



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**  
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département Biochimie-Microbiologie**

## **Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**  
**Option : Biotechnologie microbienne**

### *Thème*

# **Etude de l'activité antileishmanienne de l'acide gallique et de la vanilline**

*Réalisé par : SMAIL Lila et ZITOUNI Ouerdia*

*Soutenu le 26/10/2016 devant le jury composé de :*

Présidente :	Mme ZENNIA Saliha	MCB	UMMTO
Promotrice :	Mme TAZDAÏT Rym	MCB	UMMTO
Co-promotrice:	Mme EDDAIKRA Naouel	MR	IPA
Examineurs :	Mme HACID Fatma	MCB	UMMTO
	Mr MOULOUA Abdel kamel	MCB	UMMTO

Année universitaire : 2015 / 2016

## Remerciements

En premier lieu, nous remercions le bon DIEU de nous avoir donné la force et la volonté pour arriver à terme de ce travail qui représente le fruit de plusieurs années d'études.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du service d'éco-épidémiologie parasitaire de l'institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Dély Ibrahim).

Nous tenons à remercier Madame TAZDAÏT Rym Maître de conférences B à l'UMMTO, pour nous avoir proposé et dirigé ce sujet. Nous la remercions également pour nous avoir fourni les extraits biologiques testés dans la présente étude. Ses conseils avisés et ses remarques pertinentes nous ont apporté aide et soutien pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous tenons, aussi, à remercier Madame EDDAIKRA Naouel, Maître de recherche au service d'éco-épidémiologie parasitaire à l'IPA. Pour avoir codirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, elle a toujours bien veillé à ce que ce travail aboutisse et elle nous a toujours encouragés pour aller plus loin dans notre travail. Nous la remercions pour la confiance et la compréhension qu'elle a manifestée à nos égards. Nous avons pris plaisir à travailler avec elle.

Nous adressons nos remerciements au Docteur HARRAT Zoubir, Directeur de recherches au service d'éco-épidémiologie parasitaire à l'IPA, pour nous avoir accueilli au sein de son service, voulons croire, Monsieur, en nos parfaite considération.

Que tous ceux, qu'on n'a pas nommé, et qui de prêt ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce modeste travail :

Président : Mme ZENNIA Saliha maître de conférences B à l'UMMTO

Examineurs : Mme HACID Fatma maître de conférences B à l'UMMT

Examineurs : Mr MOULOUA Abdel Kamel maître de conférences B à l'UMMTO

**Merci**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents, ma mère qui m'a toujours encouragé  
et soutenu, ainsi que mon père pour sa patience et son  
sacrifice, que dieu les bénisses.*

*Mes très chers frères : Yacine, Ahmed et Massinissa.*

*Mes très chères sœurs : Kahina, Sadia et Chahrazed.*

*MES neveux Yanis, Amir et ma nièce Dalia.*

*Ma belle-sœur Fatima.*

*Mon beau-frère Arezki.*

*A tous mes amis et mes proches :ouerdia.*

*A toutes la famille Zenia.*

*Lila*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A Mes très chères parents MOHAMED et MOURA*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que*

*vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessés de me*

*donner depuis ma naissance, jusqu'à aujourd'hui.*

*C'est grâce à vous que je suis arrivé à cette étape.*

*Je saurai vous rendre fiers inshallah !*

*A Mon frère FATEH*

*A mes Chères Sœurs LYDIA et RYMA*

*A mes beaux-frères ABDENOUR et HACEN*

*A ma nièce YASMINE*

*A Mes chères tantes SADIA et ZOËRA*

*A mes chères amies*

*LILA, MADJID et SARAH*

*Ouerdia*

## Liste des abréviations

---

**DMSO** : DiMéthyle SulfOxyde

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire

**IFI** : Immuno-fluorescence indirect

**IP** : Indice Parasitaire

**IPA** : Institut Pasteur d'Algérie

**LC** : Leishmaniose Cutané

**LCM** : Leishmaniose Cutané-Muqueuse

**LV** : Leishmaniose Viscérale

**LVZ** : Leishmaniose Viscérale Zoonotique

**RPMI**: Roswel Park Memorial Institute Medium

**SbIII**: Antimoine trivalent

**SDS**: Sodium Dodécyl Sulphate

**SVF**: Sérum Veau Foetal

**THP-1** : lignée humaine de monocytes cancéreuse

## Liste des figures

---

<b>Figure1</b> : Distribution de la leishmaniose dans le monde .....	3
<b>Figure2</b> : Répartition géographique de la leishmaniose viscérale en Algérie .....	6
<b>Figure3</b> : Distribution géographique de la leishmaniose cutanée causée par <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> et <i>L. tropica</i> en Afrique du Nord .....	7
<b>Figure4</b> : Aspect microscopique de forme promastigote dans une culture .....	9
<b>Figure5</b> : Aspect microscopique de forme amastigote dans un macrophage .....	9
<b>Figure6</b> : Cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	11
<b>Figure7</b> : Morphologie d'un phlébotome adulte .....	12
<b>Figure8</b> : Cas clinique de la leishmaniose cutanée.....	15
<b>Figure9</b> : Cas clinique de la leishmaniose cutanée diffuse et cutanéomuqueuse.....	16
<b>Figure10</b> : Enfant atteint de la leishmaniose viscérale.....	17
<b>Figure11</b> : Aspect de la leishmaniose canine .....	18
<b>Figure 12</b> : La structure chimique de l'acide gallique.....	23
<b>Figure 13</b> : La structure chimique de la vanilline .....	24
<b>Figure 14</b> : Microplaque à 96 puits avec MTT (puits jaune).....	30
<b>Figure 15</b> : Chambre de Labtek.....	32
<b>Figure 16</b> : Valeurs des concentrations d'acide gallique (E2), de la vanilline(E3) et d'antimoine trivalent (Sb III) inhibant 50% de <i>L. infantum</i> .....	36
<b>Figure 17</b> : Valeurs des concentrations d'acide gallique(E2), de vanilline(E3) et d'antimoine trivalent (Sb III) inhibant 50% de <i>L. major</i> .....	38
<b>Figure 18</b> : Valeurs des concentrations d'acide gallique(E2), de vanilline(E3) et d'antimoine trivalent (Sb III) inhibant 50% de <i>L. killicki</i> .....	40
<b>Figure 19</b> : Valeurs des concentrations d'acide gallique(E2) et de vanilline (E3) inhibant 50% des cellules THP-1. ....	42

## Liste des figures

---

<b>Figure 20</b> : Valeurs des concentrations d'acide gallique(E2) et de vanilline(E3) inhibant 50% des <i>L.infantum</i> intramacrophagiques.....	44
--	----

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I</b> : Exemples d'espèces de <i>Leishmania</i> .....	5
<b>Tableau II</b> : Caractéristique des souches utilisées dans les tests de sensibilité promastigote et amastigote.....	27
<b>Tableau III</b> : Résultats de la viabilité de <i>L. infantum</i> LIPA15/05 après 72h d'incubation en absence et en présence d'extraits biologiques.....	35
<b>Tableau IV</b> : Résultats de la viabilité de <i>L. major</i> LIPA 32/06 après 72h d'incubation en absence et en présence d'extraits biologiques.....	37
<b>Tableau V</b> : Résultats de la viabilité de <i>L. tropica (killicki)</i> LIPA 281/11après 72h d'incubation en absence et en présence d'extraits biologiques.....	39
<b>Tableau VI</b> : Résultats de l'étude de l'activité cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline sur les cellules THP-1 après 72h d'incubation.....	41
<b>Tableau VII</b> : Indices de sélectivité calculée pour l'acide gallique et la vanilline .....	42
<b>Tableau VIII</b> : Indices parasitaires obtenus en présence d'acide gallique.....	43
<b>Tableau IX</b> : Indices parasitaires obtenus en présence de vanilline.....	43

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste de figures

Liste des tableaux

## Sommaire

Introduction .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
1. Répartition géographique et situation épidémiologique.....	3
1.1. Dans le monde.....	3
1.2. En Algérie .....	5
1.2.1. Leishmaniose viscérale .....	5
1.2.2. Leishmaniose cutanée .....	6
1.2.3. Leishmaniose canine .....	8
2. Le parasite .....	8
2.1. Taxonomie.....	8
2.2. Biologie des <i>Leishmania</i> .....	9
2.2.1. Le stade promastigote.....	9
2.2.2. Le stade amastigote .....	9
2.3. Génome .....	10
2.3.1. Génome nucléaire.....	10
2.3.2. Génome kinétoplastique .....	10

2.4. Cycle de vie et mode de transmission .....	11
3. Le vecteur .....	12
3.1. Biologie des phlébotomes .....	13
4. Hôtes réservoirs .....	13
5. Aspects cliniques des leishmanioses chez l'être humain .....	14
5.1. Les leishmanioses cutanées. ....	14
5.1.1 Leishmaniose cutanée localisée .....	14
5.1.2. Leishmaniose cutanée diffuse .....	15
5.1.3 Leishmaniose cutanéomuqueuse ou Espundia .....	15
5.2. Leishmaniose viscérale .....	16
6. Aspects de la leishmaniose canine .....	17
7. Diagnostic de la leishmaniose .....	18
8. Traitement .....	19
8.1. Traitement de la leishmaniose cutanée.....	19
8.1.1. Les sels organiques.....	19
8.1.2. Les sels pentamidine .....	19
8.1.3. L'Amphotéricine B .....	19
8.1.4. Kétoconazol.....	20
8.1.5. Autres traitements généraux .....	20
8.2. Traitement de la leishmaniose viscérale.....	20
8.2.1. Traitement de première intention .....	20
8.2.2. Les alternatives thérapeutiques .....	21
8.2.2.1 Les polyènes .....	21

8.2.2.2. Les pentamidines .....	21
8.2.2.3. Les miltéfosines (Impovido®). .....	21
8.2.2.4. Allopurinol (Zyloric ®).....	22
8.3. Traitement de la leishmaniose canine .....	22
9. Rappel.....	23
9.1. Acide gallique .....	23
9.2. Vanilline .....	24

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

1. Matériel .....	25
1.1. Matériel non biologique .....	25
1.1.1. Appareillage .....	25
1.1.2. Petit matériel .....	25
1.1.3. Réactifs et solutions .....	26
1.2. Matériel biologique .....	26
1.2...1. Les souches utilisées .....	26
1.2.2. Lignée cellulaire THP-1 .....	27
1.2.3. Les extraits étudiés .....	27
1.2.4. Les milieux de culture .....	27
2. Méthode.....	28
2.1. Etude de la solubilité de la vanilline et de l'acide gallique .....	28
2.2. Culture des Leishmanies .....	28
2.3. Culture des cellules THP-1 .....	28
2.4. Etude de l'activité leishmanicide .....	29

2.4.1. Test MTT.....	29
2.4.1.1. Principe.....	29
2.4.1.2. Protocole.....	29
2.4.2. Calcul d'IC <sub>50</sub> .....	30
2.4.3. Test de cytotoxicité .....	30
2.4.3.1. Révélation avec le bleu de Trypan .....	31
2.4.3.2. Révélation avec le MTT .....	31
2.4.4. Test intramacrophagique à partir des promastogotes .....	31
2.4.4.1. Transformation de monocytes THP-1 à macrophages .....	31
2.4.4.2. Infection des macrophages .....	32
2.4.4.3. Contact avec les différentes concentrations d'extraits à tester .....	32
2.4.4.4. Lecture.....	33
2.5. Calcul de l'indice de sélectivité.....	33

### **Chapitre III : Résultats et Discussion**

1. Résultats .....	34
1.1. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de <i>Leishmaniainfantum</i> .....	34
1.2. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de <i>Leishmania major</i> .....	36
1.3. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de <i>Leishmania killicki</i> .....	38
1.4. Résultats de l'activité cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline sur la lignée cellulaire THP-1.....	40
1.5. Indices de sélectivité .....	42

1.6. Résultats de l'activité leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme amastigote de *L.infantum* ..... 43

2. Discussion ..... 44

Conclusion..... 47

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

# Introduction

## Introduction

---

Les leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires vectorielles très diverses et complexes dans leur écologie et leur épidémiologie. Elles sont dues à un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Ces parasites affectent aussi bien l'être humain que l'animal, à travers le monde. Ils sont transmis par la piqure infectante d'un insecte vecteur, le phlébotome. Largement répandues à la surface du globe, les leishmanioses connaissent une aire géographique intertropicale, mais débordent largement sur les zones du sud de l'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie et d'Amérique. Elles posent de nos jours d'importants problèmes de santé publique dans de nombreux pays.

Les leishmanioses sont endémiques dans 98 pays dont 72 sont des pays en développement. L'OMS a estimé que 350 millions de personnes sont exposées à la maladie. 14 millions de personnes sont atteintes de leishmaniose et qu'il y'a environ 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an (OMS, 2014).

L'Algérie, qui compte parmi les pays les plus touchés, est concernée par cette zoonose qui sévit à l'état endémique sous deux formes cliniques : la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée (LC).

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires pour lesquelles les traitements disponibles reposent essentiellement sur des composés découverts il y a plus de 50 ans. Il s'agit des sels d'antimoine et de l'amphotéricine B. Ces médicaments sont coûteux, toxiques et causent des résistances chez les patients. De plus, ces traitements, nécessitant généralement une administration par voie générale, s'avèrent lourds car ils requièrent une hospitalisation. De ces faits, la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère impérative.

Bien qu'une grande partie du XX<sup>ème</sup> siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs, via le criblage de sources naturelles, a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles dans le traitement de nombreuses maladies humaines. A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent les premiers réservoirs de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules à effet leishmanicide.

L'Algérie, de par sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques induisant une biodiversité de plantes utilisées aussi bien en thérapeutique qu'en nutrition.

## Introduction

---

Ainsi, la présente étude vise à mettre en évidence les propriétés antileishmaniennes de certaines plantes médicinales. Elle a consisté en :

- un criblage primaire et secondaire sur les formes promastigotes de trois espèces de *Leishmania* responsables de la leishmaniose cutanée (*Leishmania major* et *L. killicki*) et de la leishmaniose viscérale (*L. infantum*),
- un test de cytotoxicité sur les THP-1,
- une étude de l'activité inhibitrice de nos produits sur les formes amastigotes intramacrophagique de *L. infantum* pour la détermination des IC<sub>50</sub>.

Chapitre I :  
Synthèse  
bibliographique

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*. Il s'agit d'une parasitose à distribution mondiale. Elles sont transmises lors de la pique d'un insecte diptère, le phlébotome femelle du genre *Phlebotomus*. (SAMBA *et al.*, 2013.). Chez l'être humain, la maladie peut se présenter sous 3 formes : la forme viscérale, la forme cutanée de type localisée ou diffuse et la forme cutanéomuqueuse. Cette multiplicité de tableaux cliniques résulte à la fois d'un large éventail d'espèces de *Leishmania* poussé dans des tropismes distincts pour les organes profonds, la peau ou les muqueuses de la face ; ainsi que de la variation de la réponse immunitaire de l'hôte infecté (DEDET *et al.*, 2009).

### 1. Répartition géographique et situation épidémiologique

#### 1.1. Dans le monde

La leishmaniose est une maladie très fréquente dans le monde, répartie sur quatre continents : Afrique, Amérique, Asie et Europe ; elle n'est pas endémique dans le sud de l'Asie et l'Australie et cela est dû à l'absence de vecteurs (Figure 1). Par contre, elle est endémique dans les régions tropicales et sub-tropicales dans 98 pays dont 72 pays en développement (ALVAR *et al.*, 2012 ; OMS, 2014). Elle affecte de très nombreuses espèces de mammifères.



**Figure 1** : Distribution de la leishmaniose dans le monde (HANDMAN, 2001).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

---

La leishmaniose touche environ 12 millions d'individus, avec 2 millions de nouveaux cas chaque année (500000 cas pour la LV et 1,5 millions pour la LC). Selon les données de l'OMS 350 millions d'individus sont à risque (OMS, 2010). L'Afrique est le continent le plus touché, en particulier le Maroc, l'Algérie, le Soudan, la Tunisie, l'Ouganda, le Kenya et l'Éthiopie (DJEZZAR-MIHOUBI, 2006).

La leishmaniose canine est répandue dans de nombreux pays du monde, notamment, l'Italie, l'Espagne et le Portugal, pays dans lesquels pratiquement toutes les régions sont contaminées. Sa répartition géographique est liée à l'habitat de l'insecte vecteur (DJEZZAR-MIHOUBI, 2006). La population canine constitue un réservoir de parasites potentiellement transmissibles à l'homme. 25 millions de chiens : 2/3 des chiens sont exposés en zone méditerranéenne, 10% des chiens sont infectés, 5% développent la maladie et meurent précocement en absence ou en cas d'échec du traitement (MOULOUA, 2014).

Les différentes manifestations cliniques sont observées dans l'Ancien et le Nouveau Monde mais elles ne sont pas toujours provoquées par les mêmes espèces de *Leishmania* (Tableau I) et elles sont transmises par différentes espèces de vecteurs (SENGHOR, 2011).

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

**Tableau I :** Exemples d'espèces de *Leishmania* (d'après Roberts et Janovy, 2000 in FORGET, 2004).

Syndrome	Distribution	Espèces
LC	Ancien Monde	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. donovani</i>
	Nouveau Monde	<i>L. Mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>
LC/LCM	Nouveau Monde	<i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i>
LV	Ancien Monde	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
	Nouveau Monde	<i>L. chagasi</i>

### 1.2. En Algérie

L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés dans le monde, selon le Ministère de la santé, un totale de 7784 cas de leishmaniose a été déclaré en 2008 (RAMLI, 2013). Les leishmanioses sont signalisées sur tout le territoire national. Au nord, c'est surtout la forme viscérale qui sévit, frappant particulièrement les enfants alors qu'au sud la forme cutanée est plus importante (BERCHI *et al.*, 2007).

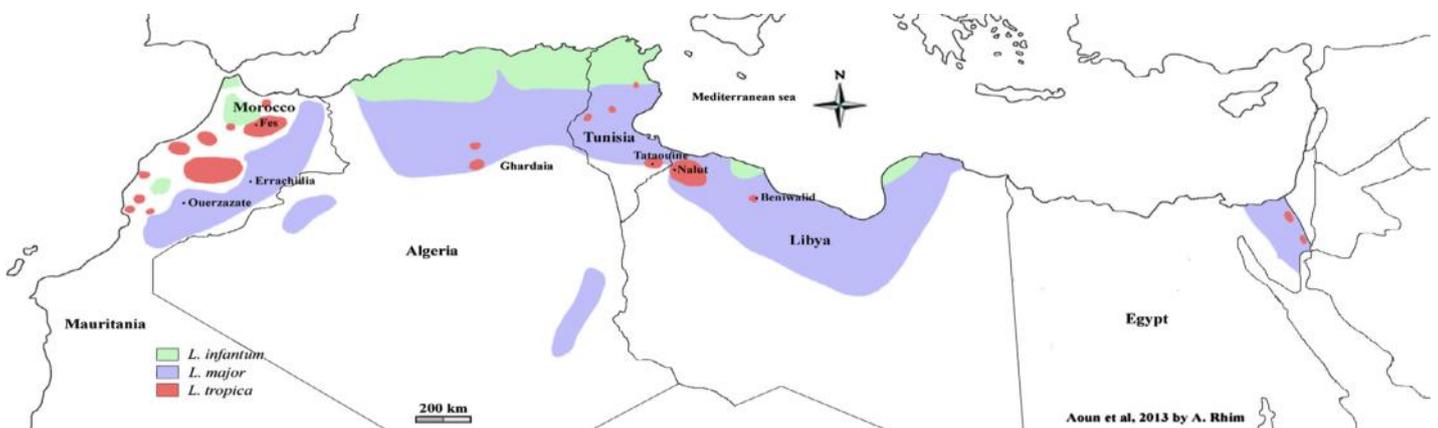
#### 1.2.1. Leishmaniose viscérale

La LV est une maladie parasitaire causée par *L. infantum*. Sa répartition géographique (Figure 2) couvre toutes les régions humides et subhumides dans le nord du pays, et de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi-arides et arides (ADEL *et al.*, 2014). Il s'agit surtout des wilayas de M'sila, de Batna et de Biskra (HARRAT *et al.*, 1995). Les plus anciens foyers



foyers sont apparus au niveau des étages arides, particulièrement à El Oued, Ghardaïa, Béchar et Laghouat. D'autres foyers sont apparus au nord du pays ; ils concernent les wilayas de Batna, Médéa, Tiaret et Bordj Bou Arredj (BACHI, 2006). Le vecteur est *Phlebotomu spapatasi*. Les hôtes réservoirs sont *Meriones shawi* (rongeur sauvage) et *Psammomy sobesus* ou rat de sable. Ce dernier est généralement considéré comme le principal réservoir de *L. major* en Afrique du Nord (CHAARA *et al.*, 2014). La fréquence exacte de LCZ est difficile à apprécier, on estime son incidence à plus de 2000 nouveau cas par an (DJEZZAR-MIHOUBI *et al.*, 2006).

Au nord du pays (Figure 3), la LC due à *L. infantum* fut décrite, pour la première fois, sous le nom de « clou de Mila » par Sergent qui rapporté le premier cas en 1923 (HARRAT *et al.*, 1995). Elle est transmise par *L. infantum* Mon 24, l'un des principaux agents responsables de LC sporadiques, mais aussi *L. infantum* Mon1 et *L. infantum* Mon 80, tous deux isolés d'une femelle *Phlebotomus perfiliewi* à Ténès (HARRAT *et al.*, 1996 ; MIHOUBI *et al.*, 2006). Elle est transmise par la piqure de *P. perfiliewi* et le chien est soupçonné en être le réservoir (CHARRA *et al.*, 2014). Les foyers les plus touchés sont Tizi-Ouzou, Ténès, Bordj Menaiel, Bouira, Meftah, Larbaa et Alger (BACHI, 2006).



**Figure3:** Distribution géographique de la LC causée par *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica* en Afrique du Nord (AOUN et BOURATBINE, 2014).

Au sud du pays, la LC est due à *L. Killicki zymodème* MON-301 ; le vecteur étant *Phlebotomus sergenti* et le réservoir est un rongeur *Massoutiera Mzabi* (le Goundie du Mzab) (FENDI *et al.*, 2012).

### 1.2.3. Leishmaniose canine

En Algérie, la première observation de la leishmaniose canine a été rapportée par Sergent et Sergent en 1910 (DJERBOUHA *et al.*, 2005). Elle est de plus en plus fréquente à Alger, ce qui explique la survenue de cas de leishmaniose chez les enfants n'ayant jamais quitté la capitale. Cependant, il est tout indiqué actuellement de faire un dépistage beaucoup plus important pour situer la prévalence de la maladie chez le chien dans notre pays (IZRI *et al.*, 1992 ; HARRAT *et al.*, 1995).

## 2. Le parasite

### 2.1. Taxonomie

Les leishmanies sont des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* ; la place de ce genre dans la classification de Adl *et al.*, (2005) est la suivante :

Règne : Protista

Sous-Règne : Protozoa

Embranchement : Sarcomastigophora

Sous-Embranchement : Mastigophora

Classe : Zoomastigophorea

Ordre : Euglenozoa

Sous-ordre : Kinetoplastea

Famille : Metakinetoplastina

Genre : *Leishmania*

### 2.2. Biologie des *Leishmania*

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des kinétoplastidés et à la famille des trypanosomatidés. Ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades

successifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré.

### 2.2.1. Le stade promastigote

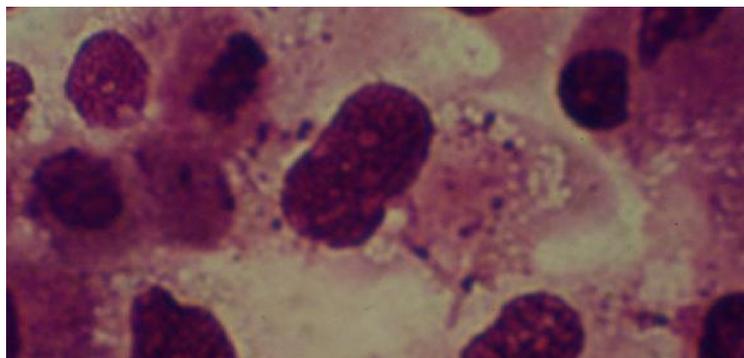
Au stade promastigote, l'organisme est allongé (environ 10 à 25  $\mu\text{m}$  de longueur). Le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en position antérieur et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure (Figure 4). C'est le stade que présente le parasite dans le tube digestif du phlébotome et en culture (DEDET,2009).



**Figure 4:** Aspect microscopique de forme promastigote dans une culture (HADJ SLIMANE, 2012).

### 2.2.2. Le stade amastigote

Au stade amastigote, le parasite est un petit corpuscule ovalaire ou arrondi, de 2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre, présentant un noyau, un kinétoplaste, et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur (Figure 5). C'est le stade du parasite retrouvé à l'intérieur des cellules du système des phagocytes mononucléés chez les mammifères (DEDET, 2009).



**Figure 5 :** Aspect microscopique de forme amastigote dans un macrophage.

### 2.3. Génome

#### 2.3.1. Génome nucléaire

L'ADN nucléaire varie de 29 Mb pour *Leishmania amazonensis*, à 33 Mb pour *L. major*, *L. infantum* et *L. braziliensis* (PEACOCK, 2007 ; REAL,2013). Il est organisé en un nombre variable de chromosomes : 34 pour *L. amazonensis* et *L. mexicana*, 35 pour *L. braziliensis*, et 36 pour *L. major*, *L. donovani*, et *L. infantum* (REAL,2013). L'ADN des leishmanies est dépourvu d'introns et il se découpe en grandes unités polycistroniques (MYLER,2000). Il est très riche en G/C (60% en moyenne) (ALVER, 1994), et contient assez peu de séquences répétées (OUELETTE, 2003). L'état de ploïdie s'oriente fortement vers la diploïdie ou l'aneuploïdie. En effet, des doubles knock-out de gènes sont nécessaires pour influencer l'expression génique (SOUZA, 1994). D'autres phénomènes tels que des réarrangements chromosomiques (fusion/fission, translocation), ou des amplifications chromosomiques ont été mis en évidence (SITES, 1999; DUJAEDIN, 2000). Malgré la variabilité pathogénique des différentes espèces de *Leishmania* et la différence dans leur tropisme tissulaire, leur génome est remarquablement similaire, montrant un haut degré de conservation dans l'architecture et le contenu génique (PEACOCK, 2007; REAL, 2013).

#### 2.3.2. Génome kinétoplastique

Le génome kinétoplastique constitue 10 à 20% de l'ADN total (SIMPSON, 1987). Il renferme deux types d'ADN : les mini-cercles impliqués dans les phénomènes d'édition permettant l'insertion ou la délétion d'uridine dans l'ARN, et les maxi-cercles codant pour des ARN guides et des ARN ribosomiques ; ce mécanisme d'édition, commun à tous les kinétoplastidés, permet l'expression des transcrits des maxi-cercles grâce à l'ancrage des ARN guides sur les ARN pré-édités (GOTT, 2003; KABB, 2011).

2.4. Cycle de vie et mode de transmission

Quelle que soit l'espèce, le cycle de reproduction des *Leishmania* est sensiblement de même. Cependant, il existe une grande variabilité dans les hôtes, les vecteurs et les manifestations cliniques.

Les promastigotes contenus dans le tube digestif du phlébotome sont injectés à l'humain lors d'un repas sanguin. Ils sont ensuite phagocytés par les macrophages, et à ce stade, dans le phagolysosome macrophagien, a lieu la transformation en amastigotes. Ces amastigotes, dépourvus de moyens de locomotion, se multiplient au sein du macrophage. Après la piqûre, le sang peut transporter des parasites qui seront hébergés dans d'autres cellules que les macrophages. Les macrophages infectés sont ensuite réabsorbés par un phlébotome lors d'un repas sanguin, et les amastigotes qu'ils contiennent sont libérés et vont se transformer en promastigotes (RAMLI, 2013).

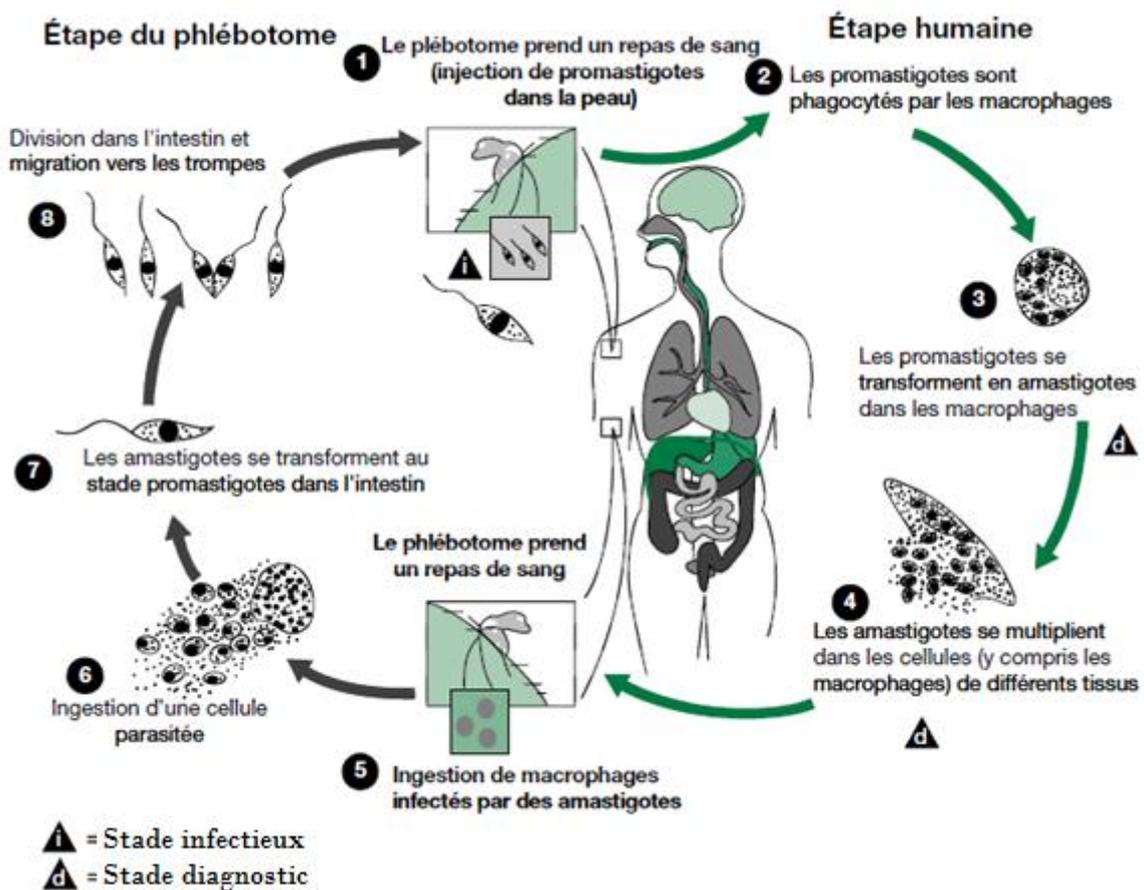


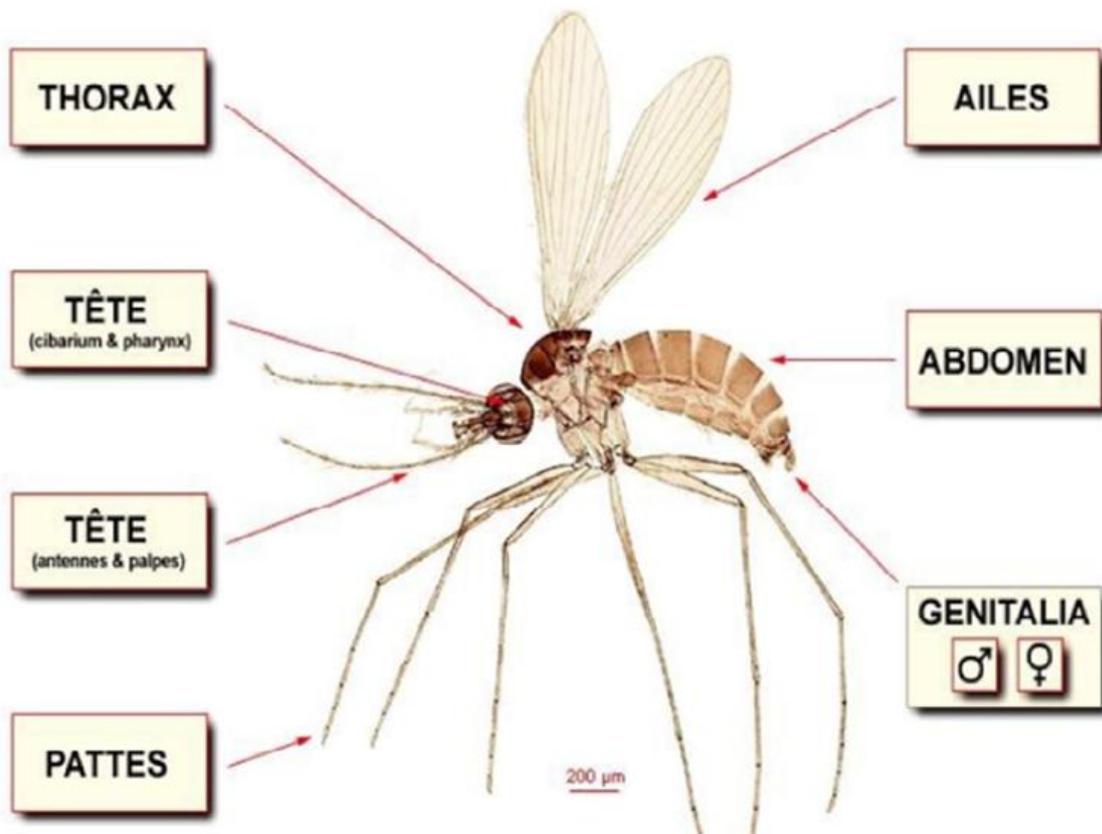
Figure 6 : Cycle de vie de *Leishmania* (CARRE *et al.*, 2010)

### 3. Le vecteur

Les phlébotomes sont des insectes, diptères (une paire d'ailes), nématocères (avec des antennes filiformes), qui appartiennent à la famille des psychodidae, où ils constituent la sous-famille des Phlebotominae qui regroupe environ 800 espèces largement réparties dans les régions tropicales et tempérées. Deux genres *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde transmettent les leishmanioses.

Les phlébotomes mesurent 2 à 3 mm et ils sont parfois confondus avec des petits moustiques. Ils sont de couleur claire, jaune, pâle à brune à peine visible à l'œil nu. Leurs ailes, de forme lancéolée, se dressent en V à 45° sur le dos lorsqu'ils sont au repos (Figure 7). Examinés à la loupe, ils apparaissent velus, bossus, pourvus de longues pattes et d'une nervation alaire.

Ce sont des insectes à activités crépusculaire et nocturne, dont le développement est pré-imaginal (œuf, quatre stades larvaires et nymphes) (IZRI *et al.*, 2006).



**Figure 7** : Morphologie générale d'un phlébotome adulte (BOUNAMOUS, 2010).

### 3.1. Biologie des phlébotomes

Les phlébotomes sont abondants toute l'année en zone tropicale, et également en zone tempérée à la belle saison. Ils sont rencontrés même sur les pentes andines jusqu'à 2000 m d'altitude. Ils se présentent durant la journée et trouvent refuge dans des endroits sombres, chaud et l'humides comme l'humus que l'on trouve dans la canopée des grands arbres de la forêt tropicale, mais aussi au niveau de souches d'arbres, d'anfractuosités de roches ou de murs. Ils volent le soir (capacité de vol réduite à quelques centaines de mètres) et les femelles, qui seules sont hématophages, sont particulièrement actives à la tombée du jour.

C'est au cours de ces repas pris sur un animal infecté que le phlébotome absorbe le parasite. Les leishmanies amastigotes qui se transforment dans l'intestin du phlébotome en forme promastigotes qui se multiplient ; les en formes métacycliques très infectieuses gagnent les pièces antérieures et buccales (cycle de 4 à 7 jours). Le vecteur peut alors transmettre le parasite par régurgitation lors de la piqûre à un autre animal ou à l'homme (LIGHTBOURN *et al.*, 2002).

Les repas sanguins assurent un développement des oocystes en une semaine puis la femelle va pondre sur un sol riche en humus entre 50 et 100 œufs qui éclosent en 8 à 10 jours. Les larves, terricoles et coprophages, se développent sans aucune phase aquatique jusqu'au stade adulte (en 1 à 2 mois suivant la température).

### 4. Hôtes réservoirs

Selon l'hôte réservoir, les leishmanioses peut être divisées en deux groupes :

-Les leishmanioses zoonosiques pour lesquelles les hôtes réservoirs sont des animaux sauvages et des animaux commensaux ou domestiques.

-Les leishmanioses anthroponosiques pour lesquelles le réservoir est constitué par l'homme (OMS, 1990).

Plusieurs vertèbres peuvent être porteuses de protozoaires appartenant au genre *Leishmania* ; hormis certaines espèces de lézards, tous les hôtes, qu'ils soient accidentels ou naturels, appartiennent à la classe des mammifères. En effet, les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages, chez lesquels le parasite colonise les cellules

du système des phagocytes mononucléés. Ces mammifères appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primats ou périssodactyles. Dans certains cas, l'homme est l'unique réservoir du parasite (MOULOUA, 2014).

### **5. Aspects cliniques des leishmanioses chez l'être humain**

#### **5.1. Les leishmanioses cutanées**

En général, les caractéristiques cliniques de la LC ne sont pas uniformes (BOUSSAD, 2009). Cette pathologie débute par l'apparition d'une ou plusieurs lésions cutanées sur des parties découvertes du corps (visage, cou, bras et jambes) (DEDET, 1999).

##### **5.1.1. Leishmaniose cutanée localisée**

Sur le plan épidémiologique, on distingue les formes de l'Ancien Monde et celle du Nouveau Monde.

La forme de l'Ancien Monde est provoquée par 5 espèces (*L. tropica*, *L. infantum*, *L. major*, *L. donovani* et *L. aethiopica*) connu sous le nom bouton d'orient qui revêt plusieurs aspects. Une forme sèche antroponothique siégeant au niveau d'une zone découverte. C'est une papule rouge carmin ulcéré en son centre recouverte d'une croûte, s'étendant en surface et en profondeur. Elle est indolore et met plusieurs mois à cicatriser. Une forme impétigineuse moins fréquente, et caractérisée par son indolence. Et enfin une forme humide zoonotique rurale observée dans les zones rurales, qui se caractérise par une ulcération précoce (PILLY, 1994).

La leishmaniose cutanée du Nouveau Monde se rencontre surtout chez les travailleurs des plantations d'Amérique latine et les forestiers. On trouve la forme Uta ressemblant au bouton d'orient avec un aspect extensif et végétant (Figure 8). La forme Espundia avec métastases cutanées ou muqueuses après guérison de l'ulcère primitif. Et une forme diffuse rappelant la lèpre. Il existe aussi des formes cliniques à lésions multiples atypique (impitiginisée, lipoïde) et des formes à type lymphangite nodulaires (forme dites sporotrichoïde) (PROUST, 1981).



**Figure 8** : Cas cliniques de leishmaniose cutanée (ELRAAFFARI *et al.*, 2002).

### 5.1.2. Leishmaniose cutanée diffuse

La forme diffuse de LC rappelle la lèpre lépromateuse, la lésion élémentaire est le nodule non ulcéré. Les nodules sont, au début, de petite taille, isolés, très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps aussi bien sur le visage que sur les membranes ou le tronc (Figure 9). Le nodule est riche en parasites et sa lésion histologique est un infiltrat homogène de l'épiderme et du derme composé d'histiocytes vacuolisés riches en parasites. Au fur et à mesure de l'évolution de l'affection, les nodules augmentent de taille, deviennent confluents et forment de larges plaques infiltrées. L'aspect du malade s'apparente dès lors à celui d'un lépreux lépromateux (DEDET, 2009).

### 5.1.3. Leishmaniose cutanéomuqueuse ou Espundia

Elle succède, en général, à une lésion cutanée passée inaperçue ou mal traitée, apparue il y a plusieurs mois ou années. Présente en Amérique latine et causée par *L. braziliensis*, cette affection évolue en deux temps : une primo-invasion cutanée pouvant être ultérieure suivie par une atteinte muqueuse secondaire. Elle se manifeste par une infiltration granulomateuse de la muqueuse nasale puis buccale avec extension locale progressive et destructrice (Figure 9) (PILLY, 2010).



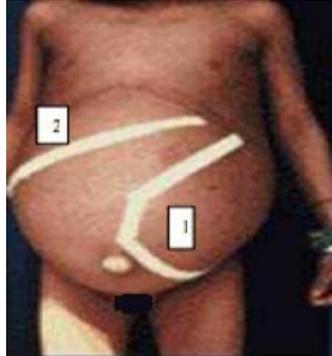
**Figure 9** : Cas clinique de la leishmaniose, à gauche : Leishmaniose cutanée diffuse (CASTELLON, 2007), à droite : Leishmaniose cutanéomuqueuse (DEDET, 2009).

### 5.2. Leishmaniose viscérale

Décrite en Inde sous le nom Kalaazar ou fièvre noire, c'est la forme la plus grave de la maladie avec une mortalité annuelle estimée à 59000cas (JANVIER *et al.*, 2008).

Elle atteint de préférence l'enfant de 2 à 5 ans résident sur le pourtour de la méditerranée. La période d'incubation moyenne de l'infection est de 1 à 6 mois, mais les atteintes leishmaniennes peuvent se développer dès 10 jours en zone endémique. Au début, la LV est insidieuse, et par conséquent, le diagnostic n'est le plus souvent fait qu'à la phase d'état, représentée par une triade clinique (fièvre, pâleur, splénomégalie) : la fièvre irrégulière et anarchique est dite « DumDum » (folle), la pâleur est extrême (vieille cire). Une splénomégalie est homogène et le plus souvent volumineuse (Figure 10). Paradoxalement, l'appétit est conservé et l'état général reste assez bon. A côté de la splénomégalie, l'hyperplasie de système phagocytes mononuclée peut se manifester aussi par une hépatomégalie modérée, en général, et par de petites adénopathies fermes, indolores, plus rarement axillaires. La triade est presque constante chez l'enfant, par contre, chez l'adulte, le tableau clinique peut comporter également un amaigrissement visible surtout au niveau des membranes et du thorax. D'autres signes digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) et respiratoires (toux, râles, crépitation ou ronflants), ainsi que des troubles hémorragiques et des signes cutanés sont plus marqués (macules érythémateuses, taches pigmentées et dépigmentées, nodules). Dans la LVZ de l'adulte, de plus en plus fréquente en Europe méditerranéenne (environ deux tiers de l'ensemble des cas humains) cette triade est moins constante. Dans la moitié de ces cas de l'adulte, on trouve une immunodépression permanente

(coïnfection avec le VIH ou thérapie immunosuppressives) (Marty *et al.*,2007; Marty,2010 ; MONCEF AMRANI HASSANI*et al.*,2011).



**Figure 10:** Enfant atteint de la leishmaniose viscérale. 1 : inflammation de la rate ; 2 : inflammation du foie (SALAMA, 2015).

### 6. Aspects de la leishmaniose canine

La leishmaniose canine est une protozoose zoonotique, infectieuse et inoculable, due à la multiplication dans les macrophages-et toute cellule à capacité macrophagique de *Leishmania* transmis par la piqûre d'un diptère (BOURDOISEAU *et al.*, 2004).

La maladie chez le chien est bien connue et décrite depuis 1910 : abattement, anoxie, amaigrissement et cachexie, adénomégalie, lésions cutanées et muqueuses multiples (alopécie, squameuses, ulcères), onychogryphose, uvéite, glomérulonéphrite (Figure 11). Toutefois, il est important de souligner la fréquence de formes atypiques cutanées (nodulaires, pseudo-tumorales, pseudo-pyodermites), articulaires (arthralgie, œdème des extrémités, chute de griffes), cardiovasculaires (péricardite, hyperviscosité, thrombo-embolie), digestives (colite ulcéreuse, entérite hémorragique), respiratoires (rhinite, pneumonie), et nerveuses, etc. (BLAVIER *et al.*, 2001 ; BOURDOISEAU*et al.*,2004).



**Figure 11:** Aspect de la leishmaniose canine (DEDET, 2009).

### 7. Diagnostic de la leishmaniose

Les méthodes utilisées pour le diagnostic de la leishmaniose sont divisées en méthodes d'isolement et en méthodes immunologiques (CABANILLAS, 2001).

La détection au microscope est la méthode habituellement utilisée pour le diagnostic des deux types de leishmaniose (LC et LV) ; le parasite étant sous la forme amastigote dans des prélèvements des macrophages sur frottis (moelle osseuse, rate et lésions cutanées). Les frottis fixés au méthanol, sont colorés au Giemsa (DJEZZR-MIHOUBI, 2006). Une autre option consiste en la culture de tissus dans un milieu spécial (NNN) suivie d'une inoculation d'animaux comme les hamsters (CABANILLAS, 2011). L'ADN de *Leishmania* peut être aussi détecté par PCR au sein de l'échantillon à analyser, cette technique permet l'amplification *in vitro* de séquences d'ADN définie. En quelques heures, on peut obtenir jusqu'à un million de copies d'une séquence d'ADN spécifique (FRAHTIA-BENTAMANE, 2015). D'autres techniques immunologiques (IFI, ELISA et test d'agglutination) sont utilisées dans le diagnostic de la LV ; elles font appel à des antigènes qui sont couramment préparés à partir des formes promastigotes de culture d'espèce de *Leishmania* (DEJAZZAR-MIHOUBI, 2006).

### **8. Traitement de la leishmaniose**

#### **8.1. Traitement de la leishmaniose cutanée**

##### **8.1.1. Les sels organiques**

Premier traitement anti-leishmanien connu, les sels organiques sont utilisés comme traitement de première intention de la plupart des leishmanioses, du fait de leur efficacité et tolérance.

L'antimoniote de méglumine (Glucantime®) ou le Stibogluconate de sodium (Pentostam®) sont les dérivés de l'antimoine habituellement utilisés. L'antimoniote de méglumine est présenté en ampoule de 5ml de 1,5 g et est prescrit à la dose de 20 mg d'antimoine pentavalent par kg et par jour ou 0,20 ml/kg/J. En cas de rechute ou de résultat insuffisants, le traitement doit être répété à la dose de 20 mg/kg pendant quarante à soixante jours. L'adjonction de l'allopurinol per os (20 à 30 mg par jour, en trois jours) a donné de bons résultats (DIALLO, 2014).

##### **8.1.2. Les sels pentamidine**

L'iséthionate de pentamidine, se présente sous forme de flacons de 300 mg. Il s'utilise par voie parentérale, à la dose de 4 mg base/ kg et par injection. Les injections doivent être réalisées chez un malade alité et à jeun. Le flacon est dissous dans 10 ml d'eau stérile, la suspension étant administrée en une seule injection intramusculaire ou diluée dans 50 à 250 ml de soluté glucosé à 5 % et administrée en perfusion lente de 1 heure. L'intervalle entre deux injections est de 2 à 3 jours et le nombre d'injections dépend de la forme de leishmaniose, trois à cinq injections étant le nombre le plus couramment admis. (JEBBOURI, 2013).

##### **8.1.3. L'amphotéricine B**

C'est un traitement de deuxième intention de la LCM, en cas d'échec des dérivés de l'antimoine. Elle se présente en flacons de 50 mg et ne s'utilise qu'en perfusion intraveineuse lente 6 à 8 h, administrées un jour sur deux. Le traitement est institué à doses progressives pour atteindre en 4 jours la dose maximale 1 mg/kg ; des guérisons peuvent s'obtenir à partir d'une dose totale de 1g. L'amphotéricine B est actuellement au premier rang des traitements

dans la co-infection HIV-leishmaniose, car elle est plus efficace et mieux tolérée que les antimoniés pentavalents (JEBBOURI,2013).

### **8.1.4. Le kétoconazole (Imidazolés)**

Le kétoconazole est un dérivé d'Imidazolés. Ces derniers sont absorbés par voie digestive. Ils sont présentés en comprimés dosés à 200mg ; les doses les plus courantes au cours des essais thérapeutiques dans la LC ont sont de 200 à 400mg/j pour l'adulte, pendant 1 à 3 mois (JEBBOURI, 2013).

### **8.1.5. Autres traitements généraux**

D'autres médicaments systémiques sont utilisés. Il s'agit dumétronidazole, allopurinol, dapson, rifampicine et triméthoprime-sulfaméthoxazole, etc. Le fluconazole, utilisé depuis2008, est reconnu comme moyen thérapeutique efficace dans la LC à *L.major* (DIALLO, 2014).

## **8.2. Traitement de la leishmaniose viscérale**

### **8.2.1. Traitement de première intention**

Le traitement de première intention consiste en l'utilisation de dérivés pentavalents de l'antimoine. Il y en a deux commercialisés actuellement :

- L'antimonié de N-méthyle-glucamine ou antimoine de méglumine (Glucantime®) est présenté en ampoules de 5ml (1500 mg) dont la concentration en antimoine et de 85 mg/ml. Il est administré habituellement en cure de 21 jours.
- Le Stribogluconate de sodium commercialisé sous le nom de Pentostam®. Il est présenté en flacon de 100 ml avec une concentration en antimoine de 100 mg/ml du produit. Selon OMS, la durée du traitement correspond à une posologie de 60 mg d'antimoine de N- méthyle glutamine/kg/J sans limitation de dose pendant 28 jours, par voie intramusculaire profonde ou intraveineuse (TAMIMY,2011).

### 8.2.2. Les alternatives thérapeutiques

#### 8.2.2.1. Les polyènes

L'amphotéricine B est le plus puissant agent anti-leishmanien connu. Il a plusieurs présentations thérapeutiques :

- L'amphotéricine B libre « Fungizone® » : l'amphotéricine B désoxycholate n'est utilisée qu'en perfusion intraveineuse lente (6 à 8 h). Le schéma thérapeutique habituel est de 1 mg/ kg/j pendant 30 jours. Le traitement est institué à doses progressive en commençant par une posologie de 0,8 mg/kg/J pour atteindre en 4 jours la dose maximale de 1 mg/kg/J. Des guérisons peuvent s'obtenir à partir d'une dose totale de 1g (CARRE *et al.*, 2010).
- Les liposomes d'amphotéricine B « Ambisome® » : plus tolérés que la forme libre au niveau rénal, ils sont administrés en perfusion intraveineuse d'une heure à la dose de 3 à 4 mg /kg/J de 5 J et à 10 J (TAMIMY, 2011).

#### 8.2.2.2. Les pentamidines

Le chef de file de cette classe médicamenteuse est la pentamidine (Lomidine®) à la concentration de 40 mg/ml. L'iséthionate de pentamidine (Pentacarinat®), en flacon de 300mg pour 10 ml, n'est pas absorbé par voie digestive ; il s'utilise uniquement par voie parentérale (classiquement injecté en intramusculaire mais peut aussi être transcrit en intraveineuse lente d'une heure), à la dose de 3-4 mg/kg/J, un jour sur deux pour une cure de 10 injections maximum (CARRE *et al.*, 2010).

#### 8.2.2.3. Le miltéfosine (Impovido®)

Le miltéfosine (Impovido®) possède une activité leishmanicide reposant sur une toxicité directe envers le parasite. C'est le premier médicament par voie orale pour la leishmaniose viscérale. Il se présente sous forme de comprimés de 50 mg ; la posologie courante étant de 100 mg/J pendant 4 semaines (CARRE *et al.*, 2010).

### **8.2.2.4. L'allopurinol (Zyloric®)**

L'allopurinol (Zyloric®), analogue structurale de l'hypoxanthine, est utilisé dans le traitement de la LV. Il se présente sous forme de comprimés de 100mg, 200mg et 300mg et est administré à dose de 20 mg/kg/j en 2 ou 3 prises pendant 8 à 12 semaines (TAMIMY, 2011).

### **8.3. Traitement de la leishmaniose canine**

Le traitement de la leishmaniose chez le chien repose sur l'utilisation :

- d'antimoniate (Glucantime® (AMM chien)) à 100 mg/kg/jour par injection sous-cutanée quotidienne pendant 21 à 28 jours,
- d'allopurinol (Zyloric®) à 30 mg/kg/jour en 2 prises quotidiennes par voie orale (Mouloua, 2014).

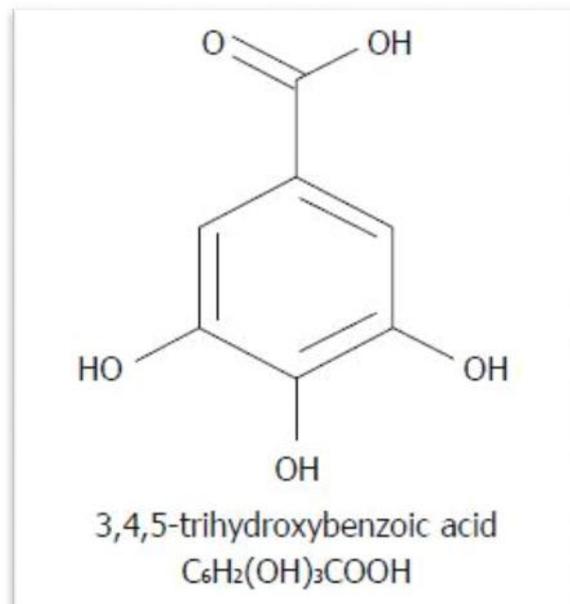
### 9. Rappel sur l'acide gallique et la vanilline

#### 9. Acide gallique

L'acide gallique (3, 4, 5-trihydroxybenzoïque) est un composé polyphénolique (Figure 12) d'origine naturelle dans les boissons traitées tel le thé vert. Il est largement réparti dans le règne végétal, tels que les feuilles de bérubéri, ainsi que les racines et l'écorce des grenadiers et des noix de galle, ou dans certaines espèces végétales de bois durs comme le chêne (*Quercus robur*) le châtaignier (*Castanea sativa L.*).

L'acide gallique se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune pâle ayant une masse moléculaire de 170,12 g/mol et point de fusion est de 250°C. sa solubilité dans l'eau est très limitée.

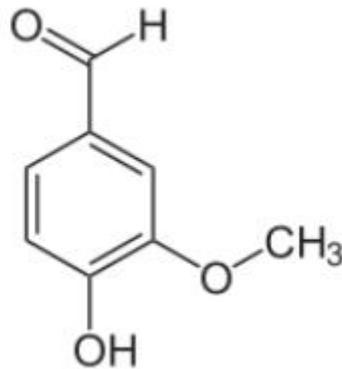
Il est fréquemment utilisé dans les industries pharmaceutiques. En médecine, il est particulièrement employé pour ses propriétés antioxydantes et ses activités antitumorale et antibactériennes (PATENT REVIEW, 2015).



**Figure 12 :** Structure chimique de l'acide gallique (WJG, 2016).

### 9.2. Vanilline

La vanilline est une poudre cristalline blanche avec un arôme agréable, doux et intense, offrant une saveur vanillée. Chimiquement, la vanilline est un aldéhyde aromatique appartenant au groupe des composés phénoliques C6-C1. Structurellement, c'est un phénol substitué avec un groupe aldéhyde et un groupe méthoxy aux positions spécifiques (Figure 13).



**Figure 13 :** Structure chimique de la vanilline (NETHAJI, 2015).

La vanilline a une solubilité relativement faible dans l'eau à température ambiante. Par contre, elle est soluble dans l'eau chaude, l'alcool et l'éthanol. C'est un produit intermédiaire pour la production de plusieurs dérivés à usage pharmaceutique (NETHAJI, 2015).

# Chapitre II:

## Matériel et Méthodes

La partie expérimentale du présent mémoire a été réalisée au niveau des laboratoires du service éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Dély Ibrahim).

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel non biologique

##### 1.1.1. Appareillage

- ✓ Bain-marie (Memmert),
- ✓ Balance de précision électronique (Denver Instrument),
- ✓ Centrifugeuse (Sigma),
- ✓ Etuves à CO<sub>2</sub> réglée à 37°C (Binder),
- ✓ Etuves à 25°C (Jouan),
- ✓ Hotte à flux laminaire (Faster BH Exc 2004),
- ✓ Microscope optique (Motic),
- ✓ Microscope photonique inverse (Motic),
- ✓ pH-mètre (MP 220),
- ✓ Vortex,
- ✓ Spectrophotomètre (BioTeK).

##### 1.1.2. Petit matériel

- ✓ Bec Bunsen,
- ✓ Boîtes de congélation,
- ✓ Chambres Labteck,
- ✓ Cellule de Thoma,
- ✓ Flacons de culture cellulaire de 500ml en verre,
- ✓ Flasques,
- ✓ Lames et lamelles,
- ✓ Micropipettes et pointes,
- ✓ Parafilm®,
- ✓ Pipettes Pasteur stériles,
- ✓ Pipetus,
- ✓ Plaques microtitres de 96 puits à fond plat,

- ✓ Poire,
- ✓ Tubes coniques (15ml),
- ✓ Tubes de congélation,
- ✓ Tubes Eppendorf®.

### 1.1.3. Réactifs et solutions

- ✓ Antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine),
- ✓ Biotéine,
- ✓ Bleu Trypan (0,04%),
- ✓ DMSO (0,05%),
- ✓ Ethanol 99%,
- ✓ HCl,
- ✓ Huile à immersion,
- ✓ Méthanol,
- ✓ MTT (sel de tetrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)]),
- ✓ PBS (Phosphate Buffer Solution),
- ✓ PMA (Phorbol Myristate Acétate),
- ✓ Solution d'isopropanol 50% et de SDS 10%,
- ✓ Antimoine trivalent (SbIII),
- ✓ Glucantime® (SbV).

## 1.2. Matériel biologique

### 1.2.1. Les souches utilisées

Dans notre étude, nous avons utilisé 3 souches de leishmanies appartenant aux 3 complexes de *Leishmania* existants en Algérie. Ces souches ont été isolées et identifiées au service d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'institut Pasteur d'Algérie (Tableau II).

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

**Tableau II** : Caractéristiques des souches utilisées dans les tests de sensibilité promastigote et amastigote

Code OMS	Forme clinique	Origine	Typage moléculaire	Typage isoenzymatique
MPSA/DZ/2006/LIPA32/06	LC	M'sila	<i>L. major</i>	MON25
MHOM/DZ/2005/LIPA 15/05	LV	Tizi-Ouzou	<i>L. infantum</i>	MON1
MHOM/DZ/2011/LIPA 281/11	LC	Ghardaïa	<i>L. killicki</i>	MON301

### 1.2.2. Lignée cellulaire THP-1

La lignée cellulaire THP-1 est une lignée cellulaire tumorale de monocytes humains conservés en azote liquide. Ces cellules ont été utilisées pour le test de cytotoxicité et le test d'infection intramacrophagique.

### 1.2.3. Les extraits biologiques étudiés

Les extraits biologiques utilisés dans la présente étude ont été préparés et fournis par notre promotrice Mme TAZDAÏT. Il s'agit de l'acide gallique et de la vanilline.

### 1.2.4. Les milieux de culture

- ✓ Milieu NNN (Novy Nicole Mc Neal),
- ✓ Milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute). Ce milieu est supplémenté avec 10% de SVF avant chaque utilisation (sauf mention).

La composition des deux milieux est citée en annexe 1.

## 2. Méthodes

### 2.1. Etude de la solubilité de la vanilline et de l'acide gallique

La solubilité de la vanilline et de l'acide gallique a été étudiée dans l'éthanol (99%) et le DMSO (dont la concentration finale ne doit pas dépasser 0,05%).

### 2.2. Culture des Leishmanies

Pour l'étude de l'activité leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline sur *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum*, nous avons utilisé deux milieux de croissance : le NNN (un milieu semi-solide) et le RPMI (un milieu liquide).

Les souches ont été maintenues sur milieu NNN et cultivées sur milieu RPMI pour les tests leishmanicide.

Un contrôle hebdomadaire était effectué sur les souches cultivées sur milieu NNN.

Afin de subir les tests relatifs à l'activité leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline. Les cultures en phase exponentielle ont été concentrées à partir des cultures sur milieu NNN, puis ont subi 2 à 3 lavages à l'eau physiologique (2500 rpm pendant 10 min) et transférées sur milieu RPMI.

Les cultures sur milieu RPMI ont été contrôlées et repiquées tous les 3 à 7 jours.

### 2.3. Culture des cellules THP-1

Les cellules THP-1 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 milieu RPMI. Les cellules ont été repiquées tous les 4 jours et incubées dans l'étuve à 37 °C à 5 % CO<sub>2</sub>. Le contrôle de la culture était effectué à l'aide du microscope photonique inverse.

### 2.4. Etude de l'activité leishmanicide

Les 3 souches de leishmanies (*Leishmania infantum*, *L. killicki* et *L. major*) ont été cultivées sur milieu RPMI. La concentration parasitaire a ensuite été ajustée à  $10^6$  parasite/ml, par une centrifugation à 600g/min pendant 15 min. La suspension parasitaire a ensuite été répartie dans une plaque de 96 puits de culture cellulaire à raison de 90 $\mu$ l de suspension/puit. L'acide gallique ou la vanilline a alors été ajouté à raison de 10 $\mu$ l/puit, à des concentrations finales de 100, 50, 25 et 12,5 $\mu$ g/ml. La microplaque, ainsi préparée, a été incubée à 25°C pendant 72 heures. L'amphotéricine B a été utilisé comme témoin positif.

La numération des leishmanies a été effectuée simultanément par deux techniques différentes : le test colorimétrique par la méthode de MTT (sel de tetrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)]), et le comptage sur la cellule de Thoma (annexe 2).

#### 2.4.1. Test MTT (sel de tetrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)])

##### 2.4.1.1. Principe

Le test est basé sur la transformation d'un sel de tetrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique.

En bref, le cycle tétrazolique du MTT est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

##### 2.4.1.2. Protocole

A la fin de l'incubation de la microplaque contenant les leishmanies, un volume de 10 $\mu$ l de MTT pour chaque puits est rajouté et les plaques sont remises dans les incubateurs à 37°C (Figure 14). Après 4 heures d'incubation, il se développe une coloration violette. La réaction est arrêtée par ajout de 100 $\mu$ l de la solution d'isopropanol 50% (v/v) et de SDS 10% (m/v). Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance de chaque puits est mesurée à 550nm sur un spectrophotomètre permettant la lecture des microplaques.



**Figure 14 : Microplaque à 96 puits avec MTT (puits jaunes)**

### 2.4.2. Calcul des IC<sub>50</sub>

La détermination de la valeur de concentration d'inhibition de 50% des cellules (IC<sub>50</sub>) : est déterminée par interpolation linéaire sur des courbes donnant le pourcentage de viabilité en fonction de logarithme de la concentration testée. L'ensemble des calculs a été fait par le logiciel Graph Prism version 5.03.

### 2.4.3. Test de cytotoxicité

Les cellules en culture sont maintenues dans un incubateur à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont ensuite centrifugées à 2000rpm durant 10min à 25°C et sont suspendues à nouveau dans le milieu RPMI. Après comptage des cellules sur cellule de Thoma (annexe 2), 5x10<sup>5</sup> cellules/ml sont ajoutées dans des plaques de 96 puits. Ces cellules sont différenciées à l'aide de la PMA (Phorbol Myristate Acétate) en macrophages adhérents. La PMA doit être à une concentration finale de 20 ng/ml. Les cellules sont laissées durant 48h dans l'incubateur à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont alors lavées une fois avec du milieu RPMI.

Les extraits étudiés préparés à différentes concentrations (100, 50, 25, 12.5µg/ml) dans le milieu RPMI, sont mis en contact des cellules ainsi préparées durant 72 heures. Les macrophages non traités ont été utilisés comme contrôle négatif.

### **2.4.3.1. Révélation avec le bleu de Trypan**

Après 72h d'incubation, les cellules sont colorées avec le bleu de Trypan pendant 5 minutes. Dans chaque puits, 50µl de bleu de Trypan à 0,04% sont rajoutés. Les cellules mortes apparaissent colorées en bleues.

### **2.4.3.2. Révélation avec le MTT**

Après 48h d'incubation, du MTT est rajouté (10 µl de MTT/puit). Après 4h d'incubation, la réaction est arrêtée par ajout de 100 µl d'une solution d'isopropanol à 50% (v/v) SDS 10% (m/v). Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance de chaque puit est mesurée à 550nm sur un lecteur spectrophotométrique de microplaques.

### **2.4.4. Test intramacrophagique à partir des promastigotes**

Le test intramacrophagique à partir des promastigotes a été effectué à l'aide de culture de monocytes THP-1 et de cultures d'amastigotes de *Leishmania infantum* LIPA15/05.

#### **2.4.4.1. Transformation de monocytes THP-1 à macrophages**

Tout d'abord, les cellules THP-1 sont dénombrées sur une cellule de Thoma (annexe 2). Puis, les cellules sontensemencées dans des chambres Labteck (Figure 15) à raison de  $5 \times 10^5$  cellules/puits dans 100 µl de milieu RPMI.

Afin de déclencher la transformation de monocytes en macrophages, 20 ng/ml de PMA (Phorbol Myristate Acétate) sont rajoutés.

Les chambres Labteck sont incubées pendant 48heures à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>.

La transformation est vérifiée à l'aide du microscope optique inverse.



**Figure 15 :** Chambre Labteck

### 2.4.4.2. Infection des macrophages

Après 48 heures d'incubation, les macrophages sont infectés avec les promastigotes de *L. infantum*. Pour cela chaque puits est rincé avec de 100  $\mu$ l de RPMI (sans SVF), puis on ajoute les parasites en phase métacyclique dans un volume de milieu de 200  $\mu$ l. La concentration des parasites étant de  $8 \times 10^6$  parasites/ml. Les chambres Labteck ainsi préparés sont mises à incuber pendant 24h à 37°C.

### 2.4.4.3. Contact avec les différentes concentrations d'extraits à tester

Après incubation, chaque puits est rincé 3 fois avec du milieu RPMI (sans SVF) pour éliminer les parasites qui n'ont pas pénétrés les macrophages.

Dans chaque puits, 100 $\mu$ l d'extrait dilué dans du milieu RPMI aux différentes concentrations (12,5 ; 25 ; 50 et 100 $\mu$ g/ml) sont rajoutés. Le contrôle négatif était préparé avec 100 $\mu$ l de milieu RPMI (0 $\mu$ g/ml d'extrait). Pour le contrôle positif, des concentrations croissantes d'antimoine trivalent dilué dans du milieu RPMI étaient testées (20, 40 et 80  $\mu$ g/ml).

Les chambres Labtek étaient mises à incuber à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub> pendant 3 à 5 jours. Le milieu est renouvelé une fois pendant toute la durée d'incubation.

### 2.4.4.4. Lecture

Après incubation, le milieu de culture est éliminé et les macrophages adhérents sont fixés durant 5 min avec du méthanol absolu. Ils sont, ensuite, colorés durant 48 min par une solution Giemsa diluée à 1/10 dans de l'eau distillée.

Une fois les puits séchés, les joints des chambres Labtek sont retirés et les macrophages sont observés au microscope photonique au grossissement 100 avec de l'huile à immersion.

Le calcul de l'indice parasitaire (IP) se fait comme suit :

$$\text{IP} = \% \text{macrophages infectés} \times \text{nombre d'amastigotes par macrophage} \quad (\text{Eq. 1})$$

### 2.5. Calcul de l'indice de sélectivité

L'indice de sélectivité (IS) de l'activité antileishmanienne des extraits étudiés peut être déduit de la formule ci-dessous :

$$\text{IS} = \text{CI}_{50} / \text{CT}_{50} \quad (\text{Eq. 2})$$

# Chapitre III :

## Résultats et Discussion

### 1. Résultats

Afin de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques ayant un effet leishmanicide, nous avons testé l'acide gallique et la vanilline. Leurs solubilités vis-à-vis de l'éthanol a été vérifiée.

L'effet leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline a été exploré sur les formes promastigotes des trois complexes de *Leishmania* retrouvés en Algérie, soit *L. infantum*, *L. major* et *L. killicki*.

L'infection intramacrophagique a permis de déterminer l'effet leishmanicide de l'acide gallique et la vanilline sur les formes amastigotes de *L. infantum*.

La toxicité et l'indice de sélectivité de l'acide gallique et la vanilline ont été évalués en utilisant la lignée de cellules cancéreuses de monocytes humains, THP-1.

#### 1.1. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de *Leishmania infantum*

Pour l'étude de l'activité leishmanicide, de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote du complexe *L. infantum*. Nous avons utilisé la souche *L. infantum* LIPA 15/05 responsable de la LV en Algérie.

Pour ce faire, des concentrations croissantes d'acide gallique ou de vanilline ont été mises en présence du parasite pendant 72h. L'antimoine trivalent (SbIII) a été utilisé comme témoin positif. La viabilité des promastigotes de *L. infantum* LIPA 15/05 en fonction des concentrations d'acide gallique ou de vanilline est indiquée dans le tableau III. Les observations microscopiques obtenues sont données en annexe 3.

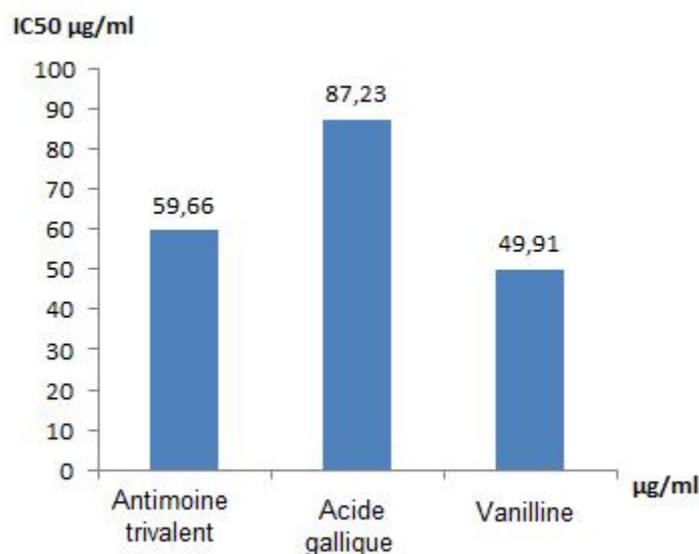
### Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau III :** Résultats de la viabilité de *L. infantum* LIPA 15/05 après 72h d'incubation en absence et en présence d'extraits biologiques.

Extrait testé	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viabilité (%)
Aucun extrait (témoin négatif)	0	100
Acide gallique	12,5	97,43
	25	89,74
	50	64,1
	100	33
Vanilline	12,5	85
	25	66,6
	50	46,6
	100	33,3
Antimoine trivalent	12,5	83,89
	25	77,11
	50	75,11
	100	73,72

Les résultats (tableau III) montrent un très grand effet leishmanicide dose-dépendant de l'acide gallique et de la vanilline sur la souche *L. infantum* LIPA 15/05, après 72h d'incubation. A une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ , l'acide gallique et la vanilline ont montré un effet leishmanicide largement supérieur par rapport à l'antimoine trivalent (témoin positif testé). En effet, à 100 $\mu\text{g/ml}$ , l'acide gallique et la vanilline ont donné une viabilité de 33,3% alors que l'antimoine trivalent a donné une viabilité de 73,72%.

Les IC<sub>50</sub> ont été calculées par régression non linéaire grâce au logiciel Graph Prism version 5.03. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> déduites sont données dans la figure 16.



**Figure 16 :** Valeurs des concentrations d'acide gallique, de vanilline et d'antimoine trivalent (SbIII) inhibant 50% de *L. infantum*.

L'IC<sub>50</sub> la plus faible (49,91%) a été obtenue avec la vanilline (figure 16) ; elle s'est avérée plus faible que celle de l'antimoine trivalent (59,66%). L'acide gallique, quant à lui, a démontré un effet leishmanicide moindre avec une viabilité 87,23%.

### 1.2. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de *Leishmania major*

Pour l'étude de l'activité leishmanicide, de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote du complexe *L. major*, nous avons utilisé la souche *L. major* LIPA 32/06, responsable de la LC en Algérie.

Pour ce faire, des concentrations croissantes de la vanilline ou de l'acide gallique ont été mises en présence du parasite pendant 72h. L'antimoine trivalent (SbIII) a été utilisé comme témoin positif. Les résultats de la viabilité des promastigotes en fonction de la concentration en vanilline ou en acide gallique sont regroupés dans le tableau IV.

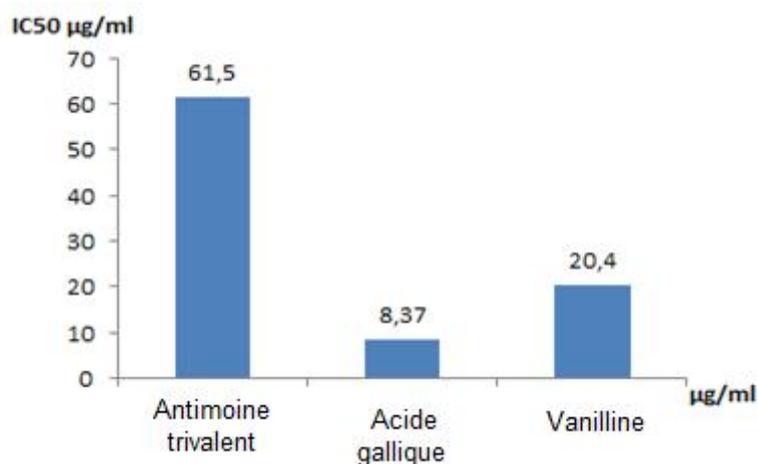
### Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau IV :** Résultats de la viabilité de *L. major* LIPA 32/06 après 72h d'incubation en absence et en présence de la vanilline, de l'acide gallique ou de l'antimoine trivalent.

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viabilité (%)
Aucun extrait (témoin négatif)	0	100
Acide gallique	12,5	41,5
	25	25,66
	50	10,37
	100	8,49
Vanilline	12,5	87,65
	25	80,15
	50	78,49
	100	73,96
Antimoine trivalent	12,5	92,64
	25	89,78
	50	72,95
	100	68,53

On remarque d'après le tableau IV, une diminution significative du pourcentage des parasites en présence d'acide gallique. Ceci démontre une activité leishmanicide très importante de l'acide gallique envers la souche *L. major* LIPA 32/06. L'activité leishmanicide de l'acide gallique s'est même avérée beaucoup plus importante que celle de l'antimoine trivalent (témoin positif). La vanilline, quant-à-elle, présente une activité leishmanicide plus faible.

Les  $IC_{50}$  ont été calculées par régression non linéaire grâce au logiciel Graph Prism version 5.03. Les valeurs d' $IC_{50}$  déduites sont données la figure 17.



**Figure 17 :** Valeurs des concentrations d'acide gallique, de vanilline et d'antimoine trivalent (SbIII) inhibant 50% de *L. major*.

Nous remarquons, d'après la figure 17, que l'acide gallique et la vanilline ont une activité leishmanicide très remarquable. Ces deux produits ont démontré un effet leishmanicide sur la souche *L. major* LIPA 32/06 supérieur à celui de l'antimoine trivalent.

### **1.3. Résultats de l'effet inhibiteur de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote de *Leishmania killicki***

Pour l'étude de l'activité leishmanicide, de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme promastigote du complexe *L. tropica (killicki)*. Nous avons utilisé la souche *L. tropica (killicki)* LIPA 281/11 responsable de la LC en Algérie.

Pour ce faire, des concentrations croissantes de vanilline ou d'acide gallique ont été mises en présence du parasite pendant 72h. L'antimoine trivalent (SbIII) a été utilisé comme témoin positif. Les résultats de la viabilité des promastigotes sont regroupés dans le tableau V.

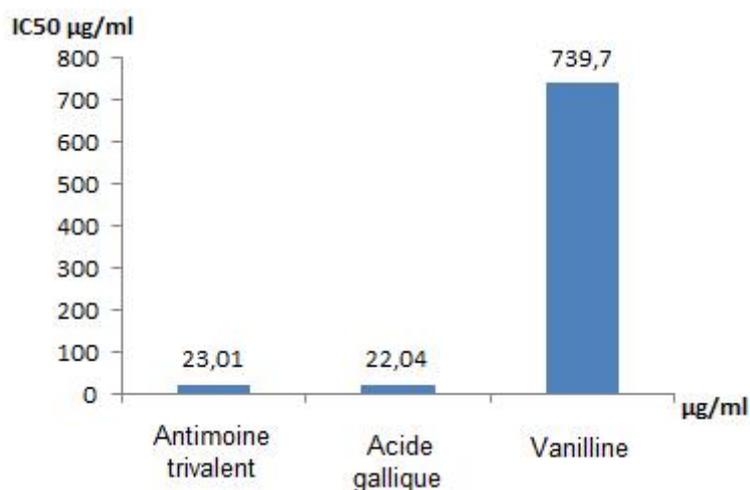
### Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau V :** Résultats de la viabilité de *L. tropica (killicki)* LIPA 281/11 après 72h d'incubation en absence et en présence de vanilline, d'acide gallique ou d'antimoine trivalent.

Extrait testé	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viabilité (%)
Aucun extrait (témoin négatif)	0	100
Acide gallique	12,5	95,16
	25	26,61
	50	-
	100	3,22
Vanilline	12,5	98,53
	25	97,39
	50	95,6
	100	87,11
Antimoine trivalent	12,5	76,19
	25	72,15
	50	70,05
	100	34,34

Les résultats présentés dans le tableau V montre que l'acide gallique présente une activité leishmanicide très importante envers la souche *L. killicki* LIPA 281/11. Cette activité s'est avérée moindre en présence de vanilline.

Les  $IC_{50}$  (figure 18) ont été calculées par régression non linéaire grâce au logiciel Graph Prism version 5.03.



**Figure 18 :** Valeurs des concentrations d'acide gallique, de vanilline et d'antimoine trivalent (SbIII) inhibant 50% de *L. killicki*.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues en présence d'acide gallique (figure 18) sont du même ordre que celles obtenues en présence de l'antimoine trivalent, démontrant une activité leishmanicide similaire. L'activité leishmanicide de la vanilline s'est avérée moindre.

#### 1.4. Résultats de l'activité cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline sur la lignée cellulaire THP-1

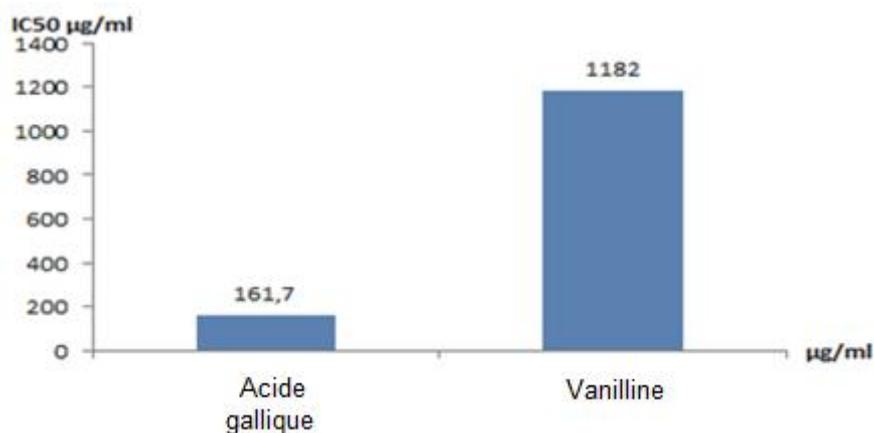
L'activité cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline sur les cellules THP-1. Des concentrations croissantes de nos extraits ont été mises en présence de THP-1 pendant 72h. Les résultats de la cytotoxicité de nos produits sur les macrophages en fonction de leur concentration sont regroupés dans le tableau VI. Les observations microscopiques sont données en annexe 3.

### Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau VI** : Résultats de l'étude de l'activité cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline sur les cellules THP-1 après 72h d'incubation.

Extrait testé	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Viabilité (%)
Aucun extrait (témoin négatif)	0	100
Acide gallique	12,5	84,76
	25	84,10
	50	81,45
	100	61,42
Vanilline	12,5	99,58
	25	97,11
	50	96,04
	100	92,29

Les résultats présentés dans le tableau VI indiquent que l'activité cytotoxique de la vanilline envers la lignée cellulaire THP-1 est plus faible que celle de l'acide gallique. Les valeurs de l' $\text{IC}_{50}$  (figure 19) ont été calculées par régression non linéaire avec le logiciel Graph Prism version 5.03.



**Figure 19** : Valeurs des concentrations d'acide gallique et de vanilline inhibant 50% des cellules THP-1

L'activité cytotoxique de la vanilline semble très négligeable (figure 19).

### 1.5. Indices de sélectivité

Les indices de sélectivité obtenus sont donnés dans le tableau VII.

**Tableau VII** : Indice de sélectivité calculée pour l'acide gallique et la vanilline

	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. killicki</i>
Acide gallique	0,53	0,05	0,13
Vanilline	0,04	0,01	0,62

La comparaison entre les concentrations inhibitrices de l'acide gallique et de la vanilline envers les cellules THP-1 avec les concentrations inhibitrices de l'acide gallique et de la vanilline envers les trois souches de *Leishmania* étudiées ont permis de dresser le tableau VII. Les résultats ont montré que l'acide gallique et la vanilline ont exhibé un bon indice de sélectivité pour les 03 souches étudiées : *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum* (dont les valeurs sont inférieures à 1).

### 1.6. Résultats de l'activité leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline sur la forme amastigote de *L. infantum*

L'activité leishmanicide de l'acide gallique et de la vanilline a été évaluée sur la forme amastigote de *L. infantum*. Pour ce faire, des concentrations croissantes de nos extraits ont été mises en présence de la souche *L. infantum* LIPA15/05. Les résultats de viabilité des amastigotes intramacrophagiques après 72h d'incubation en présence de nos produits, exprimés en indices parasitaires (IP), sont regroupés dans les tableaux VIII et IX.

**Tableau VIII :** Indices parasitaires obtenus en présence d'acide gallique.

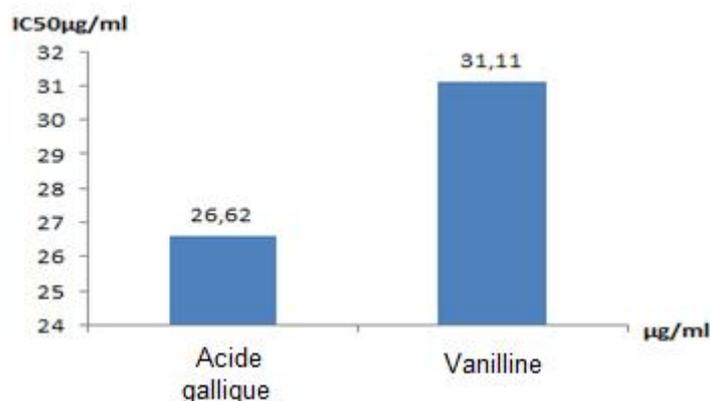
Concentrations (µg/ml)	0	12,5	25	50	100
Nombre d'amastigotes	802	579	335	190	250
Nombre de macrophages infectés	407	362	253	121	218
Nombre total de macrophages	817	521	647	693	639
% macrophages infectés	49,82	69,48	39,10	17,46	34,12
Indice parasitaire (IP)	48,90	77,22	20,25	4,79	13,35

**Tableau IX :** Indices parasitaires obtenus en présence de vanilline.

Concentrations (µg/ml)	0	12,5	25	50	100
Nombre d'amastigotes	802	699	399	309	125
Nombre de macrophages infectés	407	419	361	294	73
Nombre total de macrophages	817	645	650	594	631
% macrophages infectés	49,82	64,96	55,54	49,49	11,57
Indice parasitaire (IP)	48,90	70,40	34,09	25,75	2,29

D'après les tableaux VIII et IX, on remarque que l'indice parasitaire diminue avec l'augmentation des concentrations pour les deux extraits acide gallique et la vanilline pour *L. infantum*.

Les IC<sub>50</sub>, calculées par régression non linéaire sur le logiciel Graph Prism version 5.03, sont représentées dans la figure 20.



**Figure 20 :** Valeurs des concentrations d'acide gallique et de vanilline inhibant 50% des *L. infantum* intramacrophagiques

L'acide gallique et la vanilline ont démontré une activité leishmanicide remarquable (figure 20) envers *L. infantum*.

## 2. Discussion

Les médicaments actuellement utilisés pour traiter la leishmaniose sous toutes ses formes présentent des facteurs limitants. Parmi ces facteurs, la toxicité élevée des molécules utilisées, l'apparition de résistance et la difficulté de gestion de cette résistance. L'ensemble de ces éléments incite la communauté scientifique à rechercher de nouveaux médicaments plus efficaces. De nombreux travaux ont permis de trouver de nombreuses molécules isolées à partir des plantes et ayant une activité leishmanicide (SEN et CHATTERJEE, 2011). Parmi eux, il y a celles extraites par IMRAN KHAN *et al.* (2015) à partir d'*Ocimum basilicum* (basilic).

Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet antileishmanien de deux molécules extraites à partir de plantes. L'acide gallique extrait à partir des feuilles de thé, et la vanilline produite à partir de son du riz. L'effet de ces deux molécules a été étudié sur les 03 souches de *Leishmania* endémique en Algérie ; *Leishmania major* et *L. killicki* étant responsables de la LC et *L. infantum* étant responsable de la forme viscérale de la maladie.

Les résultats obtenus pour l'acide gallique sur les formes promastigotes donnent une activité leishmanicide très importante pour *L. major* et *L. killicki* dont les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont

de 8,37 $\mu$ g/ml et 22,04 $\mu$ g/ml, respectivement. Par contre, pour *L. infantum*, l'acide gallique a démontré une faible activité leishmanicide avec une IC<sub>50</sub> de 87,23 $\mu$ g/ml.

Par ailleurs, la vanilline a révélé une activité leishmanicide très importante pour *L. major*, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 20,4 $\mu$ g/ml. Alors que pour *L. infantum* et *L. killicki*, la vanilline n'a pas eu d'activité leishmanicide aussi remarquable ; les valeurs d'IC<sub>50</sub> étaient de 49,91 $\mu$ g/ml et 739,7 $\mu$ g/ml, respectivement.

Cette variabilité de l'activité leishmanicide selon les espèces de *Leishmania* a été largement citée dans la littérature. Parmi les plantes étudiées de la flore maghrébine, *Artemisia herba-alba* Asso (armoïse blanche) est très utilisée dans la médecine traditionnelle et a montré dans des études antérieures une activité leishmanicide vis-à-vis de deux espèces de *Leishmania* : *L. tropica* et *L. major* (HATIMI *et al.*, 2000). Dans le même contexte, d'autres travaux réalisés pour mettre en évidence l'activité leishmanicide des plantes, ont montré que l'allicine extraite d'*Allium sativum* (ail) pouvait inhiber la croissance des formes promastigotes de *L. major* à une concentration de 50pM (METWALLY *et al.*, 2016). En 2015, LUCIAN *et al.* ont déduit que *Casearia sylvestris* avait une activité plus expressive contre les formes promastigotes de différentes espèces de *Leishmania* ; les valeurs d'IC<sub>50</sub> étaient de 5,4 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 8,5 $\mu$ g/ml et 7,7 $\mu$ g/ml pour *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* et *L. major*, respectivement. Par ailleurs, EZATPOUR *et al.* (2015) ont montré que l'extrait alcoolique de *Pistacia khinjuk* (pistachier) avait une activité antileishmanienne remarquable contre les formes promastigotes de *L. tropica* avec une IC<sub>50</sub> de 3,15 $\mu$ g/ml. Dans les pays du moyen orient, tel que l'Arabie Saoudite et le Yémen, il a été montré que l'extrait de *Verbascum bottae* (molène) avait une activité antileishmanienne contre *L. infantum*. La valeur de l'IC<sub>50</sub> était de 3,2 $\mu$ g/ml (MOTHANA *et al.*, 2014).

En plus de la capacité inhibitrice de l'acide gallique et de la vanilline sur les formes promastigotes, nous avons aussi testé leur cytotoxicité sur des macrophages différenciés à partir des cellules THP-1. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus étaient de 161,7 $\mu$ g/ml et 1182 $\mu$ g/ml pour l'acide gallique et la vanilline, respectivement. Ces résultats indiquent que les deux extraits sont très peu cytotoxiques vis-à-vis des cellules THP-1. Les tests de cytotoxicité sont très importants avec les produits naturels à cause de l'intérêt de ces derniers et leur utilisation comme un traitement thérapeutique à partir des plantes médicinales. Des études sur la cytotoxicité des produits naturels ont montré l'intérêt des cellules THP-1 dans l'évaluation de l'activité antileishmanienne (GEBRE-HIWOT *et al.*, 1992).

### Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Les concentrations inhibitrices de nos deux produits sur les cellules THP-1, nous a aussi permis de calculer l'indice de sélectivité. Nos résultats ont montré que l'extrait acide gallique avait un bon indice de sélectivité pour les 03 souches étudiées : *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum* (dont les valeurs sont inférieures à 1). Par ailleurs, la vanilline a aussi révélé un bon indice de sélectivité en dessous de 1 pour les 03 souches (*L. major*, *L. infantum* et *L. killicki*).

Nos résultats de criblage secondaire sur les formes amastigotes pour *L. infantum* ont montré que les valeurs des IC<sub>50</sub> sont plus faibles que celles obtenues avec les formes promastigotes dont les valeurs étaient respectivement de : 22,62µg/ml et 13,11µg/ml pour l'acide gallique et vanilline. Ces résultats nous laissent supposer que l'acide gallique pourrait avoir un intérêt thérapeutique leishmanicide pour *L. infantum*. Les travaux de RAMIREZ *et al.*, 2012, sur les flavonoïdes de la staphisaigre ont montré un effet leishmanicide à la fois sur les formes promastigotes et les formes amastigotes de *L. infantum*. Les résultats obtenus par LAKSHMI *et al.* (2015) indique aussi la possibilité de l'utilisation de *Haliclona oculata* (éponge marine) dans le traitement contre *L. donovani*.

# Conclusion

## Conclusion

---

Les leishmanioses forment un ensemble de maladies parasitaires qui se différencient par leurs manifestations cliniques : LC, LCM ou LV ; cette dernière étant la forme la plus grave de la maladie. Les traitements disponibles sont assez anciens ; c'est le cas de l'antimoine pentavalent. Ce dernier est toxique et coûteux. La nécessité de trouver de nouvelles molécules leishmanicides reste donc une priorité de santé publique pour un pays endémique de la leishmaniose comme l'Algérie.

La richesse de notre flore et son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle a orienté notre travail vers 2 extraits l'acide gallique et la vanilline. L'activité leishmanicide a été étudiée vis-à-vis des espèces présentes en Algérie : *L. major*, *L. killicki* et *L. infantum*.

La présente étude a pu montrer que l'acide gallique et la vanilline possèdent une activité leishmanicide sur la forme promastigote des leishmanies : *L. infantum*, *L. major* et *L. killicki*, et une activité leishmanicide significative sur les amastigotes intramacrophagiques de *L. infantum*. L'intérêt pour ces molécules est d'autant plus important que la cytotoxicité sur une ligné de monocytes est faible avec un indice de sélectivité bien en dessous de 1.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour ce travail. Une étude *in vivo* pourrait conforter l'utilisation de ces molécules. De plus, la richesse de notre flore locale utilisée en pharmacopée traditionnelle montre qu'il reste encore beaucoup de plantes locales qui n'ont pas été analysées. Elles mériteraient d'être étudiées afin de déterminer leur potentialité dans le traitement de la leishmaniose. Une étude des mécanismes d'action de l'acide gallique et de la vanilline 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

---

1. **A REVIEW, 2015.** Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives. Pharm.Pat.Amal.(2015)4(4), 305-315.
2. **ADEL A., BOUGHNUFALAH A., SAEGERMAN C., DE DEKEN R., BOUCHENE Z., SOUKEHAL A., BERKVENS D., BOELAERT M., 2014.** Epidemiology of leishmaniasis in Algria. PLOS ONE 9(6): e 99207. Doi: 10.137/journal.pone.0099207.
3. **ALVAREZ F., ROBELLO C., VINGNALIM M., 1994.** Evolution of codon usage and base contents in kinetoplastid protozoans. Mol. Bio. Evol., 11, 790-802.
4. **ALVER J., VELER I., BERN .C, HERRO M., DESJEUX P., CANO J., JANNIN J, BOER M., 2012.** Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. The WHO Leishmaniasis Control Team, 7, p 12.
5. **ANTINARELLI L.M.R., SCIO N.C.P. E., COIMBRA A.S., 2015.** Antileishmanial activity of some Brazilian plants, With particulier reference to *casearia sylvestris*. An A cad. Bras. cieuc, 87 (2),p 734-742.
6. **AOUN K., BOURATBINE A., 2014.** Cutaneous leishmaniasis in North Afric a review. Parasite, 21, 14.
7. **BACHI F., 2006.** Aspects épidémiologiques et clinique des leishmanioses en Algérie. La lettre de l'infectiologue. TomeXXI.n°1-Janvier- Février. p15.
8. **BAMBA S., BARRO-TRAORE F., DRABO M.K., GOUBA A., TRAORE A., GUIGUEMDE T.R, 2013.** Epidemiological profile, clinical and therapeutic cutaneous leishmaniasis in the Department of dermatology at University Hospital in Ouagadougou, Borkina Faso. Rev. Med. Brux., 34, 392-396.
9. **BERCHI S., BOUNAMOUS A., LOUADI K., PESSON B., 2007.** Differentiation macrophagique de deux espèces sympatiques: *Phlebotomus pernicious Newstead* 1911 et *Phlebotomus iongicupis Nitzulescu* 1930 (Diptera : psychodidae). Ann. Soc. Entomol. Fr., 43(2) : 201-203.
10. **BLAVIER A., KEROCK S., DENEROLLE P., GOY-THOLLOT I.,CHABANNE L., CADORE J.L., BOURDOISEAU G., 2001.** Atypicale forme of canine leishmaniose. Vet. J., 162, 108-120.
11. **BOUDRISSA A., CHERIF K., KHERRACHI I., BENBETKA S., BOUIBA L., BOUBIDI S.C., ARRAR L., HAMRIOU B., 2012.** Extension de *Leishmania major* au Nord de l'Algérie. Bull. soc. Pathol. Exot., 105, 30-35.
12. **BOUNAOMUS A., 2010.** Biosystematique et caractérisation par Biologie Moléculaire des phlébotomes de l'Est Algérien. Thèse de Doctorat en science option : Entomologie. Université Frères Mentouri de Constantine.

## Références bibliographiques

---

- 13. BOURDOISEAU G., HUGNET C., PAPIEROK G.M., LAMESRE J.L., 2004.** La Leishmaniose canine à la *Leishmania infantum* : essais d'immunothérapie. Bull. Acad. Vet. France –Tome 157-N°1.p63-67
- 14. BOUSSAA S., 2008.** Epidémiologie des leishmanioses dans la région de Marrakech, Maroc: effet de l'urbanisation sur la répartition spatio-temporelle des phlébotomes et caractérisation moléculaire de leurs populations. Thèse de Doctorat : Ecologie-Epidémiologie. Université Louis pasteur Strasbourg I, France.
- 15. CARRE, N., COLLOT, M., GUILATD, P., HORELLOU M., GANGEUX J.P., 2010.** La leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. J. Pharm. Clin., 3, 121-148.
- 16. DEDET J.P., 2009.** Leishmaniose, leishmanioses: Biologie, Clinique et thérapeutique. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-506-A-10. p12.
- 17. DEDET J.P., 1999.** Les leishmanioses. Ed. Ellipses Paris, 227-236.
- 18. DEDET J.P., 2009.** Les leishmanioses en France : épidémiologie et surveillance. Université Montpellier1 et CHU de Montpellier, Centre National de Référence des *Leishmania*. 5<sup>ème</sup> Séminaire des CNR, Paris.
- 19. DJARBUH A, TOUDJINE M, DJOUDI M, BENKHELEF R, HARRAT Z, 2005.** La leishmaniose canine en Algérie : essai de traitement par l'allopuninol. Ann. Med. Vet., 149, 132-134.
- 20. DHEKRA C., HAOUAS N., DEDET J.P., BABBA H., 2014.** Leishmanioses in Maghreb : An endemic neglected disease Acta Tropica, 132, 80-93.
- 21. DUJARDIN T.C., HENRISSON I., VIVTOIR K., BRISSE S., GAMBOA D., AREVALO J., LE RAY D., 2000.** Genomic rearrangements in trypanosomatide : an alternative to the 'one gene' evolutionary hypotheses, Memórias do Instituto Oswaldo, Cruz, 95, 527-535.
- 22. ELRHAFARI L., HAMMAMI K., BENLYYAS M., ZAID A., 2002.** Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet. Biologie et santé, 1(4), p45-54.
- 23. EZATPOUR B., DEZAKI E.S., VAND H.M., AZODPOUR M., EZZATKHAN F., 2015.** In vitro and In vivo Antileishmanial Effects of pistacia khinjuk against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID149707, p 6 .
- 24. FENDRI F.H., BELDJOUIDI W., AHRAOU S., DJABALLAH M., 2012.** Les leishmanioses diagnostiquées au CHU Benbadis de Constantine (Algérie) : bilan de cinq années (2006-2010). Bull. Soc. Pathol. Exot., 105, 46-48.
- 25. FRAHTIA-BENOTMANE K., 2015.** Détection moléculaires des leishmanies à partir du genre *Phlebotomus* (Diptera :pshychodidance) : Tendance vers la régression de la

## Références bibliographiques

---

leishmaniose à Constantine. Thèse Doctorat en Science en Biologie Animale. Option Entomologie. Université Frères Mentouri, Constantine.

**26. FORGET G., 2004.** Etude des mécanismes de régulation négative utilisés par leishmaniose pour contrer la réponse immunitaire. Doctorat en microbiologie-immunologie. Faculté de Médecine. Université Laval, Canada.

**27. GEBER-HIWO *et al*, 1992.** An vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP1. *Acta trop.* 53(3-4): p.237-45.

**28. Gott J.M., 2003.** Two distinct roles for terminal uridylyl transferases in RNA editing. *Proc. Nall. Acad. Sci. USA*, 100(19): 10583-10584.

**29. HANDMAN E., 2001.** Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. microbial. Rev*, 14 (2), p 229-43.

**30. HARRET Z., HAMRIOUI B., BELKAID M., TABET-DERRAZ O., 1995.** Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull. soc. Path. Ex.*, 88, 180-184.

**31. HARRET Z., PRATLONG F., BELAZZOUG S., DEREURE J., DENIA M., RIOUX J.A., BELKAID M., DEDET J.P., 1996.** *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transaction of the royal Society of Tropical Medecine and Hygiene*, 90, 625-629.

**32. HASSANI M.A., LAHLOU H., ALANU M., BABA A.F., EL YOUSSEFI LAILA G., CHAOUKI S., ATMANI S., MOSTAPHA HIDA M., 2011.** Aspects biologique de la leishmaniose viscérale infantile. *Revue francophone des laboratoires*, 429, p55-60.

**33. HADJ SLIMANE T., 2012.** Profil épidémiologique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'Ouest Algérien. Diplôme de Magister en parasitologie. Université d'Oran.

**34. HATIMI S., BOUDOUMA M., BICHICHI M., CHAIB N., GUESSOUS IDRISSE N., 2000.** Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'artémisia herba-alba ASSO. *Thérapeutique*, 2162, 1-3.

**35. IZRI A., DEPAQUIT J., PAROLA P., 2006.** Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes au tour du Bassin Méditerranéen. *Med. Trop.*, 66, 429-435.

**36. IZRI (M.A) & BELAZZOUG (S), 1993.** *Phlebotomus (Larrousius)perfiliewi*. Naturally infected with dermatropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans.Roy.Soc.Trop: Hyg.*, 1993,87, 399.

**37. JANVIER F., MORILLON M., OLLIARO F., 2008.** Leishmaniose viscérales : efficacité clinique et résistances aux différentes molécules. *Med. Trop.*, 68, 89-101.

**38. JEBBOURI Y., 2013.** Prof épidémie-clinique, Thérapeutique et évolutif de la leishmaniose cutanée (A propos de 52 ans). Thèse de Doctorat en Médecine. Expérience de Dermatologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail- Meknés.

## Références bibliographiques

---

- 39. KABB A.L., OPPEGAED L.M., KENZEIE B.A.M.C., CONNELL G.J., 2001.** A mRNA determinant of gRNA- directed kinetoplastid editing. *Nucleic Acid Res.*, 29(12), 2575-2580.
- 40. KALILOU DIALLO K., 2014.** Epidémiologique, Clinique thérapeutique et évolutif. A propos 87 cas récentes dans le service de dermatologie de l'institut d'hygiène sociale de Dakar. Diplôme d'Etat en médecine : médecine et d'odontostomatologie. Université des Sciences des Techniques et des technologies de Bamako.
- 41. KHAN I., AHMED K., TALHA KHABIL A., KHAN J., KHAN Y.A., SAQIB M.S., UMAR M.V., AHMED H., 2015.** Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). 35, p316-322.
- 42. LAKSHMI V., KHARE P., SRIVASTAVA P.M.M.N., DUBE A., 2015.** Antileishmanial potentiel of a marine sponge *Haliclona Oculata* against experimental visceral leishmaniasis. *Journal of coastal life medicine*, 3(3), 187-192.
- 43. LIGHTBURN E., MORAND J.J., MEYNARD J.B., KPAE MER P., CHUDIER B., PAGES F., GARNOTEL E., PATTE J.H., BANZET S., DAMPIERRE H., LEPAGE J., MORILLON M., BOUTIN J.P., HOVETTE P., CHOUC C., 2003.** Thérapeutique des leishmanioses tégumentaires du nouveau Monde expérience à propos de 326 cas traités par Isothionate de Pentamidine a fortes doses. *Med. Trop.*, 63, 35-44.
- 44. MARTY P., 2010.** Leishmaniose viscérale : Epidémiologie, diagnostic et traitement. La lettre de l'infectiologie. Tome xxv-n°5.
- 45. MARTY P., DELAUNAY P., FISSORE C., LEFICHOUX Y., 2007.** La leishmaniose Méditerranéenne due à *Leishmaniose infantum* mise au point-intérêts des tests de diagnostic rapide: IT- LEISH ETID-PAGIA LEISHMANIASIS. *Med. Trop.*, 67, 79-85.
- 46. METWALLY D.M., AL-OLAYAN E.M., EL. KHADRAGY M.F., ALKHATHIR B., 2016.** Antileishmanial Activity (In Vitro and In Vivo) of Allicin and Allicin Cream Using *Leishmania major*; *PlosOne*, 11(8), 1-11.
- 47. MIHOUBI I., MONBRISON F.D.E., ROMEUF N., MOULAHM T., PICOT S., 2006.** Diagnostic délocalisé par PCR temps réel de la leishmaniose cutanée sévissant dans le foyer de Constantine (Algérie). *Med. Trop.*, 66, p6
- 48. MOULOUA A.K., 2014.** Etude-eco-epidemiologique de la leishmaniose canine en Kabyle. Thèse de doctorat en science biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- 49. MONTHANA R.A., AL-MSAYEIB N.M., AL-AJMI M.F., COS P., MAES L., 2014.** Evaluation of the in vitro Antiplasmodial, Antileishmanial, and Antitrypanosomal Activity of Medicinal plants Used in Saudi and Yemeni Traditional Medicine. Hindawi Publishing

## Références bibliographiques

---

Corporation Evidence-Based complementary and alternative Medecine, volume 2014, Article ID905639,p7.

**50. MYLER P.J, SISK E, DONAGH P.D MC, MARTINEZ-CALVILLO S, SCHNAUFER A. SUNKIN S.M, YAN S, MADHUBALA R, IVENS A and STUART K, 2000.** “Genomic organization and gene function in *Leishmania*”. Biochem. Soc. Trans., 28(5), 527-531.

**51. NETHAJI J.G, 2015.** Vanillin Bioconversion and-Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its DE Novo Biosynthesis in the vanilla Orchid. Volume 8, Issue 1.p40-57, 5 January 2015.

**52. OMS, 2014.** Rapport de la réunion du comité OMS d’experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22-26 mars 2010. Lutte contre les leishmanioses.

**53. OMS, 1990.** Rapport d’un comité OMS d’experts, lutte contre la leishmaniose. Organisation Mondiale de la santé, Genève 1990.

**54. OMS, 2014.** Deuxième rapport de L’OMS sur les maladies tropicales négligées.

**55. OUELETTE M., OLIVIER M., PAPADOPOULOU B., 2006.** Le parasite leishmania à l’ère de la post-génomique. Médecine/science ; 19(10), 900-909.

**56. PEACOCK C.S., 2007.** Comparative genomic analysis of three leishmanias species that cause diverse human disease. Nat. Genet, 39, 839-847.

**58. PILLY.E, 2010.** CMIT, leishmaniose: vivactis plus. p 424.

**59. PILLY.E, Montmorecy, 1997.** APPIT, “Leishmaniose.” In: APPIT, ed. 2 M 2 Ed: pages 547.

**60. PROUST J., 1981.** Maladies infectieuses. Parasitologies Editions VIGOT. P 195.

**61. RAMIREZ-MACIAS I., MARIN C., DIAZ J.G., ROSALES M.J., GUTIERNEZ-SANCHEZ R., SANCHEZ-MARENO M., 2012.** Leishmanicidal Activity of Nine Novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*. The Scientific World journal volume 2012. Article ID 203646,p10.

**62. RAMLI I., 2013.** Etude, in vitro, de l’activité anti leishmanienne de certaines plantes médicinales locales : cas de la famille des lamiacées. Thèse de magister : biologie appliquée. Université Constantine 1.

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

**64. SENSOR M.W., 2011.** Eco-épidémiologie des phlébotomes dans le foyer leishmaniose de la communauté Rural de Mont-Rolland, (Thiès, Sénégal) : le genre *stergentomyia*, vecteur de *Leishmania infantum*. Thèse Doctorat : CBS2 : Biologie des populations et écologie. Université Montpellier II, France.

## Références bibliographiques

---

- 65. SIMPSON L., SIMPSON A.M., KIDANE G., LIVINGSTON L., SPHITHILL T.W., 1980.** The kinoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29, 1053-1063.
- 66. STILES J.K., HICOCK P.I., MEADE J.C., 1999.** Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93(8), 781-807.
- 67. TAMIMY H., 2011.** La leishmaniose viscérale infantile (A propos 73 cas). Thèse de Doctorat en Médecine : Médecine et pharmacie. Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah.
- 68. World Journal of Gastroenterology, 2016.** Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. Apr21, 2016; 22(15): 3952-3961.
- 69. ZAIT H., HAMRIOUI B., 2009.** Leishmaniose cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue Francophone des Laboratoires*, 412, p33-39.

# Annexes

## Annexe 1 : Préparation des milieux de culture

### 1. Milieu NNN

#### 1.1. Composition

- Gélose Bacto Agar (Difco)..... 10g
- NaCl .....6g
- Eau distillée stérile ..... 100ml
- Sang de lapin ..... 10 à 20%

#### 1.2. Préparation

La gélose Bacto Agar est ajoutée à la solution de NaCl chauffée à 80°C. Le mélange est soumis à une agitation continue. La stérilisation se fait à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. La conservation se fait à +4 °C.

Le sang de lapin est obtenu par ponction cardiaque, il est recueilli sur citrate de sodium à 10%. La conservation se fait à +4 °C.

La gélose est fondue au bain marie (45 °C) et le sang y est ensuite incorporé (1 volume de sang pour 4 volumes de gélose).

### 2-Milieu RPMI 1640

#### 2.1. Composition

- RPMI 1640.....16,4g
- Eau distillée.....1000ml

#### 2.2. Préparation

- Mesurer environ 900ml d'eau distillée.

## Annexes

---

- Tout en soumettant l'eau distillé à une agitation magnétique, ajouter le milieu sous forme de poudre et mélanger jusqu'à dissociation sans chauffer.
- Ajouter 2ml de L-Glutamine, 50U/ml de Pénicilline et 50U/ml de Streptomycine.
- Compléter avec l'eau distillée jusqu'à atteindre le volume final de 1000ml.
- Filtrer le milieu avec un filtre de 0,22 $\mu$ m.
- Additionner aseptiquement du Sérum de veau Fœtal (SVF) à 10 %, si nécessaire.
- Conserver le milieu à +4 °C.

## **Annexe 2 : Comptage sur cellule de Thoma**

### **1. Principes de la numérotation cellulaire des parasites sur cellule de Thoma**

La numération cellulaire est la détermination du nombre de parasite contenus dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de numérotation en concentration cellulaire (le nombre de parasites dans un volume donné).

### **2. Technique de numération cellulaire**

#### **2.1. 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.

#### **2.2. Préparation de la cellule de numération**

##### **2.2.1. 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. Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravée sur la lame et la profondeur de la chambre.

##### **2.2.2. Remplissage de la cellule de numération**

Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer une lamelle 22× 22 mm.

Faire adhérer la lamelle aux plateaux en exerçant une légère pression ainsi qu'un mouvement de va vient jusqu'à percevoir une résistance jusqu'à créer un effet de ventouse.

Placer la cellule de comptage sur une surface plane puis homogénéiser la suspension parasitaire.

## Annexes

---

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.

Laisser la goutte se diffuser sur toute la surface de la plate-forme centrale du quadrillage.

Laisser le liquide sédimenter quelques secondes avant de procéder à la numération.

Laver puis sécher la cellule de Thoma après utilisation.

### 2.3. Numération

Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage et l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).

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.

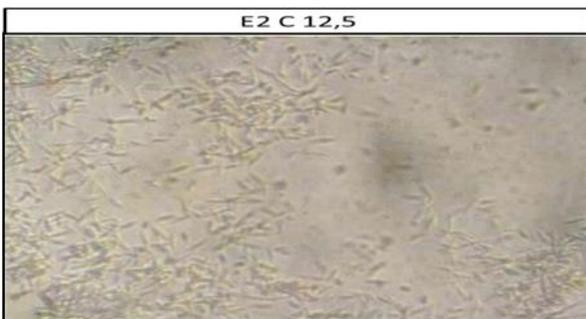
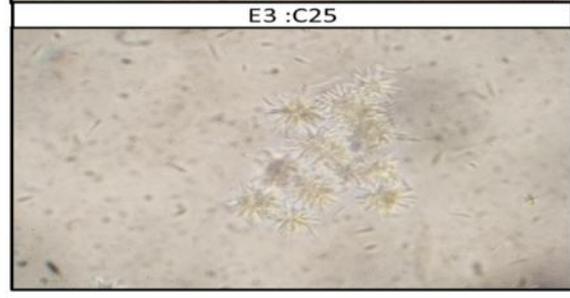
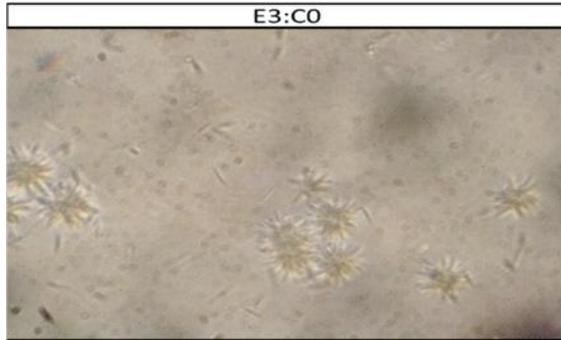
### 2.4. Calcul de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire de la suspension est calculée comme suit :

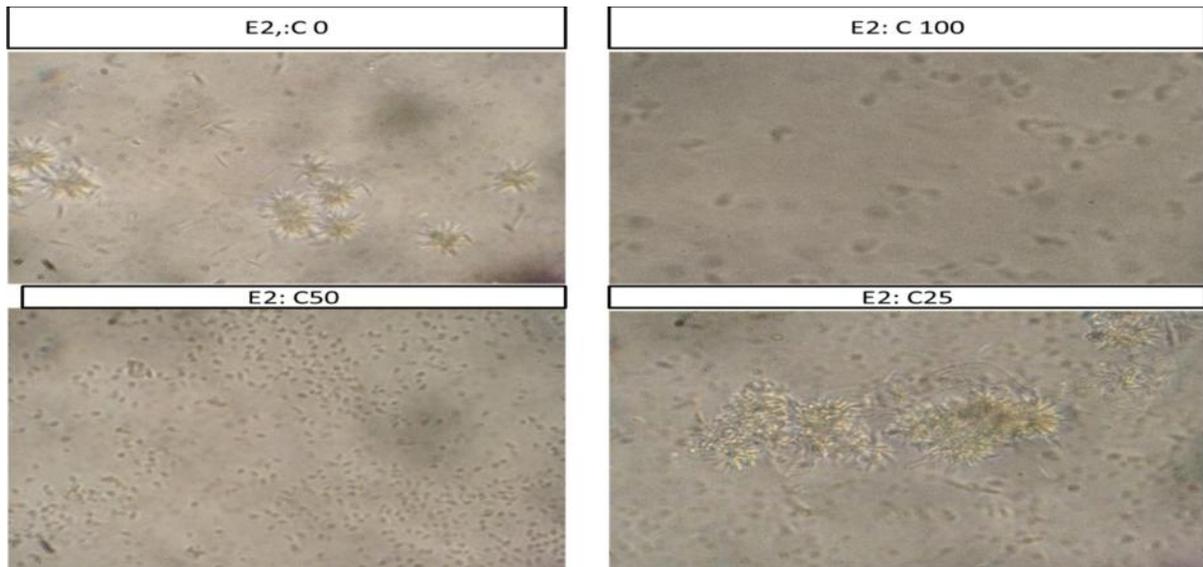
$$\text{La concentration cellulaire} \frac{\text{cellules}}{\text{ml}} = \frac{\text{nombre de cellules}}{6} \times \frac{16 \times 10^4}{\text{dilution}}$$

### Annexe 3 : les résultats microscopiques

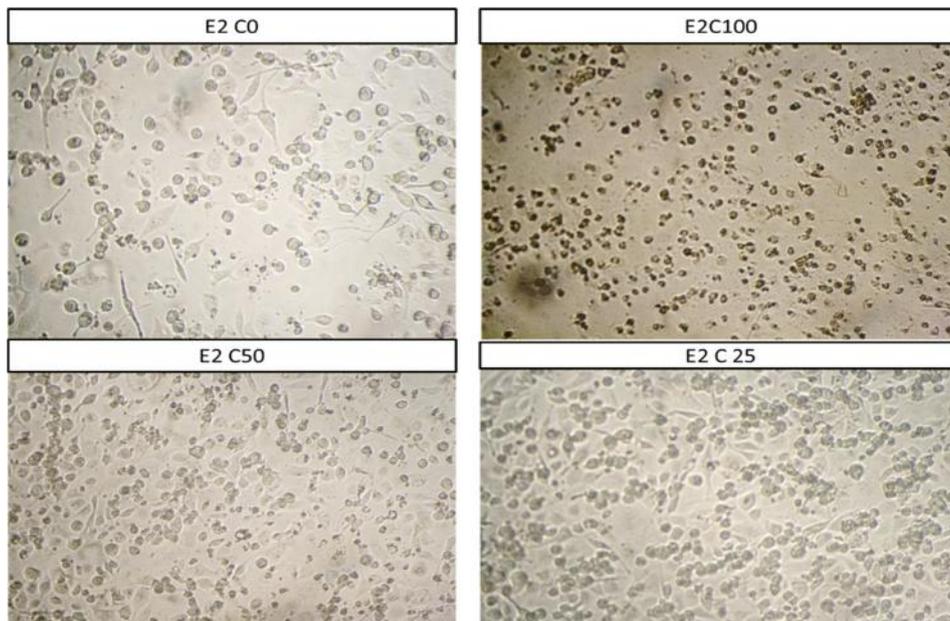
#### 1. Observations microscopiques de l'effet de l'acide gallique et la vanilline à différentes concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) sur les formes promastigotes de *L. infantum* LIPA 15/05



## Annexes



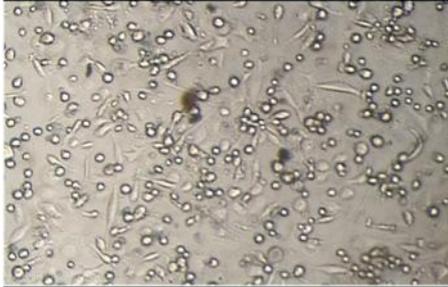
### 2. Observations microscopiques de la cytotoxicité de l'acide gallique sur les macrophages avec et sans coloration au bleu de Trypan



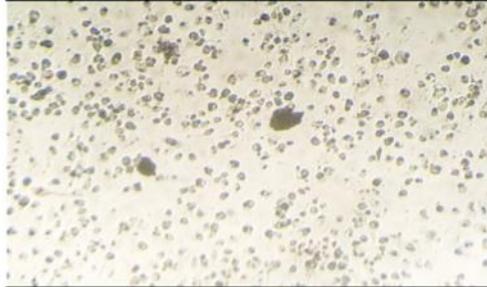
# Annexes

---

E2 C0 avec coloration



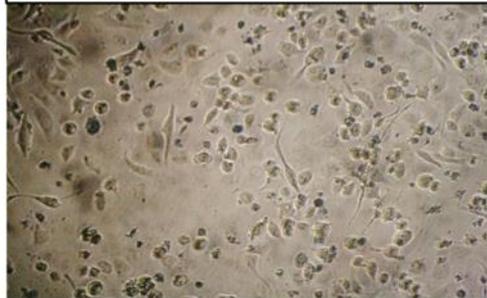
E2 C100 avec coloration



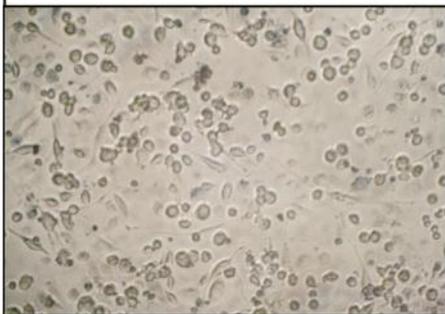
E2 C50 avec coloration



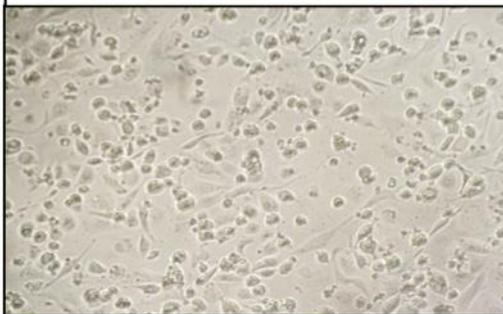
E2 C25 avec coloration



E2 C 12,5 avec coloration



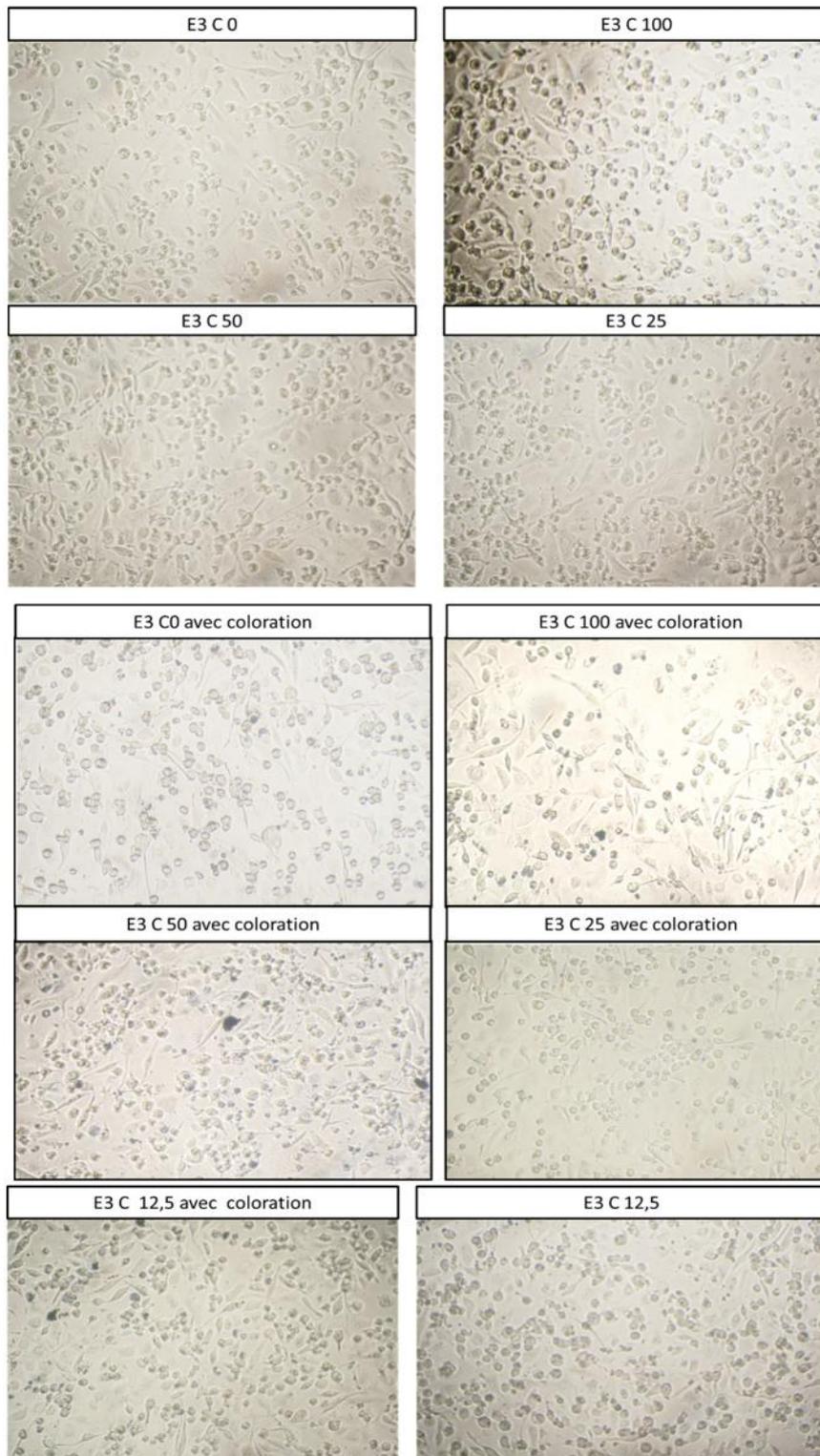
E2 C12,5



## Annexes

---

### 3. Observations microscopiques de la cytotoxicité de la vanilline sur les macrophages avec et sans coloration au bleu de trypan



## Résumé

La leishmaniose est une maladie complexe avec une large spectre de présentation clinique en Algérie soit la leishmaniose cutanée et la leishmaniose viscérale. En effet, le principal traitement disponible qui est l'antimoine pentavalent. Ce dernier est un traitement coûteux administré par voie parentérale. La recherche de nouvelle molécule active est donc une nécessité, afin de trouver de nouvelles molécules, d'origine naturelle, efficaces contre la leishmaniose. Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet antileishmanien de l'acide gallique et la vanilline contre *Leishmania major*, *L. infantum* et *L. killicki*. Pour ce faire, nous avons testé ces deux composés sur la forme promastigote de *L. infantum*, *L. major* et *L. killicki*. Aussi, nous avons testé ces deux extraits sur la forme amastigote de *L. infantum*. L'effet cytotoxique de l'acide gallique et de la vanilline a aussi été testé sur la lignée cellulaire THP-1. Les résultats ont révélé que l'acide gallique a montré une très bonne activité leishmanicide sur les formes amastigote et promastigote, par contre, la vanilline a démontré une meilleure activité leishmanicide sur les amastigotes par rapport à la forme promastigote. Les deux extraits ont montré une faible toxicité sur les cellules THP-1.

Mots clés : activité leishmanicide, acide gallique, leishmaniose, vanilline.

## Abstract

Leishmaniasis is a complex disease with a wide spectrum of clinical forms in Algeria: cutaneous and visceral. The main treatment available is the pentavalent antimony, which requires parenteral administration and is costly. So, there is a need to find new natural molecule effective against leishmaniasis. In this study we evaluated the effect of gallic acid and vanillin against *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. killicki*. These two extracts were tested against the promastigote form of *L. infantum*, *L. major* and *L. killicki*. Besides, their effects on THP-1 cells and amastigote form of *L. infantum* were also evaluated. The obtained results showed that gallic acid exhibited a very good leishmanicidal activity on both amastigote and promastigote forms while vanillin had good activity only on amastigote form. On the other hand, the two natural extracts showed low toxicity to THP-1 cells.

Keywords: gallic acid, leishmaniasis, leishmanicidal activity, vanillin.