

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLAB – BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRO – VETERINAIRES
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.

Spécialité : Phytothérapie et santé.

Thème

Activité leishmanicide des plantes médicinales issues de la pharmacopée traditionnelle Algérienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité

Présenté par : M^f SBABDJI Mohammed Amine

Soutenu le 17 – 12 – 2013 devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------------------|--------|----------|---------------|
| M ^{me} AMEDJKOUH H. | M.A.A. | U.S.D.B. | Présidente |
| M ^{me} EDDAIKRA N. | M.A. | I.P.A. | Promotrice |
| M ^{me} EDDAIKRA A. | M.A.A. | U.S.D.B. | Co-Promotrice |
| M ^{me} BENSALAH L. | M.A.B. | U.S.D.B. | Examinatrice |
| M ^{me} BENASSEL N. | M.A.B. | U.S.D.B. | Examinatrice |

Promotion : 2012 – 2013

Remerciements

- ✚ La réalisation et l'achèvement de ce travail ont vu le jour grâce à « الله » le tout puissant que nous ne remercierons jamais assez.

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce travail.

- ✚ Je tiens, sincèrement, à remercier en tout premier lieu Madame **EDDAIKRA Naouel**, chargée d'études et de recherche au service d'éco-épidémiologie parasitaire à l'**IPA** et promotrice de ce travail de mémoire, pour tous ses efforts et surtout sa patience.

Veillez recevoir, Madame, l'expression de ma profonde gratitude et de mes sincères remerciements.

- ✚ Je tiens à remercier également Madame **EDDAIKRA Atika**, chargée de cours et co-promotrice de ce travail, pour son aide très précieuse, en ma orientant vers cet établissement, afin de réaliser mon stage de fin d'études, trouvez ici, Madame, l'expression de ma profond respect.

- ✚ J'adresse mes remerciements au Docteur **HARRAT Zoubir**, Directeur de recherches au service d'éco-épidémiologie parasitaire à l'**IPA**, pour ma avoir accueilli au sein de son service, Veuillez croire, Monsieur, en ma parfaite considération.

- ✚ Je remercie Madame **Djennad-Kherachi Ihcèn**, chargée d'études et de recherche au service d'éco-épidémiologie parasitaire, pour l'intérêt qu'elle à porté pour mon travail, pour son implication et sa participation très précieuses, Veuillez croire, Madame, en ma parfaite considération.

- ✚ Je tiens à adresser mes vifs remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de

juger mon modeste travail :

- ❖ **Présidente** : M^{me} AMEDJKOUH H.
- ❖ **Examinatrice** : M^{me} BENSALAH L.
- ❖ **Examinatrice** : M^{me} BENASSEL N.

MERCI

Table Des Matières

Remerciements

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Glossaire

Résumé

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Les leishmanioses.....2

1. Répartition géographique.....2

1. 1. Dans le monde.....2

1. 2. En Algérie.....3

2. Formes cliniques.....5

2. 1. La Leishmaniose viscérale.....5

2. 1. 1. La forme de l'enfant.....6

2. 1. 2. La forme de l'adulte.....6

2. 2. La leishmaniose cutanée.....7

2. 2. 1. Leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*.....7

2. 2. 2. Leishmaniose cutanée sporadique du Nord à *L. infantum*.....7

3. Biologie du parasite et cycle de développement.....8

3. 1. La forme promastigotes.....9

3. 2. La forme amastigote.....9

4. Vecteurs.....10

5. Réservoirs.....10

6. Traitements des leishmanioses.....11

7. Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques des leishmanioses.....12

| | |
|---|-----------|
| II. Les plantes médicinales..... | 14 |
| 1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales..... | 14 |
| 2. Présentation des plantes médicinales étudiées..... | 15 |
| 2. 1. <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb..... | 15 |
| 2.2. <i>Artemisia herba-alba</i> Asso..... | 18 |
| 2. 3. <i>Ballota hirsuta</i> Benth..... | 20 |
| 2. 4. <i>Erica arborea</i> L..... | 22 |
| 2.5. <i>Marrubium deserti</i> De Noé..... | 24 |
| 2. 6. <i>Marrubium supinum</i> L..... | 25 |
| 2. 7. <i>Marrubium vulgare</i> L..... | 27 |
| 3. Données sur les flavonoïdes, les tanins et les imidazoles..... | 28 |
| 3. 1. Données sur les flavonoïdes..... | 29 |
| 3. 2. Données sur les tannins..... | 30 |
| 3. 3. Données sur les imidazoles..... | 32 |

Chapitre II : Matériels et Méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Matériels..... | 35 |
| 1. 1. Matériel biologique..... | 35 |
| 1. 1. 1. Les leishmanies..... | 35 |
| 1. 1. 2. Les Cellules THP1..... | 35 |
| 1. 1. 3. Les extraits de plantes..... | 35 |
| 1. 1. 4. Matériel végétal..... | 35 |
| 1. 1. 4. 1. Extraction méthanolique..... | 36 |
| 1. 1. 4. 2. Extraction des métabolites secondaires..... | 37 |
| 1. 1. 4. 3. Extraction et purification des tannins..... | 38 |
| 1. 1. 4. 4. Extraction des flavonoïdes..... | 40 |
| 1. 2. Matériels non biologiques | 41 |
| 1. 2. 1. Appareillage | 41 |
| 1. 2. 2. Petit matériel et consommables | 41 |
| 1. 2. 3. Réactifs et solutions | 41 |
| 1. 2. 4. Les milieux de culture..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 2. Méthodes | 42 |
| 2. 1. Préparation des extraits de plantes et de molécules de synthèse..... | 42 |
| 2. 2. Culture des Leishmanies..... | 42 |
| 2. 3. Culture des cellules THP1 | 42 |
| 2. 4. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme promastigote <i>in vitro</i> | 43 |
| 2. 4. 1. Criblage primaire à 400 µg/ml..... | 43 |
| 2. 4. 2. Détermination des IC50 (Criblage secondaire) | 43 |
| 2. 5. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme amastigote <i>in vitro</i> | 43 |
| 2. 6. Analyse statistique..... | 44 |

Chapitre III : Résultats et Discussions

| | |
|--|----|
| 1. Résultats..... | 45 |
| 1. 1. Criblage primaire à 400 µg/ml..... | 45 |
| 1. 2. Criblage secondaire..... | 47 |
| 1. 2. 1. Sur les formes promastigotes de <i>Leishmania major</i> et <i>Leishmania infantum</i> | 47 |
| 1. 2. 2. Sur les formes amastigotes de <i>Leishmania major</i> | 48 |
| 2. Discussions..... | 50 |
| Conclusion..... | 52 |

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Distribution de la leishmaniose dans le monde..... | 2 |
| Figure 2 : Répartition géographique de la leishmaniose cutanée en Algérie..... | 4 |
| Figure 3 : Les composants de la leishmaniose cutanée en Algérie..... | 5 |
| Figure 4 : Enfant atteint de leishmaniose viscérale..... | 6 |
| Figure 5 : Cycle de vie du parasite..... | 8 |
| Figure 6 : Formes promastigotes de Leishmania..... | 9 |
| Figure 7 : Les formes amastigotes..... | 9 |
| Figure 8 : Phlébotome..... | 10 |
| Figure 9 : Chien atteint de leishmaniose..... | 11 |
| Figure 10 : Structures des différents médicaments utilisés actuellement..... | 12 |
| Figure 11 : L'ivette musquée (race à fleurs purpurines)..... | 16 |
| Figure 12 : L'ivette musquée (race à fleurs jaunes doré)..... | 16 |
| Figure 13 : la plante dans son milieu naturel au début de la saison de floraison..... | 19 |
| Figure 14 : la plante dans son milieu naturel à la fin de la saison de floraison..... | 20 |
| Figure 15 : <i>Ballota hirsuta</i> Benth..... | 21 |
| Figure 16 : <i>Erica arborea</i> L..... | 23 |
| Figure 17 : <i>Marrubium deserti</i> De Noé..... | 25 |
| Figure 18 : <i>Marrubium supinum</i> L..... | 26 |

| | |
|---|----------|
| Figure 19 : <i>Marrubium vulgare</i> L..... | 28 |
| Figure 20 : Squelette de base des flavonoïdes..... | 29 |
| Figure 21 : Structure des tanins hydrolysables..... | 31 |
| Figure 22 : Structure des tanins condensés..... | 31 |
| Figure 23 : Structure de la 1H-Imidazole..... | 32 |
| Figure 24 : Imidazo [1, 2-a] pyridine..... | 32 |
| Figure 25 : Les médicaments à base de l'imidazo [1,2- a] pyridine commercialisés..... | 34 |
| Figure 26 : le dérivé (GSK812397)..... | 34 |
| Figure 27 : Les Différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts..... | 38 |
| Figure 28 : la méthode d'extraction des tannins..... | 40 |
| Figure 29 : Résultats du criblage primaire à 400 µg sur la forme promastigote de <i>Leishmania major</i> L. et <i>Leishmania infantum</i> des 17 extraits étudiés..... | 45 |
| Figure 30 : Quadrillage de la cellule de numération « Thoma » vu sous microscope photonique..... | (Annexe) |
| Figure 31 : Les structures moléculaires des 3 imidazoles testés..... | (Annexe) |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Molécules d'origine naturel avec des activités antileishmanienne..... | 13 |
| Tableau 2 : les extraits testés et méthodes d'extractions..... | 36 |
| Tableau 3 : Résultats du criblage secondaire sur les formes promastigotes de <i>L. major</i> et <i>L. infantum</i> et détermination des IC50..... | 47 |
| Tableau 4 : Résultats du criblage secondaire (IC50) sur les formes amastigotes et promastigotes de <i>L. major</i> | 48 |

Liste des Abréviations

Ampho-B : Amphotericine B.

APG : Angiosperm Phylogeny Group.

IC50 : Concentration Inhibitrice à 50%.

CNRL : Centre Nationale Référence Leishmania.

C.R.A.P.C. : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-chimique.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

E : Extrait.

IPA : Institut Pasteur d'Algérie.

LC: Leishmaniose cutanée.

LIPA : Leishmania Institut Pasteur d'Algérie.

LV : Leishmaniose viscérale.

LVA : Leishmaniose viscérale anthroponotique.

LVZ : Leishmaniose viscérale zoonotique.

L. : *Leishmania*.

MPSA : Mammifère Psamomys.

MON : Montpellier.

NNN : Novy Nicolle Mc Neal.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PM : poids moléculaire.

PMA : Phorbol Myristate Acétate.

RPMI: Roswell Park Memorial Institut.

rpm : rotation par minute.

SVF : Sérum de vœux Fœtal.

T : Témoin.

μM : micro-molaire.

❖ Glossaire

Anti-inflammatoire : un médicament propre à combattre l'inflammation.

Antirabique : Qui est employé contre la rage.

Apéritive : qui ouvre et augmente l'appétit.

Antiseptique : un médicament propre à prévenir les infections.

Antispasmodique : qui empêche les contractions musculaires involontaires (qui calme les crampes).

Antiarthritique : qui combat l'arthrite (inflammation d'une articulation).

Analgésique : qui calme ou supprime la douleur.

Cholagogue : qui favorise l'évacuation de la bile.

Cicatrisante : une substance qui favorise la cicatrisation.

Dysménorrhée : menstruation douloureuse.

Dépuratif : Qui a la propriété de dépurier l'organisme.

Diurétique : qui stimule la sécrétion de l'urine.

Emménagogue : qui provoque ou régule les règles (menstruation).

Fébrifuge : un médicament qui fait tomber la fièvre.

Goutte : inflammation douloureuse au niveau des articulations, avec dépôt de cristaux d'urates.

Hypotenseur : un médicament qui diminue la tension artérielle.

Hypoglycémiant : C'est une substance qui diminue la glycémie (concentration du glucose dans le sang).

Hydropisie : épanchement de sérosité dans une cavité naturelle du corps, en particulier au niveau de l'abdomen ou entre les éléments du tissu conjonctif.

Stomachique : qui stimule la fonction digestive de l'estomac.

Sédatif : Calmant qui possède la propriété de modérer l'activité d'un organe (qui calme une activité exagérée, par exemple : cardiosédatif, neurosédatif).

Résumé

Deux formes cliniques de leishmaniose coexistent à l'état endémique en Algérie : la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. En effet, les traitements disponibles requièrent pour la plus part des administrations parentérales et sont coûteux pour les populations concernées. La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Afin de trouver de nouvelles molécules d'origine naturelle efficaces contre la leishmaniose, ce travail est consacré à l'étude de l'activité leishmanicide des extraits de quelques plantes médicinales issues de la pharmacopée traditionnelle Algérienne. Au cours de ce travail nous avons testées ces extraits en premier lieu sur la forme promastigote de *L. major* et *L. infantum* puis sur la forme amastigote de *L. major*. On a trouvé que les 3 extraits d'*Erica arborea L.* (E2, E3 et E4), et les extraits méthanoliques (E13, E14) et les 3 imidazoles synthétiques (E9, E10 et E11) donnent des résultats positives par contre les 3 extraits d'*Ajuga iva L.* (E6, E7 et E8) et les 2 autres extraits d'*Erica arborea L.* (E1 et E5) n'ont pas une activité leishmanicide pour *Leishmania major L.* et *Leishmania infantum L.*

Mots clés : Leishmaniose, Amastigote, Promastigote, extraits méthanoliques, imidazoles synthétiques.

Summary

Two clinical forms of leishmaniasis coexist in an endemic state in Algeria: the cutaneous leishmaniasis and the visceral leishmaniasis. Indeed, the treatments available require for more the share of the parenteral administrations and are expensive for the populations concerned. The search for new active molecules is thus a need. In order to find new molecules of natural origin effective against the leishmaniasis, this work is devoted to the study of the leishmanicide activity extracts of some medicinal plants resulting from the Algerian traditional pharmacopeia. During this work we tested these extracts initially on the shape promastigote of *L. major* and *L. infantum* then on the shape amastigote of *L. major*. It was found that 3 extracts of *Erica arborea L.* (E2, E3 and E4), and extracts methanolic (E13, E14) and 3 synthetic imidazols (E9, E10 and E11) give results on the other hand positive the 3 extracts of *Ajuga iva L.* (E6, E7 and E8) and the 2 other extracts of *Erica arborea L.* (E1 and E5) do not have a leishmanicide activity for *Leishmania major L.* and *Leishmania infantum L.*

Key words: leishmaniasis, Amastigote, Promastigote, extracts methanolic, imidazols Synthetic.

ملخص

نوعان لداء الليشمانيات متواجدان بشكل وبائي في الجزائر : داء اللايشمانيا الجلدي وداء الليشمانيا الحشوي. في الواقع, العلاجات المتوفرة في معظمها تتطلب الإعطاء بالحقن وباهظة الثمن بالنسبة للأشخاص المعنيين. وبالتالي البحث عن جزيئات جديدة فعالة يعتبر ضرورة. يخصص هذا العمل لدراسة مستخلصات بعض النباتات الطبية من الأدوية التقليدية الجزائرية.

في هذا العمل اختبرنا هذه المستخلصات في المقام الأول على الشكل البروماسثيقوت (*L. major, L. infantum*) وفي المقام الثاني على الشكل الاماستيقوت (*L. major*). وجدنا بالنسبة للمستخلصات الثلاثة (E2, E3, E4) والمستخلصات الميثانولية (E13, E14) و مستخلصات الاميدازولات الاصطناعية (E9, E10, E11) أعطت كلها نتائج ايجابية بينما المستخلصات (E1, E5, E6, E7, E8) لم تعط أي نتائج ايجابية.

الكلمات المفتاحية: داء الليشمانيات, الاماستيقوت, البروماسثيقوت, المستخلصات الميثانولية, الاميدازولات الاصطناعية.

Introduction

Les leishmanioses constituent un ensemble hétérogène d'affections toutes dues à l'infection de l'hôte par un parasite, protozoaire du genre *Leishmania*, et transmises par un insecte vecteur, le phlébotome femelle (Bachi, 2006).

Selon les données statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, dans les régions endémiques 350 millions d'individus sont en risque d'infection, 12 millions de personnes sont atteintes et l'on recense entre 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an. Les formes cutanées de cette maladie touchent environ 1 à 1,5 millions de personnes chaque année et la forme viscérale 0,5 millions d'individus.

L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde par ces zoonoses qui sont classées dans notre pays parmi les maladies à déclaration obligatoire. Deux formes cliniques : viscérale et cutanée, sévissent à l'état endémique (Bachi, 2006).

Bien que des médicaments existent pour traiter ces maladies, dont principalement les sels d'antimoine et l'amphotéricine B, ceux-ci ne sont pas toujours efficaces. Du fait de l'apparition de parasites résistants et de la toxicité des produits, et que l'administration des traitements disponibles s'effectue essentiellement par voie générale, nécessitant ainsi une hospitalisation des patients, la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire.

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme matière première essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments.

L'Algérie est l'un des pays possédant une longue tradition et savoir-faire traditionnel à base de plantes. L'objectif principal de ce travail est l'identification de l'activité leishmanicide de certaines plantes médicinales appartenant à la pharmacopée traditionnelle Algérienne récoltées dans les régions de Blida et de Msila, ainsi que de 3 variantes d'une molécule de synthèse appartenant à la famille des imidazoles.

Dans un premier temps nous allons faire un criblage primaire sur les formes promastigotes des 2 espèces responsable de la leishmaniose cutanée (*Leishmania major*) et de la leishmaniose viscérale (*Leishmania infantum*) pour sélectionner les molécules ayant une activité leishmanicide, suivi d'un criblage secondaire sur les formes amastigotes et promastigotes pour la détermination des IC50.

Synthèse

Bibliographique

I. Les leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, transmis de mammifère à mammifère par piqûre d'un diptère vecteur, le phlébotome femelle. Elles sont répandues sur tous les continents à l'exception de l'Océanie, sous la forme de foyers plus ou moins étendus. On recense dans le monde environ 2 millions de nouveaux cas humains par an, d'expressions cliniques variées, depuis la leishmaniose cutanée localisée bénigne jusqu'à la leishmaniose viscérale avec dissémination du protozoaire dans tout l'organisme, qui peut, en l'absence de traitement, entraîner la mort (Marty, 2010).

1. Répartition géographique

1. 1. Dans le monde

Les leishmanioses, toutes formes cliniques confondues, affectent quatre continents (Asie, Afrique, Amérique et Europe), dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays, dont 72 en voie de développement (Figure 1). Les zones d'endémie sont l'Europe du sud, ainsi que de nombreux pays d'Afrique, du Moyen-Orient, d'Asie, d'Amérique centrale et d'Amérique du sud (Odonne, 2010).

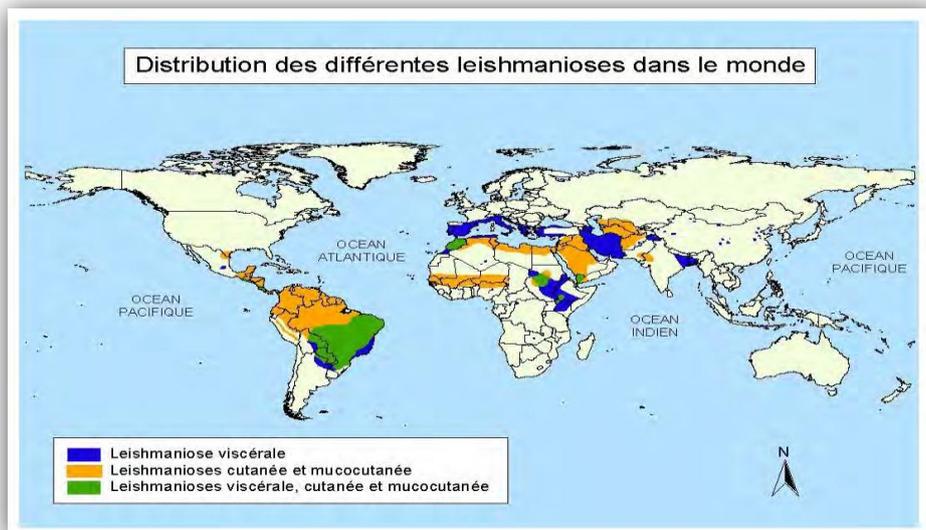


Figure 1 : Distribution de la leishmaniose dans le monde (Odonne, 2010).

1. 2. En Algérie

La LV et la LC sont connues pour être endémiques en Algérie depuis le début du siècle. Ces maladies constituent un problème de santé publique, avec une population à risque de plus de 7 millions d'individus. Les différents foyers du pays ainsi que leurs caractéristiques épidémiologiques ont été intensément étudiés à l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). La caractérisation isoenzymatique précise des Taxons de *Leishmania* circulants dans ces foyers a commencé seulement en 1980 (Harrat et *al.*, 1996).

La LV apparaît en Algérie comme une affection rurale. En effet, la parasitose sévit dans les régions montagneuses surtout dans les villages situés autour de Azazga (wilaya de Tizi-Ouzou) autour d'Akbou (wilaya de Bedjaia), dans la région de Ferdjioua (wilaya de Mila), autour de la wilaya de Constantine et autour de Tablat (wilaya de Médéa), avec une présence de cas sporadiques dans le grand sud, dans la région de Hoggar et de Tassili N'Ajjer. Elle est transmise par *Phlebotomus perniciosus*, et a le chien comme réservoir (Belkaid et *al.*, 1998).

La LC en Algérie est présente sous 3 formes : LC zoonotique : LCZ à *L. major*, LC sporadique du nord : LCSN à *L. infantum*, et LC du sud : LCS à *L. killicki* (Figures 2 et 3).

***L. major* zymodème MON-25** : responsable de la LCZ, identifié en 1982 par Bellazoug dans les hauts plateaux. C'est la LC des régions steppiques arides et semi arides (Harrat et *al.*, 1996), rencontrée dans la zone qui va de Batna à Naama, Djelfa, El-Oued, Laghouat, et à l'ouest : Tlemcen, Ksar Chellala, Saida, El-Bayad et en 1987 à Ghardaïa. Elle correspond au clou de Biskra. Transmise par *Phlebotomus papatasi*, la LCZ admet comme réservoir les rongeurs sauvages tels que *Psammomys* et *Meriones*. Cette forme se singularise par l'extension rapide de son territoire à partir de foyers anciens (tel que Biskra) et devient de plus en plus fréquente au Nord et rejoint ainsi les zones endémiques de la LV (Harrat et *al.*, 1996).

***L. infantum* zymodème MON-24** : Agent principal de la leishmaniose cutanée sporadique (LCSN) (Belazzoug et *al.*, 1985), qualifiée de leishmaniose cutanée nordique étant donné qu'elle est présente dans toute la partie nord côtière du pays (Harrat et *al.*, 1996). Transmise par la piqûre infectante de *Phlebotomus perfiliewi* (Izri et *al.*, 1992) et admet le chien comme réservoir (Benikhlef et *al.*, 2004).

***L. killicki* zymodème MON-301** : Agent de la LCS, rapporté pour la première fois en Algérie par Harrat en 2009. Il a été isolé lors de l'épidémie de LC de 2005, qui a causé plus de 30000 cas, et au cours de laquelle un nombre important de cas est apparu dans les zones urbaines pour la première fois à Ghardaïa. Plus de 2040 cas de LC ont été retrouvés dans ce foyer urbain actif, qui a montré une transmission intensive différente de celle observée dans les foyers ruraux (Harrat et *al.*, 2009). Parmi les composants du cycle de transmission, on ne connaît que *Phlebotomus sergenti* qui a été identifié comme vecteur de la LCS à *L. killicki* (Boubidi et *al.*, 2011).

Il est à noter que le premier cas autochtone de LC à Ghardaïa a été décrit par Pascal en 1936 (Pascal et Bachi, 1936). Depuis, 134 cas ont été recensés entre 1980 et 1990 (Harrat et *al.*, 2009).

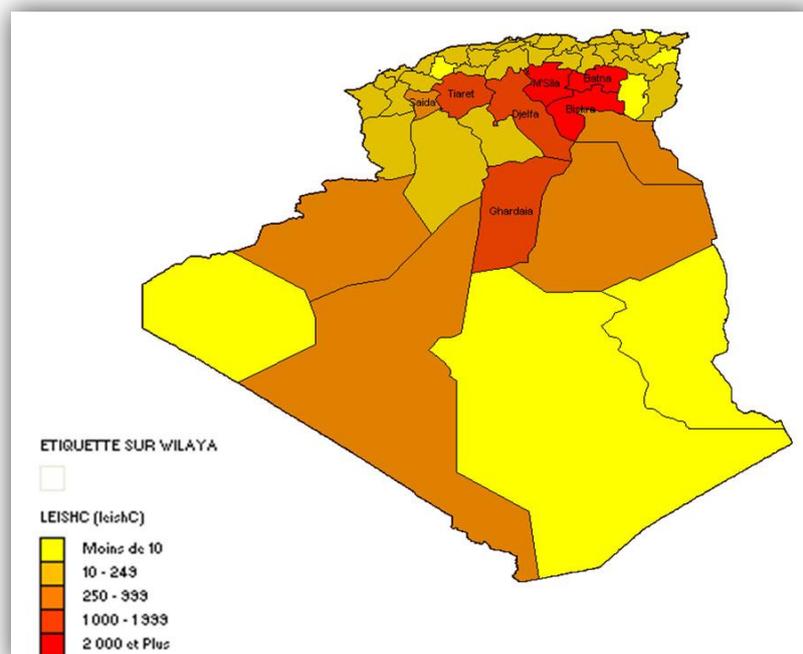


Figure 2 : Répartition géographique de la leishmaniose cutanée en Algérie (CNRL, IPA).

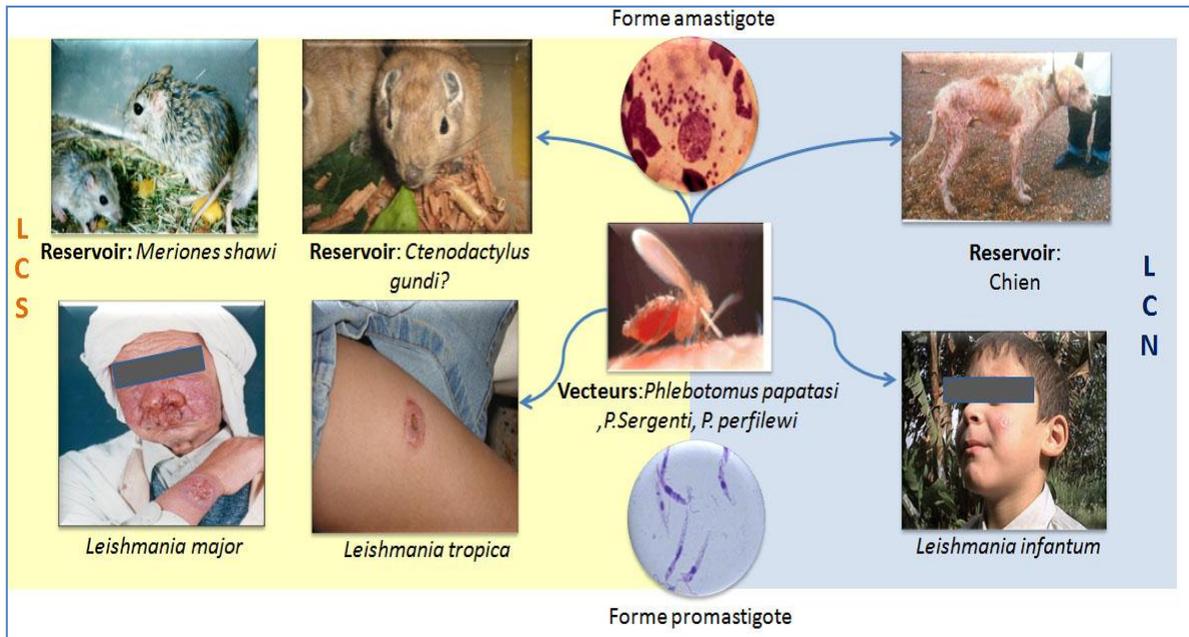


Figure 3 : Les composants de la leishmaniose cutanée en Algérie (CNRL, IPA).

2. Formes cliniques

Deux types de leishmanioses sévissent à l'état endémique en Algérie :

2. 1. La Leishmaniose viscérale

Également appelée kala-azar, un mot indien signifiant fièvre noire. Représente la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité d'environ 100 % en l'absence de traitement. Les parasites ne restent pas au site de piqûre, ils migrent vers les organes lymphoïdes (le foie, la rate et la moelle osseuse), via les systèmes sanguin et lymphatique. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids importante, une hépatosplénomégalie (augmentation du volume de la rate et du foie), une lymphoadénopathie et une anémie. La mort survient chez les patients non-traités de 6 mois à quelques années suivant l'infection (Acebey, 2007).

2. 1. 1. La forme de l'enfant

La forme infantile est la plus fréquente dans le pourtour du bassin méditerranéen. Ce sont les très jeunes enfants, préférentiellement entre un an et 4 ans, qui sont le plus souvent atteints. Cependant, des cas de leishmaniose viscérale chez des nourrissons de 5 mois et de jeunes adolescents de 13 à 14 ans ont été enregistrés (Bachi, 2006).

Symptômes : fièvre dite « folle », pâleur cutanéomuqueuse et splénomégalie. Sans traitement spécifique, l'évolution est fatale, la mort survient par surinfections et/ou hémorragies (Figure 4) (CNRL, IPA).



Figure 4 : Enfant atteint de leishmaniose viscérale (CNRL, IPA).

2. 1. 2. La forme de l'adulte

La leishmaniose viscérale est beaucoup moins fréquente chez l'adulte. Le tableau clinique est moins typique que celui de l'enfant. Il peut s'agir d'une forme fébrile prolongée. La splénomégalie peut être absente ou constituer le seul élément clinique, de même que les adénopathies. Les signes cutanés sont prédominants, d'installation brutale, rendant le diagnostic difficile (Bachi, 2006).

2. 2. La leishmaniose cutanée

Cette manifestation clinique était autrefois appelée bouton d'Orient, elle se caractérise par la formation d'une petite papule prurigineuse rouge sombre qui apparaît au site de piqûre. Puis, elle s'ulcère, s'infiltré en profondeur et se recouvre d'une mince croûte (la forme la plus répandue qui s'exprime par des lésions ulcéro-croûteuse sur le corps) évoluant très lentement sous forme sèche ou forme humide. Le tout se résorbe généralement après quelques mois voire un an, en laissant, malheureusement, de profondes cicatrices non pigmentées particulièrement inesthétiques (Acebey, 2007).

2. 2. 1. Leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales. Après une incubation courte apparaît la lésion caractéristique, la forme ulcéro-croûteuse, avec une ulcération recouverte d'une épaisse croûte brune. À côté de cette forme, la plus fréquente, s'observent les formes ulcérovégétantes, verruqueuses et, plus rarement, lupoides. Les lésions siègent, en petit nombre, au niveau des zones découvertes, de la face et des membres. Elles évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'une cicatrice rétractile indélébile. La durée d'évolution de la LCZ est habituellement courte (Bachi, 2006).

2. 2. 2. Leishmaniose cutanée sporadique du Nord à *L. infantum*

Elle s'oppose à la LCZ par de nombreux points. Sur le plan clinique, la LCS du Nord se présente comme une seule petite lésion siégeant au niveau de la face, très inflammatoire ; elle ne s'ulcère habituellement pas et, quand elle le fait, ne se recouvre jamais d'une croûte épaisse. Sa durée d'incubation est longue, tout comme sa durée d'évolution. La LCS du Nord nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation, qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an (Bachi, 2006).

3. Biologie du parasite et cycle de développement

Les leishmanies sont des protozoaires (unicellulaires), de l'ordre des Kinetoplastida se caractérisent par la présence d'une organelle unique ; le kinétoplaste qui est situé à la position basale adjacente au flagelle (près de la poche flagellaire) et qui représente de l'ADN mitochondrial (fragment d'ADN extranucléaire) (Maamri, 2008).

Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes et dimorphiques c'est-à-dire possédant deux formes morphologiques différentes au cours de leur cycle de vie (Figure 5) : tout d'abord la forme promastigote libre lorsqu'il se développe chez l'insecte vecteur (dans l'intestin du phlébotome) et dans le milieu de culture puis sous forme amastigote qui se développe à l'intérieur des macrophages (intramacrophagiques) chez l'hôte mammifère (vertébré) dont l'homme (Acebey, 2007).

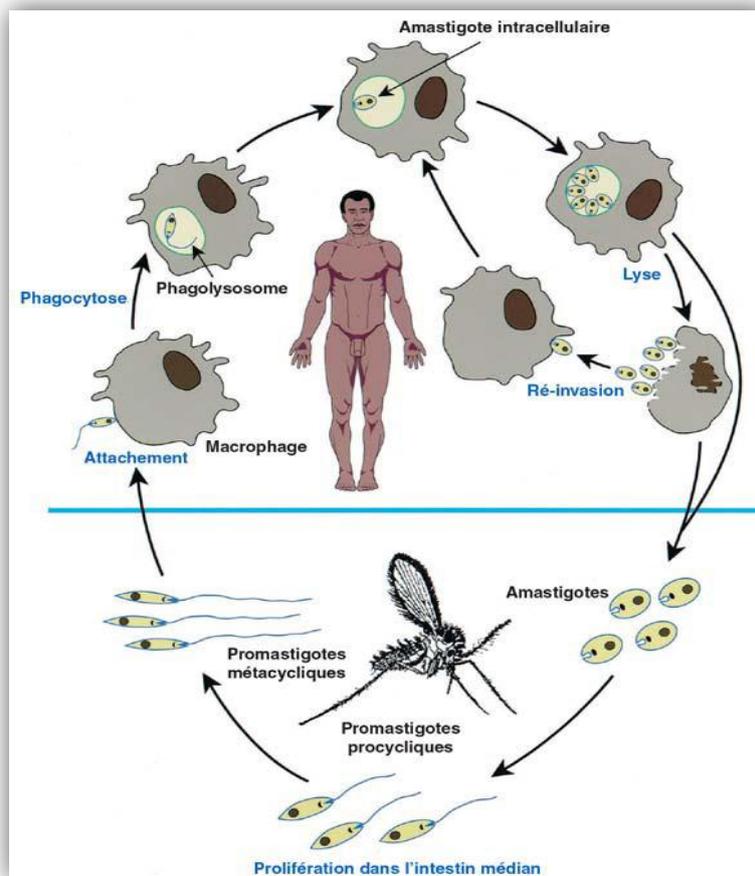


Figure 5 : Cycle de vie du parasite (Estevez, 2009).

3. 1. La forme promastigotes

Les parasites sous cette forme sont mobiles, extracellulaires et fusiforme de 5 à 20 μm de longueur et de 1 à 4 μm de largeur, prolongés par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur (Dedet, 1999). Le kinétoplaste de cette forme est situé entre le noyau et la base du flagelle. Elles se multiplient par scissiparité longitudinale (Figure 6) (Maamri, 2008).



Figure 6 : Formes promastigotes de Leishmania (CNRL, IPA).

3. 2. La forme amastigote

Les amastigotes sont des parasites intracellulaires de forme Ovoïdes d'environ 4 μm de long et 2 μm , de large, possédant un flagelle très court qui ne dépasse pas le corps cellulaire (Dedet, 1999). Elles se multiplient par scissiparité dans la ou les vacuoles parasitophores dans le cytoplasme des macrophages. Libérées après éclatement du macrophage, elles parasitent d'autres macrophages sains (Figure 7) (Maamri, 2008).

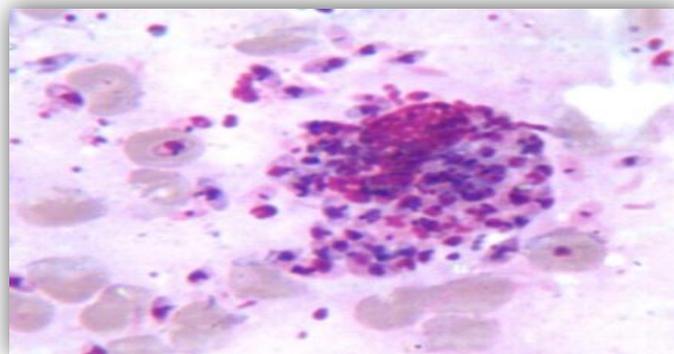


Figure 7 : Les formes amastigotes (CNRL, IPA).

4. Vecteurs

Les vecteurs de transmission de la leishmaniose sont des insectes qui appartiennent à l'ordre Diptera, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae. Ses insectes sont petits, ils n'excèdent pas 3 mm de long, possèdent un corps grêle et allongé, leurs couleurs s'étendent du blanc au noir (Figure 8). Seules la femelle est hématophage en prenant un repas sanguin chez l'hôte qui servira au développement des œufs et responsable de la transmission de la leishmaniose. Leur durée de vie est fonction de la température et de l'humidité, en moyenne les femelles vivent entre deux semaines et deux mois (Dedet, 1999).



Figure 8 : Phlébotome (CNRL, IPA).

5. Réservoirs

Les leishmanioses se divisent en deux types, anthroponotique et zoonotique. Les leishmanioses anthroponotiques touchent uniquement l'être humain et les leishmanioses zoonotiques qui touchent l'être humain et d'autres mammifères. Dans le cas des leishmanioses zoonotiques, les réservoirs présents dans le nouveau monde sont entre autres les paresseux, les lapins, les primates et les chauves-souris. Dans l'ancien monde, ce sont surtout les petits rongeurs et les chiens (Figure 9) (Maamri, 2008).



Figure 9 : Chien atteint de leishmaniose (these.vet.alfort.fr).

6. Traitements des leishmanioses

N-méthyl glucamine (Glucantime[®]) est le médicament de première intention pour le traitement des leishmanioses en Algérie. Cependant, malgré sa toxicité, le Glucantime[®] est toujours utilisé pour le traitement de la LCZ dans notre pays (CNRL, IPA).

Les cliniciens ne disposent que d'un dérivé pentavalent de l'antimoine, le N-méthyl-glucamine (Glucantime[®]), pour les deux formes cliniques. Cette molécule reste efficace, pour nos pédiatres, dans le traitement de la leishmaniose viscérale et selon un protocole qui suit les recommandations de l'OMS, soit 20 mg de Sb/kg/j pendant 30 jours en intramusculaire profonde (Bachi, 2006). D'autres molécules sont utilisées pour le traitement de la leishmaniose, mais leur utilisation est réduite à cause de leur coût et de leur toxicité (figure 10).

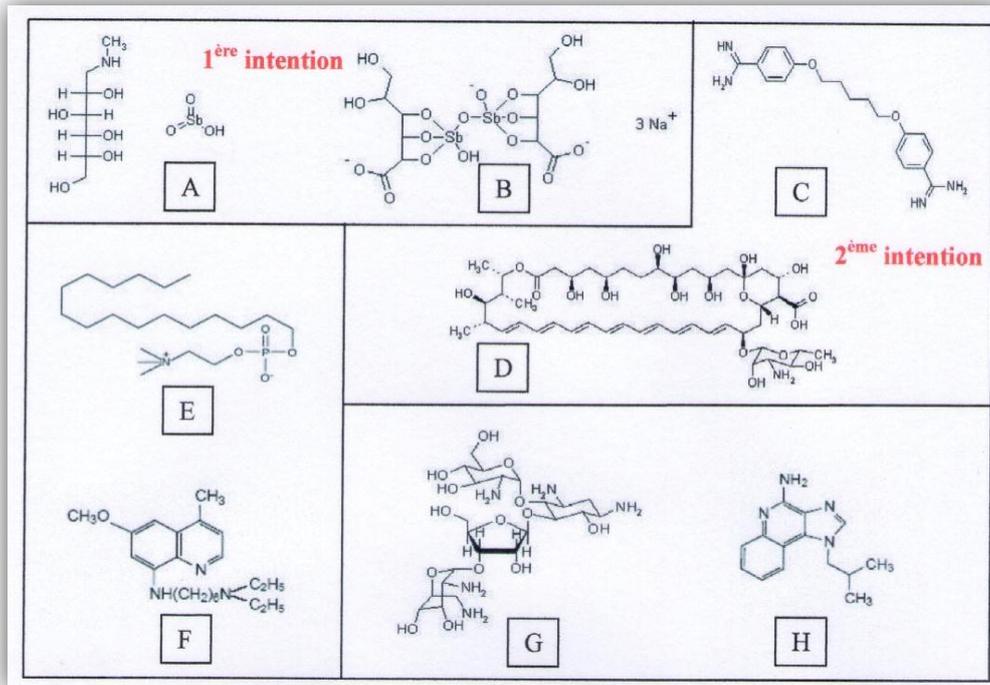


Figure 10 : Structures des différents médicaments utilisés actuellement (Estevez, 2009).

A : Glucantime® ; B : Stibogluconate de Sodium; C : Pentamidine iséthionate ; D : Amphotéricine B ; E : Miltéfosine ; F : Sitamaquine ; G : Paromomycine ; H : Imiquimod.

7. Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques des leishmanioses

La médecine traditionnelle joue un rôle significatif dans le processus de découverte de nouvelles thérapeutiques. Les plantes offrent une source de molécules actives contre plusieurs protozoaires responsables de différentes maladies (Acebey, 2007).

Dans le tableau 1 sont résumés les principaux résultats décrits dans la bibliographie concernant l'activité antileishmanienne des molécules d'origine naturelle [pour les Tests développés, mécanisme d'action et structure (voire l'Annexe)].

Tableau 1 : Molécules d'origine naturel avec des activités antileishmanienne (Acebey, 2007).

| N° | Famille et espèce végétale | Famille chimique et nom de la molécule |
|----|---|---|
| 1 | Ebenaceae : <i>Diospyros montana</i> | Quinone : Diospyrine |
| 2 | Bignoniaceae : <i>Tabebuia impetiginosa</i> | Quinone : Lapachol |
| 3 | Ulmaceae : <i>Ampelocera edentula</i> | Quinone : 4-hydroxy-1-tétralone |
| 4 | Euphorbiaceae : <i>Pera benensis</i> | Naphtoquinone : Plumbagine |
| 5 | Annonaceae, Berberidaceae et Minespermaceae | Alcaloïde : isoquinoléine : Berberine |
| 6 | Annonaceae : <i>Annona spinescens</i> , <i>Rollinia emarginata</i> | Alcaloïde : isoquinoléique: Liriodenine |
| 7 | Hernandiaceae : <i>Gyrocarpus americanus</i> | Alcaloïde : Bisbenzylisoquinoléines : Gyrocarpine |
| 8 | Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i> | Alcaloïdes : Quinoléine : Chimanine B |
| 9 | Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i> | Alcaloïdes : Quinoléine : Chimanine D |
| 10 | Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i> | Alcaloïdes : Quinoléines : 2-npropyl quinoline |
| 11 | Rutaceae : <i>Dictyoloma peruviana</i> | Alcaloïdes : Dictyoloma A et B |
| 12 | Apocynaceae : <i>Peschiera van heurkii</i> | Alcaloïde : Bis-indole : Gabunine |
| 13 | Oleaceae : <i>Nyctanthes arbortristis</i> | Terpène 5 : Iridoïde : Arbortristoside A |
| 14 | <i>Picrorhiza kurroa</i> | Terpenes : Iridoids : Picrolive, Mélange prédéterminé entre picroside I (A) et kutkoside (B) |
| 15 | Gentianeaceae : <i>Swertia chirata</i> | Terpenes : Iridoids : Amarogentine |
| 16 | Asteraceae : <i>Munnozia maronii</i> | Sesquiterpènes : Dehydrozalunin C |
| 17 | Fabaceae : <i>Glycyrrhiza spp.</i> | Chalcones : Licochalcone A |
| 18 | <i>Asparagus africanus</i> | Lignane : Nyasol |
| 19 | Annonaceae : <i>Annona haematantha</i> | Argentilactone |
| 20 | Myrsinaceae : <i>Maesa balansae</i> Mez. | Saponosides : Maesabalides (mélange des six saponosides de type oléane) |
| 21 | Asteraceae : <i>Tanacetum parthenium</i> | Sesquiterpène lactone |

II. Les plantes médicinales

De tous les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner (Messai, 2011).

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires. Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique (Maamri, 2008).

1. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

De nos jours, et surtout dans les pays du tiers monde, la phytothérapie occupe encore une place importante. La flore de ces pays reste assurément riche et prometteuse, tant dans la perspective de découvrir de nouvelles espèces botaniques que de trouver de nouvelles molécules ayant une activité thérapeutique, pour la mise au point de nouveaux médicaments. L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. La flore algérienne est potentiellement riche, beaucoup d'espèces endémiques peuvent y être. Nous partageons avec les méditerranéens et les pays du Sahel un large éventail de composés et d'éléments phytochimiques d'un intérêt grandissant d'où la nécessité et l'importance de ce travail de recherche. Ce brassage d'espèces constitue pour notre pays une véritable richesse qui doit être préservée et gérée rationnellement et durablement dans le but de maintenir les équilibres écologiques déjà fragiles et de conserver notre diversité biologique (Messai, 2011).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (Maamri, 2008).

2. Présentation des plantes médicinales étudiées

2. 1. *Ajuga iva* (L.) Schreb.

2. 1. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Lamiidees |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | <i>Ajuga</i> |
| Espèce | <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb. |

Noms communs : L'ivette musquée, petit if (Djerroumi et Nacef, 2011).

Noms vernaculaires : Meusk el-kbour, Touff eltalba, Chendgoura (Djerroumi et Nacef, 2011).

2. 2. 2. Description botanique

Ligneuse à la base et vivace, cette espèce se distingue par ses feuilles entières ou dentées, très rarement plus profondément divisées, par ses fleurs purpurines (Figure 11), très rarement d'un jaune doré (Figure 12), et par son odeur musquée (absente de la race à fleurs jaunes). Elle est assez commune dans la région méditerranéenne, tant en Europe qu'en Afrique du Nord (Fournier, 2010). On trouve la plante dans le Tell, sur les sols particulièrement pauvres et, de ce fait, peu cultivés, peut vivre plusieurs années ; elle fructifie plusieurs fois dans son existence. La récolte de la plante se fait au printemps. Elle est séchée à l'ombre, dans un endroit aéré (Djerroumi et Nacef, 2011).



Figure 11 : L'ivette musquée (race à fleurs purpurines) (www.tela-botanica.org).



Figure 12 : L'ivette musquée (race à fleurs jaunes doré) (www.tela-botanica.org).

2. 2. 3. Propriétés et usages thérapeutiques

Toutes les parties de l'ivette (Plante entière) sont utilisées en médecine populaire et notamment les feuilles qui ont des propriétés antiseptiques et cicatrisantes. Elles ont, en outre, la vertu de réguler le taux de sucre dans le sang et de combattre les troubles circulatoires et digestifs (Djerroumi et Nacef, 2011).

La plante renferme des Tannins, un principe amer, acides phénols, des flavonoïdes. Elle est antirhumatismale, hypoglycémiant, parasiticide, antirabique, stomachique, hypotenseur (Ali-Delille, 2010).

Les feuilles de l'ivette musquée renferment une huile essentielle spéciale ou essence d'ivette musquée, mais dont la présence ne suffit pas à expliquer les légères propriétés attribuées à la plante, regardée comme faiblement excitante, antispasmodique, diurétique, apéritive et tonique, et non moins faiblement fébrifuge et antiarthritique. On peut l'employer dans l'hydropisie, la goutte, le rhumatisme (Fournier, 2010).

2. 2. *Artemisia herba alba* Asso.

2. 2. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|----------------|-----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Campanulidees |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae |
| Genre | Artemisia |
| Espèce | <i>Artemisia herba alba</i> Asso. |

Appelée **Chih** en arabe (Djerroumi et Nacef, 2011).

Noms communs : armoise blanche, Thym des steppes, semen contra de Barbarie (Ali-Delille, 2010).

Noms vernaculaires : Chih-labyadh, chih-lahmar, chi-azgah, chiha, alala, ifsi, seri, abelbel, azzere, zezzeri (Ali-Delille, 2010).

2. 2. 2. Description botanique

Plante steppique, très répandue sur les Hauts-Plateaux et le Sahara. L'armoise se présente sous la forme de buissons très ramifiés de 30 à 80 cm de hauteur. Ses feuilles sont blanches duveteuses, ainsi que les rameaux très découpés, capitules ovoïdes à involucre scarieux comportant deux à quatre fleurs par capitule. Le fruit est un akène oblong à divisions longues étroites et espacées. Son odeur est très forte, aromatique, d'une saveur chaude et amère (Ali-Delille, 2010). La récolte de la plante se fait à la fin du printemps ou au début de l'été (Figure 13 et 14) (Djerroumi et Nacef, 2011).



Figure 13 : *Artemisia herba alba* Asso. (www.sahara-nature.com).

2. 2. 3. Propriétés et usages thérapeutiques

L'armoise blanche renferme des terpènes (Artémisinine, Le thuyone) et des flavonoïdes. Les principes actifs de l'*Artemisia herba alba* Asso sont : tannins, principes amers, santonine et huile essentielle. Ce sont ses feuilles et ses sommités fleuries qui sont utilisées en médecine populaire (Djerroumi et Nacef, 2011). Elle est diurétique, tonique, dépuratif, cholagogue, antidiabétique, analgésique, anti-inflammatoire, cicatrisant, anti-diarrhéique, antispasmodique, emménagogue, règles douloureuses, sédatif nerveux, stomachique, syndromes prémenstruels, puissant vermifuge, apéritif (Ali-Delille, 2010).



Figure 14 : *Artemisia herba alba* Asso. (www.sahara-nature.com).

2. 3. *Ballota hirsuta* Benth.

2. 3. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Lamiidees |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Ballota |
| Espèce | <i>Ballota hirsuta</i> Benth. |

Nom commun : Ballote hirsute (www.tela-botanica.org).

Noms vernaculaires : connue par Magharoui, Marouta, Afarghaki, Timarssate et Afiss (Touil, 2009).

2. 3. 2. Description botanique

C'est une plante rameuse annuelle ou vivace, de 50 cm à 1,50 m de hauteur, entièrement couverte d'un duvet très court. Les Feuilles sont ovales ou arrondies à fortes nervures, un peu dentées, en cœur à la base du limbe, laineuses et grisâtres sur la face inférieure. Les Fleurs sont roses ou pourpres en glomérules denses à l'aisselle des feuilles, lèvre supérieure bifide (Figure 15). C'est une espèce méditerranéenne, elle est commune dans le Sahara central et dans le Hoggar (Touil, 2009).



Figure 15 : *Ballota hirsuta* Benth. (www.sahara-nature.com).

2. 4. *Erica arborea* L.

2. 4. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Ordre | Ericales |
| Famille | Ericaceae |
| Genre | <i>Erica</i> |
| Espèce | <i>Erica arborea</i> L. |

Nom commun : bruyère arborescente (Djerroumi et Nacef, 2011).

Nom vernaculaire : El-khelnedj (Djerroumi et Nacef, 2011).

2. 4. 2. Description botanique

La bruyère est un arbuste qui dépasse rarement 1 m de haut mais certaines espèces peuvent atteindre 3 m. Il se caractérise par des rameaux dressés, serrés, portant des feuilles persistantes, alternes, qui ressemblent à des aiguilles d'environ 5 mm de long et généralement recourbées pour mieux résister à la sécheresse. Ses fleurs, groupées en de riches épis terminaux, présentent des couleurs variables allant du blanc au rose. Le fruit est une capsule sèche ou une baie (Figure 16) (Djerroumi et Nacef, 2011).

L'arbuste, qui aime à pousser sur les terrains acides du pourtour méditerranéen, est très mellifère. Ses racines sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication des pipes. On cueille les sommités fleuries en mars quand elles sont encore sous forme de boutons. Ces parties sèchent facilement dans un endroit ombragé et aéré (Djerroumi et Nacef, 2011).



Figure 16 : *Erica arborea* L. (www.tela-botanica.org).

2. 4. 3. Propriétés et usages thérapeutiques

La bruyère est un désinfectant efficace qui purifie le milieu urinaire. Son effet anti-inflammatoire est incontestable. C'est aussi un diurétique à l'effet aussi rapide que puissant et un sédatif dans les cas de mictions difficiles. La bruyère est également active contre les maladies des reins et l'hypertrophie de la prostate. C'est enfin un dépuratif reconnu (Djerroumi et Nacef, 2011).

2.5. *Marrubium deserti* De Noé.

2. 5. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Lamiidees |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Marrubium |
| Espèce | <i>Marrubium deserti</i> De Noé. |

Noms vernaculaires : En Algérie, elle est souvent nommée djaidi (Aït Youssef, 2006). Al-djaaïda, Makhzouma, Tahrare et Aberkakou (Touil, 2009).

2. 5. 2 Description botanique

C'est une espèce endémique saharienne trouvée en Algérie et au Maroc, de 20 à 30 cm de hauteur, sous forme d'arbrisseau blanchâtre très rameux à poils laineux. Les Feuilles sont veloutées, opposées, petites, ayant un aspect nervuré et une forme spatulée, terminée en général par trois grandes dents de forme variable. Les fleurs rose pâle en tube sont entourées par un calice vert et disposées au dessus de chaque paire de feuilles (Figure 17). C'est une plante broutée par les herbivores. Elle est commune dans le nord du Sahara et le Sahara central, où on la trouve surtout dans les pâturages désertiques (Aït Youssef, 2006).



Figure 17 : *Marrubium deserti* De Noé (www.sahara-nature.com).

2. 5. 3. Propriétés et usages thérapeutiques

Les feuilles, les rameaux et les jeunes bourgeons de *Marrubium deserti* sont utilisés en décoction, infusion et macération contre les troubles intestinaux, les maladies respiratoires, la fièvre, la toux, la dysménorrhée, la piqûre de scorpion et les allergies (Benhammou, 2011).

2. 6. *Marrubium supinum* L.

2. 6. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Supérieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Lamiidees |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Marrubium |
| Espèce | <i>Marrubium supinum</i> L. |

Nom commun : Marrube couché (Aït Youssef, 2006).

2. 6. 2. Description botanique

Cette espèce, de 45 cm de hauteur, Vivace formant des coussins étalés aux tiges franchement laineuses à la base, velues à l'extrémité. Feuilles dentées réniformes, en cœur à la base, d'aspect crispé, laineuses, argentées. En juin-juillet apparaissent des fleurs de 0,5 à 1 cm de long, rose lilacée avec la lèvre supérieure à deux lobes (Figure 18) (Patrick, 2008).

Trouvée en Algérie, rare dans l'Atlas saharien et les Hauts Plateaux de l'Algérois et de l'Oranais ; elle y est trouvée surtout dans les rocailles des montagnes (Aït Youssef, 2006).



A



B

Figure 18 : *Marrubium supinum* L. **A** (www.ebay.fr), **B** (www.florasilvestre.es).

2. 7. *Marrubium vulgare* L.

2. 7. 1. Place du taxon dans la classification APG III (www.tela-botanica.org).

| | |
|---------|----------------------------------|
| Cladus | Chlorophytes |
| Cladus | Plasmodesmophytes |
| Cladus | Embryophytes |
| Cladus | Stomatophytes |
| Cladus | Hemitracheophytes |
| Cladus | Tracheophytes |
| Cladus | Euphyllophytes |
| Cladus | Spermatophytes |
| Cladus | Angiospermes |
| Cladus | Dicotyledones Vraies |
| Cladus | Dicotyledones Vraies Superieures |
| Cladus | Asteridees |
| Cladus | Lamiidees |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Marrubium |
| Espèce | <i>Marrubium vulgare</i> L. |

Noms communs : Marrube blanc, Marrube, herbe vierge, bon-homme, mont-blanc, bon-rubi, marrochemin (Ali-Delille, 2010).

Noms vernaculaires : Marriout, meriouat el kelb, achebet el kelb, frassioun, oum el roubia, timeriout, ifsi, aferkizoud (Ali-Delille, 2010).

2. 7. 2. Description botanique

Plante commune dans toute l'Algérie, au bord des chemins, dans les lieux incultes, et les rues des villages. Cette plante vivace, ligneuse, peut atteindre 60 cm de hauteur. Sa tige rameuse, dure presque carrée, velue et grisâtre est peu ou pas ramifiée. Ses feuilles arrondies, faiblement dentées, tomenteuses, sont vert blanchâtre. Ses fleurs petites, blanches, en glomérules compacts à l'aisselle de bractéoles linéaires, pointues, à sommet crochu (Figure 19). Son odeur est légèrement aromatique, sa saveur chaude est amère (Ali-Delille, 2010).

On cueille les feuilles et, à l'époque de la floraison (en été), les sommités fleuries. Leur séchage se fait à l'ombre dans un endroit aéré (Djerroumi et Nacef, 2011).



Figure 19 : *Marrubium vulgare* L. (www.tela-botanica.org).

2. 7. 3. Propriétés et usages thérapeutiques

Multiplés sont les propriétés attribuées aux feuilles du Marrube et à ses sommités fleuries. Renfermant un principe amer, une lactone diterpénique, la marrubiine, on les tient pour : antiseptiques, antispasmodiques, apéritives, balsamiques, digestives, emménagogues, eupeptiques, expectorantes et cholérétiques (utiles en cas de bronchite chronique), fébrifuges et toniques (Boullard, 2001).

3. Données sur les flavonoïdes, les tanins et les imidazoles

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, notamment le cas des poly-phénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antioxydants (Boudjellal, 2009).

Parmi les composés polyphénoliques, on retrouve dans une grande mesure les flavonoïdes et les tanins.

3. 1. Données sur les flavonoïdes

3. 1. 1. Définition

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. On les trouve d'une manière très générale dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (Boudjellal, 2009).

3. 1. 2. Structure chimique et classification

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés et isolés à partir des milliers des espèces végétales et possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Figure 20) (Bruneton, 1999).

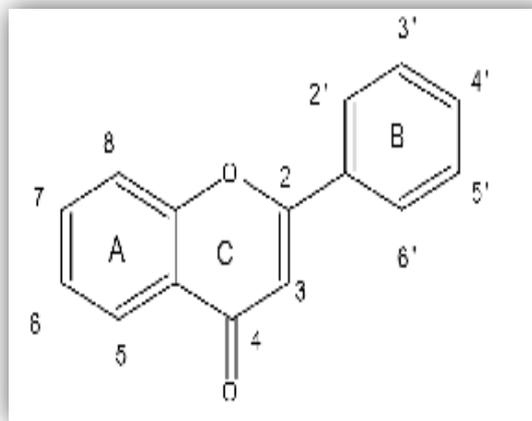


Figure 20 : Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

A l'état naturel, on trouve très souvent des flavonoïdes sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire des dérivés de génines sur lesquelles un ou plusieurs oses sont greffés (Boudjellal, 2009).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aurones (Benhammou, 2011).

3. 1. 3. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal, ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. D'ailleurs, ils sont largement abondants dans les légumes à feuilles (salade, chou, épinards, etc.) ainsi que dans les téguments externes des fruits. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (boutons floraux, jeunes feuilles) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Boudjellal, 2009).

3. 2. Données sur les tannins

3. 2. 1. Définition

Ils sont d'origine végétale et non azotée. Ce sont des composés polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. La masse moléculaire des tanins est comprise entre 500 et 3000 PM (Boudjellal, 2009).

3. 2. 2. Structure chimique et classification

Les tannins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique.

3. 2. 2. 1. Tannins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Les oses trouvés dans ces tannins sont surtout représentés par le glucose, ces tannins sont de deux types : les tannins galliques qui sont les esters d'oses (glucose) et d'acides galliques, et les tannins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques (Figure 21) (Bruneton, 1999).

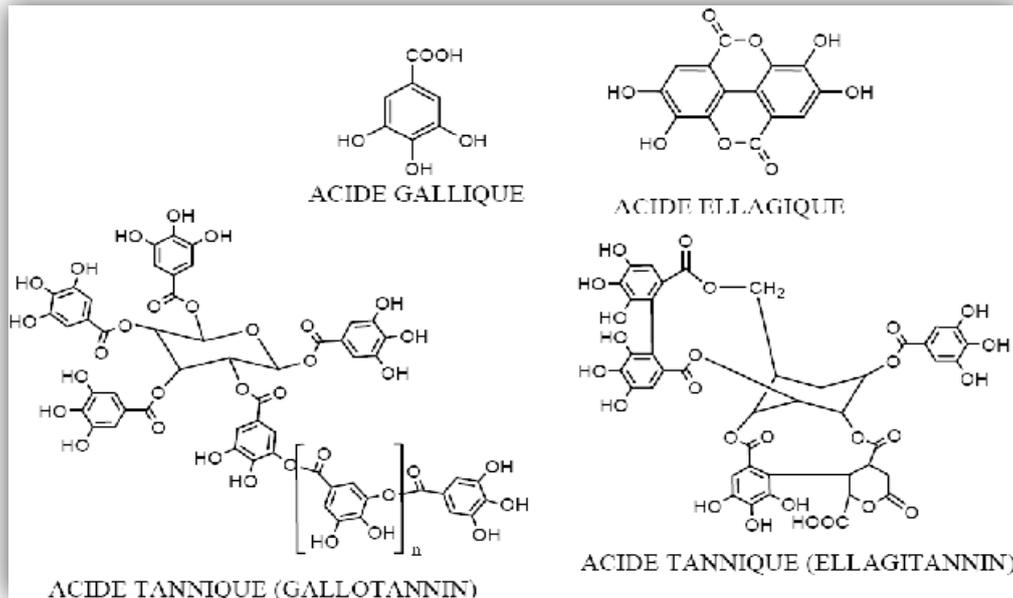


Figure 21 : Structure des tanins hydrolysables (Bruneton, 1999).

3. 2. 2. 2. Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols :

qui se diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Figure 22) (Bruneton, 1999).

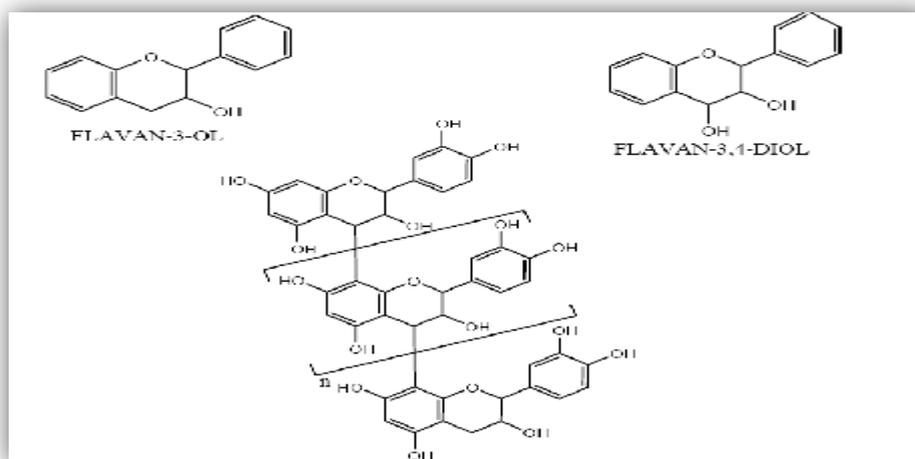


Figure 22 : Structure des tanins condensés (Bruneton, 1999).

3. 2. 3. Sources végétales des tannins

On les trouve dans de nombreuses plantes utilisées dans l'alimentation, notamment les céréales et les légumineuses. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (racines, écorces, feuilles) mais on note fréquemment une accumulation dans les organes âgés (Boudjellal, 2009).

3. 3. Données sur les imidazoles

L'imidazole est un composé organique aromatique hétérocyclique avec la formule $C_3H_4N_2$ et est classifié comme alcaloïde. C'est un cycle à cinq atomes contenant trois atomes de carbone et deux atomes d'azote en position 1 et 3 (Figure 23) (Grimmett, 1997).

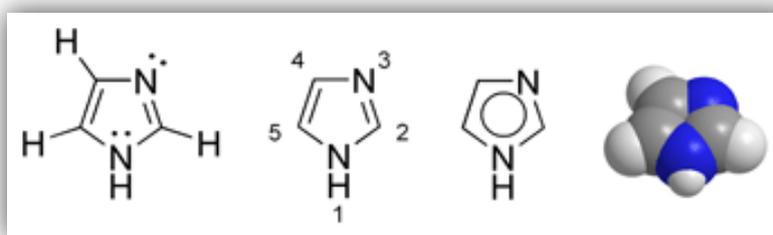


Figure 23 : Structure de la 1H-Imidazole (Grimmett, 1997).

L'imidazo [1, 2-a] pyridine est un hétérocycle synthétique connu depuis longtemps par ses effets pharmacologiques (Figure 24) (Bruneton, 2009).

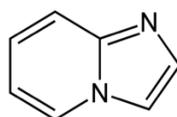
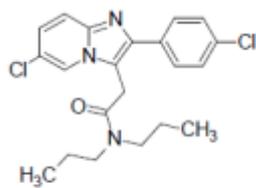


Figure 24 : Imidazo [1, 2-a] pyridine (Bruneton, 2009).

3. 4. Intérêt pharmacologique de l'imidazo [1,2-a] pyridine

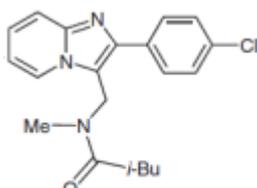
Les dérivés de l'imidazo [1,2-a] pyridine ont une importance considérable dans l'industrie pharmaceutique en raison de leurs activités pharmacologiques intéressantes affichées sur un large éventail de catégories thérapeutiques. Ce sont soit des antiviraux, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-malariques, anticonvulsives, antiseptiques, anticancéreux, anti HIV, antiulcéreux, antiacides, anti virus du varicelle zostère, herbicides, soit des cardiotoniques, antiagrégants plaquettaires. Certains sont des inhibiteurs des canaux calciques ou présentent une activité anesthésique, tandis que d'autres sont des ligands des plaques β -amyloïde, et constituent une nouvelle classe de voie orale active non peptidique du récepteur antagonistes B2 de la bradykinine. Ce sont aussi des inhibiteurs des récepteurs agonistes Acide Gamma Amino Butyrique (GABA) qui transmet les messages issus d'une cellule nerveuse de cerveau à une autre. Ce récepteur régule l'anxiété : effet anxiolytique. Certaines imidazopyridines sont évaluées pour être des inhibiteurs de l'acyl Acyltransferase de Cholesterol (ACAT) en agissant en bloquant l'absorption intestinale du cholestérol (Bruneton, 2009).

Grâce à la recherche et le développement au sein de la classe des imidazopyridiniques, huit médicaments dont les principes actifs appartiennent à cette famille sont commercialisés : trois anxiolytiques, deux antiulcéreux, un hypnotique, un inhibiteur de phosphodiesterase [PDE-3] et un pour le traitement de l'ostéoporose (Bruneton, 2009).



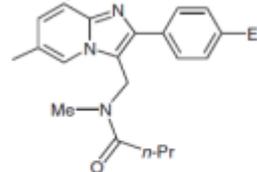
Alpidem

Anxiolytique



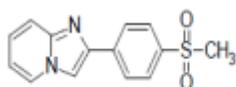
Saripidem

anxiolytique



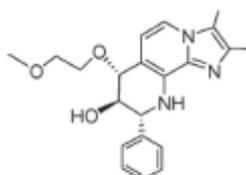
Necopidem

anxiolytique



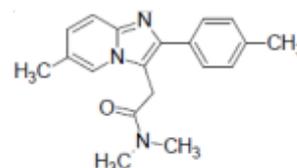
Zolimidine

Antiulcéreux



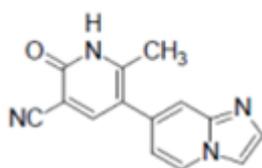
Soraprazan (phase II, I)

antiulcéreux



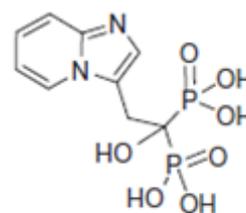
Zolpidem

hypnotique



Olprinone

Inhibiteur de phosphodiesterases [PDE-3]

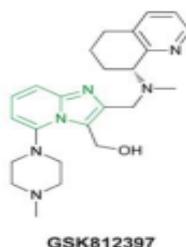


Acide minodronique

traitement de l'ostéoporose

Figure 25 : Les médicaments à base de l'imidazo [1,2- a] pyridine commercialisés (Bruneton, 2009).

Signalons aussi que le dérivé (GSK812397), est porté comme candidat pour le traitement de l'infection par le VIH (Figure 26) (Bruneton, 2009).



GSK812397

Figure 26 : le dérivé (GSK812397) (Bruneton, 2009).

Matériels
et
Méthodes

1. Matériels

1. 1. Matériel biologique

1. 1. 1. Les leishmanies

Deux espèces ont été choisies pour l'étude de l'activité leishmanicide des extraits des plantes étudiés. Une espèce responsable de leishmaniose cutanée : *L. major* (MPSA/DZ/06/LIPA 32/06) et l'autre responsable de leishmaniose viscérale : *L. infantum* (MHOM/DZ/11/LIPA284/11). Les souches appartenant à la cryobanque du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'IPA, ont été décongelées et cultivées sur milieu NNN à 26 °C.

1. 1. 2. Les Cellules THP1

La lignée cellulaire dérivée de monocytes du sang humain, obtenues d'une leucémie aigue monocyttaire, et conservée en azote liquide et entretenue sur milieu RPMI, a été utilisée pour la sensibilité de la forme amastigote de *Leishmania*.

1. 1. 3. Les extraits de plantes

Les extraits sont obtenus du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-chimique de Bou-ismail « C.R.A.P.C. ». Elles ont été récoltées dans les régions de Blida et de Msila.

1. 1. 4. Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté dans les régions de Blida et de Msila en mai 2012, et a été préparé par séchage à l'abri de la lumière de la partie aérienne des plantes étudiées La partie séchée de chaque plante a été broyée jusqu'à l'obtention d'une poudre qui a été utilisée pour l'extraction (tableau 2).

Tableau 2 : les extraits testés et méthodes d'extractions.

| NOM DE LA PLANTE | N° de l'extrait | Type d'extraction |
|-----------------------------------|-----------------|--|
| <i>Erica arborea</i> L. | Extrait 1 | P1 (cristaux) |
| | Extrait 2 | P2 (cristaux) |
| | Extrait 3 | Phase acétate d'éthyle (d'ACOEt) (DMSO) |
| | Extrait 4 | Phase chloroformique |
| | Extrait 5 | Cristaux |
| <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb. | Extrait 6 | Flavonoïdes |
| | Extrait 7 | Tanin dans l'hexane |
| | Extrait 8 | Tanin par DCM |
| Imidazoles | Extrait 9 | Imidazole 1 (Produit de synthèse 1) |
| | Extrait 10 | Imidazole 2 (Produit de synthèse 2) |
| | Extrait 11 | Imidazole 3 (Produit de synthèse 3) |
| <i>Ballota hirsuta</i> Benth. | Extrait 12 | Extrait méthanolique |
| <i>Marrubium vulgare</i> L. | Extrait 13 | Extrait méthanolique |
| <i>Artemisia herba alba</i> Asso. | Extrait 14 | Extrait méthanolique |
| <i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb. | Extrait 15 | Extrait méthanolique |
| <i>Marrubium supinum</i> L. | Extrait 16 | Extrait méthanolique |
| <i>Marrubium deserti</i> De Noé. | Extrait 17 | Extrait méthanolique |

1. 1. 4. 1. Extraction méthanolique

20 g de poudre de la partie aérienne de chaque plante ont été extraits avec 300 ml de méthanol à 85% à 65°C pendant 6 heures. Après filtration avec le papier wattman, la solution a été soumise à évaporation à vide, puis conservée dans des flacons bruns à + 4°C jusqu'à utilisation.

1. 1. 4. 2. Extraction des métabolites secondaires

Le matériel végétal a été mis à macérer à température ambiante dans du méthanol. Une macération de 24 à 48 heures a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 35°C, l'extrait méthanolique a été dilué avec de l'eau distillée, suivi d'extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle. La Figure 27 résume les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

Les deux phases organiques ainsi obtenues chloroforme et acétate d'éthyle ont été séchées, puis filtrées, et concentrés à sec sous pression réduite.

Extrait chloroformique : masse=700mg.

Extrait acétate d'éthyle : masse=7g.

Cristaux : une couche de produits tapissant la paroi de l'ampoule à décanter après l'extraction avec le chloroforme. Ils sont insolubles dans le chloroforme et solubles dans le méthanol.

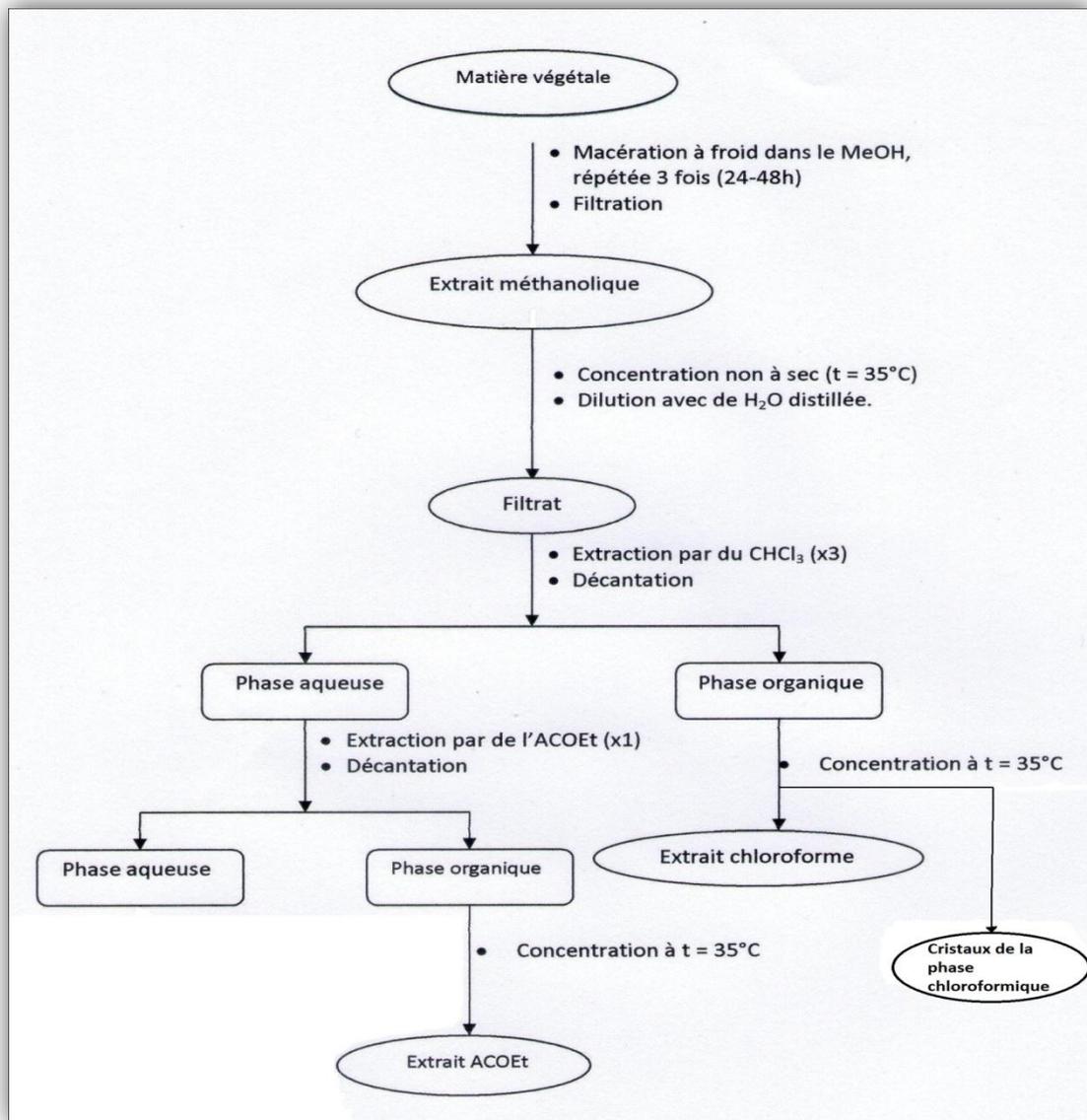


Figure 27 : Les Différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts (C.R.A.P.C.).

1. 1. 4. 3. Extraction et purification des tannins

Les tannins sont des polyphénols à structure souvent complexes et mobiles, c'est pourquoi l'extraction et l'identification des composants individuels présentent de grandes difficultés. La méthode d'extraction des tannins a été réalisée selon la technique de Bruneton (2009).

La poudre végétale de la partie aérienne d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. (60 g), a été additionné d'un mélange de benzène et chloroforme (100 ml / 100 ml). Le mélange a été ensuite laissé à macérer pendant au moins 24h, pour éliminer la chlorophylle et les lipides. La filtration a permis de récupérer le résidu restant sur papier filtre. Ce dernier a été épuisé par 100ml d'éther di-éthylique pour la séparation de quelques composés phénoliques (l'acide oxy-butyrique et les catéchines). Le résidu a été épuisé à nouveau par 100 ml d'acétate d'éthyle puis a été filtré pour éliminer les leuco-anthocyanes, les pro-anthocyanes et les éthers de l'acide oxy-butyrique. Ensuite le résidu a été épuisé à nouveau avec 200 ml d'alcool méthylique et a été laisser à macérer pendant 45min puis filtrer (Figure 28).

Le filtrat contenant les tannins et l'alcool méthylique a été évaporé sous vide avec un évaporateur rotatif à une basse température 40 à 50°C. L'extrait des tannins a été obtenu finalement dans le ballon sous forme d'extrait sec.

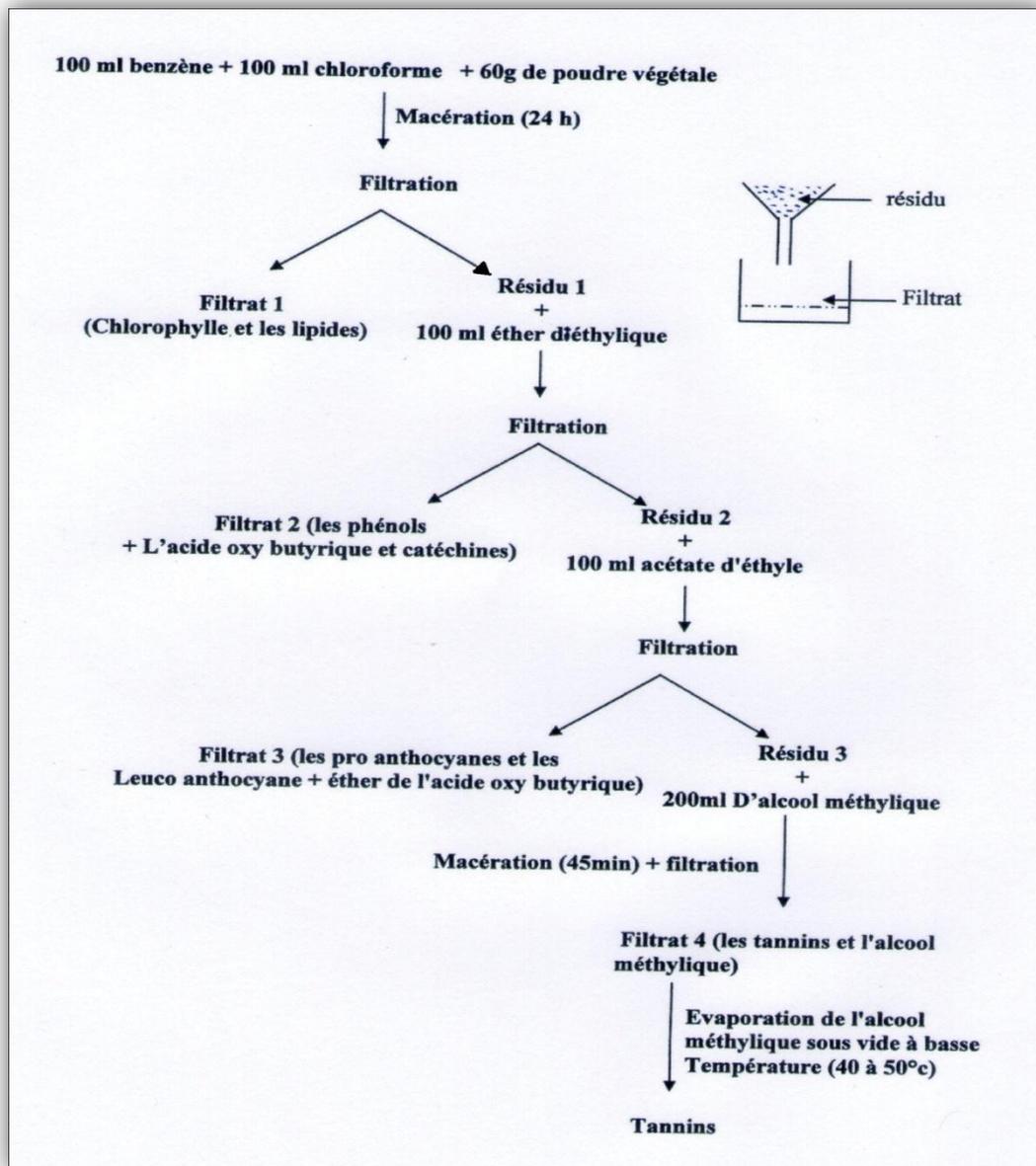


Figure 28 : la méthode d'extraction des tannins (Bruneton, 2009).

1. 1. 4. 4. Extraction des flavonoïdes

Extrait des flavonoïdes a été préparé selon le protocole d'extraction décrit par Bruneton (2009). Par le principe de macération de la partie aérienne d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. dans l'éthanol/eau (70/30 ml) pendant 24 h trois fois, suivi par une évaporation à sec par le rota-vapeur.

1. 2. Matériels non biologiques

1. 2. 1. Appareillage

Cette étude a nécessité l'usage d'un ensemble d'appareillage : Agitateur magnétique, microscope optique (MOTIC), microscope inversé (Leica), centrifugeuse (SIGMA), bec bunsen (PROPANGAS), balance (PHILLIPS), balance de précision électronique, étuves réglées à 25 °C, 26 °C et 37 °C (JOUAN), pH-mètre électronique, hotte à flux laminaire (FASTER BH-EH 2004), bain-marie (MEMMERT), vortex (FISHERBRAND), compteur manuel (PRIMAT), pipetus (JUNIOR).

1. 2. 2. Petit matériel et consommables

On a utilisé lors de ce travail le matériel suivant : plaques de 96 puits, lames, lamelles, cellule de Thoma, pipette stériles à usage unique de 5 à 20 ml, tubes coniques (15 ml) et tubes Eppendorfs®, flacons de culture cellulaire 40 ml, pipettes Pasteur stériles, parafilm®, Filtre stérile de 0,22 µm.

1. 2. 3. Réactifs et solutions

Les réactifs ayant servi à la réalisation de cette étude sont : eau physiologique (0,9%), eau distillée, antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine : GECTAPEN), Formaldéhyde (formol) dilué à 4 % (PANREAC), Acide Chlorhydrique (HCL), Hydroxyde de Sodium (NaOH), bleu de Trypan (RAL555), DMSO (Diméthylsulfoxyde), Sérum de veau fœtal (SVF), huile à émersion (REACTIFS RAL), Giemsa (MERCK) et Kit Ral 555 de coloration rapide (RAL 555), alcool.

1. 2. 4. Les milieux de culture

Les milieux de culture ayant servis à l'isolement et à l'enrichissement des souches sont : le milieu NNN (Novy Nicolle Mc Neal) et le milieu RPMI (Roswell park Memorial Institute) 1640 + 10 % SVF (Annexe 1).

2. Méthodes

2. 1. Préparation des extraits de plantes et de molécules de synthèse

Les extraits de plantes et les molécules de synthèse ont été dissous dans du DMSO, et dilué dans le milieu liquide à une concentration finale de 1 g/ml. La concentration finale de DMSO doit être à un maximum de 0.05 % poids/volume.

2. 2. Culture des Leishmanies

Pour l'étude de l'activité leishmanicide des 17 extraits sur *L. major* et *L. infantum*, nous avons utilisé deux milieux de croissance : un milieu semi solide le NNN et un milieu liquide : le RPMI 1640 supplémenté de 10 % de SVF. Les souches ont été maintenues sur NNN et cultivées sur RPMI pour les tests leishmanicide. Les souches qui sont sur NNN ont été contrôlées chaque semaine. Les cultures en phase exponentielle ont été concentrées à partir de NNN, puis ont subis 2 à 3 lavages à l'eau physiologique (2500 rpm pendant 10 min), et transférées sur RPMI. Les cultures sur RPMI 1640 + SVF 10% ont été contrôlées et repiquées tous les 5 jours.

2. 3. Culture des cellules THP1

Les THP1 conservées dans de l'azote liquide ont été décongelées dans un bain-marie à 37 °C pendant une minute. Le contenu des cryotubes a été récupéré par la suite et déposé dans 5ml de RPMI à 10 % SVF (Sérum de Veau Fœtal). Les cellules ont été repiquées tous les 4 et incubé dans l'étuve à 37 °C à 5 % CO₂. Le contrôle de la culture se fait au microscope inversé.

2. 4. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme promastigote *in vitro*

2. 4. 1. Criblage primaire à 400 µg/ml

La suspension parasitaire ajustée à 2×10^6 parasite/ml a été cultivée sur milieu RPMI + SVF 10% pendant 72 heures à 25°C, en présence des extraits étudiés et des molécules de synthèse à une concentration finale de 400 µg/ml sur des plaques de culture cellulaire de 96 puits. Chaque dilution a été réalisée en quintuplate (Sereno *et al.*, 1998). Les tests de criblage primaire ont été répétés 3 fois. A la fin du test, l'effet des molécules étudiées est estimé sous microscope inversé à GrX200, et par comptage sous microscope optique à GrX400 par la cellule de Thoma.

2. 4. 2. Détermination des IC50 (Criblage secondaire)

La suspension parasitaire ajustée à 2×10^6 parasite/ml a été cultivée sur milieu RPMI + SVF 10% pendant 72 heures à 25 °C, en présence des extraits actifs à 400 µg à des concentrations finales de 100, 50, 25 et 12,5 µg/ml sur une plaque de culture cellulaire de 96 puits, en quintuplate. Ces tests ont été répétés 3 fois. L'amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif.

2. 5. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme amastigote *in vitro*

Les cellules THP- 1 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF. Les THP-1 en phase logarithmique de croissance ont été différenciées par une incubation de 48 heures dans le RPMI +10% SVF contenant 20 µg de phorbol myristate acétate (PMA) par ml, qui induit la différenciation et causé les cellules de devenir adhérent (Sereno *et al.*, 1998) . Les THP-1 traitées avec du PMA ont été lavées et ensuite infectées avec la phase stationnaire des leishmanies pendant 24 heures dans des chambres Labteck de culture cellulaire, avec un rapport Macrophage: parasite de 1/10 et incubées à 37 ° C avec 5% de CO₂. Après 24 h de contact, les parasites non internalisés ont été éliminées par plusieurs lavages.

Des dilutions en série de chaque extrait ont été réalisées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de SVF et sont distribuées dans les puits à des concentrations finales de 100, 50, 25 et 12.5 µg/ml. Le Glucantime® a été utilisé comme témoin positif. Le milieu contenant les extraits a été renouvelé au bout de 3 jours. Après 5 jours d'exposition aux extraits, les puits contenant les THP-1 différenciées ont été lavées. Les cellules ont été fixées avec du méthanol et colorées avec Giemsa.

Le nombre de leishmanies infestées dans cent cellules THP1, est déterminé par comptage sous microscope photonique. L'index de parasitisme (IP) est alors calculé comme suit :

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

2. 6. Analyse statistique

Les effets des extraits étudiés sur la viabilité des cellules ont été exprimés en IC 50, qui est la concentration nécessaire pour tuer 50% de la population. Les valeurs des IC50 ont été calculées à partir de l'extrapolation graphique de courbes dose-réponse et aussi confirmé le calcul de la tendance sur Excel.

Résultats et Discussion

1. Résultats

Afin de déterminer l'activité leishmanicide de 17 extraits de plantes et molécules de synthèse, nous avons dans un premier temps fait un criblage primaire pour sélectionner les molécules d'intérêt et pousser nos investigations vers un criblage secondaire permettant de déterminer la concentration inhibitrice de chaque extrait sur les formes promastigotes et amastigote de *Leishmania major* responsable de la LC et sur la forme promastigote de *Leishmania infantum* responsable de la LV.

1. 1. Criblage primaire à 400 µg/ml

On note à travers l'histogramme du criblage primaire à 400 µg, que parmi les 17 extraits testés, il y a des extraits qui donnent un effet leishmanicide très intéressant pour les deux souches étudiées (*L. major* et *L. infantum*) par contre d'autres extraits n'ont aucune activité leishmanicide soit pour la souche *L. major* ou bien *L. infantum* (figure 29).

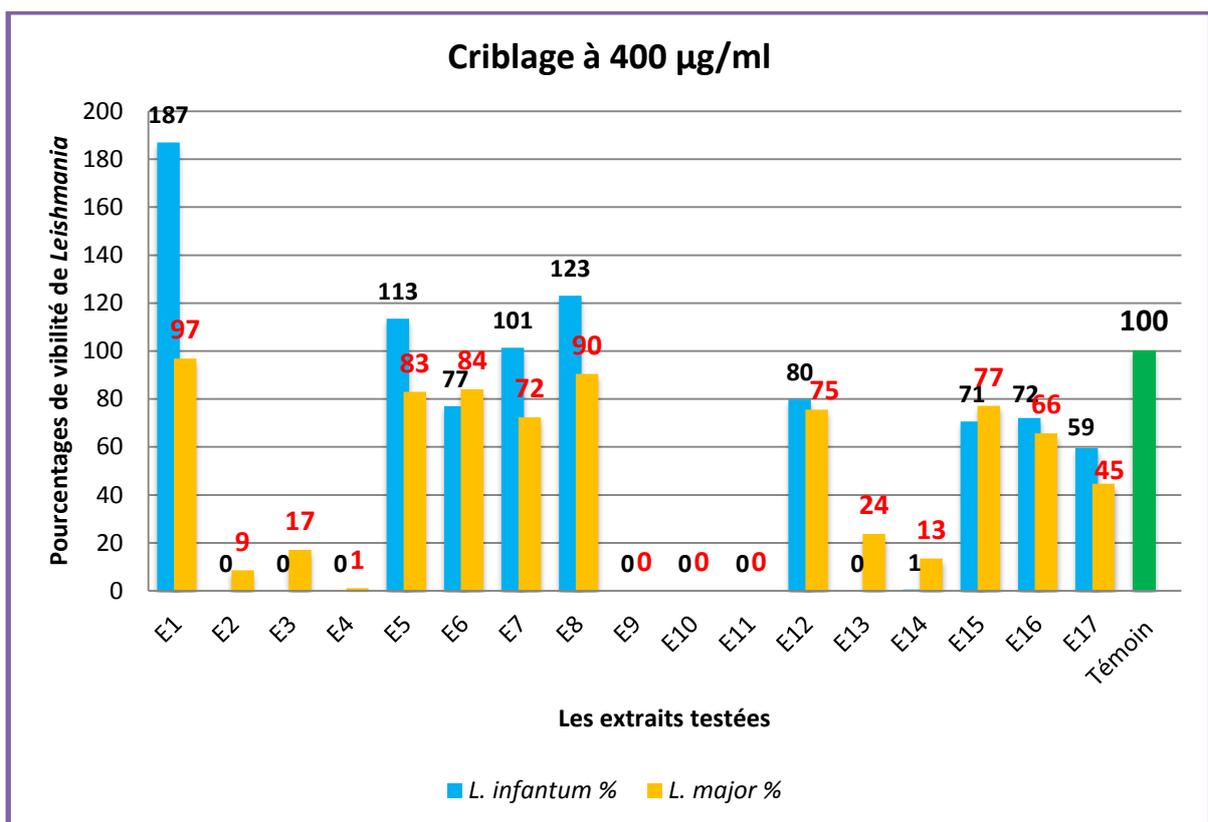


Figure 29 : Résultats du criblage primaire à 400 µg sur la forme promastigote de *Leishmania major* L. et *Leishmania infantum* des 17 extraits étudiés.

Nous observons que parmi les cinq extraits de la bruyère arborescente (*Erica arborea* L.), il y a trois extraits : E2 « cristaux », E3 « Phase acétate d'éthyle (d'ACOEt) et E4 « Phase chloroformique qui donnent une activité leishmanicide très important. Pour *L. major*, On note une diminution significative du pourcentage des parasites, alors que pour *L. infantum*, nous avons une disparition totale des parasites (0% de viabilité). Cependant, les deux autres extraits de la bruyère arborescente : E1 « cristaux » et E5 « cristaux » ne présentent aucune activité leishmanicide. Le pourcentage de viabilité des parasites pour les deux souches (*L. major* et *L. infantum*) est similaire à celui du témoin, et semble avoir un effet positif sur la croissance du parasite pour l'extrait E1 sur *L. infantum*, puisqu'on note une augmentation considérable par rapport au témoin (187%).

Les 4 extraits de l'ivette musquée (*Ajuga iva* (L.) Schreb.) : E6 « Flavonoïdes », E7« Tanin dans l'hexane », E8 « Tanin par DCM » et E15 « extrait méthanolique », ne semblent pas avoir une activité leishmanicide. Le pourcentage de viabilité entre 72 et 123 % des parasites pour les deux souches (*L. major* et *L. infantum*) est proche de celui du témoin.

Par ailleurs, les extraits méthanoliques de E12 (*Ballota hirsuta* Benth.), E16 (*Marrubium supinum* L.) et E17 (*Marrubium deserti* De Noé.), ne possède pas aussi d'activité leishmanicide remarquable ; le pourcentage de viabilité des deux souches (*L. major* et *L. infantum*) diminue très peu par rapport au témoin, sauf pour E17, où le pourcentage des parasites est diminué d'environ de moitié (45 % pour *L. major* et 59 % pour *L. infantum*).

Nous remarquons par contre que pour les autres extraits méthanoliques E13 (*Marrubium vulgare* L.) et E14 (*Artemesia herba alba* Asso), une activité leishmanicide très remarquable ; des diminutions significatives du pourcentage des parasites pour *L. major* ont été enregistrées, avec une disparition presque totale (1%) des parasites de *L. infantum* traité par E14, et une disparition totale (0%) des parasites de *L. infantum* traité par E13.

Enfin, les trois imidazoles synthétiques [E9, E10 et E11] donnent tous une activité leishmanicide très remarquable ; nous observons qu'il y a une disparition totale des parasites pour les deux souches (*L. major* et *L. infantum*) (0%).

1. 2. Criblage secondaire

1. 2. 1. Sur les formes promastigotes de *Leishmania major* et *Leishmania infantum*

Les résultats du criblage secondaire sur les formes promastigotes des deux espèces de *Leishmania* étudiées *L. major* et *L. infantum*, ont permis de déterminer les IC50 de chaque extrait dont le pourcentage de viabilité était inférieur à 45% au cours du criblage primaire à 400 µg/ml (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats du criblage secondaire sur les formes promastigotes de *L. major* et *L. infantum* et détermination des IC50

| Extraits | <i>L. major</i> (IC50 en µg/ml) | <i>L. infantum</i> (IC50 en µg/ml) |
|--|---------------------------------------|--|
| E2 (Bruyère arborescente : cristaux) | 43,98 | 61,27 |
| E3 (Bruyère arborescente : phase acétate d'éthyle) | 67,94 | 51,51 |
| E4 (Bruyère arborescente : phase chloroformique) | 51,93 | 42,23 |
| E9 (Imidazole 1) | 72,24 | 30,28 |
| E10 (Imidazole 2) | 53,07 | 34,31 |
| E11 (Imidazole 3) | 25,83 | 25,49 |
| E13 (<i>Marrubiu mvulgare</i> L. : extrait méthanolique) | 45,84 | 35,63 |
| E14 (<i>Artemesia herba alba</i> Asso : extrait méthanolique) | 55,21 | 77,97 |
| E17 (<i>Marrubium deserti</i> De Noé (extrait méthanolique) | 53,49 | - |

Sur les formes promastigotes de *L. major* et selon les espèces de plantes étudiées, nous avons noté que l'IC50 de la Bruyère arborescente (43.98 µg/ml) et celle de *Marrubium vulgare* (45.84 µg/ml) sont les plus intéressantes. Ces deux plantes semblent avoir un effet leishmanicide notable en comparaison avec les autres plantes étudiées dont les IC50 varient entre 51 et 67 µg/ml.

Cet effet leishmanicide sur les formes promastigotes de *L. infantum* semble légèrement différent puisque les extraits les plus efficaces sont toujours les mêmes c'est-à-dire la Bruyère arborescente et *Marrubium vulgare* L., mais avec des IC50 plus faible qui sont respectivement de 42.23 µg/ml et de 35.63 µg/ml.

Selon le mode d'extractions utilisé, la Bruyère arborescente a donné des effets différents sur les deux espèces étudiées. Les cristaux sont plus efficaces sur *L. major* (forme cutanée), alors que pour *L. infantum* (forme viscérale), c'est l'extrait chloroformique qui est plus efficace.

Pour les molécules de synthèses étudiées : les imidazoles, nous avons obtenus les IC50 les plus faibles pour *L. major* et *L. infantum*, puisque l'imidazole 3 a donné des IC 50 de 25µg pour les deux espèces.

Par ailleurs ces imidazoles ont donné des effets variables selon leur méthode de synthèse. L'imidazole 1 a une IC50 de 72µg pour *L. major*, alors qu'elle est de 30µg pour *L. infantum*.

1. 2. 2. Sur les formes amastigotes de *Leishmania major*

Les résultats du criblage secondaire sur les formes amastigotes *L. major*, ont permis de déterminer les IC50 de chaque extrait dont le pourcentage de viabilité était inférieur à 50% au cours du criblage secondaire sur les formes promastigotes (tableau 4).

Tableau 4 : Résultats du criblage secondaire (IC50) sur les formes amastigotes et promastigotes de *L. major*

| Extraits | <i>L. major</i> | <i>L. major</i> |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| | amastigote | promastigote |
| | (IC ₅₀ en µg/ml) | (IC ₅₀ en µg/ml) |
| E2 (Bruyère arborescente : cristaux) | 36 | 43,98 |
| E4 (Bruyère arborescente : phase chloroformique) | 41.58 | 51,93 |
| E11 (Imidazole 3) | 17.64 | 25,83 |
| E13 (<i>Marrubium vulgare</i> L. : extrait méthanolique) | 32.15 | 45,84 |
| E14 (<i>Artemisia herba alba</i> Asso : extrait méthanolique) | 37.87 | 55,21 |

Les résultats du criblage secondaire sur les formes amastigotes de *L. major*, montrent que les IC 50 sont plus faibles que celles obtenus avec les formes promastigotes.

Selon les extraits de plantes, l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* L. apparaît comme étant le plus efficace avec une IC50 de 32.15 µg/ml.

Selon la méthode d'extraction, nous notons que l'effet leishmanicide des cristaux est plus important que celui de la phase chloroformique pour la Bruyère arborescente.

Par ailleurs, la molécule de synthèse : Imidazole3, possède l'effet leishmanicide le plus marqué avec une IC50 de 17.64 µg/ml.

2. Discussions

Les résultats du criblage primaire des 17 extraits étudiés dans ce travail ont montré que sur les 7 plantes étudié 4 avaient une activité leishmanicide qui pouvait réduire la viabilité des formes promastigotes de *Leishmania major* et *Leishmania infantum* de 50%.

Nous rapportons dans ce travail, pour la première fois l'activité leishmanicide de la bruyère arborescente et de *Marrubium vulgare* L. sur *L. major* et *L. infantum*. Kirmizibekmez en 2011, a réalisé une étude sur l'activité antiprotozoaires de certaines *Lamiaceae* turques, dont le genre *Marrubium*.

Il est à noter que parmi la flore maghrébine, la plante *Artemesia herba-alba* Asso est très utilisé dans la médecine traditionnelle et a montré dans des études antérieures une activité leishmanicide vis-à-vis de 2 espèces de *Leishmania* : *L. tropica* et *L. major* (Hatimi et al., 2000). Dans notre travail, l'extrait méthanolique de cette plante apparait plus efficace sur *L. major* que sur *L. infantum*. De plus *Marrubium vulgare* L. a donné une activité leishmanicide beaucoup plus importante que celle d'*Artemesia*.

Sur les 3 variantes de la molécule de synthèse obtenue à partir des imidazoles possédant un noyau pyridine, nous avons obtenus 100% d'efficacité sur les 2 souches étudiées au cours du criblage primaire. Cependant, au cours du criblage secondaire, leur efficacité par souche semble différente, et l'extrait 3 possédant le radical le plus long, ressort comme celui qui possède l'activité leishmanicide la plus importante avec une IC50 de 25 µg/ml. Sur les 3 molécules de synthèse, l'imidazole 3 possède le radical le plus long. Les dérivés de l'imidazo [1,2-a] pyridine sont connus pour leur importance considérable dans l'industrie pharmaceutique. Parmi leurs activités pharmacologiques, on retrouve des antibactériens, antifongiques, anti-malariques (Bruneton, 2009). Ces imidazoles ont été utilisé en combinaison avec d'autres produits pour prévenir la leishmaniose canine (Otranto et al., 2013).

Selon les méthodes d'extractions nous avons trouvé des différences entre les IC50 pour la bruyère arborescente. Les cristaux de cette dernière sont plus actif sur *L. major*, alors l'extrait chloroformique opère plus sur *L. infantum*. Ces extraits pourraient affecter de plusieurs manières Leishmania. Il a été démontré chez *L. amazonensis* que l'huile essentielle de *Croton cajucara* pouvait détruire la chromatine et provoquer la lyse cellulaire, dans l'heure qui suit le contact avec le parasite (Do Socorro *et al.*, 2003).

Selon les espèces, les formes promastigotes et amastigotes ont une sensibilité différentes vis-à-vis des certains extraits méthanolique. *Marrubium* apparait comme étant plus efficace sur *L. infantum* alors qu'*Artemesia* exerce un effet plus leishmanicide sur *L. major*. On peut émettre l'hypothèse que cette différence pourrait s'expliquer par les différences au niveau des patrimoines génétiques. Les génomes des espèces de Leishmania ne sont pas identiques, par conséquence elles n'expriment pas les mêmes gènes, d'où les mécanismes mis en jeu pour chaque espèces sont différents (Kumar *et al.*, 2013).

Conclusion

❖ Conclusion

La leishmaniose représente un important problème de santé publique en Algérie. Les traitements disponibles requièrent pour la plupart des administrations parentérales, sont coûteux, et les cas de résistance sont de plus en plus fréquents. La nécessité de trouver des molécules leishmanicide reste une priorité pour un pays comme l'Algérie. La richesse de notre flore et son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle a orienté notre travail vers 7 plantes, auxquelles nous avons rajoutés 3 molécules de synthèse. De plus nous avons étudiés l'activité leishmanicide selon les espèces présente en Algérie et selon les produits d'extraction pour certaines plantes.

Ainsi, l'étude de l'activité antileishmanienne *in vitro* a montré que les extraits provenant de la bruyère arborescente (*Erica arborea* L.) E2 « cristaux », E3 « Phase acétate d'éthyle (d'ACOEt) » et E4 « Phase chloroformique » et les imidazoles synthétiques E9, E10, E11 possèdent une activité leishmanicide sur la forme promastigote des leishmanies (*L. infantum* et *L. major*). L'effet par espèce de leishmanie, est variable, et les formes amastigotes semblent plus sensibles que les formes promastigotes.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées : puisqu'il reste encore beaucoup de plantes locales qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leur potentialité dans le traitement de la leishmaniose.

Par ailleurs des études plus poussées de cytotoxicité et *in vivo* mériterait d'être poursuivi pour la bruyère arborescente et le marrube blanc, ainsi que pour l'imidazole 3, car de très nombreuses substances naturelles montrent une activité antileishmanienne résultant d'une forte toxicité et sont donc inutilisables en pratique.

En conclusion, cette modeste contribution à la recherche des produits d'origine naturelle efficaces pour traiter les leishmanioses cutanées et viscérales servira en priorité les populations affectées par cette maladie. En espérant que cette étude permettra de mettre au point des traitements plus efficaces, plus accessibles et moins toxiques que ceux qui existent actuellement sur le marché.

Références

Bibliographiques

❖ Références Bibliographiques

Acebey C., 2007, Caractérisation de Terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms. Thèse de Doctorat : Chimie, Biologie & santé. Institut National Polytechnique de Toulouse. Pp 26, 41, 43, 44, 45, 46, 47. 217 P.

Ali-Delille L., 2010, Les plantes médicinales d'Algérie, 2^{eme} éd., Alger, Éditions BERTI. Pp 68, 144. 239 P.

Aït Youssef M., 2006, Plantes médicinales de Kabylie, 1^{ere} éd., Paris, Éditions Ibis Press. Pp 204. 349 P.

Bachi F., 2006, Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. La lettre de l'Infectiologue - Tome 21 - n° 1, France, Éditions EDIMARK SAS. Pp 11, 12, 13, 14. 15 P.

Benhammou N., 2011, Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. Pp 9, 21, 22. 108 P.

Boudjellal K., 2009, Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. Thèse de Magister : Biochimie Appliquée. Université - El Hadj Lakhder - Batna. Pp 10, 11, 13, 14, 15, 16. 55 P.

Boullard B., 2001, Plantes médicinales du monde – croyances et réalités, 1^{ere} éd., Paris, Éditions ESTEM. Pp 340, 341. 636 P.

Bruneton J., 1999, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 3^{eme} éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc – Éditions médicales internationales. Pp 456, 457. 1120 P.

Bruneton J., 2009, Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 4^{eme} éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc – Éditions médicales internationales. Pp 375. 1288 P.

Belazzoug, S. 1982. Une épidémie de leishmaniose cutanée dans la région de M'sila (Algérie). Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique. **75** : 497-504.

Belazzoug S, Lannote G, Maazoun R, Pratlong, F, et Rioux J. A., 1985, Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908. Agent de la leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* **60**: 1-3.

Benikhlef R, Harrat Z, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali-Braham S, Belkaid M. 2004. Présence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien. *Méd Trop.* **64** : 381 - 383.

Boubidi, S.C., Benallal, K., Boudrissa, A., Bouiba, L., Bouchareb, B., Garni, R., Bouratbine, A., Ravel, C., Dvorak, V., Votypka, J., Volf, P. et Harrat, Z. 2011. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaia, south Algeria. *Microbes and Infection.* **13** : 691-696.

Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Riberio J., Sacks D. L., 1998, Development of natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effect 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.

Dedet P., 1999, Les leishmanioses. Colloque «Médecine tropicale» des universités francophones, Paris, Éditions Ellipses. 253 P.

Djerroumi A. et Nacef M., 2011, 100 plantes médicinales d'Algérie, 1^{ère} éd., Alger, Éditions HOUMA, Pp 49, 52, 159 P.

Djezzar-mihoubi I., 2006, Etude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire Ben Baddis de Constantine. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Université Mentouri Constantine. Pp 20. 119 P.

Do Socorro S., Rosa Mdo S., Mendonça-Filho R.R., Bizzo H.R., de Almeida Rodrigues I., Soares R.M., Souto-Padrón T., Alviano C.S., Lopes A.H., 2003, Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun; 47 (6) : 1895 – 901.

Estevez Y., 2009, Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle péruvienne et de molécules de synthèse ; étude relation structure activité. Thèse de Doctorat : Innovations pharmaceutiques. L'Université Toulouse III – Paul Sabatier. Pp 7, 18. 92 P.

Fournier P., 2010, Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France, Éditions Omnibus. Pp188, 1000 P.

Grimmett M., 1997, Synthèse d'imidazole et de benzimidazole. Éditions académique. Pp 2, 4, 5. 7 P.

Harrat Z., Pratlong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M. et Dedet J.P. 1996, *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. **90** : 625 - 629.

Harrat Z., Boubidi S.C., Pratlong F., Benikhlef R., Selt B., Dedet J.P., Ravel C. et Belkaid M., 2009, Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986) in Algeria. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. **103** : 716 - 720.

Hatimi M., Boudouma M., Bachichi N., Idrissi N.G., 2000, Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba alba* Asso. S. Thrapeutiques Manuscrit n°2162.

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.

Kumar A, Misra P, Dube A., 2013 Amplified fragment length polymorphism_: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. Parasitol Res. Feb ; 112(2): 457-66

Kirmizibekmez H, Atay I, Kaiser M, Yesilada E, Tasdemir D., 2013 In vitro antiprotozoal activity of extracts of five Turkish Lamiaceae species. Nat Prod Commun. 2011 Nov ; 6(11):1697-700.

Maamri S., 2008, Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Thèse de Magister : Biochimie et Microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. Pp 8. 112 P.

Marty P., 2010, Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement. La lettre de l'Infectiologue - Tome 25 - n° 5, France, Éditions EDIMARK SAS. Pp 186. 189 P.

Messai L., 2011, Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est algérien (*Artemisia herba alba* Asso). Thèse de Doctorat : Phytochimie. Université Mentouri Constantine. Pp 48, 49. 94 P.

Odonne G., 2010, Approche ethno-pharmacologique comparative des traitements phytothérapeutiques de la leishmaniose en Amazonie. Application aux communautés Chayahuita (Pérou) et du haut et moyen Oyapock (Guyane française). Thèse de Doctorat : Chimie des substances naturelles. Université des Antilles et de la Guyane. Pp 18, 238 P.

Otranto D., Dantas-Torres F., de Caprariis D., Di Paola G., Tarallo V.D., Latrofa M.S., Lia R.P., Annoscia G., Breitshwerdt E.B., Cantacessi C., Capelli G., Stanneck D., 2013., Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. PLoS One. ;8 (2):

Patrick M., 2008, Le grand Larousse des 15000 plantes et fleurs de jardin, 2^{ème} éd., Chine, Éditions PROTEA, Pp 499. 1080 P.

Pascal J.M. et Bachi J. 1936, Sur l'existence du bouton d'Orient au Mzab. Arch Inst Pasteur Algérie. **10** : 413 - 415.

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

Touil A., 2009, Etude du métabolisme secondaire de quelques plantes issues de la région du Hoggar. Thèse de Doctorat : Phytochimie. Université Mentouri Constantine. Pp 56, 64. 179 P.

Annexes

❖ Annexes

1. Préparation des milieux de culture

1. 1. Préparation du Milieu NNN

a) Composition

- Gélose : Bacto Agar Difco..... 10gr.
- NaCl..... 06gr.
- Eau distillée stérile..... 100 ml.
- Sang de lapin10 à 20 %.

b) Préparation

- ❖ **La gélose Bacto Agar** : elle est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80 °C. Le mélange est soumis à une agitation continue jusqu'à dissociation. Après distribution dans des tubes à essai de 8 ml et stérilisation (à l'autoclave 120 °C pendant 20 minutes), la conservation se fait à +4 °C.
- ❖ **Le sang de lapin** : 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 (2 ml 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.

1. 2. Préparation du milieu RPMI 1640 à 10 % :

a) Composition

- RPMI 164016,4 gr.
- Eau distillée stérile1000 ml.

b) Préparation

- ✓ Mesurer environ 900 ml d'eau distillée.
- ✓ Tout en soumettant l'eau distillée à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer.
- ✓ Ajouter 2ml de L-Glutamine, 50 U/ml de Pénicilline et 50 U/ml de Streptomycine.
- ✓ Compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000 ml.
- ✓ Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 µm.
- ✓ Additionner aseptiquement du Sérum de Veau Foetal (SVF) à 10 %.
- ✓ Conserver le milieu à +4 °C au réfrigérateur.

2. Principes de la numération cellulaire des parasites sur cellules de Thoma :

La numération cellulaire est la détermination du nombre de parasites contenus dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de numération en concentration cellulaire, c'est-à-dire le nombre de parasites par carreaux de la cellule.

2. 1. Techniques de numération cellulaire :

a) Dilution préalable :

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, la présence d'un grand nombre de parasites par unité de volume rend le comptage difficile.

b) Utilisation de la cellule de numération :

Présentation de la cellule de THOMA :

La cellule de numération de THOMA est une lame porte-objets dans laquelle est creusée une chambre de comptage d'un volume connu. C'est une lame épaisse, en verre, comportant des rigoles et un quadrillage (Figure 53). Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

Remplissage de la cellule de numération :

- a. Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22x22 mm.
- b. Faire adhérer la lamelle aux plateaux en exerçant une légère pression ainsi qu'un mouvement de va et vient jusqu'à percevoir une résistance jusqu'à créer un effet de ventouse.
- c. Placer la cellule de comptage sur une surface plane puis homogénéiser la suspension parasitaire.
- d. A l'aide d'une pipette Pasteur, remplir la chambre de comptage en une seule fois, en gardant la pointe de la pipette inclinée près de la lamelle, sans former de bulles d'air et sans faire déborder le liquide dans les rigoles pour ne pas fausser le comptage des parasites.
- e. Laisser la goutte se diffuser sur toute la surface de la plate-forme centrale du quadrillage.
- f. Laisser le liquide sédimenter quelques secondes avant de procéder à la numération.
- g. Laver puis sécher la cellule de **THOMA** après utilisation.

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 (1 rectangle par champ). Compter les cellules contenues dans 6 des 100 rectangles du quadrillage.

Calcul de la concentration cellulaire :

La concentration cellulaire de la suspension de cellule de **THOMA** est calculée par la loi suivante :

$$\text{(Nombre de cellules (parasites) / 6) x 16 x (1/dilution) x } 10^4 \text{ cellules/ml.}$$

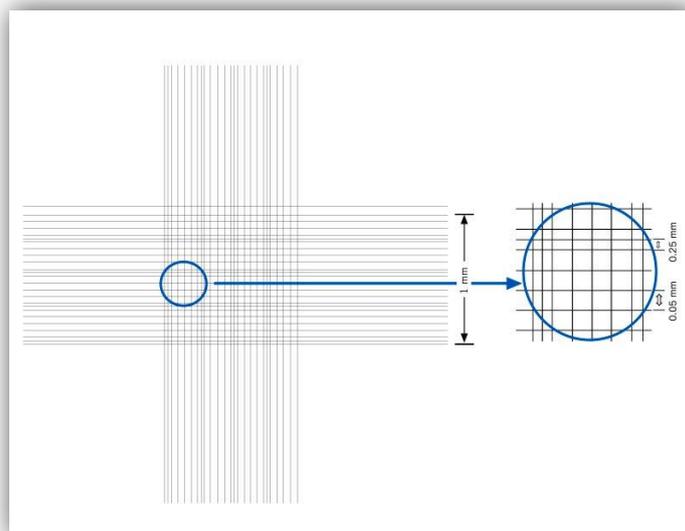


Figure 30 : Quadrillage de la cellule de numération « Thoma » vu sous microscope photonique.

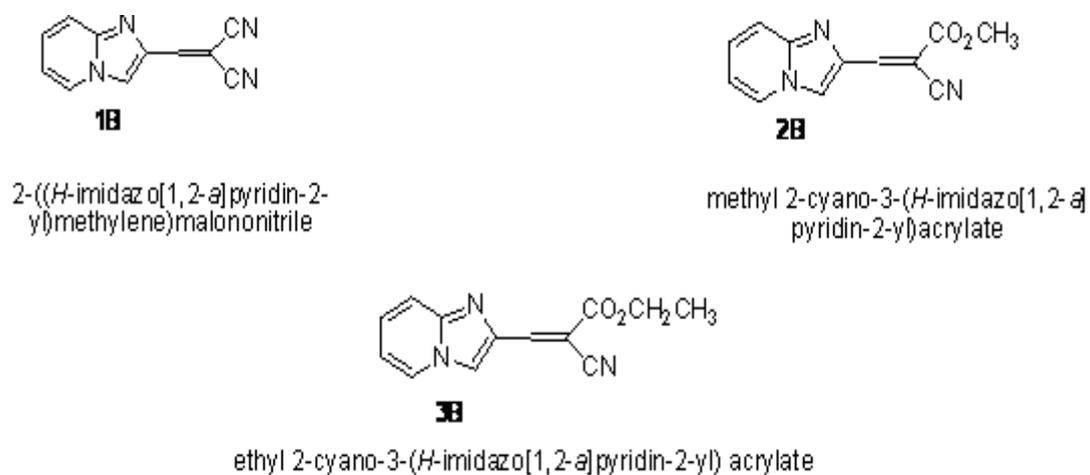
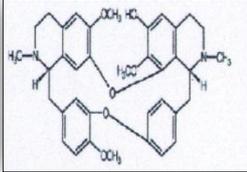
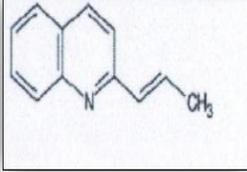
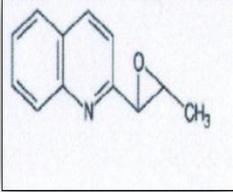
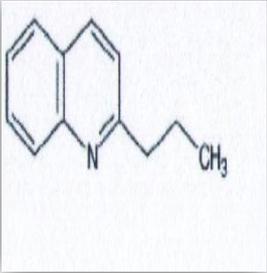


Figure 31 : Les structures moléculaires des 3 imidazoles testés.

Tableau I : Molécules d'origine naturel avec des activités antileishmanienne (Acebey, 2007).

| N° | Tests développés, mécanisme d'action et Structure |
|----|--|
| 1 | <p>In vitro : actif sur promastigotes de <i>L. donovani</i> avec une concentration inhibitrice minimale (MIC) de 1µg/ml. Cette activité n'est pas sélective sur la phase intramacrophagique.</p> <p>Mécanisme : Inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme Topoisomerase I.</p> <div data-bbox="703 591 975 770" data-label="Chemical-Block"> </div> |
| 2 | <p>In vitro : actif sur des amastigotes intramacrophagiques de <i>L. braziliensis</i></p> <p>Oralement : sur des hamsters infectés avec <i>L. braziliensis</i> n'empêcha pas la formation d'ulcères à une dose de 300 mg/kg/jour pendant 42 jours. La différence d'activité est peut être due à la métabolisation du lapachol en métabolite inactif.</p> <p>Mécanisme : Production de radicaux oxygénés.</p> <div data-bbox="695 1122 983 1335" data-label="Chemical-Block"> </div> |
| 3 | <p>In vitro : actif sur promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> (CI90 = 10 µg/ml).</p> <p>Administration subcutanée : actif sur des souris infectées avec <i>L. amazonensis</i> et <i>venezuelensis</i> à 25mg/kg/jour (activité semblable au Glucantime® 56 mgSbV/kg/jour).</p> <p>In vivo : administré proche du point de piqûre, plus actif que le Glucantime® (50mg/kg/jour vs. 112 mgSbV/kg/jour respectivement). Test réalisé sur des souris infectées avec <i>L. amazonensis</i>.</p> <p>Ce composé montre des activités cytotoxique, carcinogénique et mutagénique.</p> <div data-bbox="715 1816 967 2007" data-label="Chemical-Block"> </div> |

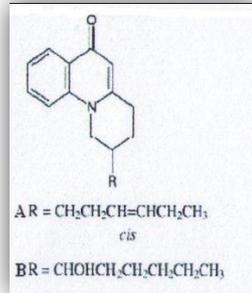
| | |
|-----------------|--|
| <p>4</p> | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>donovani</i> et <i>amazonensis</i> (CI90 = 5µg/ml).</p> <p>In vitro : actif sur des amastigotes de <i>L. amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec une CI50 de 0,42 et 1,1 µg/ml respectivement. De plus, à 10 µg/ml l'indice de survie (SI) des parasites est de 16,5% et à cette concentration il est remarqué une absence de toxicité sur les macrophages.</p> <p>In vivo : activité détectable à 2,5 mg/kg/jour sur <i>L. amazonensis</i> et 5 mg/kg/jour sur <i>L. venezuelensis</i></p> <p>Mécanisme : production de radicaux oxygénés.</p> <div data-bbox="722 622 959 891" data-label="Chemical-Block"> <p>The image shows the chemical structure of a naphthoquinone derivative. It consists of two fused benzene rings. The right ring has two carbonyl groups (C=O) at the 1 and 4 positions. A hydroxyl group (-OH) is attached to the left ring at the 8 position. A methyl group (-CH₃) is attached to the right ring at the 2 position.</p> </div> |
| <p>5</p> | <p>In vitro : actif sur plusieurs espèces de <i>Leishmania</i> à une concentration de 10µg/ml.</p> <p>In vitro : actif sur les amastigotes de <i>L. major</i> qui infectent des macrophages intrapéritonéaux de souris à une concentration effective CE50 = 10µg/ml.</p> <p>In vivo : faiblement actif en application cutanée sur lésions ulcéraives de leishmaniose cutanée.</p> <div data-bbox="715 1223 970 1429" data-label="Chemical-Block"> <p>The image shows a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring fused to a six-membered ring containing an oxygen atom. This is further fused to a seven-membered ring containing a nitrogen atom. There are two methoxy groups (-OCH₃) attached to the benzene ring at the 3 and 4 positions.</p> </div> |
| <p>6</p> | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> avec un IC100 = 100µg/ml (<i>A. spinescens</i>).</p> <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> avec un IC100 = 5µg/ml (<i>R. emarginata</i>).</p> <p>(2 résultats différents pour la même molécule).</p> <div data-bbox="722 1709 959 2000" data-label="Chemical-Block"> <p>The image shows a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring fused to a six-membered ring containing an oxygen atom. This is further fused to a seven-membered ring containing a nitrogen atom. There is a carbonyl group (-C=O) attached to the benzene ring at the 1 position.</p> </div> |

| | |
|----|---|
| 7 | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> à 10 µg/ml.</p> <p>In vivo presque aussi actif (100mg/kg/j) que le Glucantime® (56mg/kg/j) sur des souris infectées avec <i>L. amazonensis</i>.</p>  |
| 8 | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un IC90 = 25µg/ml (Glucantime® CI90 > 100µg/ml).</p>  |
| 9 | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un IC90 = 25µg/mL (Glucantime® CI90 > 100 µg/ml).</p> <p>Subcutanée : à une dose de 0,54 mmol/kg/jour/pendant 10 jours inhibe 86,6 % des parasites dans le foie de souris BALB/c infectées avec <i>L. donovani</i> (Glucantime® à 56 mg/kg/jour pendant 10 jours inhibe 97,4%).</p>  |
| 10 | <p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un CI90 = 50 µg/ml (Glucantime® CI90 > 100µg/ml).</p> <p>Oralement : à une dose de 0,54 mmol/kg/jour/pendant 10 jours inhibe 99,9% des parasites dans le foie de souris BALB/c infectées avec <i>L. donovani</i> (Glucantime® à 56 mg/kg/jour pendant 10 jours inhibition parasitaire de 89,8%).</p>  |

11 *In vitro* : produit la lyse totale de promastigotes de *L. amazonensis* à 100µg/ml.

Ils sont moins actifs sur *L. braziliensis* à la même concentration.

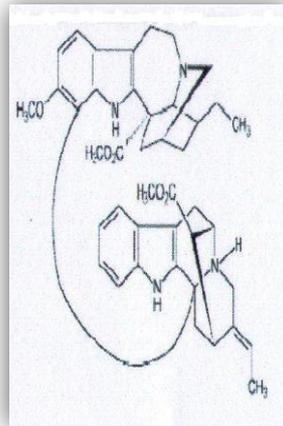
Ces composés sont 10 fois moins actifs que la pentamidine (CI100 = 5 µg/ml).



12 *In vitro* : actif sur promastigotes de *L. amazonensis* et *braziliensis*

In vitro : actif sur des amastigotes de *L. amazonensis* à 25 µg/ml avec un Indice de Survie (IS) des parasites de 3%.

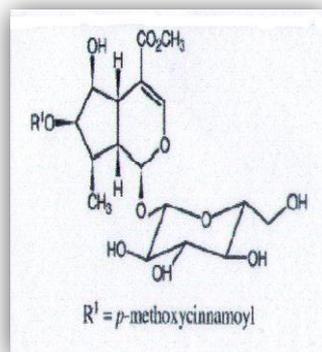
In vivo : ce composé n'est pas actif sur des tests *in vivo* peut être dû à une possible inactivation dans le hôte.



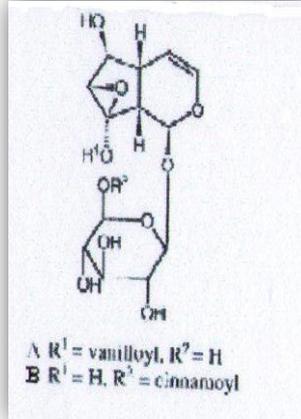
13 *In vitro* : actif sur des amastigotes de *L. donovani*.

Oralement actif sur des hamsters infectés avec *L. donovani* à 100 mg/kg/5jours

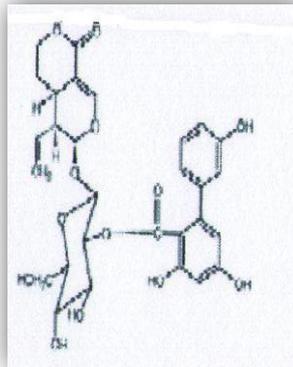
Par voie intraperitonéale actif sur des hamsters infectés avec *L. donovani* à 100 mg/kg/5jours. L'extrait montre une activité immunostimulante sur souris BALB/c.



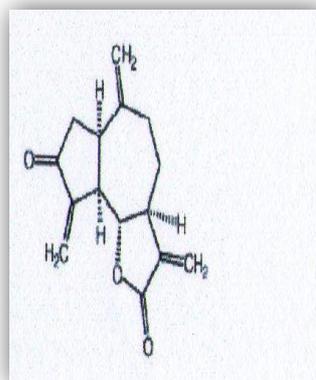
- 14** *In vivo* protège contre l'infection d'hamsters par *L. donovani*.
Prévention des dommages hépatiques causés par la pentamidine.
Proposé comme adjuvant à fin d'augmenter l'efficacité des médicaments
Augmentation de la réponse immunitaire non spécifique.



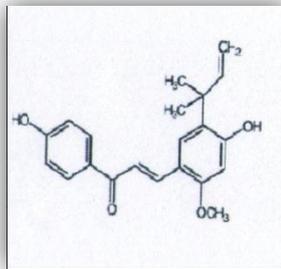
- 15** *In Vitro* : actif sur *L. donovani* à une concentration de 30 μ M
Topoisomerase I : Inhibition activité catalytique de l'Enzyme.



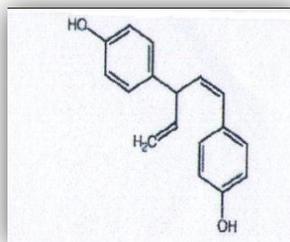
- 16** *In vitro* : actif sur des promastigotes des différentes souches avec des CI50 comprises entre 2,5 à 10 μ g/ml.
Sur des promastigotes de *L. mexicana* et *amazonensis* le CI90 = 25 μ g/ml.
In vivo : il se remarque une diminution de la sévérité des lésions causées par *L. amazonensis* sur des souris BALB/c.



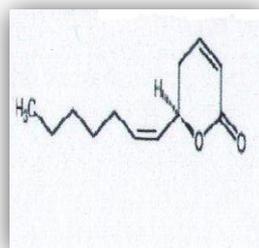
17 **In vitro** : actif sur des promastigotes de *L. donovani* et *major*
In vivo : inhibition des parasites de *L. major* dans des monocytes dérivés de macrophages du système sanguin périphérique humain à 1,4 μM
Oralement et par voie péritonéale : à des doses orales 5-150 mg/kg/jour et intrapéritonéal à 20 mg/kg/jour e (6 jours) réduction des parasites (en foie et rate) de 65-85% et de 96% respectivement sur souris BALB/c infectées avec *L.major*
Voie péritonéale : à 2,5 mg/kg/jour prévient le développement des lésions sur des souris BALB/c infectées avec *L.major*
 Peut induire la suppression du système immunitaire, inhibition des lymphocytes.
 Altération de l'ultra-structure mitochondriale, affecte la chaîne respiratoire du parasite sans dommage sur les macrophages ou leur fonction phagocytaire.



18 **In vitro** : actif sur des promastigotes de *L. major* avec une CI50 49 μM (semblable au pentostan avec un CI50 = 53 μM)
 Effets inhibiteur sur les lymphocytes humains à la même concentration.



19 **In vitro** : actif sur des promastigotes de *L. donovani*, *amazonensis* et *major*
Administration subcutanée : sur des souris infectées par *L. amazonensis* à une dose de 25 mg/kg/jour pendant 14 jours, il réduit la taille de la lésion (résultats semblables au Glucantime®).



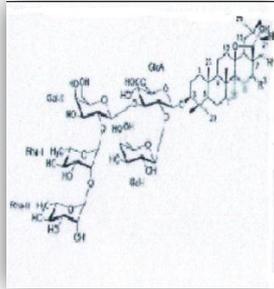
20

In vitro : actif sur des macrophages infectés par *L. infantum* avec un CI50 = 0,04 µg/ml (concentration cytotoxique sur macrophages de souris et sur de fibroblastes humains est respectivement de 1 µg/ml et >32 µg/ml).

Administration subcutanée : une seule dose de 0,4 mg/kg le lendemain de l'infection (ou une dose 4 fois plus importante 14 jours après l'infection) réduit 95% des parasites (foie). (Pentostam[®] à 250 mg/kg dose unique, à 1 et 14 jours après l'infection montre une inhibition de 95% des parasites)

Une dose unique à 2,5 mg/kg ; 5 jours avant l'infection prévient l'infection du foie.

Oralement : à 200 mg/kg/jours pendant 5 jours n'est pas actif.



21

In vitro : actif sur des promastigotes de *L. amazonensis* CI50 = 0,37 µg/ml.

Sur la phase intramacrophagique à une concentration de 0,81 µg/ml, l'indice de survie (SI) des parasites est de 50%.

Ce composé ne montre pas d'effets toxiques sur des cultures des macrophages (J774G8).

Il semblerait agir sur l'activité de l'enzyme cystéine protéase. Cela peut être lié aux changements dans la morphologie du parasite.

