



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Etude *in vitro* de l'activité antileishmanienne
des extraits de plantes
originaires du Maroc**

Présenté par :
Mlle SALAMA Najoua

Encadré par :
Pr. BEKHTI Khadija

Soutenu le 23 Juin 2015 devant le jury composé de:

Pr. BEKHTI Khadija	FST-FES	Encadrant
Pr. FARAH Abdellah	INPMA-Tounate	Examineur
Pr. Lotfi Aarab	FST-FES	Examineur
Pr. Saad Rachiq	FST-FES	Examineur

Année Universitaire : 2014-2015



Résumé

La leishmaniose est une maladie complexe avec un large spectre de présentations cliniques. Dans la présente étude nous avons évalué l'effet antileishmanien de *Trigonella foenum graecum*, *Plectranthus aromaticus* et de *Rosmarinus officinalis* contre *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum* et *Leishmania major*, en utilisant un modèle *in vitro*.

Quatre extraits sont testés : deux sont obtenus à partir du *Rosmarinus officinalis* (M.A.R.O1 et R), un troisième est obtenu à partir du *Plectranthus aromaticus* et le quatrième provient de *Trigonella foenum graecum*. La préparation des différentes dilutions est faite dans du DMSO 0,1% et dans du RPMI. L'évaluation de l'activité leishmanicide a été réalisée par le test colorimétrique à la MTT.

Les résultats ont révélé que (i) *Trigonella foenum graecum* a montré une très bonne activité leishmanicide vis-à-vis des trois espèces cibles et cela quelque soit le milieu de dilution.

(ii) que *Rosmarinus officinalis* (MARO1) a montré une très bonne activité leishmanicide vis-à-vis de *L.tropica* et une activité moyenne vis-à-vis de *L.infantum* et *L.major* lorsque la dilution est faite dans du DMSO, alors que cette activité est faible quand la dilution est faite dans du RPMI, que (iii) *Rosmarinus officinalis* (R) n'a montré aucune activité leishmanicide sur les trois espèces et cela quelque soit le milieu de dilution et enfin (iv) *Plectranthus aromaticus* a montré une bonne activité avec les deux milieux de dilution vis-à-vis de *L.infantum* et *L.major* et aucune activité vis-à-vis de *L.tropica* et cela quelque soit le milieu de dilution.

Ces résultats prometteurs nous encouragent de sélectionner ces plantes et de les étudier en étant des plantes à potentiel leishmanicide par des études chimiques, pharmacologiques approfondies afin de caractériser les molécules naturelles responsables de cette activité.

Mots clés : Leishmaniose, Activité leishmanicide, *Trigonella foenum graecum*, *Rosmarinus officinalis*, *Plectranthus aromaticus*



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

✉ B.P. 2202 – Route d’Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

Introduction

La deuxième cause de mortalité parasitaire après le paludisme et la leishmaniose. Selon l'OMS, plus de 88 pays dont le Maroc sont touchés par cette infection et 350 millions de personnes sont exposées au risque d'infection à *Leishmania*. L'incidence annuelle de la leishmaniose selon les données de l'OMS se situe à environ deux millions de cas se répartissant entre 1 à 1,5 millions cas de leishmaniose cutanée (LC) et 500 000 cas de leishmaniose viscérale (LV).

*La LV en absence de traitement est mortelle, le parasite se développe dans les cellules histiomonocytaires du foie et de la rate ce qui provoque des poussées de fièvre irrégulières, une hépatosplénomégalie et une anémie (**Grünfeld, 1998**).

*La LC est une entité nosoclinique qui inclue des formes cutanées localisées (LCL), des formes cutanées diffuses (LCD) et des formes cutanéomuqueuses (LCM) mutilantes et défigurantes. Le parasite responsable de la LC se développe dans les macrophages du derme et donne des ulcérations dont la forme, la taille et la profondeur diffèrent selon l'espèce incriminée (**Grünfeld, 1998**).

Les médicaments prescrits en première intention en cas de leishmaniose sont limités aux sels d'antimoine pentavalents (SbV) dont l'antimoniote de N-méthyl glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) (**Escobel, 1917 ; Berman, 1997 ; Herwaldt BL, 1999**). Cependant ces produits en plus d'être contre indiqués en cas de, myocardite (**Matoussi et al, 2007**), néphrite (**Zaghloul et al, 2004**) pancréatite (**Shahian et al, 2009**), pneumonie, grossesse et allaitement, ils peuvent générer d'importants effets secondaires (**Sand, 1985 ; Dedet, 1999**) ainsi que des formes de résistance (**Falcofe et al, 1993 ; Sundar et al, 2000 ; Rapp et al, 2003 ; Alvar et al, 2006**). Les médicaments utilisés en second intention sont un antimycosique l'amphotéricine B (**Rapp et al, 2003**), un trypanocide le pentamidine (Pentacarinat®) et un anticancéreux le miltéfosine (Impavido®) (**Croft et al, 1987**). Ces produits en dépit de leur coût excessif, auraient des effets secondaires néfastes. En effet l'amphotéricine B est néphrotoxique (**Deray et al, 2002**), le pentamidine serait un hypoglycémiant (**Bouchard et al, 1982**) et le miltéfosine s'avère tératogène (**Dorlo et al, 2012**).

C'est dans ce contexte de toxicité et de résistance dans le traitement de la leishmaniose que l'OMS (2010) a recommandé le développement de nouveaux produits moins toxiques et facilement accessible.

Le retour vers la nature en s'appuyant sur des bases scientifiques peut constituer une source non négligeable pour la découverte de nouvelles molécules bioactives à effet leishmanicide. Une des matières premières naturelles, sont les plantes médicinales, facilement disponibles et largement utilisées en médecine traditionnelle.

Ce présent travail s'inscrit dans cette thématique de recherche, l'objectif vise à étudier l'effet d'extraits de certaines plantes médicinales d'origine Marocaine sur la forme promastigote des leishmanies entretenues *in vitro*.

Pour se faire, Quatre extraits sont testés: deux sont obtenus à partir du *Rosmarinus officinalis* (M.A.R.O1 et R), un troisième est obtenu à partir du *Plectranthus aromaticus* et le quatrième provient de *Trigonella foenum graecum* et ils sont testés sur les trois espèces circulantes dans le territoire Marocain à savoir *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum*.

Dans ce rapport, trois volets vont être développés

- Le premier consiste dans l'élaboration d'une synthèse bibliographique sur la leishmaniose et les acteurs de son implantation, le traitement actuelle et l'état d'avancement de la recherche en matière de traitement de la leishmaniose avec les plantes médicinales.
- Le deuxième volet est une exposition du matériel d'étude et les techniques d'études
- la troisième partie sera consacrée à l'exploitation des résultats.
- la quatrième partie va être consacrée à la discussion des résultats.

Chapitre I. Leishmaniose

Leishmaniose est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme faisant partie des maladies parasitaires majeures mortelles (dengue, trypanosomiase, paludisme) répandus dans le monde. Elle fait parti des maladies émergentes et opportunistes au cours de l'infection à VIH. La leishmaniose est due au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaires *trypanosomatidaie* (**Adler et al, 1926**) du genre *Leishmania*.

Ces parasites obligatoires affectent de nombreuses espèces de mammifères (**Adler et al, 1929**), et dont la transmission est assurée par la piqûre d'un insecte diptère hématophage du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde (**Osman et al, 2000**)

1. Historique

Les premières descriptions cliniques de la leishmaniose concernent la forme tégumentaire d'Amérique latine et ils datent de l'invasion espagnole du XVIème siècle. Cependant, bien avant cela, pendant la période pré-Inca, des visages présentent des mutilations faciales probablement dues à des leishmanioses cutanéomuqueuses étaient déjà représentés sur des figurines provenant du Pérou et de l'Equateur (**Hide, 2004**).

En 1898, Borowsky décrit pour la première fois l'agent étiologique de la leishmaniose cutanée de l'ancien monde.

En 1901, Sir William Leishman observa des petites cellules de 2-3µm dans le foie d'un soldat atteint de leishmaniose viscérale.

En 1903 Sir Charles Donovan et Ronald Ross confirment la découverte de la Leishmaniose en montrant l'existence des formes amastigotes dans un extrait de foie d'un patient souffrant de fièvre et de splénomégalie et créent le genre *leishmania* (**Ross1903**) et l'espèce *Leishmania donovani*.

En 1921 les frères Sargent démontrent le rôle vecteur des phlébotomes en réussissant la transmission du « bouton d'Orient » par application du broyat de ces insectes sur des scarifications cutanées (**Sergent et al, 1921**).

L'évolution de *Leishmania* considérée alors comme étant *L.tropica* fut étudiée simultanément en Algérie (**Sergent et al, 1926**) et en Palestine. (**Adler et al, 1925**).

En 1941 **Adler et Ber, 1941** prouvent ce mode de transmission et **Latyshev et Krujukova** attirent l'attention sur le rôle des rongeurs en tant que réservoirs sauvages des leishmanioses.

Depuis ces découvertes, les connaissances sur la leishmaniose n'ont cessé de s'accroître, le cycle de vie parasite est élucidé ainsi que sa dynamique.

2. Formes cliniques chez l'homme

Deux manifestations symptomatiques peuvent être décrites (**Grünfeld, 1998**) une présente la forme de leishmaniose viscérale (LV) qui touche le foie et la rate et l'autre regroupe les formes tégumentaires où le parasite reste localisé au niveau de la peau et/ou la peau et les muqueuses selon l'espèce en cause et engendre soit une forme de leishmaniose cutanée (LC) ou une forme Leishmaniose cutanée diffuse (LCD) ou une forme de leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM).

2.1 Leishmaniose viscérale

La LV représente la forme la plus grave, mortelle en absence de traitement. Lors de la piqûre par l'insecte vecteur, les parasites migrent via le système sanguin et lymphatique vers les organes lymphoïdes (rate et moelle osseuse) et le foie et ils engendrent une hépatosplénomégalie (Figure 1) accompagnée de la fièvre et de l'anémie.

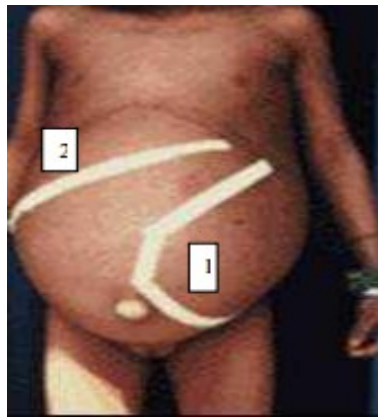


Figure 1. Enfant atteint par la Leishmaniose viscérale

1 : inflammation de la rate ; 2 : inflammation du foie (**Banuls, 2007**)

2.2 Leishmaniose cutanée

La LC provoque des lésions cutanées localisées au site de piqûre par l'insecte, une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme conduit à une ulcération. Ces ulcères sont généralement circulaires avec des bords bien délimités ayant une couleur violacée (Figure 2), ils se recouvrent d'une mince croûte et évoluent vers une forme humide ou sèche selon les espèces. Ces lésions sont généralement indolores mais laissent après guérison de profondes cicatrices non pigmentées (**Grevelink, 1997**).



Figure 2. Lésion sèche d'une leishmaniose cutanée

2.3 Leishmaniose cutanée diffuse

La LCD est une forme qui ne guérit pas spontanément, même après un traitement. Elle est caractérisée par la dissémination de lésions nodulaires, qui sont riches en parasites et qui forment de large plaques infiltrées (Figure 3).



Figure 3. Lésion d'une leishmaniose cutanée diffuse

2.4 Leishmaniose cutanéomuqueuse

L'infection évolue en deux temps avec apparition d'ulcères cutanés totalement identiques à ceux présentés lors d'une LC qui fini par cicatriser entre 6 mois et 1 an mais elle est suivie ou concomitante d'une seconde infection de la muqueuse nasale. La LCM pourra conduire à une destruction partielle ou étendue des muqueuses du nez, de la bouche ou de la gorge (Figure 4). Ces lésions nécrosées pourront donc être surinfectées par des affections bactériennes pouvant engendrer de grandes difformités faciales (**Banuls, 2007**).



Figure 4. Lésion d'une leishmaniose cutanéomuqueuse

3. Dynamique du cycle parasitaire

3.1 Germe parasitaire

3.1.1 Classification

Les leishmanies sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des *kinétoplastida* et à la famille des *trypanosomatidaie* (Tableau 1)

Tableau 1. Classification du genre *Leishmania* (Levine *et al*, 1980).

Règne	<i>Protista</i>	(Haeckel, 1866)
Sous-règne	<i>Protozoa</i>	(Goldfus, 1817 ; Siebold, 1848)
Embranchement	<i>Sarcomastigopohora</i>	(Honieberg et Balamuth, 1963)
Sous-embranchement	<i>Mastigophora</i>	(Diesing, 1866)
Classe	<i>Zoomastigophorea</i>	(Calkins, 1909)
Ordre	<i>Kinétoplastida</i>	(Vickerman, 1976)
Sous-ordre	<i>Trypanosomatina</i>	(Kent, 1880)
Famille	<i>Trypanosomatidae</i>	(Doflein, 1901 ; Grobben, 1905)
Genre	<i>Leishmania</i>	(Ross, 1903)

Les espèces au sein du genre *Leishmania* sont morphologiquement identiques leur classification a constamment évolué depuis la découverte de ces parasites. Les premières classifications sont basées sur les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la maladie ; actuellement et avec les nouvelles technologies d'identification, les espèces sont classés selon leurs caractéristiques biochimiques et moléculaires. Cependant une classification définitive n'est pas encore établie, elle fait encore l'objet de controverse en raison de différents facteurs, notamment la présence d'hybrides (Belli *et al*, 1994).

3.1.2 Morphologie parasitaire

Les leishmanies sont des protozoaires avec un appareil de Golgi, un flagelle, une poche flagellaire et un organite « le kinétoplaste » située à la base du flagelle et composé d'ADN kinétoplastique (kDNA) (Figure 5).

La membrane plasmique est composée de glycolipides, des protéines membranaires et des glycoinositol-phospholipides (McConville, 1992).

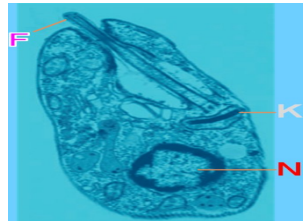


Figure 5. Organisation cellulaire de *Leishmania*

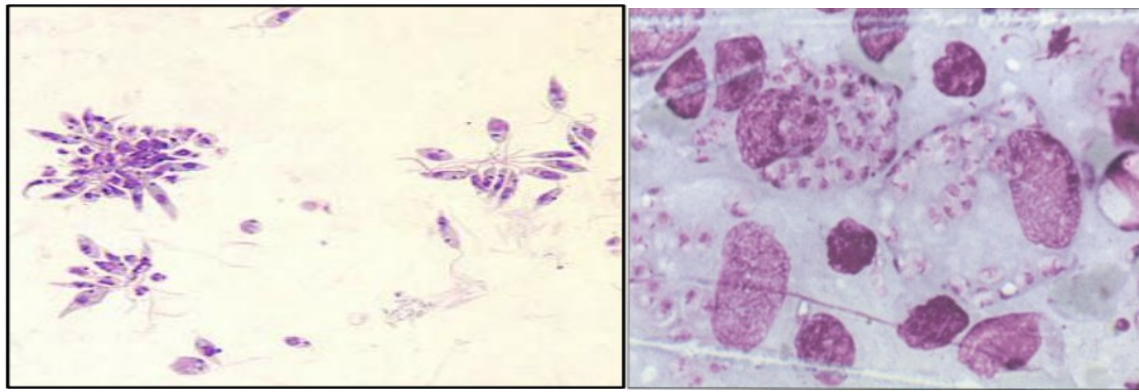
F : flagelle, K : kinétoplaste, N : noyau

❖ Dimorphisme des leishmanies

Les *leishmanies* passent par 2 formes de développement (Figure 6) caractérisant l'hôte dans lequel elles évoluent :

***La forme promastigote** (figure 6.A), extracellulaire retrouvée dans le tractus digestif du vecteur et en culture *in vitro*. Il s'agit d'un organisme allongé, d'environ 10 à 25µm de longueur, le noyau est approximativement central, le kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure. Cette forme se développe par scissiparité dans l'intestin moyen du phlébotome puis migre jusqu'au pharynx. La durée de cette phase varie de 14 à 18 jours. Le parasite est régurgité par l'insecte au moment de son repas sanguin.

***La forme amastigote** (figure 6.B), intracellulaire est présente au niveau des cellules du système des phagocytes mononucléés (SPM) de la peau ou de divers organes (cellules de la rate, la moelle osseuse, cellules de Küpffer, cellules du tractus digestif...). Elle est immobile, de forme ovoïde de 3-5µm, possède un noyau, un flagelle réduit interne et un kinétoplaste.



A

B

Figure 6. Dimorphisme cellulaire de *Leishmania*.

A : forme promastigote de *Leishmania* vue au microscope optique (Gx100) à partir d'une culture réalisée à l'INH; **B: forme amastigote** intramacrophagique des *Leishmania* Grx400) (Belhadj, 2004)

3.2. Transmission parasitaire

3.2.1. Vecteur de transmission

Dans l'ancien monde les vecteurs de la leishmaniose appartiennent au genre *Phlébotomus* des insectes diptères nématocères dont seule la femelle est hématoophage (Figure 7). Ces insectes sont de petite taille (2 à 5 mm de long), de couleur pâle, des anthropophiles, leur vol est silencieux et leur activité est nocturne.

La sous-famille des *Phlebotominae* comptent actuellement 800 espèces décrites, dont 70 sont potentiellement capable de transmettre le parasite.

La relation entre l'espèce vecteur et l'espèce leishmania est étroite (Sacks, 2001).



Figure7. Phlébotome femelle gorgée de sang (DELM, 2010)

3.2.2. Cycle parasitaire

Lors d'un repas sanguin du vecteur infecté les parasites promastigotes métacycliques sont déposés par la salive et se trouvent phagocytés par les macrophages. Une vacuole parasitophore se forme, les lysosomes fusionnent à la vacuole et forment un phagolysosome secondaire. Cependant le revêtement de phosphoglycane et la présence à la surface du parasite des phosphatases acides neutralisent l'activité oxydative des macrophages et le parasite se multiplie à l'intérieur du phagolysosome.

Selon les espèces et leurs facteurs de virulence l'infestation peut être tégumentaire ou viscérale et selon l'Hôte la transmission peut être symptomatique ou asymptomatique chez l'Hôte réservoir.

Le cycle de vie (Figure 8) recommence quand le vecteur prend son repas sanguin chez l'Hôte infecté. Les macrophages infestés sont ensuite réabsorbés par un autre phlébotome lors d'un repas sanguin.

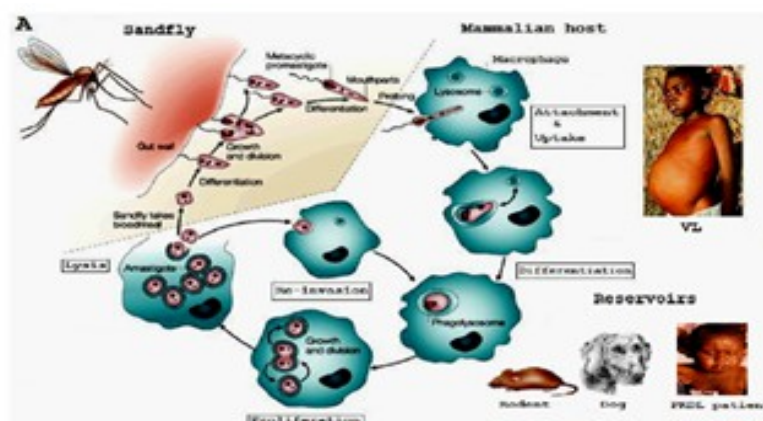


Figure 8. Cycle de développement du parasite *Leishmania* (Sacks et al, 2002)

3.2.3. Evolution en foyer leishmanien

La circulation des parasites s'effectue dans un environnement défini comportant des mammifères réservoirs (y compris l'homme) et des vecteurs ayant chacun leur propre écologie. Trois types de foyers sont distingués: foyer primaire: dans lequel, des animaux sauvages (rongeurs, renards) peuvent constituer des réservoirs de base. Dans ce cas on parle de zoonose (Tayouss, 1995); foyers secondaire où le chien intervient comme principal réservoir du parasite, on parle alors de zoonothronose (Tayouss, 1995), foyer tertiaire où l'Homme est le réservoir.

4. Répartition géographique

4.1. Leishmaniose dans le monde

La leishmaniose est présente dans tous les continents à part l'Océanie (Figure 9). 90% des cas de LC se trouvent concentrés en Iran, Afghanistan, Syrie, Arabie saoudite, Brésil et le Pérou et plus de 90% des cas de LV sont quant à elles présentes dans 5 pays : l'Inde, le Bangladesh, le Soudan, le Népal et le Brésil (OMS, 2010).

Selon les estimations de l'OMS 2013, de 200 000 à 400 000 nouveaux cas de LV surviennent chaque année alors qu'il y aurait dans le monde entre 700 000 et 1.3 millions de nouveaux cas de Leishmaniose cutanée (LC).



Figure 9. Répartition géographique de la leishmaniose dans le monde (Anofel, 2007)

4.2. Leishmaniose au Maroc

Au Maroc, la leishmaniose se divise en trois entités nosocliniques: deux formes cutanées une humide et l'autre sèche dues respectivement à *L. major* et *L. tropica* et une forme viscérale provoquée par *L. infantum* (Rami, 2003). Ce sont des maladies à déclaration obligatoire (arrêté ministériel n° 683-95 du 31 mars 1995). *L. major* se trouve dans les régions sahariennes, *L. tropica* est localisée dans les zones semi-arides et *L. infantum* est située dans le nord, les régions centrales et subhumides (Rhajaoui, 2011).

❖ Leishmaniose cutanée à *L. major*

La maladie sévit à l'état endémique dans les hauts plateaux orientaux (**Rami, 2003**) c'est-à-dire dans les zones présahariennes, allant du sud de l'Anti-Atlas et du Haut Atlas jusqu'à Figuig, incluant les plaines d'Ouarzazate, la vallée du Draa, le Tafilalet, Alnif et la région de Boudnib (**Rhajaoui, 2011**). A partir de l'année 1977, la maladie a pris un caractère épidémique avec plusieurs milliers de cas enregistrés dans la province de Tata (**Rami, 2003**). La maladie est relativement bénigne mais l'augmentation du nombre de cas au cours de ces dernières années est inquiétant (**Lasri, 2009 ; Rhajaoui, 2011**)

❖ Leishmaniose cutanée à *L. tropica*

Cette forme de leishmaniose sévit dans les zones semi-arides du pays allant de la région de l'Ouest aux plateaux péri-Rifain de Taza à l'Est en passant par le versant Ouest de la chaîne de l'Atlas touchant le centre du pays, dans les régions de Marrakech, Béni Mellal, Meknès, Fès, et le Nord du pays. Un foyer de LC à *L. tropica* a été localisé pour la première fois en 1989 (**Marty et al, 1989**) à Tanant dans la région d'Azilal chez une fillette marocaine en déplacement à Nice. Récemment, le Maroc a connu l'émergence de plusieurs nouveaux foyers dans le nord à Taza (**Guessouss-Idrissi et al, 1997**), à Zouagha My Yacoub (**Rhajaoui et al, 2004**), à Sefrou (**Hmamouch et al, 2014**) et à Boulemane (**Rhajaoui et al, 2007**). D'autres foyers, ont été identifiés à Chichaoua (**Guernaoui et al, 2005 ; Guernaoui, 2006**). *L. tropica* a été constaté dans certaines régions déjà connues pour la transmission de *L. major* (**Rhajaoui, 2009**). *L. tropica* à la plus grande répartition géographique, ceci peut être expliqué par son biotope commun à plusieurs régions du Maroc.

❖ Leishmaniose cutanée à *L. infantum*

Le premier cas marocain a été dépisté, dans le Rif central à Taounate. L'identification enzymatique du parasite a montré qu'il s'agit de *L. infantum* MON 24 (**Rhajaoui, 2009**). Des investigations moléculaires, réalisées en 2007, montrent l'existence de formes cutanées causées par *L. infantum*. La majorité de ces cas ont été enregistrés au niveau de la province de Sidi Kacem (**Rhajaoui, 2009**). Il s'agit de formes sporadiques montrant des lésions uniques, ulcérocrouteuses ou lipoïdes, évoluant pendant au moins deux ans (**Rhajaoui, 2009**). Le cycle de transmission de la LC à *L. infantum* reste inconnu et le chien est le seul réservoir connu.

• Leishmaniose viscérale à *L. infantum*

Due à *L. infantum*, la LV est répandue sur une vaste partie du territoire marocain et survient fréquemment pendant la saison chaude (**Lasri, 2009**). Elle se répartit géographiquement au Nord du pays, suivant un axe prolongé grossièrement les foyers de l'Algérie et de la Tunisie. Les foyers sont concentrés dans les étages bioclimatiques arides et semi-arides (**Lasri, 2009**).

Elle touche le Rif, le Moyen-Atlas, le versant septentrional du Haut-Atlas et l'Anti-Atlas (**Rami, 2003**). Les trois zones géographiques particulièrement exposées sont : la zone du Nord joignant le Rif à Ouazzane et s'étendant jusqu'à Nador (en passant par Tétouan et El Hoceima), l'axe joignant Oujda vers Taza et Khenifra et s'étendant à Fès et Meknès, et zone du Sud comprenant Ighrem, Tafilalet et Arfoud (en dessous du haut Atlas) (**Lasri, 2009**)

C'est une zoonose dont le chien est le principal réservoir. Deux espèces de phlébotomes (*P. ariasi* et *P. perniciosus*.) sont incriminées dans la transmission de *L. infantum*, qui est constitué de deux zymodèmes : MON-1, commun à l'homme et au chien, agent de la LV, et MON-24, zymodème dermatrope, responsable de cas sporadiques de leishmaniose cutanée humaine et canine (**Rami, 2003 ; Lasri, 2009**)

Chapitre II. Traitement de la leishmaniose

1. Traitement conventionnelle

1.1. Traitement de première intention

Les traitements de premières intentions font appel à des sels d'antimoine : le N-méthyl glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostan®) dont les teneurs en antimoine pentavalent sont respectivement de 8,5% et 10%, certains cas de résistance à ces traitements ont été notifiés (**Thakur, 2004 ; Janvier , 2008**).

1.2. Traitement de seconde intention

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'amphotéricine B (**Rapp et al, 2003**), ou de la pentamidine (**Soto-Mancipe et al, 1993**). Pour le moment, aucune résistance n'a été rapportée lors de leurs utilisations. L'amphotéricine B est un puissant antifongique capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux mais aussi capable de stimuler la production d'interleukine en agissant sur les récepteurs Toll-like (TLR) (**Sau et al, 2003**).

La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasitaire et se fixe sur l'ARN de transfert. Il semblerait que la cible de la pentamidine soit un composant de la mitochondrie (**Basselin et al, 2002**).

2. Traitement alternatif

2.1 . Inventaire des plantes utilisées contre la leishmaniose

Les travaux sur les substances naturelles dirigées contre la leishmaniose font régulièrement l'objet de revues (**Chan-Bacab et al, 2001 ; Brito et al, 2013**), plus de 101 plantes incluant 288 produits sont testés (**Rocha et al, 2005**).

Un screening des différentes familles botaniques qui ont été utilisées pour combattre la leishmaniose est effectué par Ramli (2013). Nous rapportons dans le tableau ci-dessous les familles de plantes, les espèces de plantes et les espèces de *leishmania* cible (Ramli, 2013).

Tableau 2. Inventaire des plantes utilisées pour les différentes espèce de *leishmania* (Ramli, 2013).

Famille	Espèce plante	Espèce <i>leishmania</i>
Agavaceae	<i>Yucca filamentosa</i> L	<i>L. amazonensis</i>
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> <i>Pistacia atlantica</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. major, L. infantum</i>
Annonaceae	<i>Annona glabra</i> L. <i>Annona muricata</i> L. <i>Annona aff. spraguei</i> Saff <i>Cardiopetalum calophyllum</i>	<i>L. amazonensis, L. braziliensis L. donovani, L. braziliensis</i> <i>L. panamensis, L. braziliensis</i> <i>L. infantum, L. panamensis, L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis L. donovani.</i>
Apiaceae	<i>Apium graveolens</i> L.	<i>L. amazonensis</i>
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i> L. <i>Alstonia scholaris</i> R. Br <i>Holarrhena curtisii</i> <i>Picralima nitida</i>	<i>L. major L. tropica</i> <i>L. donovani.</i> <i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i>
Araliaceae	<i>Hedera helix</i> L. <i>Oreopanax species</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>
Asclepiadaceae	<i>Gongronema latifolia</i> <i>Periploca graeca</i> L.	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i>
Asteraceae	<i>Artemisia herba- alba</i> <i>Pentacaliadesiderabilis</i> <i>s</i> <i>Anthemis stiparum</i> <i>Achyrocline flaccida</i> <i>Echinacea purpurea</i> Moench <i>Ophryosporus piquerioides</i> Benth	<i>L. major, L. tropica</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. mexicana mexicana, L. amazonensis, L. donovani</i> <i>L. braziliensis, L. donovani</i>
Bambusinae	<i>Bambusa vulgaris</i>	<i>L. chagasi</i>
Berberidaceae	<i>Berberis boliviana</i> Lechl	<i>L. amazonensis, L. braziliensis, L. donovani.</i>
Bignoniaceae	<i>Jacaranda copaia</i>	<i>L. mexicana amazonensis</i>
Caricaceae	<i>Crotalaria retusa</i>	<i>Leishmania sp</i>
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum lechleri</i>	<i>Leishmania sp</i>
Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliense</i>	<i>L. amazonensis</i>
Crassulaceae	<i>Bryophyllum pinnatum</i>	<i>L. amazonensis</i>
Dilleniaceae	<i>Doliocarpus</i>	<i>L. mexicana</i>
Euphorbiacées	<i>Crotalaria barbata</i>	<i>L. donovani</i>

Gentianaceae	<i>Swertia chirata</i> Buch.	<i>L. donovani</i>
Lamiaceae	<i>Salvia cilicica</i>	<i>Leishmania sp</i>
Lauraceae	<i>Cinnamum zeylanicum</i> Nees. <i>Allium sativum</i> L.	<i>L. major, L. tropica</i> <i>L. major</i>
Loranthaceae	<i>Piper hispidum</i>	<i>Leishmania sp</i>
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	<i>L. major</i>
Menispermaceae	<i>Abuta pahnii</i> Mart.	<i>L. amazonensis L. braziliensis</i>
Myrsinaceae	<i>Myrsine pellucida</i>	<i>L. braziliensis</i>
Myrtaceae	<i>Eucalyptus Sp</i>	<i>Leishmania sp</i>
Papaveraceae	<i>Bocconia integrifolia</i>	<i>L. amazonensis L. braziliensis L. donovani</i>
Piperaceae	<i>Peperomia galioides</i>	<i>L. amazonensis L. braziliensis L. chagasi L. donovani</i>
Punicaceae	<i>Punica granatum</i> L.	<i>L. amazonensis</i>
Rubiaceae	<i>Faramea guianensis</i>	<i>L. mexicana L. amazonensis</i>
Rutacées	<i>Galipea longiflora</i>	<i>L. braziliensis L. amazonensis L. donovani</i>
Scrophulariaceae	<i>Conohea scoparioides</i>	<i>L. amazonensis L. braziliensis</i>
Simaroubaceae	<i>Simarouba glauca</i>	<i>L. amazonensis</i>
Sterculiaceae	<i>Ampelocera edentula</i>	<i>Leishmania sp</i>
Verbenaceae	<i>Nyctanthes arbortristis</i>	<i>L. donovani</i>
Zingiberaceae	<i>Carica papaya</i> L.	<i>Leishmania sp</i>

2.2. Les plantes dont les substances sont en cours de développement

Trois produits à base d'extraits de plantes ayant montrés une activité significative mesurée sur plusieurs modèles d'animaux de leishmanioses cutanées et viscérales sont en phase trois de développement. Il s'agit de :

* la Licochalcone provenant des racines de plante de réglisse chinoise (**Chen et al, 1993**) le composé interférerait avec la fonction mitochondriale du parasite (**Zhai et al, 1995**), deux brevets sont déposés **US Patent 5985935 ; US Patent 6603046**.

* Un mélange de saponosides isolés de *Maesa balansea* (**Germonprez et al, 2005**) une plante médicinale asiatique, le brevet est déposé (**brevet WO 00/38700**)

* Des quinoléines , isolés de l'espèce *Galipea longiflora* plante médicinale de bolivie (**Fournet et al, 1994b, Munos et al, 1994**).Deux brevets sont déposés (**brevet français FR 9112174 et US Patent 5541196**).

2.3. Plantes pour le traitement traditionnelle de la leishmaniose au Maroc

Les substances d'origine végétale ont toujours constitué une source thérapeutique ancrée dans la culture de la population marocaine (**Bellekhdar, 1997 ; Orch et al, 2015**).

Cependant peu d'études ont été consacrées. Dans le cas du traitement traditionnel de la leishmaniose nous rapportons deux études.

*Une enquête ethnobotanique a été effectuée dans l'environnement des oasis de Tafilalet (Province d'Errachidia) touché par la leishmaniose cutanée par (El rhaffari et al, 2002). Les informations ont été collectées auprès des herboristes. Les données ont été vérifiées dans l'espace et le temps. Au total, 61 plantes appartiennent à 34 familles botaniques dont les *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Liliaceae*, *Cupressaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lythraceae*, *Ranunculaceae*, *Chenopodiaceae* et *Cucurbitaceae* sont les plus représentées. Les remèdes, en quasi totalité à usage externe, sont à 84% des préparations simples. Ils sont sous forme de liquides pour le rinçage (35%), poudre à pulvériser (11%), mixtures appliquées sur l'épiderme (50%) ou ingérées (4%). Les mixtures sont appliquées, entre autres, sous forme d'emplâtre-cataplasme, de liniment, onguent.

*Une étude in vitro utilisant l'extrait aqueux et l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* (*Asteraceae*) ont été éprouvés pour leur activité antileishmanienne vis-à-vis de la forme promastigote de *Leishmania tropica* et *Leishmania major*. L'huile essentielle a montré une importante activité vis-à-vis des deux souches à une concentration de 2 µg/ml. L'extrait aqueux a révélé une activité antileishmanienne à la concentration de 4 µg/ml (Hatimi et al,2000)

3. Monographie des plantes investiguées dans l'actuelle étude.

3.1. *Rosmarinus officinalis*

Espèce appartient à la famille des *Lamiaceae*. Originaire des régions méditerranéennes, se développe dans les zones tropicales et dans les zones tempérées, se caractérise par une forte odeur de terpène, elle est utilisée en médecine traditionnelle et en cuisine (Guenter , 1972-1974)

Description

Rosmarinus officinalis L. (figure10) (Iklil al jabal, lazir, aziir, ouzbir, aklel)

C'est un arbrisseau de 50 cm à 1 mètre de long, rameux, très feuillé, l'écorce s'écaille sur les branches les plus âgées, vert toute l'année



Figure10. *Rosmarinus officinalis*

Vertus thérapeutique

Le romarin aide à la digestion, traite les céphalées et les migraines, les blanchêtes, les coliques, améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs.

Il est utilisé en usage externe pour soigner les rhumatismes et les troubles circulatoires.

C'est un hypoglycémique (**Bnouham et al, 2002**), il soigne les affections oculaires et il est utilisé comme antiseptique, cholagogue, antispasmodique, vulnéraire et diurétique(**Koubissi, 2002**).

En outre, les feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont été utilisées comme remèdes pour les parasites intestinaux, les rhumatismes et les reins. Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) fait partie des plantes qui ont été largement étudiées pour leurs activités biologiques; anti-oxydante (**Malo et al, 2011 ; Lara et al, 2011**) antimicrobienne (**Jarrar et al, 2010 ; Celiktas et al, 2007**), anti-inflammatoire (**Benincá et al, 2011**), Antidépresseur (**Machado et al, 2009**), anticancéreuse (**Tai et al, 2012**), antiulcérogène (**Dias et al, 2000**), antinociceptive (**González-Trujano et al, 2007**), Hépatoprotecteur (**Amin et al, 2005**), antidiabétique (**Bakirel et al, 2008**) et spasmolytique (**Ventura-Martínez et al, 2011**)

3.2. *Plectranthus aromaticus*

Espèce appartient à la famille des *Lamiaceae*. La plante est originaire d'Inde.

Le genre *Plectranthus* est rencontré principalement en Afrique subsaharienne et à Madagascar, mais s'étend au Sud de la péninsule arabique, en Inde et, pour quelques espèces, en Malaisie, Indonésie, Australie et quelques îles du Pacifique (**Forster et al, 2002 ; Van Jaarsveld, 2006**).

Description

Plectranthus aromaticus (figure11) est une herbe semi-crassulescente. La tige est couverte de poils laineux avec des feuilles opposées, largement ovales, canées ou arrondies à la base charnue, brièvement acuminées ou arrondies au sommet, à bords crénelés, très odorantes, mesurant de 3 à 5 cm de large ; présence de 4 à 6 paires de nervures latérales proéminentes en dessous. Leurs fleurs sont blanchâtres avec une corolle à deux lèvres disposées autour de l'épi (**Adjanohoun et al, 1982 ; Faujour, 2002**). Les feuilles sont très fortement et agréablement aromatiques.



Figure11. *Plectranthus aromaticus*

Vertus médicinales

P. aromaticus fait partie de la pharmacopée traditionnelle. Les feuilles sont utilisées pour le traitement de la grippe, la toux et la bronchite (**Adjanohoun et al, 1982 ; Gurib-Fakim et al, 2001 ; Gurib-Fakim et al, 2004**) , en fumigation contre le paludisme (**Monjoin, 1981 ; Faujour, 2002 ; Kaou et al, 2008**),

3.3. *Trigonella foenum graecum*

L'espèce **Trigonella foenum graecum** (Helbah, Holbah) appartient à famille des *Fabaceae* (**Linuma .M et al, 1993**). La plante est d'origine méditerranéenne en Inde et le Yemen.

Description

Plante herbacée annuelle (figure12) (**Maletic et al, 2007**) feuilles simples ou composées, ordinairement alternes et stipulées, les fleurs sont du type 5 avec 2 verticilles d'étamines mais un seul carpelle qui donnera une gousse bivalve ou légume (figure12) (**Mekkiou et al, 2005 ; Hernandez,1996**) les graines de fenugrec contiennent: 96 mg de carotène, 0,34 mg de

thiamine, 0,29 mg rapophliphen, la vitamine C (**Chadha, 1976**), Sucre simple (glucose, saccharose, galactose), des protéines (l'albumine, la globuline et prolime), des acides aminés (2,33% de lysine et 1,14% d'acides aminés contenant du soufre (Méthionine + cystéine) (**Jamalian et al,1968**), des glycolipides et des phospholipides (**Hemavathy et al, 1989**). La graine contient une quantité élevée de minéraux (Ca, P, Fe, Zn et MA), il comprend la vitamine A, la vitamine du complexe B, des flavonoïdes, des saponines, trigonelline et d'autres alcaloïdes (**Longe, 2005**).



Figure 12. *Trigonella foenum graecum*

Vertus médicinales

Le fenugrec est la plante miracle vénérée par toutes les civilisations, largement utilisée et bien documentée (**Meghwal, 2012**); il est utilisé dans le traitement des plaies, diarrhées, acné, déshydratation, anémie, bronchite, rhumatismes, maux d'estomac, hypertension artérielle, constipation. Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement. Les graines ont des propriétés nutritives importantes et des effets hypocholestérolémiants, elles sont traditionnellement utilisées comme stimulant de l'appétit. Réduction du taux de cholestérol sérique chez les diabétiques (**Longe, 2005**). un puissant antioxydant (**Bukhari et al, 2008**), réduire la glycémie dans le diabète non insulino-dépendant (**Sampath et al, 2011**); réduire le taux de glucose dans le type insulino-dépendant (**Sharma et al, 1990**).

Ainsi que Le fenugrec a également été rapporté à présenter des propriétés pharmacologiques telles que d'avoir une activité antitumorale, antivirale, antimicrobienne, anti-inflammatoires (Cowan, 1999 ; Shetty, 1997)

Résultats

La recherche *in vitro* des extraits de plantes ayant une activité leishmaniacide vis-à-vis de différentes espèces du genre *Leishmania* est entièrement guidé par les résultats du test biologique basé sur l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale parasitaire qui permet la réduction du bromure de 3(4.5 diMéthylThiazol-2.5-diphényl Tétrazolium) en formazan dosable par spectrophotométrie, suite à la mort cellulaire l'activité des mitochondries disparaît et la potentialité de réduction des sels de tétrazolium avec.

Le Calcul de CI50 (concentration inhibitrice de 50% de la croissance parasitaire) après l'évaluation des pourcentages d'inhibition de croissance à différentes concentrations par le calcul de la tendance, va exprimer l'effet des extraits sur les leishmanies. La sensibilité des parasites vis-à-vis des extraits testés a été comparée par sa sensibilité par rapport au (Glucantime®).

Les résultats de la tendance calculé par le logiciel Excel de la série de dilutions 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 et 1.5625µg/ml dans deux diluants différents (DMSO 0,1% et RPMI) des trois extraits en poudres (*Plectranthus aromaticus*, *Rosmarinus officinalis* (R) , *Rosmarinus officinalis* (M.A.R.O1)) et de la série de dilutions V/V 80%, 40%, 20%, 10% , 5% , 2,5%, 1,25% et 0,625% dans deux diluants différents DMSO 0,1% et le RPMI, de l'extrait liquide *Trigonella foenum-graecum* sur *Leishmania tropica*, *L. infantum* et *L. major* sont donnés dans les figures (16,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38,39)

Conclusion et Perspectives

Les Leishmanioses représentent un problème de santé publique aux conséquences Socio-économiques graves. Cette maladie est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S), comme faisant partie des six maladies parasitaires majeures présentes dans le monde. La distribution de cette dernière de part le monde est vaste, l'émergence de nouveau foyer est en augmentation, les formes cliniques surtout viscérales peuvent être mortelle et pourtant c'est une maladie qui reste négligée.

Les traitements disponibles actuels sont des drogues anciennes, toxiques, coûteuses, des formes injectables nécessitant une surveillance médicale mais surtout peuvent se révéler sans effet car le parasite peut développer des résistances. La nécessité de trouver de nouvelles molécules leishmanicides reste une priorité de santé publique pour les pays du tiers monde où sévit cette maladie.

