique, le ministère de la Santé recommande l'administration en intradermique (intra-lésionnel) de 1,5 à 2 ml de Glucantime® deux fois par semaine pendant 4 semaines. Cependant, certains médecins ne respectent pas encore ces lignes directrices et utilisent (i) soit un protocole fait maison de Glucantime® pour le traitement des patients ayant la forme cutanée de la leishmaniose, ou bien (ii) utilisent des molécules alternatives dont l'efficacité clinique n'a pas été entièrement vérifiée.

Dans ce contexte de forte endémicité de leishmaniose cutanée en Algérie, il est donc important de recueillir des informations sur l'impact des différents protocoles de traitement utilisés et leurs rapports aux taux élevé d'échec du traitement ou de rechute. L'ensemble de ces éléments permettraient de répondre aux questions sur les facteurs favorisant la sélection et la transmission des parasites résistants aux médicaments.

En Algérie, à côté de la thérapie par l'antimoine pentavalent (SbV), d'autres molécules alternatives tel que le peroxyde d'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul ou en combinaison avec Glucantime® sont utilisés pour traiter les formes cutanées de la leishmaniose.

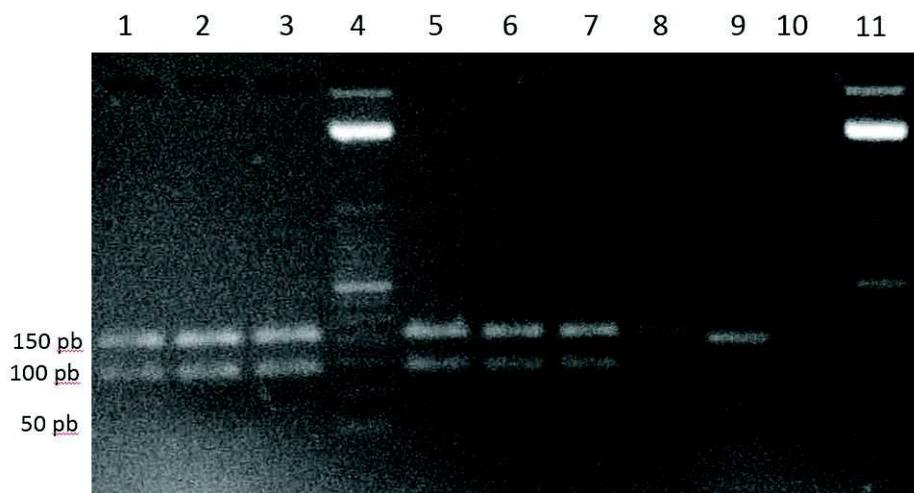
Le service d'Eco-épidémiologie et de Génétique des populations de l'institut Pasteur d'Algérie possède une Biobanque bien documentée, de souches stockées dans l'azote liquide. A partir de cette banque, nous avons sélectionné 6 souches de *Leishmania* : 3 ont été isolées à partir de 3 sujets avant le début du traitement et 3 autres après l'échec du traitement sur ces mêmes sujets. Les protocoles suivants ont été utilisés, et tous ont finalement conduit à l'échec thérapeutique.

- Patient 1 : Nettoyage de la lésion avec eau oxygénée 1 fois par jour pendant 20 jours
- Patient 2 : Nettoyage de la lésion avec de l'eau oxygénée, suivie par l'administration intralésionnelle de Glucantime® 2 fois par semaine pendant 3 semaines
- Patient 3 : Nettoyage de la lésion avec de l'eau oxygénée et l'administration intramusculaire de Glucantime® à raison de 60 mg/ kg/jour pendant 15 jours.

Le typage de genre et de l'espèce, ont été réalisés sur les souches isolées par la méthode PCR-RFLP. Ils ont permis d'identifier l'appartenance de tous les isolats au complexe de *L. major* (figure 49 et tableau VIII). En Algérie, deux zymodèmes de *L. major* sont mis en cause au cours de la leishmaniose cutanée MON-25 et MON-269 (PRATLONG *et al.*, 2009). Nous avons donc poussé la caractérisation davantage en utilisant la méthodologie standard de référence la MLEE ou caractérisation isoenzymatique (RIOUX *et al.*, 1990). Nos résultats ont montré que tous les parasites de nos isolats appartenaient au zymodème MON-25 qui est de loin le zymodème le plus répandu au cours de la LC zoonotique dans les zones endémiques de l'Algérie.

**Tableau VIII : Caractéristiques des souches isolées et de leurs typages**

Patient	Age (ans)	sexe	Phénotype des lésions	Localisation	Nombre de lésions	Souches	PCR RFLP	Zymodème
1	24	M	sèche	Oreille	2	LIPA 339	<i>L. major</i>	MON25
						LIPA 339 R	<i>L. major</i>	MON25
2	55	M	sèche	joue	1	LIPA 443	<i>L. major</i>	MON25
						LIPA 443R	<i>L. major</i>	MON25
3	31	M	Ulcérative	pied	1	LIPA 445	<i>L. major</i>	MON25
						LIPA445R	<i>L. major</i>	MON25
Témoin						LIPA 100	<i>L. major</i>	MON 25



**Figure 49 : Résultats du Typage par PCR-RFLP**

L'amplification de la région ITS1 de 320 pb est présentée sur un gel d'agarose de 3,5%, puits 1 LIPA 339, puits 2 LIPA 443, puits 3 LIPA 445, puits 4 Marqueurs de poids moléculaires, puits 5 LIPA 339R, puits 6 LIPA 443R, puits 7 LIPA 445R, puits 8 LIPA 100/09 *L. major* control, puits 9 LIPA 07/05 *L. killicki* control, puits 10 H2O, puits 11 Marqueurs de poids moléculaires

Nous avons ensuite étudié les liens entre l'échec au traitement et la résistance primaire ou secondaire à l'antimoine *in vitro*. Dans ce but, nous avons testé la sensibilité de nos isolats envers les antimoniés contenus dans ces médicaments.

Les deux formes parasitaires promastigotes et amastigotes intracellulaires des souches isolées, ont été testées en susceptibilité à l'antimoine, et comparées à une souche sensible. Comme le montre le tableau VIII une grande partie des souches isolées ont exprimé des IC50 envers l'antimoine trivalent dans la gamme de 2,38 à 4,39 µg/ml (moyenne 3,73 µg/mL). Cette moyenne étant proche de la valeur de l'IC50 de la souche de référence LIPA 100 (IC50 de 3,59 ± 0,78). Une souche a fait l'exception, c'est LIPA 445R avec une IC50 de 10,51 ± 2,11 µg/ml de SbIII. En comparaison à la souche de référence, l'index de résistance des souches isolées variait entre 0,66 à 1,24 (moyenne IR 1,03), sauf pour la LIPA 445R, qui est l'une des souches qui provient d'un patient ayant subi un échec thérapeutique, et qui exprime un indice de résistance calculée de 2,93 (tableau IX).

Afin d'explorer plus en profondeur la sensibilité des parasites isolés chez des patients qui ont subi un échec thérapeutique à l'antimoine nous avons décidé de déterminer la sensibilité au Glucantime® du stade cliniquement pertinent de *Leishmania*, c'est à dire le stade amastigote. Les résultats sont résumés dans le tableau IX. Une grande variabilité de la sensibilité de l'antimoine était constatée, avec des valeurs d'IC50 comprises entre 15 µg/ml et allant jusqu'à plus de 100 µg/ml. Étonnamment la plupart des isolats testés semblent être moins sensibles que notre souche référence sensible au SbV, soit LIPA100. Les indices de résistances enregistrées allant de 0,75 à 6,28 µg/ml de SbV. Néanmoins, dans la plupart des cas, aucune différence significative entre la sensibilité à l'antimoine pentavalent n'a été constatée entre les parasites isolés avant et après le traitement. L'exception étant les souches isolées à partir du même patient avant traitement (LIPA 445) et après l'échec au traitement (LIPA445R). Dans ce cas, les parasites isolés à partir des lésions étaient 2 fois plus résistantes aux Glucantime® que leur homologue isolé avant traitement. Cela confirme ce que nous avons observé en utilisant le test *in vitro* sur la forme promastigote de *Leishmania*.

**Tableau IX : Résultats de la susceptibilité à l'antimoine des promastigotes et amastigotes intracellulaires**

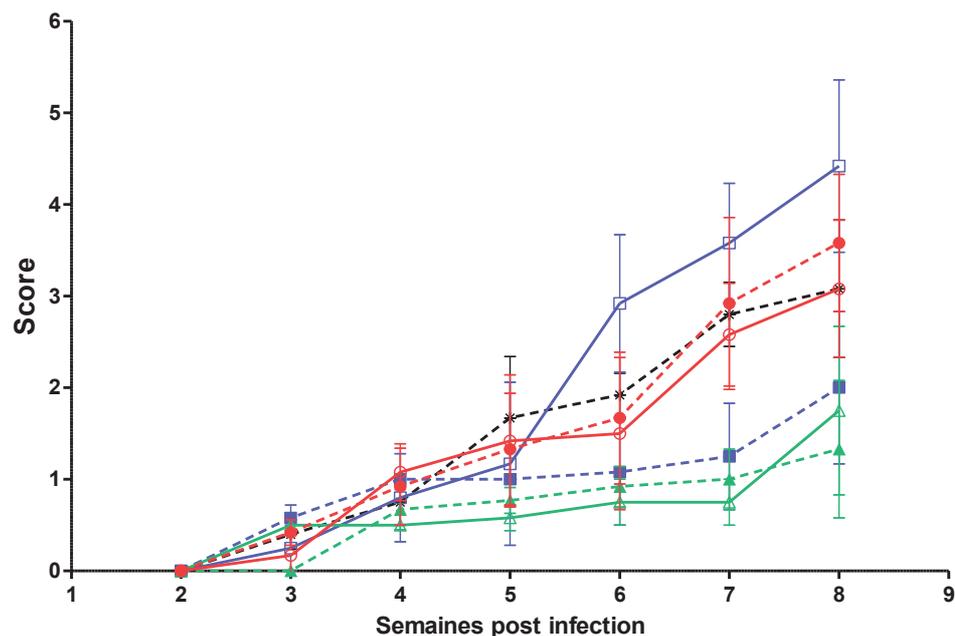
Souches	SbIII IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IR*	SbV IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IR*
LIPA 100/09	3.59 +/- 0.78	1	20.44 +/-0.21	1
LIPA 339	4.36 +/- 0.87	1.21	28.01 +/-0.15	1.37
LIPA 339 R	2.38 +/- 0.47	0.66	15.38 +/-0.02	0.75
LIPA 443	4.46 +/- 0.92	1.24	101.40 +/-2.36	4.96
LIPA 443R	3.25 +/- 0.65	0.90	89.25 +/-1.36	4.37
LIPA 445	4.39 +/- 0.87	1.22	65.06 +/-0.84	3.18
LIPA 445R	10.51 +/- 2.11	2.93	128.50 +/-3.98	6.28

\* IR= Moyenne des IC<sub>50</sub> des souches isolées /Moyenne de l'IC<sub>50</sub> de la souche de référence LIP100/09

Afin de mieux comprendre la capacité des parasites isolés de se propager à d'autres hôtes, nous avons étudié le comportement *in vivo* des souches isolées avant et après traitement. Ce comportement est un paramètre crucial donnant des informations sur le fitness des parasites.

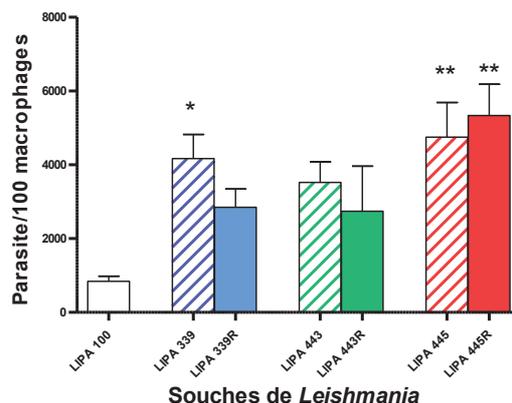
D'une part selon leur capacité à induire un développement des lésions et d'autre part à proliférer au niveau du site d'inoculation, et de se disséminer dans les ganglions lymphatiques et la rate.

Tout d'abord, une grande variabilité dans le développement des lésions a été enregistrée entre les différentes souches de *L. major* que nous avons inoculé aux souris BALB/c. Néanmoins, aucune différence significative dans le développement des lésions n'a été enregistrée entre les souches isolées avant et après l'échec du traitement (figure 50), à l'exception de LIPA339R qui a montré une diminution de sa capacité dans le développement des lésions au niveau du site d'inoculation, par rapport à LIPA 339. Toutefois, les parasites provenant de lésions de patients ayant subi un échec thérapeutique exprime la même capacité proliférative, aussi bien au niveau du site d'inoculation (figure 51), que dans des organes éloignés comme les ganglions lymphatiques et la rate (Figure 52A et 52B).



**Figure 50 : Capacité infectieuse *in vivo* des souches de *Leishmania major* chez la souris BALB/c.**

$10^3$  promastigotes métacycliques de (□) LIPA 339, (■) LIPA 339R, (○) LIPA 443, (●) LIPA 443R, (△) LIPA 445, (▲) LIPA 445R, (---) LIPA 100, ont été inoculés dans le derme de l'oreille. Une méthode de score basée sur les indurations, les rougeurs et les lésions a été utilisée pour exprimer la différence entre l'oreille inoculée et l'oreille saine (contrôle interne) pour chaque souris (SCHUSTER *et al.*, 2014). Les données sont exprimées en moyenne des scores de 5 souris  $\pm$  DS (n=5). L'analyse statistique a été faite par le Test de Student sur Graph Pad Prism.



**Figure 51 : Charge Parasitaire dans les oreilles des souris BALB/c.**

Après l'injection intradermique de  $10^3$  promastigotes métacycliques, la charge parasitaire a été estimée par la méthode de Buffet et col 1996. Chaque barre représente la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  DS. L'analyse statistique a été faite par une ANOVA à un facteur suivi d'un post test de Bonferroni sur Graph Prism, en utilisant LIPA 100/09 comme contrôle (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

Les résultats que nous avons obtenus ont montré l'absence de la pression de sélection (impact du fitness), sur la résistance à l'antimoine, du moins dans les souches que nous avons testées. Ces résultats sont en accord avec des observations antérieures réalisées sur la capacité de résistance à l'antimoine de souches de *Leishmania infantum*. Cette étude avait montré que le phénotype résistant du parasite pouvait être transmis par leur hôte naturel *Phlebotomus perniciosus* vers leurs cellules hôtes sans modification de la capacité infectieuse (AÏT OUDHIA *et al*, 2011a et 2011b ; AÏT OUDHIA *et al*, 2012 ; SEBLOVA *et al*, 2014). Une association entre la résistance au SbV, la propagation des parasites, et la virulence a déjà été proposée par certains auteurs (VANAERSHOT *et al*, 2010 ; OUKAD *et al*, 2011), ainsi qu'au cours de la résistance à la miltefosine (RAI *et al*, 2013.). Mais cette augmentation du fitness n'a pas été observée chez les parasites où la résistance à l'antimoine a été induite expérimentalement (SERENO *et al.*, 2001). C'est aussi le cas chez les parasites résistants à la paromomycine *in vitro* (HENDRICKX *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que la sélection expérimentale de la résistance aux médicaments est associée à un coût compétitif par rapport à la sensibilité des souches parentales (AGNEW *et al.*, 2001).

Le résultat frappant de cette étude est que les souches de *Leishmania major* isolées en Algérie expriment une grande variabilité pour tous les critères étudiés dans cette étude (sensibilité des promastigotes et amastigotes à l'antimoine, le développement des lésions et leur capacité inhérente à proliférer). A notre grande surprise, 2 sur 3 des souches isolées avant le traitement ont montré une résistance significative à l'antimoine SbV chez les amastigotes intracellulaires

: càd LIPA 443 n LIPA 445 avec un indice de résistance respectif de 4,96 et 3,18. Ces résultats sont évocateurs d'une grande variabilité de la sensibilité à l'antimoine dans les populations du complexe de *L. major*. Il ressort de l'ensemble de nos résultats qu'il est plus que nécessaire de faire des études plus approfondies de ces souches naturellement tolérantes à l'antimoine et responsables de l'échec thérapeutique dans les foyers de la leishmaniose cutanée zoonotique en Algérie.

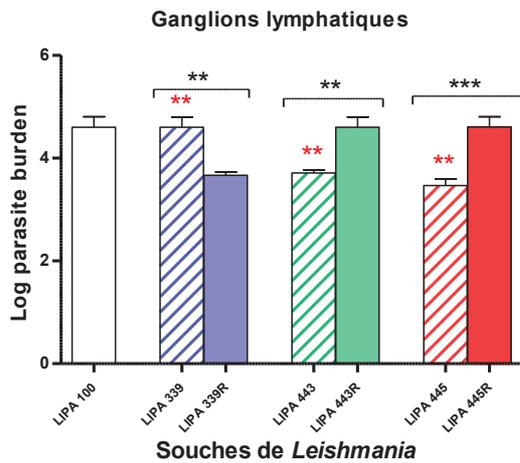


Figure 52 A

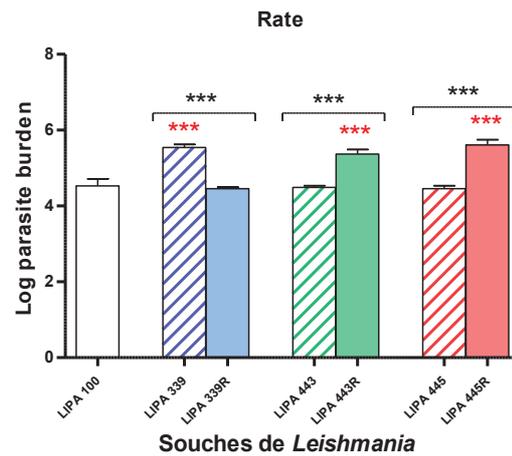


Figure 52 B

**Figure 52 : Charge parasitaire *In vivo* dans les ganglions lymphatiques (A) et la rate (B) des souris of BALB/c.** Chaque barre représente la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  DS. L'analyse statistique a été faite par une ANOVA à un facteur sur Graph Pad Prism et comparée à LIPA 100/09 souche contrôle. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , (\*\*)  $p < 0.01$ .

#### **2.2.4. Développement d'un modèle animal de leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* et son application en pharmacologie expérimentale**

En Algérie, plusieurs espèces de *Leishmania* sont responsables de la leishmaniose cutanée. *Leishmania killicki* est l'une de ces espèces qui a été découverte en 2005 dans la wilaya de Ghardaia, et qui a récemment été signalée dans le Nord du pays (HARRAT *et al.*, 2009 ; IZRI *et al.*, 2014). Les études phénotypiques basées sur la MLEE et sur des analyses de séquences, ont montré que les souches de *L. killicki* appartiennent à un clade distinct dans le complexe *L. tropica* (SCHWENKENBECHER *et al.*, 2006 ; EL BAIDOURI *et al.*, 2013). En Algérie, jusqu'à présent, seules les souches appartenant au sous-groupe *L. killicki* au sein du complexe *L. tropica* ont été isolées. La pathogénicité et l'infectivité de ces souches n'ont jamais été étudiées. L'un des moyens d'étude est le modèle animal. Les modèles animaux sont utilisés dans les études de découverte et de développement de médicaments, ainsi que pour la caractérisation de la physiopathologie de la maladie. Ils sont aussi utilisés dans l'estimation du dosage clinique, des schémas des marges de sécurité, d'évaluation de la toxicité et bien sûr pour valider les composés thérapeutiques et leur cible. De nombreux modèles expérimentaux ont été développés sur des rongeurs pour étudier la LC. Des modèles de murins ont été établis pour *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis* et *L. braziliensis*, chacun ayant des caractéristiques spécifiques, permettant de caractériser la réponse immunitaire, mais aucun ne reproduit complètement la pathologie observée dans les maladies humaines (BASTIEN & KILLICK-KENDRICK, 1992 ; BELKAID *et al.*, 1998 ; LORIA-CERVERA & ANDRADE-NARVAEZ, 2014). Pour *L. tropica* et *L. major*, les modèles de réponses sont spécifiques des espèces avec des différences en fonction du sexe et des gènes de susceptibilité de l'hôte (LIRA *et al.*, 1998 ; GIRGINKARDESLER *et al.*, 2001 ; KOBETS *et al.*, 2012). Ainsi, *L. killicki* provoque chez l'homme des lésions cutanées, qui ont tendance à former des ulcères secs semblables dans leur aspect à ceux causés par *L. tropica* (LIRA *et al.*, 1998 ; HARRAT *et al.*, 2009 ; MAUBON *et al.*, 2009). Néanmoins, leur guérison nécessite une période de traitement plus longue. La LC causée par *L. killicki* est appelée LC chronique parce que les lésions persistent pendant des années, par opposition à la LC provoquée par *L. major* pour lesquels les lésions disparaissent généralement en laissant des cicatrices après quelques mois (MAUBON *et al.*, 2009).

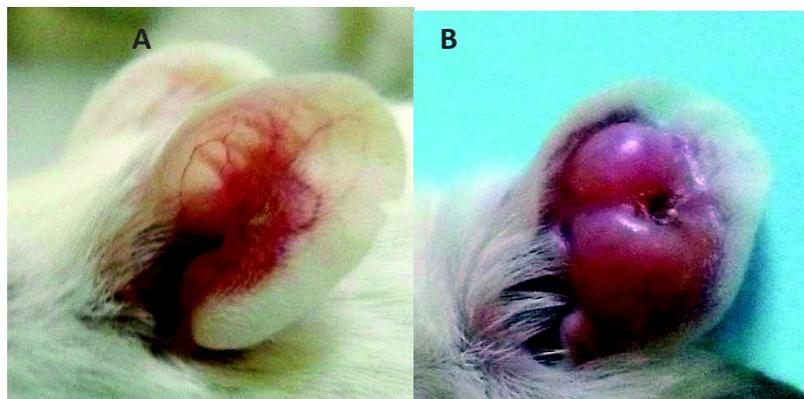
Les objectifs de ce travail sont donc de développer un modèle animal qui nous permet d'étudier les bases de la physiopathologie et les aspects immunologiques de l'infection causée par *L. killicki* et d'évaluer son application en pharmacologie expérimentale.

**Apparition des lésions et leur développement.** Pour établir un modèle *in vivo* de lésions cutanées causées par *L. killicki*, nous avons comparé l'aspect et l'épaisseur de l'induration de la lésion après inoculation intradermique avec *L. killicki* ou *L. major* dans le derme de l'oreille des souris BALB / c. Une différence frappante dans la survenue, le type et la gravité des lésions a été observée entre les deux espèces de *Leishmania*. La rougeur au niveau du site d'inoculation, est le premier symptôme de l'infection causée par l'inflammation des tissus. Ces

rougeurs étaient détectables 2 semaines après l'infection des souris avec *L. major*, alors que pour *L. killicki*, elles ne sont apparues qu'à 4 semaines après l'infection.

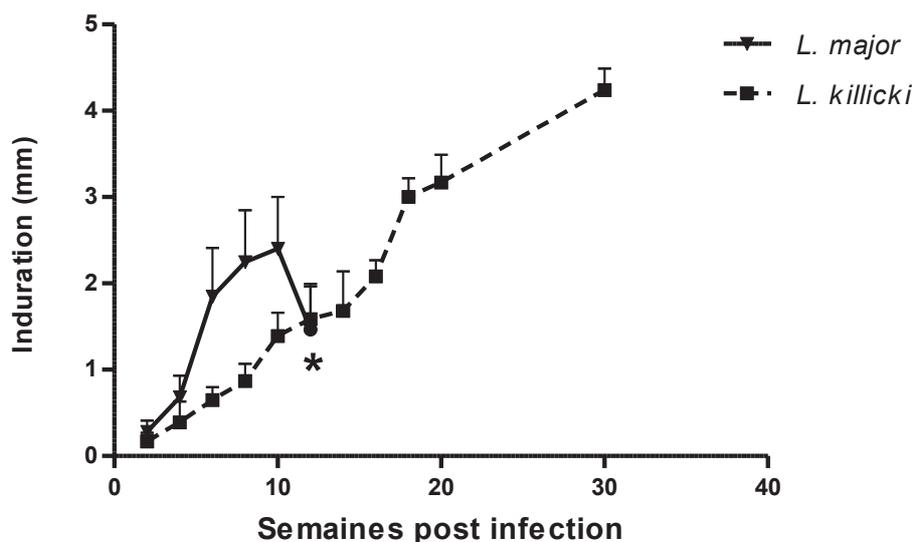
Après 4 semaines d'infection par *L. major*, les souris présentaient des lésions ulcéro-croûteuse formant un cratère avec des bordures élevées (figure 53A). Les lésions développées par les souris infectées par *L. killicki* sont apparues beaucoup plus tardivement, généralement après la 12<sup>ème</sup> semaine. Cependant, on note une augmentation considérable de l'épaisseur de l'oreille infectée par *L. killicki* durant cette période (figure 53B). Par ailleurs, nous n'avons pas noté d'ulcération pour cette dernière. Les phénotypes des lésions induites par *L. killicki* sont clairement distincts de ceux induits par *L. major*.

Les promastigotes métacycliques ont provoqué des indurations 3 semaines post infection. Les rougeurs des oreilles ont rapidement augmenté, pour atteindre un maximum de 2,4 mm à la 10<sup>ème</sup> semaine, puis ont régressé (Figure 54). Pour *L. killicki*, l'épaisseur de l'oreille infectée a eu une augmentation linéaire, beaucoup plus lente que celle de *L. major*, pour atteindre respectivement 1,4 mm et 4,3 mm aux semaines 10 et 30 post infection.



**Figure 53 : Evolution Clinique des lésions d'oreilles de souris BALB/c**

Phénotype des Lésions au cours de : (A) l'infection par *L. major* (4<sup>ème</sup> semaine post-infection) ou de (B) *L. killicki* (20 semaines post-infection).

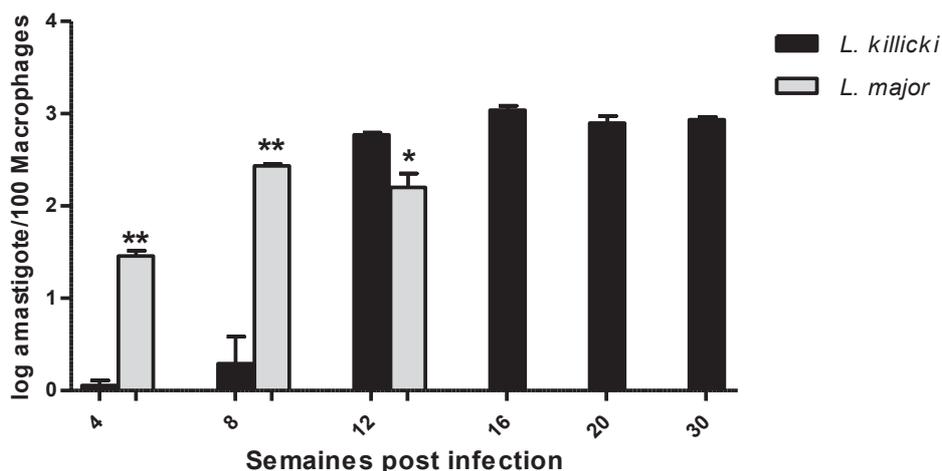


**Figure 54 : Evolution des lésions après infection des BALB/avec *Leishmania killicki* ou *Leishmania major*.**

$10^3$  promastigotes métacycliques de *L. killicki* ou de *L. major* ont été inoculé en intradermique dans l'oreille des souris. L'évolution de l'induration a été mesurée toutes les 2 semaines. Les données représentent les moyennes de mesures de 5 souris  $\pm$  la déviation standard (n=5). NB : (\*) 12 semaines après l'infection par *L. major* les oreilles sont devenues nécrotiques, avec des pertes importantes de tissus d'où l'interruption des expériences.

**Charge parasitaire dans le derme de l'oreille et présence du parasite dans d'autres organes ou tissus.** Pour étudier la prolifération parasite lors de l'expansion de la lésion, nous avons déterminé la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation. La présence de parasites dans le derme de l'oreille de souris inoculées avec *L. major* a été observée dès la quatrième semaine (figure 55). En outre, la charge parasitaire a augmenté régulièrement jusqu'à la huitième semaine et était synchronisée avec le maximum d'épaisseur de l'oreille (figures 54 et 55). A partir de la 8<sup>ème</sup> semaine, l'épaisseur de l'oreille et la taille de la lésion ont légèrement diminué jusqu'à ce que l'oreille soit perforée.

La cinétique de la charge parasitaire chez les souris infectées par *L. killicki* était quelque peu différente. L'expansion de parasite a commencé plus tard que pour *L. major*, c'est à dire 8 semaines après l'infection. Elle a atteint son maximum à la 16<sup>ème</sup> semaine et a été maintenue jusqu'à la fin de l'expérience à la 30<sup>ème</sup> semaine. La charge parasitaire maximale était significativement plus élevée que pour les souris infectées par *L. major* ( $p < 0,001$ ). Chez les souris infectées par *L. killicki*, aucune augmentation significative de la charge parasitaire n'a été observée après la 12<sup>ème</sup> semaine alors que nous avons noté une augmentation de l'épaisseur de (figures 54 et 55).



**Figure 55 : Charge parasitaire mesurée dans les oreilles de souris BALB/c infectées par *Leishmania killicki* ou *Leishmania major*.**

Après une injection de  $10^3$  promastigotes métacycliques, la charge parasitaire a été estimée. Chaque barre représente la moyenne de 5 déterminations  $\pm$  DS. L'analyse statistique a été faite par le Test de Student sur Graph Pad Prism (n= 5 souris/groupe) (\* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Au-delà de la capacité de *Leishmania* de se multiplier au niveau du site d'inoculation, la diffusion de *L. killicki* et *L. major* dans divers tissus ou organes a également été étudiée. La présence de l'ADN de *L. major* ou de *L. killicki* a été détectée dans les différents organes que nous avons examinés (tableau X). *Leishmania major* et *L. killicki* ont également été détectées dans la culture *in vitro* des organes. En effet, la recherche de la présence de l'ADN a donné des preuves de la présence de parasites sur le site d'inoculation dès la 2<sup>ème</sup> semaine après l'infection pour les deux espèces. Cependant, la principale différence entre les deux espèces étudiées est le retard observé pour la colonisation de l'organe après l'infection. *Leishmania major* a colonisé les ganglions lymphatiques et la rate plus rapidement, 2 semaines après l'infection par rapport à *L. killicki*, où la colonisation ne s'est faite qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine (tableau X). L'ADN a été détecté dans le foie, 4 semaines après l'infection chez les deux espèces. A partir de ce point, la PCR est resté positive jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine pour les deux espèces.

**Comparaison de l'évolution clinique de *L. killicki* et *L. major* au cours du traitement à l'antimoine.** Dans une première tentative d'étudier la capacité de ce nouveau modèle murin de l'infection par *L. killicki* à être utilisé pour le criblage de nouveaux composés antileishmaniens *in vivo*, nous avons comparé les résultats du traitement Glucantime® chez *L. major* et *L. killicki*. Le traitement consistait en l'injection de la drogue dans les lésions respectivement à la 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> semaine pour *L. major* et *L. killicki*. L'épaisseur de l'oreille était à peu près similaire chez les souris infectées par *L. major* qu'elle soit traitée par l'antimoine ou par le PBS (figure 56a). Il est important de noter que la réduction des lésions observées

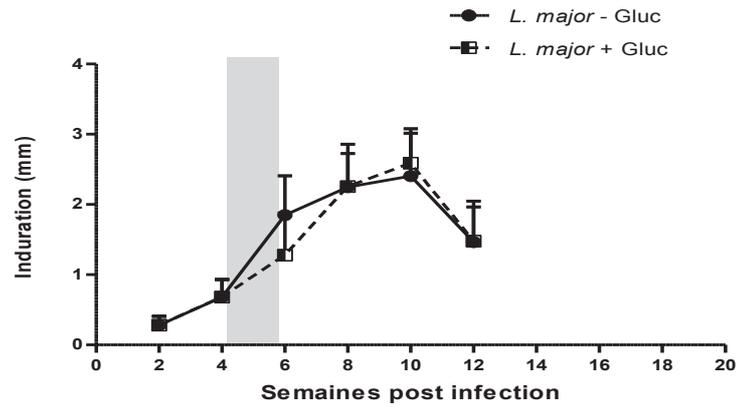
chez les souris infectées par *L. major* à 10 semaines après l'infection, était due à une nécrose des tissus et de leur perte. Ces résultats montrent que l'antimoine n'a pas d'effet sur les lésions de *L. major* après la fin du traitement, comme le montre la figure 56c. Fait intéressant, l'expansion des indurations est freinée chez les souris infectées par *L. killicki* et qui sont sous traitement par l'antimoine (figure 56b). Par conséquent, l'indice d'épaisseur de l'oreille a augmenté constamment au cours de toute la durée du traitement (figure 56c).

Le traitement par le Glucantime® affecte légèrement la charge parasitaire de *L. major* avec seulement une réduction de 1,12 fois du nombre moyen d'amastigotes/100 macrophages dans les lésions (Figure 57a et 57c). Cependant, il est plus efficace chez les souris infectées par *L. killicki*, qui présentaient une charge parasitaire en amastigotes deux fois plus réduite (figure 57b et 57c). Les charges parasitaires étaient significativement différentes une semaine après la fin du traitement ( $p < 0,001$ ). Dans l'ensemble, une meilleure concordance entre la charge parasitaire et l'épaisseur de l'oreille a été observée chez des souris infectées par *L. killicki* pendant le traitement d'antimoine que chez les souris infectées par *L. major*.

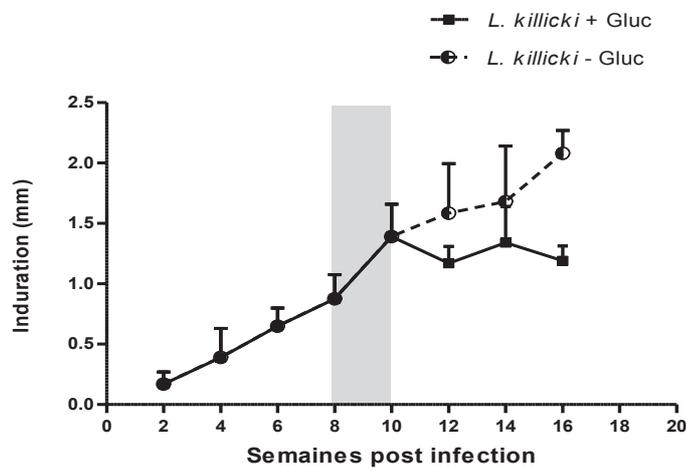
**Tableau X : Détection de l'ADN parasitaire de *L. major* et *L. killicki* dans divers tissus de la souris BALB/c.**

<i>Leishmania</i>	Tissus ou organe	PCR post inoculation / Culture LIT					
		2 semaines	4 semaines	8 semaines	12 semaines	16 semaines	20 semaines
<i>L. major</i>	Oreille (site d'inoculation)	+	+	+	+ / ND		
	Ganglions lymphatique drainant	+	+	+	+ / +		
	Rate	-	+	+	+ / +		
	Foie						
<i>L. killicki</i>	Oreille (site d'inoculation)	+	+	+	+ / ND	+	+
	Ganglions lymphatique drainant	-	+	+	+ / +	+	+
	Rate	-	+	+	+ / +	+	+
	Foie	-	+	+	+ / +	ND	ND

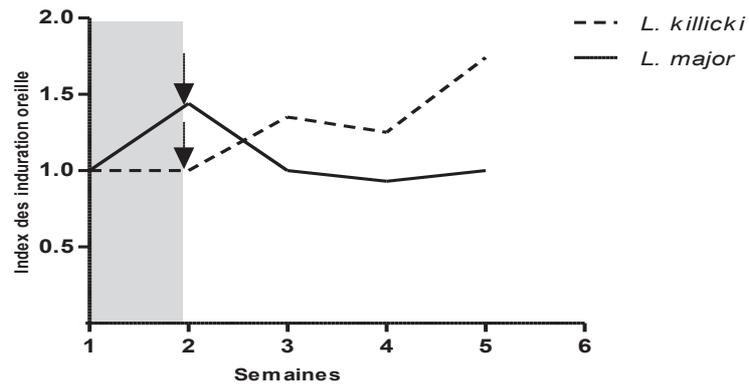
(a)



(b)

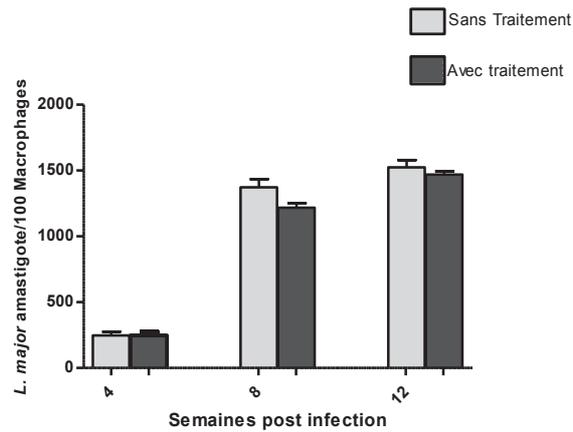


(c)

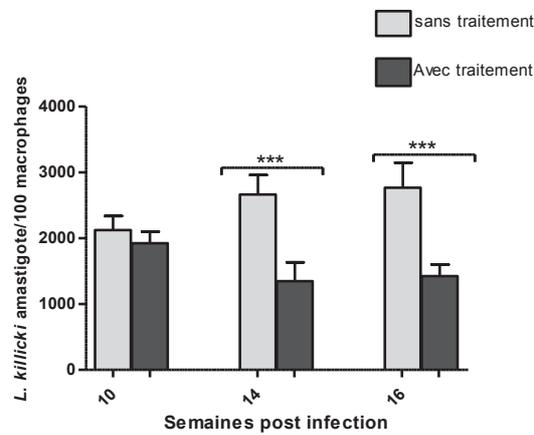


**Figure 56: Effet du traitement par le Glucantime® sur les indurations des oreilles des souris infectées par *Leishmania major* (a) ou *Leishmania killicki* (b) et sur l'index des indurations (c)** Les souris ont traité avec le Glucantime®, comme décrit dans la partie matériel et méthode. La période de traitement est indiquée en gris. Les données sont exprimées par des moyenne  $\pm$  DS ( $n=5$ ).

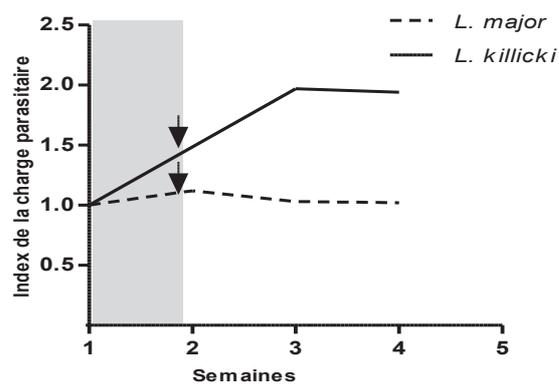
(a)



(b)



(c)



**Figure 57 : Charges parasitaires suite au traitement par l'antimoine des oreilles souris infectées par *Leishmania major* (a) ou *Leishmania killicki* (b) et évolution de l'index de charge parasitaire (c)**

Chaque barre représente la moyenne de la charge parasitaire de 5 souris  $\pm$  DS. L'analyse statistique (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ), a été réalisé par le Test de Student sur Graph Prism (n=5 souris/groupe)

#### 2.2.4.1. Discussion

Dans ce travail, nous avons essayé pour la première fois d'établir un modèle murin de la LC à *Leishmania killicki* : parasite émergent en Algérie. Ce parasite qui est endémique au Maghreb, et proche de *L. tropica*, a été découvert pour la première fois en 2005 en Algérie (HARRAT *et al.*, 2009). Les lésions cutanées causées par *L. tropica* ont tendance à former des ulcères secs qui nécessitent beaucoup de temps à guérir, généralement un an ou plus. La guérison est souvent associée à des cicatrices et des papules défigurantes qui peuvent également se reproduire à la périphérie de la lésion initiale et sont appelées lésions de type récurrentes (MOMENI & AMINJAVAHERI, 1994 ; LIRA *et al.*, 1998). Les lésions cutanées causées par *L. killicki* sont aussi appelées lésions cutanées chroniques parce qu'elles persistent pendant plusieurs années (MAUBON *et al.*, 2009). Ainsi, les signes cliniques de la leishmaniose cutanée due à *L. killicki*, sont limitées à une lésion cutanée chronique et résistant au traitement standard à l'opposé de la LC due à *L. tropica* (MAGILL *et al.*, 1993 ; ALBORZI *et al.*, 2008 ; JAOUADI *et al.*, 2011 ; JAOUADI *et al.*, 2012). En outre, la transmission de *L. killicki* semble être strictement zoonotique alors que pour *L. tropica*, elle peut être anthroponotique ou occasionnellement anthrozoonotique.

Pour tenter de reproduire la transmission naturelle de *Leishmania* au cours de la LC, BELKAID *et al.* (2000) a établi un modèle de l'infection parasitaire dans le derme de l'oreille dans laquelle un petit nombre de promastigotes métacycliques de *L. major* a été injecté. Sur la base de cette méthodologie, nous avons établi un modèle dermique de l'infection à *L. killicki*, qui a reproduit une lésion cutanée dans le derme de l'oreille de souris. La lésion obtenue était similaire à celle observée chez les patients atteints de l'infection, c'est à dire des lésions localisées qui ne guérissent pas spontanément. Les phénotype des lésions induites par *L. killicki* sont différent de ceux produits par *L. major* ou de *L. tropica sensu stricto* (LIRA *et al.*, 1998 ; KOBETS *et al.*, 2012). L'infection expérimentale de souris BALB/c avec *L. tropica* produit une lésion qui se développe jusqu'à 3 mois après l'infection, puis régresse (LIRA *et al.*, 1998 ; KOBETS *et al.*, 2012). Chez les souris infectées par *L. killicki*, on n'a jamais observé de régression de l'épaisseur de l'oreille, mais un prolongement continu de l'induration et de la lésion.

Dans l'ancien monde, deux espèces seulement *L. infantum* et *L. donovani*, sont connus pour provoquer les formes viscérales de leishmaniose. Néanmoins, ces deux espèces peuvent également être les agents responsables de certaines formes de LC (SHARMA *et al.*, 2005 ; AOUN & BOURATBINE, 2014). De la même manière, *L. tropica* comme *L. major* sont responsables de la LC chez l'homme, mais différentes études ont rapporté l'isolement et la caractérisation de *L. tropica* chez les patients atteints de LV (MEBRAHTU *et al.*, 1989 ; KREUTZER *et al.*, 1993 ; MAGILL *et al.*, 1993 ; SACKS *et al.*, 1995). Chez la souris, *L. tropica* et *L. major* sont également connues pour causer des infections viscérales. Ces deux espèces responsables de LC sont détectés dans la rate et le foie, mais la rapidité de la diffusion viscérale, les symptômes observés, ainsi que la charge parasitaire diffèrent entre *L. tropica* et *L. major* (NICOLAS *et al.*, 2000 ; MAHMOUDZADEH-NIKNAM *et al.*, 2007 ; BOGDAN, 2008).

Nous avons constaté que *L. killicki* avait aussi la capacité de diffuser et de persister dans les organes internes de souris. Néanmoins, la capacité de *L. killicki* à provoquer la LV chez l'homme reste inconnue et n'a pas été rapporté à ce jour.

En effet, chez l'homme, *L. killicki* induit des lésions chroniques qui persistent jusqu'à un an (IZRI *et al.*, 2014). Chez la souris, nous avons observé que les lésions de *L. killicki* ne guérissent pas spontanément, mais persistent et se développent tout au long de l'expérience. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les déterminants immunologiques sous-jacents permettant de la persistance à long terme de *L. killicki* dans les lésions.

*Leishmania killicki* est considéré comme un nouvel agent pathogène résistant aux traitements par l'antimoine pentavalent (HARRAT *et al.*, 2009 ; MAUBON *et al.*, 2009 ; JAOUADI *et al.*, 2012 ; IZRI *et al.*, 2014). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer la pertinence du modèle d'infection par *L. killicki* en pharmacologie expérimentale. Ce modèle d'infection pourrait servir à tester l'activité leishmanicide de médicaments connus et être utilisé comme élément prédictif de leur efficacité clinique. Actuellement, les modèles animaux d'infection optimisés pour tester des composés antileishmaniens sont disponibles pour *L. major* et *L. amazonensis* (EL-ON *et al.*, 1984 ; FOURNET *et al.*, 1996]. Les infections humaines causées par le complexe *L. tropica* sont considérés comme réfractaires à la plupart des traitements classiques, y compris aux médicaments contenant les antimoniés, contrairement aux infections à *L. major* (MEBRAHTU *et al.*, 1989 ; MODABBER *et al.*, 2007, SCHNUR, 1989). Dans notre étude, nous avons observé que le traitement par l'antimoine ne modifie pas le résultat de lésions induites par *L. major* contrairement à *L. killicki*. En fait, l'expérience ne peut être poursuivie chez des souris infectées par *L. major* en raison de la rapidité de l'infection et de la nécrose qui se forme dans le siège des lésions. Le traitement des souris infectées par *L. killicki* a eu comme révèle une réduction de la taille de lésions, ainsi que de l'épaisseur de l'induration, associées à une diminution drastique de la charge parasitaire au niveau du site d'inoculation.

Ces observations corroborent l'idée que le modèle murin de l'infection par *L. killicki*, présente plusieurs avantages pratiques par rapport au modèle de *L. major*. Tout d'abord, le schéma posologique du médicament peut être évalué sur une période de temps plus long (jusqu'à 30 semaines) par rapport à *L. major*, où la perte de tissu et l'apparition des lésions ulcéreuses limiteront dans le temps le déroulement de l'expérimentation. D'autre part, la multiplication intense et continue des parasites au niveau du site d'inoculation permet d'évaluer plus facilement l'activité leishmanicide de nouvelles molécules d'une manière simple. La forte fréquence de la résistance à l'antimoine chez *Leishmania* spp. dans diverses parties du monde nécessite le développement de nouveaux médicaments anti-leishmaniens (CROFT & OLLIARO, 2011 ; AÏT-OU DHIA *et al.*, 2011 ; SEBLOVA *et al.*, 2014). À cette fin, cette étude soutient l'idée que ce nouveau modèle expérimental murin de *L. killicki* pourrait être utile pour le criblage et la validation de nouveaux composés *in vivo*.

**CONCLUSION GENERALE**  
**ET**  
**PERSEPECTIVES**

Le traitement à l'antimoine des leishmanioses humaines reste à l'heure actuelle, menacé par la résistance clinique. La surveillance épidémiologique de la maladie, et la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques représentent un enjeu important dans la réduction de manière significative de la morbidité et de la mortalité des leishmanioses à travers le monde. Cependant, l'analyse de la littérature montre également comment nos connaissances sur l'épidémiologie de l'efficacité du traitement et de la résistance aux médicaments, sont limitées.

En Algérie, pays endémique de la leishmaniose viscérale et cutanée, l'apparition des cas de résistance au Glucantime®, qui est le principal traitement utilisé, a orienté ce travail de thèse vers l'étude de la susceptibilité à l'antimoine *in vitro* et *in vivo* à la recherche de marqueurs qui permettraient une surveillance efficace de la résistance à l'antimoine en Algérie.

Notre étude sur un large panel d'espèce nous a permis de valider l'utilisation du cutoff calculé comme un premier outil de sélection des souches selon leur susceptibilité à l'antimoine. Les valeurs optimales du SbIII étaient de 15,91 µg/ml pour la LC et 23,83µg/ml de SbIII pour la LV, et de 50 µg/ml pour la LV et de 30 µg/ml de SbV pour la LC. Ce seuil de susceptibilité pourrait être utilisé dans des études épidémiologiques à grande échelle de résistance à l'antimoine, dans des pays endémiques tel que l'Algérie.

Notre analyse de la susceptibilité à l'antimoine des promastigotes, en fonction des espèces et des formes cliniques isolées entre 1984 et 2013, a montré une grande variabilité. Nous avons remarqué une clusterisation en fonction des espèces. Le complexe *L. infantum* possède une susceptibilité variable pour les formes viscérales à MON 1, alors que dans les formes cutanées à MON 24, la susceptibilité à l'antimoine est en dessous du cutoff. Une analyse comparative entre les zymodèmes des différentes souches cutanées a montré une différence significative, faisant ressortir le phénotype résistant des souches du MON 301 de *L. killicki*.

De l'ensemble de nos résultats, ressort un fait important : la baisse de susceptibilité aux drogues et l'apparition de résistance peut être un phénotype intrinsèque et/ou acquis. Néanmoins, compte tenu de la longue histoire de l'utilisation de la monothérapie en Algérie, des éléments de transmission zoonotique de la maladie, et des souches déjà rapportées comme cliniquement résistantes, la discrimination intrinsèque et / ou acquise des bases du phénotype de sensibilité aux médicaments reste difficile. La monothérapie pourrait amplifier la résistance intrinsèque, ainsi que les mécanismes acquis. Le coût biologique ou l'avantage de perte de sensibilité et sa transmission vont influencer les politiques et pratiques de traitement, avec un impact considérable sur la sensibilité aux médicaments des populations de *Leishmania* en Algérie.

A travers cette étude, il ressort une synergie spécifique entre les facteurs de risque étudiés, et le caractère épidémiologique de la résistance aux antimoniés et la nature des défis qu'ils posent pour les programmes de contrôle locaux. Et bien que les antimoniés ne sont plus utilisés comme traitement de première ligne dans plusieurs pays du sous-continent indien, nous pouvons encore tirer de nombreuses leçons de l'expérience avec ce médicament par

rapport à (1) la spéculation de l'avenir du peu d'autres médicaments disponibles et (2) de la conception et la mise en œuvre des stratégies adéquates de surveillance pour surveiller leur efficacité.

Par ailleurs, l'étude de la sensibilité à l'antimoine sur un modèle murin, chez la souris BALB/c, nous a permis de caractériser l'infection des souches de *L. major* sensible et résistante au SbV, *in vitro*. Notre travail, a fait ressortir la virulence comme facteur sélectif de résistance et de sensibilité au Glucantime. De plus, nos résultats ont montré que des paramètres tel que l'apparition précoce des symptômes (rougeurs, indurations, lésions et poids), leur intensité, ainsi que la dissémination rapide du parasite à partir du site d'inoculation vers les différents organes (ganglions drainant et rates) chez les souches résistantes, sont fortement liés à la sensibilité à l'antimoine. En effet, la comparaison du phénotype externe et interne des 2 souches sensible et résistante, montre que l'intensité de la charge parasitaire ainsi que la dissémination du parasite sont lié au caractère virulent de la souche.

L'exploration de la réponse immunitaire associée à cette résistance, et la recherche de l'expression de molécules de virulence, permettrait une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de résistance à l'antimoine, et la sélection de molécules d'intérêt vaccinal.

Le résultat frappant de cette étude est que les souches naturellement résistantes de *Leishmania major* isolées en Algérie expriment une grande variabilité pour tous les critères étudiés (sensibilité des promastigotes et amastigotes à l'antimoine, le développement des lésions et leur capacité inhérente à proliférer). A notre grande surprise, 2 sur 3 des souches isolées avant le traitement ont montré une résistance significative à l'antimoine SbV chez les amastigotes. Ces résultats sont évocateurs d'une grande variabilité de la sensibilité à l'antimoine dans les populations du complexe de *L. major*. Il ressort de l'ensemble de nos résultats qu'il est plus que nécessaire de faire des études plus approfondies de ces souches naturellement tolérantes à l'antimoine et responsables d'échecs thérapeutiques dans les foyers de la leishmaniose cutanée zoonotique en Algérie.

Les résultats obtenus par le modèle murin de l'infection par *L. killicki*, montrent qu'il présente plusieurs avantages pratiques par rapport au modèle de *L. major*. Tout d'abord, le schéma posologique du médicament peut être évalué sur une période de temps plus long par rapport à *L. major*. D'autre part, la multiplication intense et continue des parasites au niveau du site d'inoculation permet d'évaluer plus facilement l'activité leishmanicide de nouvelles molécules d'une manière simple. La forte fréquence de la résistance à l'antimoine chez *Leishmania* spp. dans diverses parties du monde nécessite le développement de nouveaux médicaments anti-leishmaniens. À cette fin, nos résultats soutiennent l'idée que ce nouveau modèle expérimental murin de *L. killicki* pourrait être utile pour le criblage et la validation de nouveaux composés *in vivo*.

Ce travail de thèse ce veut une contribution à la surveillance de l'efficacité du traitement et de la résistance aux médicaments en Algérie. Il représente un élément majeur dans la

compréhension de l'épidémiologie de la leishmaniose et est essentiel dans la lutte contre cette maladie.

Ce travail de thèse met en évidence l'importance d'intégrer cette étude dans un contexte plus large. Une approche de modélisation mathématique est absolument nécessaire pour évaluer la complexité de sa dynamique. De plus, le manque de standardisation des méthodes d'études reste un problème majeur, qui se répercute sur tous les niveaux de la recherche clinique et expérimentale. La mise en place de plates-formes de recherche et de coordination est donc nécessaire. En fournissant des connaissances et des outils pertinents pour le suivi de l'efficacité des rares médicaments existants, ce type d'initiative devrait contribuer à leur « protection » et permettra d'établir les bases à long terme d'une utilisation plus rationnelle.

## Références Bibliographiques

- ADEL A., BOUGHOUFALAH A., SAEGERMAN C., DE DEKEN R., BOUCHENE Z., SOUKEHAL A., BERKVEN S D., BOELAERT M. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One*; **20**(6), e99207.
- AGNEW P., HOLZMULLER P., MICHALAKIS Y., SERENO D., LEMESRE J.L., RENAUD F. (2001). *In vitro* growth of *Leishmania amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun;45(6),1928-9.
- AÏT-LOUDHIA K., GAZANION E., SERENO D., OURY B., DEDET J.P., PRATLONG F., LACHAUD L. (2012). *In vitro* susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol*; **187**(3), 386-393.
- AÏT-LOUDHIA<sup>a</sup> K., HARRAT Z., BENIKHLEF R., DEDET J.P., PRATLONG F.(2011).Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta trop*; **118**(2), 80-6.
- AIT-LOUDHIA<sup>b</sup> K., GAZANION E., OURY B., VERGNES B., SERENO D. (2011). The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: lessons from the field. *Trends Parasitol*; **27**(4),141-2.
- AIT-LOUDHIA K., LAMI P., LESCEU S., HARRAT Z., HAMRIOUI B., DEDET J.P., PRATLONG F. (2009). Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Ann Trop Med Parasitol*; **103**(8), 679-92.
- AKILOV O.E., KHACHEMOUNE A., HASAN T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*;46(2),132–42.
- AKOPYANTS N.S., KIMBLIN N., SECUNDINO N., PATRICK R., PETERS N., LAWYER P., DOBSON D.E., BEVERLEY S.M., SACKS D.L. (2009). Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, **324**, 265–268.
- ALBORZI A., POULADFAR G.R., FAKHAR M., MOTAZEDIAN M.H., HATAM G.R., KADIVAR M.R. (2008). Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral Leishmaniasis and disseminated cutaneous Leishmaniasis, southern Iran. *Amer J of Trop Med & Hyg*, **79**, 435–437.
- ALURU S., HIDE M., MICHEL G., BAÑULS A.L., MARTY P., POMARES C. (2015). Multilocus microsatellite typing of *Leishmania* and clinical applications: a review. *Parasite*, **22**, 16.
- ALVAR J., VÉLEZ I.D., BERN C., HERRERO M., DESJEUX P., CANO J., JANNIN J., DEN BOER M.; WHO. (2012). Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*; **7** (5), e35671.
- ALVAR J., CAÑAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advan Parasitol*; **57**, 1-88.
- ALVAR J., JIMÉNEZ M. (1994). Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS*, **8**(6), 854.
- AMATO V.S., TUON F.F., BACHA H.A., NETO V.A., NICODEMO A.C. (2008). Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*, **105**, 1–9.
- AMEEN M. (2010). Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol*, **35**(7), 699-705.
- AOUN K., BOURATBINE A. (2014). Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, **21**, 14-23.

**ASHUTOSH, SUNDAR S., GOYAL N. (2007).** Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*, **56**(2), 143-153.

**ALVAREZ F., ROBELLO C., VIGNALI M. (1994).** Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. *Mol Biol Evol*. Sep;**11**(5), 790-802.

## B

**BADARO, R., JONES T.C., CARVALHO E.M., SAMPAIO D., REED S.G., BARRAI A., TEIXEIRA R., JOHNSON W.D. (1986).** New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, **154**(6), 1003-11.

**BALANA-FOUCE R., REGUERA R.M., CUBRÍA J.C., ORDÓÑEZ D. (1998).** The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol*, **30**, 435-443

**BALDWIN T.M., ELSON C., CURTIS J., BUCKINGHAM L., HANDMAN E. (2003).** The Site of *Leishmania major* Infection Determines Disease Severity and Immune Responses. *Infect Immun*, **71**, 1-6.

**BAÑULS A.L., DUJARDIN J.C., GUERRINI F., DE DONCKER S., JACQUET D., AREVALO J., NOËL S., LE RAY D., TIBAYRENC M. (2000).** Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol*, **47**(3), 197-207.

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

**BAPTISTA-FERNANDES T., MARQUES C., ROOS RODRIGUES O., SANTOS-GOMES G.M. (2007).** Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **30**, 41-53.

**BASTIEN P., KILLICK-KENDRICK R. (1992).** *Leishmania tropica* infection in hamsters and a review of the animal pathogenicity of this species. *Experimental Parasitology*, **75**, 433-441.

**BATES P.A. (2007).** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, **37**(10):1097-106.

**BEATTIE, L., KAYE P.M. (2011).** *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us? *Cell Microbiol*, **13**(11), 1659-67.

**BELAZZOUG S., NEAL R.A. (1986).** Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **80**(4), 670-671.

**BELAZZOUG S., ADDADI K., MOKRANI T., HAFIRASSOU N., HAMRIOUI B., BELKAID M. (1985).** La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. *Ann Soc Belg Med Trop*, **65**, 329-35.

**BELAZZOUG S. (1986).** Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeur, Gerbillidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de Ksar Chellal (Algérie). *Bull Soc Pathol Exot*; **79**(5), 630-633.

**BELAZZOUG S. (1983).** Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretschmar, 1928 (*Rodentia*, *Gerbillidae*) in Algeria. *Transac Roy Soc Trop Med Hyg*; **77**(6), 878.

**BELKAID Y., PICCIRILLO C. A., MENDEZ S. (2002).** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, **420**, 633-7.

**BELKAID Y. (2003).** The role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther*, **3**, 875-85.

**BELKAID Y., KAMHAWI S., MODI G., VALENZUELA J., NOBEN-TRAUTH N., ROWTON E., RIBERIO J.,**

- SACKS DL. (1998).** Development of natural model of cutaneous Leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med*, **188**, 1941-1953.
- BELKAID Y., MENDEZ S., LIRA R., KADAMBI N., MILON G., SACKS D. (2000).** A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*, **165**, 969-977.
- BENALLAL K., GASSEN B., BOUIBA L., DEPAQUIT J., HARRAT Z. (2013).** Entomological investigation following the resurgence of human visceral leishmaniasis in southern Algeria. *Acta Trop*, **128**(3), 518-21.
- BENIKHLEF R., HARRAT Z., TOUDJINE M., DJERBOUH A., BENDALI-BRAHAM S., BELKAID M. (2004).** Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Med trop*, **64**(4), 381-383.
- BENNIS I., DE BROUWERE V., AMEUR B., EL IDRISSE LAAMRANI A., CHICHAOUI S., HAMID S., BOELAERT M. (2015).** Control of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in south-eastern Morocco. *Trop Med Int Health*, **20**(10), 1297-305.
- BENSEGHIER S. FENDRI F.H. BENIKHLEF R. KHERRACHI I. HARRAT Z. ET AIT HAMOUDA R. (2015).** Aspects épidémiologiques de la leishmaniose cutanée en milieu militaire dans l'Est Algérien : bilan de 05 ans (2009-2104) ». *J Franco-Maghrébine parasitol.*
- BERMAN J. (2003).** Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16:397–401.
- BESSAD A., MOULOUA K., KHERRACHI I., BENBETKA S., BENIKHLEF R., MEZAI G., HARRAT Z. (2012).** *Leishmania infantum* MON-1 isolated from a golden jackal (*Canis aureus*) in Grande Kabylie (Algeria). *Bull Soc Pathol Exot*; **105**(1), 5-7.
- BESTEIRO S., WILLIAMS R.A., COOMBS G.H., MOTTRAM J.C. (2007).** Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, **37**,1063-1075.
- BHAT S.V., PELEG A.Y., LODISE T.P., SHUTT K.A., CAPITANO B., POTOSKI B.A., PATERSON D.L. (2007).** Failure of current cefepime breakpoints to predict clinical outcomes of bacteremia caused by gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 4390– 4395.
- BLACKWELL J.M., FAKIOLA M., IBRAHIM M.E., JAMIESON S.E., JERONIMO S.B., MILLER E.N., MISHRA A., MOHAMED H.S., PEACOCK C.S., RAJU M., SUNDAR S., WILSON M.E. (2009).** Genetics and visceral leishmaniasis: Of mice and man. *Parasite Immunol*, **31**(5), 254–66.
- BOGDAN C. (2012).** Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. *Ann Rheum Dis*, **71**(S2), i60–6.
- BOGDAN C. (2008).** Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: Leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*, **10**, 1221-1234.
- BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. (1998).** The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, **28**(1), 121-34.
- BOUBIDI S.C., BENALLAL K., BOUDRISSA A., BOUIBA L., BOUCHAREB B., GARNI R., BOURATBINE A., RAVEL C., DVORAK V., VOTYPKA J., VOLF P., HARRAT Z. (2011).** *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* hosts in Ghardaïa, south Algeria. *Microb & Infec*; **13**(7), 691-696.
- BOUDRISSA A., CHERIF K., KHERRACHI I., BENBETKA S., BOUIBA L., BOUBIDI S.C., BENIKHLEF R., ARRAR L., HAMRIOUI B., HARRAT Z. (2012).** Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria. *Bull Soc Pathol Exot*; **105**(1), 30-35.

**BRETON M., TREMBLAY M.J., OUELLETTE M., PAPADOPOULOU B. (2005).** Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, **73**(10), 6372-82.

**BRINGAUD F., RIVIERE L., COUSTOU V. (2006).** Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol*, **149**(1), p. 1-9.

**BROCHU C., WANG J., ROY G., MESSIER N., WANG X.Y., SARAVIA N.G., OUELLETTE M. (2003).** Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 3073–3079.

**BUDCZIES J., KLAUSCHEN F., SINN B.V., GYŐRFFY B., SCHMITT W.D., DARB-ESFAHANI S., DENKERT C. (2012).** Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*, **7**(12), e51862.

**BUFFET P.A., SULAHIAN A., GARIN Y.J., NASSAR N., DEROUIN F. (1995).** Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**(9), 2167-8.

## C

**CANGUSSU S.D., DE SOUZA C.C., CAMPOS C.F., VIEIRA L.Q., AFONSO L.C.C., ARANTES R.M.E. (2009).** Histopathology of *Leishmania major* infection: Revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **104**, 918–22.

**CANTACESSI C., DANTAS-TORRES F., NOLAN M.J., OTRANTO D. (2015).** The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, **31**(3), 100-8.

**CARRIÓ J., PORTÚS M. (2002).** *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol*, **2**(2), 11.

**CARRIÓ J., RIERA C., GÁLLEGO M., RIBERA E., PORTÚS M. (2001).** *In vitro* susceptibility of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIV-coinfected patients. *J Antimicrob Chemother*, **47**, 120-121.

**CASTRO R., SCOTT K., JORDAN T., EVANS B., CRAIG J., PETERS E.L., SWIER K. (2006).** The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *J Parasitol*, **92**(6), 1162-70.

**CHAARA D., HAOUAS N., DEDET J.P., BABBA H., PRATLONG F. (2014).** Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop*, **132**(4), 80-93.

**CHAKRAVARTY J., SUNDAR S. (2010).** Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* **2**, 167–176

**CHAPPUIS F., SUNDAR S., HAILU A., GHALIB H., RIJAL S., PEELING R.W., ALVAR J., BOELAERT M. (2007)** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, **5**, 873–882

**CHERIF K., BOUDRISSA A., CHERIF M.H., HARRAT Z. (2012).** A social program for the control of zoonotic cutaneous leishmaniasis in M'Sila, Algeria. *Sante Publique*, **24**(6), 511-2.

**CROFT S.L., SUNDAR S., FAIRLAMB A. (2006).** Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbio Rev*, **19**(1), 111-126.

**CROFT S.L., OLLIARO P. (2011).** Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities. *Clinical Microb Infec*, **17**, 1478-1483.

**CUNNINGHAM, A.C. (2002).** Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*, **72**(2), 132-41.

## D

**DAVID CV., CRAFT N. (2009).** Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, **22**(6), 491-502.

**DAVIDSON R.N., DEN BOER M., RITMEIJER K. (2009).** Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**, 653–660

**DA LUZ R.I., VERMEERSCH M., DUJARDIN J.C., COS P., MAES L. (2009).** *In vitro* sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(12), 5197-203.

**DE MUYLDER G., ANG K.K., CHEN S, ARKIN M.R., ENGEL J.C., MCKERROW J.H. (2011).** A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**, e1253.

**DEDET J.P. (2009).** Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. *EMC*, **8**, 506-510.

**DENTON H., MCGREGOR J.C., COOMBS G.H. (2004).** Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase, TDR1. *Biochem J*, **381**(2), 405-412.

**DESJARDINS M., DESCOTEAUX A. (1997).** Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*,. **185**(12), 2061-8.

**DESJEUX P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives, Comparative immunology. *Microbiol Infec Dis*, **27**, 305–318.

**DESJEUX P. (2001).** The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**(3), 239-43.

**DETOLLA L.J., SCOTT P.A., FARRELL J.P. (1981).** Single gene control of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. *Immunogenetics*, **14**, 29–39.

**DOWLATI Y. (1996).** Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, **14**(5), 425-31.

**DUJARDIN J.C. (2006).** Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol*, **22**(1), 4-6.

**DUJARDIN J.C., HENRIKSSON J., VICTOIR K., BRISSE S., GAMBOA D., AREVALO J., LE RAY D. (2000).** Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the "one gene" evolutionary hypotheses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **95**(4), 527-34.

**DUTTA A., BANDYOPADHYAY S., MANDAL C., CHATTERJEE M. (2005).** Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*, **54**(2), 119-22.

## E

**EL BAIDOURI F., DIANCOURT L., BERRY V., CHEVENET F., PRATLONG F., MARTY P., RAVEL C. (2013).** Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Neg Trop Dis*, **7**, e2255.

**ELIAS, M.C., DA CUNHA J.P., DE FARIA F.P., MORTARA R.A., FREYMÜLLER E., SCHENKMAN S. (2007).** Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist*,. **158**(2), 147-57.

**EL-ON J., JACOBS JP., WITZTUM E., GREENBLATT CL. (1984).** Development of topical treatment for cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother*, **26**, 745-751.

EL TAI N.O., EL FARI M., MAURICIO I., MILES M.A., OSKAM L., EL SAFI S.H., PRESBER W.H., SCHÖNIAN G. (2001). *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol*, **97**(1), 35-44.

ENGWERDA C.R., KAYE P.M. (2000). Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today*, **21**, 73–8.

EPHROS M., BITNUN A., SHAKED P., WALDMAN E., ZILBERSTEIN D. (1999). Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 278–282.

EVANS T.G., TEIXEIRA M.J., MCAULIFFE I.T., VASCONCELOS I., VASCONCELOS A.W., SOUSA ADE A., LIMA J.W., PEARSON R.D. (1992). Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis*, **166**(5), 1124-32.

## F

FARAUT-GAMBARELLI F., PIARROUX R., DENIAU M., GIUSIANO B., MARTY P., MICHEL G., FAUGÈRE B., DUMON H. (1997). *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 827-830.

FERNÁNDEZ O.L., DIAZ-TORO Y., OVALLE C., VALDERRAMA L., MUVDI S., RODRÍGUEZ I., GOMEZ M.A., SARAVIA N.G. (2014). Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*, **22**, 8(5), e2871.

FERNANDEZ O., DIAZ-TORO Y., VALDERRAMA L., OVALLE C., VALDERRAMA M., CASTILLO H., PEREZ M., SARAVIA N.G. (2012). Novel approach to *in vitro* drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania spp.* *J Clin Microbiol*, **50**, 2207–2211.

FIGUEROA R.A., LOZANO L.E., ROMERO L.C., CARDONA M.T., PRAGER M., PACHECO R., DIAZ Y.R., TELLEZ J.A., SARAVIA N.G. (2009). Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *J Infect Dis*, **200**(4), 638-46.

FILARDY A.A., PIRES D.R., DOSREIS G.A. (2011). Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. *Cell Mol Life Sci*, **68**(11), 1863-70.

FIRDOUS R., YASINZAI M., RANJA K. (2009). Efficacy of glucantime in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **48**(7), 758-62.

FLORENTINO P.T., REAL F., BONFIM-MELO A., ORIKAZA C.M., FERREIRA E.R., PESSOA C.C., LIMA B.R., SASSO G.R., MORTARA R.A. (2014). An historical perspective on how advances in microscopic imaging contributed to understanding the *Leishmania Spp.* and *Trypanosoma cruzi* host-parasite relationship. *Biomed Res Int*, 565291.

FORTIER A.H., MELTZER M.S., NACY C.A. (1984). Susceptibility of inbred mice to *Leishmania tropica* infection: genetic control of the development of cutaneous lesions in P/J mice. *J Immunol*, **133**, 454–9.

FOURNET A., FERREIRA M., DE ARIAS A., TORRES DE ORTIZ S., FUENTES S., NAKAYAMA H., SCHININI A., HOCQUEMILLER R. (1996). *In vivo* efficacy of oral and intralésional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemothe*, **40**, 2447–2451.

FRANKE E.D., WIGNALL F.S., CRUZ M.E., ROSALES E., TOVAR A.A., LUCAS CM., LLANOS-CUENTAS A., BERMAN J.D. (1990). Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*, **113**(12), 934-40.

**FREZARD F., DEMICHELI C. (2010).** New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv*, **7**, 1343–1358.

**FREZARD F., DEMICHELI C., FERREIRA C.S., COSTA M.A. (2001).** Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 913–916

## G

**GANGULY S., BANDYOPADHYAY S., SARKAR A., CHATTERJEE M. (2006).** Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Meth*, **66**(1), 79-86.

**GARNI R., TRAN A., GUIH H., BALDET T., BENALLAL K., BOUBIDI S., HARRAT Z. (2014).** Remote sensing, land cover changes, and vector-borne diseases: use of high spatial resolution satellite imagery to map the risk of occurrence of cutaneous leishmaniasis in Ghardaïa, Algeria. *Infect Genet Evol*, **28**, 725-34.

**GEBRE-HIWOT A., TADESSE G., CROFT S.L., FROMMEL D. (1992).** An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop*, **51**(3-4), 237-245.

**GIRGINKARDEŞLER N., BALCIOĞLU IC., YERELI K., ÖZBILGIN A., ÖZBEL Y. (2001).** Cutaneous leishmaniasis infection in BALB/c mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey. *J Parasitol*, **87**, 1177–1178.

**GOTO H., LINDOSO J.A. (2010).** Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Exp Rev Anti-infect Ther*, **8**, 419–433.

**GOTT J.M. (2003).** Two distinct roles for terminal uridyl transferases in RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(19), 10583-4.

**GOURBAL B., SONUC N., BHATTACHARJEE H., LEGARE D., SUNDAR S., OUELLETTE M., ROSEN B.P., MUKHOPADHYAY R. (2004).** Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem*, **279**, 31010–31017.

**GUERIN P.J., OLLIARO P., SUNDAR S., BOELAERT M., CROFT S.L., DESJEUX P., WASUNNA M.K., BRYCESON A.D. (2002).** Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, **2**(8), 494-501.

**GUIMARÃES-COSTA A.B., NASCIMENTO M.T., FROMENT G.S., SOARES R.P., MORGADO F.N., CONCEIÇÃO-SILVA F., SARAIVA E.M. (2009).** *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(16), 6748-53.

**GUY R.A., BELOSEVIC M. (1993).** Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun*, **61**(4), 1553-8.

## H

**HADIGHI R., MOHEBALLI M., BOUCHER P., HAJJARAN H., KAMESIPOUR A., OUELLETTE M. (2006).** Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med*, **3**(5), e162.

**HAILU A., MUSA A.M., ROYCE C., WASUNNA M. (2005).** Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS Med*, **2**, e211.

**HAILU A. (2002).** The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diag Microbiol Infect Dis*, **42**(4), 251-6.

**HARRAT Z., BOUBIDI S.C., PRATLONG F., BENIKHLEF R., SELT B., DEDET J.P., RAVEL C., BELKAID M. (2009).** Description of *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **103**(7):716-20.

**HARRAT Z., BELKAID M. (2003).** Leishmaniasis in Algiers: epidemiologic data. *Bull Soc Pathol Exot*, **96**(3), 212-214.

**HARRAT Z., PRATLONG F., BELAZZOUG S., DEREURE J., DENIAU M., RIOUX JA., BELKAID M., DEDET J.P. (1996).** *Leishmania infantum* and *leishmania major* in Algeria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, **90**(6), 625 – 629.

**HARRAT Z., ADDADI K., BELKAID M., TABEL-DERRAZ O. (1992).** Visceral leishmaniasis in Algeria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990). *Bull Soc Pathol Exot*, **85**(4), 296-301.

**HARTLEY M.A., RNET C., ZANGGER H., BEVERLEY S.M., FASEL N. (2012).** *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol.*, **2**, 99.

**HENDRICKX S., LEEMANS A., MONDELAERS A., RIJAL S., KHANAL B., DUJARDIN J.C., DELPUTTE P., COS P., MAES L. (2015).** Comparative Fitness of a Parent *Leishmania donovani* Clinical Isolate and Its Experimentally Derived Paromomycin-Resistant Strain. *PLoS One*, **10**(10), e0140139.

**HIDE M., BAÑULS A.L., TIBAYRENC M. (2001).** Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, **123**(Pt 5), 425-32.

## I

**INSTITUT NATIONAL DE SANTE PUBLIQUE D'ALGERIE (INSP). (2013).** REM (Relevé épidémiologique mensuel) from 1980 to 2013. URL: <http://www.ands.dz/insp/rem.html>.

**IVES A., RNET C., PREVEL F., RUZZANTE G., FUERTES-MARRACO S., SCHUTZ F., ZANGGER H., REVAZ-BRETON M., LYE L.F., HICKERSON S.M., BEVERLEY S.M., ACHA-ORBEA H., LAUNOIS P., FASEL N., MASINA S. (2011).** *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, **331**(6018), 775-8.

**IZRI A., BENDJABALLAH A., ANDRIANTSOANIRINA V., DURAND R. (2014).** Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria. *Emerg Infect Dis*, **20**, 502-504.

**IZRI A., BELAZZOUG S. (1993).** *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; **87**(4), 399.

**IZRI M.A., BELAZZOUG S., PRATLONG F., RIOUX J.A. (1992).** Isolement de *L. major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie). Fin d'une épopée éco-épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp*, **67**(1), 31-2.

**IZRI M.A., BELAZZOUG S., BOUDJEBLA Y., DEREURE J., PRATLONG S., DELALBRE-BELMONTE A., RIOUX JA. (1990).** *Leishmania infantum* Mon 1 isolé de *Phlebotomus perniciosus* en Kabylie (Algérie). *Ann Parasitol Hum Comp*, **65**(3), 151-2.

## J

**JAOUADI K., DEPAQUIT J., HAOUAS N., CHAARA D., GORCII M., CHARGUI N., DEDET J.P., PRATLONG F., BOUBABOUS R., BABBA H. (2012).** Twenty-four new human cases of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of *Phlebotomus sergenti* in the transmission. *Acta Tropi*, **122**, 276-283.

**JAOUADI K., HAOUAS N., CHAARA D., GORCII M., CHARGUI N., AUGOT D., PRATLONG F., DEDET JP., ETTLIJANI S., MEZHOUH H., BABBA H. (2011).** First detection of *Leishmania killicki* (*Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*) in *Ctenodactylus gundi* (*Rodentia*, *Ctenodactylidae*), a possible reservoir of human cutaneous Leishmaniasis in Tunisia. *Parasitol Vec*, **4**, 159-161.

**JEDDI F., MARY C., AOUN K., HARRAT Z., BOURATBINE A., FARAUT F., BENIKHLEF R., POMARES C., PRATLONG F., MARTY P., PIARROUX R. (2014).** Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**(8), 4866-74.

**JHINGRAN A., CHAWLA B., SAXENA S., BARRETT M.P., MADHUBALA R. (2009).** Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **164**, 111–117

## K

**KABB A.L., OPPEGARD L.M., MCKENZIE B.A., CONNELL G.J. (2001).** A mRNA determinant of gRNA-directed kinetoplast editing. *Nucleic Acids Res*, **29**(12), 2575-80.

**KAUR G., RAJPUT B. (2014).** Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. *J Parasitol Res*, 726328.

**KAYE P., SCOTT D.P. (2011).** Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, **9**(8), 604-15.

**KAYE P.M., CURRY A.J., BLACKWELL J.M. (1991).** Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*, **146**, 2763–70.

**KBAIER-HACHEMI H., GUERBOUJ S., TURKI-MANNOUBI L., KAABI B., GUIZANI I. (2012).** *In vitro* growth kinetics, differentiation and morphological characterisation of Tunisian *Leishmania infantum* parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **106**(1), 20-5.

**KÉBAÏER C., LOUZIR H., CHENIK M., BEN SALAH A., DELLAGI K. (2001).** Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun*, **69**, 4906–15.

**KEDZIERSKI L., ZHU Y., HANDMAN E. (2006).** *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, **133** (S87-I), 12.

**KEVRIC I., CAPPEL M.A., KEELING J.H. (2015).** New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin*, **33**(3), 579-93.

**KHAMESIPOUR A., DOWLATI Y., HASHEMI-FESHARKI R., JAVADI A., NOAZIN S., MODABBER D.F. (2005).** Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, **23**(28), 3642-8.

**KILLICKI-KENDRICK R., KILLICKI-KENDRICK M. (1999).** Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Canine leishmaniasis an update*. p26-32.

**KUREY I., KOBETS T., HAVELKOVÁ H., SLAPNICKOVÁ M., QUAN L., TRTKOVÁ K., GREKOV I., SVOBODOVÁ M., STASSEN A.P., HUTSON A., DEMANT P., LIPOLDOVÁ M. (2009).** Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics*, **61**(9), 619-33.

**KOBETS T., HAVELKOVA H., GREKOV I., VOLKOVA V., VOJTISKOVA J., SLAPNICKOVA M., KUREY I., SOHRABI Y., SVOBODOVA M., DEMANT P., LIPOLDOVA M. (2012).** Genetics of host response to *Leishmania tropica* in mice: different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver. *PLoS Neg Trop Dis*, **6**, e1667.

**KREUTZER R.D., GRÖGL M., NEVA F.A., FRYAUFF D.J., MAGILL A.J., ALEMAN-MUNOZ M.M. (1993).** Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from operation Desert storm. *Am J Trop Med Hyg*, **49**, 357–363.

## L

**LAUFS H., MÜLLER K., FLEISCHER J., REILING N., JAHNKE N., JENSENIUS J.C., SOLBACH W., LASKAY T. (2002).** Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, **70**(2), 826-35.

**LEPROHON P., LÉGARÉ D., RAYMOND F., MADORE E., HARDIMAN G., CORBEIL J., OUELLETTE M. (2009).** Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nuc Acid Res*, **37**(5), 1387-1399.

**LI J., NOLAN T.J., FARRELL J.P. (1997).** *Leishmania major*: a clone with low virulence for BALB/c mice elicits a Th1 type response and protects against infection with a highly virulent clone. *Exp Parasitol*, **87**, 47-57.

**LIMA H.C., TITUS R.G. (1996).** Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun*, **64**, 5442-5.

**LIRA R., DOHERTY M., MODI G., SACKS D. (2000).** Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. *Infect Immun*, **68**, 5176-82.

**LIRA R., SUNDAR S., MAKHARIA A., KENNEY R., GAM A., SARAIVA E., SACKS D. (1999).** Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infec Dis*, **180**(2), 564-567.

**LIRA R., MENDEZ 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 diseases. *Exp Parasitol*, **89**, 331-342.

**LOEUILLET C., BAÑULS A.L., HIDE M. (2016).** Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations *Parasit Vectors*, **9**(1), 144.

**LOPEZ KOSTKA S., DINGES S., GRIEWANK K., IWAKURA Y., UDEYMC, VON STEBUT E. (2009).** IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*, **182**, 3039-46.

**LORIA-CERVERA E.N., ANDRADE-NARVÁEZ F.J. (2014).** Animal models for the study of Leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **56**, 1-11.

## M

**MAAROUF M., DE KOUCHKOVSKY Y., BROWN S., PETIT P.X., ROBERT-GERO M. (1997).** *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res*, **232**, 339-348

**MACHADO-COELHO, G.L., CAIAFFA W.T., GENARO O., MAGALHAES P.A., MAYRINK W. (2005).** Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **99**(1), 55-61.

**MAGILL A.J., GROGL M., GASSER R.A., SUN W., OSTER C.N. (1993).** Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *NEJM*, **328**, 1383-1387.

**MAHMOUDZADEH-NIKNAM H., KIAEI S.S., IRAVANI D. (2007).** Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic Leishmaniasis. *Kor J Parasitol*, **45**, 247-253.

**MAIA C., NUNES M., MARQUES M., HENRIQUES S., ROLÃO N., CAMPINO L. (2013).** *In vitro* drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Exp Parasitol*, **135**(1), 36-41.

- MARSDEN P.D., TADA M.S., BARRETO A.C., CUBA C.C. (1984).** Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **78**(4), 561-2.
- MAUBON D., GUILLOU C.T., RAVEL C., LECCIA M.T., PELLOUX H. (2009).** *Leishmania killicki* imported from Tunisian desert. *Emerg Infect Dis*, **15**, 1864-1865.
- MAURER M., DONDI B., VON STEBUT E. (2009).** What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*, **198**(3), 137-46.
- MBOW M.L., BLEYENBERG J.A., HALL L.R., TITUS R.G. (1998).** Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol*, **161**, 5571-7.
- MCCLRATH B.M.J., KAPLAN G., NUSRAT A., COHN Z.A. (1987).** The Defect in T Cell Influx in BALB/c Mice. *J Exp Med*, **165**, 546-59.
- MEBRAHTU Y., LAWYER P., GITHURE I., WERE J.B., MUGAI R., HENDRICKS L., LEEUWENBURG J., KOECH D., CLIFFORD R. (1989).** Visceral Leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, **41**, 289-294.
- MELBY P.C., TABARES A., RESTREPO B.I., CARDONA A. E., MCGUFF H.S., TEALE J.M. (2001).** *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*, **99**, 17-25.
- MITTAL M.K., RAI S., ASHUTISH R., GUPTA S., GOYAL N. (2007).** Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg*; **76**(4), 681-688.
- MODABBER F., BUFFET P.A., TORREELE E., MILON G., CROFT S.L. (2007).** Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous Leishmaniasis, Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006, *Kinetoplastid Biology and Disease*, **24**, 1-24.
- MODABBER F. (1995).** Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, **89** S1, 83-8.
- MOHAMMADZADEH M., BEHNAZ F., GOLSHAN Z. (2013).** Efficacy of Glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran. *J Infect Public Health*, **6**(2), 120-4
- MOMENI A., AMINJAVAHERI M. (1994).** Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Ispahan, Iran” *Int J Derm*, **33**, 260-265.
- MOORE E.M., LOCKWOOD D.N. (2010).** Treatment of visceral leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* , **2** (2), 151-158
- MOORE E., O'FLAHERTY D., HEUVELMANS H., SEAMAN J., VEEKEN H., DE WIT S., DAVIDSON R.N. (2001).** Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull World Health Organ*, **79**(5), 388-93.
- MOSSER D.M., EDWARDS J.P. (2008).** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, **8**(12), 958-69.
- MOSSER D.M., EDELSON P.J. (1985).** The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*, **135**(4), 2785-9.
- MOUGNEAU E., BIHL F., GLAICHENHAUS N. (2011).** Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*, **240**(1), 286-96.
- MURRAY M.W. (2010).** Treatment of visceral leishmaniasis in 2010: direction from Bihar state, India. *Future Microbiol*, **5**(9), 1301-1303.

**MURRAY H.W., BERMAN J.D., DAVIES C.R., SARAVIA N.G. (2005).** Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366** (9496), 1561-77.

**MURRAY H.W., STERN J.J., WELTE K., CARRIERO S.M., NATHAN A., RUBIN Y. (1987).** Treatment with Interleukin 2 and Interferon-  $\gamma$ . *J Immunol*, **138**, 2290–7.

## N

**NABORS G.S., FARRELL J.P. (1994).** Site-specific immunity to *Leishmania major* in SWR mice: The site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. *Infect Immun*, **62**, 3655–62.

**NADERER T., MCCONVILLE M.J. (2008).** The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, **10**(2), 301-8.

**NASCIMENTO M.S.L., CARREGARO V., LIMA-JÚNIOR D.S., COSTA D.L., RYFFEL B., DUTHIE M.S., DE JESUS A., DE ALMEIDA R.P., DA SILVA J.S. (2015).** Interleukin 17A acts synergistically with interferon  $\gamma$  to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis*, **211**, 1015–26.

**NATERA S., MACHUCA C., PADRÓN-NIEVES M., ROMERO A., DÍAZ E., PONTE-SUCRE A. (2007).** *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents*, **29**, 637–642.

**NASIRI V., KARIMI G., DALIMI A., PAYKARI H., GHAFARIFAR F. (2013).** Effects of sheep and mouse urine on the growth pattern of *Leishmania major* promastigotes. *Biomed Res Int*, **12**, 748592.

**NICOLAS L., SIDJANSKI S., COLLE J.H., MILON G. (2000).** *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. *Infect Immun*, **68**, 6561-6566.

**NOGUEIRA F.S., MOREIRA M.A., BORJA-CABRERA G.P, SANTOS F.N., MENZ I., PARRA L.E., XU Z., CHU H.J., PALATNIK-DE-SOUSA C.B., LUVIZOTTO M.C. (2005).** Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, **23**(40):4805-10.

## O

**OBONAGA R., FERNÁNDEZ O.L., VALDERRAMA L., RUBIANO L.C., CASTRO MDEL M., BARRERA M.C., GOMEZ M.A., GORE SARAVIA N. (2014).** Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal Leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**, 144–152.

**OUELLETTE M., DRUMMELSMITH J., PAPADOPOULOU B. (2004).** Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Update*, **7**, 257–266

**OUELLETTE M., OLIVIER M., SATO S., PAPADOPOULOU B. (2003).** Studies on the parasite *Leishmania* in the post-genomic era. *Med Sci*, **19**(10), 900-9.

**OUAKAD M., VANAERSCHOT M., RIJAL S., SUNDAR S., SPEYBROECK N., KESTENS L., BOELL DEDONCKER S., MAES I., DECUYPERE S., DUJARDIN J.C. (2011).** Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitol*, **138**(11), 1392-9.

**OLIVEIRA F., DE CARVALHO A.M., DE OLIVEIRA C.I. (2013).** Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. *Front Immunol*, **4**, 1–8.

**OLIVEIRA-NETO M.P., MATTOS M., SOUZA CS., FERNANDES O., PIRMEZ C. (1998).** Leishmaniasis récidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **37**(II), 846-9.

## P

**PALATNIK C.B., BOROJEVIC R., PREVIATO J.O., MENDONCA-PREVIATO L. (1989).** Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect Immun*, **57**(3), 754-63.

**PALATNIK-DE-SOUSA C.B., SILVA-ANTUNES I., MORGADO ADE A., MENZ I., PALATNIK M., LAVOR C. (2009).** Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. *Vaccine*, **27**(27), 3505-12.

**PEACOCK C.S., SEEGER K., HARRIS D., MURPHY L., RUIZ J.C., QUAIL M.A., PETERS N., ADLEM E., TIVEY A., ASLETT M., KERHORNOU A., IVENS A., FRASER A., RAJANDREAM M.A., CARVER T., NORBERTCZAK H., CHILLINGWORTH T., HANCE Z., JAGELS K., MOULE S., ORMOND D., RUTTER S., SQUARES R., WHITEHEAD S., RABBINOWITSCH E., ARROWSMITH C., WHITE B., THURSTON S., BRINGAUD F., BALDAUF S.L., FAULCONBRIDGE A., JEFFARES D., DEPLEGGE D.P., OYOLA S.O., HILLEY J.D., BRITO L.O., TOSI L.R., BARRELL B., CRUZ A.K., MOTTRAM J.C., SMITH D.F., BERRIMAN M. (2007).** Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, **39**(7), 839-47.

**PEARSON, R.D., SOUSA A.Q. (1996).** Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, **22**(1), 1-13.

**POLAT E, KUTLUBAY Z. (2014).** Four cutaneous leishmaniosis case resistant to meglumine antimoniate treatment. *Turkiye Parazitoloj Derg.*; **38**(3), 177-80.

**PONTE SUCRE A. (2013).** Drug Resistance in *Leishmania* Parasites. Springer Vienna, 459p.

**POURMOHAMMADI B., MOTAZEDIAN M.H., HANDJANI F., HATAM G.H., HABIBI S., SARKARI B. (2011).** Glucantime efficacy in the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **42**(3), 502-8.

**PRATLONG F., DEREURE J., RAVEL C., LAMI P., BALARD Y., SERRES G., LANOTTE G., RIOUX J.A., DEDET J.P. (2009).** Geographical distribution and epidemiological features of Old World leishmaniasis foci based on the isoenzymes analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health*, **14**(9), 1071-1078.

**PRATLONG F., LAMI P., RAVEL C., BALARD Y., DEREURE J., SERRES G., BAIDOURI F.E., DEDET J.P. (2013).** Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitol*, **140**(4), 423-34.

**PUNTES SM, DWYER DM, BATES PA, JOINER KA. (1989).** Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol.* **143**(11), 3743-9.

## R

**RAI K., CUYPERS B., BHATTARAI N.R., URANW S., BERG M., OSTYN B., DUJARDIN J.C., RIJAL S., VANAERSCHOT M. (2013).** Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. *MBio*, **4**(5):e00611-13.

**RHAJAOUI M., SEBTI F., FELLAH H., ALAM M.Z., NASEREDDIN A., ABBASI I., SCHÖNIAN G. (2012).** Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua province, Morocco. *Parasite*, **19**(1), 81-4.

**REAL F. (2013).** The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res*, **20**, 567-581.

**RIJAL S., YARDLEY V., CHAPPUIS F., DECUYPERE S., KHANAL B., SINGH R., BOELAERT M., DE DONCKER S., CROFT S., DUJARDIN J.C. (2007).** Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current *in vitro* susceptibility assays adequate for prognosis of *in vivo* therapy outcome? *Microbes Infect*, **9**, 529-535.

**RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P., PERIERES J. (1990).** Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **65**, 111–125.

**RITMEIJER K., VEEKEN H., MELAKU Y., LEAL G., AMSALU R., SEAMAN J., DAVIDSON R.N. (2001).** Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**, 668–672.

**RITTIG M.G., BOGDAN C. (2000).** *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, **16**(7), p. 292-7.

**ROBERTS W.L., BERMAN J.D., RAINEY P.M. (1995).** *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1234–1239.

**RODRIGUES O.R., MARQUES C., SOARES-CLEMENTE M., FERRONHA M.H., SANTOS-GOMES G.M. (2009).** Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiol*, **214**, 101–11.

**ROGERS M.E., ILG T., NIKOLAEV A.V., FERGUSON M.A., BATES P.A. (2004).** Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation off PPG. *Nature*, **430**(6998), 463-7.

**ROJAS R., VALDERAMA L., VALDERAMA M., VERONA M.X., OUELLETTE M., SARAVIA N.G. (2006).** Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis*, **193**(10), 1375-1383.

**ROLÃO N., MELO C., CAMPINO L. (2004).** Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Trop*, **90**, 123–6.

**ROUGERON V., DE MEEUS T., HIDE M., WALECKX E., BERMUDEZ H., AREVALO J., LLANOS-CUENTAS A., DUJARDIN J.C., DE DONCKER S., LE RAY D., AYALA F.J., BAÑULS A.L. (2009)** Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(25), 10224-9.

**ROSENTHAL E., DELAUNAY P., JEANDEL P.Y., HAAS H., POMARES-ESTRAN C., MARTY P. (2009).** Liposomal amphotericin B as treatment for visceral leishmaniasis in Europe, 2009. *Med Mal Infect*, **39**(10), 741-4.

**ROYCHOUDHURY J., ALI N. (2008).** Sodium stibogluconate: therapeutic use in the management of leishmaniasis. *Indian J Biochem Biophys* **45**, 16–22.

## S

**SACKS D., NOBEN-TRAUTH N. (2002).** The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, **2**, 845–58.

**SACKS D.L. (2001).** *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*. **3**(4), 189-96.

**SACKS D.L., MODI G., ROWTON E., SPÄTH G., EPSTEIN L., TURCO S.J., BEVERLEY S.M. (2000).** The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**(1), 406-11.

**SACKS DL., KENNEY RT., KREUTZER RD., JAFFE CL., GUPTA AK., SHARMA MC., SINHA SP., NEVA FA., SARAN R. (1995).** Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet*, **345**, 959–961.

**SACKS D.L. (1992).** The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infect Agents Dis*, **1**(4), 200-6.

- SALINAS, G., ZAMORA M, STUART K, SARAVIA N. (1996).** *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. *Am J Trop Med Hyg*, **54**(4), 425-9.
- SCHNUR LF. (1989).** On the clinical manifestations and parasites of old world leishmaniases and *Leishmania tropica* causing visceral leishmaniasis. In *Leishmaniasis, the Current Status and New Strategies for Control*. 163<sup>rd</sup> edition. Edited by Hart DT. New York and London: Plenum Press, in cooperation with NATO Scientific Affairs Division, 939–943.
- SCHUSTER S., HARTLEY M.A., TACCHINI-COTTIER F., RONET C. (2014).** A scoring method to standardize lesion monitoring following intra-dermal infection of *Leishmania* parasites in the murine ear. *Front Cell Infect Microbiol*. **28**;4;67.
- SCHÖNIAN G., MAURICIO I., CUPOLILLO E. (2010).** Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. **26**(10), 466-9.
- SCHÖNIAN G., MAURICIO I., GRAMICCIA M., CAÑAVATE C., BOELAERT M., DUJARDIN J.C. (2008).** Leishmaniases in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol*, **24**(3), 135-42.
- SCHÖNIAN G., NASEREDDIN A., DINSE N., SCHWEYNOCH C., SCHALLIG H., PRESBER W., JAFFE CL. (2003).** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiol Infec Dis*, **47**, 349-358.
- SCHWENKENBECHER J.M., WIRTH T., SCHNUR LF., JAFFE CL., SCHALLIG H., AL-JAWABREH A., HAMARSHEH O., AZMI K., PRATLONG F., SCHÖNIAN G. (2006).** Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Intern J Parasitol*, **36**, 2, 237- 246.
- SEBLOVA V., OURY B., EDDAIKRA N., AÏT-OU DHIA K., PRATLONG F., GAZANION E., MAIA C., VOLF P., SERENO D. (2014).** Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; **58**(10), 6273-6.
- SEIFERT K., ESCOBAR P., CROFT S.L. (2010).** *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother*, **65**(3), 508-11.
- SEIFERT K., MATU S., JAVIER PÉREZ-VICTORIA F., CASTANYS S., GAMARRO F., CROFT SL. (2003).** Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (Miltefosine). *Int J Antimicrob Agents*, **22**, 380–387
- SERENO D., CORDEIRO DA SILVA A., MATHIEU DAUDET F., OUAISSI A. (2007).** Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug screening procedures. *Parasitol Inter*, **56**(1), 3-7.
- SERENO D., ROY G., PAPADOPOULOU B., OUELLETTE M. (2001).** DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**(4), 1168-1173.
- SERENO D., HOLZMULLER P., LEMESRE J.L. (2000).** Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop*, **74**(1), 25-31.
- SERENO D., LEMESRE J.L. (1997).** Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. *Parasitol Res*, **88**(4), 401-403.
- SERGEANT E.D., SERGEANT E.T. (1910).** Kala-Azar : Existence de la leishmaniose chez les chiens d’Alger. Première note. *Bull Soc Pathol Exot*, **3**, 510-511.
- SHAKED-MISHAN P., ULRICH N., EPHROS M., ZILBERSTEIN D. (2001).** Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, **276**, 3971–3976.
- SHARMA N.L., MAHAJAN VK., KANGA A., SOOD A., KATOCH VM., MAURICIO I., SINGH CD., PARWAN**

**UC., SHARMA VK., SHARMA RC. (2005).** Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in Himachal Pradesh, India. *Am J Trop Med Hyg*, **72**, 819–824.

**SILVERMAN J.M., REINER N.E. (2011).** Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol*, **13**(1), 1-9.

**SILVERMAN J.M., CLOS J., HORAKOVA E., WANG A.Y., WIESGIGL M., KELLY I., LYNN M.A., MCMASTER W.R., FOSTER L.J., LEVINGS M.K., REINER N.E. (2010).** *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, **185**(9), 5011-22.

**SIMPSON L., NECKELMANN N., DE LA CRUZ V.F., SIMPSON A.M., FEAGIN J.E., JASMER D.P., STUART K. (1987).** Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J Biol Chem*, **262**(13), 6182-96.

**SIMPSON L., SIMPSON A.M., KIDANE G., LIVINGSTON L., SPITHILL T.W. (1980).** The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am J Trop Med Hyg*, **29**, 1053–1063.

**SINGH R., KUMAR D., RAMESH V., NEGI N.S., SINGH S., SALOTRA P. (2006).** Visceral leishmaniasis, or kala azar (KA): high incidence of refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. *J Infect Dis*, **194**, 302–306.

**SINGH S., SIVAKUMAR R. (2004).** Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*, **10**, 307–315

**SMELT S.C., ENGWERDA C.R., MCCROSSEN M., KAYE P.M. (1997).** Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol*, **158**, 3813–21.

**SPÄTH G.F., BEVERLEY SM. (2001).** A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*, **99**, 97–103.

**STUART K.D., WEEKS R., GUILBRIDE L., MYLER P.J. (1992).** Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(18), 8596-600.

**SUNDAR S., MORE D.K., SINGH M.K., SINGH V.P., SHARMA S., MAKHARIA A., KUMAR P.C., MURRAY H.W. (2000).** Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*, **31**, 1104–1107.

**SUNDAR S., PAI K., KUMAR R., PATHAK-TRIPATHI K., GAM A.A., RAY M., KENNEY R.T. (2001).** Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am J Trop Med Hyg*; **65**(3), 193-196.

**SOUZA A.E., BATES P.A., COOMBS G.H., MOTTRAM J.C. (1994).** Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. **63**(2), 213-20.

## T

**TABBARA K.S., PETERS N.C., AFRIN F., MENDEZ S., BERTHOLET S., BELKAID Y., SACKS D.L. (2005).** Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection *Infect Immun*, **73**(8), 4714-22.

**THEODOS C.M., RIBEIRO J.M.C., TITUS R.G. (1991).** Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun*, **59**, 1592–8.

**TOLEDO J.S., FERREIRA T.R., DEFINA T.P., DOSSIN F.D.E. M., BEATTIE K.A., LAMONT D.J., CLOUTIER S., PAPADOPOULOU B., SCHENKMAN S., CRUZ A.K. (2010).** Cell homeostasis in a *Leishmania major*

mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**(10), 1661-71.

**THOMÁS-PÉREZ M., KHALDI M., RIERA C., MOZO-LEÓN D., RIBAS A., HIDE M., BARECH G., BENYETTOU M., SEGHIRI K., DOUDOU S., FISA R. (2014).** First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop*, **135**, 44-9.

## V

**VANAERSCHOT M., DECUYPERE S., BERG M., ROY S., DUJARDIN J.C. (2013).** Drug-resistant microorganisms with a higher fitness--can medicines boost pathogens? *Crit Rev Microbiol*, **39**(4), 384-94.

**VANAERSCHOT M., MAES I., OUKAD M., ADAUI V., MAES L., DE DONCKER S., RIJAL S., CHAPPUIS F., DUJARDIN J.C., DECUYPERE S. (2010).** Linking *in vitro* and *in vivo* survival of clinical *Leishmania donovani* strains. *PLoS One*; **17**(5), 8p

**VANLERBERGHE V., DIAP G., GUERIN P.J., MEHEUS F., GERSTL S., VAN DER STUYFT P., BOELAERT M. (2007).** Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis", *Trop Med Int Health*; **12**(2), 274-83.

**VERGNES B., SERENO D., TAVARES J., CORDEIRO-DA-SILVA A., VANHILLE L., MADJIDIAN-SERENO N., DEPOIX D., MONTE-ALEGRE A., OUAISSI A. (2005).** Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. *Gene*; **363**, 85-96.

**VERMEERSCH M., DA LUZ R.I., TOTÉ K., TIMMERMANS J.P., COS P., MAES L. (2009).** *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 3855–3859.

**VIANA, G.M., NASCIMENTO M.D., DINIZ NETO J.A., RABELO E.M., BINDA JUNIOR J.R., SANTOS O.M., SANTOS A.C., GALVAO C.S., GUIMARAES R.S. (2011).** Anti-*Leishmania* titers and positive skin tests in patients cured of kala-azar. *Braz J Med Biol Res*, **44**(1), 62-5.

## W

**WEIGLE K., SARAVIA N.G. (1996).** Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*, **14**(5), 433-50.

**WINBERG M.E., HOLM A., SÄRNDAHL E., VINET A.F., DESCOTEAUX A., MAGNUSSON K.E., RASMUSSEN B., LERM M. (2009).** *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect*, **11**(2), 215-22.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2013).** Second WHO report on neglected tropical diseases Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010).** Control of the leishmaniasis. Technical report N°949.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000).** Leishmaniose et les co-infections *Leishmania* / HIV. Aide mémoire N°116.

## Y

**YARDLEY V., ORTUNO N., LLANOS-CUENTAS A., CHAPPUIS F., DONCKER S.D., RAMIREZ L., CROFT S., AREVALO J., ADAUI V., BERMUDEZ H., DECUYPERE S., DUJARDIN J.C. (2006).** American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis*; **194**(8), 1168-1175.

## Z

**ZAIT H., FERHANI Y., ACHIR I., HAMRIOUI B. (2012).** Study of 71 cases of visceral leishmaniasis diagnosed at the Mustapha University Hospital (Algiers) from 1998 to 2009. *Med Mal Infect*; Mar;42(3), 119-25.

**ZHOU Y., MESSIER N., OUELLETTE M., ROSEN B.P., MUKHOPADHYAY R. (2004).** *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confer sensitivity to the drug pentostam. *Molecul Biochem Parasitol*; 279(36), 37445-37451.

**ZIJLSTRA E.E., MUSA A.M., KHALIL E.A., EL-HASSAN I.M., EL-HASSAN A.M. (2003).** Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 3(2), 87-98.

**ZIJLSTRA E.E., EL-HASSAN A.M., ISMAEL A. (1995).** Endemic kala-azar in eastern Sudan: post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 52(4), 299-305.

# **ANNEXE**

## Annexes 1: Tableau des Réservoirs de la leishmaniose (ASHFORD et al., 1996)

Table 1. Records of Naturally Acquired Infections of *Leishmania* in the Old World

Order	Species	Reservoir host of	Incidental host of
Primates	<i>Cercopithecus aethiops</i>		<i>L. major</i>
	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>
Carnivora	<i>Canis familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i>
	<i>C. aureus</i>		<i>L. infantum</i>
	<i>Vulpes corsac</i>		<i>L. infantum</i>
	<i>V. vulpes</i>		<i>L. infantum</i>
	<i>V. zerda</i>		<i>L. donovani</i> *
	<i>Nyctereutes procyonoides</i>		<i>L. infantum</i> ?
	<i>Meles meles</i>		<i>L. infantum</i>
	<i>Genetta genetta</i>		<i>L. donovani</i>
	<i>Felis serval</i>		<i>L. donovani</i>
	Hyracoidea	<i>Dendrohyrax arboreus</i>	
<i>Heterohyrax brucei</i>		<i>L. aethiopica</i>	
<i>Procavia capensis</i>		<i>L. tropica</i> †	
<i>Procavia johnstoni</i> ( <i>P. capensis</i> )		<i>L. tropica</i>	
<i>Procavia habessinica</i> ( <i>P. capensis</i> )			
Rodentia	<i>Xerus rutilus</i>		<i>L. major</i>
	<i>Gerbillus pyramidum</i>		<i>L. major</i>
	<i>Tatera gambiana</i>		<i>L. major</i>
	<i>T. indica</i>		<i>L. major</i>
	<i>T. robusta</i>		<i>L. major</i>
	<i>Taterillus emini</i>		<i>L. major</i>
	<i>Meriones crassus</i>		<i>L. major</i>
	<i>M. erythraeus</i> ( <i>M. libycus</i> )		<i>L. major</i>
	<i>M. hurrianae</i>	<i>L. major</i>	
	<i>M. libycus</i>		<i>L. major</i>
	<i>M. meridianus</i>		<i>L. major</i>
	<i>M. shawi</i>	<i>L. major</i>	
	<i>Psammomys obesus</i>	<i>L. major</i>	
	<i>Rhombomys opimus</i>	<i>L. major</i>	
	<i>Cricetomys gambianus</i>		<i>L. aethiopica</i>
	<i>Arvicanthus niloticus</i> ( <i>Arvicanthus</i> sp)	<i>L. donovani</i> ? <i>L. major</i> ?	
			<i>L. tropica</i> <i>L. infantum</i>
	<i>Rattus rattus</i>		<i>L. donovani</i>
	<i>Aethomys kaiseri</i>		<i>L. major</i>
	<i>Mastomys erythroleucis</i> ( <i>Praomys erythroleucis</i> )	<i>L. major</i>	
<i>Mastomys natalensis</i> ( <i>Praomys natalensis</i> )		<i>L. major</i>	
<i>Nesokia indica</i>		<i>L. major</i>	

Table 2. Records of Naturally Acquired Infections of *Leishmania* in the New World

Order	Species	Reservoir host of	Incidental host of
Marsupalia	<i>Marmosa cinerea</i>		<i>L. amazonensis</i>
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>		<i>L. panamensis</i>
			<i>L. amazonensis</i>
	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. guyanensis</i> ?	<i>L. guyanensis</i>
			<i>L. panamensis</i>
		<i>L. amazonensis</i>	
	<i>D. albiventris</i>		<i>L. infantum</i> *
	<i>Philander opossum</i> ( <i>Metachiroptis opossum</i> )		<i>L. infantum</i> †
			<i>L. amazonensis</i>
Xenarthra (Edentata)	<i>Tamandua tetradactyla</i>	<i>L. guyanensis</i> ?	<i>L. amazonensis</i>
	<i>Bradypus griseus</i> ( <i>B. variegatus</i> )		<i>L. shawi</i>
	<i>B. variegatus</i>		<i>L. panamensis</i>
	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. shawi</i>
	<i>C. hoffmanni</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. colombiensis</i>	
	<i>Dasyurus novemcinctus</i>	<i>L. naiffi</i>	
Primates	<i>Cebus apella</i>		<i>L. shawi</i>
	<i>Chiropotes satanas</i>		<i>L. shawi</i>
	<i>Homo sapiens</i>		all species
Carnivora	<i>Canis familiaris</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. peruviana</i>	<i>L. panamensis</i>
	<i>Cerdocyon thous</i> ( <i>Dusicyon thous</i> )		<i>L. infantum</i>
	<i>Lycalopex vetulus</i> ( <i>Dusicyon vetulus</i> )		<i>L. infantum</i>
	<i>Nasua nasua</i>		<i>L. shawi</i>
	<i>Potos flavus</i>		<i>L. amazonensis</i>
	<i>Felis catus</i>		<i>L. venezuelensis</i>
Perissodactyla	<i>Equus asinus</i>		<i>L. braziliensis</i>
	<i>E. caballus</i>		<i>L. braziliensis</i>
Rodentia	<i>Sciurus vulgaris</i>		<i>L. amazonensis</i>
	<i>Heteromys desmarestianus</i>		<i>L. mexicana</i>
			<i>L. panamensis</i>
			<i>L. amazonensis</i>
	<i>Oryzomys capito</i>		
	<i>Otodylomys phyllotis</i>	<i>L. mexicana</i> ‡	
	<i>Nyctomys sumichrasti</i>		<i>L. mexicana</i>
	<i>Akodon</i> sp		<i>L. panamensis</i>
	<i>A. arviculoides</i>		<i>L. braziliensis</i>
	<i>Sigmodon hispidus</i>		<i>L. mexicana</i>
	<i>Neotoma micropus</i>	<i>L. mexicana</i> §	
	<i>Rattus rattus</i>		<i>L. panamensis</i>
	<i>Coendou</i> sp		<i>L. panamensis</i>
	<i>Agouti paca</i> ( <i>Cuniculus paca</i> )	<i>L. lainsoni</i>	
	<i>Proechimys cuvieri</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>P. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>P. theringi</i>		<i>L. braziliensis</i>
	<i>P. semispinosus</i>		<i>L. panamensis</i>

**Annexe 2 : Tableau des caractéristiques des souches de *Leishmania major* et *Leishmania killicki* utilisées dans l'étude de la dynamique de croissance *in vitro***

Code OMS de la souche	Espèce	Origine	Localisation
MHOM/DZ/09/LIPA 99/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA 97/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA 98/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA100/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA 96/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA 104/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA 103/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA102/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/10/LIPA134/10	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/09/LIPA135/09	<i>L.major</i>	Homme	M'sila (M'hir)
MHOM/DZ/10/LIPA136/10	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/10/LIPA138/10	<i>L.major</i>	Homme	M'sila(M'hir)
MHOM/DZ/11/LIPA 175/11	<i>L.major</i>	Homme	Biskra
MHOM/DZ/06/LIPA 32/06	<i>L.major</i>	Rongeurs	Tougourt
MHOM/DZ/10/LIPA 137/10	<i>L.major</i>	Homme	M'sila (M'hir)
MHOM/DZ/05/LIPA 07/05	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/05/LIPA 10/05	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/05/LIPA 11/05	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/05/LIPA 14/05	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/11/LIPA 279/11	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/11/LIPA 281/11	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/11/LIPA 282/11	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia
MHOM/DZ/11/LIPA 283/11	<i>L.killicki</i>	Homme	Ghardaia

### **Annexe3 : Milieux de culture**

#### **1. Milieu NNN (*Novy Nicolle Mc Neal*)**

Composition : Gélose (10gr bacto agar diffco), NaCl (06gr), Eau distillée stérile (100ml), sang de lapin (10 à 20%)

Préparation : la gélose bacto Agar est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80°C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation ; après distribution dans des tubes à essais 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 (U) 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 (2ml de sang pour 8 ml de gélose). Après homogénéisation, les tubes sont refroidis en position inclinée. La conservation de ce milieu est d'un mois à +4°C.

#### **2. Milieu RPMI 1640 +10% SVF**

Composition : RPMI 1640 (16,4 gr), Eau distillée stérile (1000ml)

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

#### **3. Milieu LIT**

Composition : 30 ml sang de lapin, 60 ml gélose, 10 ml RPMI à 10%, 10 ml M199

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

## **Annexe4 : La numération cellulaire et coloration Giemsa**

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

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

Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22x22 mm et faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela il faut placer la lamelle sur ces plateaux, puis exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.

Placer la cellule de comptage sur une surface plane, homogénéiser les suspensions cellulaires, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de l'embout légèrement inclinée près de la lamelle sur la plateforme centrale quadrillée.

Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulle d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération. Après utilisation, la lamelle est jetée et la cellule de numération est immergées dans un bain d'eau javel pendant 5 minutes, puis rincée avec de l'eau distillée et essuyée avec une gaze ou un papier (sans froter, en particulier au niveau du quadrillage).

### **Numération**

Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer) et observer par la suite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage. Compter parmi les 16 carreaux les cellules contenues dans 6 carreaux du quadrillage en Z.

### **Calcul de la concentration cellulaire**

La concentration cellulaire de la suspension de cellules est calculée par la loi suivante :  $(\text{Nombre de cellules}/6) \times 16 \times (1/\text{dilution}) \times 10^4$  cellules /ml.

## **Coloration Giemsa**

**Préparation du colorant à 10%** : rajouter à 9 volumes d'eau, un volume de colorant Giemsa

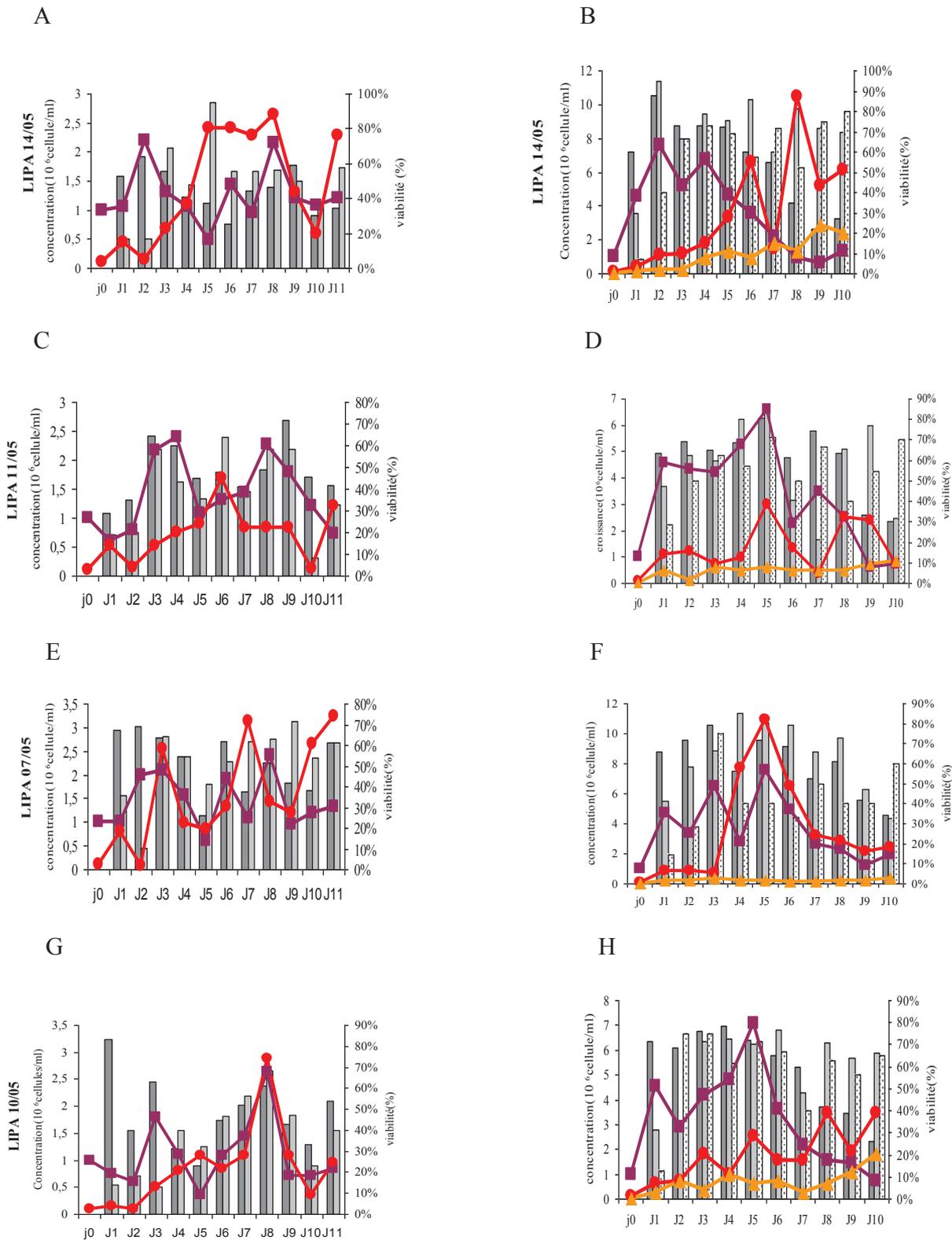
**Fixation** : fixer les lames à colorer avec de l'alcool à 100%, pendant 30 secondes.

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

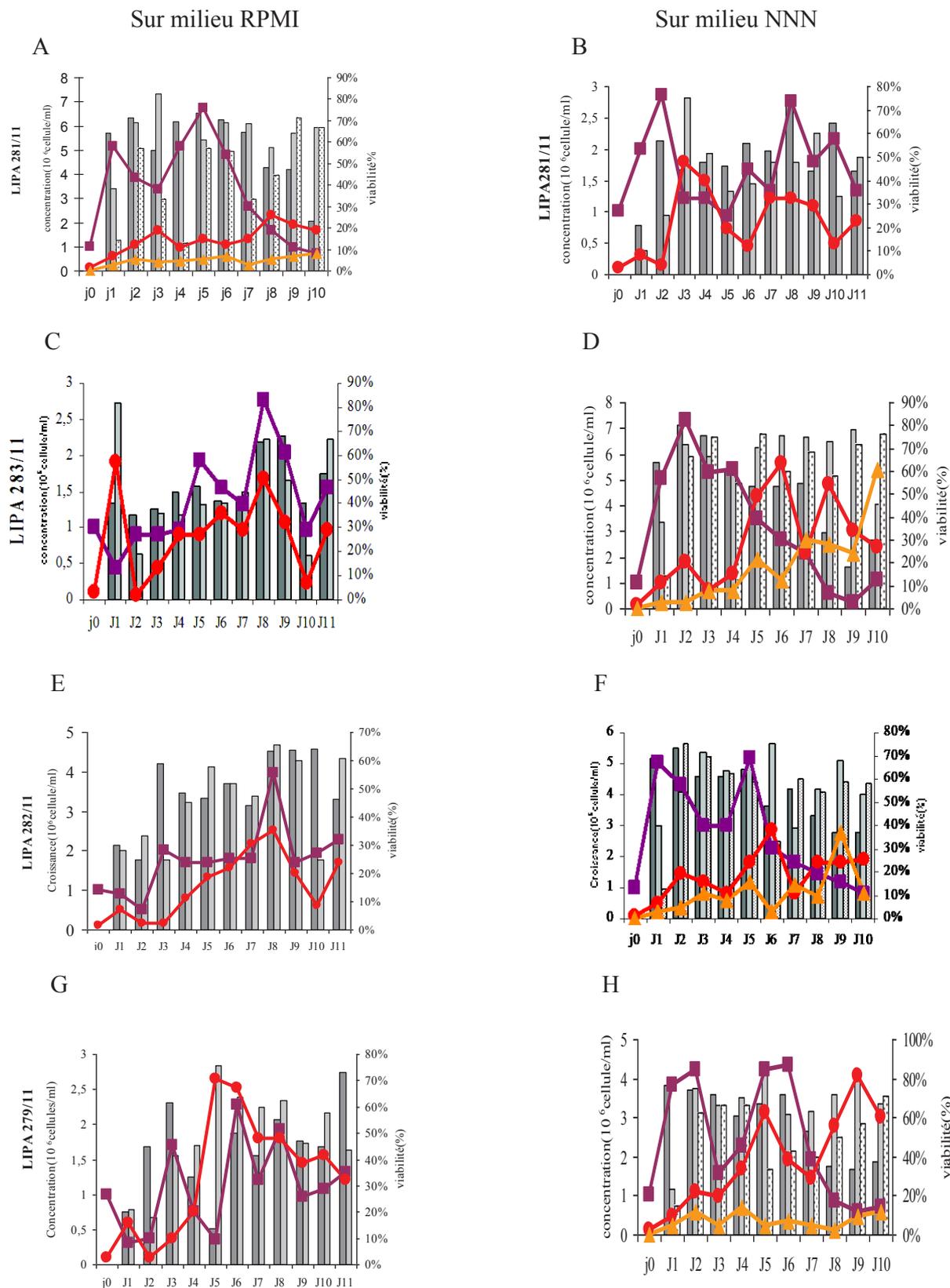
Annexe 5 : Courbes de croissance de 8 souches de *Leishmania killicki*

Sur milieu NNN

Sur milieu RPMI



**Figure 58** : Cinétique de croissance des souches : LIPA14/05, LIPA11/05, LIPA07/05, LIPA10/05, sur milieu NNN (A, C, E, G) et sur milieu RPMI (B, D, F, H). C=concentration ; V=viabilité.



**Figure 59 :** Cinétique de croissance des souches : LIPA281/11, LIPA283/11, LIPA282/11, LIPA279/11, sur milieu NNN (A, C, E, G) et sur milieu RPMI (B, D, F, H) C= concentration, V=viabilité.

### Annexe 6 : Conditions d'électrophorèse des isoenzymes pour les 15 systèmes enzymatiques

Enzyme (Abbréviation)		Tampon d'électrophorèse	Tampon de réaction	Substrats et cofacteurs	Enzymes et colorants
<b>OXYDO-REDUCTASES</b>	ENZYME MALIQUE (ME) EC 1.1.1.40	Tris citrate EDTA (TCE) Ph 9.5	Tampon Tris-HCl 0, 2M pH8 (8ml)	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,2M (1ml), β-NADP 1% (1ml), <b>solution A (5ml) :</b> Ac malic (3,35 g), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ((3,10 g) H <sub>2</sub> O (25ml)	PMS 1% (0.5ml), NBT 1% (1ml)
	MALATE DESHYDROGENASE (MDH) EC 1.1.1.37	Tris citrate EDTA (TCE) Ph 9.5	Tampon Tris-HCl 0, 2M pH8 (8ml)	NAD 1% (1ml), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10mg) <b>solution A (5ml)</b>	PMS 1% (0.5ml), NBT 1% (1ml)
	GLUCOSE -6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (G6PD) EC 1.1.1.49	Tris Maléate EDTA (TME) Ph 7.4	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (10ml)	Glucose 6-phosphate (20mg), EDTA (10mg) β-NADP 1% (1 ml),	PMS 1% (0,5ml), NBT 1% (1ml)
	6-PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASE (PGD) EC 1.1.1.44	Tris Maléate EDTA (TME) Ph 7.4	Tampon Tris-HCl 0.2M pH8 (10ml)	Gluconate 6-phosphate (40mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (1 ml),	PMS 1% (1ml), NBT 1% (1ml)
	GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GLUD) EC 1.4.1.3	Tris Citrate (TC) Ph 8.6	Tampon Tris-HCl 0, 2M pH8 (8ml)	L Glutamic acid sel monosodique (845mg), β-NADP 1% (2.5 ml),	PMS 1% (0.5ml), NBT 1% (2ml)
	NADH DIAPHORASE (DIA) EC 1.6.2.2	Tris Citrate (TC) Ph 8.6	Tampon Tris-HCl 0.2M pH8 (8ml)	β-NADH (10mg)	MTT 100% (10mg), DICIP 100%(0.5ml)
	ISOCITRATE DESHYDROGENASE (ICD) EC 1.1.1.42	Tris Citrate (TC) Ph 8.6	Tampon Tris-HCl 0, 2M pH8 (8ml)	Acide isocitrique (0.1032g), β-NADP 1% (1 ml),	PMS 1% (0,5ml), NBT 1% (1ml)
<b>LYASES</b>	FUMARATE HYDRATASE (FUM) EC 4.2.1.2	Tris maléate PH7.4	Tampon Tris-HCl 0.2M pH8 (8ml)	Acid Fumaric (580mg), β-NAD 1% (≪3ml), Acid pyruvic (20mg)	MDH (100 unités) 200µl PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)
<b>TRANSFERASES</b>	PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE (NP1) EC 2.4.2.1, (NP2) EC 2.4.*	Tris Citrate (TC) Ph 8.6	Tampon Tris-HCl 0.2M pH8 (16ml)	Inosine (40 mg),	Xanthine oxydase (100 µl), PMS 1% (1ml)
	GLUTAMATE OXALOACETATE (GOT1, GOT2) EC 2.6.1.1	Tris Citrate (TC) Ph 8.6	Tampon Tris-HCl 0.2M pH8 (8ml)	Alpha kétoglutarate (150mg), Acide aspartique (300mg), Pyridoxal 5 phosphate (15mg)	Faste blue BB (225mg)
	PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM) EC 5.4.2.2	Tris Maléate EDTA (TME) Ph 7.4	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (15ml)	α-D-glucose-1-P (100mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (0,5 ml), β-NAD 1% (1 ml),	G6PDH (10 unités) 50 µl, PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)
<b>ISOMERASES</b>	PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE (PGI) EC 5.3.1.9	Tris Maléate EDTA (TME) Ph 7.4	Tampon Tris-HCl 0,2M pH8 (15ml)	Fructose-6-phosphate (10mg), MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0,5M (1ml), β-NADP 1% (0,5 ml), β-NAD 1% (1 ml),	G6PDH (10 unités) 50 µl, PMS 1% (0,5ml), MTT 1% (0,5ml)

## Annexe 7 : Extraction de l'ADN parasitaire

### Les réactifs d'extraction

#### 1. Phénol chloroforme

##### Tampon de lyse : pH 8

- 0.5 M EDTA

##### Tampon d'éluion pH 8

Tris-Hcl 1 mM .....	20 ml	} 200 ml de TE
EDTA 0,5 M.....	400 µl	
H2O .....	170 ml	

##### Phenol, chloroform et isoamyl alcool (25v:24v:1v)

##### SDS 10% : pH 7,5

SDS .....	10 g
H2O .....	90 ml

2. Réactifs du kit d'extraction Invitrogen PureLink se sont des réactifs prêts à l'emploi.

### Electrophorèse

#### Réactifs

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

#### Préparation du gel d'agarose à 0.8%

- Peser 0.8g d'agarose et le mettre dans 100ml de TAE 1X.
- Après Chauffage le mélange au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide, pour le refroidir met le mélange sous l'eau courante puis ajouter 7 µl de BET.
- Couler le gel dans la cuve après avoir positionné le peigne. Après polymérisation du gel, retirer soigneusement le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TAE.

## La PCR

### Réactifs

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

**Tableau1** : Les produits du mix et leurs rôles

Produit	Rôle
tampon	Stabiliser le PH du milieu réactionnel
dNTPs	Elongation des 2 brins d'ADN
Mgcl2	Cofacteur positif de la Taq polymérase
Amorce 1	La Reverse et la Forward
Amorce 2	
Taq polymérase	Intervient dans l'hybridation de l'ADN
Eau distillée stérile	Dilution des réactifs à leurs concentrations optimales d'utilisation

### Mode opératoire

Une détection spécifique de l'ADN de *Leishmania spp* a été réalisée en utilisant les amorces : ITS1(pour ciblé l'ADN génomique) et JW 11-12 (pour ciblé l'ADN kinétoplastique)

**Tableau 2** : Amorces utilisées en PCR pour les deux protocoles.

Protocol PCR ITS1	LITSR/L5.8s 300-350pb  5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'  5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'
Protocol JW 11-12	JW11(forward):  5'CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3'  JW12 (reverse) 5'-GGGTAGG GGCGTTCTGCGAAA-3'

**Protocol ITS 1 :****Tableau 3 : Les conditions PCR ITS 1 (Préparation du mix)**

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µL) Pour 1 échantillon
H2O	/	/	23.1
Tampon	10X	1X	5
dNTP	4mM	0,2mM	2.5
A1	25µM	0,5µM	1
A2	25µM	0,5µM	1
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5mM	3
Taq pol	5U	2U	0,4
ADN	/	/	2

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

**Tableau 4 : Programmation du thermocycleur pour ITS 1 :**

Programme		
Paramètre	Température	Temps
Dénaturation initiale	95°C	15min
Dénaturation	95°C	20sec
Hybridation	53°C	30sec
Elongation	72°C	1min
Elongation finale	72°C	6min

} X 35 (cycles)

**Protocol JW11-12 :****Tableau 5 :** Les conditions PCRJW11-12 (Préparation du mix) :

	Concentration finale	Volume ( $\mu\text{L}$ ) Pour 1 échantillon
H <sub>2</sub> O	/	13.3
dNTP	0.2 mM	1.5
Tampon	1X	4
Mgcl <sub>2</sub>	1.5 mM	5
Amorce 1	0.5 $\mu\text{M}$	1
Amorce 2	0.5 $\mu\text{M}$	1
Solution Q	0.5 X	10
Taq polymérase	2U	0.2

- Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillon étudié.
- Tous les constituants sont mélangés dans un tube Eppendorf. 18  $\mu\text{l}$  de ce mélange sont distribués dans chaque tube de barrettes de 8 spécifiques à la PCR (thermocycleur).
- En plus des échantillons on a :
  - o Témoin (-) : contient 2 $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile plus 18  $\mu\text{l}$  de mix.
  - o Témoin (+) : contient 2 $\mu\text{l}$  de l'ADN (+) plus 18  $\mu\text{l}$  du mix.
- L'échantillon : contient 2  $\mu\text{l}$  d'ADN extrait ajouté de 18  $\mu\text{l}$  de mix. Le volume total de chaque microtube (échantillons et témoins) est de 20  $\mu\text{l}$ .

**Tableau 4 :** Programmation du thermocycleur pour JW 11-12 :

Programme		
Paramètre	Température	Temps
Dénaturation initiale	94°C	4 min
Dénaturation	64°C	1 min
Hybridation	58°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	10 min

} X 30 (cycles)

## Annexe 8 : Publications

**Publication 1** :EDDAIKRA N, KHERACHI DJENAD I, BENBETKA S, BENIKHLEF R, AÏT-LOUDHIA K, MOULTI-MATI F, OURY B, SERENO D, HARRAT Z. Development of a Murine Infection Model with *Leishmania killicki*, Responsible for Cutaneous Leishmaniasis in Algeria: Application in Pharmacology. *Biomed Res Int.* 2016;2016:7985104.

**Publication 2**: VERONIKA SEBLOVA, BRUNO OURY, NAQUEL EDDAIKRA, KHATIMA AÏT-LOUDHIA, FRANCINE PRATLONG, ELODIE GAZANION, CARLA MAIA PETR VOLF AND DENIS SERENO. Transmission Antimony-Resistant *Leishmania* Field Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58(10):6273.

**Publication 3**: N. EDDAIKRA, K. AÏT-LOUDHIA, B. OURY, Z. HARRAT AND D. SERENO. Retrospective and ongoing researches on *Leishmania* antimony resistance in Algeria. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 2013: 678-688.

## Research Article

# Development of a Murine Infection Model with *Leishmania killicki*, Responsible for Cutaneous Leishmaniasis in Algeria: Application in Pharmacology

Naouel Eddaikra,<sup>1,2,3</sup> Ihcene Kherachi Djenad,<sup>1</sup> Sihem Benbetka,<sup>1</sup>  
Razika Benikhlef,<sup>1</sup> Khatima Ait-Oudhia,<sup>4</sup> Farida Moulti-Mati,<sup>3</sup> Bruno Oury,<sup>2,5</sup>  
Denis Sereno,<sup>2,5</sup> and Zoubir Harrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Eco-Épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations, Institut Pasteur d'Algérie, Route de Petit Staouéli, Dely Brahim, Algiers, Algeria

<sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche IRD 224 MiVegec (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université Mouloud Mameri de Tizi-Ouzou, Algeria

<sup>4</sup>Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Hassan Badi, BP 161, El Harrach, Algiers, Algeria

<sup>5</sup>Unité Mixte de Recherche IRD 177 InterTryp ("Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites-Environnement dans les Maladies Tropicales Négligées dues aux Trypanosomatides"), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Correspondence should be addressed to Denis Sereno; [denis.sereno@ird.fr](mailto:denis.sereno@ird.fr)

Received 21 September 2015; Revised 30 November 2015; Accepted 6 January 2016

Academic Editor: Chiara Palmieri

Copyright © 2016 Naouel Eddaikra et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In Algeria, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, and *Leishmania killicki* (*Leishmania tropica*) are responsible for cutaneous leishmaniasis. We established a murine model of *L. killicki* infection to investigate its infective capacity, some immunophysiological aspects, and its suitability for pharmacological purposes. Following the injection of *L. major* or *L. killicki* metacyclic promastigotes in the ear dermis of BALB/c mice, the course of infection was followed. The infection with *L. killicki* caused slower lesion formation than with *L. major*. The presence of *L. killicki* or *L. major* DNA and parasites was detected in the ear dermis and in lymph nodes, spleen, and liver. Lesions induced by *L. killicki* were nonulcerative in their aspect, whereas those caused by *L. major* were highly ulcerative and necrotic, which matches well with the lesion phenotype reported in humans for *L. killicki* and *L. major*, respectively. The treatment of *L. killicki* lesions by injection of Glucantime® significantly reduced the lesion thickness and parasite burden. Ear dermal injection of BALB/c mice constitutes a model to study lesions physiopathology caused by *L. killicki* and presents interest for *in vivo* screening of new compounds against this pathogen, emerging in Algeria.

## 1. Introduction

*Leishmania* are obligate intracellular parasites, which cause different forms of leishmaniasis in humans, ranging from dermal ulcers to fatal visceral forms. Cutaneous leishmaniasis (CL) are caused by several *Leishmania* species and display various clinical manifestations. In Algeria, *L. killicki* was discovered in 2005 in the southern province of Ghardaia and recently reported in the northern part of the country

[1, 2]. Phylogenetic studies based on Multilocus Enzyme Electrophoresis showed that *L. killicki* strains were included in clearly distinct clades within the *L. tropica* complex. A recent Multilocus Sequence Analysis further evidenced the substructuring of *L. tropica* species and supported this proposal [3, 4]. In Algeria, up till now only strains belonging to the *L. killicki* subgroup within the *L. tropica* complex have been isolated. The pathogenicity and the infectivity of these strains have never been studied. Cutaneous lesions caused

by *L. tropica* tend to form dry ulcers that require a long time to heal, typically one year or more. Healing is often associated with disfiguring scars and papules that can also recur at the periphery of the original lesion and are called recurrent type lesions [5, 6]. Cutaneous lesions caused by *L. killicki* are called chronic cutaneous lesions because they persist for several years [7]. So clinical signs of cutaneous leishmaniasis due to *L. killicki* are restricted to a chronic cutaneous lesion, resistant to standard treatment in opposite to *L. tropica* cutaneous leishmaniasis [8–11]. In addition, the transmission of *L. killicki* seems to be strictly zoonotic, while it is anthroponotic or occasionally anthrozoönotic for *L. tropica*.

Animal models have been used in the drug discovery and development process to characterize disease physiopathology and to estimate clinical dosing regimens safety margins and toxicity and of course to validate targets and compounds. The ideal in an animal model is that it should replicate to a great extent a human disease phenotype and its underlying causality. Many experimental models have been developed on rodents to study CL. Mouse models were established for *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*, and *L. braziliensis*, each with specific features in order to characterize the immune response, but none of them reproduces the pathology observed in human disease [12–14]. For *L. tropica* and *L. major*, patterns of responses are species specific with different sex effects and largely different host susceptibility genes [6, 15, 16]. So, *L. killicki* causes in humans cutaneous lesions, which tend to form dry ulcers similar in their aspect to those caused by *L. tropica* [1, 6, 7]. Nevertheless, their healing requires a longer period of treatment. CL caused by *L. killicki* is called chronic CL because lesions persist for years, as opposed to CL caused by *L. major* for which lesions usually resolve with scars after few months only [7].

The aims of this work were therefore to develop an animal model that allows us to study basic physiopathological and immunological aspects of the infection caused by *L. killicki* and to evaluate its suitability for pharmacological purposes.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Parasites.** *L. major* (MHOM/DZ/10/LIPA175/11) and *L. killicki* (MHOM/DZ/11/LIPA281/11) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 25 mM glucose, 100 µg/mL streptomycin, and 100 IU/mL penicillin at 25°C. Strain virulence was maintained by a regular passage in susceptible BALB/c mice.

**2.2. Ethics Statement.** All experiments were carried out in compliance with the guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and approved by the Ethical Committee of the Pasteur Institute in Algiers.

**2.3. Mouse Infection.** A total of 120 BALB/c mice were obtained from the animal breeding stock facility of Pasteur Institute in Algiers. Six-week-old females were kept in conventional conditions with barriers, controlled temperature,

and light cycle. Food and water were provided *ad libitum*. Infective promastigotes were isolated at the metacyclic stage from stationary phase cultures (6 days old). Metacyclic promastigotes were isolated on a Ficoll gradient [17], washed once with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.3), and then resuspended in PBS (pH 7.3).  $10^3$  metacyclic promastigotes in 10 µL of PBS were injected in the left ear of each mouse [13].

**2.4. *L. killicki* Animal Model.** To establish an *in vivo* model of cutaneous lesions caused by *L. killicki*, we compared the appearance and the induration thickness of the lesion following intradermal inoculation with *L. killicki* or *L. major* into the ear dermis of BALB/c mice. To monitor lesion development, mice were divided into three groups: 5 mice for the control noninfected mice, 5 mice infected with *L. major*, and 5 mice infected with *L. killicki*. Experiments were conducted during 12 consecutive weeks after infection in mice infected with *L. major* and during 30 consecutive weeks after infection for mice infected with *L. killicki*. Lesion development was monitored by measuring the ear thickness using a digital micrometer caliper (Fisherbrand) at weeks 2, 4, 6, 10, and 12 after infection for *L. major* and at weeks 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, and 30 after infection for *L. killicki*. Results are expressed as the difference between thicknesses of the inoculated ear and the noninoculated contralateral ear (internal control).

**2.5. Detection and Quantification of Parasites in Tissues.** To look at the capacity of *L. killicki* and of *L. major* to disseminate into internal organ, the presence of parasite DNA and of live parasites was investigated at weeks 2, 4, 8, and 12 for *L. major* infected mice and at weeks 2, 4, 8, 12, 16, and 20 for the *L. killicki* group. Mice were euthanized, and the retroaxillary draining lymph nodes, spleen, and liver were collected to extract DNA. At the 12th week, an aliquot from each sample was seeded to LIT (Liver Infusion Tryptose) medium and incubated for 4 weeks in order to isolate live parasites. Samples of tissue were homogenized in PBS using potter grindings and 1.5 mL microtubes with single-use blue pellet pestles (Polylabo, France). Homogenates were then aliquoted and stored at –20°C until DNA extraction. Total DNA was purified using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Parasite DNA was detected after amplification of the ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) using primers LITSR and L5.8S previously designed by Schönian et al. [18]. The PCR mix (25 µL) contained 2.5 µL of DNA, 10x buffer, 300 µM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 500 nM of each primer, and 2 U of Taq DNA polymerase. Amplification products were separated on a 1% agarose gel and visualized after staining with ethidium bromide.

To investigate parasite proliferation during lesion expansion, we measured the parasite load at the inoculation site. At weeks 4, 8, and 12 for *L. major* infected mice and at weeks 4, 8, 12, 16, 20, and 30 for *L. killicki* groups, mice were euthanized. Parasite proliferation within the lesion was monitored by counting the number of amastigotes in Giemsa-stained smears under 100x magnification. The number of



FIGURE 1: Clinical evolution of the ear lesions in BALB/c mice. Lesions' appearance in mice infected with *L. major* (4th week after infection) (a) or *L. killicki* (20th week after infection) (b).

infected macrophages and the mean number of amastigotes per macrophage were determined in one hundred randomly selected fields. The results are expressed as the mean number of parasites per 100 macrophages.

**2.6. Drug Treatment.** In a first attempt to investigate the capacity of this new *in vivo* murine model of infection with *L. killicki* to be used for the screening of new antileishmanial compounds, we compared the outcome of Glucantime treatment which consisted in injecting drug into lesions at weeks 4 and 8 for *L. major* and *L. killicki*, respectively. In all experiments, the treatment was initiated when the infection was well established and when the lesions were obvious 4 and 8 weeks after the inoculation with *L. major* and *L. killicki*, respectively. Two days before drug administration, mice were randomly divided into 2 groups of thirty animals. N-Methylglucamine antimoniate (pentavalent antimony: SbV) was diluted in PBS and then administered to mice by injection directly into lesions at a dose of 28 mg per kg of body weight every 5 days for 15 days. Ear thickness was measured weekly during the treatment and after the end of the treatment. The antimony treatment efficiency was monitored by calculating ear thickness and parasite load indexes:

Ear thickness index = mean thickness of ear from treated mice/mean thickness of ear from untreated mice.

Parasite load index = mean parasite load in untreated mice/mean parasite load in treated mice.

**2.7. Statistical Analysis.** Values are given as the mean  $\pm$  SEM for groups of *n* samples. Analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test were performed using GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) and Microsoft Office Excel 2013 was used to determine the significance of differences.

### 3. Results

**3.1. Lesion Appearance and Development.** A striking difference in the onset, the type, and the severity of lesions was observed between both *Leishmania* species. Cutaneous redness, which is the first symptom of infection caused by tissue inflammation, was detectable 2 weeks after the infection of mice with *L. major* but 4 weeks after infection with *L. killicki*.

After 4 weeks, *L. major*-infected mice exhibited lesions with elevated borders and sharp craters (Figure 1(a)). Mice infected with *L. killicki* developed a detectable lesion later: the ear thickness increased progressively during the time course of the experiment (Figure 1(b)). Infection never caused lesion ulceration, which was observed in *L. major*-infected mice. Strikingly, lesion phenotypes induced by *L. killicki* were clearly distinct from those induced by *L. major*.

In mice infected by *L. major* metacyclic promastigotes, thickening of the ear was observed at the inoculation site as early as 3 weeks after infection. The ear thickness rapidly increased, reached a maximum of 2.4 mm at week 10, and then regressed (Figure 2). For *L. killicki*, the ear thickness expanded linearly and more slowly throughout the time course of the experiment to reach 1.4 mm and 4.3 mm at weeks 10 and 30, respectively.

**3.2. Parasite Burden in the Ear Dermis and Occurrence in Other Organs or Tissues.** The presence of parasites in the ear dermis of mice inoculated with *L. major* was observed as early as the 4th week (Figure 3). Moreover, the parasite burden steadily increased until the 8th week and the maximum was reached at the 10th week (Figures 1 and 3). As from this time, the ear thickness and the lesion size slightly decreased until the ear perforated.

The onset of parasite burden in *L. killicki*-infected mice was different. Parasite expansion began later than for *L. major*, 8 weeks after infection, reached its maximum at week 16, and was maintained until the end of the experiment

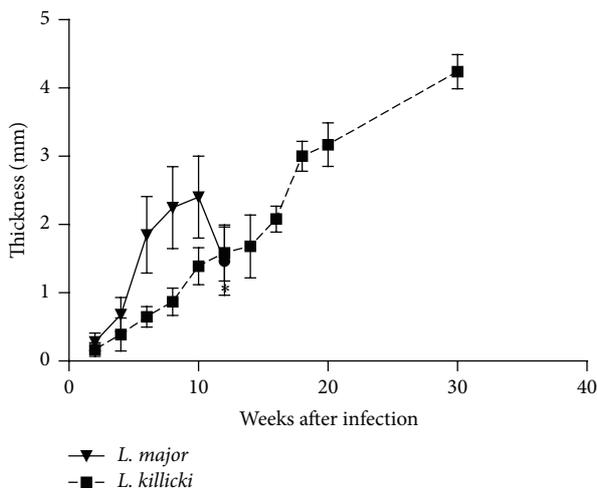


FIGURE 2: Evolution of indurations following infection of BALB/c mice with *Leishmania killicki* or *Leishmania major*. The ear thickness is expressed as the difference between the thicknesses of the inoculated ear and the noninoculated contralateral ear. The data represent the mean values of measures  $\pm$  standard deviations ( $n = 5$ ). Note: 12 weeks (\*) after infection with *L. major*, ears became necrotic and showed a loss of tissue which has prompted us to interrupt the experiment at this time.

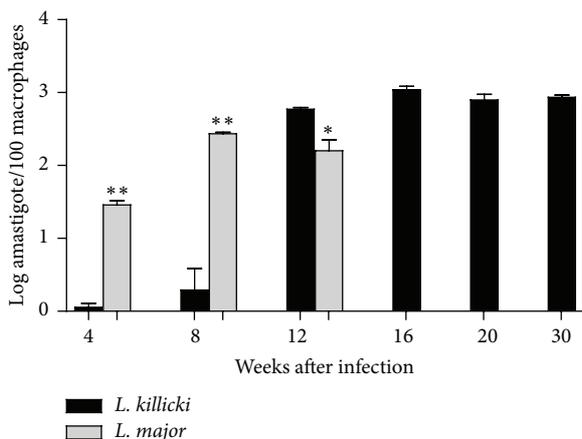


FIGURE 3: Parasite burden measured in ears of BALB/c mice infected with *Leishmania killicki* or *Leishmania major*. Following intradermal injection of  $10^3$  metacyclic promastigotes, the parasite load was estimated as described in Materials and Methods. Each bar is representative of the mean of five determinations  $\pm$  standard deviations. Statistical analysis (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ) was performed using Student's *t*-test under GraphPad Prism ( $n = 5$  mice/group).

at week 30. The maximal parasite burden was significantly higher than for *L. major*-infected mice ( $p < 0.001$ ). In *L. killicki*-infected mice, no further parasite expansion was observed after the 12th week, while the induration thickness increased (Figures 1 and 3).

Beyond the capacity of *Leishmania* to replicate at the inoculation site, the dissemination of *L. killicki* and *L. major* in various tissues or organs was further investigated (Table 1).

*L. major* and *L. killicki* were both detected in culture at 12 weeks. Indeed, DNA detection evidenced the presence of parasites at the inoculation site from the 2nd week after infection for both species. However, the major difference was the delay observed for the colonization of the organ following infection. *L. major* colonized draining lymph nodes and spleen more quickly, 2 weeks after infection compared to 4 weeks for *L. killicki* (Table 1). DNA was detected in liver 4 weeks after infection for both species. After this time point, the PCR remained positive until the 12th week for *L. major* and the 20th week for *L. killicki*.

3.3. Compared Clinical Evolution of *L. killicki* and *L. major* Lesions and Parasite Load under Antimonial Treatment. The ear thickness was roughly similar in *L. major*-infected mice when treated with drug or PBS (Figure 4(a)). The reduction in the lesions observed in *L. major*-infected mice 10 weeks after infection was due to tissue necrosis and loss. These results show that antimony has no or undetectable effect on *L. major* lesions after the end of the treatment, although at concentration we used in our experiment (Figure 4(c)). Interestingly, the expansion of lesion halted in treated *L. killicki*-infected mice submitted to chemotherapy (Figure 4(b)). Accordingly, the ear thickness index increased constantly during the time course of the treatment (Figure 4(c)).

Glucantime treatment slightly affects the parasite load with only 0.12-fold reduction of the mean number of *L. major* amastigotes/100 macrophages in lesions (see Figures 5(a) and 5(c)). However, it is more efficient in *L. killicki*-infected mice, which exhibited twofold reduction in *L. killicki* amastigotes (Figures 5(b) and 5(c)). Parasite loads were significantly different as early as one week after the beginning of the treatment, that is, at the third injection of Glucantime ( $p < 0.001$ ). Overall, a better concordance between parasite load and ear thickness was observed in mice infected with *L. killicki* during antimony treatment than in mice infected with *L. major*.

## 4. Discussion

In this work we seek for the first time to establish a CL animal model for the emerging *Leishmania* parasite in Algeria: *L. killicki*. In an attempt to reproduce the natural biology of *Leishmania* transmission, Belkaid et al. [19] established a dermal model of infection in which low numbers of *L. major* promastigotes were injected into the ear. Based on this methodology, we established a dermal model of infection using *L. killicki*, which involved a cutaneous lesion in the ear dermis of mice, similar to those observed in patients with *L. killicki* infection, that is, localized lesions that do not heal spontaneously. The appearance of lesions induced by *L. killicki* is different from those produced by *L. major* or *L. tropica sensu stricto* [6, 16]. Experimental infection of BALB/c mice with *L. tropica* produced lesions that developed up to 3 months after infection and then regressed [6, 16]. In mice infected with *L. killicki*, we never observed regression of the ear thickness but a continuous extension of the lesion. Indeed, in humans, *L. killicki* induces chronic lesions that persist up

TABLE 1: Detection of *L. major* and *L. killicki* DNA and parasites in various tissues of BALB/c mice. ND, not determined.

<i>Leishmania</i>	Tissue or organ	PCR after inoculation/LIT culture					
		2 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks	20 weeks
<i>L. major</i>	Ear (inoculation site)	+	+	+	+/ND		
	Draining lymph node	+	+	+	+/+		
	Spleen	+	+	+	+/+		
	Liver	-	+	+	+/+		
<i>L. killicki</i>	Ear (inoculation site)	+	+	+	+/ND	+	+
	Draining lymph node	-	+	+	+/+	+	+
	Spleen	-	+	+	+/+	+	+
	Liver	-	+	+	+/+	ND	ND

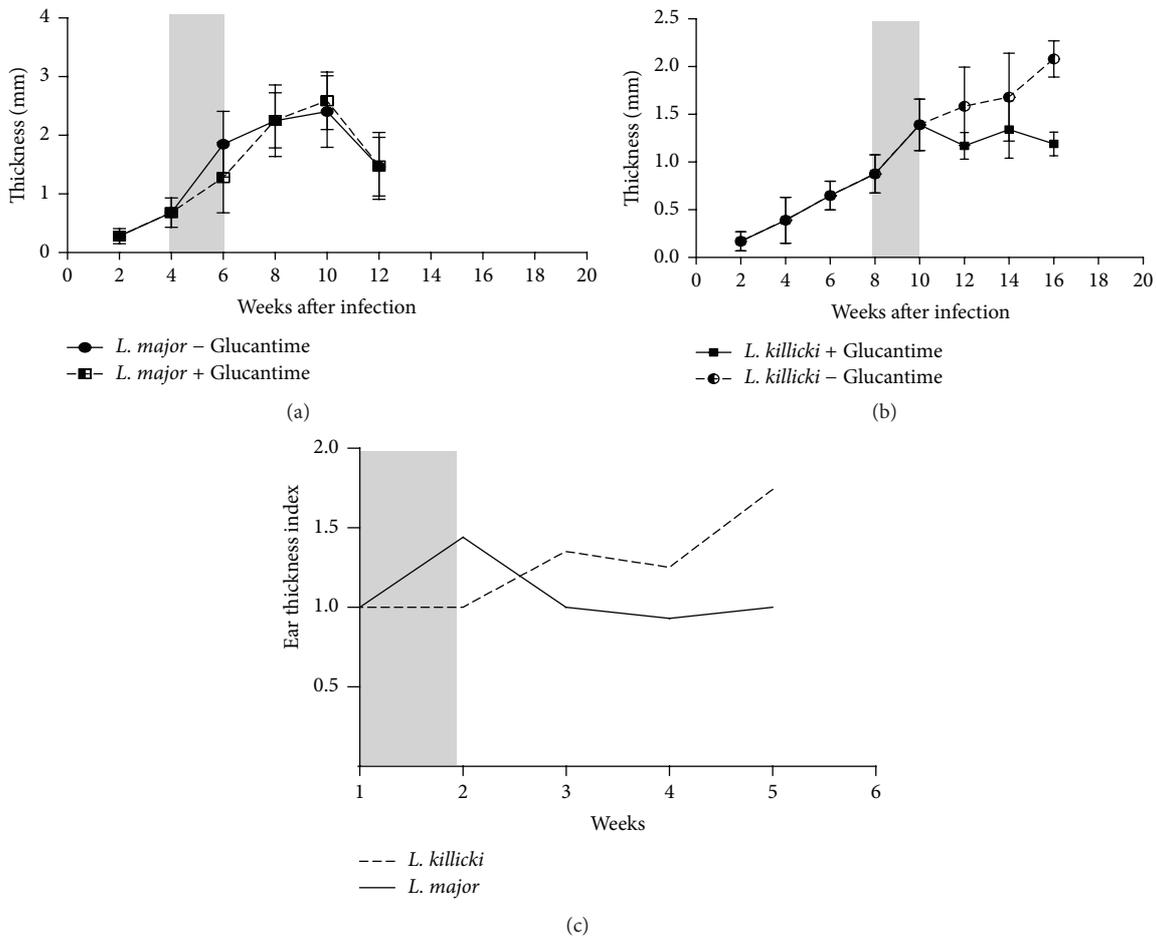


FIGURE 4: Effect of Glucantime treatment on ear induration in mice infected with *Leishmania major* (a) or *Leishmania killicki* (b) and on the ear thickness index (c). Grey bars indicate the Glucantime treatment period. The induration thickness is expressed as the difference of thicknesses between infected ears and contralateral noninoculated ear (control). Data are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations (error bars) ( $n = 5$ ).

to one year [2]. In the mouse, we observed that *L. killicki* lesions do not spontaneously heal but persist and develop all along the experiment. Further studies will be required to understand the underlying immunological determinants allowing the long-term persistence of *L. killicki* in lesions. In the old world, only *L. infantum* and *L. donovani* are known to cause visceral forms of leishmaniasis (VL). Nevertheless,

these two species can also be the causative agents of some forms of CL [20, 21]. In the same way, *L. tropica* as *L. major* cause CL in humans but different studies reported the isolation and characterization of *L. tropica* in patients with VL [8, 22–24]. In mice, *L. tropica* or *L. major* are also known to cause visceral infections; that is, they are detected in spleen and liver but the rapidity of the visceral dissemination,

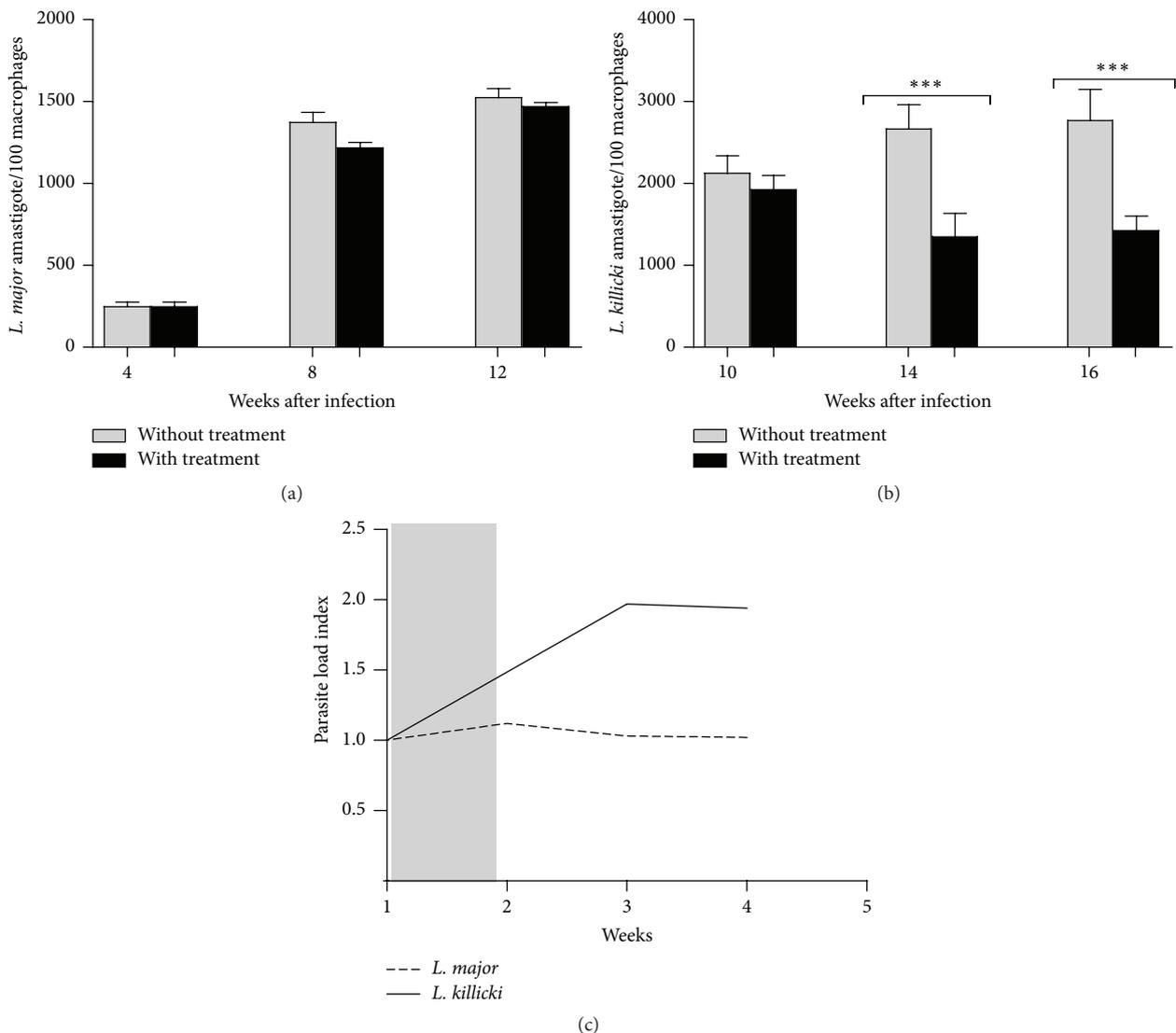


FIGURE 5: Parasite load in mice infected with *Leishmania major* (a) or *Leishmania killicki* (b) and evolution of the parasite load index following antimony treatment (c). The parasite load index was calculated as follows: mean parasite load in untreated mice/mean parasite load in treated mice. Each bar is representative of the mean parasite load determined in 5 mice  $\pm$  standard deviations (error bars). Statistical analysis (\*\*\*)  $p < 0.01$  was performed using Student's *t*-test under GraphPad Prism ( $n = 5$  mice/group). Grey bar indicates the Glucantime treatment period.

the symptoms observed, and the parasite load differ between *L. tropica* and *L. major* [25–27]. We observed that *L. killicki* had also the capacity to disseminate and to persist in internal organs of mice. Nevertheless, the ability of *L. killicki* to cause VL in humans remains unknown and has not been reported to date.

*L. killicki* is considered as an emerging pathogen resistant to pentavalent antimonial treatment [1, 2, 7, 10]. Therefore, it would be interesting to evaluate the suitability of this *L. killicki* infection model in experimental pharmacology. This infection model could test the leishmanicidal activity of known drugs and be predictive of their clinical efficacy. Currently, animal models of infection optimized to test antileishmanial compounds are available for *L. major* and *L. amazonensis* [28, 29]. Human infections caused by *L. tropica* complex are considered to be refractory to most classical

treatments, including antimonial containing drugs, unlike *L. major* infections [22, 30, 31]. In our study, we have observed that antimony treatment does not affect the outcome of lesions induced by *L. major* in contrast to *L. killicki*. In fact, the outcome of the experiment cannot be further followed in mice infected with *L. major* because of lesions' necrosis. The treatment of mice infected with *L. killicki* resulted in the reduction of lesions size and of the thickness which were associated with a drastic diminution of the parasite load at the inoculation site.

## 5. Conclusions

Our observations support the notion that this *L. killicki* model of infection has several practical advantages over the *L. major* model. First, the drug regimen can be evaluated

over a longer time period (up to 30 weeks) as compared to *L. major*, where tissue loss and the appearance of ulcerative lesions limit the time course of the experimentation. Second, the intense and continuous parasite multiplication at the inoculation site makes it possible to more easily assess the leishmanicidal activity of new molecules in a simple way. The continuous emergence of antimony resistance in *Leishmania* spp. in various parts of the world necessitates the development of new alternative antileishmanial drugs [32–34]. To this end, this study supports the notion that this new *L. killicki* experimental model might be useful for screening and validating new compounds *in vivo*.

### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### Authors' Contribution

Naouel Eddaikra and Ihcene Kherachi Djenad contributed equally to this work.

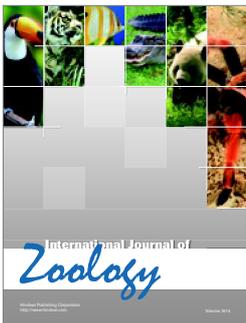
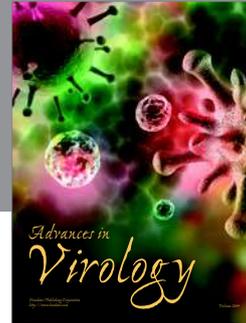
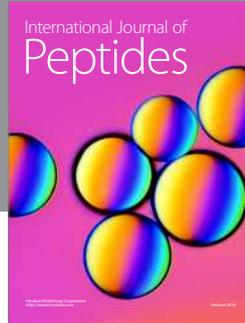
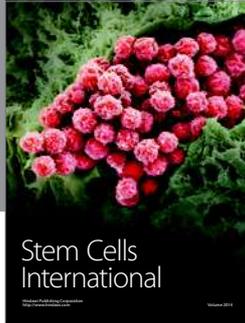
### Acknowledgments

This study was supported in part by the BEST Grant program of IRD doctoral Fellows (821849H). The authors are grateful to the Department for Sustain and Training (DSF) from IRD for providing doctoral Fellowship to Naouel Eddaikra during the period of this study. This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext 277 (<http://www.edenext.eu/>).

### References

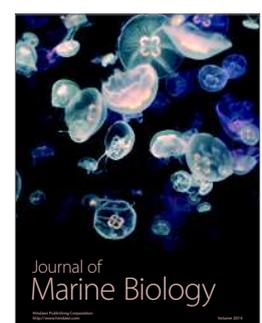
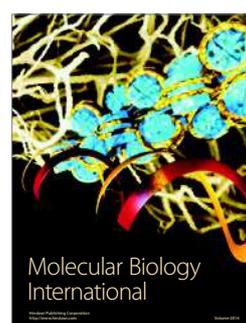
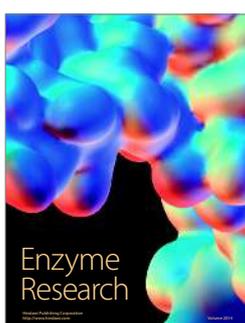
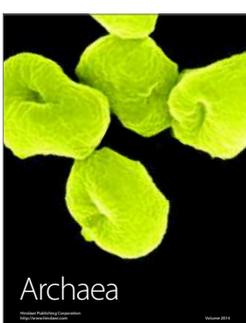
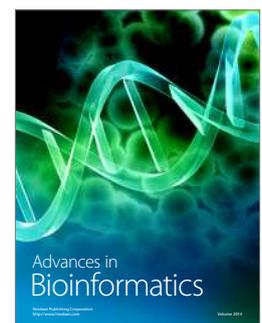
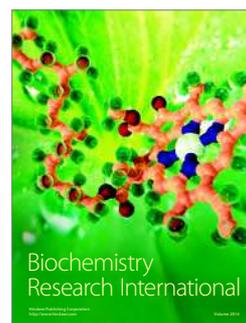
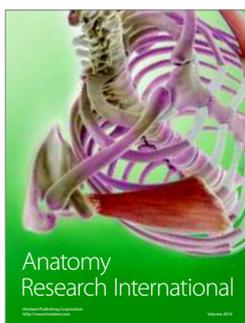
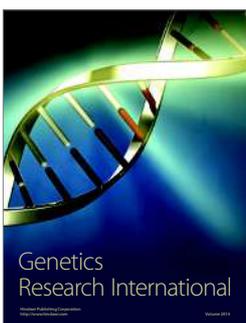
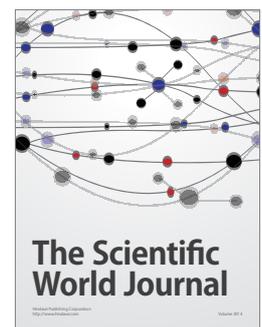
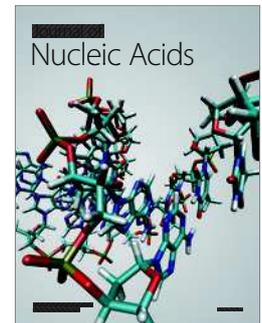
- [1] Z. Harrat, S. C. Boubidi, F. Pratlong et al., "Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 103, no. 7, pp. 716–720, 2009.
- [2] A. Izri, A. Bendjaballah, V. Andriantsoanirina, and R. Durand, "Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania killicki*, Algeria," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 20, no. 3, pp. 502–504, 2014.
- [3] J. M. Schwenkenbecher, T. Wirth, L. F. Schnur et al., "Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*," *International Journal for Parasitology*, vol. 36, no. 2, pp. 237–246, 2006.
- [4] F. El Baidouri, L. Diancourt, V. Berry et al., "Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 6, Article ID e2255, 2013.
- [5] A. Z. Momeni and M. Aminjavaheri, "Clinical picture of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran," *International Journal of Dermatology*, vol. 33, no. 4, pp. 260–265, 1994.
- [6] R. Lira, S. Méndez, L. Carrera, C. Jaffe, F. Neva, and D. Sacks, "*Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease," *Experimental Parasitology*, vol. 89, no. 3, pp. 331–342, 1998.
- [7] D. Maubon, C. Thurot-Guillou, C. Ravel, M.-T. Leccia, and H. Pelloux, "*Leishmania killicki* imported from Tunisian desert," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 11, pp. 1864–1865, 2009.
- [8] A. J. Magill, M. Grögl, R. A. Gasser Jr., W. Sun, and C. N. Oster, "Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm," *The New England Journal of Medicine*, vol. 328, no. 19, pp. 1383–1387, 1993.
- [9] A. Alborzi, G. R. Pouladfar, M. Fakhar, M. H. Motazedian, G. R. Hatam, and M. R. Kadivar, "Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, Southern Iran," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 79, no. 3, pp. 435–437, 2008.
- [10] K. Jaouadi, J. Depaquit, N. Haouas et al., "Twenty-four new human cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of *Phlebotomus sergenti* in the transmission," *Acta Tropica*, vol. 122, no. 3, pp. 276–283, 2012.
- [11] K. Jaouadi, N. Haouas, D. Chaara et al., "First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia," *Parasites & Vectors*, vol. 4, no. 1, pp. 159–161, 2011.
- [12] P. Bastien and R. Killick-Kendrick, "*Leishmania tropica* infection in hamsters and a review of the animal pathogenicity of this species," *Experimental Parasitology*, vol. 75, no. 4, pp. 433–441, 1992.
- [13] Y. Belkaid, S. Kamhawi, G. Modi et al., "Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 188, no. 10, pp. 1941–1953, 1998.
- [14] E. N. Loria-Cervera and F. J. Andrade-Narváez, "Animal models for the study of leishmaniasis immunology," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 56, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [15] N. Girginkardeşler, I. C. Balcioglu, K. Yereli, A. Özbilgin, and Y. Özbek, "Cutaneous leishmaniasis infection in Balb/c mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey," *Journal of Parasitology*, vol. 87, no. 5, pp. 1177–1178, 2001.
- [16] T. Kobets, H. Havelková, I. Grekov et al., "Genetics of host response to leishmania tropica in mice—different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 6, Article ID e1667, 2012.
- [17] G. F. Späth and S. M. Beverley, "A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation," *Experimental Parasitology*, vol. 99, no. 2, pp. 97–103, 2001.
- [18] G. Schönián, A. Nasereddin, N. Dinse et al., "PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 47, no. 1, pp. 349–358, 2003.
- [19] Y. Belkaid, S. Méndez, R. Lira, N. Kadambi, G. Milon, and D. Sacks, "A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged 'silent' phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity," *The Journal of Immunology*, vol. 165, no. 2, pp. 969–977, 2000.
- [20] N. L. Sharma, V. K. Mahajan, A. Kanga et al., "Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica*: preliminary findings of the study of 161 new cases from a new endemic focus in Himachal Pradesh, India," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 6, pp. 819–824, 2005.

- [21] K. Aoun and A. Bouratbine, "Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review," *Parasite*, vol. 21, pp. 14–23, 2014.
- [22] Y. Mebrahtu, P. Lawyer, I. Githure et al., "Visceral leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 41, no. 3, pp. 289–294, 1989.
- [23] R. D. Kreuzer, M. Grogl, F. A. Neva, D. J. Fryauff, A. J. Magill, and M. M. Aleman-Munoz, "Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from operation Desert Storm," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 49, no. 3, pp. 357–363, 1993.
- [24] D. L. Sacks, R. T. Kenney, F. A. Neva et al., "Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*," *The Lancet*, vol. 345, no. 8955, pp. 959–961, 1995.
- [25] L. Nicolas, S. Sidjanski, J.-H. Colle, and G. Milon, "*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," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 12, pp. 6561–6566, 2000.
- [26] H. Mahmoudzadeh-Niknam, S. S. Kiaei, and D. Irvani, "Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis," *The Korean Journal of Parasitology*, vol. 45, no. 4, pp. 247–253, 2007.
- [27] C. Bogdan, "Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example," *Cellular Microbiology*, vol. 10, no. 6, pp. 1221–1234, 2008.
- [28] J. El-On, G. P. Jacobs, E. Witztum, and C. L. Greenblatt, "Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 26, no. 5, pp. 745–751, 1984.
- [29] A. Fournet, M. E. Ferreira, A. Rojas De Arias et al., "In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 11, pp. 2447–2451, 1996.
- [30] F. Modabber, P. A. Buffet, E. Torreele, G. Milon, and S. L. Croft, "Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13–15 June, 2006," *Kinetoplastid Biology and Disease*, vol. 6, article 3, 24 pages, 2007.
- [31] L. F. Schnur, "On the clinical manifestations and parasites of old world leishmaniases and *Leishmania tropica* causing visceral leishmaniasis," in *Leishmaniasis, the Current Status and New Strategies for Control*, D. T. Hart, Ed., pp. 939–943, Plenum Press, NATO Scientific Affairs Division, New York, NY, USA, 163rd edition, 1989.
- [32] S. L. Croft and P. Olliaro, "Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 10, pp. 1478–1483, 2011.
- [33] K. Ait-Oudhia, E. Gazanion, D. Sereno et al., "In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure," *Veterinary Parasitology*, vol. 187, no. 3–4, pp. 386–393, 2012.
- [34] V. Seblova, B. Oury, N. Eddaikra et al., "Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 58, no. 10, pp. 6273–6276, 2014.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



## Transmission Potential of Antimony-Resistant *Leishmania* Field Isolates

Veronika Seblova, Bruno Oury, Naouel Eddaikra, Khatima Ait-Oudhia, Francine Pralong, Elodie Gazanion, Carla Maia, Petr Volf and Denis Sereno  
*Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58(10):6273. DOI:  
10.1128/AAC.02406-13.  
Published Ahead of Print 21 July 2014.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://aac.asm.org/content/58/10/6273>

*These include:*

**REFERENCES**

This article cites 26 articles, 5 of which can be accessed free at:  
<http://aac.asm.org/content/58/10/6273#ref-list-1>

**CONTENT ALERTS**

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

# Transmission Potential of Antimony-Resistant *Leishmania* Field Isolates

Veronika Seblova,<sup>a</sup> Bruno Oury,<sup>b</sup> Naouel Eddaikra,<sup>c</sup> Khatima Aït-Oudhia,<sup>d</sup> Francine Pratlong,<sup>b</sup> Elodie Gazanion,<sup>e</sup> Carla Maia,<sup>f</sup> Petr Volf,<sup>a</sup> Denis Sereno<sup>b</sup>

Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic<sup>a</sup>; MIVEGEC (UM1/UM2-CNRS5290-IRD224), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France<sup>b</sup>; Service d'Eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations Parasitologie, Institut Pasteur d'Algérie, Dely Ibrahim, Alger, Algeria<sup>c</sup>; Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Hassan Badi El-Harrach, Alger, Algeria<sup>d</sup>; Centre de Recherche en Infectiologie du CHUL, Québec, Québec, Canada<sup>e</sup>; Unidade de Parasitologia Médica (UPM), Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisbon, Portugal<sup>f</sup>

**We studied the development of antimony-resistant *Leishmania infantum* in natural vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus perniciosus* to ascertain the risk of parasite transmission by sand flies. All three resistant strains produced fully mature late-stage infections in sand flies; moreover, the resistant phenotype was maintained after the passage through the vector. These results highlight the risk of circulation of resistant *Leishmania* strains and question the use of human drugs for treatment of dogs as *Leishmania* reservoirs.**

Drug-resistant microorganisms are currently a major global health threat. They are the main cause of nonresponse to treatment, prolonged illness, and higher risk of death. Furthermore, they seriously reduce treatment options. For visceral leishmaniasis, a vector-borne and widespread disease with potentially fatal outcomes, treatment alternatives are limited and largely dictated by economic conditions (1). The worldwide emergence of *Leishmania* resistance to the most widely used antileishmanial agent, antimonials, represents a threatening problem (2, 3, 4, 5). In leishmaniasis, various environmental factors can contribute to the selection of antimony (Sb)-resistant strains (6, 7, 8). Several field studies suggest a probability of natural cyclical transmission of resistant strains to explain the observed epidemiological patterns in different regions of the world (9, 10). In Algeria, where antimony drug pressure is sought to be low, antimony-resistant *Leishmania infantum* strains have been repeatedly isolated from dogs (11), which serve as a main reservoir of visceral leishmaniasis. Previously, it was shown in *in vitro* experiments that selection for drug resistance affects the amastigote-promastigote differentiation process of *Leishmania* (12) and is associated with competitive cost (13). In addition, a higher fitness of Sb-resistant *Leishmania donovani* strains corresponding to an increased number of metacyclic stages has been described (14). However, many *Leishmania* strains developed efficiently in the culture but did not produce late-stage infection in the sand fly vector (15). During passage through the sand fly gut, *Leishmania* must overcome several barriers which are critical for successful completion of the parasite life cycle (16).

Strains of *L. infantum* isolated from dogs that have undergone several courses of antimonial therapy were shown to grow in *Phlebotomus perniciosus* sand flies used for xenodiagnosis in these dogs (17), and this finding raised questions about circulation of these strains in nature and their transmissibility to humans (18). While these studies dealt with resistant strains under strong drug pressure, there is no study performed on antimony-resistant strains isolated in areas where antimony is not the primary pressure source, like the ones that have been isolated in Algeria and South America (11, 19).

Thus, we investigated in detail the development of antimony-resistant *L. infantum* parasites in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus perniciosus*, two natural sand fly vectors of visceral leishmaniasis (20). Three antimony-resistant (LEM5285-R, LEM5696-R, and LEM5695-R) and three antimony-susceptible (LEM5680-S, LEM5684-S, and LEM5688-S) *L. infantum* strains, isolated from naturally infected dogs originating from various localities in the Algiers region (Algeria), where leishmaniasis is endemic (11), were used; two of them belong to the MON-1 zymodeme and four to the MON-281 zymodeme (Table 1) (21). We classified these strains as resistant ones because they express 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) toward trivalent derivatives of Sb (SbIII) and pentavalent derivatives of Sb (SbV) that are 2- to 3-fold higher than the IC<sub>50</sub>s determined for 50 *L. infantum* strains isolated in France and Algeria (11, 22). Before passage through the sand fly, susceptibilities of promastigotes and amastigotes were measured twice within a 6-month interval to confirm that the resistant phenotype is stable.

The susceptibility of *Leishmania* promastigote forms to SbIII was determined by cell counting using a flow cytometer as previously described (11). Briefly, parasites were incubated with increasing concentrations of SbIII, ranging from 3.12 to 50 µg/ml, for 3 days. Dead cells were discriminated from the whole population by propidium iodide staining and counted on a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson). As summarized in Table 1, the IC<sub>50</sub>s of promastigotes to SbIII vary between 7.0 and 10.6 µg SbIII/ml for susceptible strains, compared to IC<sub>50</sub>s of 15.2 to 28.3 µg SbIII/ml for resistant strains.

To confirm these results, we also ascertained the susceptibility

Received 9 November 2013 Returned for modification 15 December 2013

Accepted 17 July 2014

Published ahead of print 21 July 2014

Address correspondence to Denis Sereno, denis.sereno@ird.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02406-13

TABLE 1 Antimony susceptibility of *L. infantum* before and after experimental infections of *P. perniciosus*<sup>a</sup>

<i>L. infantum</i> isolate	WHO code	Zymodeme	Mean IC <sub>50</sub> ± SD (µg/ml)			
			SbIII		SbV	
			Pro(In)	Pro(Pern)	Ama(In)	Ama(Pern)
LEM5680-S	MCAN/DZ/2008/ENV34	MON-1	7.0 ± 0.5	ND	30.1 ± 5.0	ND
LEM5684-S	MCAN/DZ/2008/ENV38	MON-1	9.0 ± 0.5	10.5 ± 2.9	35.0 ± 4.0	29.3 ± 3.2
LEM5688-S	MCAN/DZ/2008/ENV41	MON-281	10.6 ± 1.0	8.5 ± 1.0	25.7 ± 9.0	34 ± 6.0
LEM5285-R	MCAN/DZ/2006/ENV6	MON-281	25 ± 1.0	23.4 ± 1.0	>100	>100
LEM5695-R	MCAN/DZ/2008/ENV48	MON-281	15.2 ± 3.4	ND	60 ± 3.1	ND
LEM5696-R	MCAN/DZ/2008/ENV49	MON-281	28.3 ± 4.6	ND	>100	ND

<sup>a</sup> The susceptibility of promastigotes to SbIII before [Pro(In)] and after [Pro(Pern)] development in *P. perniciosus* and susceptibility of intramacrophagic amastigotes to SbV before *P. perniciosus* infection [Ama(In)] and amastigotes derived from promastigotes after *P. perniciosus* infection [Ama(Pern)]. Results are mean values from three independent experiments. Shading indicates results obtained in experiments with the three Sb-resistant *L. infantum* strains. ND, not determined.

of intracellular amastigotes (the clinically relevant stage of *Leishmania*) to SbV. Briefly, THP-1 monocytes were differentiated into macrophages in a 16-well chamber (LABTECKII; Nunc) by adding 20 ng/ml of phorbol myristate acetate (Sigma) for 48 h. Macrophages were washed two times with RPMI medium (Life Technology) and infected for 4 h at a parasites/host cell ratio of 10:1. Then, 12.5, 25.0, 50.0, or 100.0 µg SbV/ml was added. Drugs were renewed after 48 h, and after 120 h macrophages were fixed with methanol and stained with Giemsa to evaluate the susceptibility to SbV antimony. As shown in Table 1, three isolates belonging to the MON-281 zymodeme were characterized as antimony (SbV) resistant, with IC<sub>50</sub>s greater than 100 µg SbV/ml for LEM5285-R and LEM5696-R and an IC<sub>50</sub> of 60.0 ± 3.1 µg SbV/ml for LEM5695-R. Susceptible isolates expressed IC<sub>50</sub>s for SbV between 25.7 and 35.0 µg SbV/ml (Table 1).

Then, we compared the intravectorial development of resistant and susceptible strains. Three Sb-resistant and three Sb-susceptible *L. infantum* strains were used for experimental infection of *Lutzomyia longipalpis* females. In each experiment, approximately 150 sand fly females (5 to 7 days old) were fed through a chick skin membrane on heat-inactivated rabbit blood containing 10<sup>6</sup> promastigotes/ml. Engorged females were separated, maintained at 26°C under conditions described previously (23), and dissected at days 2, 8, and 9 after blood meal (pbm). Localization and intensity of *Leishmania* infection in sand fly midguts were estimated *in situ* under a light microscope, by scoring the proportions of sand flies with weak (<100 parasites/gut), moderate (100 to 1,000 parasites/gut), and heavy (>1,000 parasites/gut) infections (24). All experiments were repeated twice. The  $\chi^2$  test was used for comparison of infection rates and intensities using the STATISTICA 6.0 program (StatSoft, Inc.). On day 2, no differences were observed in the development of Sb-resistant and Sb-susceptible *L. infantum* strains ( $P = 0.46$ ), with both phenotypes showing high infection rates (>80%). Most sand fly females produced heavy or moderate infection in their abdominal midgut, with parasites enclosed within the peritrophic matrix. In late-stage infection, days 8 and 9 pbm, parasites migrated anteriorly to the thoracic midgut (infection rates above 70%) and colonized the stomodeal valve in 70 to 90% of infected females. All tested strains produced mature late-stage infection with metacyclic promastigotes, and no significant differences in infection intensities were observed between Sb-resistant and Sb-susceptible strains ( $P = 0.27$ ) (Fig. 1).

To test the stability of the Sb resistance phenotype after development in sand flies, we isolated one resistant strain

(LEM5285-R) and two susceptible strains (LEM5688-S and LEM5684-S) from the guts of *P. perniciosus* females with mature infections (on day 9 pbm). *P. perniciosus* females were infected using the same methods described above for *Lutzomyia longipalpis*. Sand fly-derived promastigotes were transferred into SDM79 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (amikacin, penicillin, and fluorocytosine) in order to prevent bacterial and fungal growth (25). Seven to 10 days after isolation from the sand fly gut, their susceptibilities to SbIII and SbV were tested as described above. We also checked the SbV resistance of intramacrophagic amastigotes derived from gut-isolated promastigotes. As shown in Table 1, the cyclical passage of the LEM5384-R *Leishmania* strain through sand fly did not alter its SbIII or SbV antimony resistance profiles. As suspected, the cyclical passages of susceptible strains (LEM5688-S and LEM5684-S) did not change their antimony susceptibility.

The worldwide increase in drug resistance frequency among the *Leishmania* population, including areas where antimonial pressure is low (6), and the description of fitness advantages in Nepalese Sb-resistant *L. donovani* strains (26) raise concerns about the risk of spreading of such strains. Here, we confirmed previous finding by Gradoni et al. (17) that Sb-resistant *L. infantum* strains grow in sand flies. Importantly, we studied in detail the development of *L. infantum* originating from an area with a low drug pressure, and for the first time we showed that resistant strains are comparable to the resistant ones in all studied aspects of the vectorial part of the life cycle. For the first time, we demonstrated that the Sb resistance phenotype was maintained after passage through the natural sand fly under conditions without any drug pressure. The most important prerequisite for successful transmission, a high number of parasites colonizing the stomodeal valve and the thoracic part of the sand fly midgut, was achieved in all the strains tested. However, this aspect should be confirmed in the future using additional field-isolated antimony-resistant strains.

Nevertheless, our results highlight the risk of circulation of resistant *Leishmania* strains and also question the use of human drugs for treatment of dogs as *Leishmania* reservoirs. Treatment of canine and human leishmaniasis, both based on antimonial compounds, provide favorable conditions for selection and long-lasting circulation of resistant strains, particularly in areas where leishmaniasis is endemic and where no cost-effective therapeutic alternatives are available. As mentioned by Aït-Oudhia et al. (27), further work should be done in order to verify the epidemiological

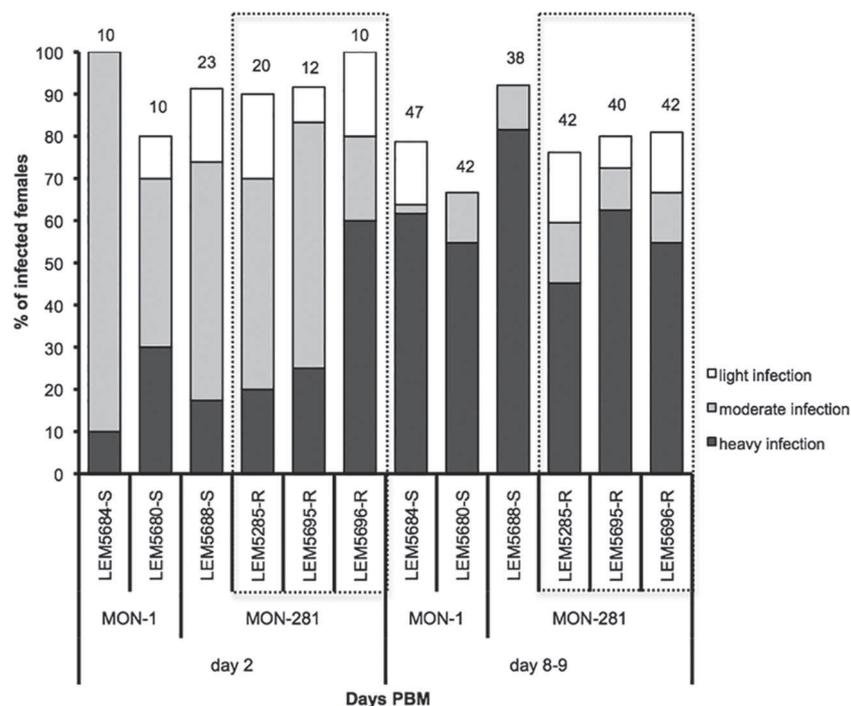


FIG 1 Development of antimony-resistant (box with dashed lines) and antimony-susceptible *L. infantum* strains in *Lutzomyia longipalpis*. Infection rates and intensities of infection by Sb-susceptible (LEM5684-S, LEM5680-S, LEM5688-S) and Sb-resistant (LEM5285-R, LEM5695-R, LEM5696-R) *L. infantum* strains in *Lutzomyia longipalpis* determined at day 2 and days 8 and 9 post blood meal (PBM). Numbers above the bars indicate the number of dissected females.

consequences of the natural occurrence of *L. infantum* antimony resistance in field conditions and their impact on the emergence and spreading of chemoresistance and consequently on control of the disease.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to P. Lami (National Reference Center for Leishmaniasis) for *Leishmania* isoenzyme typing, D. Garcia (IRD-MIVEGEC) for technical assistance, and J. Votypka for help with statistical analysis. We also thank anonymous reviewers for helpful suggestions, corrections, and comments.

V.S. and P.V. were partially funded by grants GACR 13-07 500S. D.S. and B.O. are supported by IRD. N.E. is supported in part by grants from IRD (BEST 2012) and from the Agence Nationale du Développement de la Recherche en Santé (ANDRS) Algeria (PNR no. 08/ANDRS/2011). C.M. holds a fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Portugal (SFRH/BPD/44082/2008). This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext 0192 (<http://www.edenext.eu>).

#### REFERENCES

- Vanlerberghe V, Diap G, Guerin JP, Meheus F, Gerstl S, Van der Stuyft P, Boelaert M. 2007. Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. *Trop. Med. Int. Health* 12:274–283. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01782.x>.
- Abdo MG, Elamin WM, Khalil EAG, Mukhtar MM. 2003. Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and *in vitro* correlation. *East Mediterr. Health J.* 9:837–843.
- Hadighi R, Mohebbi M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. 2006. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med.* 3:e162. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030162>.
- Mittal MK, Rai S, Ashutosh Ravinder Gupta S, Sundar S, Goyal NN. 2007. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76:681–688.
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J. Infect. Dis.* 193:1375–1383. <http://dx.doi.org/10.1086/503371>.
- Sereno D, Maia C, Ait-Oudhia K. 2012. *Leishmania* antimony resistance and environment: elusive links to explore. *Int. J. Parasitol.* 2:200–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.07.003>.
- Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. 2011. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol. Res.* 109:1225–1232. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2555-5>.
- Perry MR, Wyllie S, Raab A, Feldmann J, Fairlamb AH. 2013. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:19932–19937. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1311535110>.
- Adaui V, Maes I, Huyse T, Van der Broeck F, Talledo M, Kuhls K, De Doncker S, Maes L, Llanos-Cuentas A, Schönian G, Arevalo J, Dujardin JC. 2011. Multilocus genotyping reveals a polyphyletic pattern among naturally antimony-resistant *Leishmania braziliensis* isolates from Peru. *Infect. Genet. Evol.* 11:1873–1880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.008>.
- Singh S, Kumar DV, Ramesh Negi NS, Singh S, Salotra P. 2006. Visceral leishmaniasis, or kala azar (KA): high incidence of refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 194:302–306. <http://dx.doi.org/10.1086/505079>.
- Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. 2012. *In vitro* susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet. Parasitol.* 187:386–393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.034>.
- Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmüller P, Ouassii A, Lemesre JL. 2001. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the *in vitro* life cycle of *Leishmania infantum*:

- implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Trop.* 80:195–205. [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00154-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00154-1).
13. Agnew P, Holzmüller P, Michalakis Y, Sereno D, Lemesre JL, Renaud F. 2001. *In vitro* growth of *Leishmania amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1928–1929. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.6.1928-1929.2001>.
  14. Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, Boel L, De Doncker S, Maes I, Decuyper S, Dujardin JC. 2011. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology* 138:1392–1399. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011001120>.
  15. Cihakova J, Volf P. 1997. Development of different *Leishmania major* strains in the vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus duboscqi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91:267–279. <http://dx.doi.org/10.1080/000349897611120>.
  16. Dostalova A, Volf P. 2013. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5:276. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>.
  17. Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Macianti F. 1987. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med. Vet. Entomol.* 4:339–342.
  18. Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. 1992. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86:613–620.
  19. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG. 1999. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J. Parasitol.* 85:360–366. <http://dx.doi.org/10.2307/3285647>.
  20. Maroli M, Feliciangeli M, Bichaud L, Charrel R, Gradoni L. 2013. Phlebotomine sand flies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27:123–147. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>.
  21. Ait-Oudhia K, Lami P, Lesceu S, Harrat Z, Hamrioui B, Dedet JP, Pratlong F. 2009. Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103:679–692. <http://dx.doi.org/10.1179/000349809X12554106963591>.
  22. Oury B, Diabate M, Gazanion E, Barnabe C, Vergnes B, Garcia D, Pratlong F, Bastien P, Dedet JP, Sereno D. 2008. Chemosensitivity to antimony of *Leishmania infantum* in the region of Montpellier (South of France), p 37–42. *In Dupoy-Camet J, Dei-Cas E (ed), X European Multicolloquium of Parasitology*. Medimond, Paris, France.
  23. Volf P, Volfova V. 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36:S1–S9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>.
  24. Myskova J, Votýpka J, Volf P. 2008. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *J. Med. Entomol.* 45:133–138. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[133:LISFCO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[133:LISFCO]2.0.CO;2).
  25. Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, Miles MA. 2011. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One* 6:e19851. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019851>.
  26. Vanaerschot M, Decuyper S, Berg M, Roy S, Dujardin JC. 2013. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness—can medicines boost pathogens? *Crit. Rev. Microbiol.* 39:384–394. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.716818>.
  27. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. 2011. The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: lessons from the field. *Trends Parasitol.* 27:141–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.003>.

## Retrospective and ongoing researches on *Leishmania* antimony resistance in Algeria

N. Eddaikra<sup>1,\*</sup>, K. Aït-Oudhia<sup>2,\*</sup>, B. Oury<sup>3</sup>, Z. Harrat<sup>1</sup> and D. Sereno<sup>3,#</sup>

<sup>1</sup>Service d'eco-épidémiologie Parasitaire et Génétique des Populations Parasitologie, Institut Pasteur d'Algérie, Dely Ibrahim, Alger, Algeria.

<sup>2</sup>Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, BP 161. Hassan Badi El-Harrach. Alger. Algeria.

<sup>3</sup>MIVEGEC (UMI-CNRS 5290-IRD 224) Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France.

\*Both authors equally contribute to the work.

#Corresponding author

*Leishmania* are the causative protozoal agents of leishmaniasis, that is a significant cause of morbidity and mortality in more than 88 countries. In the absence of any effective vaccines, the only feasible way to treat leishmaniasis is through the use of medications. The first line drugs is composed of molecules developed in the 1950s, like pentavalent antimony (i.e., Pentostam<sup>®</sup>, Glucantime<sup>®</sup>). Currently *Leishmania* antimony resistance still continues to emerge in various part of the world. In Algeria, as early as 1986, a high rate of treatment failure (48.5%) was recorded during the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. In addition, lower sensitivity to meglumine antimoniate was observed in *L. major* isolated from *Psammomys obesus*, a reservoir host. More recently decrease antimony susceptibility was reported in *L. infantum* strains. The current studies engaged in Algeria on the susceptibility of *Leishmania* parasites will shed light not only on the occurrence of antimony resistance in this area but also on factors that are involved in the selection of antimony resistance in natural *Leishmania* populations.

**Keywords** *Leishmania*, drug resistance, antimony, life cycle.

### 1. Introduction

*Leishmania* are the causative protozoal agents of various forms of leishmaniasis, which is a significant cause of morbidity and mortality in more than 88 countries. The clinical manifestations of leishmaniasis range from various cutaneous forms to a fatal visceral form. In the Mediterranean Basin, anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica*, zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) caused by *Leishmania major* or, less frequently *Leishmania infantum* and zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) caused by *L. infantum* are all endemic. Visceral leishmaniasis is widely distributed around the Mediterranean Basin, unlike ZCL and ACL, which are more restricted to meridional and oriental regions. In South America, ZCL caused by various *Leishmania* species (e.g., *Leishmania mexicana*, *Leishmania (Vianna) peruviana*, *Leishmania (Vianna) guyanensis*, *Leishmania (Vianna) panamensis* and others), mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Vianna) braziliensis*, diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* and ZVL caused by *Leishmania chagasi* are all highly endemic. In the Indian subcontinent, anthroponotic visceral leishmaniasis (AVL) caused by *Leishmania donovani* poses a major health problem. In several regions of the world, the incidence of leishmaniasis outbreaks has been associated with urbanization, travel, climatic change and social conflict [1, 2, 3].

In the absence of effective vaccines, the only feasible way to treat and control leishmaniasis is through the use of affordable medications. The current chemotherapeutic arsenal consists of molecules that were developed in the 1950s, including pentavalent antimony (SbV) compounds (e.g., Pentostam<sup>®</sup>, Glucantime<sup>®</sup>), pentamidine and various formulations of the antifungal Amphotericin B and, more recently, miltefosine [4, 5, 6]. Instead of determining therapeutic protocols based on clinical and biological indications, treatment choice is frequently dictated by economic considerations, pentavalent antimonial compounds being one of the most affordable [7]. Therapeutic failure during antimony treatment remains a well know problem, but antimony resistance is not the only factor responsible to therapeutic failure. Indeed, factors that are linked to the host (e.g., immunosuppression or malnutrition), the drug itself (e.g., drug batch or counterfeit drugs), the *Leishmania* species, or the practitioner (e.g., incomplete treatment follow-ups) will also play a role in parasite drug resistance and treatment failure [1, 8, 9]. In most parts of the world, the frequency of parasite antimony resistance linked to treatment failure is unknown. This information is crucial for addressing the risk of selection and transmission of drug-resistant parasites, particularly in areas where antimony is the only chemotherapeutic alternative. Here we review current tools available to diagnose *Leishmania* antimony resistance and after reviewing the current epidemiological situation of leishmaniasis, both human and canine, we focused on ongoing researches on antimony resistance in this area.

## 2. Tools to monitor *Leishmania* antimony resistance

Various hosts and drug-derived molecules play a role in the antileishmanial activity of SbV *in vivo*. Therefore, to reflect the *in vivo* activity of antimonials, the *in vitro* tests must monitor the antileishmanial activity of the microbicidal compounds involved in the killing pathway of SbV. In addition, the origin of the antimonial batch has been taken into account because commercially available SbV solutions are not pure [4, 10]. In fine in all cases, the results given by the *in vitro* tests must always be compared with clinical observations.

### 2.1. Cellular models for *in vitro* antimonial susceptibility testing

Obviously, the intracellular forms of the parasites (amastigotes) represent the ideal form, because both indirect activity through the host cell and direct activity on the parasite can be assessed. Unfortunately, methods that involve intracellular amastigotes are labor intensive, difficult to standardize, time-consuming and dependent upon the nature of the host cell [11, 12, 13]. The development of the reporter gene technologies has enabled the quantification of *Leishmania* parasites in host cells and whole mammalian hosts [14, 15, 16, 17]. These technologies have been tested to determine the drug susceptibility of field isolates [18, 19]. However, the time required for transfection and the selection of recombinant parasites certainly affect the composition of the isolates in mixed *Leishmania* infections [20]. As shown in the table 1, the nature of the host influences the outcome of the test [12]. In fine, the lack of consensus in the standardization of this methodology makes interpretations of potential intra and interspecific variations in antimony susceptibility difficult. In fact, even if this system takes into account all the factors that are involved in intracellular SbV antileishmanial activity, its versatility and cost make its application very impractical for large-scale analysis of parasite antimony susceptibility and resistance surveys.

**Table 1** Variability in the susceptibility of various *Leishmania* species towards SbV antimonial according to the host cell nature and the protocol of determination.

Host cell	<i>Leishmania</i>	Days	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	References
THP-1	<i>L. infantum</i>	NA	272.0	20
	<i>L. infantum</i>	NA	13.0	
	<i>L. infantum</i>	5	35.0	18
	<i>L. tropica</i>	5	2-40	18
	<i>L. donovani</i>	5	85.0	21
				18
Mouse peritoneal macrophages	<i>L. tropica</i>	5	2-50	
	<i>L. major</i>	5	6-17	22
	<i>L. amazonensis</i>	2	30.4	23
	<i>L. amazonensis</i>	2	49-99	-
	<i>L. braziliensis</i>	2	35-77	24
	<i>L. infantum</i>	7	40-70	-
	<i>L. infantum</i>	7	7.5-45.0	-
	<i>L. tropica</i>	7	7.5-30.0	25
	<i>L. donovani</i>	3	1.8-28.0	26
	<i>L. donovani</i>	3	14.0-18.0	27
	<i>L. infantum</i>	2	40-100	28
				29
RAW264.7	<i>L. infantum</i>	2	10-50	-
	<i>L. infantum</i>	2	7.4-7.9	
				30
J774	<i>L. mexicana</i>	3	29.0	
				31
U937	<i>L. panamensis</i>	3	1.6 to 10	32
	<i>L. panamensis</i>	3	7.0-14	

Various *Leishmania* species can be grown *in vitro* as amastigotes under axenic conditions [33, 15]. The determination of drug activity is simple, typically inexpensive and does not require host cells, which makes standardization easier [34]. Various studies showed that protein expression in axenic amastigotes is not different from the intracellular ones. In addition axenic amastigotes seems much more infective and grow easily that those isolated from macrophages derived cells. Finally, not all *Leishmania* species, however, are amenable to being cultured in axenic conditions. Currently, no extensive studies using axenic amastigote systems have been performed to evaluate the antimony susceptibility of field isolates.

The usefulness of promastigotes to ascertain the antimony susceptibility status of *Leishmania* field isolates has been debated. Because promastigote forms are not very susceptible to pentavalent antimony, trivalent antimonial forms are used. Unfortunately, the susceptibility of promastigotes to trivalent forms of antimony does not always reflect the

sensitivity of intramacrophagic amastigotes to pentavalent antimonial formulations [25, 35, 36, 37]. Nevertheless, various experimental reports that used *L. tropica* [18], *L. infantum* [38] or *L. donovani* [21] support the notion that promastigote trivalent antimony susceptibility partially reflects the intrinsic amastigotes SbV susceptibility in macrophages. Because the host cell is omitted in tests that use promastigote forms, we hypothesized that the discrepancies observed between experiments might reflect the differential role of the host-derived microbicidal factors involved in the SbV-induced intracellular killing. Most of these factors (either drug or host-derived) are currently identified, but tests aimed at simultaneously ascertaining the intrinsic susceptibility of Leishmania promastigotes to the molecules known to play a role in the antileishmanial action of antimonials might be more representative.

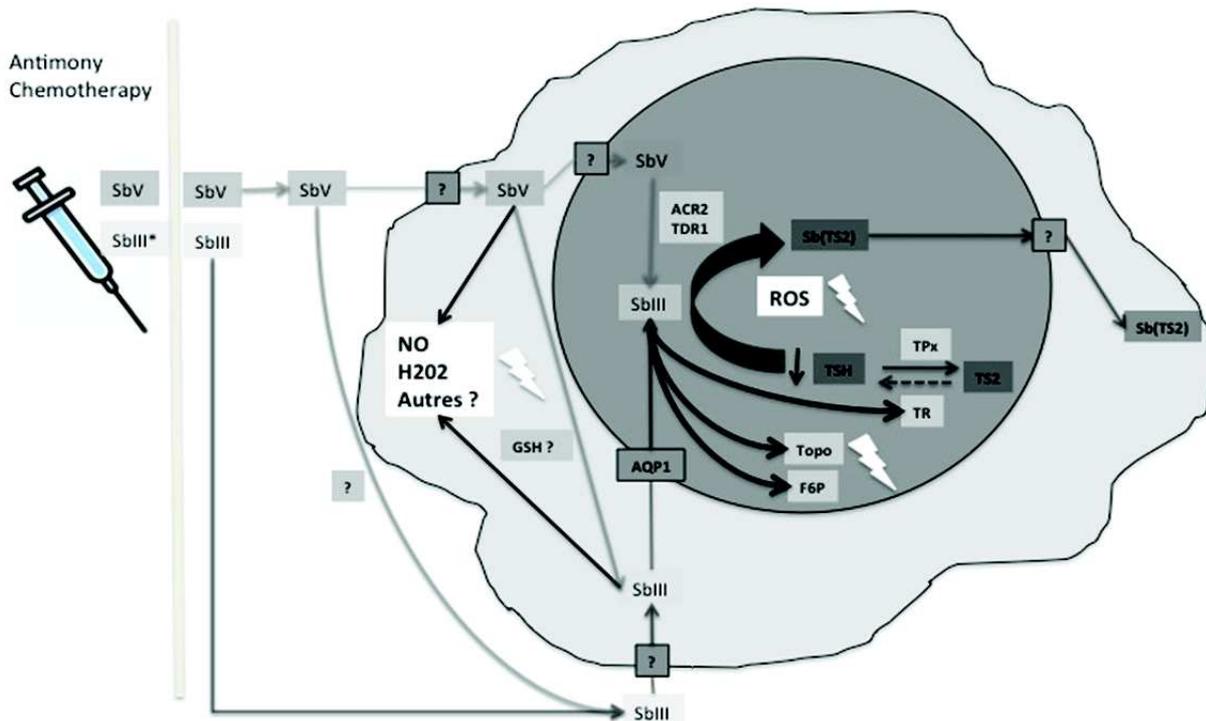
## 2.2. Biomarkers for antimony resistance

The search for resistance biomarker is based on the in-depth understanding of the antileishmanial mode of action of antimony (see figure 1) and resistance associated with *in vitro* selection [39]. Studies on the intracellular mode of action of SbIII demonstrates that thiol buffer capacity of Leishmania is deeply affected by SbIII, through the inhibition of the trypanothione reductase [40] and via a diminution in the intracellular thiol content through an efflux mechanism yet unidentified [41]. These two mechanisms combine to profoundly compromise the thiol redox potential in drug-sensitive parasites and lead ultimately to the accumulation of reactive oxygen species ROS [41, 42]. Many of the specific genes associated with resistance to antimony have been discovered.

These mechanisms generally involved:

- limiting antimony entry to the cell. The entry of Sb(III) occurs through an AQP1 transporter [43], but the route of entry of Sb(V) is currently not identified.
- increasing the expression of the target. Sb(III) inhibits the Trypanothione reductase activity leading to an accumulation of reduced form of trypanothione. Overexpression of the Trypanothione reductase has been characterized in antimony resistant field isolates [44] with some exception [45].
- decreasing the activation of the prodrug form of Sb (i.e., Sb(V)) to the active form Sb(III). This function is assumed by two reductases, TDR1, a thiol dependent reductase, belonging to the Glutathione S-transferase family that shares homology with the *T. cruzi* Tc52 protein [46]. The second reductase characterized, LmACR2, share homology with arsenate reductases [47]. Although, currently, variations in reductase capacity of field isolates of Leishmania resistant to antimony has not been investigated.
- conjugation of drug with thiol containing molecules and sequestration or efflux of the thiol conjugated drug. In Leishmania, the major low molecular mass thiol is trypanothione in contrast with to most other eukaryote organisms, which utilize glutathione. Trypanothione is a glutathione–spermidine conjugate which is formed following several enzymatic steps, via the synthesis of glutathione (GSH) and its subsequent conjugation to spermidine. Steps in the synthesis of spermidine involved ornithine decarboxylase (ODC) and spermidine synthase. The first step in the biosynthesis of GSH is catalyzed by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) and glutathione synthase. The conjugation of GSH to spermidine in the following step is then catalyzed by trypanosome specific enzymes, the glutathionyl-spermidine synthetase and the trypanothione synthase. Therefore the overexpression of genes that leads to an increase in the intracellular level of reduced trypanothione (T(SH)<sub>2</sub>), induces resistance towards SbIII [48]. The Sb–trypanothione conjugate that is formed inside the parasite cell is then sequestered within a vacuole by the intracellular ABC transporter MRPA [49].

Mutations associated with resistance represent molecular tools largely applied for drug resistance surveillance. As an example, the prevalence of some single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with *Plasmodium* susceptibility is often a good indicator of the level of clinical resistance in a population [50]. Unfortunately, currently no SNPs for genes known to be involved in antimony resistance have been proved to be indicative of antimony resistance in field isolates. In fact, in Leishmania, upregulation of resistance genes is frequently associated with genomic rearrangements, which lead to gene amplification through homologous recombination between repeated sequences [49].



**Fig. 1** Schematic representation of the proposed mode of action of SbV containing drugs. Even if trivalent form of antimony is considered as the active form of commercially available pentavalent antimony compounds, host-derived molecules also play a role in the antileishmanial activity of Sb(V) *in vivo*. Both species of antimony are able to induce the generation of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that are harmful for intracellular parasites. The entry of Sb(V) into the parasite occurs by an unknown transporter, and entry of Sb(III) through AQP1. Once inside the Leishmania, Sb(V) is reduced into Sb(III) by the action of the reductases, ACR2 (an homolog of the yeast arsenate reductase) and TDR1 (Thiol Dependent Reductase). Such reduction can also take place in the host cell (Glutathione can play the role of reducer). Sb(III) can inhibit various enzymes: the topoisomerase (Topo), the fructose-6 phosphatase (F6P) and the trypanothione reductase (TR). Sb(III) interferes with the antioxidant defence of the parasite through inhibition of the trypanothione and the formation of Sb(III)-TSH complex that are actively exported. These actions led to a drastic reduction in TSH and concomitantly to an accumulation of reactive oxidant species (ROS) toxic for Leishmania. Other abbreviations: TPx, Tryparedoxin, TSH, reduced trypanothine; TS2, oxidized trypanothione; Sb(TS)2, conjugate of Sb(III) with trypanothione. \* Trace of Sb(III) can be found in pentavalent antimony formulations [4,10].

Therefore, either quantification of copy number or expression of genes known to be involved in antimony susceptibility should represent good biomarkers for addressing antimony resistance [51]. If some of the above-mentioned mechanisms are effectively encountered in resistant lines from the field any rule could be applied [42, 52, 53], because of the presence of additional unrelated and less specific mechanisms [21, 26], or because of other yet unidentified mechanisms of resistance [31].

Recent metabolomic approaches have been used to investigate parasites displaying different susceptibilities to antimony. Interestingly, a hierarchical clustering approach (antimony resistant and susceptible) revealed that differences in the metabolite abundance profiles of the drug-resistant and -sensitive clones could clearly be distinguished. The sample size of this experiment, however, was not large enough to conclusively detect drug-resistant parasites [54]. The extensive procedures involved in culturing the parasites, the high cost, the large amount of time required and the need for highly skilled individuals to perform the metabolomic analysis limit its usefulness for antimony susceptibility surveys, but metabolomic studies might provide information on new metabolic markers for monitoring Leishmania resistance.

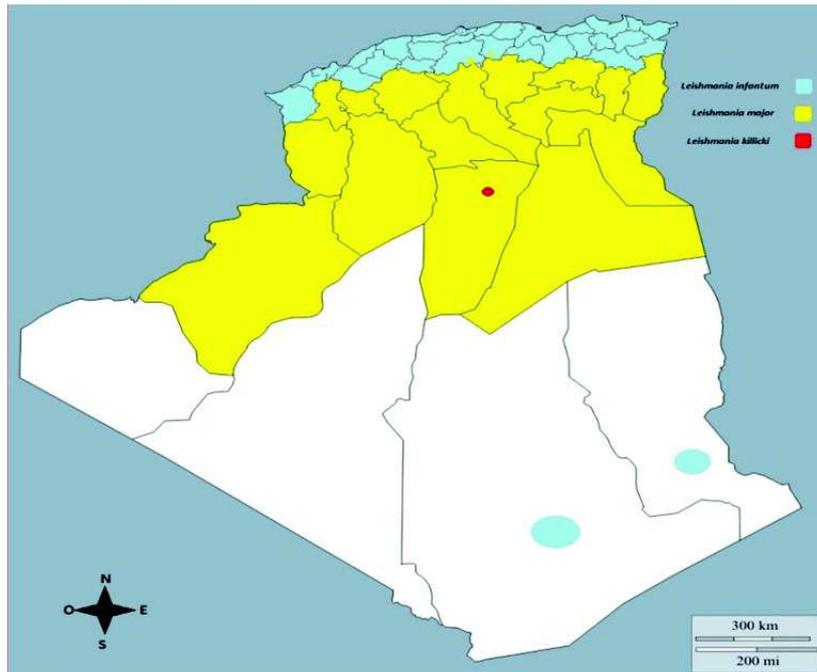
### 3. Human leishmaniasis in Algeria: antimony therapy and resistance

In Algeria, leishmaniasis remains a major public health problem. The population at risk is estimated to be more than 7 millions of persons. Two clinical forms are mainly prevalent.

### 3.1. Cutaneous leishmaniasis

Three distinct clinical forms are encountered according to bioclimatic stages of Algeria. As shown in the Fig.2, in the Sahara and the highland regions, the zoonotic forms, caused by *L. major* (ZCL), affect more than 30.000 peoples and have an incidence of 93.6 per 100.000 inhabitants). The region of Biskra, Batna and M'sila accounted for more than 88% of the total cases recorded in the country [55]. Overall, Algeria is one of the most affected country of the Old World, Afghanistan being the country where the disease is the more prevalent [56]. Only two variants of *L. major*, zymodeme MON-25 and zymodeme MON-269 are reported in Algeria [57, 58]. The vector for *L. major* is *Phlebotomus papatasi* [59] and the wild rodents, *Psammomys obesus* and *Meriones shawi* are the main reservoir hosts [60, 61]. Recently, a spread of *L. major* from the arid zones in the south towards the semi-arid zones of the northern part of the country was reported, such that new ZCL foci were currently found in the country [62].

In the southern part of the country and particularly in the oasis of Ghardaia, the chronic form of cutaneous leishmaniasis due to *L. killicki* is present. *L. killicki* belongs to the *L. tropica* complex and generally occurs in sympatry



**Fig. 2** Geographical distribution of *Leishmania infantum*, *L. major* and *L. killicki* in Algeria (Photo Dr Harrat Z, IPA)

with *L. major* [63]. The annual incidence of this form of cutaneous leishmaniasis is currently unknown but is estimated to be less than 100 cases per year. The proven vector of *L. killicki* is *Phlebotomus sergenti* [64] and the suspected reservoir host is *Masouretiera mzabi*, a rodent close to *Ctenodactylus gundii* that has been found naturally infected with *L. killicki* in Tunisia [65]. In the northern part of the country a zoonotic cutaneous form of leishmaniasis, caused by *L. infantum*, is sporadic. The average incidence is of 200 new cases each year. Three different zymodemes of *L. infantum* have been shown to cause cutaneous leishmaniasis [57]. The proven vector is *Phlebotomus perfiliewi* [66] and dogs are the main reservoir of *L. infantum* MON-24, the latter is the most frequently isolated in patients or canids [67].

### 3.2. Visceral leishmaniasis

Visceral form of leishmaniasis occurs mainly in the northern part of the country. The disease is caused by *L. infantum* and an average of 150 new cases are recorded. The active VL foci are located in the region of Kabylie in the north of the country and in the east, the department of Jijel and Constantine. Cases are also reported in the south, in Tassili N'ajjer and Hoggar mountains in Illizi and Tamanrasset respectively. The vector is *Phlebotomus perniciosus* and canids, dogs and jackals are the main reservoir [57, 68]. The mortality rate caused by the disease is still high with 6% of total cases that affect mainly children and immunocompromised adults [69].

### 3.3. Treatment and drug-resistance

Pentavalent antimonial compounds remain the first line treatment against both cutaneous and visceral forms of leishmaniasis, in North Africa. However, its efficiency is currently threatened by the emergence of antimony resistance. In Algeria, the protocol for the treatment of CL recommended by the Ministry of Health is 20 mg/kg/day for 15 days by intramuscular injection in case of multiple lesions or if the lesion is located on the face. For single lesion the Ministry of Health recommends the intradermic (intralesional) administration 1.5 to 2 ml of Glucantime twice per week for 4 weeks. Alternative therapy like the use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol or the use of cryotherapy is also recommended. For VL, the

treatment regimen applied is the one recommended by the World Health Organization. It consists in the intramuscular injection of 20 mg Sb(V)/kg/day, for 28 days. In case of unresponsiveness, intravenous perfusion of amphotericin B (Fungizone®) in a dose of 1 mg/kg/day for 15 days is used.

Patients with ZCL lesions unresponsive to Sb(V) treatment, have been previously reported in Algeria, in the focus of M'sila in 1986. The ninety-seven children, who received 60 mg/kg/day of meglumine antimoniate for 15 days, did not show any significant response to treatment compared to those receiving placebo. The use of *in vitro* tests using mouse peritoneal macrophages have confirmed that strains of *L. major* isolated from these children displayed a low susceptibility. In fact, isolates from unresponsive patients were less susceptible to Sb(V) antimony as compared to control parasites. The IC<sub>50</sub> values range from 18 µg/ml to 52 µg/ml and were significantly higher than the IC<sub>50</sub> of the reference *L. donovani* strain (6 µg/ml) [70]. Several cases of VL or CL patients unresponsive to antimony treatment are currently registered in various areas of Algeria. These observations prompted to initiate studies aimed to assess the *in vitro* antimony susceptibility of amastigote forms for *L. major*, *L. tropica* and *L. infantum* isolated from different patients. We observed that all strains isolated before treatment were resistant towards antimony, and that a course treatment did not reduce the parasite load of the patients [Harrat et al., manuscript in preparation]. Furthermore, parasites isolated from wild rodents (*Psammomys obesus* and *Meriones shawi*) were found resistant in *in vitro* test [Harrat et al., personal communication]. All these observations support the occurrence of a primary resistance in strains endemic in Algeria. Primary resistance is distinct from the secondary ones that is induced by the treatment.

Overall, little is known about the incidence of antimony resistance in endemic foci of Algeria or of other countries from Northern Africa. This information will be crucial for addressing the risk of selection and transmission of drug-resistant parasites, particularly in areas where antimony is the main chemotherapeutic alternative like in Algeria.

## 4. Canine leishmaniasis in Algeria: epidemiology, antimony therapy and resistance

### 4.1. Epidemiology

Since 1908, it has been recognised that the dog plays a major role in the life-cycle parasite (*Leishmania infantum*) [71]. Various sandfly species of the genus *Phlebotomus* act as vectors of the parasite [72]. Canine leishmaniasis is a cosmopolitan disease and has a worldwide distribution. It is present in majority in tropical regions, but also in temperate ones of North Africa, Europe and Asia [73], especially in the moist semi-humid areas. The Mediterranean basin is particularly affected by this disease, which has been reported in almost all the countries bordering the Mediterranean, with relatively variable prevalence. The first leishmaniasis case in Algeria was described by the Sergent brothers almost a century ago [74]. Since then, several epidemiological surveys have been carried out in Algeria, with the aim of evaluating the prevalence of the human disease or the associated canine leishmaniasis (CanL). Although the general prevalence of CanL recorded in the country fluctuated below 11% for many years, it has recently increased, reaching 25.1% in 2006 [75], and this apparent increase in the prevalence of canine infection has been accompanied by an increase in the incidence of human leishmaniasis. In the Algiers area, for example, the annual number of cases of human visceral and cutaneous leishmaniasis increased by 12.2% between 1990 and 1997 [76]. As shown in the table 2, until the 1980s, the prevalence of the leishmanial infection among dogs of Algiers has been always found below 10%. It is only in the last decade that the prevalence has markedly increased, with a value superior to 20%. This change may mainly be explained by the concurrent and dramatic environmental changes that have occurred in Algeria, particularly the intense urbanization that took place in recent years. This new urbanization has led to a proliferation in the number of dogs around the houses and the removal of much natural vegetation, possibly driving vectors into peridomestic and intradomestic habitats.

Six zymodemes were identified in Algeria: MON-1, MON-24 in Algiers [67, 75], MON-34 and MON-77 in Grande Kabylie [83] and MON-281 [75]. In some regions in the world, several other types of canids have been found to be parasitized by *L. infantum* and have been incriminated as wild reservoirs. Infection was described in the jackal *Canis aureus* [86] the fox *Vulpes vulpes* [87], the fennec *Fennecus zerda* [88], the wolf *Canis lupus* [88], the Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon* [89], the European genet *Genetta genetta* and the Iberian Lynx, *Lynx pardinus* [90]. But very few isolates obtained from these wild carnivores were identified by isoenzymes. Other carnivores have been infected in highly endemic areas such as cats *Felis felis* [91].

**Table 2** Prevalence of canine leishmaniasis in Algeria in different surveys from 1910 to 2009

Period of the study	Mean prevalence	References
1910	7,2 %	74
1912	8,8 %	77
1913	2,57 %	78
1949	4,87 %	78
1950	10,5 %	79
1973	2,52 %	80
1986	6,8 %	81
1990-1995	36,5 %	82
2002-2005	18,5 %	83
2006-2009	25,1%	75

#### 4.2. Chemotherapy and drug-resistance

For the veterinarian practitioners, the treatment of canine leishmaniasis remains a problem, given its complex pathogenesis, associated with highly variable clinical signs [92]. All antileishmanial compounds in use to treat in dogs can lead to temporary or permanent remission of clinical signs but no established protocols is effective to eliminate the infection. While therapeutic protocols have evolved the drugs used for treatment haven't changed. In case of a confirmed diagnosis, the practitioner has firstly to worry about the risks of transmission to man and then about chances of curing of the animal [93]. For this reason in Algeria but also in various parts of the world, veterinarian practitioners euthanize dogs diagnosed as positive in order to prevent the spread of the disease to humans. Infected dogs are often treated with the same drug in use to treat human, meglumine antimonate that still remains the main antileishmanial agent. Treatment with antimony is often long and costly, causing toxicity and serious side effects [94, 95]. In dogs, the treatment objectives are: (i) to induce a general reduction of the parasite load, as far as the treated dogs remain infected and potentially infectious to vectors, (ii) to restore an effective immune response, (iii) to stabilize the clinical improvement induced by drugs and delay possible relapses and (iv) to treat clinical relapses. Before considering the long, heavy and costly canine leishmaniasis treatment, two essential characteristics must be taken into account by the veterinary practitioner [95]:(i) the zoonotic nature of the disease: the canine species is in Algeria the reservoir of the parasite. The attitude of clinicians in the field is potentially difficult and has serious consequences; (ii) the persistence of the parasite in the body: Leishmania by complex mechanisms is able not only to resist to diverse processes of destruction developed by macrophages, but also to multiply within these cells. The current treatment of canine leishmaniasis is the association of meglumine antimonate-allopurinol [95, 96].



**Fig. 3** Enzymatic polymorphism of *L. infantum* canine leishmaniasis according to the countries. The highest polymorphism was found in Algeria and Spain. Number correspond to zymodemes MON.

In Algeria, dogs suffering of leishmaniasis are usually not treated; therefore, there are no available data on treatment efficiency. The selection of resistant strains to antimony has been documented in dogs [97] in the occidental part of the Mediterranean basin where dogs are commonly treated with meglumine antimonate. Recent study highlights the possibility of the occurrence of a natural resistance to antimonials for *L. infantum* MON-281 [38]. This observation requires confirmation with a clinico-epidemiological study to determine the prevalence and the antimony susceptibility of this zymodeme in the canine population. Unfortunately, in most parts of the world, no information is available on

Leishmania antimony susceptibility. This information is crucial for addressing the risk of selection and transmission of drug-resistant parasites, particularly in areas where antimony is the only chemotherapeutic alternative. The zoonotic potential of Canine leishmaniasis, lack of a parasitological cure, and the reported occurrence of parasitic resistance to pentavalent antimonials [98] indicates that it would be best to avoid or minimize the use of the same drugs for therapy of canine and human leishmaniasis. The recent finding that the selection for antimony resistance confers fitness advantages will likely result in the prioritization of studies aimed to understand better the antimony susceptibility of Leishmania parasites [99, 100].

## 5. Ongoing researches on Leishmania antimony resistance in Algeria

### 5.1. Transmission associated risks of antimony resistant Leishmania parasites

In Algeria, Sb(V) resistant *L. major* and *L. infantum* have been isolated from unresponsive patients and reservoirs (dogs) [38, 70]. Despite reliance on antimonials, high treatment failure rates, up to 66% is suspected in Algeria [Harrat, unpublished data]. The emergence of antimonial therapy failure linked to proven parasite resistance has stressed questions about selective factors as well as transmission risk of drug resistance. The poor knowledge about factors that favor selection of resistant parasites and the multiplicity of the agents that can play a role in the *in vivo* antileishmanial activity of antimony, contribute to insufficient monitoring of antimony resistance. To assess the relative fitness of an antimony-resistant Leishmania in relation to its drug-sensitive counterpart, we choose a field-based approach that will compare the prevalence of both phenotypes between three decades, over which fitness differences can become evident. We think that it will be the most adequate manner to assess the relevant natural fitness of both phenotypes, the former is essential to study each of the fitness components in more detail and to understand why the relative fitness between phenotypes differs, e.g. due to differences in survival, reproduction or transmission [99, 100].

### 5.2. Insights into the mechanisms of drug-resistance and identification of resistance markers

Upregulation of genes involved in drug resistance is frequently associated with genomic rearrangement, that lead to gene amplification [49]. Therefore, either quantification of copy number or expression of genes known to be involved in antimony susceptibility should represent good biomarkers for addressing antimony resistance [101]. However, the multifactorial origin of antimony resistance makes the analysis at a single gene level only partially indicative of the antimony status of the parasite. The search for biomarker should therefore include both the analysis of potential genetic mutations and of changes in transcript expression and/or protein expression level. The analysis of genetic mutations is now more easily amenable due to the development of new sequencing technologies. As an example, the whole genome sequencing of 17 *L. donovani* strains from Nepal (10 susceptible and 7 resistant), was recently performed [102]. This study identified 4 different groups of resistant parasites that carried specific SNPs. This observation implies that resistance might have multiple origins and highlights the need of a multilocus approach to identify candidate genetic markers of antimony resistance. In Leishmania, both gene expression level and mutations associated with antimony resistance, can be analyzed through global RNA sequencing analysis. RNA seq also called “Whole Transcriptome Shotgun Sequencing” refers to the use of high throughput sequencing technologies to sequence cDNA in order to get information about a sample's RNA content and polymorphism, a technique that is quickly becoming invaluable in the study of various diseases. Thanks to the deep coverage and base level resolution provided by next generation sequencing instruments, RNA-seq provides researchers with efficient ways to measure transcriptome data experimentally, allowing them to get information such as how different alleles of a gene are expressed, detect post-transcriptional mutations or identify gene fusions. This might be of some help to identify potential molecular marker indicative of the Leishmania susceptibility.

Proteomics has yield significant insight into mechanisms associated with: the stage differentiation process of *Leishmania*, the species differences, virulence determinants or drug resistance pathways [103]. A major focus has been the capability to conduct comparative analysis for the identification of new and specific biomarkers of drug resistance. The production of large-scale proteomic data sets has been made possible by technological advances in mass spectrometry, combined with the availability of the complete genome sequences of various Leishmania species, including *L. infantum*. Comparative studies of isolates harboring distinct drug resistance phenotypes will help to dissect the complexity of drug resistance pathways [21, 104, 107]. As an exemple, the comparative analysis of genetically pairs of antimony sensitive and resistant *L. donovani* strains isolated from VL patients have highlighted a number of differentially regulated proteins of them. Two proteins, HSP83 and the small kinetoplastid calpain related proteins, were implicated in the drug resistant cell death phenotype [21]. The comparative proteomic analysis of a genetically related pair of *L. infantum* selected *in vitro* for their resistance towards Sb(III) has highlighted a number of proteins differentially expressed in resistant parasites. A higher level of the enzyme argininosuccinate synthetase (ARGG) was observed in drug resistant mutants while a decrease in the expression of the kinetoplastid membrane protein (KMP-11) correlated with the drug resistance phenotype [105]. Currently all these approaches are applied to antimony resistant strains isolated in Algeria with the aim to develop molecular and/or biological marker of antimony resistance.

## 6. Conclusions

Leishmaniasis is not the priority in the agenda of pharmaceutical companies: because the prevalent one, *ie* cutaneous leishmaniasis is not fatal and it is endemic mostly in developing countries that do not represent a profitable market. It is thus becoming very difficult today to convince decision makers to fund antileishmanial drug innovation. So, one would have to focus on research and development of new tools aimed to diagnose drug resistance earlier. In Algeria, the antimonial therapy failure linked to proven parasite resistance stresses questions about selective factors and of transmission risk associated with drug resistance. However, research on *Leishmania* drug resistance remains dependent on: the availability of information of patients refractory to antimonial therapy, the availability of isolates before and after treatment particularly for patients with VL, the use of a standardized technique for the screening of the susceptibility phenotype and finally in the training of personnel on tests for the detection and the analysis of *Leishmania* drug resistance. For all that the development of resistance biomarkers is urgently needed.

**Acknowledgements** NE is supported in part by grants from IRD (BEST 2012) and from the « Agence Nationale du Développement de la Recherche en Santé (ANDRS) » (PNR N° 08/ANDRS/2011). DS and BO are supported by grants from the “Département valorisation sud” (DVS-IRD, AAP Leishmed).

## References

- [1] Croft SL, Sundar S, Fairlamb A. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19:111-126.
- [2] Cardenas CM, Sandoval CM, Rofiguez-Morales AJ, Vivas P. Zoonoses and climate variability. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1149:326-330.
- [3] Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pralong F, Balard Y, and Dedet JP. The potential effects of global warming on changes in canine Leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vect Born & Zoonotic Dis*, 2009. 9:687-694.
- [4] Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*. 2008;103:1-10.
- [5] Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral Leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8:919-944.
- [6] Murray MW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2010 : direction from Bihar state, India. *Future Microbiol* 2010;5:1301-1303.
- [7] Vanlerberghe V, Diap G, Guerin PJ, Meheus F, Gerstl S, Van der Stuyft P, Boelaert M. Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. *Trop Med Int Health*. 2007;12:274-283.
- [8] Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001;6:899-905.
- [9] Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, De Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin JC, Arevalo J, Chappuis F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 2008;46:223-231.
- [10] Lukaszczuk L and Zyrnicki W. Speciation analysis of Sb(III) and Sb(V) in antileishmaniotic drug using Dowex 1 x 4 resin from hydrochloric acid solution. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;52:747-51.
- [11] Berman JD. *Leishmania tropica*: quantitation of *in vitro* activity of antileishmanial agents by Giemsa staining, viability, and 3H-formycin B incorporation. *J Parasitol*. 1984;70:561-562.
- [12] Seifert K, Escobar P, Croft SL. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:508-511.
- [13] Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft SL, Frommel D. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Trop*. 1992;51:237-245.
- [14] Sereno D, Roy G, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1168-1173.
- [15] Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu Daudet F, Ouassiss A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int*. 2007;56:3-7.
- [16] De La Llave E, Lecaœur H, Besse A, Milon G, Prina E, Lang T. A combined luciferase imaging and reverse transcription polymerase chain reaction assay for the study of *Leishmania* amastigote burden and correlated mouse tissue transcript fluctuations. *Cell Microbiol*. 2011;13:81-91.
- [17] Lang T, Lecaœur H, Prina E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol*. 2009;25:464-473.
- [18] Hadighi R, Moheballi M, Boucher P, Hajjaran H, Kamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med*. 2006;3:e162.
- [19] Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, Ouellette M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis*. 2009;48:e16-22.
- [20] Antoniou M, Douglerakis C, Pralong F, Dedet JP, Tselentis Y. Treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:71-72.
- [21] Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6:88-101.

- [22] Ayres DC, Pinto L, Gioglio S. Efficacy of pentavalent antimony, amphotericin B, and miltefosine in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages under normoxic and hypoxic conditions. *J Parasitol.* 2008;94:415-1417.
- [23] Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010;15:68-76.
- [24] Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:827-830.
- [25] Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999;180:564-567.
- [26] Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. *In vitro* susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:835-838.
- [27] Vouldoukis I, Rougier S, Dugas B, Pino P, Mazier D, Woehrlé F. Canine visceral leishmaniasis: comparison of *in vitro* leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol.* 2006;135:137-146.
- [28] Carrio J, Riera C, Gallego M, Portus M. *In vitro* activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. *Acta Trop.* 2001;79:179-183.
- [29] Carrio J and Portus M. *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol.* 2002;2:11.
- [30] Callahan HL, Portal AV, Devereaux R, Grögl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:818-822.
- [31] Rojas R, Valderama L, Valderama M, Verona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006;193:1375-1383.
- [32] Goyeneche-Patino DA, Valderama L, Walker J, Saravia NG. Antimony resistance and trypanothione in experimentally selected and clinical strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:4503-4506.
- [33] Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of Leishmania. *Trends Parasitol.* 2001;17:150-153.
- [34] Sereno D, and Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. *Parasitol Res.* 1997;83:401-403.
- [35] Yardley V, Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility?. *J Infect Dis.* 2006;194:1168-1175.
- [36] Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M, Kenney RT. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:193-196.
- [37] Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3855-3859.
- [38] Ait-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. *In vitro* susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol.* 2012;187:386-393.
- [39] Ashutosh S, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. *J Med Microbiol.* 2007;56:143-153.
- [40] Cunningham ML and Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem.* 1995;230:460-468.
- [41] Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004;279:39925-39932.
- [42] Mandal G, Wyllie S, Singh N, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology.* 2007;134:1679-1687.
- [43] Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania. *Mol Microbiol.* 2005;57:1690-1699.
- [44] Mittal MK, Rai S, Ashutish R, Gupta S, Goyal N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:681-688.
- [45] Wyllie S, Mandal G, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M. Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;173:162-164.
- [46] Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J.* 2004;381:405-412.
- [47] Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confer sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem.* 2004;279:37445-37451.
- [48] Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.* 1997;16:3057-3065.
- [49] Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1387-1399.
- [50] Anderson T, Nkhoma S, Ecker A, Fidock D. How can we identify parasite genes that underlie antimalarial drug resistance? *Pharmacogenomics.* 2010;12:59-85.

- [51] Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol.* 2008;9:R115.
- [52] Aduai V, Schnorbusch K, Zimic M, Gutiérrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, DE Doncker S, Maes I, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Arévalo J, Dujardin JC. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different *in vitro* susceptibility to pentavalent antimony. *Parasitology.* 2010;3:1-11.
- [53] Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:204-211.
- [54] t'Kindt R, Scheltema RA, Jankevics A, Bruncker K, Rijal S, Dujardin JC, Breitling R, Watson DG, Coombs GH, Decuypere S.. Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:ep.904.
- [55] Relevé Epidémiologique Mensuel (REM). Institut National de Santé Publique. <http://www.andrs.dz/insp/rem.html>.
- [56] den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1471-1477.
- [57] Harrat Z, Pratlong F, Belazzoug S, Dereure J, Deniau M, Rioux JA, Belkaid M, Dedet JP. *Leishmania infantum* and *leishmania major* in Algeria *Trans R Soc Trop Med and Hyg.* 1996; 90:625 – 629.
- [58] Pratlong F, Dereure J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G, Lanotte G, Rioux JA, Dedet JP.. Geographical distribution and epidemiological features of Old World leishmaniasis foci based on the isoenzymes analysis of 1048 strains. *Trop Med Inter Health.* 2009;14:1071-1078.
- [59] Izri MA, Belazzoug S, Pratlong F, Rioux JA. Isolement de *L major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra ( Algérie). Fin d'une épopée eco-épidémiologique. *Ann Parasitol. Hum. Comp.* 1992;67: 31-32.
- [60] Belazzoug S. Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretzschmar, 1928 (*Rodentia, Gerbillidae*) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:878.
- [61] Belazzoug S. Découverte d'un *Meriones shawi* (Rongeur, Gerbillidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de Ksar Chellal (Algérie). *Bull Soc Pathol Exot.* 1986;105:5-7.
- [62] Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi I, Benbetka S, Bouiba L, Boubidi SC, Benikhlef R, Arrar L, Hamrioui B, Harrat Z.. Extension de *Leishmania major* au Nord de l'Algérie. *Bul Soc Path Ex.* 2012;105:30-35.
- [63] Harrat Z, Boubidi SC, Pratlong F, Benikhlef R, Selt B, Dedet JP, Ravel C, Belkaid M.. Description of *Leishmania* close to *L killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986) in Algeria; *Trans R Soc Trop Med and Hyg.* 2009;103:716-720.
- [64] Boubidi SC, Benallal K, Boudrissa A, Bouiba L, Bouchareb B, Garni R, Bouratbine A, Ravel C, Dvorak V, Votypka J, Volf P, Harrat Z. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* hosts in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes and Infection.* 2011;13:691-696.
- [65] Jaouadi K, Haouas N, Chaara D, Gorcii M, Chargui N, Augot D, Pratlong F, Dedet JP, Ettlijani S, Mezhoud H, Babba H. First detection of *Leishmania killicki* ( Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* ( Rodentia, Ctenodactilidae) a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & Vectors.* 2011;4:159.
- [66] Izri A and Belazzoug S. *Phlebotomus (Larrousius) perfiliewi* naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:399.
- [67] Benikhlef R, Harrat Z, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali-Braham S, Belkaid M. Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Médecine tropicale.* 2004;64:381-383.
- [68] Bessad A, Mouloua K, Kherrachi I, Benbetka S, Benikhlef R, Mezai G, Harrat Z.. *Leishmania infantum* MON-1 isolated from a golden jackal (*Canis aureus*) in Grande Kabylie (Algeria). *Bull Soc Pathol Exot,* 2012;105:5-7.
- [69] Zait H, Ferhani Y, Achir I, Hamrioui B.. Study of 71 cases of visceral leishmaniasis diagnosed at the Mustapha University Hospital (Algiers) from 1998 to 2009. *Médecine et maladies infectieuses.* 2012;42:119-125.
- [70] Belazzoug S and Neal RA, Failure of meglumine antimoniate to cure cutaneous lesions due to *L. major* in Algeria. *Trans. R. Soc Trop. Med Hyg.* 1986, 80:p.670-671.
- [71] Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007;149:139-146.
- [72] Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 1999;17:279-289.
- [73] Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J.. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88.
- [74] Sergeant ED and Sergeant ET. Kala-Azar . Existence de la leishmaniose chez les chiens d'Alger. Première note . *Bull Soc Pathol Exot.* 1910;3:510-511.
- [75] Ait-Oudhia K, Lami P, Lesceu S, Harrat Z, Hamrioui B, Dedet JP, Pratlong F. Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009;103:679-692.
- [76] Harrat Z, and Belkaid M. Leishmaniasis in Algiers: epidemiologic data. *Bull Soc Pathol Exot.* 2003;96:212-214.
- [77] Sevenet G. Sur la fréquence de la leishmaniose canine à Alger et ses variations saisonnières. *Bull Soc Pathol Exot.* 1912;5:89-91
- [78] Lemaire G. Premier cas de Leishmaniose algérienne. *Bull Soc Pathol Exot.* 1911;4:554-563.
- [79] Loufrani G. Les caractères épidémiologiques du Kaala-azar dans le monde. Contribution à l'étude de la leishmaniose générale du chien à Alger, 1949, Thèse de Pharmacie. Université d'Alger, 94p.
- [80] Poul J. Sur la fréquence de la leishmaniose canine à Alger et sur la valeur diagnostic de la formol-gélification. *Arch Inst Pasteur. Algérie.* 1950;28:449-456.
- [81] Dedet J, Osman FB, Chadli A, Croset H, Rioux JA. Leishmaniasis in Tunisia. Sero-immunological survey about the frequency of infestation. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1973;48:653-660.
- [82] Belazzoug, S. *Leishmania infantum*, causative organism of visceral leishmaniasis at Biskra (Algeria). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80:1002-1003.

- [83] Harrat Z, Addadi K, Belkaid M, Tabet-Derraz O. Visceral leishmaniasis in Algeria. Cases reported of visceral leishmaniasis (1985-1990). *Bull Soc Pathol Exot.* 1992;85:296-301.
- [84] Djerbouh A, Toudjine M, Djoudi M, Benikhlef R, Harrat Z. La leishmaniose canine à Alger. Essai de traitement par l'allopurinol. *Ann Med Vet.* 2005;149:132-134.
- [85] Aït-Oudhia K, Harrat Z, Benikhlef R, Dedet JP, Pratlong F. Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Trop.* 2011;118:80-86.
- [86] Nadim A, Navid-Hamidid A, Javadian E, Bidruni GT, Amini H. Present status of kala-azar in Iran. *Am J Trop Med Hyg.* 1978;27:25-28.
- [87] Rioux JA. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 2. Selvatic reservoirs. Spontaneous infestation of the fox (*Vulpes vulpes* L.). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1968;43:421-428.
- [88] Conroy JD, Levine ND, Small E. Visceral leishmaniasis in a fennec fox (*Fennecus zerda*). *Pathol Vet.* 1970;7:163-170.
- [89] Elnaïem DA, Hassan MM, Maingon R, Nureldin GH, Mekawi AM, Miles M, Ward RD. The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology.* 2001;122:531-536.
- [90] Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol.* 2008;155:198-203.
- [91] Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.* 2007;145:267-273.
- [92] Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 1997, 141:539-543.
- [93] Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008;24: 371-377.
- [94] Noli C and Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol.* 2005;16:213-232.
- [95] Denerolle P and Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med.* 1999;13:413-415.
- [96] Vercammen F and De Deken R. Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. *Vet Rec.* 1995;37:252.
- [97] Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992;86:613-620.
- [98] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:111-126.
- [99] Vanaerschot M, et al. Linking *in vitro* and *in vivo* survival of clinical *Leishmania donovani* strains. *PLoS One.* 2010;5:e12211.
- [100] Ait-Oudhia K, Gazanion E, Oury B, Vergnes B, Sereno D. The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: lessons from the field. *Trends Parasitol.* 2011;27:141-142.
- [101] Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schönian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res.* 2011;21:2143-2156.
- [102] Paape D and Aebischer T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *J Proteomics.* 2011;74:1614-1624.
- [103] Drummel-Smith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:146-155.
- [104] Hajjaran H, Azarian B, Mohebbi M, Hadighi R, Assareh A, Vaziri B. Comparative proteomics study on meglumine antimoniate sensitive and resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian anthroponotic cutaneous leishmaniasis patients. *East Mediterr Health. J.* 2012;18:165-171.
- [105] El Fadili K, Drummel-Smith J, Roy G, Jardim A, Ouellette M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Exp Parasitol.* 2009;123:51-57.