

I- Identification de l' agent pathogène:

1-1- Critères d'identification:

Les méthodes d'identification font simultanément appel à des caractères extrinsèques tels que (manifestation clinique distribution géographique, cycle épidémiologique) et à des caractères intrinsèques et plus particulièrement biochimique, est l'analyse des iso enzymes par électrophorèse. A l'heure actuelle cette méthode constitue la méthode de référence en matière d'identification, cependant de nouvelles techniques sont constamment mise au point (Pratlong et Lanotte, 1999).

Tableau01: Critères d'identification des leishmanies (pratlong et Lanotte, 1999)

Critères d'identification	
I) Critères pathologiques	a) Manifestation clinique b) Syndromes des affection
II) Critères biologiques	
2.1) Caractères morphologique	a) Différence de la taille des formes biologiques (microscopie photonique) b) Diamètre des cellules et nombre des microtubules (microscopie électronique)
2.2) Caractères cultureux :	a) Critères de croissance .b) Besoin métabolique c) Besoin de température
2.3) Comportement chez l'animal de laboratoire	a) Infectivité et dissémination
III) Critères épidémiologique	a) Spécificité de l'hôte réservoir b) Spécificité de l'hôte vecteur c) Distribution géographique .
IV) Critères immunologique et sérologique	a) Test de nogachi Adler b) Sérotypage des facteurs excrétés c) Utilisation d'antisérum polyclonaux
V) Critères biochimiques	a) Radioréspirométrie b) Agglutination par les léctines. c) Caractérisation des isoenzymes
VI) Critères moléculaires	a) Densité de flottaison de l'ADN b) Analyse des restriction RFLP c) Technique d'hybridation PCR

1-2- Techniques d'identification:

Le diagnostic parasitologique est nécessaire pour la confirmation de la LC (par grattage des lésions ou aspiration avec une aiguille sur le bord des lésions) car ni l'examen clinique ni la sérologique ne sont suffisants (OIE, 2005).

Plusieurs techniques sont maintenant utilisées dans beaucoup de centres pour identifier les différentes espèces de *Leishmania*, sous-espèces ou souches, parmi les quelles (Séridi, 1998).

1-2-1- La technique des anticorps monoclonaux (AcM):

Est appliquée à l'analyse et la classification des espèces et des sous-espèces de *Leishmania* du Nouveau et du Vieux Monde. Pour la production des anticorps, des souris BALB/c sont immunisées avec des préparations de membrane à partir soit des promastigotes soit des amastigotes. Les cultures d'hybridome sécrétant les anticorps sont ensuite sélectionnées et clonées par des dilutions limites. La spécificité des souches de *Leishmania* est évaluée grâce à des essais d'immunofluorescence ou d'immunoradiométrie. Cette analyse doit être quantitative, car la quantité du même antigène de surface peut varier parmi les espèces de *Leishmania*. Les anticorps monoclonaux ont aussi été utilisés dans des techniques d'immunohistochimie appliquées sur des biopsies de tissu (OIE, 2005).

1-2-2- L'utilisation de l'ADN:

Dans le domaine des *leishmania*, il a été d'un grand apport pour la distinction des nombreux agents causaux des différentes pathologies leishmaniennes.

Les sondes d'hybridation de l'ADN sont un outil prometteur dont le principe est de permettre de marquer, des séquences d'ADN du kinétoplaste ou nucléaires simple brin à partir de souches standards bien caractérisées pour trouver et hybrider avec des séquences d'ADN homologues à partir ou dans des isolats de *Leishmania* inconnu. Seules des séquences d'ADN complémentaires formeront de l'ADN double brins, qui peut être détecté par autoradiographie si la sonde est marquée, ou par réaction immuno-enzymatique. Ces techniques sont assez sensibles pour identifier des organismes repérés sur filtres de nylon. Beaucoup moins de parasites (< 10) sont nécessaires pour l'identification par la technique d'hybridation in situ (Séridi, 1998).

1-2-3- Identification moléculaire par PCR séquençage:

La technique de référence reste l'identification enzymatique qui permet de trouver l'espèce et le zymodème en cause. Actuellement, la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) d'utilisation récente permet une approche de l'identification d'espèce directement

sur le prélèvement (Mahjour, 1997). C'est une identification moléculaire réalisée au CNRL depuis fin 1998. Elle est basée sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique d'une région de 1265 pb du gène de la ARN polymérase II, à partir d'un travail original de Croan et *al.*, (1997).

L'intérêt de cette approche, qui fait appel aux techniques d'amplification génétique et de séquençage, est d'utiliser des amorces universelles, valables pour toutes les espèces du genre *Leishmania*. Cette méthode a nécessité préalablement le séquençage de cette région pour toutes les espèces de *Leishmania* connues. La banque du CNRL contient 31 espèces différentes de trypanosomatidés, parmi lesquelles 26 appartiennent au genre *Leishmania*. Ce travail a montré qu'il existe un polymorphisme nucléotidique de la région étudiée, permettant de distinguer spécifiquement chacune de ces espèces entre elles (Djezzar-Mihoubi , 2006).

1-2-4- Identification enzymatique:

Cette méthode a comme principal objectif d'identifier la souche responsable de l'infection. Elle est basée sur le principe que chaque profil enzymatique est rattaché au complexe d'une espèce de *Leishmania*. Le typage enzymatique consiste à identifier le profil enzymatique de l'espèce en cause (Amrani et *al.*, 2011).

II- Rappels biochimique le typage isoenzymatique:

2-1- les enzymes :

2-1-1- Définition:

Les enzymes sont des catalyseurs de nature protéique transformant un substrat en un produit, ils possèdent des propriétés les différenciant des catalyseur chimiques: activité plus importante, c'est- à-dire efficacité plus grande et spécificité (Coutouly, 1991); l' activité enzymatique peut être influencé par: (Pelmont, 1993)

- ✓ **PH:** les enzymes ont un PH optimum ou une zone de PH dans la quelle leur activité est maximale.
- ✓ La température
- ✓ La force ionique du tampon
- ✓ La présence de cofacteurs indispensable
- ✓ La durée de la réaction
- ✓ Les activateurs et les inhibiteurs.

2-1-2- Localisation des enzymes in vivo:

Selon leur localisations in vivo les enzymes peuvent être divisé en trois catégories: (Coutouly, 1991).

a- Les enzymes extra cellulaires: qui sont synthétisées à l'intérieur de la cellule ; puis excrétés dans l'espace extracellulaire (cas des hydrolases).

b- Les enzymes intracellulaires: synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule; ils sont on général présents, soit sous forme d'agrégats soit liés ou emprisonnés dans des particules subcellulaire ou membranaire intracellulaire rendant leur isolement plus difficile.

c- Les enzymes périplasmiques situés à l'intérieur du périplasme

2-2- Les isoenzymes:

2-2-1- Définition:

Le terme "isoenzyme" ou "isozymes" a été créé par Markert et Moler 1957 pour désigner toute bande apparaissant au sein d'un système enzymatique donné sur un seul gel. Un système isoenzymatique correspond à l'ensemble des bandes dont chaque bande correspond à une isoenzyme ayant donc des vitesses de migration électrophorétique différentes. Les isoenzymes diffèrent sur le plan structurel par leur composition en sous unités, mais catalysent la même réaction biochimique (Tibayrenc, 1979).

Les isoenzymes se distinguent par leurs propriétés physico-chimiques (Boulanger, 1973).

- La charge électrique.
- PH optimum d'action.
- Thermolabilité.
- Mobilité électrophorétique.
- Comportement vis à vis des inhibiteurs.
- Comportement vis à vis des concentrations variables de substrat.
- Activité en présence d'analogues de coenzymes.

Dans le domaine de la parasitologie, les isoenzymes sont principalement utilisés pour caractériser et distinguer "les souches" de parasites (Ben Abderrazak et *al.*, 1993).

2-2-2- Classification des isoenzymes :

Deux grands groupes sont à distinguer :

2-2-2-1- Isoenzymes unigéniques:

Les différences de structure qu'elles présentent résultent toutes de la modification secondaire que peut subir la chaîne polypeptidique originelle. Harris (1969) distingue deux grands groupes au sein de cette catégorie):

- isoenzymes unigéniques: différant par leur structure primaire (exemples: combinaison à d'autres molécules, perte d'une partie de la molécule).

- isoenzymes unigéniques: différant par leur structure tertiaire ou quaternaire: séries d'isomères de conformation ou « conformers ».

2-2-2- Isoenzymes multigéniques:

Ce sont celles dont la différence de structure répond à une commande génétique différente. On peut séparer deux catégories(Tibayrenc, 1979):

A. Isoenzymes alléliques:

C'est pour elles que Prakash, Lewontin et Hubby (1969) ont forgé le terme d'allozymes ou alloenzymes: enzymes codées par des allèles différents d'un même gène (situé au même locus), séparables par la mobilité électrophorétique.

Les alloenzymes sont en principe impossibles à distinguer par l'immunoélectrophorèse (Ogita, 1968). D'autre part, en général, deux alloenzymes présentent exactement la même spécificité de substrat.

B. Isoenzymes non alléliques:

Chaque isoenzyme résulte de l'action d'un gène propre. Pour un même sujet, la présence de deux isoenzymes multigéniques non alléliques (zymogramme à deux bandes) traduit donc l'action de deux gènes, situés à des loci différents. On peut en général distinguer deux isoenzymes non alléliques par l'immunoélectrophorèse (Ogita , 1968). Ces différences de comportement antigénique trahissent sans doute des différences de structure plus fortes que celles qu'on observe chez les alloenzymes. D'autre part, on observe assez fréquemment des différences de spécificité de substrat.

2-3- L'électrophorèse :

2-3-1- Définition:

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec *phoros*, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules ou comparaison simultanée d'une vingtaine d'individus de même espèces ou différentes espèces en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques (Westermeier, 1997).

2-3-2- Historique :

L'électrophorèse des protéines se pratique depuis l'entre deux-guerres. Le développement de la technique doit beaucoup à la recherche médicale (étude de sérums de malades). Hunter et Markert (1957) ont appliqué pour la première fois à l'électrophorèse des enzymes les méthodes de coloration histochimique.

Ils ont baptisé cette technique: "zymogramme". Cette astuce technique a permis la découverte des " isoenzymes", ou isozymes: enzymes de même fonction, migrant différemment à l'électrophorèse.

On s'est ensuite aperçu qu'une bonne part de ces isozymes subissaient une ségrégation mendélienne simple: ce sont les alloenzymes, ou allozymes: isoenzymes codées par des allèles différents d'un même gène. Cette découverte a été une véritable aubaine pour les généticiens des populations et les taxonomistes (Tibayrenc, 1979).

2-3-3- Appareillage:

Il se compose d'une cuve d'électrophorèse munie d'un couvercle pour obtenir une atmosphère saturée en vapeur d'eau et d'un générateur de courant continu de quelques centaines de V et mA. Les électrodes sont en acier inoxydable, platine ou carbone. L'échantillon est déposé sous la forme d'un point ou d'un trait sur un support imbibé de la solution d'électrolytes qui assure le transport du courant. Les bandes de support trempent dans deux réservoirs de solution compensant par capillarité l'évaporation sur le support d'électrophorèse(Trivin et Le Bricon, 2002).

2-3-4- Les support de l'électrophorèse:

L'électrophorèse a été décrite pour la première fois par Tiselius dans les années 1930 en veine liquide, c'est-à-dire libre de tout support. L'amélioration des performances analytiques de l'électrophorèse a ensuite été obtenue grâce au support migratoire qui augmente la résolution tout en diminuant les courants de convection et les phénomènes de diffusion (Trivin et Le Bricon, 2002).

a- Le gel d'agarose:

Le gel d'agarose présente une grande porosité qui lui permet la migration des molécules de poids moléculaires élevées (Métais et *al.*, 1990).

b- Le gel d'acétate de cellulose :

C'est un support qui n'a pas d' influence sur la migration électrophorétique vue que la migration des protéines. s'effectue à la surface de gel (Métais et *al.*, 1990).

c- Le gel d'amidon :

Ce gel permet une migration à l'intérieur d'un réseau de pores dont la taille est relativement constante et suffisamment grande pour que la plupart des protéines solubles puissent traverser sans être freinée grâce à son élasticité, il présente un avantage par rapport à d'autres gels (Benane, 2001).

Le gel d'amidon peut être tranché pour révéler trois ou quatre enzymes appartenant à différents systèmes avec le même terme, ce qui permet de gagner beaucoup de temps (Tibayrenc, 2009).

d- Le gel de polyacrylamide:

La taille des pores des gels dépend de la concentration de l'acrylamide, plus cette concentration est élevée, plus les pores sont petits et les protéines de grande taille auront du mal à les traverser. La longueur de la chaîne dépend du degré de polymérisation, mais la viscosité et l'élasticité sont en fonction du nombre de pontages; la dimension du réseau est en fonction de l'inverse du pourcentage de N, N-méthylène bis-acrylamide utilisé au moment de la polymérisation.

Le gel de polyacrylamide possède l'avantage d'être transparent et peut être analysé en spectrophotométrie visible et l'UV; il peut analyser une solution fine de composition complexe (David et al., 1989).

En électrophorèse simple la séparation des protéines dépend de la charge et du PM, par contre en isoélectrofocalisation la séparation exige un gradient de pH continu, stable et linéaire grâce à l'utilisation des ampholytes qui sont des molécules de polyaminopolycarboxylique de faible poids moléculaire et qui migrent soit vers l'anode ou vers la cathode sous l'influence d'un champ électrique (Métais, et al., 1990; Pelmont et al., 1993).

2-3-5- Principe de l'électrophorèse :

L'électrophorèse sur gel fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche de gel. Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux. (Westermeier, 1997).

Diverses macromolécules biologiques importantes (ex.: acides aminés, peptides, protéines, nucléotides et acides nucléiques) possèdent des groupes ionisables qui, à un pH donné, se transforment en espèces chargées électriquement sous forme tantôt de cations

(+), tantôt d'anions (-). En fonction de la nature de la charge du réseau, les particules chargées migreront soit vers la cathode, soit vers l'anode (Westermeyer, 1997).

2-3-6- La migration électrophorétique :

La migration électrophorétique est influencée par (Trivin et Le Bricon, 2002) :

- La mobilité d'une protéine qui est proportionnelle à sa charge et inversement proportionnelle à son rayon et sa viscosité.

$$\mu = I / 6\pi v * q / r$$

μ : mobilité

q: charge de protéine

r: le rayon de la protéine

v: la viscosité

- champ électrique qui doit être maintenu constant pendant la migration

Le champ électrique E représente la différence de potentiel V (en volts) par unité de longueur L (en cm) : $E = V/L$, $V = RI$ et $R = l/S X$ ou $S =$ section du conducteur (cm^2)

X = conductivité du milieu (ohms/cm), I = intensité (ampères)

R = résistance (en ohms).

- courant d'évaporation (rhéophorèse).
- la migration est proportionnelle au temps (la netteté de bandes diminue en augmentant le temps de migration).

2-3-7- Les facteurs affectant la mobilité électrophorétique :

a- Structure des protéines :

- La mutation d'un nucléotide peut conduire à la production de nouvelles allèles (alloenzyme) qui diffèrent d'un saut de charges lorsqu'ils sont soumis à un champ électrophorétique .

- L'influence des événements post -traductionnel: Dans certains polymères (homopolymère ou hétéro polymère) certaines sous unités présentes des activités enzymatiques et d'autre non (Audigié et *al.*, 1982).

b- Influence des conditions expérimentales :

- PH: selon le PH de la solution solvant, le polypeptide aura des charges nettes différentes.

- La concentration des sels dans la solution .

-Influence des supports (Benane, 2001).

L'électrophorèse peut se résumer en :

- ✓ préparation des extraits.
- ✓ préparation du gel.
- ✓ Dépôt des échantillons.
- ✓ migration électrophorétique.
- ✓ Révélation enzymatique.

2-3-8- Les différentes modalités d'électrophorèse:

Deux modalités électrophorétiques sont principalement utilisées

a- Electrophorèse sur gel d'amidon :

C'est la technique électrophorétique la plus utilisée ;à cause de faible coût ainsi que sa facilité expérimentale. En plus de la séparation des molécules protéiques selon leurs charges, les mailles du gel d'amidon peuvent les filtrer selon leurs tailles et leurs formes (Pelmont, 1993).

b- Isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide :

C'est une technique électrophorétique particulière, basée sur la séparation des protéines suivant leur p*H*_i. Un gradient de pH est établi sous l'influence d'un champ électrique appliqué à un mélange d'ampholyte dissous d'un milieu adéquat (Benane, 2001).