

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des sciences biologiques et de sciences agronomiques

Département de Biochimie et Microbiologie

Mémoire

De fin d'Etudes

En Vue de l'Obtention du Diplôme de MASTER en Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Activité antileishmanienne des extraits aqueux de *Verbascum sinuatum.L* et *Phlomis bovei de Noé*

Réalisé par : Melle : BELKALEM Sabrina

Melle : ZAUCHE Katia

Soutenu le 12 Octobre 2017

Devant le jury :

Présidente : Mme IRATNI. G

Maitre assistante à l'UMMTO.

Promoteur : Mr HOUALI. K

Professeur à l'UMMTO.

Examineur : Mr MOULOUA. A

Maitre de conférences à l'UMMTO.

2016-2017

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous remercions ALLAH 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.

C'est pour nous autant un plaisir qu'un devoir d'exprimer notre gratitude et notre reconnaissance à notre promoteur Pr Houali Karim et Mr Mouloua Abdelkamel , pour nous avoir proposé et dirigé ce sujet avec une grande rigueur scientifique et pour leurs conseils avisés et leurs remarques pertinentes qui nous ont apportés aide pour la réalisation de ce modeste travail.

Nos plus vifs remerciements s'adressent au Dr Afroun Rekeia , qui nous a initié et formé à la culture des *Leishmanias* au sein du laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine de L'UMMTO et pour ses bonnes explications qui nous ont éclairées le chemin de la recherche ainsi que sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce travail.

Nous voudrions aussi témoigner notre reconnaissance à nos enseignants, Mr Medjkoun, Mr Bariz, Mr Titouche, Mr Moualek qui ont participés avec leurs conseils et leurs critiques qui ont guidé nos réflexions. Ainsi que M^{me} Irratni qui s'est montré à l'écoute et très disponibles tous au long de la réalisation de ce travail et pour l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Nos profonds remerciements vont à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je dédis le fruit de ce modeste travail comme un geste de gratitude :

D'abord à ceux qui sont les plus chers pour moi : Ma mère, qui est la source de mon bonheur, celle qui m'a toujours soutenue et encouragée et à qui je dois une grande reconnaissance pour tous ce qu'elle m'a offert ; et à mon très cher père qui est la source de ma fierté, que je remercie pour sa présence, ses sacrifices et tous ce qu'il m'a procuré.

A mes chers frères : Mouloud et Amirouche, ainsi que ma petite sœur Nounou.

A mes chères cousines : Sarah, Siham, Dehbia, Lynda, Lydia, Cylia....

A tous mes oncles et tantes ; et à mes grands mères que DIEU les garde pour nous.

A tous mes amis(es) et à toute la promotion de Microbiologie Appliquée.

Katia

Dédicaces

Aux deux plus belles créatures que DIEU a créée sur terre, qui ont toujours été à mes côtés, à leur source de tendresse et d'amour dont ils ne cessent de me combler.....

A mon très cher père et à ma mère, rien ne peut exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers vous, vos sacrifices pour moi, votre compréhension, votre patience, vos conseils et encouragements sont pour moi les soutiens indispensables qui ont guidé mes pas vers la réussite. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, je ferai de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

A ma très chère sœur Daya et ses filles : Amira, Iman et Sirne qui sont les bougies rayonnantes qui éclaire ma vie.

A ma chère grand mère Fatma qui nous a quitté sa fait bien 2 ans, tu as toujours prié pour ma réussite, que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

A mes meilleurs amies que je considère comme sœur : Ourdia, Nora, Lynda et Safia.

A toute la famille Belkalem et Mahmoudi.

A tous mes amis(es) et à toute la promotion de Microbiologie Appliquée.

Rina

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

Partie I : *Leishmania* et leishmaniose

1. Historique	3
2. Définition de la leishmaniose	4
3. Epidémiologie de la leishmaniose.....	4
3.1. Répartition géographique	4
3.1.1 Dans le monde	4
3.1.2. En Algérie	5
3.2. Agent pathogène.....	6
3.2.1. Morphologie du parasite.....	6
3.2.2. Classification du parasite	7
3.2.3. Le génome	7
3.3. Vecteur	8
3.3.1. Définition	8
3.3.2. Taxonomie.....	8
3.3.3. Morphologie	9
3.3.4. Biologie	10
3.4. Réservoir	11
3.5. Cycle évolutif de leishmania	11
3.5.1. Chez le vecteur	11
3.5.2. Chez le mammifère	12
3.6. Transmission	13

4. Immunité	14
5. Interaction parasite/Hôte	14
6. Facteurs de risque à la leishmaniose	15
7. Leishmaniose/ VIH	15
8. Formes cliniques	16
9. Aspect de la Leishmaniose canine	19
10. Diagnostic.....	20
10.1. Éléments d'orientation	20
10.2. Diagnostic indirect	20
10.3. Diagnostic direct	21
10.4. Méthodes moléculaires.....	22
11. Traitement	23
12. Prévention.....	25
13. Vaccination.....	26

Partie II : Les plantes médicinales

I. *Phlomis bovei de Noé*

1. Généralités sur le genre <i>Phlomis</i>	28
2. Espèce <i>Phlomis bovei de Noé</i>	29
2.1. Présentation	29
2.2. Description botanique	29
2.3 Propriétés chimiques	29
3.4 Activité pharmacologique	30

II. *Verbascum sinuatum*

1. Généralités sur le genre <i>Verbascum</i>	31
1.1. Utilisation des <i>Verbascum spp</i> en médecine traditionnelle.....	31
1.2. Propriétés chimiques des <i>Verbascum spp</i>	32
2. Espèce <i>Verbascum sinuatum</i>	32

2.1. Description botanique	32
2.2. Composition chimique	32

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel	33
1.1. Matériel biologique	33
1.1.1. Le parasite	33
1.1.2. Les extraits de plantes	33
1.1.3. Le sang	33
1.1.4. Urine stérile	33
1.2. Matériel non biologique	34
1.2.1. Appareillage	34
1.2.1.1. Grand matériel.....	34
1.2.1.2. Petit matériel	34
1.2.2. Réactifs et solution	34
1.2.3. Milieu de culture	35
2. Méthode.....	35
2.1. Préparation des extraits aqueux.....	35
2.2. Préparation du milieu NNN.....	36
2.3. Enrichissement du milieu NNN	39
2.4. Culture du parasite et lecture.....	39
2.5. Etude de l'activité leishmanicide sur la forme promastigote in vitro.....	39

III : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Activité antileishmania des deux extraits de feuilles des deux plante : <i>Verbascum sinuatum</i> et <i>Phlomis bovei</i>	41
1.2. Effet de l'extrait de feuilles de la plante <i>Verbascum sinuatum</i> sur les promastigotes <i>L.infantum</i>	42
1.3. Effet de l'extrait de feuille de la plante <i>Phlomis bovei</i> sur les promastigotes <i>L.infantum</i>	43

2. Discussion	44
Conclusion	46
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AmB : Amphotéricine B.

ARN : Acide ribonucléique.

CHU : Centre Hospitalo-universitaire.

CRP : C-réactive protéine.

DAT: Directe Agglutination Test.

EDTA: Ethylène diamine tétra acétique.

Gx40 : grossissement 400.

Gx10 : grossissement 100.

GC/MS: Chromatographie en phase gazeuse- spectromètre de masse.

G/l: gramme par litre.

Gp63: Glycoprotéine 63 Da.

ID : Immunodéprimé.

IC50 : Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire.

IFI: Immunofluorescence Indirect.

IFN- γ : Interféron gamma.

IgG: Immunoglobuline G.

IgM: Immunoglobuline M.

IL-4: Interleukine 4.

IL-5 : Interleukine 5.

IL-10 : Interleukine 10.

IL-13 : Interleukine 13.

IM : Intramusculaire.

IPA: Institut Pasteur Algérie.

J : jour.

Kb : Kilo bases.

Kg : kilogramme.

L: Leishmaniose.

LAMP: Loop mediated isothermal amplification.

LC: Leishmaniose cutanée.

LCD: Leishmaniose.

LCL: Leishmaniose cutanée locale.

LMC : leishmaniose muco-cutanée.

LCZ : Leishmaniose cutanée Zoonotique.

LPG: Lipophosphoglycan.

LVS: Leishmaniose visceral sporadique.

LV: Leishmaniose visceral.

LVZ: Leishmaniose viscérale zoonotique.

MGG: May- Grunwald- Giemsa.

Mb: mégabase.

NK: Natural Killer.

NNN: Novy-Mac Neal-Nicolle.

NO: Monoxyde d'azote.

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

Pb : Pairs de bases.

PCR: Polymérase Chain Réaction.

PH : potentiel hydrogène.

PSG: Promastigotes Sécrétoire Gel.

RK39 : recombinant K39.

ROS: Species reactive oxygenes.

Spp: espèce.

SPM : Système phagocyte mononuclé.

Subsp: Sous espèce.

TH1: Lymphocytes T 1.

TH2: Lymphocytes T 2.

VIH: Virus d'immunodéficience humaine.

Liste des figures

Figure 1: Répartition mondiale des leishmaniose	5
Figure 2: Formes promastigotes de leishmania.....	6
Figure 3: Formes amastigotes de leishmania	7
Figure 4: Phlébotome femelle gorgé de sang.....	10
Figure 5: Cycle de vie des parasites de Leishmania dans la mouche de sable.....	12
Figure 6: Schéma représentatif du cycle évolutif des leishmanies.....	13
Figure 7: Leishmaniose cutanée localisé (LCL) du visage chez les enfants.....	17
Figure 8: La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)	17
Figure 9: La leishmaniose cutané- muqueuse (LCM).....	18
Figure 10: Enfant atteint de La leishmaniose viscérale présentant une splénomégalie (OMS, 2014).....	19
Figure11: Chien atteint de la leishmaniose	19
Figure 12: Chien atteint de la leishmaniose	19
Figure13: <i>Phlomis bovei de Noé (subsp bovei)</i>	28
Figure14: <i>Verbascum sinuatum</i>	31
Figure15: Macération à froid de l'extrait de plante.....	35
Figure16: Filtration grossière du macéra	35
Figure17: Repartition du filtrat dans les cristallisoires	36
Figure18: Lyofilisation du filtrat.....	36
Figure19: Extrait aqueux de la plante en poudre	36
Figure 20: Contention du lapin	37
Figure21: Nettoyage de l'oreille du lapin	38
Figure 22: Rasage et désinfection l'oreille du lapin.....	38
Figure 23: Ponction du lapin	38
Figure 24: Sang du lapin en tube vacutenaires.....	38
Figure 25: Préparation de la cellule Malassez.....	40

Liste des tableaux

Tableau I: Tableau des résultats obtenus de l'activité biologique des extraits végétaux (*Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*) sur les promastigotes *L. infauntum*..... 41

Tableau II: Tableau des résultats obtenus de l'activité biologique des extraits végétaux (*Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*) sur les promastigotes *L. infauntum* exprimés en pourcentage de viabilité et de mortalité 42

Introduction

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies infectieuses à expansions mondiale (Vand eskandari *et al.*, 2016) qui comptent parmi les maladies tropicales négligées selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Shirani-Bidabadi *et al.*, 2017). Ces infections sont endémiques dans 98 pays, touchent 12 millions de personnes et menacent environ 350 millions d'autres autour du monde (Mahmoudvand *et al.*, 2014). Elles sont provoquées par des protozoaires intracellulaires obligatoires du genre *Leishmania*, qui infectent de nombreuses espèces mammifères, dont l'Homme auxquelles ils sont transmis par la pique du phlébotome femelle infectée (Clem, 2010).

Les leishmanioses sont responsables d'un large spectre clinique allant de la simple forme cutanée à la forme viscérale de pronostic plus grave (Soosarei *et al.*, 2017). Cette dernière affecte le système phagocytes mononuclée (SPM) en particulier le foie, la rate et la moelle osseuse et est habituellement mortelle si elle n'est pas traitée (Costa *et al.*, 2017). L'Algérie compte parmi les pays touchés par la LV dans le monde et comporte le chien comme réservoir principale (Adel *et al.*, 2014). Cette zoonose est importante au Nord -est de ce pays, ou elle est principalement actif en Kabylie (Zait *et al.*, 2012).

En raison de la non disponibilité de vaccins efficaces, le traitement médicamenteux reste la seule option de contrôle de la Leishmaniose (Yuan *et al.*, 2017). Les principaux agents de chimiothérapie actuelle pour le traitement de cette maladie comprennent les antimoniés, la miltefosine, la pentamidine et l'Amphotericine B (Palacios *et al.*, 2017). D'autre part ces médicaments sont toxiques, coûteux, présentent des effets secondaires, de thérapie complexe et présentent des échecs en raison de l'apparition de résistances des souches vis-à-vis des ces molécules (Akbari *et al.*, 2017) . Ces facteurs soulignent le besoin urgent pour le développement de nouvelles alternatives de traitements efficaces (Mahmoudvand *et al.*, 2014).

L'exploitation des ressources naturelles pour la mise au point de molécules de synthèse, a permis la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim, 2006).

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes. Elle possède une flore extrêmement riche et variée, L'étude de celle-ci présenterait un intérêt scientifique et fondamental pour fournir de nouvelles approches thérapeutiques et stratégies rationnelle pour la conception de nouveaux

Introduction

médicaments (Shirani-Bidabadi *et al.*, 2017). C'est dans ce contexte que nous avons lancé notre étude sur deux plantes endémiques algérienne provenant de la région de Bejaia pour évaluer leur approche thérapeutique.

L'objectif de notre travail vise à évaluer l'activité antileishmanienne de deux extraits aqueux bruts de *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei* de Noé fourni par le laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologie de l'Université Mouloud Mammeri.

Ce manuscrit, présente en premier lieu un chapitre de synthèse bibliographique, la première partie porte sur la leishmaniose, dans la seconde partie sont présentées les plantes qui ont fait l'objet de cette étude. Les deux derniers chapitres sont consacrés à la description de notre travail personnel à savoir matériel et méthodes et les résultats et discussion.

Enfin, nous présentons la conclusion et les perspectives.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Partie I : *Leishmania* et leishmaniose

1. Historique

Parmi toutes les parasitoses, les leishmanioses sont une des premières décrites au moins dans leurs formes cutanées. En effet la description des lésions cutanées remonte à la plus haute antiquité aussi bien dans le l'Ancien Monde que dans le Nouveau Monde, alors que la caractérisation des formes viscérales et la mise en évidence des agents pathogènes n'ont pu se faire qu'au XIX^{ème} siècle (Jarry, 1999).

C'est en Inde et en 1885, que Cunningham observe pour la première fois le corps parasitaire sur des coupes histologiques d'un «Bouton de Delhi» (Jarry, 1999). Cinq ans plus tard, William Leishman et Charles Donovan, découvrent indépendamment le parasite, appelé plus tard «*Leishmania-donovani*», dans des frottis de rate de malades atteints de kala-azar et l'incriminent comme agent étiologique de la maladie (Louzir *et al.*, 2013), et c'est dans la même année que Ross établit le genre *Leishmania* (Ripert, 1999).

Le réservoir canin est identifié en 1908 par Nicolle et ses collaborateurs à Tunis, et dans la même année, ces chercheurs attribuent le nom de *L.infantum* au parasite responsable de la LV infantile et parviennent à réaliser des cultures de celui-ci ainsi que *L.tropica* dans le milieu NNN (Louzir *et al.*, 2013). Après plusieurs années, le moucheron responsable de la transmission de la maladie a été identifié et cela grâce au travail des Frères Sergents et leurs collaborateurs en 1921 (Frahtia-Benotmane, 2015).

En 1974 le typage enzymatique des *Leishmania* est mis au point par Gardener et ses collaborateurs (Louzir *et al.*, 2013).

Les premiers cas d'infection VIH–Leishmaniose ont été signalés en 1980 dans la partie méditerranéenne de l'Europe (OMS, 2011). Sept ans plus tard le paradigme Th1/Th2 au cours de la leishmaniose murine est décrit (Louzir *et al.*, 2013).

En Algérie, le premier cas de la leishmaniose canine est notifié en 1910 par les frères Sergent. Une année plus tard, (Lemaire) décrit le premier cas de LV humaine en Kabylie et en 1946 Sarrouy rapporte le premier cas de Kala-azar infantile (Mouloua, 2014).

2. Définition de la leishmaniose

La leishmaniose est une maladie parasitaire négligée (Forestier, 2013), causée par des parasites protozoaires intracellulaires du genre *Leishmania* (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2017), qui affectent de nombreuses espèces de mammifères dont l'Homme, (Dedet, 2001) auxquels ils sont transmis par la pique infestante de la mouche de sable femelle appartenant au genre *Lutzomia* et *Phlebotomus* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

La maladie est représentée par un groupe diversifié de syndromes cliniques. En fonction de l'espèce parasitaire mise en cause, elle peut se manifester sous trois formes : cutanée, mucocutanée et viscérale (Harhay *et al.*, 2011). Selon l'OMS la leishmaniose est l'une des sept maladies tropicales et subtropicales les plus importantes, qui présente un grave problème de santé publique (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). En effet, jusqu'à 2 millions de personnes sont infectées chaque année dans le monde (Forestier, 2013).

3. Epidémiologie de la Leishmaniose

3.1. Répartition géographique de la leishmaniose

3.1.1. Dans le monde

Les leishmanioses ont une aire de distribution largement étendue, elles sont endémique dans les régions tropicales et subtropicales du monde (Who, 2011).

La maladie est signalée dans 98 pays, dont 72 sont en voie de développement, ou 350 millions de personne risquent d'être infectées. Les zones d'endémie sont : l'Europe du sud, de nombreux pays d'Afrique de l'Est, l'Asie du sud et l'Amérique du sud (Aubry et Gaizère, 2016).

La prévalence de la maladie est estimée à 12 millions et l'incidence annuelle est à 2 million soit 1,5 million de LC reparti en Algérie, Afghanistan, Arabie saoudite, Iran, Pérou et la Syrie. 500.000 cas de LV sont recensés au Brésil, Bangladesh, Inde, Népal, Ethiopie et le Soudan) (ANOFEL, 2014).

En Afrique du nord, trois espèces de leishmania à savoir : *L.infantum*, *L.major*, *L.tropica* sont associées à des caractères environnementaux, cliniques et épidémiologiques distincts sont responsables de la maladie (Fellah *et al.*, 2014).

La population canine qui constitue le principal réservoir du parasite est également très touchée. En effet, 25 million de chiens (2/3) sont exposés à la maladie en zone méditerranéenne, 10% des chiens sont infectés et 5 % développent la maladie et meurent dans le cas d'échec du traitement (Mouloua, 2014).

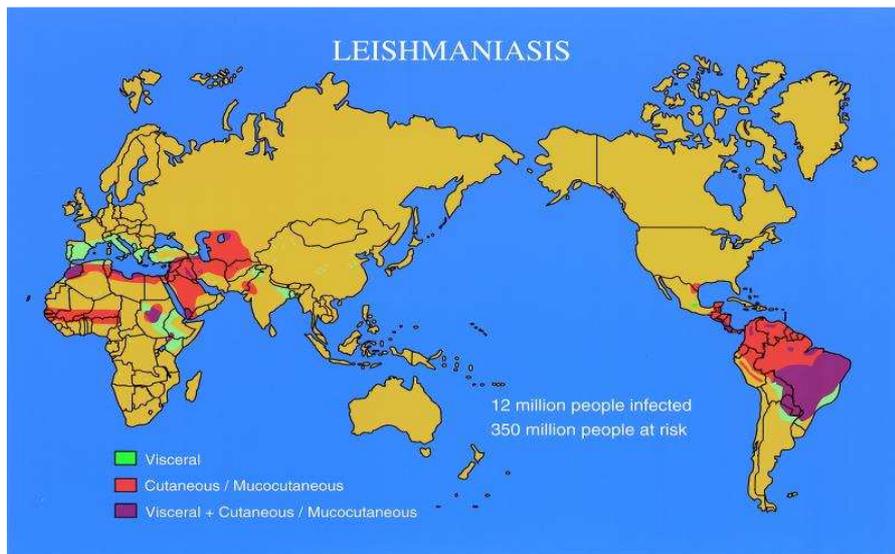


Figure 1: Répartition mondiale des leishmanioses (Handman, 2001).

3.1.2. En Algérie

L'Algérie compte parmi les pays les plus exposés à la leishmaniose où la fréquence de la maladie varie d'une région à une autre (Harrat et Belkaid, 2003). Cependant, deux formes cliniques sévissent à l'état endémique : la LC qui est due à trois espèces *L. infantum* dans le nord, *L. major* dans le centre et le sud du pays et *L. Killickii* qui est une variante de *L. tropica* avec des cas sporadiques dans la province de Ghardaia ; et la LV dont l'agent responsable est *L. infantum* dans le nord du pays, mais ces dernières années elle s'est étendue vers le sud avec plusieurs cas sporadiques (Beldi *et al.*, 2017).

Les foyers anciens de LV sont situés dans les wilayas du nord, au centre et à l'Est : Tizi-Ouzou, Jijel, Mila Boumerdés, Médéa et Constantine. Les nouveaux foyers apparus sont : Annaba et Collo à l'Est, Blida, Cherchell, Ténès et Chleff au centre et de Tlemcen et Oran à l'ouest (Bachi, 2006).

La LV pose un sérieux problème de santé publique en Algérie où 111 cas sont rapportés chaque année (Beldi *et al.*, 2017). En Kabylie, 40% des cas de maladie sont retrouvés et 6% de cas de mortalité sont signalés dans la même région (Mihoubi *et al.*, 2012).

3.2. Agent pathogène

3.2.1. Morphologie du parasite

Les Leishmania sont des parasites dimorphes se présentant à leur hôte successif sous une forme particulière :

3.2.1.1. La forme promastigote

La forme promastigote est de localisation extracellulaire vivant dans le tube digestif du phlébotome et en milieu de culture. Elle est d'aspect allongé mesurant 2 à 5 μm de long, 1 à 4 μm de large et dispose d'un flagelle libre qui assure sa mobilité. Elle est munie d'un kinetoplaste qui est localisé entre le flagelle et le noyau (Mellano, 2016).



Figure 2: Formes promastigotes de leishmania (ANOFEL, 2016).

3.2.1.2. La forme amastigote

Cette forme est localisée au niveau intracellulaire des cellules histio-monocytaire de mammifères dont l'Homme. Elle est d'aspect ovalaire ou arrondie, de taille de 2 à 5 μm , avec un gros noyau sphérique et centrale occupant le tiers du cytoplasme.

La forme amastigote est immobile, il ne présente pas de flagelle. Par contre, il possède un appareil flagellaire rudimentaire appelé rhizoplaste qui est lié à un kinétoplaste (Ripert, 1996) bacilliforme situé tout près du noyau, celui-ci joue un rôle dans l'identification morphologique des forme amastigote après coloration au Giemsa (Buffet, 2012).

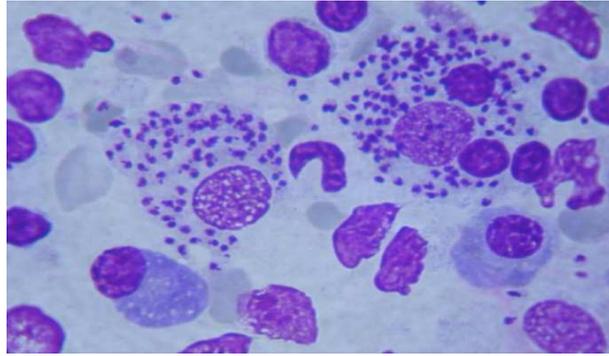


Figure3 : Formes amastigotes de leishmania (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

3.2.2. Classification du parasite

La position systématique selon Akhonundi *et al* (2016) :

Règne : *Protista* (Haeckel, 1866) ;

Classe : *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976);

Sous classe : *Metakinoplastina* (Vickerman, 2004);

Ordre : *Trypanosomatida* (Kent, 1880);

Famille : *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901) ;

Sous famille : *Leishmaniinae* (Maslov et Lukeš 2012).

Sous genre et espèces *Leishmania* (voir l'annexe1).

3.2.3. Le génome

Leishmania renferme dans sa structure un génome nucléaire et un génome kinétoplastique.

3.2.3.1. Génome nucléaire

La taille de ce génome est d'environ 35 Mb (Ouellette *et al.*, 2003), repartis sur 36 chromosomes pour les *Leishmania* spp du Vieux Monde et 34 à 35 chromosomes pour les *Leishmania* spp du Nouveau Monde (Kazemi, 2011).

3.2.3.2. Génome du kinetoplaste

Le kinetoplaste ou le mitochondrion renferme l'ADN extrachromosomique dans un arrangement contracté de molécules circulaires ; 20 à 50 maxi-cercles et 10 000 mini-cercles (Yatawara et al., 2008 ; Kazemi, 2011).

- **Les maxi-cercles**

Ce sont des molécules d'ADN d'une taille de 20 à 30 Kb (Yatawara et al., 2008) et d'environ 50 000 nucléotides (Kazemi, 2011).

Ces unités portent des gènes codants pour des protéines impliquées dans la production d'énergie et des ARN ribosomiaux (Yatawara et al., 2008).

- **Les mini-cercles**

Sont des molécules avec moins de nucléotides (600 à 2500 Pb), leur ADN comprend une séquence conservée chez tous les membres de la famille des Kinetoplastidae et d'autres séquences variables utiles pour le génotypage parasitaire (Kazemi, 2011).

3.3. Vecteur

3.3.1. Définition

Les mouches de sable de phlébotomine sont des insectes diptères (Vlkova et al., 2011), connus comme vecteurs de nombreuses maladies et en particulier, l'agent étiologiques des leishmanioses (Fraïhi *et al.*, 2017).

Seule la femelle est hématophage, pique aussi bien l'homme que l'animal lors de son repas sanguin (Guillaume, 2009 ; Carré *et al.*, 2010).

3.3.2. Taxonomie

La classification selon Torres-Guerrero *et al* (2017).

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Arthropoda*

Sous- embranchement: *Euarthropoda*

Super-classe : *Antenata*

Classe : *Insecta / Hexapoda*

Ordre : *Diptera*

Sous-ordre : *Nematocera* (considéré comme les membres les plus anciens, datant de la période Jurassique)

Family : *Psychodidae*

Sous-famille : *Phlebotominae*

Genre :

- Nouveau Monde : on distingue 3 genres selon la classification de Theodor , Lewis et al : *Lutzomyia*, *Brumployia*, *Warileya* et *Chinius*.
- Ancien Monde : 7 genres selon la classification de Rispaïl et Léger :

Phlebotomus, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaeophébotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeomyia* et *Chinius* (Akhoundi *et al.*, 2016).

Environ 800 espèces sont répertoriés à travers le monde et près de 50 espèces sont considérées comme vecteurs de la leishmaniose (Karimi *et al.*, 2014).

- **Sous genres et principales espèces impliquées dans la transmission de la maladie de la leishmaniose**

La répartition de la leishmaniose dans le monde est dépendante de la présence d'espèces phlébotomes incriminées dans la transmission de cette maladie dans l'environnement. Celles-ci appartiennent aux deux principaux genres : *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (voir annexe 2 et annexe 3).

22 espèces de phlébotomes ont été identifiées en Algérie dont 12 *Phlebotomus* et 10 *Sergentomyia* (Bachi, 2006).

3.3.3. Morphologie

Le Moucheron est d'une petite taille de 2 à 3 mm de long, de couleur jaune paille, d'aspect bossu et de pilosité développée. Cet insecte diptère est d'un vol silencieux interrompu par de brèves périodes de repos, sa piqure est douloureuse et ne laisse pas de

traces (Bessis *et al.*, 2008). Son corps est composé d'une tête, d'un thorax, d'un abdomen et de longues pattes.



Figure 4 : Phlébotome femelle gorgé de sang (Carey et Carlson, 2011).

3.3.4. Biologie

Les phlébotomes adultes vivent tout le long de l'année dans les pays tropicaux et durant la belle saison dans les pays tempérés. Ces insectes sont nocturnes, fuient la lumière du jour en gisant dans des endroits humides et obscurs. En effet, certaines espèces sont endophiles gisent volontairement dans les terriers d'animaux, les étables ou les maisons. D'autres exophiles dans les fissures des roches et des grottes (Izri *et al.*, 2006 ; Ripert, 2007).

Les sucres dérivants de certaines sources végétales servent de nourriture pour ces moucheron. Seules les femelles sont hématophages, en plus de ces nutriments elles ingurgitent du sang qu'elles prennent des oiseaux, des reptiles, des amphibiens ou de mammifères dont l'homme, nécessaire pour la maturation de leurs œufs. Un tel régime alimentaire implique de nombreuses occasions d'ingérer des microorganismes pathogènes qu'elles peuvent transmettre à leurs hôtes (Fraihi *et al.*, 2017). Elles sont les principaux vecteurs déterminants de la transmission des leishmanies (Bessis *et al.*, 2008).

La limite de vie pour ces insectes dépend de la température et de l'humidité de l'endroit dans lequel ils se trouvent. Les femelles vivent plus longtemps que les mâles en vivant 2 semaines à 2 mois, contrairement à l'autre sexe qui est de brève survie (Ripert, 2007).

3.4. Réservoir :

Leishmania est maintenue dans la nature dans plusieurs espèces de mammifères domestiques et sauvages (Roque et Jansen, 2014). Ces derniers appartiennent à divers ordres incluant les édentés, les rongeurs, les marsupiaux, les carnivores et les primates y-compris l'Homme (Dereure, 1999). Parmi ses réservoir le chien reste le plus important (Esteva *et al.*, 2017).

Selon l'hôte réservoir, La leishmaniose peut être divisée en deux groupes, on parle alors de la leishmaniose Zoonotique lorsque les hôtes réservoirs sont des animaux (Quinnel et Courtenay, 2009) et de la leishmaniose anthroponotique lorsque l'Homme constitue le réservoir exclusif du parasite (Wernecki, 2014).

En Algérie, le chien est considéré comme le principal réservoir de la LV. Par ailleurs deux rongeurs sauvages gerbillidés sont réservoirs de la LCZ, le premiers est le *Psammomys obsus* infesté par *L.major* qui a été découvert au niveau du foyer Msila, le second est le *Merione shawi* qui a été identifié au Ksar Chellala (Bachi, 2006).

3.5. Cycle évolutif de leishmania

Les *leishmanias* ont un cycle de vie dimorphique, ils se présentent sous la forme promastigotes extracellulaire chez leur vecteur, et sous la forme amastigotes intracellulaire dans les vacuoles phagolysosomales des phagocytes mononuclées de l'hôte mammifère. (Alcolae *et al.*, 2010).

3.5.1. Chez le phlébotome :

C'est suite à un repas sanguin chez un mammifère infecté que les phlébotomes ingèrent des leishmanies sous la forme amastigotes (1), et qui seront ensuite délivrées au niveau de la partie moyenne du tube digestif où la température basse et le pH élevé déclenche la transformation et le développement morphologiques des formes amastigotes en forme promastigotes procycliques (2) faiblement mobile avec un court flagelle battant à l'extrémité extérieur de la cellule (Dostálová et Volf, 2012). Cette phase prend environs 12 à 18 h (Ripert, 2007).

Les formes procycliques se divisent rapidement puis 60 à 72 heures plus tard, elles ralentissent leur réplication et se différencient en forme plus longue et fortement mobiles appelée nectomonad (3) (Inbar *et al.*, 2017).

Une fois qu'ils atteignent la soupape stomodale, les promastigotes nectomonades(4) se transforment en promastigotes leptomonad(5). Certains des promastigotes nectomonad / leptomonad s'attachent à la surface doublée de la cuticule de la valve et se différencient en promastigotes haptomonad (Bates, 2007). D'autres subissent une métacytogénèse ; qui fait référence à la maturation et la différenciation en promastigotes métacycliques infectieux(6) avec un flagelle deux fois plus long que le corps parasite (Mallorie, 2004).

Enfin les métacycliques infectieux gagnent activement la zone antérieure du tube digestif (œsophage, pharynx), la cavité buccale et les pièces buccales, prêts à infecter l'hôte mammifère à l'occasion d'une nouvelle pique (Moulinier, 2003) (Figure 5).

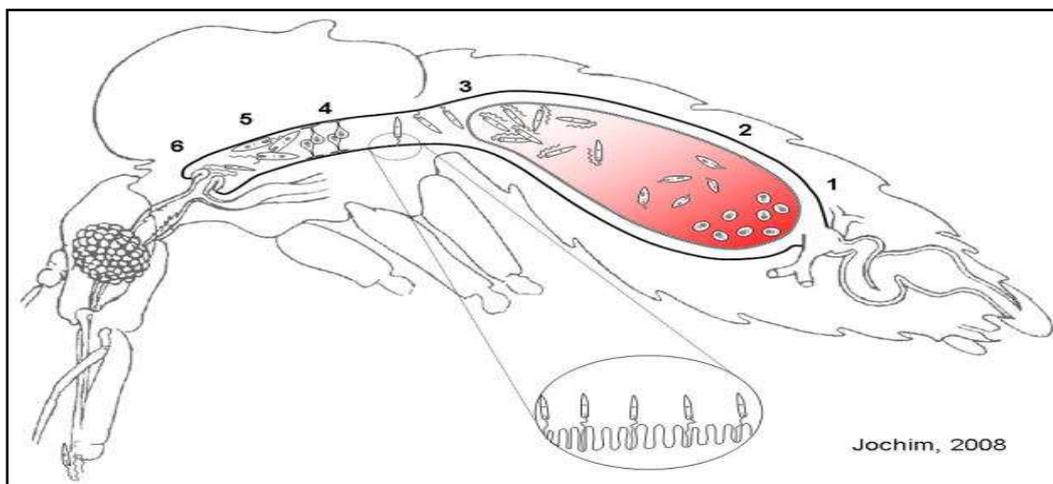


Figure5 : Cycle de vie des parasites de *Leishmania* dans la mouche de sable (Oliveira *et al.*, 2009).

3.5.2. Chez les mammifères

Lors d'un repas sanguin ultérieur, le vecteur infecté pique plusieurs fois son hôte pour se débarrasser du bouchon parasitaire ainsi les promastigotes métacycliques sont injectés dans la peau par régurgitation.

Ils pénètrent dans le macrophage par phagocytose et induisent la formation de vacuoles parasitophores, puis se transforment en amastigotes qui se multiplient par scissiparité jusqu'à éclatement du macrophage et libération des leishmanies à l'extérieur pour pouvoir infecter de nouveaux macrophages. Le cycle est complet lorsqu'une mouche de sable prend ce sang infecté (Guillaume, 2009).

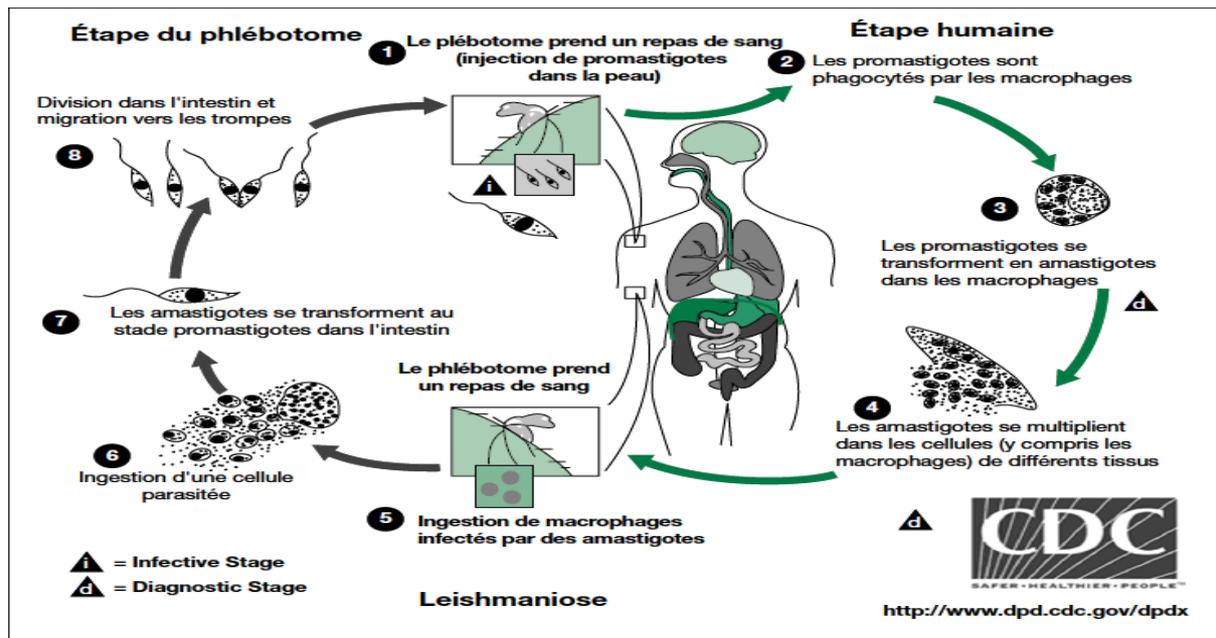


Figure 6 : Schéma représentatif du cycle évolutif des leishmanies (Carré *et al.*, 2010).

3.6. Transmission

La transmission de *L.infantum* comme pour les autres *Leishmanias* spp est essentiellement vectorielle. Elle se fait par la pique infectante d'un phlébotome femelle lors de son repas sanguin chez un hôte mammifère (Quinell *et al.*, 2009).

Lorsque le moucheron pique la peau infectée, il provoque l'endommagement du tissu dermique (formation des hématomes). A ce niveau, il aspire le sang chargé de plusieurs macrophages infectés d'amastigotes. Ainsi le phlébotome devient infecté (Who, 2014) et au même temps infectieux. En effet, lors d'un nouveau repas sanguin, ce moucheron se débarrasse de son bouchon parasitaire qui est constitué d'un gel appelé gel sécrétoire promastigotes (PSG) (Bates, 2007).

Les chiens et les rongeurs infectés peuvent aussi être des candidats contagieux qui, à la faveur de leurs sécrétions nasales et oculaires chargées de leishmanies, peuvent transmettre la maladie à d'autres animaux lorsqu'ils rentrent en contact direct avec ceux-ci, mais cette voie de transmission reste très rare (Carré *et al.*, 2010).

Parallèlement à la transmission vectorielle, une transmission interhumaine directe peut exister, cela par les partages d'aiguilles contaminées, les transfusions sanguines, les transmissions congénitales ainsi que les transmissions sexuelles (Esteva *et al.*, 2017) et les greffes d'organes (Postorino *et al.*, 2011).

4. Immunité

Après la transmission des parasites *Leishmanias* par le phlébotome, l'immunité intervient pour faire face à l'intrus. La réponse du système de défense peut varier en fonction de chaque forme clinique. En effet, dans les cas des LV, LCD et LMC la réponse adaptative est déclenchée. Par contre, dans les cas les LCL cette dernière n'est pas déclenchée (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Les macrophages sont les cellules cibles du parasite, ils sont indispensables à la survie, la réplication, la différenciation et la prolifération de toutes les espèces de *Leishmania* (Liu et Uzonna, 2012).

Pour maintenir sa survie dans l'hôte, le parasite a développé une stratégie très performante pour le détournement de la réponse immunitaire protectrice de l'hôte (Bogdan et Rollinghoff, 1998). En effet l'élimination ou la persistance de *Leishmania* dans son hôte est dépendante de la souche parasitaire, de l'état immunitaire, environnementale et de la génétique de l'hôte qu'il infecte (Khadem et Uzonna, 2014).

5. Interaction parasite/hôte

Les promastigotes métacycliques insérées dans le derme, déclenchent une réponse inflammatoire locale, en faisant intervenir en premier le système du complément, mais le parasite grâce à ces récepteurs de surface virulents LPG et gp63 et la protéine Kinase, détourne le système du complément et parvient à échapper à celui-ci, en bloquant l'accès au complexe d'attaque lytique C5b-9 (Fillipi *et al.*, 2001 ; Guillaume, 2009 ; Gurung et Kanneganti, 2015). Par ailleurs, les leishmanies ayant échappés au complément sont phagocytés par les cellules neutrophiles, dendritiques, les cellules NK et les macrophages.

L'incorporation du parasite dans le macrophage définitive et plus exactement dans le phagosome, favorise sa différenciation en forme amastigote et sa prolifération en grand nombre dans la cellule (Liu et Uzonna, 2012) et cela après détournement des voies de signalisation intracellulaires du macrophage nécessaire à la répression des fonctions : microbicides (ROS et NO), la présentation de l'antigène leishmanial aux autres cellules immunitaires, l'activation des cellules effectrices, la production de cytokines (IL-12 qui est cruciale pour l'activation des cellules TH1) et l'activation des enzymes lysosomale (Gregory et Olivier, 2005).

D'autre part les cellules dendritiques infectées migrent vers la région T des ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène parasites aux cellules T naïves. Et dans un cas de résistance de l'hôte elles activent les cellules TH1 à la production de l'IFN- γ qui à son tour active les macrophages infectés à la production de ROS (Espèces réactives d'oxygène et NO(nitrique oxyde) nécessaires à l'élimination du parasite, mais dans un cas contraire se sont les cellules TH2 qui sont activées qui libèrent les cytokines tels que IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 régulant négativement les macrophages infectées par rapport à la production du ROS et le NO, ce qui favorisera la résistance et la persistance du parasite dans l'hôte (Khadem et Uzonna, 2014).

6. Les facteurs de risques à la leishmaniose

D'après l'OMS la leishmaniose est associée à plusieurs facteurs, on compte alors les mouvements de population (migration et introduction des personnes non immunes dans les zones de transmission) (WHO, 2014), les Changement climatiques (précipitation, température, degré d'humidité...etc.) qui peuvent avoir un effet sur l'écologie des vecteurs et des hôtes réservoirs en modifiant leur distribution et leur survie (OMS, 2010).

La malnutrition, la pauvreté, les mauvaises conditions de logement, les insuffisances de l'assainissement domestique (ex : absence de système de gestion de déchets) sont les principaux facteurs socioéconomiques qui peuvent favoriser le développement et la reproduction des phlébotomes (OMS, 2017).

Les déficits immunitaires, les thérapies immunosuppressives et les pandémies de VIH/Sida sont en faveur d'augmenter l'incidence de l'apparition de la maladie (Faucher et Piarroux, 2011).

7. Leishmaniose /VIH

La pandémie du VIH se propage à un rythme alarmant en Afrique et dans le sous-continent indien où la prévalence de la leishmaniose est très élevée, ce qui contribue à préserver la coïnfection VIH/L dans de nombreuses régions. Il existe aussi une incidence croissante en Europe du sud-ouest tel que la France, l'Italie, l'Espagne et le Portugal.

La leishmaniose viscérale est connue comme une maladie opportuniste. Elle est la forme la plus associée à l'infection par le VIH (Monge-Maillon *et al.*, 2014). Le VIH et leishmania infectent et se multiplient dans les cellules d'origine myéloïde ou lymphoïde,

présentant ainsi une recette parfaite pour la modulation réciproque de la pathogenèse leishmaniose/VIH (Okwor *et al.*, 2013). Donc les deux maladies se renforcent mutuellement, les personnes infectées par le VIH sont particulièrement vulnérables à la leishmaniose, tandis que la leishmaniose accélère la réplication et la propagation du VIH (Who, 2017).

8. Les formes cliniques

Les manifestations cliniques de la leishmaniose dépendent des espèces impliquées et sont modulées par des facteurs tels que la virulence de la souche parasitaire, l'espèce phlébotomienne vectrice ou encore le profil immunitaire de l'individu infecté (Louzir *et al.*, 2013). On distingue 3 formes principales : L.cutanée, L.muco-cutanée et la L.viscérale qui est la plus grave.

8.1. Leishmaniose cutanée (LC)

C'est la forme la plus fréquente, elle fait référence aux lésions dermiques qui apparaissent dans les sites de piqure du phlébotome infecté, généralement dans les parties exposées du corps tel que le visage, les bras...etc. (Chaara *et al.*, 2013).

8.1.1. Leishmaniose cutanée localisée (LCL)

Elle est le plus souvent causée par *L.major* et *L.tropica* dans l'Ancien Monde (Moyen orient, Nord-est de l'Inde, l'Asie Centrale et l'Afrique du Nord) et par *L.mexicana* et *L.braziliensis* dans le Nouveau Monde (Amérique du Sud et Centrale) (Newlove *et al.*, 2012).

La lésion commence comme un érythème qui se transforme graduellement en une papule et plus tard en un nodule qui peut s'ulcérer progressivement, elle peut aussi se présenter sous forme ouverte (lésion humide) qui est sujette à une infection secondaire superficielle par des espèces bactériennes ou fongiques (*Staphylococcus* est le plus fréquent). Les lésions LCL sont capables de s'auto-guérir sans traitements dans de nombreux cas. Cependant, la résolution peut prendre plusieurs mois (Scorza *et al.*, 2017 ; Benis *et al.*, 2017) (Figure7).



Figure 7 : Leishmaniose cutanée localisé (LCL) du visage chez l'enfant
(MASMOUDI *et al.*, 2013).

8.1.2. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) :

Cette forme est peut fréquente, elle est causée par *L.amazoniansis* en Amérique du sud et *L.aethiopica* en Afrique de l'Est. La lésion élémentaire cutanée présente un nodule non ulcéré de petite tailles au début, puis très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps et au fur et à mesure de l'évolution de l'affection, ils augmentent de taille et forment de larges plaques infiltrées (ANOFEL, 2014) (Figure 8).



Figure 8: La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) (Purohit *et al.*, 2012).

8.2. Leishmaniose muco-cutanée (LCM)

La LMC est généralement secondaire à une propagation hématogène après des mois et des années d'infection cutanée, elle peut se manifester sous forme de lésion infiltrantes, ulcérées ou végétantes dans le nez, le pharynx, le larynx et la bouche, associés ou non à un tractus ganglionnaire (Bruno *et al.*, 2012).

La muqueuse nasale est la zone la plus fréquemment infectée, l'implication des autres sites est rare (Ozlem *et al.*, 2017) (Figure 9).



Figure 9 : La leishmaniose cutané- muqueuse (LCM) (Tangie *et al.*, 2017).

8.3. La leishmaniose viscérale (LV)

C'est l'une des manifestations cliniques les plus graves et sévères de la leishmaniose (Lima *et al.*, 2017) due à l'envahissement du système réticulo-histiocytaire (foie, rate, ganglion et moelle osseuse) (Clem, 2010) et qui peut être mortelle en absence d'un traitement adéquat (Monica *et al.*, 2016). Elle présente la majeure cause de mortalité et de morbidité dans le monde.

L'une des espèces mise en cause est *L. donovani* qui est responsable de la LV anthroponotique indienne appelé «Kala-azar» ou «maladie noire» et la LV africaine qui se développe chez l'adulte avec des lésions viscérales mais aussi tégumentaire.

La seconde espèce est *L. infantum*, responsable de la LVZ du bassin méditerranéen, l'Amérique latine et quelques foyers de l'Afrique de l'ouest et centrale. Son réservoir est constitué par les canidés (Ripert *et al.*, 2007) (Figure 10).

Elle est quasiment infantile, des cas rare sont observés chez les adultes immunodéprimés particulièrement ceux qui sont infectés par le VIH. Elle présente une triade symptomatique associant : la fièvre, la splénomégalie et l'anémie qui s'objective cliniquement par la pâleur, le teint blafard et les muqueuses décolorées (Bachi, 2006).



Figure 10 : Enfant atteint de La leishmaniose viscérale présentant une splénomégalie (OMS, 2014).

9. Aspect de la leishmaniose canine

La leishmaniose canine est l'une des maladies parasitaires les plus importantes des chiens, elle est due à l'espèce *L. infantum*. Cette infection peut être asymptomatique ou peut évoluer vers une maladie présentant divers signes cliniques menaçant la vie des chiens (Domenico *et al.*, 2013) dont les plus courants sont : les lésions cutanées localisées ou généralisées au niveau de la face, des oreilles et des membres, en plus des manifestations oculaires qui se traduisent par une conjonctivite muqueuse pâle développant des sécrétions jaunâtres et la keratoconjunctivite.

L'insuffisance rénale, la lymphadénopathie et la splénomégalie, la perte du poids et de poils, les anomalies de la motricité, les vomissements, la diarrhée, les atteintes nerveuses et musculaires ainsi que les troubles auto-immuns ont tous également été signalés (Vulpiani *et al.*, 2011) (Figure 11 et 12).



Figure 11: Chien atteint de la leishmaniose (Baneth *et al.*, 2014).



Figure 12 : Chien atteint de la leishmaniose (Granier, 2013).

10. Diagnostic

10.1. Eléments d'orientation

10.1.1. Diagnostic clinique

Les éléments cliniques qui orientent à la LVS sont : la triade classique (Fièvre folle, pâleur et splénomégalie), l'adénopathie et l'immunodépression permanente (co-infection avec le VIH ou les thérapies immunosuppressives) qui est retrouvé dans la moitié des cas de LVZ adulte (Marty, 2010).

Les lésions indolores dans les parties découvertes du corps et leur chronicité peuvent orienter vers la LC (Caumes et Bourée, 2008).

L'origine géographique du malade ainsi que la notion de séjour dans les zones endémiques sont aussi des facteurs importants qui peuvent orienter le diagnostic (Moumni, 2015).

10.1.2. Eléments biologiques d'orientation

Les éléments biologiques importants qui peuvent orienter vers un cas de LV sont : la pancytopenie associant anémie, leuconéutropénie et thrombopénie, la CRP (protéine C réactive) élevée, la vitesse sédimentaire globulaire très accélérée (avec 100 mm à la première heure) (Guillaume, 2009), l'hyperprotidémie et l'hypergammaglobulinémie polyclonale (Marty, 2010).

10.2. Diagnostic indirect

Ce diagnostic est utilisé en cas de forte présomption clinique (Buffaz *et al.*, 2014), il inclut la recherche des anticorps antileishmanien et des antigènes de leishmania.

10.2.1. Recherche d'anticorps antileishmaniens

Plusieurs méthodes sérologiques existent pour la détection des anticorps antileishmania. L'immunofluorescence indirecte (IFI) est la technique de référence pour le diagnostic de la LV, permet de détecter les anticorps antileishmanien sur étalement de promastigotes (Buffaz *et al.*, 2014). Elle est de plus en plus supplantée par la technique ELISA qui est de plus en plus utilisée car automatisée, sa sensibilité et sa spécificité varient en fonction des antigènes employées (Marty, 2010) (antigènes bruts ou recombinants) (Ghosh *et al.*, 2016).

Des tests moins couteux et d'application facile sur le terrain sont disponibles pour le diagnostic précoce de la leishmaniose, tel que le test semi quantitatif DAT (Test d'agglutination directe) qui possède une grande capacité de détecter les anticorps anti leishmania même à faible niveau (Salles *et al.*, 2017) et les tests immunochromatographiques rapides de bandelettes imprégnées d'antigènes recombinants RK39 (Marty, 2010), dont plusieurs kits sont commercialisés, tels que Kalazar Detect TM et le test IT-Leish[®], pour la détection qualitative des anticorps spécifiques pour le complexe de *L. donovani* dans les sérums des patients (Salles *et al.*, 2017 ; Carée *et al.*, 2010).

Un autre test est aussi employé, c'est celui de d'hémagglutination indirect, actuellement, Cellognost Behring est le kit commercial utilisé pour *L. donovani*, de bonne sensibilité mais de spécificité faible, d'où la nécessité de sa confirmation par le test IFI (Moumni, 2015).

10.2.2. Recherche d'antigènes anti leishmania

Le Western blot représente le test confirmatif essentiel pour la détection des anticorps spécifiques aux leishmanies. Il est de très grande sensibilité et spécificité notamment pour les cas de leishmaniose chez les immunocompétents et les sidéens (Moumni, 2015), mais l'application de cette technique reste limitée. Elle n'est réservée que pour les laboratoires spécialisés (Marty, 2010). Une autre méthode utilisant le test qualitatif d'agglutination au latex (KAtex) qui est de bonne performance et de réalisation simple (Vilaplana, 2004), permet la recherche d'antigènes leishmaniens dans des échantillons de sérum ou d'urine (Srividya *et al.*, 2012).

10.3. Diagnostic direct

Représente le diagnostic de certitude, permet la mise en évidence du parasite *Leishmania*, soit par un examen directe au microscope ou par l'emploi des méthodes moléculaires.

10.3.1. Examens direct

Cette méthode consiste en la réalisation de frottis et leur coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) suivie d'un examen microscopique pour l'observation des formes amastigotes intra ou extracellulaires.

Dans le cas de la leishmaniose viscérale, les frottis sont réalisés à partir des aspirats biologiques de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques, de la rate ou du foie. Ce dernier permet une grande sensibilité et spécificité mais comporte un risque de saignement interne mortel (Srividya *et al.*, 2012). Le sang périphérique après leucocentrifugation est aussi utilisé comme échantillon de bonne efficacité pour l'examen direct dans les cas de LV des immunodéprimés. D'autre part, les biopsies digestives et cutanées ainsi que les lavages alvéolaires sont aussi envisagés pour les patients VIH séropositifs (Marty, 2010).

Quant aux LC, les grattages, les biopsies et les aspirations à partir des lésions, sont utilisées pour la réalisation des frottis. Ceux-ci permettent une bonne spécificité mais de sensibilité faible du fait de la répartition non homogène du parasite dans les lésions et de leur faible densité dans le cas de la LC chronique (Ashrafmansouri *et al.*, 2015).

Des cultures sont envisagées en parallèle avec les examens directs, soit après inoculation à l'animale (hamster) ou directement dans des milieux de culture en vue d'obtenir une bonne charge en promastigotes pour l'isolement et le typage parasitaire. Ces cultures sont réalisées soit au lit du malade ou par prélèvements sur anticoagulants (EDTA ou citrate) qui sont envoyés aux laboratoires spécialisés (Ripert, 2003). Malgré ses avantages, cette méthode est fastidieuse, prend beaucoup de temps et de cout cher, reste donc restreintes aux laboratoires spécialisés (Srividya *et al.*, 2012).

10.3.2. Méthodes moléculaires

La recherche de l'ADN des leishmanies est très utile pour compléter les approches parasitologique et permettent le suivie poste thérapeutique et le diagnostic pour les sujets porteurs asymptomatiques (Marty, 2010).

La PCR est la technique la plus utilisée dans les laboratoires de références pour le diagnostic des leishmanioses, en raison de sa grande spécificité (Salles *et al.*, 2016) proche de 100% (Buffaz *et al.*, 2014) et sa grande sensibilité. Cette technique permet le diagnostic fiable chez les sujets immunocompétents et immunodéprimés, permet à partir de différents matériaux cliniques d'estimer le typage et la charge parasitaire (Antinori *et al.*, 2007).

L'analyse par amplification isotherme à médiation en boucle (LAMP), est une technique de rapidité plus importante que la PCR et de haute spécificité (Verma *et al.*, 2017). Elle est apparue comme un outil simple et fiable pour le diagnostic de la leishmaniose et

applicable sur le terrain avec des résultats de positivité visuelles à l'œil nu (Ghasemian *et al.*, 2014 ; Verma *et al.*, 2017).

11. Traitement

Les traitements des leishmanioses sont complexes en raison de la multiplicité des formes cliniques, la diversité des espèces *Leishmania* en cause et leur sensibilité variable aux antileishmaniens ainsi que le nombre limité d'antileishmaniens disponibles (Bastien et Lachaude, 2016).

Traitements disponibles

Antimoniés Pentavalents

Ce traitement est de première intention dans le monde entier en raison de son faible coût et sa bonne activité antileishmaniana (Gonzalez *et al.*, 2012).

Il existe deux dérivés pentavalents commercialisés sous le nom antimoniate de méglumine (glucantime®) et Stibogluconate de sodium (Pentostam®) (Minodier *et al.*, 2001), administrables par voie parentérale dans le cas des LV pour une posologie de 20mg de sbv/Kg/j pendant 28 jours recommandée par l'OMS et par injection intradermique dans le cas de LC localisées (Bastien et Lachaude, 2016).

Ce traitement est abandonné dans de nombreux pays ou préconisé avec d'autres molécules alternative en raison de sa toxicité, l'apparition des souches résistantes et son inefficacité pour le traitement des ID (Carré *et al.*, 2010).

L'Amphotéricine B

Antibiotique de la famille des macrolides polyénique, de puissante activité leishmanicide et molécule de choix pour les leishmanioses graves ou résistantes aux antimoniés ainsi que les leishmanioses de l'ID (Carré *et al.*, 2010).

La forme classique conventionnelle de l'AmB est Fungizone®, malgré son efficacité dans le traitement de toutes les leishmanioses, elle présente des effets secondaires graves (néphrotoxicité, fièvre, hypotension) ce qui a limité son utilisation (Mohamed –Ahmed *et al.*, 2013 ; Cunha *et al.*, 2015) . De ce fait d'autres formulations lipidiques moins toxiques ont été développées et recommandées par l'OMS dont l'AmBisome® mais leur coût demeurent

cher ce qui limite leur utilisation (Rosenthal *et al.*, 2009), notamment en Algérie où elle n'est pas disponible (Bachi, 2006).

L'administration de ce produit est par voie parentérale (Kip *et al.*, 2017), avec une posologie de 1mg/ Kg/ j pendant 30 jours pour Fungisone® (Kafetzis *et al.*, 2005) et 3mg/Kg /j pour l'AmBisome® pendant 5 à 6 jours avec une dernière injection au 10^{ème} jour. Chez les ID le nombre d'injections est porté à 10 (Carré *et al.*, 2010).

Miltéfosine

La miltéfosine est le premier agent antileishmanien disponible par voie orale sous forme de comprimés (Buffet *et al.*, 2012 ; McQuarrie *et al.*, 2015), prescrit en première ligne dans certaines zones de LV en Inde avec des taux de guérison initiaux proches de 100% et finaux de 92% (Bastien et Lachaude, 2016), mais récemment une étude a confirmé la présence de cas de résistance de *L.donovani* contre cette molécule, d'où la nécessité de trouver des mesures de contrôle pour éviter la propagation de ces souches mise en cause (Srivastava *et al.*, 2017).

La dose recommandée pour la miltéfosine en monothérapie pour la LV et LC est de 2,5 mg/ Kg/ jour pour une durée de 28 jours (Dorlo *et al.*, 2012).

Pentamidine

L'iséthionate de pentamidine est commercialisé sous le nom de Pentacarinat[®], est une molécule très efficace pour le traitement des LC (Buffet *et al.*, 2010). Cependant elle est prescrite en première intention dans certaines formes de LC à *L.guranyensis* ou à *L.panamensis* (Bastien et Lachaude, 2016). Elle est aussi utilisée en prophylaxie secondaire pour éviter les rechutes des LV de l'immunodéprimés (Gadelha *et al.*, 2015).

Son administration est à la dose de 3 à 4mg/Kg pour une cure de 10 injections avec une surveillance du rein, du foie, des myocardi, des fonctions glucidiques et des lignées sanguines (Carré *et al.*, 2010). Des effets secondaires immédiats de type allergique ou local peuvent survenir surtout en cas de perfusion rapide (ANOFEL, 2014).

Paromomycine

Le paromomycine est un antibiotique de la famille des aminosides, évaluée en seconde intention pour les cas de stibiointolérance et stibioresistance (Carré *et al.*, 2010). Il est utilisé soit en monothérapie ou en combinaison avec les antimonies.

Ce traitement est administrable par voie IM (Intramusculaire), laissant des douleurs au site de l'injection dans la moitié des cas d'essais cliniques en phase III de LV indienne (Kip *et al.*, 2017). La posologie recommandée est de 12 à 16 mg/Kg/j pendant 21 dans le cas de sa son association avec les antimonies, permettant 92 à 94% de guérison (Carré *et al.*, 2010).

Traitements administrables par voie orale

En plus de la miltéfosine, il existe plusieurs agents antileishmanial administrables par voie orale :

Les antifongiques azolés : Regroupent les ketoconazoles, le Fluconazole (évalué pour le traitement des leishmanioses de l'Ancien Monde) (Buffet et Morizot, 2001) et l'itraconazole (évalué pour dans le traitement de la LC).

L'Allopurinol : cette molécule est de bonne efficacité en combinaison avec le glucantime, le fluconazol, le ketoconazole ou l'intraconazole. Il a été démontré comme un traitement efficace pour la CL en Asie (74% de récupération).

Metronidazoles ou flagyl® : c'est un traitement qui a été longtemps utilisé comme alternative thérapeutique pour la lutte contre la LC de l'Ancien Monde (Masmoudi *et al.*, 2013). Cette molécule pourrai aussi soigner les LV résistantes aux molécules de premier choix et pour éviter les rechutes chez les patients co-infectés avec le VIH (Carré *et al.*, 2010).

12. Prévention

12.1. Lute anti-vectoriel

Consiste à limiter la présence du vecteur et réduire les possibilités de piqûres, cela par :

- L'utilisation des traitements insecticides de l'environnement au niveau des murs, toits et les portoirs des habitats ;
- Réduire les micro-habitats favorables au développement des phlébotomes ;
- L'utilisation des moustiquaires traitées ou pulvérisation d'insecticide (Otranto et Dantas-Torres, 2013).

12.2. Lutte contre le réservoir

- Elimination des réservoirs d'animaux en l'abattant ;
- Utilisation des vaccins canins ;
- Utilisation de colliers imprégnés d'insecticides (Biswas *et al.*, 2017).

12.3. Prophylaxie humaine

- L'utilisation de médicaments de fort potentiel, l'identification rapide et le traitement approprié réduiront la biomasse parasitaire et éviteront la transmission et les décès ultérieurs (Paraklash singh *et al.*, 2016) ;
- S'assurer que les personnes co-infectés avec le VIH ont accès non seulement au diagnostic rapide et au traitement de la LV mais aussi aux traitements antirétroviraux et la prophylaxie secondaire (Bern *et al.*, 2010).

13. Vaccination

Plusieurs tentatives de vaccination ont été faites pour prévenir l'infection leishmanienne, utilisant soit des parasites complets de *Leishmanias* vivants, morts ou atténués ou encore des isolats de leurs sous-unités hautement immunogènes synthétiques ou recombinantes ou de leur ADN. L'échec de ces candidats à assurer une protection efficace et fiable contre la leishmaniose ainsi que les effets secondaires indésirables qui accompagnent leur utilisation (Bagirova *et al.*, 2016), ont fait que à ce jour aucun vaccin n'est approuvé pour une utilisation humaine (Nagill et Kaur, 2011 ; Duthie *et al.*, 2016 ; Osman *et al.*, 2017 ; Thomaz-Soccol *et al.*, 2017).

Quant à la leishmaniose canine plusieurs vaccins sont commercialisés, notamment au Brésil, qui a autorisé depuis 2003 le vaccin Leishmune® qui s'est montré efficace pour interrompre le cycle de transmission de la LVZ (Ribeiro *et al.*, 2015). Ainsi que le vaccin Leish-Tec® offrant environ 40% de protection des chiens contre l'infection.

Un autre vaccin a été enregistré en Europe appelé LiESAp (antigènes bruts de *L. infantum* plus la Saponine comme adjuvant) qui est commercialement disponible en tant que Cani-Leish® (Gradoni, 2015), a démontré dans une étude récente une protection significative des chiens atteignant les 92% (Resende *et al.*, 2016).

Le développement d'un vaccin contre la leishmaniose présente un objectif important pour la santé publique. Dans les années récentes les chercheurs se basent principalement sur les vaccins à base de cellules dendritiques stimulées par différents types d'antigènes de *Leishmania* (Bagirova *et al.*, 2016).

Partie II : plantes médicinales

I. *Phlomis bovei* de Noé



Figure 13 : *Phlomis bovei* de Noé Subsp *bovei* (anonyme 1)

1. Généralités sur le genre *Phlomis*

Phlomis est un genre important de la famille des Lamiaceae. Il renferme plus de 100 espèces qui sont répandues principalement en Asie centrale, la Chine et dans les régions méditerranéennes (Bader *et al.*, 2015).

Un nombre élevé des espèces de ce genre ont une utilisation à des fins aromatiques et médicinales. Sur le plan industriel les huiles essentielles isolées de ces plantes sont utilisées comme arômes pour les aliments, comme parfums ou produits cosmétiques (Sarikurkcu *et al.*, 2013).

Les préparations en tisane des parties fleuries de certaines espèces, ont été utilisées pendant des décennies dans la médecine traditionnelle comme remède pour les troubles gastro-intestinaux et pour promouvoir une bonne santé en protégeant les reins, le foie, le système cardiovasculaire et les os (Bader *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2017) la peau et le cœur (Limem- Ben Amor *et al.*, 2016).

De plus, elles sont utilisées comme stimulants, toniques, analgésiques, cicatrisants des plaies (Li *et al.*, 2010 ; Bader *et al.*, 2016), carminatifs, apéritifs, diurétiques et se sont avérées efficaces pour le traitement des ulcères et des hémorroïdes (Sarikurkcu *et al.*, 2013) et sont utilisés comme antalgiques dans la médecine chinoise (Yalçina *et al.*, 2006).

Les parties fleuries de ce genre ne sont pas les seules exploitées. En effet, les racines, les graines et les flèches sont aussi utilisées soit en infusion, en décoction ou en jus et les flèches douces de certaines espèces (*Phlomis purpurea* Subsp. *Purpurea*, *Phlomis cephalotes*) sont consommées directement ou aspirées (Limem-Ben Amor *et al.*, 2009).

Divers activités pharmacologiques ont été signalées de certaines espèces tel que l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, antinociceptif, anticancéreuse, antiallergique, antimicrobienne (Li *et al.*, 2017), immunosuppresseur, radicaux libres (Sarikurkcü *et al.*, 2013), antimutagène (Li *et al.*, 2010). En plus d'une activité parasitaire déterminée par l'espèce *Phlomis brunneogaleata* et *Phlomis Kurdica* contre *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Limem-Ben Amor *et al.*, 2009).

2. Espèce *Phlomis bovei* de Noé

2.1. Présentation

Phlomis bovei de Noé, est une plante médicinale endémique rare, qui croît dans les forêts de montagnes en Algérie. Elle est communément connue sous le nom de Khayat El Djarah qui signifie cicatrisation en arabe. Elle est nommée Farseouan, Tareseouane, Iniji, R'ilefet et Azaref dans le Nord de l'Afrique (Ihoual *et al.*, 2017).

Deux sous espèces ont été enregistrées pour *Phlomis bovei* de Noé : *Phlomis bovei* de Noé subsp *Maroccana* Marie et *Phlomis bovei* de Noé subsp. *bovei* qui fait l'objet de notre étude.

2.2. Description botanique

Phlomis bovei est une plante vivace herbacée qui croît jusqu'à une hauteur de 0,8 m. Elle développe souvent une solide base ligneuse. Ses feuilles basales sont en forme de cœur, de couleur verte avec des marges fondues, leur pétiole est de 4 à 18 cm de longueur (Lioliou *et al.*, 2007). Les fleurs sont rosâtres de regroupement verticille séré, portant chacune un pétale supérieur fortement courbée (anonyme 2).

2.3. Propriétés chimique

Les iridoides, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les phénylétanoïdes, les lignanes, les néolignanes, les diterpénoïdes, les alcaloïdes et les huiles essentielles sont des métabolites typiques du genre *Phlomis* (Li *et al.*, 2010).

L'étude photochimique de l'espèce *P.bovei* a révélée différents métabolites secondaires tels que les tanins, les saponines, le mucilage et les huiles essentiels (Khitri *et al.*, 2014).

Les composants de l'huile essentielle de cette plante ont été analysés par GC/ MS (Chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse) qui a permis d'identifier 75 constituants correspondant à 86,37% du poids totale, dont les plus essentielles sont : germacrène D (21%), β -caryophyllène (7%), β -bournonène (2,9%), thymol(8,3%) et l'hexahydrofarnesyl acétone (5,8%) (Liolios *et al.*, 2007 ; Limem-Ben Amor *et al.*, 2009).

En outre, la plante est constituée d'oligoéléments tels que l'aluminium, le sélénium, le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer (Yahiaoui *et al.*, 2015).

2.4. Activité pharmacologique

Phomis bovei de Noé est traditionnellement utilisée comme cataplasme pour le traitement des lésions, des infections cutanées et surtout des brûlures (Limem-Ben Amor *et al.*, 2009) et c'est pour cette raison que divers études expérimentales ont été menées pour démontrer les activités biologiques et pharmacologiques de cette plante.

En effet, plusieurs auteurs ont montrés que les huiles essentielles composants la plante sont doués d'une puissante activité antibactérienne avec un large éventail d'inhibition contre divers types de bactéries (Liolios *et al.*, 2007 ; Yahiaoui *et al.*, 2015). Cela peut être attribué à la présence du thymol et le germacrène D qui sont fréquemment connu pour leur activité antibactérienne (Liolios *et al.*, 2007). D'autre part, les oligoéléments de la plante ont montrées une activité antioxydante et contribuent en plus de cela, à la résistance immunitaire. Cette plante pourrait être commercialisée en tant qu'agent antiseptique de fort potentiel (Yahiaoui *et al.*, 2015).

Les tannins et les flavonoïdes de la plante ont montrées dans une étude récente une activité antifongique et antioxydante potentielle (Wafa *et al.*, 2016).

II. *Verbascum sinuatum*



Figure 14 : *Verbascum sinuatum* (anonyme 3).

1. Généralités sur le genre *Verbascum*

Le genre *Verbascum* communément appelés « mullein » appartient à la famille *Scrophulariaceae* et à la tribu des *verbasceae*, il est considéré comme l'un des genres majeurs comprenant 360 espèces et qui sont largement réparties entre les régions tropicales et tempérées (Sotoodash, 2016).

Verbascum est un nom dérivé du mot latin « barbasum barba » ou « barbe » se référant aux filaments de barbe de la plante (Riaz *et al.*, 2013).

Les plantes de ce genre sont principalement représentées par des herbes rosées, vivaces et bisannuelles, possédant des fleurs jaunes dans presque toutes les espèces (Zografidis, 2016).

1.1. Utilisation de *Verbascum spp* en médecine traditionnelle

Les différentes parties des plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle, elles ont une importance pharmacologique potentielle (Ali *et al.*, 2012)

Les feuilles et les fleurs de *verbascum spp* sont utilisées comme mucolytiques, expectorantes pour traiter les maladies respiratoires telles que la toux sèche, la tuberculose, la bronchite et l'asthme. Elles sont aussi utilisées comme anti-inflammatoires sur le système urinaire, pour traiter les douleurs rhumatismales, les hémorroïdes, la diarrhée les infections fongiques et aussi comme sédatif doux (Boga *et al.*, 2016 ; Niaz *et al.*, 2012 ; Kozan *et al.*, 2011).

Les espèces de *Verbascum* ont des activités inhibitrices contre le virus de la grippe A2 et B, et celui de la leucémie. L'huile fabriquée à partir des fleurs est utilisée pour aider à apaiser le mal de l'oreille et peut même être appliquée à l'extérieure pour l'eczéma et d'autres types d'infection inflammatoires de la peau (Alper sener et Basaran Dulge, 2009).

Les feuilles et les racines sont également utilisées comme antiseptique, antispasmodique, émollient, antihistaminique et antioxydant (Sinatore *et al.*, 2007).

Une activité antiparasitaire contre les trypanosomes a été démontré récemment par l'espèce *Verrbascum sinaiticum* (Mergia *et al.*, 2016).

1.2. Propriétés chimiques de *Verbascum spp*

Des études sur les espèces *Verbascum* ont révélées la présence de plusieurs composés telles que les glycosides iridoïdes, les flavonoïdes, glycosides phénylétoides (traces de verbascoside, triterpène saponines (verbascosaponine), polysaccharides des acides phénoliques, les glycosides de phytostérol, la digiprolactone et des dérivés aucubin et catalpol (Dimitrova *et al.*, 2012 ; Kozan *et al.*, 2011 ; Marchev *et al.*, 2016).

D'autres études antérieurs ont rapportées que aucubin et le verbascoside sont les principaux composés responsables de l'activité anti-inflammatoire, des hypothèses prétendent que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne sont directement liés à la teneur en poly phénols (Grigore *et al.*, 2013).

2. Espèce *Verbascum sinuatum*

2.1. Description botanique

Cette espèce est plutôt méditerranéenne, fleurit en juin. Son inflorescence est une grande panicule aux allures de chandelier, portant de très nombreuses fleurs en épis lâches. Le duvet cotonneux tombe très vite, la corolle est jaune et les étamines sont violettes, les feuilles sont très ondulées, surtout celle de la rosette basale (anonyme 4).

2.2. Composition chimique

L'espèce *Verbascum sinuatum* contient le plus haut niveau de composés phénoliques, pouvant contribuer à une grande activité de balayage de radicaux libre, ce qui fait qu'elle est un bon candidat comme antioxydant naturel (Moein *et al.*, 2012).

Chapitre II

Matériels et méthodes

Type et lieu de l'étude:

Notre étude porte sur la recherche *in vitro* de l'activité antileishmania de deux extraits aqueux bruts de plantes à savoir *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei*, sur les promastigotes *L.infantum*. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biochimie analytique et biotechnologique LABAB, UMMTO.

1. Matériel**1.1. Matériel biologique****1.1.1. Le Parasite**

La souche que nous avons utilisée pour notre étude appartient l'espèce *L. infantum* portant le code suivant : MHOM/DZ/2016/ l'IPA 533/16 isolée à partir de la moelle osseuse d'un malade atteint de la LV hospitalisé au CHU de Tizi Ouzou. Elle a été mise à notre disposition en culture dans le milieu NNN par le laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi ousou.

1.1.2. Les extraits de plantes

Notre étude a porté sur l'effet antiparasitaire des deux plantes : *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei* de Noé, qui ont été récoltées de la région d'Addekar Asif El Hemmam de Bejaia en Mai 2016.

1.1.3. Le sang

Pour la préparation des milieux de culture parasites, une quantité de 15 ml de sang est apportée chaque semaine au laboratoire. Ce sang est prélevé à partir de deux lapins de sexe males âgés de plus de 4mois et dépassant les 2 kilos 700 g.

1.1.4. Urine stérile

L'urine utilisée pour notre étude est celle d'un enfant de 13 ans, en bonne santé présentant un examen cytbactériologique négatif (absence d'infection urinaire). Elle a été rapportée dans un pot stérile et a subi le processus de filtration dans des conditions d'asepsie par passage à travers un filtre à seringue de 0,22µm. Pour vérifier sa stérilité, ce matériel biologique a subi des contrôles par ensemencement dans différents milieux bactériologiques : gélose au sang frais, gélose nutritive, milieu Chapman, gélose au sang cuit, milieu Sabouraud

et chloramphénicole. Après cela, l'urine est traitée aux antibiotiques (la pénicilline G à raison de 100 µl/ml et la gentamicine à raison de 100µg/ml) puis conservée au réfrigérateur à +4°C.

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Appareillage

1.2.1.1. Grand matériel

Notre étude a nécessité l'usage d'un ensemble de grands matériels comme : une étuve d'incubation à 24°C non réfrigérée (MEMMERT) et une autre à 37°C (MEMMERT), un microscope optique (HUND), une étuve Pasteur (MELAG), un Autoclave (WISD), un bain marie (NUVE NB20), une balance électronique (KERN), une centrifugeuse (SIGMA), un lyophilisateur (CHRIST) et un congélateur réglé à -80°C (NUVE DF 490).

1.2.1.2. Petit matériel :

Pour la mise en œuvre de notre travail on s'est servi de : becs bunsen, tubes à vis et flacons en verre, des éprouvettes , des cristallisoirs, erlenmeyer , pipettes Pasteur stériles , seringue de 10 et de 2,5 ml, micropipettes de 100 et 1000 µl, embouts stériles, gants stériles, gants en latex, lames et lamelles, cellule de Mallassez, filtre à seringue stérile de 0,22 µm, entonnoir, papier Whatman N°1, tubes vacutenaïres , épicroâniennes de 23G , tubes Falcon stériles, agitateur magnétique (STUART), vortex (Techno Kartell) et tubes de conservation.

1.2.2. Réactifs et solutions

-Eau physiologique à 0,9% stérile (La composition est illustrée à l'annexe 4).

- Eau distillée stérile.

-Antibiotiques : la pénicilline G (solubilisée dans 3 ml d'eau distillée stérile) et la gentamycine.

-Citrate à 10% stérile (La composition est illustrée à l'annexe 5).

-Fungizone® 10% (voir annexe 9).

1.2.3. Le milieu de culture :

Pour la culture de notre parasite, on s'est servie du milieu diphasique NNN qui est constitué d'une phase solide composée d'une gélose additionné avec du sang de lapin et d'une deuxième phase liquide qui est composée d'exsudat formé à partir de ce mélange.

(La composition de la gélose NNN est illustrée à l'annexe 6).

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits aqueux

Les feuilles des plantes ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis réduites en poudre pour subir le processus de macération à froid dans de l'eau distillé (20g de la poudre végétale dans 200ml d'eau distillée) sous agitation magnétique pendant 24 heures à l'abri de la lumière. Le macérat obtenu subit une filtration grossière à l'aide d'une passoire suivit d'une seconde filtration avec le papier Whatman N°1. Le filtrat obtenu est recueilli puis reparti dans des cristallisoirs qui sont recouverts avec du papier film et maintenus au congélateur à -80°C pour une durée de 24 heures pour subir un processus de sublimation au lyophilisateur.

Le lyophilisat obtenu constitue l'extrait aqueux, il est solubilisé dans de l'eau physiologique pour une concentration finale de 500mg/ml pour *Verbascum sinuatum* et 400mg/ml et Pour *Phlomis bovei*. Les extraits des plantes sont homogénéisés au vortex puis transférés dans des tubes de conservation après passage à travers le filtre à seringue stérile (0,22 µm) puis conservés au réfrigérateur à +4°C jusqu'à leur utilisation.

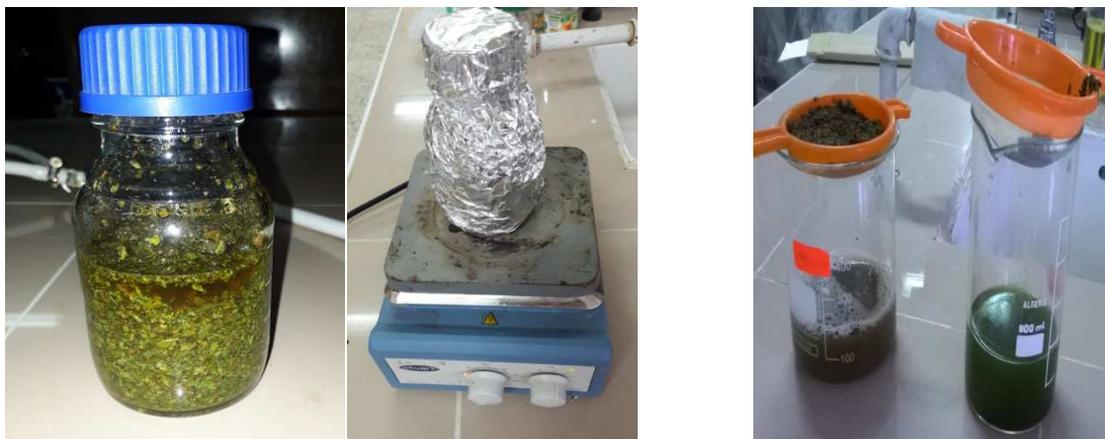


Figure15: macération à froid de l'extrait de plante. Figure16 : filtration grossière du macéra.



Figure17 : repartition du filtrat dans les cristallisoirs



Figure18 : lyofilisation du filtrat.



Figure19 : extrait aqueux de la plante en poudre.

2.2. Préparation du milieu NNN (Novy, MC Neal et Nicolle)

La préparation du milieu de culture NNN nécessite l'assemblage gélose/sang.

2.2.1. Préparation de la gélose NNN

La préparation commence d'abord par la dissolution du chlorure de sodium à froid dans l'eau distillée, ensuite, le mélange est mis à chauffer et quand il commence à frémir l'Agar est rajouté tout en remuant à l'aide d'un bâtonnet en verre jusqu'à ébullition.

Dans des conditions d'asepsie, la gélose prête est répartie à l'aide d'une seringue de 10ml dans des tubes à vis stériles à raison de 7ml pour chacun, ces derniers sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20mn.

Le milieu est conservé au réfrigérateur à +4°C pour une utilisation ultérieure.

2.2.2. Prélèvements sanguins :

Les ponctions sont réalisées à partir de deux lapins dépassants les 2 kilos 700 g. Les oreilles préalablement nettoyés sont rasés, désinfectés à la Bétadine et anesthésiés par de la Xylocaïne visqueuse pendant 20 à 30 minutes de la couche cutanée.

Après anesthésie, une contention du lapin doit être faite et cela à l'aide d'un linge avec lequel on encercle l'animale pour l'empêcher de gigoter au moment du prélèvement sanguin. Une fois la contention faite, les prélèvements sont réalisés en se servant des épicrotiniennes qui sont placées en amont avec les seringues de 10ml qui vont recevoir le sang. Avant chaque prélèvement un passage de coton imprégné de Bétadine est nécessaire pour désinfecter l'endroit de la collecte.

Tous les 15jours une quantité de 15 ml de sang est récoltée dans des tubes vacuténaires stériles comprenant 0,75 ml de citrate à 10% stérile. Après chaque récolte, les tubes sont étiquetés portant les références propres au lot à partir duquel le sang a été prélevé (nom du lapin concerné par la ponction, la veine marginale ou l'artère centrale à partir desquelles le prélèvement a été fait).

Le sang est ensuite traité en zone stérile (entre 2 becs bunsen) aux antibiotiques ; Pénicilline G à raison de 100 μ l/ml et la Gentamycine à raison de 100 μ g/ml, tout cela afin d'être rajouté lors de la préparation du milieu de culture NNN.



Figure 20 : contention du lapin.



Figure 21: nettoyage de l'oreille.
du lapin



Figure 22 : rasage et désinfection de l'oreille
du lapin.



Figure 23 : ponction du lapin.



Figure 24 : sang du lapin en tube vacutenaïres.

2.2.3. Assemblage des constituants pour la préparation du milieu NNN

La gélose stérile répartie en tubes est soumise à liquéfaction au bain marie à une température de 80 à 100°C, puis maintenue pendant 10mn à 56°C.

En zone stérile et à l'aide d'une seringue, 1ml de sang est additionné pour chaque tube formant un mélange sang-gélose qui est délicatement homogénéisé et porté sur un support légèrement incliné jusqu'à solidification à température ambiante.

Les milieux de cultures sont ensuite étiquetés et conservés au réfrigérateur à +4°C pour une limite d'utilisation qui ne dépasse pas un mois.

Un contrôle de chaque lot est réalisé sous microscope au Gx40 pour vérifier la stérilité des milieux et cela après addition d'eau physiologique à un tube de chaque lot et son incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

2.3. Enrichissement du milieu NNN

Le milieu NNN est enrichi avant chaque ensemencement avec de l'urine stérile diluée au 1/5 dans un volume d'eau physiologique stérile, auquel on rajoute deux antibiotiques (100 µl/ml de pénicilline G et 100µg/ml de gentamicine).

2.4. Culture du parasite et lecture

La souche parasitaire *L. infantum* a été maintenue en vie dans une étuve à 26°C avec des repiquages successifs chaque 5 à 7 jours dans de nouveaux milieux NNN.

Avant chaque repiquage, une goutte de la culture parasitaire de 5 jours est mise entre lame et lamelle pour une lecture au microscope au GX40 afin de voir la présence ou non des formes promastigotes mobiles, tout en tenant compte de leur charge sur la lame et la présence ou non des regroupements de leishmanies en rosettes. Dans le cas d'une estimation importante de la charge parasites, un volume de l'exsudat de la culture est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur après une légère homogénéisation pour un repiquage dans un nouveau milieu NNN enrichi à l'urine, mais dans le cas de la présence faible de promastigotes il est nécessaire d'attendre 2 jours pour permettre au parasite de se multiplier et donner une charge plus importante.

L'examen microscopique des cultures parasites permet aussi de vérifier la présence ou l'absence de contamination dans le milieu avant le repiquage.

2.5. Etude de l'activité leishmanicide sur les formes promastigotes *in vitro*

2.5.1. Suspension parasitaire

Afin d'évaluer l'activité leishmanicide des deux extraits de plantes *V.sinuatum* et *P.bovei*, une suspension parasites a été récupérée à partir de cultures NNN en phase logarithmique dans un tube Falcon, après contrôle au microscope déterminant la présence des formes promastigotes mobiles en charge importante et l'absence totale de contaminations.

La suspension parasitaire est centrifugé à 4000 tours/10mn, le culot est ensuite récupéré et lavé 2 fois avec de l'eau physiologique stérile. La charge parasitaire après le dernier lavage est estimée à 1×10^6 parasites/ml par dénombrement à la cellule de Malassez.

2.5.2. Evaluation de l'effet inhibiteur des extraits végétaux contre les formes promastigotes

La solution parasitaire préalablement préparée est répartie à raison de 180 μl dans 4 tubes de milieu NNN qui appartiennent au même lot (extrait à partir d'un même lapin et d'une seule veine) et qui sont additionnés d'un même volume de solution stérile (1ml pour chaque tube). Les deux extraits de plantes et l'antiparasitaire Fungisone, sont répartis respectivement dans chaque tube à raison de 20 μl suivant ce plan:

- Tube1 : témoin positif (suspension parasitaire +20 μl de Fungisone à la concentration de 100mg/ml) ;
- Tube2 : témoin négatif (suspension parasitaire + 20 μl d'eau physiologique) ;
- Tube3 : E1 (suspension parasitaire + 20 μl extrait de *Verbascum sinuatum* à la concentration de 500mg/ml) ;
- Tube4 : E2 (suspension parasitaire + 20 μl extrait de *Phlomis bovei*).

Ces tubes sont ensuite incubés à l'étuve à 26°C. Un dénombrement est réalisé chaque 24 heures pour un suivi de charge parasitaire pendant une durée de 3jours.

L'effet antileishmanial des deux extraits de plantes *V.sinuatum* et *P.bovei* a été évalué par la méthode de comptage cellulaire des promastigotes *L. infantum* sur la cellule Malassez (la numération cellulaire à la cellule Malassez est illustrée à l'annexe 7).

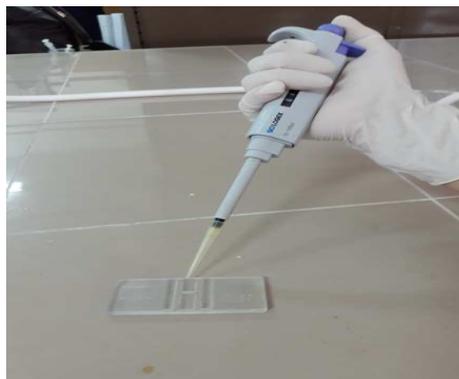


Figure25 : Préparation de la cellule Malassez.

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Activité antileishmania des extraits aqueux des feuilles de *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei*

Les dénombrements réalisés à la cellule de Malassez nous ont permis de déterminer l'effet leishmanicide des extraits de plantes sur les *Leishmania* promastigotes.

Le tableau I présente les résultats que nous avons obtenus par le dénombrement à la cellule de Malassez des promastigotes vivants en présence des 2 extraits testés : *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei* aux concentrations 500mg/ml et 400mg/ml respectivement.

Tableau I: Tableau des résultats obtenus de l'activité biologique des extrais végétaux (*Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*) sur les promastigotes *L. infantum*.

	0 jour	1 ^{er} jour	2 ^{em} jour	3 ^{em} jour
Fungizone	10 ⁶ c/ml	1,6x10 ⁵ c/ml	3,4x10 ⁵ c/ml	4,2x10 ⁵ c/ml
<i>Verbascum sinuatum</i> 500mg/ml	10 ⁶ c/ml	0,1x10 ⁵ c/ml	0,2x10 ⁵ c/ml	0 c/ml
<i>Phlomis bovei</i> 400mg/ml	10 ⁶ c/ml	0,6x10 ⁵ c/ml	0 c/ml	0 c/ml
Fungizone	10 ⁶ c/ml	1,4 x10 ⁵ c/ml	0,2 x10 ⁵ c/ml	0 c/ml

Le tableau II qui exprime le pourcentage de viabilité et de mortalité des formes promastigotes *L.infantum* est obtenu à partir des résultats du tableau I après conversion en pourcentage et cela par l'utilisation du témoin négatif comme référence.

Tableau II: Tableau des résultats obtenus de l'activité biologique des extraits végétaux (*Phlomis bovei* et *Verbascum sinuatum*) sur les promastigotes *L. infantum* exprimés en pourcentage de viabilité et de mortalité.

		Lecture				
		T0	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	Témoin négatif
<i>Verbascum sinuatum</i> 500 mg/ml	% viabilité	10 ⁶	6,25	5,88	0	100
	% mortalité	0	93,75	94,12	100	0
<i>Phlomis bovei</i> 400 mg/ml	% viabilité	10 ⁶	37,5	0	0	100
	% mortalité	0	62,5	100	100	0
Témoin positif (Fungizone) 100 mg/ml	% viabilité	10 ⁶	87,5	5,88	0	100
	% mortalité	0	12,5	94,12	100	0

1.1. 1. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Verbascum sinuatum* sur les promastigotes *L.infantum*

La figure 26, présente le pourcentage de viabilité des promastigotes *L.infantum* en fonction du temps, en présence de l'extrait de *Verbascum sinuatum* (E1) à la concentration 500mg/ ml tout en ce servant de Fungizone comme témoin positif (T+) à la concentration 100mg/ml.

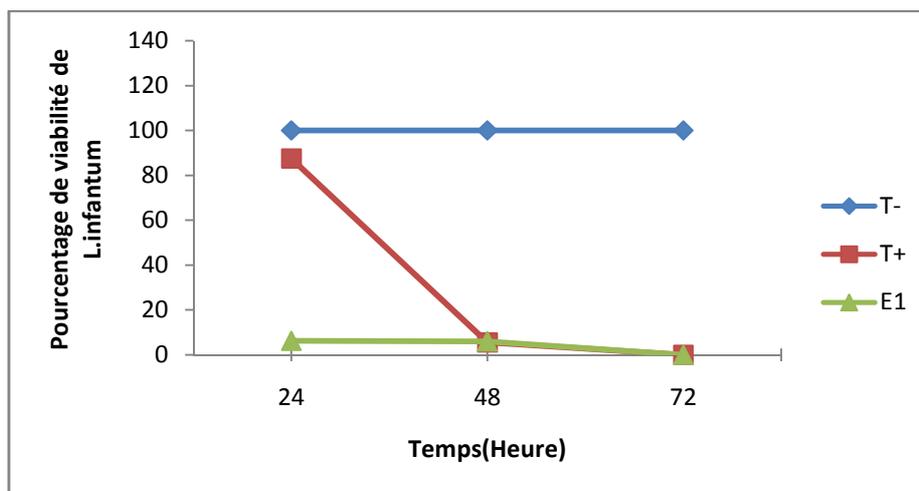


Figure 26 : Courbe représentant le pourcentage de viabilité de *L.infantum* en fonction du temps(Heure), en présence de l'extrait de *Verbascum sinuatum* (E1).

Le résultat obtenu, a montré en première vue, que l'extrait *V.sinuatuatum* testé à la concentration de 500mg/ ml, s'est avéré fatale pour la survie des promastigotes *L.infantum* atteignant les 100% d'inhibition au bout de 72h. Le bilan comparatif entre Fungizone et l'extrait de *V.sinuatuatum* a montré une efficacité similaire.

2.1.2. Effet de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Phlomis bovei* sur les promastigotes *L.infantum*

Le pourcentage de viabilité des parasites *L.infantum* cultivés en présence de l'extrait de *Phlomis bovei* (E2) à la concentration de 400mg/ml et en ce servant de Fungizone (T+) à la concentration (100mg/ml) est représenté à la figure 27.

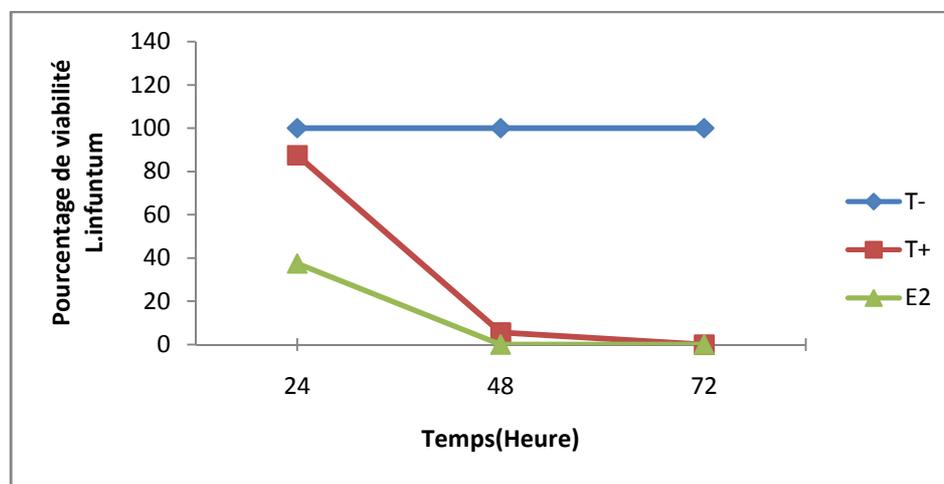


Figure 27: Courbe représentant le pourcentage de viabilité en fonction du temps(Heure) de *L. infantum*, en présence de l'extrait de feuilles *Phlomis bovei* (E2).

Le résultat de ce test, démontre que l'extrait de *P. bovei* à la concentration 400mg/ ml à une puissante activité antileishmanial sur les promastigotes *L.infantum*, allant jusqu'à 100% d'inhibition au bout de 48 heures d'incubation. Le résultat comparatif avec le control Fungizone (T+), a indiqué que l'extrait de *P.bovei* s'est montré très efficace, vu l'inhibition totale des parasites en un espace de 24h. Contrairement au témoin positif qui a permis la survie de 5,88% de promastigotes après 48h d'incubation, son élimination totale des formes vivantes ne s'est révélée qu'après 72heures.

2. Discussion

La leishmaniose viscérale est l'une des formes les plus graves de la leishmaniose (Tariq *et al.*, 2016) qui est principalement causée par les espèces *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi* (Shirian *et al.*, 2013). On recherche d'une nouvelle alternative qui remplacera les effets indésirables des traitements standards prescrits contre cette maladie, plusieurs études ont été rapportées sur l'effet de diverses plantes médicinales *in vitro* contre ces espèces, notant celles des deux espèces du genre *Phlomis* nommées *Phlomis brunneogaleata* et *Phlomis Kurdica* ont fait l'objet d'une étude, qui a fini par approuver leur efficacité contre *L. donovani* (Limem-Ben Amor *et al.*, 2009). Deux espèces du genre *Verbascum*; *V. botae* et *V. cutarus* ont aussi montré une remarquable efficacité respectivement contre *L. infantum* et *L. donovani* (Mothana *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus dans notre étude, nous montrent que les extraits aqueux brutes expérimentés *in vitro* sur les promastigotes *L. infantum*, ont présentés des effets très intéressants, notant la puissante activité antileishmaniale atteignant les 100% de mortalité exercée par *P. bovei* à la concentration 400mg/ml au bout de 24h et l'activité leishmanicide de fort potentiel de *Verbascum sinuatum* à la concentration de 500mg/ml avec un même résultat d'inhibition après 72h d'incubation.

Cet effet inhibiteur exercé par nos extraits aqueux contre les formes promastigotes *L. infantum* peut être attribué à la composition chimique de ces extraits.

En se référant de la littérature la plante *P. bovei* est composée principalement de 86,7% d'huile essentielle dont le thymol qui est présent à 8,3% (Lilios *et al.*, 2007; Limem Ben Amor *et al.*, 2009). Cette molécule a déjà fait l'objet d'étude à effet leishmanicide prouvant qu'elle est principalement active contre des formes promastigotes. En effet il a été rapporté que l'huile essentielle de *Lippia sidoides* riches en thymol a présenté une efficacité d'inhibition contre des modèles promastigotes *L. amazonensis*. Dans une autre étude, les dérivés du thymol démontrent une parfaite inhibition de la croissance des promastigotes de *L. panamensis* (De Moraes *et al.*, 2014).

Pour ce qui est de *Verbascum sinuatum*, l'activité démontrée peut être due à son composé glycosidique «le Verbascoside» qui a déjà fait l'objet d'une étude démontrant sa fatalité contre les *L. infantum* et *L. donovani* (Maquiaveli *et al.*, 2016).

Notant que ces deux espèces partagent des composés chimiques comme la saponine et les flavonoïdes (Dimitrova *et al.*, 2012 ; Kozan *et al.*, 2011 ; Marchev *et al.*, 2016 ;Khitri *et al.*, 2014 ; Wafa *et al.*, 2016). Cependant, l'effet antileishmanial des saponines a été signalé pour la première fois par une étude portant 60% de complexe saponiques testé in vitro contre les promastigotes de *L.infantum* et *L.tropica* (Majester-Savornin *et al.*, 1991).

Les flavonoïdes ont été également explorés en étude à effet antileishmanial, l'isolement de la quercitrine flavonoïde de la plante *Kalancho pinnata* a démontrée une puissante activité antileishmanial (Muzitano *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'effet inhibiteur exercé par ces extraits peut être attribué à des molécules autres que celle citées en littérature, ou à un phénomène synergique entre les molécules présentes dans l'extrait.

Les doses utilisées pour ce test sont élevées, d'ou la nécessité de déterminer la IC50 qui est la concentration en extrait végétale nécessaire pour obtenir 50% de l'activité antiparasitaire pour confirmer l'efficacité de ces plantes, chose qui n'a pas été réalisé pour des raisons pratiques au niveau du labo (absence de l'étuve réfrigérante) sachant qu'elle est très essentielle pour la détermination de l'efficacité de ces deux extraits de plantes.

Conclusion

Conclusion

Les leishmanioses sont un groupe diversifié de syndromes cliniques incluant principalement les formes cutanée, mucocutanée et viscérale qui est la forme la plus grave de la maladie.

En raison du manque d'options thérapeutiques disponibles et de la forte augmentation de la résistance des parasites aux médicaments antileishmaniaux. La recherche de nouveaux traitements reste une priorité pour la lutte contre la leishmaniose.

Ce travail, nous a permis de mettre l'accent sur une approche phytothérapeutique pour le traitement de la leishmaniose viscérale.

Les résultats obtenus ont pu montrer que les extraits aqueux des feuilles de *V.sinuatum* et *P.bovei* à la concentration 500mg/ml et 400 mg/ ml respectivement, présentent un effet antileishmanial remarquable contre les promastigotes *L.infantum* avec 100% de mortalité.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées pour ce travail. En effet La recherche de la (IC50), qui représente la concentration en extrait végétale nécessaire pour obtenir 50% de l'activité antiparasitaire, reste primordiale pour déterminer l'efficacité de chaque extrait.

D'autres parties de la plante devraient également être amenées sous les projecteurs pour la découverte de leur potentiel activité antileishmania, suivie d'une investigation approfondie en utilisant des techniques performantes d'extraction pour l'isolement des molécules bioactives de ces extraits, et leur enquête *in vitro* contre les leishmanies apportera sûrement un grand intérêt pharmacologique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **ABREU PM., MARTINS ES., KAYSER O., BINDSEIL KU., SIEMS K., SEEMANN.A. ET FREVERT J. (1999).** Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine*, 6(3), [187-95].
- **ADEL A., BOUGHOUFALAH A., SAEGERMAN C., DE DEKEN R., BOUCHENE Z., SOUKEHAL A., BERKVENS D. ET BOELAERT M.(2014).** Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: an update. *PLoS One*, 20;9(6):e99207.
- **AKBARI M., ORYAN A. ET HATAM G. (2017).** Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, 172, [86-90].
- **AKHOUNDI M., KUHL S., CANNET A., VOTÝPKA J., MARTY P., DELAUNAY P. ET SERENO D. (2016).** A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* Staff, 10(6):e0004770.
- **ALCOLEA PJ., ALONSO A., GOMEZ MJ., MORENO I., DOMINGUEZ M., PARRO V. ET LARRAGA V. (2010).** Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: high down-regulation rate in the amastigote stage. *Int J Parasitol*, 40(13), [1497-516].
- **ALI N., ALI SHAH SW., SHAH I., AHMED G., GHAS M., KHAN I. ET ALI W. (2012).** Anthelmintic and relaxant activities of *Verbascum Thapsus* Mullein. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 29.
- **AL-SOKARI SS., ALI NA., MONZOTE L. ET AL-FATIMI MA. (2015).** Evaluation of Antileishmanial Activity of Albaha Medicinal Plants against *Leishmania amazonensis*. *BioMed Research International*, 2015: 938747.
- **ANOFEL, (2014).** Leishmanioses. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie.
- **ANTINORI S., CALATTINI S., LONGHI E., BESTETTI G., PIOLINI R., MAGNI C., ORLANDO G., GRAMICCIA M., ACQUAVIVA V., FOSCHI A., CORVASCE S., COLOMBA C., TITONE L., PARRAVICINI C., CASCIO A. ET CORBELLINO M. (2007).** Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), [1602-10].
- **ASHRAFMANSOURI M., SARKARI B., HATAM G., HABIBI P. ET ABDOLAHI KHABISI S. (2015).** Utility of Western Blot Analysis for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Parasitol*, 10(4), [599–604].
- **BACHI F. (2006).** Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La Lettre de l'Infectiologie - Tome XXI, n° 1*, [9-15].
- **BADER A., TUCCINARDI T., GRANCHI C., MARTINELLI A., MACCHIA M., MINUTOLO F., DE TOMMASI N. ET BRACAB A. (2015).** Phenylpropanoids and Flavonoids from *Phlomis kurdica* as Inhibitors of Human Lactate Dehydrogenase. *Phytochemistry*, 116, [262–268].

Références bibliographiques

- **BAGIROVA M., ALLAHVERDIYEV AM., ABAMOR ES., ULLAH I., COSAR G., AYDOGDU M., SENTURK H. ET ERGENOGLU B. (2016).** Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 38(11), [651-662].
- **BANETH G., DONI ZIVOTOFISKY D., YAARIT NACHUM-BIALA Y., YASURLANDAU D. ET BOTERO AM. (2014).** Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasit Vectors*, 7: 118.
- **BASTIEN P. ET LACHAUD L. (2016).** Leishmaniose : biologie, clinique et thérapeutique. EMC-Maladies infectieuses, 8-506- A-10.
- **BATES PA. (2007).** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), [1097-1106].
- **BELDI N., MANSOURI R., BETTAIEB J., YAACOUB A., SOUGUIR OMRANI H., SAADI BEN AOUN Y., SAADNI F., GUIZANI I. ET GUERBOUJ S. (2017).** Molecular Characterization of *Leishmania* Parasites in Giemsa-Stained Slides from Cases of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, Eastern Algeria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(6), [416-424].
- **BENNIS I., THYS S., HIND FILALI, DE BROUWERE V., SAHIBI H. ET BOELAERT M. (2017).** Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infect Dis Poverty*, 6: 46.
- **BOGA M., ERTAS A., YILMAZ MA., MURAT KIZIL., ÇEKEN B., HASIMI N., YILMAZ ÖZDEN T., DEMIRCI S., YENER I. ET DEVECI Ö. (2016).** UHPLC-ESI-MS/MS and GC-MS Analyses on Phenolic, Fatty Acid and Essential Oil of *Verbascum pinetorum* with Antioxidant, Anticholinesterase, Antimicrobial and DNA Damage Protection Effects. *Iran J Pharm Res*, 15(3), [393-405].
- **BOGDAN C. ET RÖLLINGHOFF M. (1998).** The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, 28(1), [121-34].
- **BUFFAZ C., HODILLE E., JOURDY Y., LOUVRIER C. ET MARIJON A. (2014).** Parasitologie et Mycologie médicale pratique, 1^{re} édition., De boeck, Belgique.
- **BUFFET PA. ET MORIZOT G. (2003).** La leishmaniose cutanée en France : vers la fin des traitements injectables. *Bull Soc Pathol Exot*, 96, 5, [383-388].
- **BUFFET PA., ROSENTHAL E., GANGNEUX J-P., LIGHTBURNE E., COUPPIE P., MORIZOT G., LACHAUD L., PIERRE MARTY. ET DEDET J-P. (2011).** Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Med*, 40, [173-184].
- **CAREY AF. ET CARLSON JR. (2011).** Insect olfaction from model systems to disease control. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), [12987-12995].
- **CARRE N., COLLOT M., GUILLARD P., HORELLOU M. ET GANGNEUX J-P. (2010).** La Leishmaniose Viscérale Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. *J Pharm Clin*, vol. 29, N° 3, [121-48].

Références bibliographiques

- **CAUMES E. ET BOUREE P. (2008).** Diagnostic des parasitoses cutanées en France. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* N°399.
- **CHAARA D., HAOUAS N., DEDET JP., BABBA H. ET PRATLONG F.(2014).** Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop*, 132 [80-93].
- **CLEM A. (2010).** A Current Perspective on Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*, 2(2), [124–126].
- **CONCETTA POSTORINO M., BELLANTONI M., CATALANO C., CARIDI G., DE ROSA M., SECK S. ET ENIA G. (2011).** Visceral leishmaniasis reactivation in transplant patients: a minireview with report of a new case. *JNEPHROL*, 24(04), [530-534].
- **COSTA MS., GONÇALVES YG., NUNES DCO., NAPOLITANO DR., MAIA PIS., RODRIGUES RS., RODRIGUES VM, VON POELHSITZ G ET YONEYAMA KAG. (2017).** Anti-Leishmania activity of new ruthenium(II) complexes: Effect on parasite-host interaction. *J Inorg Biochem*, 175,[225-231].
- **CUNHA MA., ALINE CQL., DE CASSIA SOLER R., ET LINDOSO JAL. (2015).** Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. *Am J Trop Med Hyg*, 93(6), [1214–1218].
- **DEDET J.P. (2001).** Leishmanies, leishmanioses. *Biologie, clinique et thérapeutique. Encyclopédie Medico-Chirurgicale*, 8, [506-510].
- **DEDET J.P. (2008),** Leishmanioses cutanée ; in : «Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques». *Dermatologie et médecine* ., Springer-Verlag, Paris.
- **DEDET J- P. ET PRATLONG F. (2003).** Trypanosomoses et Leishmanioses ; in : «Epidémiologie des maladies parasitaires». *Edition Médicale Internationales*, Tome 3., Lavoisier, Paris.
- **DELGADO O., SILVA S., CORASPE V., RIVAS MA., RODRIGUEZ-MORALES AJ., NAVARRO P ET FRANCO-PAREDES C. (2008).** Cutaneous leishmaniasis imported from Colombia to Northcentral Venezuela: Implications for travel advice. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6, [376-379].
- **DE MORAES BT., DE SOUZA F., FILHO A., NETO JC., NETO PS., DE MELO JES. ET JUNIOR. (2012).** Laryngeal Leishmaniasis. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 16(4), [523–526].
- **DE MORAIS SM., VILA-NOVA NS., BEVILAQUA CML., RONDON FC., LOBO CH., DE ALENCAR A., NORONHA MOURA A., SALES AD., RODRIGUES APR., DE FIGUEREIDO JR., CAMPELLO CC., WILSON ME. ET DE ANDRADE HF, JR. (2014).** Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(21), [6250–6255].
- **DEREURE J. (1999).** Réservoirs de leishmanies ; in : DEDET JP (1999). «Les Leishmanioses ». *Ellipses*. Paris.
- **DIMITROVA P., KOSTADINOVA E., MILANOVA V., ALIPIEVA K., GEORGIEV M. ET IVANOVSKA N. (2012).**

Références bibliographiques

- Antiinflammatory properties of extracts and compounds isolated from *Verbascum xanthopoeniceum* Griseb. *Phytother Res*, 26(11), [1681-7].
- **DORLO TPC., BALASEGARAM M., BEIJNEN JH. ET DE VRIES PJ. (2012).** Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, [2576–2597].
 - **DOSTÁLOVÁ A. ET VOLF P. (2012).** Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, 5:276.
 - **DUTHIE MS., FAVILA M., HOFMEYER KA., TUTTERROW YL., REED SJ., LAURANCE JD., PICONE A., GUDERIAN J., BAILOR HR, VALLUR AC., LIANG H., MOHAMATH R., VERGARA J., HOWARD RF., COLER RN. ET REED SG. (2016).** Strategic evaluation of vaccine candidate antigens for the prevention of Visceral Leishmaniasis. *Vaccine*, 34(25), [2779–2786].
 - **ESKANDARI EG., DOUDI M. ET ABEDI S. (2016).** in vitro study of antileishmanial effect of *Portulaca oleracea* extract. *J Vector Borne Dis*, [362–369].
 - **EKIZ O., KAHRAMAN ŞŞ., ŞEN BB., SERARSLAN G., RIFAI OGLU EN., CULHA G. ET ÖZGÜR. (2017).** Mucocutaneous leishmaniasis with marked facial disfigurement. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 83(1), [91-93].
 - **ESTEVA L., VARGAS C. ET VARGAS DE LEON C. (2017).** The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation. *Mathematical Bioscience*, 293, [46-55]
 - **FAUCHER B. ET PIARROUX R. (2011).** Actualités sur les leishmanioses viscérales. *La Revue de médecine interne*, 32, [544–551].
 - **FILIPPI C., MALHERBE L., JULIA V. ET GLAICHENHAUS N. (2001).** L'immunité contre les leishmanies. *Médecine/Science*, 17, [1120-8].
 - **FORESTIER CL. (2013).** Imaging host-Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 35, [256–266].
 - **FRAHTIA-BENOTMANE K. (2015).** Détection moléculaire des leishmanioses à partir du genre *Phlebotomus* (diptera : psychodidae) : tendance vers la régression de la leishmaniose à Constantine. Thèse de doctorat en sciences en Biologie Animale option Entomologie, Université des Frères Mentouri, Constantine.
 - **FRAIHI W., FARES W., PERRIN P., DORKELD F., SERENO D., BARHOUMI W., SBISSI I., CHERNI S., CHELBI I., DURVASULA I., RAMALHO-ORTIGAO M., GTARI M. ET ZHIOUA E. (2017).** An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *Plos Neglected Tropical Disease*, 11(3): e0005484.
 - **GADELHA EPN., TALHARI S., DE OLIVEIRA GUERRA JA., OURIVES NEVES L., TALHARI C., GONTIJO B., DA SILVA JUNIOR RM. ET CHRUSCIAK TALHARI A. (2015).** Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *An Bras Dermatol*, 90(6), [807–813].
 - **GHA SEMIAN M., GHARAVI MJ., AKHLAGHI L., MOHEBALI M., MEAMAR AR., ARYAN E. ET OORMAZDI H. (2014).** Development and

Références bibliographiques

- Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Iran J Parasitol*, 9(1), [50-9].
- **GHOSH P., KHONDAKER R. BHASKAR H., HOSSAIN F., ASHFAQ KHAN MDA., VALLUR AC., DUTHIE MS., HAMANO S., ABDUS SALAM MD., MAMUN HUDA M., MUSAWWIR KHAN MDG., COLER RN., REED SG. ET MONDAL D. (2016).** Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 9:383.
 - **GONZALEZ U., PINART M., RENGIFO-PARDO M., MACAYA A., ALVAR J. ET TWEED JA. (2012).** Interventions contre la leishmaniose muco-cutanée et cutanée américaine(Review). *Cochrane library*.
 - **GRADONI L. (2015).** Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Vetrinary Parasitology*, 208(1-2), [94-100].
 - **GRANIER M. (2013).** Etude de la perception du vaccin contre la leishmaniose par les vétérinaires et les propriétaires de chiens en zone d'enzootie sur le territoire de France métropolitaine. Thèse de doctorat d'état en vétérinaire université Paul-Sabatier de Toulouse, France.
 - **GREGORY DJ. ET OLIVIER M. (2005).** Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, 130, [27-35].
 - **GRIGORE A., COLCERU-MIHUL S., LITESCU S., PANTELI M. ET RASIT I. (2013).** Correlation between polyphenol content and anti inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein). *Pharm Biol*, 51(7), [925-9].
 - **GUILLAUME V. (2009).** Parasitologie sanguine. *Biologie Médicale Pratique.*, De Boeck, Bruxelles.
 - **GURIB-FAKIM A. (2006).** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), [1-93].
 - **GURUNG P. ET KANNEGANTI T-D. (2015).** Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*, 17(9), [1286–1294].
 - **HAJIBA FELLAH., OURSULA DOUGHMI., SAAD MANIAR., ET ABDELHAKIM. EL OUALI LALAMI. (2014).** Sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in central Morocco. *Pan Afr Med J*, 19: 248.
 - **HANDMAN E. (2001).** Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), [229–243].
 - **HARHAY MO., OLLIARO PL., COSTA DL. ET COSTA CH. (2011).** Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, Vol. 27, No. 9, [403-409].
 - **IHOUAL S., KARAALI W. ET ABIDLI N. (2017).** Antioxidant, Anti-Proliferative, and Induction of Apoptosis by *Phlomis samia* Methanolic Extract from Algeria. *Der Pharma Chemica*, 9(7), [99-107].
 - **INBAR E., KEITH HUGHITT V., DILLON LAL ., KASHIGHOSH K., EL-SAYED NM. ET SACKS DL. (2017).**The Transcriptome of *Leishmania*

Références bibliographiques

- major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly. *Vector.mBio*, 8(2): e00029-17.
- **IZRI A., DEPAQUIT J. ET PAROLA P. (2006).** Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Med Trop*, 66, [429-435].
 - **JARRY DM. (1999).** Historique des leishmanioses et leur complexes pathogènes. In DEDET JP. *Les leishmanioses*. Edition Ellipses.
 - **KAFETZIS DA., VELISSARIOU IM., STABOULI S., MAVRIKOU M., DELIS D. ET LIAPI G. (2005).** Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: Amphotericin B or pentavalent antimony compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, [26–30].
 - **KARIMI A., HANAFI-BOJD AA., YAGHOOBI-ERSHADI MR., AKHAVAN AA. ET GHEZELBASH Z. (2014).** Spatial and temporal distributions of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae), vectors of leishmaniasis, in Iran. *Acta Tropica*, 132, [131–139].
 - **KAZEMI B. (2011).** Genomic Organization of *Leishmania* Species. *Iranian J Parasitol*, Vol. 6, No.3, [1-18].
 - **KHADEM F. ET UZONNA JE. (2014).** Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiology*, 9(7), [901–915].
 - **KHITRI W., ZENAKI J., ABI A., LACHGUEUR N. ET LARDJEM A. (2014).** Evaluation of Wound Healing Activity of *Phlomis bovei* De Noe in Wistar Albino Rats. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, Vol:1, No:11.
 - **KIP AE., SCHELLENS JHM., BEIJNEN JH. ET DORLO TPC. (2017).** Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. *Clin Pharmacokinet*.
 - **KOZAN E., ÇANKAYA IT., KAHRAMAN C., AKKOL EK. ET AKDEMIR Z. (2011).** The in vivo anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey. *Exp Parasitol*, 129(2), [211-4].
 - **LEGER. N ET DEPAQUIT.J J.P. (2007),** Phlebotominae ; in : «Epidemiologie des maladies parasitaires» Edition médicales internationales, Tome 4., Lavoisier, Paris.
 - **Lima MHF., SACRAMENTO LA., QUIRINO GFS., FERREIRA MD., BENEVIDES L., SANTANA AKM., CUNHA FQ., ALMEIDA RP., SILVA JS. ET CARREGARO V. (2017).** *Leishmania infantum* Parasites Subvert the Host Inflammatory Response through the Adenosine A2A Receptor to Promote the Establishment of Infection. *Frontiers in Immunology*, 8:815.
 - **LIMEM-BEN AMOR I., BOUBAKER J., BEN SGAIER M., SKANDRANI I., BHOURI W., NEFFATI A., KILANI S., INES BOUHLEL., GHEDIRA K. ET CHEKIR-GHEDIRA L. (2009).** Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, [183–202].
 - **LI M-X., SHANG X-F., JIA Z-P. ET ZHANGA R-X. (2010).** Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 7 (2), [283-301].

Références bibliographiques

- **LIOLIOS C., LAOUER H., BOULAACHEB N., GORTZI O. ET CHINOUI I. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé subsp. *Bovei*. *Molecules*, 12(4), [772-81].
- **LIU D. ET UZONNA JE. (2012).** The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 83.
- **LI X-H., LI X-H., QI YAO Q, LU L-H., LI Y-B., WU D-S., FU D-H., MEI S-X., CUI T., WANG J-K. ET ZHU Z-Y. (2017).** Phlolosides A–F, iridoids from *Phlomis likiangensis* with a carbonate ester substituent. *Tetrahedron Letters*, Volume 58, Issue 32, [3112–3118].
- **LOSADA-BARRAGÁN M., CAVALCANTI A., UMAÑA-PÉREZ A., PORROZZI R., CUERVO-ESCOBAR S., VALLEJO AF., SÁNCHEZ-GÓMEZ M. ET CUERVO P. (2016).** Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples. *Vet Parasitol*, 15; 226, [57-64].
- **LOUZIR H., AOUN K., SPÄTH GF., LAOUI NI D., PRINA E., VICTOIR K. ET BOURATBINE A. (2013).** *Leishmania* epidemiology, diagnosis, chemotherapy and vaccination approaches in the international network of Pasteur Institutes. *Medecine Science*, 29(12), [1151-60].
- **MAHMOUDVAND H., SHARIFIFAR F., RAHMAT MS., TAVAKOLI R., DEZAKI ES., JAHANBAKHS S. ET SHARIFI I. (2014).** Evaluation of antileishmanial activity and cytotoxicity of the extracts of *Berberis vulgaris* and *Nigella sativa* against *Leishmania tropica*. *J Vector Borne Dis*, 51(4), [294-9]
- **MAHMOUDVAND H., SHARIFIFAR F., SHARIFI I., EZATPOUR B., FASIHI HARANDI M., Sadat MAKKI M., ZIA-ALI N. ET JAHANBAKHS S. (2014).** In Vitro Inhibitory Effect of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and Its Main Component, Berberine against Different *Leishmania* Species. *Iranian Journal Parasitology*, 9(1), [28–36].
- **MAHMOUDVAND H., TAVAKOLI R., SHARIFIFAR F., MINAIE K., EZATPOUR B., JAHANBAKHS S. ET SHARIFI I. (2014).** Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*.
- **MAJESTER-SAVORNIN B, ELIAS R., DIAZ-LANZA AM., BALANSARD G., GASQUET M. ET DELMAS F. (1991).** Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta Med*, 57(3):260-2.
- **MAQUIAVELI CC., LUCON-JUNIOR JF., BROGI S., CAMPIANI G., GEMMA S., VIEIRA PC. ET SILVA ER. (2016).** Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Natural Products*, 79(5), [1459-63].
- **MARCHEV A., YORDANOVA Z., ALIPIEVA K., ZAHMANOV G., RUSINOVA-VIDEVA S., KAPCHINA-TOTEVA V., SIMOVA S., POPOVA M. ET GEORGIEV MI. (2016).** Genetic transformation of rare *Verbascum eriophorum*

Références bibliographiques

Godr. plants and metabolic alterations revealed by NMR-based metabolomics. *Biotechnol Lett*, 38(9), [1621-9].

- **MARTY P. (2010).** Leishmaniose viscérale : épidémiologie, diagnostic et traitement. *La Lettre de l'Infectiologie Tome XXV, n°5*, [186-189].
- **MASMOUDI A., HARIZ W., MARREKCHI S., AMOURI M. ET TURKI H. (2013).** Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *Journal of Dermatological Case Reports*, 7(2), [31-41].
- **MCQUARRIE S., KASPERMD K., MOFFATT DC., MARKO D. ET KEYNAN Y. (2015).** Relapse of visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient successfully treated with a combination of miltefosine and amphotericin B. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, Vol 26 No 6, [325–329].
- **MELLANO S. (2016).** La leishmaniose canine et humaine à *leishmania infantum* en France. Thèse de doctorat de l'Etat en pharmacie, Toulouse.
- **MERGIA E., SHIBESHI W., TEREFE G. ET TEKLEHAYMANOT T. (2016).** Antitrypanosomal activity of *Verbascum sinaiticum* Benth. (Scrophulariaceae) against *Trypanosoma congolense* isolates. *BMC Complement Altern Med*, 16: 362.
- **MINODIER P., GAUTHIER-BEATA K., RETORNAZ K., FARAUT-GAMBARELLI F., GARNIER JM. ET DUMON H. (2001).** Place de l'AmBisome® dans le traitement de la leishmaniose viscérale de l'enfant. *La Lettre de l'Infectiologie - Tome XVI, n° 6*.
- **MIHOUBI I., DE MONBRISON F., FRAHTIA K., PICOT S. ET GASSEM N. (2012).** Utility of real-time PCR for the diagnosis of infantile visceral leishmaniasis in Algeria. *Médecine et Sante Tropicales*, 22, [61-64].
- **MOEIN S., MOEIN M., KHOSHNOUD MJ. ET KALANTERI T. (2012).** In Vitro Antioxidant Properties Evaluation of 10 Iranian Medicinal Plants by Different Methods. *Iran Red Crescent Med J*, 14(12), [771-775].
- **MOHAMED-AHMED AH., SEIFERT K., YARDLEY V., BURRELL-SAWARD H., BROCCINI S. ET CROFT SL. (2013).** Antileishmanial Activity, Uptake, and Biodistribution of an Amphotericin B and Poly(α -Glutamic Acid) Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 57 Number 10, [4608 – 4614].
- **MONGE-MAILLO B., NORMAN F., CRUZ I., ALVAR J. ET LOPEZ6VELEZ R. (2014).** Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Mediterranean Region. *Journal.pntd*, 0003021.
- **MOTHANA RA., AL-MUSAYEIB NM., AL-AJMI MF., COS P. ET MAES L. (2014).** Evaluation of the In Vitro Antiplasmodial, Antileishmanial, and Antitrypanosomal Activity of Medicinal Plants Used in Saudi and Yemeni Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 905639, 7 pages.
- **MOULINIER C. (2003).** Parasitologie et mycologie médicales. Eléments de morphologie et de biologie. Edition médicales internationales, N° 488- GP 80°, Lavoisier, Paris.

Références bibliographiques

- **MOULOU A. (2014).** Etude Eco-Epidémiologique de la leishmaniose canine en Kabylie. Thèse de Doctorat de l'Etat en vétérinaire, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- **MOUMNI H. (2015).** Epidémiologie et diagnostic du laboratoire des leishmanioses au CHU de Tlemcen. Mémoire de fin des études pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie, Tlemcen.
- **MUHAMMAD RIAZ., MUHAMMAD ZIA-UL-HAQ. ET Y HAWA Z.E.JAAFA. (2013).** Common mullein, pharmacological and chemical aspects Author links open overlay panel, V23, Issue 6, [948-959].
- **MUZITANO MF., TINOCO LW., GUETTE C., KAISER CR., ROSSI-BERGMANN B. ET COSTA SS. (2006).** The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67(18), [2071-7].
- **NAGILL R. ET KAUR S. (2011).** Vaccine candidates for leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, 11(10), [1464–1488].
- **NEWLOVE T.,ROBINSON M., MEEHAN SA. ET POMERANTZ R.(2012).**Old World cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J*, 15; 18(12):32.
- **NOUIOUA W., GAAMOUNE S. ET KAABACHE M. (2016).** The antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids and tannins extracted from *Phlomis bovei* De Noé. *European Journal of Experimental Biology*, 6(3), [55-61].
- **OKWOR I. ET UZONNA JE. (2013).** The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol Res*, 56(1), [163-71].
- **OLIVEIRA F., JOCHIM RC., VALENZUELA JG. ET KAMHAWI S. (2009).** Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol Int*, 58(1), [1–5].
- **OMS. (2010).** La lutte contre les leishmanioses.
- **OMS. (2017).** Leishmaniose.
- **OSMAN M., MISTRY A., KEDING A., GABE R., COOK E., FORRESTER S., WIGGINS R., DI MARCO S., COLLOCA S., SIANI L., CORTESE R., SMITH DF., AEBISCHER T., KAYE PM. ET LACEY CJ. (2017).** A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5):e0005527.
- **OTRANTO D. ET DANTAS-TORRES F. (2013).** The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*, 29(7), [339-45].
- **OUELLETTE M., OLIVIER M., SATO S. ET PAPADOPOULOU B. (2003).** Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. *Médecine Sciences*, n° 10, vol. 19, [900-909].
- **PALACIOS G., PARODI A., UPEGUI YA., MONTOYA A., PULIDO S., VÉLEZ ID ET ROBLEDO SM.(2017).** Studies in vitro on infectivity and sensitivity to antileishmanial drugs in New World *Leishmania* species transfected with the green fluorescent protein [pIR3(-)-eGFP]. *Parasitology*, 23,[1-8].
- **PANIZ-MONDOLFI AE., TALHARI C., GARCIA BUSTOS MF., ROSALES T., VILLAMIL-GOMEZ WE., MARQUEZ M., PEREZ ALVAREZ AM., TALAMO SANCHEZ AI. ET RODRIGUEZ-MORALES AJ. (2017).**

Références bibliographiques

American cutaneous leishmaniasis in infancy and childhood. The International Society of Dermatology.

- **PIERRE BUFFET J.P. (2012).** Leishmanioses ; in : « Médecine Tropicale». Médecine Science, 6^{ème}Ed., Lavoisier, Paris.
- **PUROHIT HM., SHAH AN., AMIN BK. ET SHEVKAN MR. (2012).** Diffuse cutaneous leishmaniasis – A rare cutaneous presentation in an HIV-positive patient. Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS, 33(1), [62–64].
- **QUINNELL RJ. ET COURTENAY O. (2009).** Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology , 136(14), [1915-34].
- **RESENDE LA., AGUIAR-SOARES RD., GAMA-KER H., ROATT BM., MENDONÇA LZ., ALVES ML., SILVEIRA-LEMOS DD., CORRÊA-OLIVEIRA R., MARTINS-FILHO OA., ARAÚJO MS., FUJIWARA RT., GONTIJO NF., REIS AB. ET GIUNCHETTI RC. (2016).** Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after Leishmania chagasi-Challenge. PLoS One, 11(8):e0161169.
- **RIAZ M., ZIA-UL-HAQ M. ET JAAFA HZE. (2013).** Common mullein, pharmacological and chemical aspects Author links open overlay panel, V23, Issue 6, [948-959].
- **RIBEIRO RA., TEIXEIRA-NETO RG., BELO VS., FERREIRA EC, SCHALLIG HD. ET SILVA ES. (2015).** Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with Leishmania infantum and Leishmune(®)-vaccinated dogs. Vet Res Commun, 39(2), [87-95].
- **RIPERT C., PAJOT F-X. ET F.ESQUERDO GÓMEZ F. (1996),** Leishmanioses ; in : «Epidémiologie Des Maladies Parasitaires». Edition Médicinales Internationales, Tome 1, Paris.
- **ROQUE AL. ET JANSEN AM. (2014).** Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl, 29; 3(3), [251-62].
- **ROSENTHAL E., DELAUNAY P., JEANDEL PY., HAAS H., POMARES-ESTRAN C. ET. MARTY P. (2009).** Liposomal amphotericin B as treatment for visceral leishmaniasis in Europe. Médecine et maladies infectieuses, 39, [741–744].
- **SALLES BC., COSTA LE., ALVES PT, DIAS AC., VAZ ER., MENEZES-SOUZA D., RAMOS FF., DUARTE MC., ROATT BM., CHÁVEZ-FUMAGALLI MA., TAVARES CA., GONÇALVES DU., ROCHA RL., GOULART LR. ET COELHO EA. (2017).** Leishmania infantum mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 87(3), [219-225].
- **SARIKURKCU C., SABIH OZER M., CAKIR A., ESKICI M. ET METE E. (2013).** GC/MS Evaluation and In Vitro Antioxidant Activity of Essential Oil and Solvent Extracts of an Endemic Plant Used as Folk Remedy in Turkey: Phlomis bourgaei Boiss. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, Article ID 293080, 7 pages.

Références bibliographiques

- **SCORZA BM., CARVALHO EM. ET WILSON ME. (2017).** Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*, 18; 18(6).
- **SENATORE., FRIGANO D., FORMISANO C., GRASSIA A., BASILE A. ET SORBO S. (2007).** Phyto-growth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbascum sinuatum*. *Fitoterapia*, 78(3), [244-7].
- **SENER A. ET DULGER B. (2009).** Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3(11), [778-781].
- **SHIRANI-BIDABADI L., ZAHRAEI-RAMAZANI A., YAGHOUBI-ERSHADI MR., RASSI Y., AKHAVAN AA., OSHAGHI MA., ENAYATI AA., SAEIDI Z., JAFARI R ET VATANDOOST H.(2017).** Assessing the insecticide susceptibility status of field population of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esfahan Province, Central Iran. *Acta Trop*, 8;176,[316-322].
- **SHIRIAN S., ORYAN A., HATAM GR. ET DANESHBOOD Y. (2013).** Three *Leishmania*/L. species--L. infantum, L. major, L. tropica--as causative agents of mucosal leishmaniasis in Iran. *Pathog Glob Health*, 107(5), [267-72].
- **SOLANO-GALLEGO L., MIRO G., KOUTINAS A., CARDOSO L., MARIA PENNISI MG., LUIS FERRER L., BOURDEAU P., OLIVA G. ET BANETH G. (2011).** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 4: 86.
- **SOOSARAEI M., FAKHAR M., HOSSEINI TESHNIZI S., ZIAEI HEZARJARIBI H ET BANIMOSTAFAVI ES.(2017).** Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med Surg (Lond)*, 27; 21,[63-80].
- **SOTOODEH A. (2016).** Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire.
- **SRIVASTAVA S., MISHRA J., GUPTA AK., SINGH A., SHANKAR P. ET SINGH S. (2017).** Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasit Vectors*, 10(1):49.
- **SRIVIDYA G., KULSHRESTHA A., SINGH R. ET SALOTRA P. (2012).** Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*, 110, [1065–1078].
- **STOCKDALE L ET NEWTON R. (2013).** A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(6): e2278.
- **TANGIE LN., DESMOND A., AMINDE LN., AKO AM. ET HALLE PM. (2017).** Cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised HIV patient in Kumbo, Northwest region of Cameroon: case report. *Bio Med Central Research Notes*, 10(1):425.
- **TARIQ A., ADNAN M., AMBER R., PAN K., MUSSARAT S. ET ZABTA SHINWARI ZK. (2016).** Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani

Références bibliographiques

medicinal plants against *Plasmodia* and *Leishmania* parasites. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 15: 52.

- **THOMAZ-SOCCOL V., FERREIRA DA COSTA ES., KARP SG, LETTI LAJ., SOCCOL CR. ET THOMAZ F. (2017).** Recent advances in vaccines against *Leishmania* based on patent applications. *Recent Pat Biotechnol*.
- **TORRES-GUERRERO E., QUINTANILLA-CEDILLO MR., RUIZ-ESMENJAUD J. ET ARENAS R. (2017).** Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 7:650.
- **VAND ESKANDARI EG., MONIR DOUDI. ET SAEID ABEDI. (2016).** in vitro study of antileishmanial effect of *Portulaca oleracea* extract. *J Vector Borne Dis*, [362–369].
- **VERMA S., SINGH R., SHARMA V., AVTAR BUMB R., SINGH NEGI N., V RAMESH. ET SALOTRA P. (2017).** Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of *Leishmania* infection. *BMC Infectious Diseases*, 17:223.
- **VILAPLANA C., BLANCO S., DOMINGUEZ J., GIMENEZ M. ET AUSINA V. (2004).** Noninvasive Method for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by a Latex Agglutination Test for Detection of Antigens in Urine Samples. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 42, No. 4, [1853–1854].
- **VLKOVA M., IVA ROHOUSOVA., JAN DRAHOTA., DOROTHEE STANNECK., EVA MARIA KRUEDEWAGEN., MENCKE N., OTRANTO D. ET VOLF P. (2011).** Canine Antibody Response to *Phlebotomus perniciosus* Bites Negatively Correlates with the Risk of *Leishmania infantum* Transmission. *Plos Neglected Tropical Disease*, Volume 5 | Issue 10 | e1344.
- **VULPIANI MP., IANNETTI L., PAGANICO D., IANNINO F. ET AND FERRI N. (2011).** Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. *Vet Med Int*, 2011: 215964.
- **WERNECK GL. (2014).** Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica*, 48(5), [851–856].
- **WHO. (2011).** La lutte contre la leishmaniose. In *Organisation Mondiale de la Santé*.
- **WHO. (2014).** Manuel pour la prise en charge de la leishmaniose cutanée dans la région OMS de la Méditerranée orientale.
- **WHO. (2017).** Leishmaniasis and HIV coinfection.
- **YAHIAOUI M., HADOUN H., TOUMERT I. ET HASSANI A. (2015).** Determination of kinetic parameters of *Phlomis bovei* de Noé using thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 196, [441-7].
- **YALÇINA FN., ERSÖZA T., BEDIRB E., DÖNMEZC AA., STAVRID M., ZLOHE M., GIBBONS S. ET CALIŞ I. (2006).** Amanicadol, a Pimarane-type Diterpene from *Phlomis amanica* Vierch. *A Journal of Chemical Sciences*, volume 61 issue 11, [1433 – 1436].
- **YATAWARA L., THANH HOA LE., WICKRAMASINGHE S. ET AGATSUMA T. (2008).** Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of

Références bibliographiques

Leishmania major: Gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. Elsevier B.V, 424, [80–86].

- **YUAN M, VÁSQUEZ-VALDIVIESO MG, MCNAE I, MICHELS PAM, FOTHERGILL-GILMORE LA ET WALKINSHAW MD.(2017).** Structures of *Leishmania* Fructose-1,6-bisphosphatase Reveal Species-Specific Differences in the Mechanism of Allosteric Inhibition. *J Mol Biol*, S0022-2836(17) 30416-3.
- **ZAIT H., FERHANI Y., ACHIR I. ET HAMRIOUI B (2012).** Study of 71 cases of visceral leishmaniasis diagnosed at the Mustapha University Hospital (Algiers) from 1998 to 2009. *Médecine et maladies infectieuses* **42**, [119–125].
- **ZOGRAFIDIS A. (2016).** Two new infraspecific taxa of *Verbascum delphicum* (*Scrophulariaceae*, *Scrophularieae*) from mainland Greece and the island of Evvia. *PhytoKeys*, (74), [107-122].
- Guide illustré de la flore Algérienne. [En ligne]. <http://www.wilaya.alger.dz/Guide%20illustr%C3%A9%20de%20la%20flore%20alg%C3%A9rienne%20.pdf>.
- Molène - Fleurs du Roussillon. [En ligne]. <http://jeantosti.com/Fleurs/molene.htm>.
- *Verbascum sinuatum* - Tela Botanica. [En ligne]. <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-70972-synthese>.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Classification du genre *Leishmania* et les formes cliniques associées (Carré et al., 2010)

Ancien Monde	Nouveau Monde	
Sous-genre <i>Leishmania</i>	Sous genre <i>Leishmania</i>	Sous genre <i>viannia</i>
<p>Complexe <i>L.donovani</i> (LV)</p> <p><i>-L.donovani</i></p> <p><i>-L.infantum</i></p> <p><i>-L.archinbadi</i></p> <p>Complexe <i>L.major</i> (LC)</p> <p>Complexe <i>L.tropica</i> (LC)</p> <p><i>L.aethiopica</i> (LC)</p>	<p>Complexe <i>L .donovani</i>(LV)</p> <p><i>-L.chagasi</i></p> <p>Complexe <i>L.mexicana</i>(LC)</p> <p><i>-L.mexicana</i></p> <p><i>-L.venezuelensis</i></p> <p><i>-L.amazonesis</i></p>	<p>Complexe <i>L.braziliensis</i> (LCM)</p> <p><i>-L.braziliensis</i></p> <p><i>-L.peruviana</i></p> <p>Complexe <i>L.guyanensis</i> (LCM)</p> <p><i>-L.guyanensis</i></p> <p><i>-L.panamensis</i></p>

Annexes

Annexe2 : Classification des principales espèces incriminées dans la transmission des leishmanioses dans le Nouveau Monde (Ripert, 2007).

Genre	Sous genre	Principale espèces incriminées	Leishmaniose transmises
<i>Phlebotomus</i>	Phlebotomus	<i>papatasi, duboscqi</i>	<i>major</i>
	Paraphlebotomus	<i>Sergenti</i>	<i>tropica</i>
		<i>alexandri</i>	<i>donovani</i>
		<i>causicus, (alexandri)</i>	<i>major</i>
	Symphlebotomus	<i>Martini</i>	<i>donovani</i>
		<i>guggisbergi</i>	<i>tropica</i>
		<i>ansarii</i>	<i>major</i>
Larrousius	<i>ariasi, langeroni, neglectus,</i>	<i>infantum</i>	
	<i>perfiliewi, perniciosus, tobbi</i> <i>longipes, pedifer</i>	<i>aethiopica</i>	
Adlerius	<i>chinensis</i>	<i>infantum</i>	
Euphlebotomus	<i>argentipes</i>	<i>donovani</i>	

Annexes

Annexe3 : Classification des principales espèces incriminées dans la transmission des leishmanioses dans le Nouveau Monde (Ripert, 2007).

Genre	Sous genre	Principale espèces incriminées	Leishmaniose transmise
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>longipalpis</i>	<i>infantum(=chagasi)</i>
		<i>diabolica</i>	<i>mexicana</i>
	<i>Nyssomyia</i>	<i>olmeca olmeca</i>	<i>mexicana</i>
		<i>flaviscutellata</i>	<i>amazonensis</i>
		<i>olmeca bicolor</i>	<i>venezuelensis</i>
		<i>intermedia</i>	<i>braziliensis</i>
<i>umbratilis, anduzei, whitmani</i>		<i>guyanensis</i>	
<i>Psychodopygus</i>		<i>trapidoi</i>	<i>panamensis</i>
		<i>wellcomei</i>	<i>brasiliensis</i>
		<i>panamensis</i>	<i>panamensis</i>
		<i>Peruensis</i>	<i>peruviana</i>
	<i>Pintomyia</i>	<i>Pessoai</i>	<i>brasiliensis</i>

Annexe 4 : Eau physiologique à 0,9% stérile.

9g de NaCl dissoute dans 1000ml d'eau distillée

Annexe5 : Citrate à 10 % stérile

Le citrate à 10% est préparé par l'addition à froid de 10g de citrate en poudre dans 100ml d'eau distillée. La solution prête est aliquotée dans des tubes en verres et subit une stérilisation à l'autoclave.

Annexe 6 : composition de la gélose NNN

Agar-agar : 5g ;

Chlorure de sodium : 3g ;

Eau distillée : 500 ml.

Annexe 7 : comptage sur cellule de Mallassez

1-Présentation de la cellule de Malassez

La cellule de numération Malassez est une lame porte objet dans laquelle est creusé une chambre de comptage d'un volume connu. C'est une lame en verre épaisse, comportant des rigoles et un quadrillage. Le volume de comptage est déterminé par la surface de quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre.

2- principe de la numération cellulaire des parasites sue cellule de Mallassez

La numération cellulaire est la détermination du nombre de parasite contenus dans un volume précis de milieu liquide. Le résultat est exprimé en concentration cellulaire(le nombre de parasite par carreaux de la cellule).

3-Technique de numération cellulaire

Dilution préalable

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

Remplissage de la cellule de Mallassez

Le remplissage de la cellule de Mallessez commence d'abord par l'humidification des glissières latérales sur lesquels va reposer une lamelle 22 x22mm, suivie de l'adhéressions de la lamelle aux plateaux par exerçassions d'une légère pression ainsi qu'un mouvement de va et vient jusqu'à percevoir une résistance et créer un effet de ventouse.

Après dépôt de la cellule de comptage sur une surface plane, la solution parasitaire est homogénéisé puis aspiré à l'aide d'une micropipette avec laquelle on remplit la chambre de comptage une seule fois, en gardant la pointe de l'embout inclinée près de la lamelle, tout en

Annexes

évitant de former des bulles d'aires et sans faire déborder le liquide dans les rigoles pour ne pas fausser le comptage des parasites.

Une fois la goutte est diffusée sur toute la surface de la plate-forme centrale du quadrillage, on laisse le liquide se sédimenter quelques secondes avant de procéder à la numération au microscope.

La cellule de numération est lavée puis séchée après chaque utilisation.

Numération

- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage et la vérification de l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (recommencer si la répartition est mauvaise). Ensuite passer à l'objectif x40 pour réaliser le comptage.
- Compter les cellules contenues dans 10 des 100 rectangles du quadrillage.

Calcul de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire de la suspension parasitaire est calculée comme suit :

$$[(N) \text{ nombre de parasites}/10] \times (1/\text{dilution}) \times 10^5 \text{ cellules/ml}$$

Annexe 8 :



Formes promastigotes du *Leishmania infantum* observées au Gx40 (Laboratoire LABAB UMMTO).

Annexe 9 : Fangizone à 10% est la molécule classique conventionnelle de l'AmB.

Le traitement mis à notre disposition est administrable par voie orale, il à été dilué dans de l'eau physiologique pour une concentration final de 100mg/ml.

Résumé

Les leishmanioses sont des parasitoses qui constituent un réel problème de santé publique qui touche principalement les pays en développement. Elles sont causées par des protozoaires du genre *leishmania* qui infectent de nombreuses espèces mammifères, dont l'homme auxquels elles sont transmises par la pique infestante d'un phlébotome femelle manifestant divers syndromes cliniques, cutanée, mucocutanée et viscérale.

Les traitements actuellement disponible pour cette maladie sont couteux, toxiques, induisent des effets secondaires potentiellement mortelles et présentent des échecs en raison de l'apparition de résistances des souches vis-à-vis de ces molécules, ce qui a limité leur utilisation. Par conséquent, la validation scientifique des ressources médicinales traditionnelles pourrait conduire à de nouvelles approches pour la lutte contre la leishmaniose.

Dans la présente étude nous nous sommes concentré sur l'extraits aqueux de feuilles de *Verbascum sinuatum* et *Phlomis bovei*, afin d'évaluer leur potentiel d'activité *in vitro* contre *L.infantum* MHOM qui est la principale espèce responsable de la leishmaniose viscérale. Les résultats de cette étude on montré que les deux extraits végétales à leur concentration maximales possède une activité antileishmanial très importante avec un pourcentage de mortalité atteignant les 100%.

Mot clé : Leishmaniose, traitements, activité leishmanicide, *L.infantum*, *V.sinuatum*, *P. bovei* de Noé.

Abstract

Leishmaniasis is parasitoses that constitute a real public health problem, affecting mainly the developing countries. They are caused by a *Leishmania* protozoan that infects many species of mammals, including man. The transmission is caused by a female phlebotomus' bite which results various clinical, cutaneous, mucocutaneous and visceral syndromes.

The treatments for leishmaniasis actually available, are costly, toxic, inefficient, have potentially lethal secondary effects and presents chess due to the appearance of resistance to this molecules, which has limited their uses. As a consequence, the scientific validation of the traditional medical resources could lead to new approaches to control this protozoan.

In the present study we have been concentrated on the aqueous extract of leaves of *Verbascum sinuatum* and *Phlomis bovei* in order to evaluate their potential activity *in vitro* against *L.infantum* MHOM which is principally responsible of visceral leishmaniasis.

The results of this study have showed that the two plants' extracts at their maximum concentration possess a very important antileishmanial activity that attends 100% of mortality.

Key words: Lesihmaniasis, antileishmanial activity, , *L.infantum*, *V.sinuatum*, *P. bovei* de Noé.