جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

N° d'ordre 62 /2021

THESE DE DOCTORAT

dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah & l'Université de La Laguna- Îles Canaries

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias
Universidad de La Laguna

Présentée par

Mme : IKRAME ZEOUK

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie

Sujet de la thèse : Recherche des molécules bioactives naturelles à effets leishmanicide et staphylococcique et valorisation de leurs pouvoirs trypanocide et amoebicide.

Formation Doctorale : Sciences et Génie de la matière, de la Terre et de la Vie.

Thèse présentée et soutenue le lundi 26 juillet 2021 à 10h au Centre de conférences devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Lahsen EL GHADRAOUI	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Président
Belkheir HAMMOUTI	PES	Faculté des Sciences Oujda	Rapporteur
Saad IBNSOUDA KORAICHI	PES	Centre Universitaire D'Innovation de Fès	Rapporteur
Rodrigo MORCHON GARCIA	PES	Université de Salamanca Espagne	Rapporteur
Veronica PINO ESTEVEZ	PES	Université de la Laguna Espagne	Examinateur
Naima EL GHACHTOULI	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Examinateur
Khadija BEKHTI Jacob LORENZO-MORALES	PES PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès Université de la Laguna Espagne	Directeurs de thèse

Ignacio Antonio JIMENEZ	Université de la Laguna Iles Canaries	Invité
José ENRIQUE PINERO	Université de la Laguna Iles Canaries	Invité

Laboratoires d'accueil :
Biotechnologie Microbienne et Molécules Bioactives : Faculté des Sciences et Techniques de Fès
Laboratoire 11-12 : Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

Titre de la thèse : Recherche des molécules bioactives naturelles à effets leishmanicide et staphylococcique et valorisation de leurs pouvoirs trypanocide et amoebicide

Nom et prénom du candidat : Ikrame Zeouk
Spécialité : Biotechnologies

Résumé de la thèse

La recrudescence des germes résistants aux antimicrobiens constitue un problème majeur de santé publique. La recherche de nouvelles molécules bioactives est donc un enjeu crucial.

Dans ce contexte, des plantes supposées guérir les infections cutanées sont sélectionnées auprès des herboristes de la région Fès-Meknès. Les plantes retenues ont fait l'objet de fractionnements bioguidés pour identifier les composés actifs sur *Leishmania* spp. et *Staphylococcus aureus* fréquemment isolés dans ce type de pathologie dans la région d'étude.

64 espèces sont répertoriées, mais 15 plantes montrant un indice de fréquence de citation élevé et un apport bibliographique faible pour chaque germe cible sont évaluées quant à leurs propriétés antimicrobiennes. Le test qualitatif par macrodilution en milieu solide a révélé que l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* est le plus actif sur les souches de *S. aureus* alors que le test de microdilution a montré que l'extrait éthanolique d'*Inula viscosa* est le plus actif sur *Leishmania* spp..

Le fractionnement bioguidé et les analyses spectroscopiques et spectrométriques (RMN, EIMS et HREIMS) de l'extrait de *Rhamnus alaternus* a donné comme composés actifs **l'émodine** et **le kaempférol**. Toutefois l'émodine s'est avérée la plus active vis-à-vis des souches de staphylocoques avec des CMIs de 1,93 et 15,63 µg/ml et des valeurs de CC_{50}> 100 µg/ml témoignant la non-toxicité de ce composé.

Le fractionnement bioguidé de l'extrait d'*Inula viscosa* par de multiples étapes chromatographiques impliquant des colonnes sur gel de silice et de sephadex LH-20, des chromatographies centrifuges et préparatives a permis d'identifier à l'aide des techniques spectroscopiques et de corrélation (RMN, HMBC, HSQC et ROESY) huit composés dont quatre (**8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide** et **inuloxin A**, **sakuranétine** et **taxifoline**) se sont révélés les plus actifs vis-à-vis des espèces cibles, *Leishmania amazonensis* et *Leishmania donovani* avec des CI_{50}s entre 9,53 et 86,45 µM pour les promastigotes, et entre 0,64 et 6,98 µM pour les amastigotes. Les quatre composés ont été évalués pour leur cytotoxicité sur une lignée cellulaire des macrophages murins (J774A.1) et le dosage fluorométrique par le réactif AlamarBlue a montré que les composés ne sont pas toxiques à la dose testée. Ces quatre composés anti-*Leishmania* se sont révélés également actifs vis à vis de *Trypanosoma cruzi* alors que *Naegleria fowleri* a été sensible à l'inuloxin A seulement.

Le mécanisme d'action de ces quatre composés a été élucidé en utilisant les kits de viabilité cellulaire et de détection des évènements typiques de l'apoptose. Les résultats ont montré que ces composés ont induit des évènements de type apoptotique chez *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *N. fowleri* par l'altération de la perméabilité membranaire (kit SYTOX Green), la condensation de la chromatine (double kit Hoechst 33342/PI), la perturbation du fonctionnement de la mitochondrie (sonde JC-1), et la réduction des niveaux de production de l'ATP (CellTiter-Glo) en plus de la régénération des ROS (kit CellROX) chez *L. amazonensis*, *T. cruzi* et *N. fowleri*.

Mots clés : Etude ethnobotanique, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, Activité antistaphylococcique, Activité leishmanicide, Composés bioactifs, *Rhamnus alaternus*, *Inula viscosa*, Cytotoxicité, Mort cellulaire programmée, Apoptose.

Résumé

La recrudescence des germes résistants aux antimicrobiens constitue un problème majeur de santé publique. La recherche de nouvelles molécules bioactives est donc un enjeu crucial.

Dans ce contexte, des plantes supposées guérir les infections cutanées sont sélectionnées auprès des herboristes de la région Fès-Meknès. Les plantes retenues ont fait l'objet de fractionnements bioguidés pour identifier les composés actifs sur *Leishmania* spp. et *Staphylococcus aureus* fréquemment isolés dans ce type de pathologie dans la région d'étude.

64 espèces sont répertoriées, mais 15 plantes montrant un indice de fréquence de citation élevé et un apport bibliographique faible pour chaque germe cible sont évaluées quant à leurs propriétés antimicrobiennes. Le test qualitatif par macrodilution en milieu solide a révélé que l'extrait éthanolique de *Rhamnus alaternus* est le plus actif sur les souches de *S. aureus* alors que le test de microdilution a montré que l'extrait éthanolique d'*Inula viscosa* est le plus actif sur *Leishmania* spp..

Le fractionnement bioguidé et les analyses spectroscopiques et spectrométriques (RMN, EIMS et HREIMS) de l'extrait de *Rhamnus alaternus* a donné comme composés actifs **l'émodine** et **le kaempférol**. Toutefois l'émodine s'est avérée la plus active vis-à-vis des souches de staphylocoques avec des CMIs de 1,93 et 15,63 µg/ml et des valeurs de CC_{50}> 100 µg/ml témoignant la non-toxicité de ce composé.

Le fractionnement bioguidé de l'extrait d'*Inula viscosa* par de multiples étapes chromatographiques impliquant des colonnes sur gel de silice et de sephadex LH-20, des chromatographies centrifuges et préparatives a permis d'identifier à l'aide des techniques spectroscopiques et de corrélation (RMN, HMBC, HSQC et ROESY) huit composés dont quatre (**8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide** et **inuloxin A**, **sakuranétine** et **taxifoline**) se sont révélés les plus actifs vis-à-vis des espèces cibles, *Leishmania amazonensis* et *Leishmania donovani* avec des CI_{50}s entre 9,53 et 86,45 µM pour les promastigotes, et entre 0,64 et 6,98 µM pour les amastigotes. Les quatre composés ont été évalués pour leur cytotoxicité sur une lignée cellulaire des macrophages murins (J774A.1) et le dosage fluorométrique par le réactif AlamarBlue a montré que les composés ne sont pas toxiques à la dose testée. Ces quatre composés anti-*Leishmania* se sont révélés également actifs vis à vis de *Trypanosoma cruzi* alors que *Naegleria fowleri* a été sensible à l'inuloxin A seulement.

Le mécanisme d'action de ces quatre composés a été élucidé en utilisant les kits de viabilité cellulaire et de détection des évènements typiques de l'apoptose. Les résultats ont montré que ces composés ont induit des évènements de type apoptotique chez *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *N. fowleri* par l'altération de la perméabilité membranaire (kit SYTOX Green), la condensation de la chromatine (double kit Hoechst 33342/PI), la perturbation du fonctionnement de la mitochondrie (sonde JC-1), et la réduction des niveaux de production de l'ATP (CellTiter-Glo) en plus de la régénération des ROS (kit CellROX) chez *L. amazonensis*, *T. cruzi* et *N. fowleri*.

Mots clés : Etude ethnobotanique, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, Activité antistaphylococcique, Activité leishmanicide, Composés bioactifs, *Rhamnus alaternus*, *Inula viscosa*, Cytotoxicité, Mort cellulaire programmée, Apoptose.

Abstract

The emergence of antimicrobial resistance is an enormous public health problem which remains an urgent need for the development of new bioactive molecules.

In this context, the plants supposed to cure skin infections are selected from herbalists in Fez-Meknes region, and those selected were subjected to a bioguided fractionation in order to identify the active compounds against *Leishmania* spp. and *Staphylococcus aureus* frequently isolated in this type of pathology in the area studied.

64 plants are listed, 15 species that showed a high citation frequency index and a low bibliographic contribution for each target microorganism were evaluated for their antimicrobial properties. The qualitative test using the agar macrodilution assay revealed that the ethanolic extract of *Rhamnus alaternus* is the most active against strains of *S. aureus* while the microdilution assay showed that the ethanolic extract of *Inula viscosa* is the most active against *Leishmania* spp..

The bioguided fractionation, spectroscopic and spectrometric analyzes (NMR, EIMS and HREIMS) of the extract of *Rhamnus alaternus* yielded as active compounds **emodin** and **kaempferol**. However, emodin was found to be the most active against strains of *S. aureus* with MICs values of 1.93 and 15.63 µg / ml and CC_{50}> 100 µg/ml reflecting the non-toxicity of this compound.

The bioguided fractionation of the extract of *Inula viscosa* through multiple chromatographic steps involving silica gel and sephadex LH-20 columns, preparative centrifugal chromatography allowed to identify using spectroscopic and correlation analyzes (NMR, HMBC, HSQC and ROESY) eight compounds, among which four (**8-epi-xanthatin-1β, 5β-epoxide** and **inuloxin A**, **sakuranetin** and **taxifolin**) were the most active against the target species, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* with IC_{50}s between 9.53 and 86.45 µM for promastigotes, and between 0.64 and 6.98 µM for amastigotes. The four compounds were evaluated for their cytotoxicity on a murine macrophage cell line (J774A.1) and the fluorometric assay using the AlamarBlue reagent showed that the compounds are not toxic at the dose tested. These four anti-*Leishmania* compounds were also active against *Trypanosoma cruzi*, while *Naegleria fowleri* was susceptible to inuloxin A only.

The mechanism of action of these four compounds has been elucidated using kits for the detection of cell viability and apoptosis events. The obtained results showed that these compounds induced apoptotic-like events in *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* and *N. fowleri* via alteration of the membrane permeability (SYTOX Green kit), condensation of the chromatin (double Hoechst33342/PI kit), disruption of mitochondrial function (JC-1 probe), and decrease of the ATP production levels (CellTiter-Glo) in addition to regeneration of the ROS (CellROX kit) in *L. amazonensis*, *T. cruzi* and *N. fowleri*.

Key words: Ethnobotanical survey, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, Antistaphylococcal activity, Leishmanicidal activity, Bioactive compounds, *Rhamnus alaternus*, *Inula viscosa*, Cytotoxicity, Programmed cell death, Apoptosis.

Resumen

La aparición de la resistencia a los antimicrobianos es un enorme problema de salud pública que hace urgente el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas.

En este contexto, las plantas que supuestamente curan las infecciones cutáneas se seleccionan entre los herbolarios de la región de Fez-Meknes y las seleccionadas se someten a un fraccionamiento bioguiado para identificar los compuestos activos frente a *Leishmania* spp. y *Staphylococcus aureus* frecuentemente aislados en este tipo de patología en el área estudiada.

Se enumeran 64 plantas, 15 especies que mostraron un índice de frecuencia de citas alto y una contribución bibliográfica baja para cada germen objetivo se evalúan por sus propiedades antimicrobianas. La prueba cualitativa utilizando el ensayo de macrodilución en agar reveló que el extracto etanólico de *Rhamnus alaternus* es el más activo contra las cepas de *S. aureus*, mientras que el ensayo de microdilución mostró que el extracto etanólico de *Inula viscosa* es el más activo contra *Leishmania* spp ..

El fraccionamiento bioguiado, los análisis espectroscópicos y espectrométricos (RMN, EIMS y HREIMS) del extracto de *Rhamnus alaternus* dieron como compuestos activos **emodina** y **kaempferol**. Sin embargo, se encontró que la emodina era la más activa contra las cepas de *S. aureus* con valores de CMI de 1,93 y 15,63 µg / ml y CC_{50}> 100 µg/ml, lo que refleja la no toxicidad de este compuesto.

El fraccionamiento bioguiado del extracto de *Inula viscosa* a través de múltiples pasos cromatográficos que involucran gel de sílice y columnas sephadex LH-20, cromatografía plana y centrífuga preparativa permitió identificar mediante análisis espectroscópicos y de correlación (RMN, HMBC, HSQC y ROESY) ocho compuestos, entre los cuales cuatro (**8-epi-xantatina-1β, 5β-epóxido** e **inuloxina A**, **sakuranetina** y **taxifolina**) fueron las más activas contra las especies objetivo, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani* con IC_{50} entre 9.53 y 86.45 µM para promastigotes, y entre 0.64 y 6.98 µM para amastigotes. Se evaluó la citotoxicidad de los cuatro compuestos en una línea celular de macrófagos murinos (J774A.1) y el ensayo fluorimétrico usando el reactivo AlamarBlue mostró que los compuestos no son tóxicos a la dosis probada. Estos cuatro compuestos anti-*Leishmania* también fueron activos contra *Trypanosoma cruzi*, mientras que *Naegleria fowleri* fue susceptible únicamente a la inuloxina A.

El mecanismo de acción de estos cuatro compuestos se ha dilucidado utilizando la viabilidad celular y kits para la detección de eventos de apoptosis. Los resultados obtenidos mostraron que estos compuestos indujeron eventos de tipo apoptótico en *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* y *N. fowleri* por alteración de la permeabilidad de la membrana (kit SYTOX Green), condensación de cromatina (kit doble Hoechst33342 / PI), disrupción de función mitocondrial (sonda JC-1) y disminución de los niveles de producción de ATP (CellTiter-Glo) además de la regeneración de ROS (kit CellROX) en *L. amazonensis*, *T. cruzi* y *N. fowleri*.

Palabras clave : Estudio etnobotánico, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, Actividad antiestafilocócica, Actividad leishmanicida, Moléculas bioactivas, *Rhamnus alaternus*, *Inula viscosa*, Citotoxicidad, Muerte celular programada, Apoptosis.

ملخص

يعد ظهور مقاومة مضادات الميكروبات مشكلة صحية عامة هائلة والتي لا تزال بحاجة ملحة لتطوير جزيئات جديدة نشطة بيولوجيًا.

في هذا السياق ، تم اختيار النباتات التي من المفترض أ أنها تعالج الالتهابات الجلدية من قبل المعالجين بالأعشاب في منطقة فاس مكناس ، وتلك التي تم اختيارها تعرضت للتجزئة الحيوية من أجل التعرف على المركبات الفعالة ضد الليشمانيا. و *Staphylococcus aureus* اللتي تعد من الميكروبات المسببة بشكل كبير لهذا النوع من الأمراض في المنطقة المدروسة.

تم إدراج 64 نباتًا ، 15 منها أظهرت مؤشرًا عاليًا للاستعمال ودراسة ببليوغرافية منخفضة لكل جرثومة مستهدفة لذلك تم تقييم خصائصها المضادة للميكروبات. أظهر الاختبار النوعي أن المستخلص الإيثانولي ل *Rhamnus alaternus* هو الأكثر نشاطًا ضد سلالات *S. aureus* بينما المستخلص الإيثانولي ل *Inula viscosa* هو الأكثر نشاطًا ضد الليشمانيا.

أسفر التحليل الجزيئي الموجه يولوجيًا وتقنيات (NMR, EIMS , وHREIMS) لمستخلص *R. alaternus* على إيجاد مركبات نشطة **Emodin**و**Kaempferol** . وجد أن Emodin هو الأكثر نشاطا ضد سلالات *S. aureus* بقيم 1.93 CMI و 15.63 ميكروغرام / مل و 100 <CC_{50} ميكروغرام / مل مما يعكس عدم سمية هذا المركب.

التحليل الجزيئي الموجه بيولوجيًا لمستخلص *I. viscosa* من خلال خطوات كروماتوغرافية متعددة وتقنيات (NMR , HMBC و HSQC, ROESY,) ساهم في إيجاد ثمانية مركبات ، من بينها أربعة (**8-epi-xanthatin-1β, 5β-epoxide, inuloxinA**) (**sakuranetin, taxifoline**) كانت الأكثر نشاطًا ضد السلالات المستهدفة، L. amazonensis و L. donovani مع IC_{50} بين 9.53 و 86.45 µM ل promastigotes ، وبين 0.64 و 6.98 µM ل amastigotes. تم تقييم المركبات الأربعة لسميتها الخلوية على خلية الفئران (J774A.1) وأظهر الاختبار باستخدام كاشف AlamarBlue أن المركبات ليست سامة عند اختبار الجرعة. كانت هذه المركبات الأربعة المضادة لليشمانيا فعالة أيضًا ضد *Trypanosoma cruzi* ، في حين كانت *Naegleria fowleri* غير مقاومة ل Inuloxin A فقط.

تم توضيح آلية عمل هذه المركبات الأربعة باستخدام تقنيات واختبارات للكشف عن أحداث موت الخلايا المبرمج. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن هذه المركبات تسببت في إحداث مؤشرات موت الخلية المبرمج عند *L. amazonensis* و *L. donovani* و *T. cruzi* و *N. fowleri* عبر تغيير نفاذية الغشاء (SYTOX Green) ,تكثيف الكروماتين النووي (Hoechst33342/PI) ,تعطيل وظيفة الميتوكوندريا (JC-1) وانخفاض مستويات إنتاج ATP (CellTiter-Glo). بالإضافة إلى تجديد إفراز ROS (CellROX) عند *L. amazonensis, T. cruzi, N. fowleri*.

الكلمات الرئيسة: دراسة نباتية عرقية ، *S. aureus* المقاوم للميثيسيلين ، *Leishmania amazonensis* ، *Leishmania donovani* ، نشاط مضاد ل *S. aureus* ، نشاط مضاد ل *Leishmania* ، المركبات النشطة بيولوجيا ، *Rhamnus alaternus* ، *Inula viscosa* ، السمية الخلوية ، موت الخلايا المبرمج.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents Mustapha Zeouk et Fatima Baidada,

En témoignage de ma reconnaissance infinie pour les nombreux sacrifices, nul mot ne pourra exprimer ma gratitude envers vous. Ce travail est le fruit de votre générosité, de votre confiance, et du soutien que vous avez toujours exprimé à mon égard tout au long de ces longues études. Je vous aime et que DIEU vous protège.

A ma sœur Imane, son mari Aziz et leurs petits Imrane, Yanis et Lilyane,

A qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite et de bonheur.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond amour.

A mon cher Zakaria,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour et l'affection que je porte pour toi. Merci pour le soutien que tu m'as accordé.

A ma chère tante Badiaa,

Merci pour ton aide précieuse.

A ma chère amie Douâae Ou-yahia,

Tu es pour moi une sœur et sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs que nous avons passé ensemble, je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A tous ceux qui m'aiment,

Je dédie ce travail

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une thèse en cotutelle internationale entre l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah au Maroc (Faculté des Sciences et technique Fès) et l'Université de la Laguna en Espagne.

Je tiens en premier lieu à remercier le président de l'***USMBA*** et le président de l'***Université de la Laguna*** d'avoir encouragé la coopération scientifique entre les équipes de recherches marocaines et espagnoles.

Un grand merci au doyen de la FST le professeur ***Mustapha Ijjaali*** et au vice-doyen chargé de la recherche le professeur ***El Mestafa El Hadrami*** de m'avoir autorisé à réaliser une partie de mes travaux dans le cadre de cette coopération.

A mes encadrants de thèse

Le professeur BEKHTI KHADIJA,

Professeur de microbiologie médicale a la Faculté des Sciences et Techniques Fès, Chercheur au laboratoire de Biotechnologie Microbienne et Molécules Bioactives. Je vous serai infiniment reconnaissante madame de la confiance que vous m'avez accordée, de la compétence avec laquelle vous m'avez dirigé et de votre grande disponibilité. Votre sympathie, votre bienveillance et vos conseils m'ont été fort utiles. Je n'oublierai jamais vos encouragements tout au long de ces années de recherche.

Le professeur docteur JACOB LORENZO-MORALES,

Directeur et Chercheur de l'Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias-Universidad de La laguna (IUETSPC-ULL) de Tenerife. Merci de m'avoir accepter au sein de votre équipe afin de finaliser mes travaux de recherches. Merci pour vos conseils judicieux, votre confiance, votre soutien moral qui m'a souvent aidé à remonter la pente dans les moments difficiles. Je vous serai très reconnaissante pour la qualité de votre encadrement et de votre humanité.

Aux membres de jury

Le professeur Ibnsouda Koraichi Saad, directeur de la Cité d'Innovation de Fès et professeur à la faculté des Sciences et Techniques de Fès, de part de vos compétences en biotechnologie et malgré vos énormes occupations vous me faites l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail en tant que rapporteur et je vous remercie infiniment.

Le professeur Hammouti Belkheir, Professeur à la Faculté des Sciences Oujda, de part de vos compétences dans le domaine des molécules chimiques c'est un honneur de vous avoir comme rapporteur et c'est une occasion de vous exprimer mon profond respect et mes vifs remerciements.

Le Professeur docteur Rodrigo Morchón García, chercheur et professeur en parasitologie à l'université de Salamanca- Espagne, en vue de votre grande expérience dans le domaine de la parasitologie vous me faites l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail en tant que rapporteur et je vous exprime mes sincères remerciements.

Le Professeur docteur Verónica Pino Estévez, chercheur et professeur à l'université de La Laguna- Tenerife, vous me faites l'honneur de se joindre à ce jury comme examinateur et je vous présente mes vifs remerciements.

Le Professeur Naima El Ghachtouli, professeur et chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer à l'examen de mon travail. Merci également pour vos qualités humaines.

Le Professeur Lahsen El Ghadraoui, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et toute ma sympathie d'avoir eu la gentillesse de présider le jury de soutenance de ce travail.

Je tiens à remercier également le professeur *José E. Piñero,* directeur de laboratoire de parasitologie à l'IUETSPC-ULL pour son investissement et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'adresse également mes remerciements au chercheur *Elizabeth Córdoba-Lanús* pour son encouragement.

Ma reconnaissance va aux collaborateurs du laboratoire de chimie à l'Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Departamento de Química Orgánica, les Professeurs *Ignacio A. Jimenez* et *Isabel L. Bazzocchi*, vous faites partie de ceux qui ont éveillé en moi un intérêt et un goût certain pour la chimie. Merci d'avoir accepté d'encadrer une biologiste

sur ce projet et merci pour votre disponibilité, pour les analyses, pour le temps consacré à l'interprétation des spectres et pour l'accueil que vous m'a réservé afin de mener à bien et à terme cette thèse.

Un remerciement spécial s'adresse à Docteur ***Ines Sifaoui,*** Chercheur au laboratoire de l'IUETSPC-ULL de m'avoir initié à toutes les manipulations ainsi que pour son soutien et ses conseils je garderai surtout un bon souvenir des discussions que j'ai eu avec elle, dont les conversations n'étaient pas uniquement d'ordre professionnel, mais aussi personnel ce qui nous a permis de passer d'agréables moments ensemble, son aide m'a été précieuse.

Mes vifs remerciements s'adressent également au professeur docteur ***Atteneri López-Arencibia,*** Professeur et chercheur à l'IUETSPC-ULL, pour son accompagnement durant la réalisation du test amastigote qui n'était pas facile à performer et avec qui j'ai appris plusieurs astuces.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également au professeur ***Ibn Tattou Mohammed*** et professeur ***El Oualidi Jalal,*** directeur de l'herbier de l'Institut scientifique de Rabat-Maroc (Université Mohammed V-Rabat) pour leur aide précieuse et leur collaboration à identifier les plantes recensées dans cette étude.

Je voudrais chaleureusement remercier tous ***mes collègues du laboratoire de Parasitologie en Espagne*** pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler : Dr. María Reyes-Batlle, Dr. Olfa Chiboub, Dr. Natália Karla Bellini, Rubén Leocadio Rodríguez-Expósito, Desirée San Nicolás-Hernández, Carlos J. Bethencourt-Estrella, Aitor Rizo-Liendo, Edyta Beata Hendiger et Iñigo Arberas-Jiménez.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements à ***mes collègues du laboratoire de Biotechnologie Microbienne et Molécules Bioactives au Maroc*** pour tous les bons moments partagés : Douaae Ou-yahia, MounaAouine, Dr. Yassir Lekbach, Benounna Fadoua, Benbrick Ibrahim, Dr. Tirry Nabil, Samira Jaouhar, et Safae Erraouan. Je vous souhaite une bonne continuation.

Je tiens particulièrement à remercier ***mes chers amis*** Dr. Wessal Ouedrhiri, Dr. Chaimae Rais et Dr. Khalid El Bairi, qui de près ou de loin, ont apporté leur pierre à ce travail de thèse, tant sur le plan moral que scientifique. Merci pour votre soutien.

Enfin, merci à toutes celles et ceux qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse…

Table des matières

Introduction générale.……..……1

Partie I. Revue bibliographique

I. *Leishmania*…….6

I.1. Définition…….....6

I.2. Manifestations cliniques……..7

I.3. Traitement des leishmanioses et résistance……....10

I.4. Pathogénicité et virulence……...12

I.5. Mort cellulaire programmée chez *Leishmania*…….…….....15

II. *Staphylococcus aureus*……...……..…17

II.1. Définition……..17

II.2. Effets pathogènes……..18

II.3. Antibiothérapie et résistance de *Staphylococcus aureus*……...21

II.4. Facteurs de virulence…….23

III. Plantes à effet anti-*Leishmania* ou anti-*S. aureus*……..27

III.1. Plantes à effet anti-*Leishmania*……28

III.2. Plantes à effet anti-*S. aureus*……...…….30

Partie II. Matériel et Méthodes

I. Sélection des plantes anti-*Leishmania* et anti-*Staphylococcus aureus*…….32

I.1. Zone d'étude……...……32

I.2. Organisation de l'enquête……...34

I.3. Critères de sélection des plantes…….....34

I.3.1. Indice de fréquence de citation……34

I.3.2. Apport de la littérature…….....35

II. Extraits des plantes……..35

III. Criblage biologique……36

III.1. Activité antistaphylococcique……..……...36

III.1.1. Souches bactériennes……...……..36

III.1.2. Test biologique……...……36

III.2. Activité antileishmanienne…..……..40

III.2.1. Matériel biologique ……..…….....40

III.2.2. Test biologique……..40

III.2.2.1. Activité anti-promastigote……..41

III.2.2.2. Activité anti-amastigote……..42
IV. Fractionnement chimique et identification des composés purs……..…...44
IV.1. Fractionnement bioguidé antibactérien ……..44
IV.1.1. Bioautographie d'immersion…….……....44
IV.1.2. Séparation et purification des fractions actives ……..……..45
IV.1.3. Caractérisation des structures des composés antistaphylocoques…….…..46
IV.2. Fractionnement bioguidé antiparasitaire…….……..…47
IV.2.1. Chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® LH-20…...…….47
IV.2.2. Chromatographie sur colonne (CC) humide ……..48
IV.2.3. Chromatographie centrifuge sur couche mince : Chromatotron ……...48
IV.2.4. Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative……49
IV.2.5. Identification des structures des composés antileishmaniens…….……51
V. Détermination du mécanisme d'action des composés leishmanicides……51
V.1. Détection de l'altération de la perméabilité membranaire……..52
V.2. Analyse du potentiel de la membrane mitochondriale……52
V.3. Dosage de la production d'ATP…….53
V.4. Evaluation de la condensation de la chromatine nucléaire……..53
V.5. Marquage des espèces réactives de l'oxygène……53
VI. Test de cytotoxicité des composés actifs sur les macrophages……..55

Partie III. Résultats et discussion

Chapitre 1 : Sélection des plantes anti-*Leishmania* et anti-*Staphylococcus aureus*

I. Introduction…….56
II. Inventaire des plantes utilisées……...57
III. Sélection des plantes……..……65
IV. Discussion…….66
V. Conclusion…….69

Chapitre 2 : Activité antistaphylococcique

I. Introduction……..71
II. Criblage antistaphylococcique……...71
III. Description de la plante active sélectionnée……..73
IV. Fractionnement bioguidé et identification des composés actifs…….75
V. Discussion……..78

VI. Conclusion…….81

Chapitre 3 : Activité leishmanicide

I. Introduction……..……..…….82
II. Criblage antiparasitaire……...82
III. Description de la plante active sélectionnée……..84
IV. Fractionnement bioguidé et identification des composés actifs……85
V. Détermination du mécanisme d'action……89
V.1. Alteration de la perméabilité membranaire……...90
V.2. Condensation de la chromatine nucléaire……..93
V.3. Dépolarisation du potentiel de la membrane mitochondriale……96
V.4. Production d'ATP…….....99
V.5. Regénération des ROS……100
VI. Discussion……...101
VII. Conclusion…….105

Partie IV. Valorisation du spectre d'action des composés bioactifs d'*I. viscosa*

I. Evaluation de l'activité biocide sur *Trypanosoma cruzi*……106
I.1. Introduction……..106
I.2. Activité antitrypanosomale et détermination des composés actifs……...107
I.3. Mécanisme d'action des composés actifs…….108
I.4. Discussion……115
I.5. Conclusion……....116
II. Evaluation de l'effet biocide sur *Naegleria fowleri*……..116
II.1. Introduction……...116
II.2. Activité biologique et détermination du composé actif…….117
II.3. Mécanisme d'action du composé actif……..118
II.4. Discussion…….124
II.5. Conclusion……125
Conclusion générale et perspectives…….....126
Références bibliographiques…….……129
Annexes……...166

Liste des abréviations

Termes biologiques

ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp B	Amphotéricine B
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CP	Cystéine protéase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMB	Concentration minimale bactéricide
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50%
CI_{90}	Concentration inhibitrice 90%
CC_{50}	Concentration cytotoxique 50%
Fak	Fatty acid kinase
GISA	Glycopeptide-intermediate *S. aureus*
GP63	Glycoprotéine 63
IS	Indice de sélectivité
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutanée
LCM	Leishmaniose cutanéo-muqueuse
LCL	Leishmaniose cutanée localisée
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse
LCPK	Leishmaniose cutanée post-kalazar
LV	Leishmaniose viscérale
LPG	Lipophosphoglycane
LPV	Leucocidine de Panton-Valentine
LTA	Acide lipotéichoïque
MEAP	Méningo-encéphalite amibienne primitive
MF	Miltéfosine
MTNs	Maladies tropicales négligées
MSSA	Methicillin sensitive *S. aureus*
NO	Nitric oxide

Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCD	Programmed cell death
PGN	Peptidoglycane
PGE2	Prostaglandine E2
PI	Propidium Iodide
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
ROS	Reactive oxygen species
SARM	*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
Sb III	Antimoine trivalent
Sb V	Antimoine pentavalent
SCCmec	Cassette chromosomique staphylococcique mec
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
Sod	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TSST	Toxine du choc toxique staphylococcique
VISA	Vancomycin-intermediate *S. aureus*
VRSA	Vancomycin-resistant *S. aureus*
$\Delta\Psi m$	Potentiel transmembranaire mitochondrial

Termes chimiques

CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur couche mince
^{13}C	Carbone 13
$CHCl_3$	Chloroforme
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxide
Et_2O	Ether diéthylique
EtOAc	Acétate d'éthyle
EIMS	Electron ionization mass spectrometry
^{1}H	Proton
H_2SO_4	Acide sulfurique
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
HREIMS	High-resolution electron ionization mass spectrometry
MeOH	Méthanol
Me_2CO	Acétone
NaCl	Chlorure de sodium
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy

Unités de mesure

°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
cm	Centimètre
g	Gramme
h	Heure
kg	Kilogramme
l	Litre
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
rpm	Rotation par minute
tpm	Tour par minute
UFC	Unité formant colonie

Organisations et instituts

CDC	Center for Disease Control and prevention
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DGCL	Direction Générale des Collectivité Locales
FDA	Food and Drug Administration
HCP	Haut Commissariat au Plan

NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OMS	Organisation Mondiale de Santé
PAHO	Pan American Health Organization
WHO	World Health Organization

Divers

1 D	Une dimension
2 D	Deux dimensions
IF	Indice de fréquence
m/z	Masse/charge
p/v	Poids/volume
SAR	Structure activity relationship
UV	Ultra-violet
v/v	Volume/volume

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Leishmaniose et distribution de l'espèce responsable …….…....8

Tableau I.2 : Extraits des plantes actives contre *Leishmania* spp…….....29

Tableau I.3 : Extraits des plantes actives contre *S. aureus*……..…….....31

Tableau III.1 : Inventaire des plantes utilisées dans le traitement des infections cutanées dans les villes de Fès, Meknès, Taounate et Sefrou……..……..58

Tableau III.2 : Plantes sélectionnées pour étude……..…..……..……66

Tableau III.3 : Zones d'inhibition des extraits éthanoliques des quinze plantes contre les souches de *S. aureus*…….……72

Tableau III.4 : Concentrations minimales inhibitrices des extraits éthanoliques des six plantes sélectionnées par le test qualitatif contre les souches de *S. aureus*……..…....73

Tableau III.5 : Concentrations minimales inhibitrices des fractions de *R. alaternus* contre les quatre souches de *S. aureus*……..…...….75

Tableau III.6 : Concentrations minimales inhibitrices des composés purs isolés des fractions de *R. alaternus* contre les quatre souches de *S. aureus*, test de cytotoxicité et indice de selectivité vis à vis des macrophages murins…….....77

Tableau III.7 : Criblage des extraits éthanoliques des quinze plantes sélectionnées de l'étude ethnobotanique dans la région de Fès-Meknès contre le stade promastigote……...83

Tableau III.8 : Activité leishmanicide de l'extrait éthanolique, fractions et sous fractions d'*I. viscosa* contre les promastigotes de *L. amazonensis* et *L. donovani*……...…….....86

Tableau III.9 : Activité leishmanicide, cytotoxicité et indice de sélectivité des composés purifiés de l'extrait d'*I. viscosa* sur les promastigotes de *Leishmania* spp. et les macrophages murins……...……....88

Tableau III.10 : Activité leishmanicide et indice de sélectivité des composés actifs contre le stade amastigote de *L. amazonensis*…….……....89

Tableau III.11 : Les CI_{90} des composés actifs pour l'étude du mécanisme d'action……..…90

Tableau IV.1 : Activité antitrypanosomale, cytotoxicité et indice de sélectivité des composés purifiés de l'extrait d'*I. viscosa* sur les epimastigotes de *T. cruzi*. et les macrophages murins……...……...108

Tableau IV.2 : Activité antiamibienne, cytotoxicité et indice de sélectivité contre les trophozoïtes de *N. fowleri* et la lignée cellulaire des macrophages des composés isolés d' *I. viscosa*.....118

Liste des figures

Figure I.1 : Cycle de vie de *Leishmania*……..……...6
Figure I.2 : Formes cliniques des leishmanioses cutanées : A, LCL ; B, LCD ; C, LCM.....9
Figure I.3 : Patient présentant une forme sévère de la LCPK……...10
Figure I.4 : Possibles voies de la PCD via apoptose chez *Leishmania*…….……...16
Figure I.5 : Les principales manifestations cutanées à *S. aureus* : A, Impétigo ; B, Folliculite ; C, Furoncle ; D, Abcès cutané……..…….....18
Figure I.6 : Les principaux facteurs de virulence associés à une infection à *S. aureus*….....23
Figure II.1 : Provinces et préfectures de la région Fès-Meknès…….……....32
Figure II.2 : Répartition des cas de la leishmaniose dans la région Fès-Meknès durant la période 2005-2015*……..…...33
Figure II.3 : Protocol de diffusion sur puits utilisé dans le criblage qualitatif des extraits bruts……..…37
Figure II.4 : Protocol de macrodilution en milieu solide utilisé pour le criblage quantitatif des extraits bruts…….……....38
Figure II.5 : Protocol de la microdilution sur microplaque de 96 puits utilisé pour la détermination de la CMI et la CMB des fractions et des composés purs……..……..…….…39
Figure II.6 : Protocol du criblage leishmanicide des extraits bruts, fractions, sous fractions et composés purs contre la forme promastigote de *Leishmania* spp ……...……....41
Figure II.7 : Réduction de résazurine en résorufine en présence des cellules vivantes..…....43
Figure II.8 : Processus du fractionnement bioguidé utilisé contre *S. aureus*……...45
Figure II.9 : Protocol de la chromatographie radiale à couche mince en utilisant un « Chromatotron »…….……48
Figure II.10: Protocol utilisé pour la CCM préparative : A, Couche mince de silice contenant le composé à purifier ; B, Entonnoir filtrant……...…..….49
Figure II.11 : Processus du fractionnement bioguidé utilisé contre *Leishmania* spp……..50
Figure II.12 : Protocol suivi pour l'élucidation du mécanisme d'action des composés purs sur la forme promastigote de *L. donovani* et *L. amazonensis*……....54
Figure III.1 : Familles botaniques inventoriées lors de l'étude ethnobotanique dans les quatre villes de la région Fès-Meknès……...……...…..63
Figure III.2 : Parties utilisées pour la préparation des remèdes……..…..63

Figure III.3 : Mode de préparation des remèdes prescrits par les herboristes de la région étudiée…….…….64
Figure III.4 : Voies d'administration des remèdes préparés prescrits par les herboristes dans les villes de la région de Fès-Meknès……..…….…...64
Figure III.5 : L'espèce *Rhamnus alaternus* et sa classification botanique…….……....73
Figure III.6 : Structures des composés purifiés de l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* : Emodine (**1**), Kaempférol (**2**)…….....76
Figure III.7 : L'espèce *Inula viscosa* et sa classification botanique…….…….....84
Figure III.8 : Structures des composés (**1-8**) isolés de l'extrait éthanolique des feuilles d'*I. viscosa*…….……..87
Figure III.9 : Les images (40X et 100X) présentent les effets de la concentration CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des promastigotes de *L. amazonensis* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été obtenues en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (**A, F**)……..……...….91
Figure III.10 : Les images représentatives (40X et 100X) des promastigotes de *L. donovani* marqués avec le SYTOX Green. Les parasites ont été incubés pendant 24h avec les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**). Un contrôle négatif (souches non traitées) a été utilisé (**A, F**). L'effet sur la perméabilité de la membrane plasmique a été observé en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL…….....92
Figure III.11 : Les promastigotes de *L. amazonensis* incubés avec les CI_{90} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Les images (40X et 100X) sont représentatives de la population cellulaire observée dans les expériences réalisées en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL AMF4300, Life Technologies, USA. La coloration Hoechst est différente lorsque on compare le contrôle négatif (**A, F, K**) avec des cellules traitées où les noyaux sont marqués en bleu brillant. La fluorescence rouge correspond à la coloration par l'iodure de propidium (PI). Marquage Hoechst (**F-J**), marquage à PI (**K-O**)……..….94
Figure III.12 : Les images (40X et 100X) obtenues à partir du système d'imagerie cellulaire EVOS FL montrent l'intensité de la fluorescence lorsque les promastigotes de *L. donovani* ont été incubés avec les IC_{90} des quatre composés testés pendant 24h : Inuloxin A (**B, G, L**),

sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Hoechst correspond à la condensation de la chromatine (bleue) dans les cellules traitées. La fluorescence rouge correspond à la coloration par PI. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, F, K**)……..……95

Figure III.13 : Les effets de l'inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline **(E, J, O)** sur le potentiel de la membrane mitochondrial de *L. amazonensis* par rapport au contrôle (**A, F, K**). Le réactif JC-1 s'accumule dans les mitochondries des cellules saines sous forme d'agrégats (fluorescence rouge). Cependant, dans les cellules traitées avec les CI_{90} des composés pendant 24h, JC-1 reste dans le cytoplasme sous sa forme monomère en émettant une fluorescence verte à cause de la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale. Les images (40X et 100X) sont représentatives des parasites observés dans les expériences réalisées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL…….……...….97

Figure III.14 : Les promastigotes de *L. donovani* marqués avec le JC-1 après 24h d'incubation avec les CI_{90} d'inuloxin A (**B, E, H**) et sakuranétine (**C, F, I**). Les images (40X et 100X) sont représentatives de l'effet sur le potentiel mitochondrial des parasites, et sont observées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, D, G**)……..……..98

Figure III.15 : L'effet de 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**), de l'inuloxin A (**4**), de la sakuranétine (**5**) et de la taxifoline (**6**) sur la production d'ATP par *L. amazonensis* (A), et *L. donovani* (B) en utilisant le test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo Luminescent. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif. Les cellules ont été traitées par la concentration CI_{90} pendant 24h……..……99

Figure III.16 : Augmentation du niveau de production de ROS chez les promastigotes de *L. amazonensis* après traitement par les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) pendant 24h. Après marquage par CellROX Deep Red, des images (40X et 100X) ont été obtenues en utilisant un système EVOS FL Cell Imaging. Les résultats ont été analysés par rapport au contrôle négatif (**A, F**)……..….100

Figure IV.1 : Les images (40X et 100X) présentent les effets de la concentration CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des epimastigotes de *T. cruzi* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été obtenues

en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (**A, F**)……..109

Figure IV.2 : Les images (40X et 100X) obtenues à partir du système d'imagerie cellulaire EVOS FL montrent l'intensité de la fluorescence lorsque les epimastigotes de *T. cruzi* ont été incubés avec les CI_{90} des quatre composés testés pendant 24h: Inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Hoechst correspond à la condensation de la chromatine (bleue) dans les cellules traitées. La fluorescence rouge correspond à la coloration par PI. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, F, K**)……..…….....110

Figure IV.3 : Les effets de l'inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline **(E, J, O)** sur le potentiel de la membrane mitochondrial de *T. cruzi* par rapport au contrôle (**A, F, K**). Les images (40X et 100X) sont représentatives des parasites observés dans les expériences réalisées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL……..…….112

Figure IV.4 : L'effet de 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**), de l'inuloxin A (**4**), de la sakuranétine (**5**) et de la taxifoline (**6**) sur la production d'ATP par *T. cruzi* en utilisant le test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo Luminescent. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif. Les cellules ont été traitées par la concentration CI_{90} pendant 24h…….113

Figure IV.5 : Augmentation du niveau de production de ROS chez les epimastigotes de *T. cruzi* après traitement par les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) pendant 24h. Après marquage par CellROX Deep Red, les images (40X et 100X) ont été obtenues en utilisant un système EVOS FL Cell Imaging. Les résultats ont été analysés par rapport au contrôle négatif (**A, F**)……...…….114

Figure IV.6 : Les images présentant les effets de la concentration CI_{90} de l'inuloxin A (**C**, **D**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des trophozoïtes de *N. fowleri* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été analysées en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle de croissance (**A**, **B**)…….……...…….120

Figure IV.7 : Les trophozoïtes de *N. fowleri* incubés avec la CI_{90} de l'inuloxin A (**D**, **E**, **F**) pendant 24h. Les images sont représentatives de la population cellulaire à l'aide d'un EVOS FL Cell Imaging System. La coloration Hoechst est différente lors de la comparaison du contrôle négatif (**A**, **B**, **C**) avec les cellules traitées où les noyaux sont marqués en bleu brillant.

La fluorescence rouge correspond à la coloration par PI. Hoechst (**B**, **E**), l'iodure de propidium (**C**, **F**)……..121
Figure IV.8 : Les cellules de *N. fowleri* colorées avec le kit JC-1 après 24h d'incubation des trophozoïtes avec la CI_{90} de l'inuloxin A (**C**, **D**). Les images sont représentatives de l'effet sur le potentiel mitochondrial des amibes et observées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A**, **B**)…….…..…..122
Figure IV.9 : Les images sont représentatives du marquage des trophozoïtes de *N. fowleri* avec le kit CellROX Deep Red après traitement par la CI_{90} de l'inuloxin A (**C**, **D**) pendant 24h. Les images ont été obtenues en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et comparées avec le contrôle de croissance (**A**, **B**)…….....…...123

Introduction générale

Le XXI -ème siècle est l'ère de l'innovation et de la technologie biomédicale mais c'est aussi l'ère où la résistance aux antimicrobiens est de plus en plus signalée. Des germes microbiens incurables plongent le monde médical dans des impasses thérapeutiques et font craindre un retour à l'ère préantibiotique. Nombreux sont les germes pathogènes qui résistent aux traitements ce qui constitue un problème majeur impactant tout le système de santé et inquiète le corps médical. En effet la résistance des microorganismes aux traitements (antibiorésistance) menace l'efficacité des antimicrobiens existants, affaiblit l'arsenal thérapeutique et met en péril la santé des malades. Des modèles prédictifs ont estimé que d'ici 2050, l'antibiorésistance constituera la première cause de mortalité mondiale avec plus de 10 millions de décès par an, dont environs 5 millions en Asie, 4 millions en Afrique, 400 000 en Europe et 300 000 en Amérique du Nord (O'Neill, 2014). En plus de l'effet sur la santé, l'antibiorésistance impact l'économie des ministères de santé car elle engendre des coûts des soins plus onéreux. Il a été montré que le surcoût attribué à l'antibiorésistance s'élèverait à 1,5 milliards d'euros (EUR-RC, 2011) en Europe, et aux Etats-Unis il avoisinerait les 55 milliards de dollars (CDC, 2019). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a tiré la sonnette d'alarme sur les conséquences désastreuses de la résistance aux antibiotiques (WHO, 2014) et pour endiguer ce fléau, elle a mis en place un plan d'action mondial qui définit plusieurs objectifs (WHO, 2016). Mais le problème persiste toujours et en 2020 le même organisme a déclaré une recrudescence des germes résistants et il a insisté sur le développement de nouvelles molécules thérapeutiques qui agissent sur des cibles cellulaires différentes de celles visées par les antibiotiques actuellement utilisés (WHO, 2020).

Parmi les pathogènes à "*menace sérieuse* "et "*menace préoccupante"* classés selon le CDC (Center for Disease Control and Prevention) figure la bactérie *Staphylococcus aureus* et parmi les parasites qui causent le 2$^{\text{-ème}}$ taux de mortalité après la malaria à *Plasmodium falciparum* figure les espèces du genre *Leishmania*.

Leishmania est l'agent causal de la leishmaniose, une maladie négligée essentiellement en rapport avec la pauvreté (Hmamouch et al., 2017). Ce sont des anthropozoonoses, communes à l'Homme et à certains animaux (Postigo, 2010). Ces infestations vectorielles sont transmises par les insectes femelles hématophages du genre *Phlebotomus* (dans l'ancien monde) et le genre *Lutzomyia* (dans le nouveau monde). Les leishmanioses sont endémiques dans environs 98 pays et certains territoires à travers le monde à l'exception de l'antarctique (WHO, 2016). Elles se présentent sous trois formes cliniques : la plus grave est la leishmaniose viscérale (LV) qui touche la rate et le foie, et dont le taux de mortalité peut atteindre les 95% en absence de traitement (Alvar et al., 2012; Ibarra-Meneses et al., 2020), la plus fréquente est la leishmaniose cutanée (LC) qui touche

le derme et la moins répandue est la leishmaniose cutanéo-muqueuse (LCM), infestation mutilante qui sévit en Amérique du Sud (WHO, 2010). La prévalence de la leishmaniose est de 1,2 million de nouveaux cas comptant 50 000 à 90 000 nouveaux cas de LV et entre 600 000 et 1 million de LC ; son incidence est de 350 millions de personnes à risque d'infestation (WHO, 2020) dont l'incidence annuelle de décès est estimée entre 20 000 et 30 000 morts (PAHO, 2017).

La leishmaniose a été identifiée dans les années 1900 et les premiers médicaments à base des antimoniés ont été introduits en 1920. Depuis, le traitement de première intention des leishmanioses recommandé par l'OMS s'est basé sur les antimoniés pentavalents tels que le Stibogluconate de sodium (Pentostam®) et l'antimoniate de méglumine (Glucantime®). Cependant en plus des effets secondaires de ces produits (Seifert et Croft, 2006 ; Chakravarty et Sundar, 2019), plusieurs souches leishmaniennes ont développé une résistance (Lira et al., 1999 ; Özbilgin et al., 2020). Comme alternatif, la pentamidine, la paromomycine, les azolés, les nitroimidazoles et surtout l'amphotéricine B et la miltefosine figurent parmi les produits de traitement de deuxième intention (Chakravarty et Sundar, 2019 ; Roatt et al., 2020). Chacun de cet arsenal thérapeutique a ses limites : la miltéfosine est tératogène (Sundar et Olliaro, 2007), l'amphotéricine B est toxique (néphrotoxicité, hypokaliémie, myocardite) (Laniado-Laborín et Cabrales-Vargas, 2009) d'où le recours au système du support liposomale moins toxique (AmBisome®, Abelcet®, Amphocil®) (Yardley et Croft, 2000 ; van Griensven et Diro, 2019). Actuellement et pour contrer la résistance, l'OMS préconise la thérapie combinée en utilisant l'amphotéricine B liposomale et la miltefosine, ce qui a été prouvé dans la littérature (Ramesh et al., 2020 ; Reimão et al., 2020). Toutefois, des cas d'échec clinique ont été démontrés (Ponte-Sucre et al., 2017 ; Kosaka et al., 2020).

Concernant notre deuxième cible, *Staphylococcus aureus* c'est un genre de bactérie opportuniste, cosmopolite qui colonise la peau et les muqueuses de l'Homme. Au sein de cette espèce existe des variants toxinogènes comme ceux exprimant la toxine Leucocidine de Panton-Valentine (LPV), ou ceux exprimant la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST). Les souches toxinogènes aggravent la pathologie et rendent *S. aureus* plus dangereux en cas d'échec thérapeutique (Nakaminami et al., 2020 ; Petraitiene et al., 2020). *S. aureus* pose un problème majeur de santé publique malgré les avancées de la recherche scientifique (WHO, 2020). Ce germe a la capacité d'infecter plusieurs biotopes et de causer un large éventail d'infections qui peuvent aller des infections cutanées à d'autres pathologies profondes, à savoir la pneumonie (Grousd et al., 2019), la méningite (Aguilar et al., 2010), la septicémie (Bawazir et Mustafa, 2020), l'ostéomyélite (Weiss et al., 2020), et l'endocardite infectieuse (Selton-Suty et al., 2012).

La transmission de *S. aureus* est à la fois communautaire et nosocomiale (Freeman-Cook et Cook, 2006 ; Chow et al., 2020). C'est aussi un germe qui a développé une multirésistance aux différentes familles d'antibiotiques. A l'heure actuelle, plus de 90% des souches de *S. aureus* produisent une pénicillinase qui limite le champ d'action des bêtalactamines. De plus, la méthicilline, première pénicilline semi synthétique non sensible aux pénicillinases, a rapidement déchanté le monde médical avec l'apparition de souches résistantes à la méthicilline (SARM). En 2019, l'OMS a développé un nouvel indicateur de la résistance aux antimicrobiens permettant le suivi de la fréquence des septicémies dues à SARM et le taux médian fournit par 25 pays a été de 12,11% (WHO, 2020). En effet, le traitement des souches SARM repose sur les glycopeptides, en particulier la vancomycine. Cependant, la jouissance est de courte durée et des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été isolées. Ces isolats sont dénommés VISA (vancomycin-intermediate *S. aureus*), ou plus généralement GISA (glycopeptide-intermediate *S. aureus*) car elles sont également résistantes à la teicoplanine, un autre antibiotique de la famille des glycopeptides. L'antibiotique le plus récent sur le marché, la linézolide (Zyvox), appartient à ce groupe et a été introduit sur le marché Nord-Américain en 2000. Dès 2001, des cas de SARM résistants à la linézolide ont été rapportés (Tsiodras et al., 2001 ; Rouard et al., 2018).

En revanche, la co-infection *Leishmania* et *S. aureus* augmente le taux de morbidité et de mortalité (Endris et al., 2014 ; Borbón et al., 2019). Il a été démontré que la surinfection des ulcères leishmaniens par *S. aureus* complique le traitement de la LC (Ziaei et al., 2008) et pourrait être parmi les principaux facteurs du risque de mortalité des enfants atteints de la LV (Helel et al., 2017). De ce fait, Khan et al. (2019) ont rapporté que tout médicament possédant à la fois un potentiel bactéricide et leishmanicide est considéré comme un candidat idéal pour atteindre des objectifs thérapeutiques efficaces.

Face à l'émergence du phénomène de résistance aux traitements actuels, des stratégies sont désormais mises en place vers un renouvellement des biomolécules thérapeutiques. Les compagnies pharmaceutiques se sont détournées des produits naturels pour se tourner vers la chimie synthétique, et des dizaines de milliards de dollars ont été investis en recherche et en développement (R&D), cependant, ces nouvelles méthodes de découverte des molécules bioactives semblent avoir atteint certaines limites (Gershell et Atkins, 2003 ; Butler, 2004), ce qui peut expliquer l'intérêt porté à la recherche de nouveaux composés à partir des sources naturelles telles que les plantes médicinales surtout que ces dernières se trouvent dotées d'un pouvoir de sécrétions des métabolites secondaires contre les attaques de ravageurs et qui pourrait être exploité comme un pouvoir antimicrobien (Bérubé-Gagnon, 2006).

Les plantes médicinales ont déjà fait leur preuve depuis l'antiquité, 81% des populations ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes pour traiter divers problèmes de santé (WHO, 2002) et nombreux sont les antimicrobiens comme la quinine, l'artémisinine (prix Nobel médecine 2015) … et autres qui sont des molécules thérapeutiques (Achan et al., 2011 ; Farhi et al., 2011). Entre 1981 et 2014, plusieurs molécules ont été approuvées par l'agence « Food and Drug Administration (FDA) » et dont 73% sont d'origine naturelle (Newman et Cragg, 2016). Sur terre, 250 à 300 000 espèces de plantes médicinales sont inventoriées ce qui constitue une source prometteuse et un réservoir immense de nouveaux composés thérapeutiques potentiels. Cependant, seulement 5 à 15% de ces plantes a été destiné à la recherche des molécules bioactives (Fabricant et Farnsworth, 2001). Les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques impliquées dans un très large éventail d'activités.

Jusqu'à ce jour, l'exploitation de la richesse naturelle des plantes marocaines et plus particulièrement celle du centre du Maroc connu par sa diversité géographique reste insuffisante.

À ce titre, l'objectif spécifique de ce travail de thèse est la recherche de composés bioactifs dirigés contre la leishmaniose et les infections à *S. aureus*. Mais au-delà de cet objectif ultime, cette étude est réalisée dans le but de :

- ⇨ Créer un catalogue des plantes médicinales utilisées par la population locale de la région de Fès-Meknès pour traiter les infections cutanées comme étant le symptôme commun entre les deux germes de cette étude, *Leishmania* et *S. aureus*.
- ⇨ Identifier les composés bioactifs dotés d'une activité antistaphylococcique à partir du criblage des plantes les plus recommandées.
- ⇨ Identifier les composés bioactifs ayant une activité leishmanicide à partir du criblage des plantes les plus recommandées.

Pour atteindre l'ensemble des objectifs soulignés, le travail est subdivisé en quatre parties :

- La **1ere partie** est une synthèse bibliographique de l'état d'art de *Leishmania* et *S. aureus* en insistant sur (i) les informations nécessaires pour la compréhension de la virulence et de la résistance de ces deux germes, (ii) les découvertes des composés bioactifs utilisés comme produits alternatifs.
- La **2-ème partie** décrit les méthodes performées et le matériel utilisé lors de (i) l'étude ethnobotanique, (ii) les tests biologiques et (iii) les fractionnements chimiques.

- La **3-ème partie** concerne les résultats qui seront exposés en trois chapitres dont les données seront dûment discutées pour chacun des chapitres :
    - Le **1-er chapitre** détaille l'étude ethnobotanique réalisée pour sélectionner les plantes les plus recommandées par les herboristes dans la zone d'étude (région centre du Maroc).
    - Le **2-ème chapitre** intéresse l'évaluation de l'effet anti-*S. aureus.*
    - Le **3-ème chapitre** intéresse l'évaluation de l'effet antileishmanien et le mécanisme d'action des composés bioactifs.
- La **4-ème partie** est une valorisation des composés antileishmaniens découverts par tests sur deux autres germes dangereux : un flagellé Trypanosomatidae de la même famille que *Leishmania* (*Trypanosoma cruzi*) et une amibe flagellée (*Naegleria fowleri*).
- L'ensemble des résultats est synthétisé sous forme de conclusion générale avec des perspectives pour finaliser ce projet de thèse.

Partie I
Revue bibliographique

Agents infectieux

Les agents infectieux recouvrent différents microorganismes à savoir des bactéries, des virus, des champignons et des parasites. La rencontre de l'un de ces agents infectieux avec une personne peut causer une maladie infectieuse dont la gravité clinique varie selon le microorganisme en cause ainsi que le système immunitaire de l'hôte. Notre axe de recherche cible deux agents pathogènes qui posent un problème de santé publique à savoir *Leishmania* et *Staphylococcus aureus.*

I. *Leishmania*

I. 1. Définition

Les leishmanies sont des parasites protozoaires appartenant à l'ordre des Kinétoplastidae, à la famille des Trypanosomatidae et au genre *Leishmania*. Ce parasite est di-morphique, au cours de son cycle de vie il alterne deux principaux stades de développement caractéristiques auxquels le parasite doit s'adapter, à savoir l'hôte mammifère et l'insecte vecteur (Ogden et Melby, 2009). Selon Ponte-Sucre et Padron-Nieves (2013), le cycle commence lors du repas sanguin de l'insecte vecteur qui est la femelle du phlébotome, un hématophage connu par son activité crépusculaire et nocturne. Les insectes ingèrent des macrophages périphériques infestés par les amastigotes de *Leishmania* qui vont se transformer en promastigotes procycliques une fois qu'ils arrivent à l'intestin moyen du phlébotome. Ces formes se différencient en promastigotes métacycliques infestants et mobiles. Lors du repas sanguin suivant, le vecteur infesté régurgite les promastigotes métacycliques chez un autre hôte mammifère où les parasites sont phagocytés par les macrophages et se différencient en amastigotes, complétant ainsi le cycle de vie des parasites et leur propagation (Figure I.1).

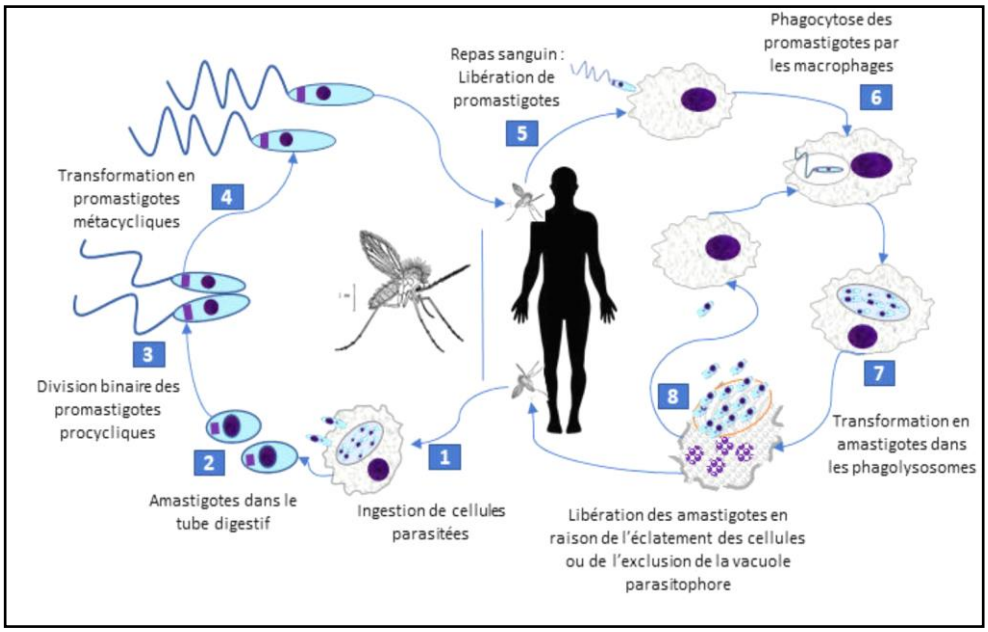


Figure I.1. Cycle de vie de *Leishmania* (Belaz, 2017).

En plus des macrophages, d'autres cellules immunitaires peuvent être également impliquées dans l'absorption de *Leishmania* comme les neutrophiles et les monocytes (Valério-Bolas et al., 2019 ; Oualha et al., 2019 ; Loría-Cervera et Andrade-Narvaez, 2020). Les leishmanies sont alors un modèle important du parasitisme intracellulaire et d'interaction vecteur-hôte-parasite. Dans une étude récente, Laranjeira-Silva et al. (2020) ont démontré que les leishmanies ont des exigences importantes en coexistence de fer et de l'hème nutritionnels pour leur survie. Cependant, ils sont des auxotrophes de l'hème, et doivent donc s'appuyer sur l'hème de l'hôte. Dans le stade promastigote, l'hème est très abondant dans l'intestin moyen de l'insecte vecteur suite à la dégradation de l'hémoglobine à l'intérieur de la matrice péritrophique. Alors que dans le stade amastigote, l'hème est disponible dans les macrophages de l'hôte lors de la digestion de l'hémoglobine au cours du processus d'érythrophagocytose (Miguel et al., 2013). En revanche, d'autres essais expérimentaux ont évalué l'interaction entre l'insecte vecteur et les macrophages, et ont révélé que la salive du phlébotome est composée des peptides favorisant l'inoculation du parasite aux macrophages. Il s'agit du peptide maxadilan, un vasodilatateur capable d'inhiber les processus métaboliques oxydatifs, et l'expression des antigènes dans les macrophages (Ponte-Sucre et Padron-Nieves, 2013).

Durant le cycle biologique des leishmanies, il existe une relative spécificité zoologique entre l'espèce du vecteur et l'espèce de leishmanie qu'il transmet (Pérez-Cutillas et al., 2020). Ainsi, cette spécificité varie en termes de distribution géographique et de conditions environnementales. Par conséquent, plusieurs espèces de *Leishmania* ont été identifiées parmi lesquelles il y a environs 20 qui sont pathogènes pour l'Homme (Burza et al., 2018) et qui causent différentes formes cliniques de la leishmaniose.

I. 2. Manifestations cliniques

Les formes cliniques de la leishmaniose dépendent, entre autres, de l'espèce infestante de *Leishmania* (Tableau I.1). Chez l'Homme, les manifestations leishmaniennes peuvent aller des lésions cutanées jusqu'à la forme viscérale potentiellement mortelle.

Tableau I.1. Leishmaniose et distribution de l'espèce responsable (Cabanillas Billy, 2011).

Forme clinique	Distribution	Complexe	Espèce
Leishmaniose cutanée	Ancien monde	-	*L. major* *L. tropica* *L. aethiopica* *L. donovani*
	Nouveau monde	*L. (Leishmania) = L. mexicana* complexe	*L. mexicana* *L. amazonensis* *L. venezuelensis*
Leishmaniose cutanée/ cutanéo-muqueuse	Nouveau monde	*L. (Viannia) = L. braziliensis* complexe	*L. braziliensis* *L. colombiensis* *L. guyanensis* *L. panamensis* *L. peruviana*
Leishmaniose viscérale	Ancien monde	*L. donovani* complexe	*L. donovani* *L. infantum*
	Nouveau monde	*L. donovani* complexe	*L. chagasi*

- **Leishmaniose cutanée (LC)**

La LC ou « bouton d'Orient » est la forme la plus fréquente, elle peut provoquer des lésions cutanées caractérisées par une papule prurigineuse sur le site de piqûre, ce qui déclenche une réaction inflammatoire avec une hyperplasie de l'épithélium et une nécrose du derme provoquant des ulcérations dermiques sur les parties exposées du corps tel que le visage, les bras et/ou les jambes. Ces ulcères sont généralement circulaires avec des bords délimités, ils se recouvrent d'une mince croûte et se développent en une forme humide ou sèche laissant des cicatrices indélébiles (Estevez, 2009). La LC peut se présenter également sous forme d'une leishmaniose cutanée localisée (LCL) (Figure I.2, A) qui peut guérir spontanément, ou cutanée diffuse (LCD) (Figure I.2, B) qui est plus difficile à traiter. De plus, une autre forme plus grave des leishmanioses cutanées est la leishmaniose cutanéo-muqueuse (LCM) provoquant une défiguration et une mutilation du visage en particulier les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge (Cabanillas Billy, 2011) (Figure I.2, C). Selon Gurel et al. (2020), la problématique de la LC réside aussi dans la possibilité de faire des diagnostics erronés, entraînant un traitement inapproprié et des morbidités, car la LC est considérée comme le « grand imitateur » qui peut imiter presque tous les types de dermatoses. De ce fait, un diagnostic sûr et précis serait nécessaire pour différencier la LC de ses sosies cliniques et histologiques.

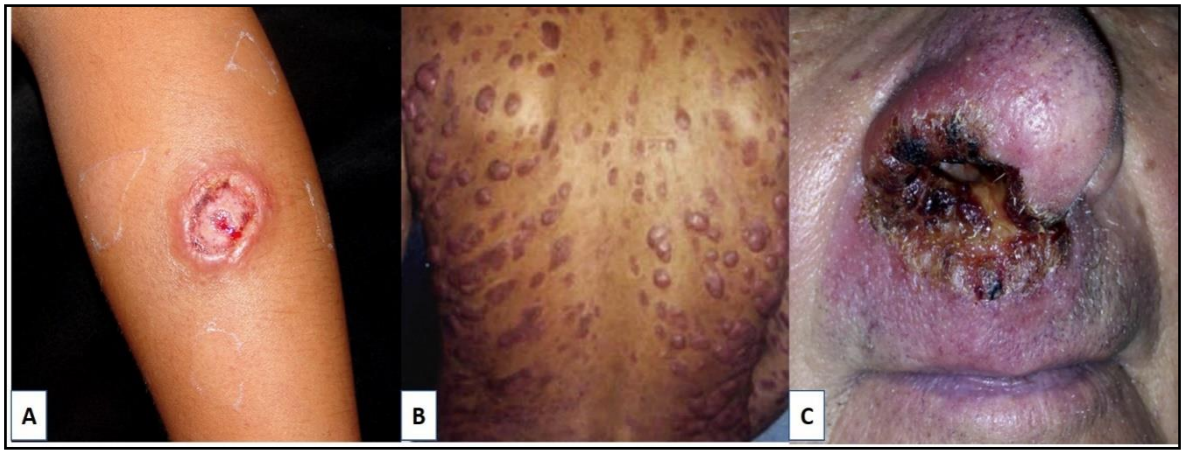


Figure I.2. Formes cliniques des leishmanioses cutanées :
A, LCL ; B, LCD (Torres-Guerrero et al., 2017) ; C, LCM (Burza et al., 2018)
par permission d'Elsevier

- **Leishmaniose viscérale (LV)**

La LV également appelée « kala-azar » est la forme la plus grave, elle est mortelle si elle n'est pas traitée (Abongomera et al., 2020). Contrairement à la LC, les parasites inoculés et ingérés par les phagocytes seront transportés vers les organes lymphoïdes en particulier le foie, la rate et la moelle osseuse à travers le système sanguin et lymphatique en causant une hépatosplénomégalie et une anémie (Ready, 2014). Le patient présente également des symptômes de l'infection systémique persistante qui incluent des poussées irrégulières de fièvre, fatigue, faiblesse, perte d'appétit et perte de poids (Sundar et Rai, 2002). D'après une étude récente menée par Bispo et al. (2020), une atteinte pulmonaire lors de la LV a été prouvée, ce qui indique que l'implication du système respiratoire et des altérations tomographiques dans la symptomatologie de la LV mérite une grande considération.

En outre, de nombreux travaux ont porté sur l'étude des cas asymptomatiques de la LV en raison de vérifier s'ils jouent un rôle dans la transmission de cette parasitose. Ibarra-Meneses et al. (2020) ont rapporté que dans les régions endémiques de la LV, les individus asymptomatiques représentent entre 25-80% des cas. La capacité de ces individus à se comporter comme un réservoir de *Leishmania* a été prouvée chez les donneurs du sang (Ortalli et al., 2020), et chez les candidats à transplantation rénale (Comai et al., 2020). Ceci favorise la propagation de la LV et complique de plus en plus sa prise en charge.

- **Leishmaniose cutanée post-kala-azar (LCPK)**

La LCPK est une forme de la leishmaniose qui se développe chez environs 2,5 à 20 % des patients guéris de la LV (Gedda et al., 2020). Elle apparait sous forme des lésions comprenant des macules hypo-pigmentées, papules et nodules (Figure I.3) (Zijlstra et al., 2020). La LCPK est difficile à

éliminer car les patients ne sont pas systématiquement malades et cherchent rarement un traitement (Goyal et al., 2020). Cependant, ils sont considérés comme une source potentielle de contamination des phlébotomes et donc d'infestation par *Leishmania* (Le Rutte et al., 2019; Mondal et al., 2019).



Figure I.3. Patient présentant une forme sévère de la LCPK (Burza et al., 2018), par permission de Elsevier

I. 3. Traitement des leishmanioses et résistance

Depuis les années 1920, le traitement de première intention des leishmanioses s'est basé sur les antimoniés pentavalents tels que le stibogluconate de sodium (Pentostam®) et l'antimoniate de méglumine (Glucantime®) (Frézard et al., 2009). Cependant, en usage systémique, ces médicaments possèdent des effets indésirables comme une hypersensibilité, des problèmes gastro-intestinaux, et une accumulation toxique dans le foie, la rate et les reins ce qui provoque des insuffisances hépatiques et rénales (Seifert et Croft, 2006). De plus, les antimoniés peuvent êtres cardiotoxiques comme ils peuvent produire des arythmies (Chakravarty et Sundar, 2019). En effet, le mécanisme d'action des antimoniés pentavalents reste encore peu clair, plusieurs études ont essayé d'élucider ce mécanisme en démontrant qu'il nécessite une conversion intracellulaire de l'antimoine pentavalent (Sb V) en antimoine trivalent (Sb III) actif. Cette conversion se fait par les enzymes de l'hôte tout en inhibant la synthèse de l'ATP chez le parasite (Berman et al., 1985). D'autres études ont démontré que Sb III inhibe la trypanothione réductase chez *L. donovani*, alors que Sb V inhibe son ADN topoisomérase de type I (Cunningham et Fairlamb, 1995 ; Chakraborty et Majumder, 1988 ; Walker et Saravia, 2004). Cependant, plusieurs souches de *Leishmania* ont démontré une résistance à ces dérivés (Lira et al., 1999), ce qui a été confirmé par l'échec du traitement clinique (Sundar et al., 2000). Par conséquent, d'autres médicaments ont remplacé les antimoniés pentavalents tels que l'amphotéricine B, la pentamidine, la paromomycine, la miltefosine, les azolés et les nitroimidazoles en adaptant la posologie et le mode d'administration

en fonction de la forme de leishmaniose en question (Chakravarty et Sundar, 2019 ; Roatt et al., 2020). De nombreuses recherches ont montré l'efficacité de ces molécules et ont décrit le mécanisme d'action vis-à-vis de différentes souches de *Leishmania in vitro* et *in vivo*. En effet, l'amphotéricine B (Amp B) est le médicament le plus efficace et par conséquent c'est le plus étudié dans le développement des formulations antileishmaniose et de stratégies d'administration (Lanza et al., 2019). Son activité antileishmanienne a été attribuée principalement à l'augmentation de la perméabilité membranaire causée par l'ouverture des canaux ioniques et des pores aqueux lors de sa fixation sur l'ergostérol membranaire des leishmanies ce qui conduit à une perte de composés intracellulaires, déclenchant ainsi la lyse et la mort du parasite (Cohen, 2016). L'Amp B peut également agir sur les macrophages en stimulant leur production et en augmentant leur capacité phagocytaire (Kumar Singh et al., 2020).

En plus de l'Amp B, l'administration de la miltefosine (MF) a présenté une grande avancée dans le traitement de la leishmaniose car c'est le premier et le seul médicament oral (Reimão et al., 2020), son mécanisme d'action cible la modification des voies de la synthèse de la membrane cellulaire, l'altération du fonctionnement de la mitochondrie et la fragmentation de l'ADN menant à déclencher des processus de la mort cellulaire programmée chez *Leishmania* (Verma et Dey, 2004 ;Verma et al., 2007). Cependant, après l'émergence de la résistance et de la toxicité de la MF, son utilisation a été recommandée uniquement en association avec d'autres médicaments (van Griensven et Diro, 2019).

En effet, les schémas d'association comprenant les différents médicaments destinés au traitement de la leishmaniose ont été révélés efficaces, moins toxiques et moins coûteux (Basile et al., 2020). Auparavant, Seifert et Croft (2006) ont démontré que la combinaison de la MF et l'Amp B a augmenté le potentiel inhibiteur contre *L. donovani in vitro* et *in vivo*. Récemment, ce résultat a été confirmé cliniquement, où des patients traités par des injections contenant la MF et la forme liposomale de l'Amp B ont causé une réduction rapide de la charge parasitaire avec un taux de guérison de 100% par rapport à l'injection de la MF seule (Ramesh et al., 2020). Dans ce contexte, Sundar et Singh (2018) ont recommandé l'utilisation des mélanges dans le traitement de la leishmaniose comme étant une stratégie alternative efficace pour diminuer le coût et la durée du traitement, réduire les effets secondaires, et retarder la résistance aux médicaments.

En plus de la thérapie combinée, d'autres travaux ont discuté le progrès apporté par l'encapsulation des médicaments dans le traitement de la leishmaniose par différents types de nanoparticules tels que les nanoparticules métalliques, polymères, liposomes et solides lipides (Nilforoushzadeh et al., 2019 ; Esfandiari et al., 2019 ; Parvez et al., 2020). En fait, la formulation

liposomale est l'approche la plus étudiée cliniquement surtout celle de l'Amp B (Ambisome®). Dans une étude rétrospective, l'efficacité de l'Amp B liposomique dans le traitement de la LC chez 24 enfants a été prouvée (Solomon et al., 2014). De plus, Lucero et al. (2015) ont démontré que le taux de guérison a dépassé 95% chez les patients ayant une LV, tandis que dans une étude prospective, l'administration de l'Amp B liposomique a été bénéfique dans le traitement des lésions causées par la LDPK (Den Boer et al., 2018). Certes, l'Amp B liposomique (Ambisome®) s'est avéré plus efficace et moins toxique, mais son coût élevé rend son utilisation difficile surtout dans les pays en voie de développement. De plus, l'Amp B a montré son échec thérapeutique chez un cas de LC, et n'a montré un effet qu'à forte dose, ce qui va stimuler sans doute les réactions toxiques (Kosaka et al., 2020).

Néanmoins et malgré les avancées de la science, la problématique de résistance, de toxicité et du coût élevé persiste toujours, ce qui rend la liste des molécules antileishmaniennes de plus en plus restreinte (de Souza et al., 2020), car en plus du médicament lui-même, il existe plusieurs autres facteurs qui peuvent conduire à l'échec du traitement comme, par exemple, des facteurs intrinsèques à l'hôte et au parasite. A titre d'exemple, la résistance de *L. donovani* vis-à-vis de l'Amp B s'est liée à la sécrétion de nouvelles protéines régulatrices comme mécanisme adaptatif du parasite (Garg et al., 2019), alors que dans une autre étude cette résistance s'est liée à la présence d'une quantité élevée de stigmastérol chez les souches résistantes (Bansal et al., 2020).

I. 4. Pathogénicité et virulence

La multiplicité des tableaux cliniques de la leishmaniose est due essentiellement à la diversité des espèces et des souches de *Leishmania*, ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte infesté tout en influençant le spectre de pathogénicité, de virulence et de résistance (Bañuls et al., 2007). En effet, la virulence de *Leishmania* ou de tout agent infectieux mesure l'intensité de son pouvoir pathogène.

- **Facteurs liés à *Leishmania***

Les leishmanies sont des parasites connus par une plasticité génétique très importante, ce qui rend difficile de concorder les profils génétiques avec les manifestations cliniques, même en utilisant les techniques avancées de la biologie moléculaire. Par conséquent, les recherches se sont concentrées sur les facteurs et les marqueurs génétiques directement liés à la virulence (Bañuls et al., 2007). Parmi ces facteurs, les leishmanies sécrètent et/ou expriment à leur surface un réseau de glycanes impliqués dans leur survie. L'une des molécules la plus importante est le lipophosphoglycane (LPG) très abondant dans la surface des promastigotes, mais faiblement

exprimé par les amastigotes (Azevedo et al., 2020). Cette molécule a contribué, depuis longtemps, à l'invasion et à la survie de *Leishmania* dans la cellule hôte en modulant la signalisation des macrophages (Späth et al., 2003) dont les mécanismes ont été associés à l'induction d'une gamme de réponses pro-inflammatoires, y compris la prostaglandine E2 (PGE2), la libération de l'oxyde nitrique (NO), l'augmentation de la formation de gouttelettes lipidiques et l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Lima et al., 2017). Récemment, grâce au LPG *L. donovani* a pu réguler la synthèse et la production de la chimiokine multifonctionnelle (CXCL16) par les macrophages, contrairement à une souche déficiente en LPG. Certes, la production de la CXCL16 est un mécanisme de défense de l'hôte pendant l'infection, mais la subversion du système de chimiokine est une stratégie de survie adoptée par *Leishmania* (Chaparro et al., 2019). De plus, un modèle de *L. infantum* déficient pour le gène LPG-2 impliqué dans la synthèse des phosphoglycanes a permis de renforcer l'importance du LPG entant que facteur de virulence (Jesus-Santos et al., 2020). Cependant, dans une étude comparative de l'activation des macrophages par *L. infantum*, *L. braziliensis* et *L. amazonensis*, le LPG seul n'a pas été un déterminant pour l'activation, contrairement à la glycoprotéine 63 (GP63) (Nogueira et al., 2020). En effet, la GP63 ou la leishmanolysine est une métalloprotéase qui participe avec le LPG à la protection contre la lyse par le complément, alors que lorsqu'elle est libre, elle permet la dégradation de la matrice extracellulaire en favorisant le rapprochement des promastigotes et des cellules phagocytaires (Isnard et al., 2012). D'une manière plus spécifique, Arango Duque et al. (2019) ont dévoilé le mécanisme par lequel LPG et GP63 participent à manipuler les macrophages, et ont montré qu'après phagocytose, ces molécules sont libérées dans la surface de *Leishmania* et redistribuées au réticulum endoplasmique des macrophages entrainant une perturbation entre le réticulum et l'appareil de Golgi, ce qui inhibe la sortie de LPG et GP63 de la vacuole parasitophore et atténue le clivage des protéines de l'hôte par la GP63.

Afin d'analyser le rôle de la GP63 toute seule dans la virulence de *L. major*, des mutants déficients en leishmanolysine ont été utilisés pour infester des souris BALB/c. Les mutants déficients en cette protéine ont significativement retardé le développement des lésions par rapport aux promastigotes de type sauvage. Cependant, les manifestations cutanées ont été réapparues lors de la réintroduction d'un gène cloné de la GP63 (Joshi et al., 2002). En revanche, il a été conclu que la glycosylation des protéines chez *Leishmania* est impliquée dans la virulence, l'invasion des cellules hôtes et la modulation de la réponse immunitaire des mammifères (Mule et al., 2020).

Parmi les autres protéines impliquées dans la virulence de *Leishmania*, s'ajoutent les cystéines protéases (CPs) qui contribuent à l'inactivation des enzymes protéolytiques de la cellule hôte et la prolifération parasitaire par production de cytokine (Hide, 2004). La contribution des protéines membranaires dans la virulence de *Leishmania* est un sujet qui est toujours en recherche. Récemment, Oliveira et al. (2020) ont comparé la composition de la membrane plasmique de *L. amazonensis* et *L. infantum* et ont révélé que pour les deux espèces, la membrane est très riche en protéines associées à des fonctions distinctes. À cet égard, les protéines de *L. infantum* ont été liées aux processus métaboliques, tandis que les protéines de *L. amazonensis* ont été impliquées dans la transduction du signal.

Cependant, la virulence de *Leishmania* spp. peut intervenir d'autres mécanismes, surtout pour la forme amastigote qui exprime faiblement le LPG et la GP63. A titre d'exemple, *Leishmania* a développé plusieurs stratégies d'échappement au stress oxydatif. Les amastigotes de *L. donovani* ont pu neutraliser la réponse de l'hôte en régulant l'expression des protéines A2 responsables de l'abaissement des espèces réactives de l'oxygène. L'utilisation d'un model A2-deficient a souligné l'implication de ces protéines dans la virulence et la résistance de *L. donovani* en lui permettant de survivre dans les organes internes de l'hôte mammifère et de causer la forme viscérale (McCall et Matlashewski, 2012). Une étude récente a mis en évidence une nouvelle voie d'échappement au stress oxydatif où Vivarini et Lopes (2020) ont montré que l'activation, l'expression et la régulation de Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) par *Leishmania* et l'un des facteurs fondamentaux pour réussir l'infestation parasitaire en protégeant les cellules contre ce stress.

- **Facteurs liés à l'hôte**

La réponse immunitaire de l'hôte joue également un rôle dans la virulence et la pathogénicité de *Leishmania*. Eradiquer le parasite ou établir l'infestation seront en quelques sortes décidés par la capacité ou non de *Leishmania* à moduler les réactions immunitaires de l'hôte. Ceci diffère selon les protéines leishmaniennes en présence et la nature des cytokines et chimiokines secrétées qui dépendent eux même des cellules immunitaires activées, à savoir les neutrophiles, les cellules dendritiques et les macrophages. A titre d'exemple, l'activation des macrophages par la cytokine IL-15 induit la mort des parasites en favorisant la production de la cytokine IL-12 (Milano et al., 2002) nécessaire pour l'activation des cellules Th1 (León et al., 2007). Inversement, l'activation des macrophages par les cytokines IL-4 ou Il-10 favorise la survie intracellulaire des parasites (Vouldoukis et al., 1997). Il est par conséquent évident que la réponse immunitaire générée par *Leishmania* est multicellulaire, et les cytokines présentes sont des médiateurs clés de sensibilité

ou de résistance de l'hôte vis-à-vis de *Leishmania* (Oghumu et al., 2015). Cependant, cette réponse immunitaire lorsqu'elle est intense ou exagérée, elle peut contribuer à la propagation de l'infestation. L'utilisation du model animal a permis de mieux comprendre cet aspect, il a été démontré que l'infiltration des neutrophiles et le taux élevé des cytokines pro-inflammatoires ont été associés à l'inflammation, les douleurs et le stress oxydatif chez des souris BALB/c infestés par *L. amazonensis* (Crupi et al., 2020). L'implication de la production accrue de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines dans la manifestation de la LCL a été confirmé (Chanyalew et al., 2020).

- **Interactions *Leishmania*-macrophages**

Les patterns entre les données décrites ci-dessus, indiquent que la vie intracellulaire du parasite dans les macrophages est un déterminant essentiel de la virulence. Bien que *Leishmania* infeste différentes cellules, un rôle important est attribué aux macrophages, cible principale de *Leishmania* (Loría-Cervera et Andrade-Narvaez, 2020). Ce type d'interaction a été largement étudié de point de vue métabolique, car les amastigotes ont des besoins nutritionnels complexes par rapport aux autres pathogènes intracellulaires (Naderer et McConville, 2008 ; Bodhale et al., 2020). En fait, le stade prolifératif majeur de *Leishmania* réside dans les phagolysosomes matures de l'hôte où l'acquisition de nutriments se fait probablement par fusion entre la vacuole parasitophore contenant les espèces de *Leishmania* et les lysosomes de la cellule hôte (Real et Mortara, 2012 ; Cojean et al., 2020), ce compartiment est riche en éléments essentiels et en source de carbone tels que les acides aminés, les purines, les vitamines et les lipides mais pauvre en sucres nécessaires pour la survie du parasite (McConville et Naderer, 2011). Etant donné que les leishmanies sont des auxotrophes pour beaucoup de ces acides aminés et des sucres, ils doivent donc les adopter ou les synthétiser à partir des macrophages. Par conséquent, les acides gras venant des lipides de l'hôte peuvent remplacer les sources de carbone pour la vie intracellulaire. L'ensemble de ces substrats, disponibles par activation des macrophages, est donc crucial pour le maintien et la virulence de *Leishmania* (Podinovskaia et Descoteaux, 2015).

I. 5. Mort cellulaire programmée chez *Leishmania*

La mort cellulaire programmée (PCD) est un processus génétiquement contrôlé et indispensable au maintien et au développement des organismes multicellulaires. C'est un mécanisme homéostatique qui permet l'élimination des cellules mortes sans causer de dommages aux cellules environnantes, évitant ainsi l'inflammation et toute réponse immunitaire conséquente (Conradt, 2009). La PCD peut se produire également en tant qu'une réponse immunitaire ou lorsque les

cellules sont endommagées par un agent nocif (Norbury et Hickson, 2001). Malgré les controverses des dix dernières années à propos de l'existence de la mort cellulaire programmée par apoptose chez les organismes unicellulaires comme les protozoaires, le terme « apoptose » est maintenant largement accepté comme un mécanisme fondamental de la mort cellulaire chez les organismes, comme les kinétoplastidés (Pérez Martín, 2008). Deux voies apoptotiques principales ont été décrites dans les cellules de mammifères ; la voie extrinsèque qui implique l'activation des récepteurs de la mort, et la voie intrinsèque activée par des signaux intracellulaires, dont le point de control principal est la mitochondrie ainsi que les molécules pro/anti apoptotiques, ce qui conduit dans les deux cas à l'activation d'une cascade de protéines spécifiques (Basmaciyan et al., 2018). En outre, chez *Leishmania*, de nombreuses études ont participé à une meilleure compréhension des caractéristiques de l'apoptose et ont révélé que ce processus a fait intervenir plusieurs acteurs moléculaires qui s'accompagnent des modifications morphologiques caractéristiques tels que, entre autres, la perméabilité de la membrane plasmique, la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN, l'altération de la perméabilité membranaire de la mitochondrie résultant en la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$), ainsi que l'augmentation du niveau intracellulaire d'oxydants (Lee et al., 2002 ; Deponte, 2008) (Figure I.4).

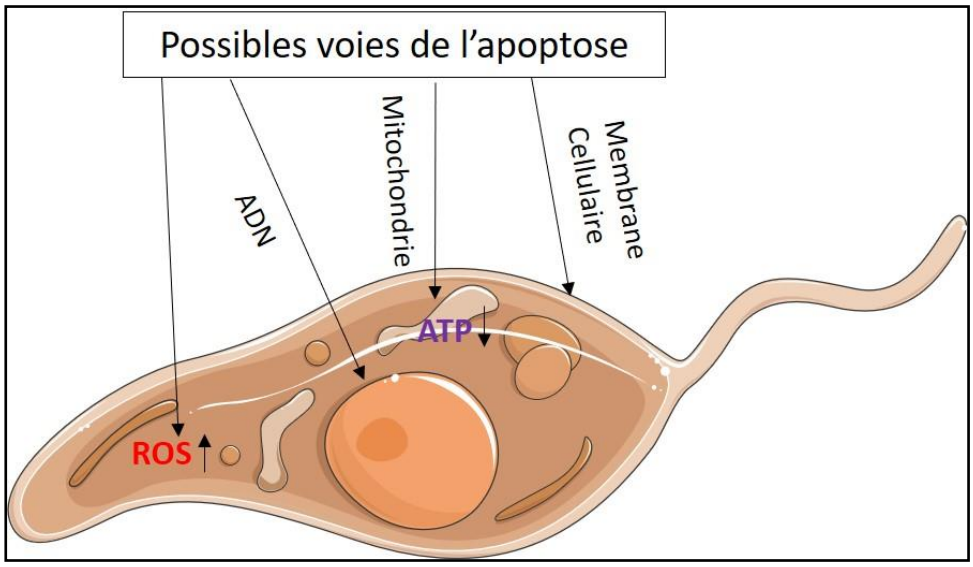


Figure I.4. Possibles voies de la PCD via apoptose chez *Leishmania* (par Zeouk, 2021).

Chez *Leishmania*, les mécanismes d'apoptose jouent un rôle important dans la biologie de ces protozoaires. Dans l'intestin du phlébotome, l'apoptose semble réguler la population parasitaire en éliminant la forme procyclique consommatrice des nutriments essentiels trouvés en quantité limitée en faveur de la forme métacyclique infestante et appropriée pour la propagation de la maladie sous le concept de « altruisme égoïste ». Cependant, la régulation de la densité parasitaire

par apoptose au sein de l'hôte dépend de la capacité du parasite à s'échapper au système immunitaire pour éviter l'hyperparasitisme qui tuerait l'hôte et empêcherait ainsi la transmission du parasite (Basmaciyan et Casanova, 2019). Il a été montré que les pathogènes intracellulaires comme *Leishmania* peuvent induire l'apoptose pour déjouer le système immunitaire, comme ils peuvent inhiber l'apoptose pour protéger leur niche intracellulaire (Thi et al., 2012). Ce constat d'interférence entre *Leishmania* et le processus apoptotique dépend de la balance par laquelle *Leishmania* module les vois apoptotiques des macrophages humains mais surtout du stade de l'infestation (Rai, 2016). Dans un but curatif et non préventif, induire de l'apoptose par des agents antimicrobiens chez la forme infestante de *Leishmania* constitue alors une approche thérapeutique prometteuse. Effectivement, l'apoptose a été déclenchée chez *Leishmania* en réponse à divers traitements tels que l'antimoine, la MF et l'Amp B. Plus précisément, il a été montré que ces composés ont induit au moins l'une des caractéristiques de l'apoptose telle que l'accumulation d'oxydants (Moreira, 2011). Dans une autre étude, López-Arencibia et al. (2017) ont montré que chez *Leishmania*, le traitement par la périfosine a réduit le potentiel de la membrane mitochondriale et a diminué le taux de production de l'ATP cellulaire tout en augmentant l'externalisation de la phosphatidylsérine. Cependant, ce médicament n'a pas altéré la perméabilité membranaire. D'une manière similaire pour ces médicaments, la cascade d'événements activant la PCD via apoptose chez *Leishmania* par les composés bioactifs d'origine naturelle a été prouvée, le traitement de *Leishmania* par les métabolites de type withanolide isolés de la plante *Withania aristata* a déclenché des évènements typiques de l'apoptose à savoir la diminution de la dépolarisation de la membrane mitochondriale et de la production de l'ATP, l'augmentation du taux de régénération des ROS, la condensation de la chromatine et l'augmentation de la perméabilité membranaire (López-Arencibia et al., 2019).

II. *Staphylococcus aureus*

II.1. Définition

S. aureus ou Staphylocoque doré est un Cocci à Gram positif disposé en grappe qui n'a cessé d'occuper une place importante en pathologie. Il s'agit d'une bactérie cosmopolite, mais son réservoir essentiel est l'Homme où elle vit surtout à l'état commensal au niveau des zones cutanées humides (périnée, aisselles), des muqueuses et des fosses nasales (Freeman-Cook et Cook, 2006). Cependant, ces bactéries peuvent devenir de redoutables agents pathogènes et ce n'est qu'après une altération de l'architecture cutanée normale qu'une infection invasive se produit (Archer, 1998). Contrairement aux leishmanies, le mode de transmission des staphylocoques est plus large. Autrement dit, il n'y a pas un cycle de transmission bien déterminé.

L'air, la poussière, la literie, les couvertures, le matériel médical, les aliments et les mains sont autant d'objets disséminateurs de staphylocoques soulignant alors une transmission intra et interhumaine (Robinson et al., 2019 ; Chow et al., 2020). Il est aujourd'hui admis que *S. aureus* est l'une des bactéries les plus dangereuses dont la transmission est à la fois communautaire et nosocomiale, ce qui conduit à la propagation de nombreuses infections qui peuvent être graves et difficiles à traiter.

II.2. Effets pathogènes

Malgré l'augmentation des infections causées par le genre *Staphylococcus*, *S. aureus* demeure l'espèce la plus redoutable. En effet, *S. aureus* est une bactérie pyogène et toxinogène dont les infections peuvent aller des infections cutanées, qui sont faciles à traiter, aux autres pathologies invasives, qui sont beaucoup plus difficiles à traiter voire mortelles. Contrairement à *Leishmania*, *S. aureus* peut infecter la peau, les voies respiratoires, digestives, urinaires et reproductives et peut provoquer de graves infections du cœur et des os.

- **Infections cutanées**

Selon Moran et al. (2006), *S. aureus* est responsable de 76% des infections de la peau et des tissus mous. Les infections cutanées principales causées par *S. aureus* comprennent parmi d'autres l'impétigo, la folliculite, le furoncle et l'abcès cutané (Figure I.5).

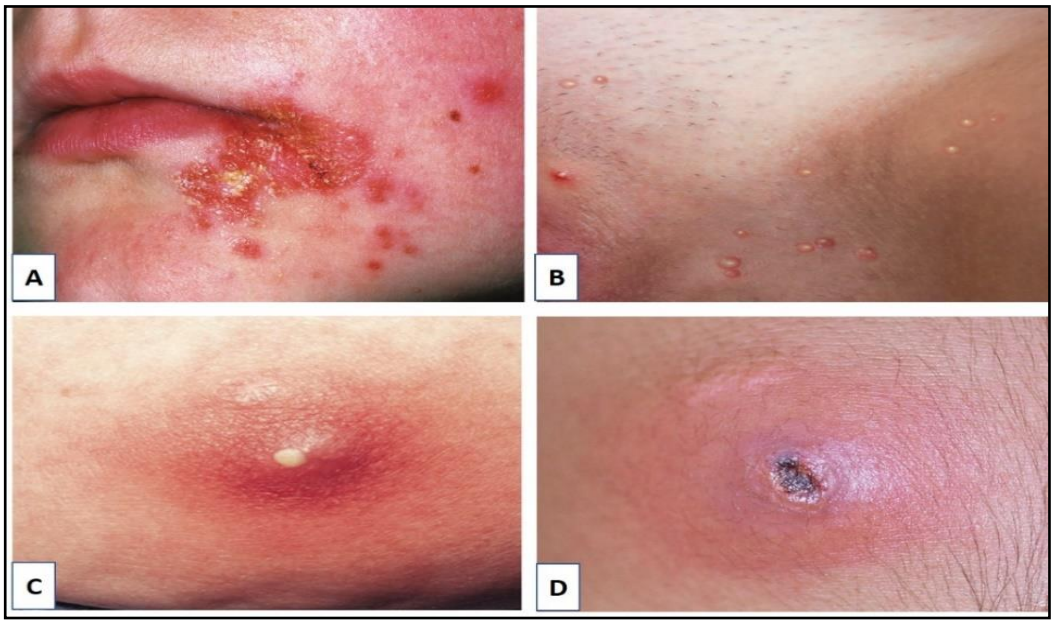


Figure I.5. Les principales manifestations cutanées à *S. aureus* :
A, Impétigo (Chaplin, 2020) ; B, Folliculite (Selk et Wood, 2019);
C, Furoncle (Lawrence et al., 2015) ; D, Abcès cutané (Del Giudice, 2020)

Le tableau clinique de ces infections est différent ; l'impétigo se présente sous forme de pustules, vésicules ou bulles fragiles au niveau superficiel, le plus souvent au pourtour de la bouche ou du nez, au menton ou derrière les oreilles. Il peut aussi atteindre le tronc, les fesses ou les mains. Ces lésions deviennent rapidement enflammées et forment des croûtes ayant une couleur de miel (Figure I.5, A). C'est une infection contagieuse survenant principalement chez l'enfant, mais aussi chez l'adulte en cas de déficiente immunitaire (Lawrence et Nopper, 2012). La folliculite se manifeste par de petites papules, avec une pustule centrée par un poil associé à un érythème périfolliculaire (Figure I.5, B). Toutes les parties du corps peuvent être affectées, tels que les cuisses, périnée, bras, dos, et paupière (Selk et Wood, 2019). La forme profonde et nécrosante de la folliculite avec atteinte du follicule pilo-sébacé dans son intégralité, est dite furoncle (Figure I.5, C) qui se présente sous forme d'une papule ou d'un nodule inflammatoire douloureux centré autour d'une pustule (Del Giudice, 2020). Le furoncle a un aspect proche de l'abcès cutané (Figure I.5, D) qui se présente également sous forme d'un nodule ou d'une masse érythémateuse, parfois avec une pustule centrale et drainage spontané du pus, mais qui n'a pas de localisation privilégiée (Kobayashi et al., 2015). Par conséquent, Del Giudice (2020) a insisté sur la considération des infections cutanées à *S. aureus* comme un groupe complexe de maladies dont le spectre clinique est très varié.

Par ailleurs, les abcès cutanés sont les manifestations les plus fréquentes de *S. aureus* et les plus dangereuses, car lorsqu'elles sont pyogènes, elles peuvent se former dans des tissus plus profonds comme les muscles sous-jacents, puis les bactéries peuvent se disséminer pour former des abcès dans tout le système organique interne (Kobayashi et al., 2015). Dans une étude rétrospective, Rochet et al. (2020) ont montré que les consultations dans les services d'urgence pour les abcès cutanés ont beaucoup augmenté et que *S. aureus* a été l'agent pathogène responsable de 73% de ces infections. De plus, Ismail et al. (2020) ont décrit une large épidémie d'abcès cutanés chez les employeurs de mine d'or au Sud d'Afrique. Une souche de *S. aureus* producteur de LPV a été l'agent responsable de cette épidémie, à cause des contaminations croisées résultantes de mauvaises pratiques d'hygiène.

- **Infections profondes**

S. aureus est responsable de pneumonies qui peuvent être de pronostic grave surtout celles correspondant à une infection nosocomiale (pneumonie nosocomiale) (Grousd et al., 2019). Dans une étude récente chez un personnel de santé, il a été démontré que la colonisation de la salive par *S. aureus* est une cause fréquente de pneumonie et que le milieu buccal agit comme un réservoir

potentiel pour l'infection des voies respiratoires inferieures et le développement des pneumonies (Chiang et al., 2020).

Une autre pathologie causée par cette bactérie est la méningite, une étude rétrospective a mis en évidence que lorsque causée par *S. aureus,* la méningite a des conséquences cliniques dévastatrices et des taux de mortalité élevés (36%) à cause des options thérapeutiques limitées (Aguilar et al., 2010).

Parmi les autres pathologies les plus graves, se trouvent l'ostéomyélite (une infection localisée de l'os) et l'endocardite (une infection des valves cardiaques). Il a été démontré que lors d'une ostéomyélite, *S. aureus* a présenté 60,5% des cas positifs en culture (Weiss et al., 2020). De plus, une autre étude a confirmé la forte prévalence de l'ostéomyélite staphylococcique avec 85,1% des cas (Silago et al., 2020). Selon Urish et Cassat (2020), le traitement de l'ostéomyélite est en grande partie inchangé au cours des dernières décennies et se concentre sur une antibiothérapie personnalisée avec correction des comorbidités médicales. Ainsi, la majorité des cas de l'ostéomyélite ont été associés à de grandes collections purulentes profondes nécessitant un débridement chirurgical (Kok et al., 2018), ce qui complique de plus en plus la prise en charge des patients.

En revanche, *S. aureus* est l'agent causal principal de l'endocardite infectieuse associée à des taux de mortalité et des événements emboliques élevés (Selton-Suty et al., 2012). Il a été noté que cette infection est mortelle dans 20% à 65% des cas, et les patients survivants souffrent des séquelles permanentes à cause de l'invasion locale des structures cardiaques (Murray, 2005).

En plus des atteintes organiques, le caractère ubiquitaire de *S. aureus* augmente le risque de son passage dans le sang à partir de différents foyers primaires en causant une septicémie d'origines distinctes à savoir cutanées, urinaires, dentaires et autres. En effet, la septicémie à SARM a été rapportée pour la première fois comme l'étiologie sous- jacente d'une nécrose œsophagienne aiguë (Bawazir et Mustafa, 2020).

Dans l'ensemble de ces pathologies, une infection pourrait être la complication de l'autre qui est un comportement pathologique fréquemment observé chez *S. aureus*. Dans ce sens, Al-bayati et al. (2020) ont rapporté que les infections de la peau et des tissus mous par *S. aureus* causent une complication inhabituelle de bactériémie persistante qui entraine elle-même une endocardite compliquée en plus d'une affinité de la souche en cause pour l'ostéomyélite vertébrale. Plusieurs études ont documenté le risque de l'endocardite comme étant une complication de la bactériémie et ils ont confirmé qu'il s'agit d'une complication très sévère (Bouchiat et al., 2015 ; Andersen et al., 2020). De plus, Grillo et al. (2020) ont montré que la bactériémie elle-même peut provenir des

infections urinaires à cause de sondage et de cathétérisme, ce qui entraine une mortalité importante en tenant compte que dans un grand nombre de cas, les souches de SARM ont été les plus identifiées. Par conséquent, il est nécessaire de s'assurer de l'éradication complète des infections à *S. aureus* et surtout celles cutanées.

En effet, la capacité de l'ensemble de ces infections à engager ou non un pronostic vital dépend de plusieurs facteurs, en particulier la nature virulente de la souche en question, la réponse immunitaire de l'hôte et l'intensité de résistance au protocol utilisé des antibiotiques. Une multitude des études a confirmé que le taux des infections dans le monde entier augmente progressivement avec l'augmentation de la résistance aux médicaments et que le traitement anti-infectieux clinique des souches résistantes est devenu plus difficile, surtout devant une réponse immunitaire modulée par la bactérie (Guo et al., 2020 ; Scudiero et al., 2020).

II.3. Antibiothérapie et résistance de *Staphylococcus aureus*

Depuis longtemps, le traitement des infections à *S. aureus* s'est basé sur différentes familles d'antibiotiques, parmi lesquelles trois sont qualifiées de majeures à savoir les bêtalactamines, les aminosides, et les macrolides (Taylor, 2013). Cependant, *S. aureus* est doté d'une grande capacité d'adaptation à son environnement, il possède une habilité remarquable à acquérir une résistance aux différents antibiotiques avec d'abord l'apparition de la résistance à la pénicilline qui a été tellement prévalente que l'antibiotique n'est plus efficace pour le traitement des infections, plus de 90% des souches sont résistantes (Lowy, 2003). Cette résistance s'est produite parce que, sous une utilisation massive et sélective de l'antibiotique, certaines souches de *S. aureus* expriment des pénicillinases capables d'hydrolyser le site actif bêta-lactame du médicament (Khoshnood et al., 2019). C'est pour cette raison que les scientifiques ont développé une nouvelle pénicilline semi-synthétique capable de résister à l'hydrolyse des bêta-lactamases staphylococciques, c'est la méthicilline (Pottinger, 2013). Cependant, *S. aureus* a rapidement développé plusieurs souches résistantes (SARM) caractérisées par une protéine de liaison à la pénicilline modifiée (PBP2a/c) et qui perd son affinité pour la plupart des antibiotiques appartenant à famille des bêtalactamines (Gajdács, 2019). Cette résistance à large spectre est due essentiellement aux gènes *mecA* et *mecC*, situés sur la cassette chromosomique staphylococcique mec (SCCmec) (Paterson et al., 2014).

Bien que SARM constitue le pathogène majeur identifié lors des pathologies nosocomiales, il est le germe le plus isolé également durant des infections communautaires. Cette propagation a poussé Moran et al. (2006) à suggérer que parmi toutes les infections à staphylocoques, une proportion majeure est causée par le SARM. Cette suggestion a été très largement confirmée dans la plupart des infections cutanées, internes et viscérales précédemment décrites.

A titre d'exemple, dans une étude menée chez un personnel militaire contractant des infections de la peau et des tissus mous, 70% des souches étaient résistantes à la méthicilline (Landrum et al., 2012).

Par conséquent, des recommandations de traitement alternatif anti-SARM ont été élaborées à savoir la vancomycine qui est devenue le pilier de l'antibiothérapie pour de nombreux types d'infections à SARM (Diaz et al., 2017). Son activité est due à sa liaison aux précurseurs de la paroi cellulaire, et non pas au PBP2 (Pottinger, 2013). Cependant, un phénomène d'augmentation graduelle des CMIs (concentrations minimales inhibitrices) a été signalé chez un nombre croissant d'isolats de *S. aureus* menant à l'émergence des souches VISA (Vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*), VRSA (Vancomycin-resistant *S. aureus*) et hetero-VRSA (Ahmad et al., 2018 ; Amberpet et al., 2019).

À cause de cette émergence rapide de résistance de *S. aureus* et la propagation des infections invasives à SARM, d'autres antibiotiques ont été utilisés. Dans une revue récente, Guo et al. (2020) ont documenté l'antibiothérapie anti-SARM et ont rapporté que la daptomycine est efficace dans le traitement des infections cutanées et des bactériémies causées par SARM, mais l'utilisation de cet antibiotique est limitée en cas de pneumonie, car son mécanisme d'action repose sur la destruction du potentiel électrique de la membrane plasmique sans inhiber l'acide lipotéichoïque, et donc en système respiratoire, son activité est bloquée par le surfactant alvéolaire (Taylor et Palmer, 2016). De plus, Roch et al. (2017) ont décrit un cas clinique atteint d'une infection à SARM dont la souche isolée a été résistante à la daptomycine. En effet, les SARM n'ont pas développé une résistance seulement à la daptomycine mais aussi aux tétracycline et ciprofloxacine (Lai et al., 2017).

Récemment, Yamashita et al. (2019) ont mené une étude comparative entre la daptomycine, la vancomycine et l'azithromycine en utilisant un model murin de pneumonie à SARM. Ils ont démontré que le traitement par l'azithromycine après 24h d'infection a été efficace en montrant une survie significativement plus longue et une charge bactérienne faible au niveau des poumons. De ce fait, ils ont suggéré que cet antibiotique peut constituer un agent prophylactique potentiel d'une pneumonie à SARM.

Malgré les efforts intensifiés pour la recherche d'un traitement efficace, le SARM est toujours un facteur important de mortalité et morbidité partout dans le monde. De plus, l'émergence concomitante de résistance est à prévoir. Selon Vestergaard et al. (2019), la multirésistance des SARM a considérablement augmenté les difficultés de la recherche scientifique.

II.4. Facteurs de virulence

L'aptitude pathogène du *S. aureus* dépend de nombreux facteurs de virulence en plus des défenses immunitaires de l'hôte (Figure I.6). Ces facteurs comprennent principalement les exoprotéines telles que les toxines sécrétées (exotoxines) qui perturbent les cellules hôtes et interfèrent avec les réponses immunitaires, et les protéines de surface qui jouent divers rôles dans la pathogenèse comme par exemple l'adhésion, mais qui ne causent pas de toxicité directe chez les tissus de l'hôte (Vincenot et al., 2008).

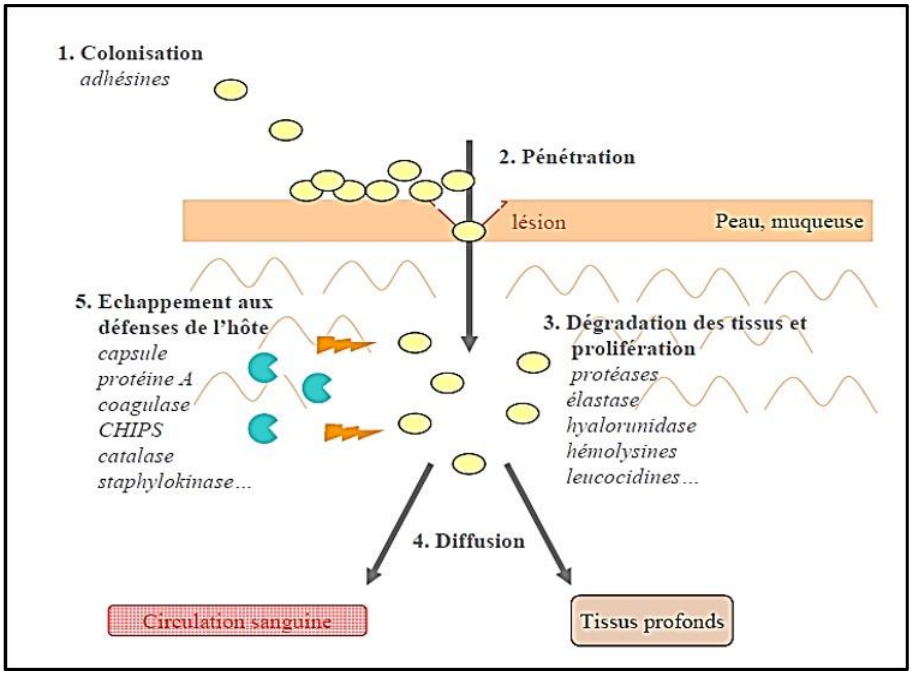


Figure I.6. Les principaux facteurs de virulence associés à une infection à *S. aureus*, d'après (Hiron, 2007)

- **Facteurs liés à *S. aureus***

La physiopathologie des infections à *S. aureus* commence par la colonisation des surfaces en produisant différentes sortes de molécules d'adhésion, les adhésines. Parmi les molécules les plus importantes se trouve la protéine A qui est un facteur primordial à l'établissement des infections (Palmqvist et al., 2002). Selon l'état de la cellule hôte, la protéine A peut agir soit par déguisement de *S. aureus* du système immunitaire de l'hôte en lui permettant de résister à la phagocytose, soit par désactivation complète de la réponse immunitaire humorale, ou par induction des cytokines et chimiokines inflammatoires (Falugi et al., 2013 ; Gonzalez et al., 2019). En plus de la protéine A, certaines souches peuvent former une microcapsule véritable ou élaborer une substance polysaccharidique visqueuse dénommée *slime* (Baselga et al., 1993). Après l'attachement aux tissus de la cellule hôte, *S. aureus* secrète plusieurs enzymes impliquées dans différents

mécanismes tels que la dégradation des tissus de l'hôte, ce qui favorise l'extension du foyer infectieux. Les principaux enzymes extracellulaires incluent parmi d'autres, les protéases, les catalases, les désoxyribonucléases, les lipases, les phosphatases, les hyaluronidases et les coagulases… Récemment, à titre d'exemple, Lehman et al. (2019) ont montré que durant la prolifération des abcès cutanés, les protéases staphylococciques ont joué un rôle important dans la digestion des peptides et des acides aminés nécessaires pour le métabolisme nutritif de *S. aureus*. De plus, la surexpression de ces protéases a été le facteur responsable de la pathogenèse élevée du *Fak* (Fatty acid kinase) lors d'une infection cutanée à *S. aureus* (Ridder et al., 2020). En outre, Treffon et al. (2020) ont conclu d'après leur étude, que les deux superoxydes dismutases (SodA et SodM), typiques de *S. aureus*, favorisent de manière compensatoire la survie de cette bactérie durant la destruction des leucocytes ce qui montre que l'interaction entre ces deux enzymes est à l'origine de la virulence et la persistance de *S. aureus* dans les voies respiratoires et lors des mucoviscidoses, en plus de déclenchement des réactions inflammatoires et la lutte contre le stress oxydant. D'autres enzymes permettent à *S. aureus* de lutter contre les réactions oxydatives, c'est notamment le cas de la catalase qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Mandell, 1975).

Parallèlement, *S. aureus* produit en moyenne quarante exotoxines qui représentent environ 10% du sécrétome total, beaucoup d'entre elles ont des fonctions similaires en raison d'une similitude structurelle remarquable (Tam et Torres, 2018). Selon leurs fonctions, plusieurs études ont montré que les exotoxines se répartissent en trois grands groupes à savoir les cytotoxines qui agissent sur les membranes des cellules hôtes entrainant une lyse cellulaire et une inflammation, les enzymes toxiques qui endommagent les cellules de l'hôte, et les superantigènes qui interviennent dans la production massive de cytokines induisant une prolifération des cellules T et B (Vincenot et al., 2008 ; Tam et Torres, 2018 ; Bennett et Thomsen, 2020). Les principales toxines incluent les hémolysines, les leucocidines, les exfoliatines, les entérotoxines et la toxine du choc toxique (Elisabeth, 2014).

La toxine dite leucocidine de Panton-Valentine (LPV) ou « Panton-Valentine Leukocidin » est mondialement connue pour son rôle potentiel dans la virulence et pour son implication dans les infections invasives. C'est pour cette raison que même si seul 5% des souches de *S. aureus* produisent la LPV, c'est une toxine largement étudiée. En effet, la LPV ne provoque des changements cytotoxiques que dans les monocytes humains et les lapins, car l'activité cytotoxique envers ces cellules est hautement spécifique et cible les récepteurs couplés aux protéines G humaines et celles des lapins (Spaan et al., 2015), c'est pourquoi ces modèles constituent une

bonne approche pour mieux comprendre la complexité et la pathologie médiée par la LPV. Dans ce contexte, plusieurs études ont mis au point des modèles animaux sur les lapins et ont montré que les individus infectés par des souches sauvage LPV+ ont développé des infections plus sévères et des taux de mortalité plus élevés par rapport aux individus infectés par des souches LPV- (Diep et al., 2010 ; Lipinska et al., 2011). En revanche, pour évaluer la production de la LPV lors des infections humaines, Nakaminami et al. (2020) ont mené une étude récente dans laquelle ils ont révélé que les souches productrices de LPV sont largement disséminées dans les infections cutanées et que la gravité de ces infections chez les patients infectés par la LPV+ est plus élevée que celle des patients infectés par LPV-. Cette progression sévère des infections causées par des souches productrices LPV a été confirmée dans la littérature (Petraitiene et al., 2020). Actuellement, Duployez et al. (2020) ont rapporté un cas mortel d'un jeune adulte atteint de la Covid-19 dont la complication de l'infection virale a été due à une pneumonie nécrosante induite par *S. aureus* secrétant la LPV.

La pathogénie de *S. aureus* fait intervenir alors une multitude de facteurs de virulence qui ne se produisent pas au même temps mais leur production est finement coordonnée, ce qui explique le fort pouvoir pathogène de *S. aureus* et la variation de son tableau clinique. Selon Jenul et Horswill (2019), la régulation de ces facteurs par *S. aureus* est soumise à un réseau complexe qui intègre l'hôte et les signaux dérivés de l'environnement. L'un des systèmes de régulation le plus étudié est le gène *agr* qui est un « quorum sensing system » et qui permet à *S. aureus* de découvrir la densité de sa propre population et de traduire cette information en un modèle d'expression génique spécifique afin de contrôler l'expression de ses gènes (Butrico et Cassat, 2020).

- **Interactions hôte- *S. aureus***

Lors d'une infection à *S. aureus*, la reconnaissance de l'agent pathogène se fait par les cellules du tissu infecté. De nombreuses cellules peuvent remplir ce rôle, les macrophages, les monocytes et les neutrophiles constituent des acteurs majeurs dans le control des infections staphylococciques (Accarias, 2014). En effet, la composition de la paroi de *S. aureus* de sa part aussi intervient dans la reconnaissance et le déclenchement de la défense immunitaire de l'hôte (Rockel et al., 2011). Parmi ces composants, les lipoprotéines, l'acide lipotéichoïque (LTA) et le peptidoglycane (PGN) sont les prédominants (Wang et al., 2000 ; Kielian et al., 2002). Plusieurs études ont documenté l'interaction existante entre les composants de la paroi de *S. aureus* et la réponse immunitaire de l'hôte. La synergie entre le LTA et Le PGN mène à la production d'une cascade de cytokines et chimiokines permettant le recrutement des cellules inflammatoires chez l'hôte (Leemans et al., 2003 ; Wu et al., 2020). La protéine A avec le LTA peuvent également stimuler la libération de

ces médiateurs inflammatoires (Gómez et al., 2004 ; Patou et al., 2008). Néanmoins, *S. aureus* est capable de limiter la phagocytose et d'atténuer les réponses pro-inflammatoires de l'hôte, ce qui favorise sa persistance dans le micro-environnement, en modulant surtout les macrophages, voire induire la nécroptose chez ces cellules par les facteurs de virulence précédemment décrits (Josse et al., 2017 ; Grousd et al., 2019). Par conséquent, la bactérie se trouve capable de survivre et de se disséminer dans les phagocytes (Horn et al., 2017).

Ces interactions lorsqu'elles sont régulées et les cytokines secrétées sont ajustées de point de vu équilibre entre celles pro et anti-inflammatoires, les cellules de l'hôte réussissent à phagocyter et détruire la bactérie. Cependant, à l'instar des leishmanies, *S. aureus* comme tout autre agent infectieux peut également déclencher une réponse immunitaire exagérée, lors d'une infection, si par exemple deux cytokines sont sécrétées en quantité trop élevée, elles peuvent participer à une issue fatale (vom Berg et al., 2013). En effet, il a été démontré que la LPV semble avoir un impact majeur dans l'amplification des réponses immunitaires de l'hôte, Huang et al. (2020) ont montré dans un modèle de pneumonie que *S. aureus* producteur de LPV a été responsable de la gravité de la maladie en augmentant l'expression des cytokines pro-inflammatoires. En plus de la production accrue de cytokines, la LPV a été capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte en diminuant l'expression de TFNα (Yoong et Pier, 2012).

En plus des réactions immunitaires, la voie métabolique joue un rôle important dans les interactions entre *S. aureus* et l'hôte. Lopez et al. (2017) ont constaté que grâce au complexe enzymatique *Fak, S. aureus* est capable de détecter des acides gras cis-insaturés spécifiques qui sont très abondants dans le tissu de l'hôte et que *S. aureus* est incapable de produire. Dans le même sens, Potter et al. (2020) ont effectué une analyse complète des besoins métaboliques de *S. aureus* lors d'une ostéomyélite, et ils ont montré que la biosynthèse de l'aspartate représente un nœud métabolique clé pour la survie des staphylocoques pendant l'infection, cette biosynthèse a été largement favorisée par le milieu nutritif de l'hôte. De plus, Delekta et al. (2018) ont prouvé que pendant l'infection, les particules de lipoprotéines humaines constituent une source viable d'acides gras exogènes pour *S. aureus*. Une autre étude menée par Lehman et al. (2019) a montré que lors des abcès, le collagène abondant sur le site de l'infection chez l'hôte peut servir de réservoir de nutriments pour la prolifération de *S. aureus*.

III. Plantes à effet anti-*Leishmania* ou anti-*S. aureus*

L'émergence rapide de la résistance de *Leishmania* et *S. aureus* aux médicaments actuels nécessite le développement de nouveaux agents antimicrobiens présentant un effet notable et une toxicité réduite. Ces agents sont recherchés au niveau de divers produits naturels dont le criblage des métabolites secondaires qui peuvent constituer une source précieuse de molécules thérapeutiques. Parmi ces produits figurent les plantes aromatiques et médicinales dont la pratique de l'ethnomédecine représente la source majeure de la découverte des composés bioactifs. L'utilisation des plantes pour la guérison par les cultures indigènes fait partie des études ethnobotaniques qui semblent être l'approche la plus envisagée en raison du grand nombre de nouveaux composés isolés et caractérisés à partir des plantes largement utilisées par les populations locales (Iwi et Wootton, 2002). Les composés actifs peuvent être découverts avec succès à partir de ces plantes ethnobotaniques en utilisant des tests de criblages biologiques et chimiques modernes. Dans ce sens, Mulzer et Bohlman (2000) ont supposé que les bibliothèques générées par le fractionnement standardisé d'extraits d'origine naturelle représentent les outils les plus précieux pour les programmes actuels de la découverte des nouveaux agents thérapeutiques. L'ensemble de ces données soulignent alors une interdisciplinarité focalisée entre l'ethnobotanique, la pharmacologie et la chimie sous forme de fractionnements bioguidés. Il a été démontré que d'une part, la chance d'obtenir des molécules bioactives non toxiques à partir des plantes largement utilisées dans la médecine traditionnelle est plus grande que celle par un criblage aléatoire (Coulerie, 2012). D'autre part, les essais complémentaires de nature chimique et biologique sur les plantes citées dans l'ethnobotanique seront nécessaires en vue de caractériser les principes actifs et de valider ou non leurs usages traditionnels.

L'approche bioguidée consiste alors à déterminer, à chaque étape de fractionnement chimique d'un extrait de plante, l'activité biologique d'intérêt des différentes fractions obtenues (Elia, 2019). Par la suite, seules les fractions actives feront l'objet d'autres fractionnements chromatographiques plus fins, suivis des tests biologiques pour aboutir à une série de sous fractions, et à l'isolement des composés actifs purs dont les structures seront établies par des techniques spectroscopiques et spectrométriques (Sarker et Nahar, 2012). Le fractionnement bioguidé présente plusieurs avantages comme l'orientation rapide et moins coûteuse vers la fraction active contenant le principe responsable de l'activité biologique (Elia, 2019). De plus, plusieurs études ont montré l'excellente efficacité des fractionnements bioguidés des extraits de plantes dans l'identification des composés doués d'une activité antileishmanienne et antistaphylococcique intéressante et spécifique. Les composés les plus prometteurs sélectionnés

pour leur activité pharmacologique contre *Leishmania* et *S. aureus* ont fait l'objet de l'étude bibliographique ci-dessous.

III.1. Plantes à effet anti-*Leishmania*

De nombreux composés à effet leishmanicide ont été recherchés dans les extraits bruts appartenant à diverses familles phytochimiques (Tableau I.2). Dans une étude récente, un nouveau sesquiterpène glycoside (le quinovoside ester) isolé des fleurs de *Calendula officinalis* a montré une activité prometteuse contre les amastigotes de *L. donovani* avec une CI_{50} de 3,57 µg/ml (Zaki et al., 2020). La classe des sesquiterpènes a été largement rapportée comme une source très riche en composés dotés des activités antiparasitaires. A titre d'exemple, les sesquiterpènes lactones obtenues de la famille des Asteraceae ont montré un pouvoir inhibiteur élevé des amastigotes de *L. infantum* avec des CI_{50s} très faibles (Wulsten et al., 2017). Cette activité a été confirmée dans l'étude menée par Sosa et al. (2016) dans laquelle ils ont prouvé le potentiel antileishmanien des sesquiterpènes lactones, isolées de la famille des Vernoniceae, sur les promastigotes de *L. brasiliensis* et *L. amazonensis.*

D'autres études ont caractérisé des composés actifs à partir des terpènes et terpénoïdes issus de différentes espèces voire différentes familles phytochimiques (Juárez-Vázquez et al., 2020). L'abondance de ces groupes dans la nature mis en place la possibilité d'évaluer différentes propriétés pharmacologiques telle que l'activité antiparasitaire.

En revanche, l'extrait éthanolique de *Piper marginatum* de la famille Piperaceae a montré une activité prometteuse contre les promastigotes (CI_{50}=3,1 µg/ml) et les amastigotes (CI_{50}=1,2 µg/ml) de *L. amazonensis* avec un profil de cytotoxicité très faible et un indice de sélectivité élevée vis-à-vis de la ligné des macrophages. Le fractionnement de cet extrait a permis de mettre en évidence des fractions de polarité différente plus actives contre les promastigotes, et dont la composition chimique a révélé la présence des composés phénoliques et des terpénoïdes. Le phénylpropanoïde, 3,4-Methylenedioxypropiophenone, a constitué le composé majoritaire dans toutes les fractions (Macêdo et al., 2020). De plus, les études phytochimiques menées sur le genre *Piper* ont largement montré une variété importante de composés doués d'une activité leishmanicide très remarquable (Bernuci et al., 2016 ; Varela et al., 2016).

De nombreux composés de la famille des flavonoïdes ont été également identifiés. Andrade et al. (2019) ont montré que les profils chimiques des extraits bruts actifs de *Ziziphus joazeiro* étaient riches en flavonoïdes, les auteurs ont supposé que la forte activité de ces extraits contre le stade promastigote de *L. braziliensis* et *L. infantum* est liée à la présence des flavonoïdes.

Fadel et al. (2018) ont mené un fractionnement bioguidé de l'extrait brut de *Pulicaria inuloides,* où ils ont identifié le flavonol quercetagetin-3,5,7,3-tetramethyl éther comme étant le composé responsable de l'activité contre les promastigotes et les amastigotes de *L. amazonensis*.

Tableau I.2. Extraits des plantes actives contre *Leishmania* spp.

Extraits de plantes	**Famille phytochimique**	**Nature de l'extrait**	**Classe chimique des composés actifs isolés**	**Références**
Piper marginatum Jacq. (Feuilles)	Piperaceae	Ethanolique	Composés phénoliques et terpénoïdes	(Macêdo et al., 2020)
Arrabidaea brachypoda (Racines)	Bignoniaceae	Ethanolique	Biflavonoïdes	(Neuenschwander et al., 2020)
Calendula officinalis L (Fleurs)	Asteraceae		Sesquiterpènes	(Zaki et al., 2020)
Ziziphus joazeiro Mart. (Feuilles et écorce)	Rhamnaceae	Aqueux	Terpénoïdes, flavonoïdes et acides phénoliques	(Andrade et al., 2019)
Croton sylvaticus (écorce)	Euphorbiaceae	Ether de pétrole	Plusieurs familles	(Crentsil et al., 2020)
Cnidoscolus tehuacanensis (Feuilles)	Euphorbiaceae	Hexane	Triterpènes	(Juárez-Vázquez et al., 2020)
Tarenaya spinosa (Jacq.) Raf. (Feuilles)	Cleomaceae	Aqueux et éthanolique	Terpènes, flavonoïdes, stéroïdes, et composés phénoliques	(Bezerra et al., 2019)
Cinnamomum cassia (écorce)	Lauraceae	Dichlorométhane	Phénylpropanoïdes et ses dérivés	(Afrin et al., 2019)
Miconia willdenowii (Feuilles)	Melastomataceae	Ethanolique	Benzoquinones	(Viegas et al., 2019)
Pulicaria inuloides (racines)	Asteraceae	Chloroforme	Flavonoïdes	(Fadel et al., 2018)

III.2. Plantes à effet anti-*S. aureus*

Les extraits de plantes constituent une source importante pour l'identification des métabolites antibiotiques efficaces contre *S. aureus* (Tableau I.3). La diversité chimique de ces composés est bien remarquable. Chabán et al. (2019) ont mené un fractionnement bioguidé de l'extrait préparé à partir de la partie aérienne de *Lepechinia meyenii,* une espèce de la famille des Lamiaceae, sélectionnée lors d'une étude ethnobotanique. L'extrait éthanolique s'est révélé le plus efficace avec des CMIs allant de 62,5 à 500 µg/ml sur des souches de *S. aureus* résistantes et sensibles à la méthicilline. Le fractionnement chimique a abouti à l'identification du carnosol, du rosmanol et de l'acide carnosique comme principes actifs avec des CMIs allant de 7,8 à 62,5 µg/ml contre 15 souches de SARM et 11 souches de MSSA. Zheng et al. (2019) ont été intéressés par l'étude de différentes parties de l'espèce *Garcinia esculenta* appartenant à la famille des Clusiaceae et ils ont identifié un nouveau xanthone, (±) garciesculenxanthone C à effet bactériostatique contre SARM, MSSA et VISA.

Comme pour l'activité leishmanicide, les sesquiterpènes ont montré également une activité significative contre *S. aureus*. Yuan et Yuk (2018) ont caractérisé le β-caryophyllene comme étant le composé majoritaire dans l'extrait actif de *Syzygium antisepticum.* Ce sesquiterpène a induit des dommages à la membrane de *S. aureus*. Dans la même année, Tittikpina et al. (2018) ont caractérisé des composés actifs dans l'extrait de *Pterocarpus erinaceus* de la famille des Fabaceae. Ces composés ont été identifiés comme friedeline, 2,3 dihydroxypropyloctacosanoate, et β-sitosteryl-β-D-glucopyranoside, et ils ont montré une activité très intéressante contre SARM avec une CMI de 4 µg/ml. Plusieurs études ont confirmé la richesse des Fabaceae en espèces dotées d'une activité anti-*S. aureus* (Ashu et al., 2020 ; Guidi et al., 2020).

Récemment, le fractionnement bioguidé de *Boswellia dalzielii* a confirmé l'efficacité de ce processus dans la purification des composés actifs contre *S. aureus*. L'extrait brut a présenté une activité modérée (CMI=250 µg/ml), les fractions ont présenté une bonne activité avec des CMIs allant de 7,8 to 125 µg/ml, tandis que les composés purifiés de ces fractions ont exhibé de fortes activités avec une valeur de CMI de 3,125 µg/ml (Tegasne et al., 2020).

D'autres études ont envisagé des fractionnements bioguidés pour la découverte des composés capables d'inhiber la formation des biofilms par *S. aureus*. Dans ce sens, Manilal et al. (2020) ont apporté l'activité antistaphylococcique de *Moringa stenopetala* sélectionnée parmi trois autres espèces. Son extrait éthanolique a montré un effet bactériostatique contre SARM en inhibant sa croissance dans la matrice préformée du biofilm. L'analyse chimique de cet extrait a mis en évidence 12 composés actifs appartenant à différentes classes chimiques.

En revanche, il a été démontré que la formation de biofilm par *S. aureus* a été hautement influencée par l'extrait de *Frangula alnus* riche en flavonoïdes et anthraquinones comme la catéchine et l'émodine (Đukanović et al., 2020).

Tableau I.3. Extraits des plantes actives contre *S. aureus.*

Extraits de plantes	**Famille phytochimique**	**Nature de l'extrait**	**Classe chimique des composés actifs isolés**	**Références**
Moringa stenopetala (Feuilles)	Moringinaceae	Ethanolique	Plusieurs familles	(Manilal et al., 2020)
Frangula alnus (écorce)	Rhamnaceae	Acétate d'éthyle	Phénols, flavonoïdes et anthraquinones	(Đukanović et al., 2020)
Boswellia dalzielii (écorce)	Burceraceae	Méthanolique	Terpénoïdes et triterpènes	(Tegasne et al., 2020)
Acacia polyacantha (Feuilles, écorces et racines)	Fabaceae	Méthanolique	Stérols, triterpènes, saponines, et flavonoïdes	(Ashu et al., 2020)
Poincianella pluviosa (écorce)	Fabaceae	Ethanolique	Polyphénols	(Guidi et al., 2020)
Lepechinia meyenii (Walp.) (Partie aérienne)	Lamiaceae	Ethanolique	Diterpènes phénolique et polyphénols	(Chabán et al., 2019)
Garcinia esculenta (Feuilles et brindilles)	Clusiaceae	Ethanolique	Xanthones, biphényles	(Zheng et al., 2019)
Syzygium antisepticum (Feuilles)	Myrtaceae	Acétone/méthanol/ eau	Sesquiterpènes	(Yuan et Yuk, 2018)
Pterocarpus erinaceus (écorce et racines)	Fabaceae	Méthanol/ Dichlorométhane	Triterpénoïdes, et stéroïdes	(Tittikpina et al., 2018)

Par conséquent, c'est dans le but de trouver des plantes à effet anti-*Leishmania* et anti-*Staphylococcus aureus* que notre travail s'insinue.

Partie II
Matériel et Méthodes

I. Selection des plantes anti-*Leishmania* et anti-*Staphylococcus aureus*

Le choix des plantes à étudier ainsi que le lieu d'étude constituent une étape cruciale pour toute recherche visant le développement de nouveaux agents anti-infectieux à partir des plantes aromatiques et médicinales. Ceci exige, sans doute, une sélection rigoureuse exploitant à la fois les expériences des pratiquants traditionnels et les moyens statistiques qui valident et décèlent leur significativité. De ce fait, notre travail a débuté par **une étude ethnobotanique** dans la région Fès-Meknès où les ulcérations peuvent résulter des infections à *Leishmania* ou à *Staphylococcus aureus*.

I.1. Zone d'étude

Le choix s'est porté sur la région de Fès-Meknès pour des raisons géographiques et épidémiologiques. En effet, la région se situe en plein centre Nord du Maroc (Figure II. 1), intégrant en partie la plaine de Saïss et côtoyant les chaînes montagneuses du Rif et du Moyen Atlas, la région de Fès-Meknès s'étend sur une superficie de 40.075 Km² correspondant à 5,7% de la superficie nationale territoire.

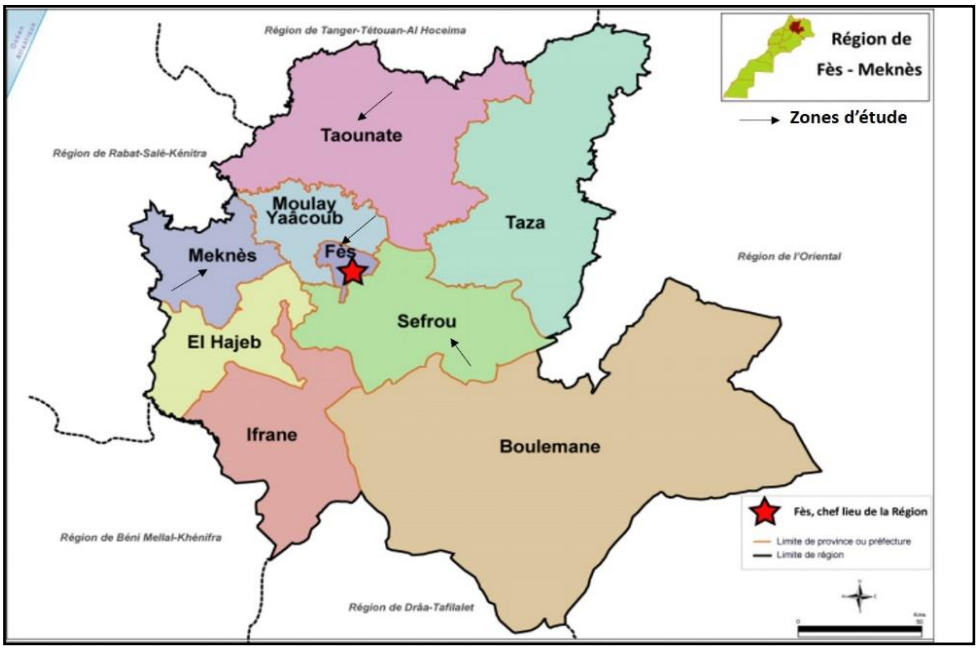


Figure II .1. Provinces et préfectures de la région Fès-Meknès

La région est composée de 2 préfectures (Fès et Meknès) et 7 provinces (Taounate, Taza, Sefrou, El Hajeb, Boulemane, Moulay Yaâcoub et Ifrane) (DGCL, 2015). Selon le rapport du Recensement Général de la Population et de l'Habitat de 2014, la région de Fès-Meknès compte 4 236 892 habitants avec une densité de 107.56 habitants par km^2 (HCP, 2019), très élevée par rapport à la moyenne nationale (47.6 hab/km^2). En raison de sa position stratégique particulière, la région se caractérise par trois types climatiques ; (i) un climat continental dans la partie Nord,

très chaud et très sec en été et froid et humide en hiver, (ii) un climat froid et humide dans la zone montagneuse, très froid et très neigeux en hiver et tempéré en été, et (iii) un climat semi-aride dans les hautes collines de Boulemane avec des hivers très froids et neigeux (DGCL, 2015). Cette diversité bioclimatique ainsi que le caractère montagnard de la région se traduisent par une richesse certaine et inestimable en plantes médicinales.

En se basant sur le point de départ qui est la création du catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections cutanées, et en tenant compte que l'agent infectieux bactérien est cosmopolite, une autre caractéristique rend la région de Fès-Meknès un lieu propice pour notre étude : C'est le nombre élevé des cas de la leishmaniose dans ses 2 préfectures ainsi que la plupart de ses provinces (Hmamouch, 2017). Avant de commencer l'enquête ethnobotanique, il a été donc nécessaire de faire une carte de confirmation indiquant la répartition des cas de la leishmaniose dans la zone d'étude en exploitant les données annuelles publiées par le ministère national de la santé (Figure II.2).

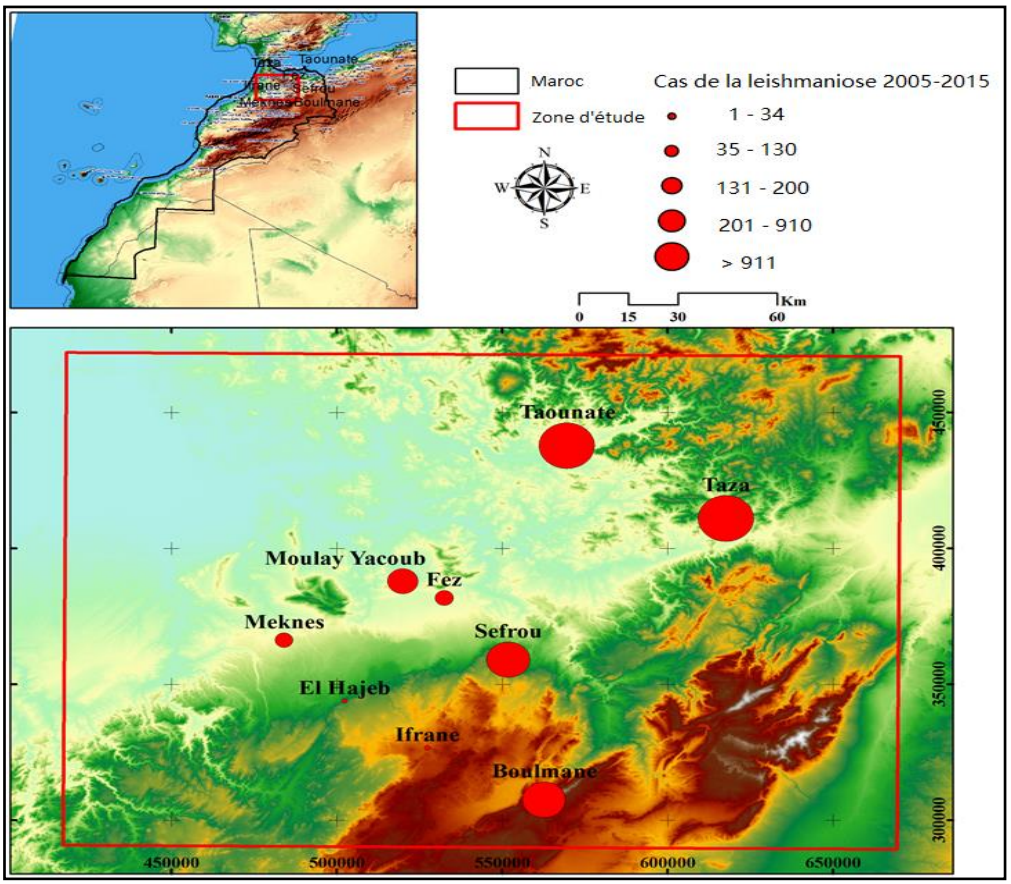


Figure II.2. Répartition des cas de la leishmaniose dans la région Fès-Meknès durant la période 2005-2015* (par Zeouk, 2021)
*à exclure les données de l'année 2007 : pas d'accès sur le site web

I.2. Organisation de l'enquête

La carte de répartition des cas de la leishmaniose dans la région de Fès-Meknès, ainsi que l'effectif des herboristes par ville, nous a mené à considérer les villes de Fès, Meknès, Taounat, Sefrou et à écarter les provinces de Taza, Boulemane, Moulay Yaâcoub, Elhajeb et Ifrane où le nombre des herboristes est trop faible. L'enquête s'est déroulée durant la période allant de Janvier à Mai 2017 auprès des herboristes de chaque ville. Le questionnaire (Annexe 1) préétablit s'est basé sur un concept plus vaste des ulcères persistantes cutanées pour essayer d'inclure au maximum possible les infections causées par les 2 agents étudiés notamment le genre de *Staphylococcus* et *Leishmania.* Les questions ont été centrées sur les plantes recommandées en cas d'éruption cutanée, les noms vernaculaires, les parties utilisées, le mode de préparation et d'administration. De plus, une attention particulière a été portée aussi sur l'utilisation des plantes citées dans d'autres infections internes à savoir que les souches microbiennes rapportées dans la présente étude peuvent causer également des maladies internes plus graves. À partir des données accueillies, nous avons répertorié les plantes recensées pour être identifiées par un botaniste de l'institut scientifique de Rabat-Maroc.

I.3. Critères de sélection des plantes

Dans le but de faciliter le criblage biologique, nous avons choisi au cours de la première étape de nos recherches de présélectionner les plantes à étudier en combinant l'indice de fréquence de citation et les connaissances bibliographiques des plantes recensées.

I.3.1. Indices de fréquence de citation

Afin de souligner l'importance d'utilisation des plantes citées dans les différentes villes, l'indice de fréquence (IF) a été défini selon la formule suivante (Madikizela et al., 2012 ; Mahwasane et al., 2013) :

$$\text{IF } (\%) = \frac{n}{N} x100$$

Avec n : Nombre d'herboristes qui ont prescrit une plante particulière.

N : Nombre total d'herboristes interrogés.

I.3.2. Apports de la littérature

Une étude bibliographique approfondie a été réalisée sur les plantes les plus citées afin d'éliminer celles largement étudiées dans la découverte des composés bioactifs antistaphylococciques et antileishmaniennes et dont les composés actifs sont largement caractérisés.

II. Extraits des plantes

Les plantes sélectionnées ont été récoltées entre Juillet et Mars 2017-2018 dans les montagnes du moyen Atlas. Pour conserver les plantes, celles-ci ont été séchées pendant plusieurs jours (séchage complet) à température ambiante et à l'air libre dans une salle obscure non humide. Ensuite, les organes recommandés ont été broyés avec un simple broyeur électrique et 25 g de la matière végétale en poudre a été extraite par macération à froid dans l'éthanol (1:10 p/v) pendant 6h à température ambiante, et sous agitation continue à 500 tr/min. Par la suite, le mélange résultant a été filtré par papier filtre de type Whatman N°1, et les filtrats ont été concentrés sous vide au rota vapeur rotatif à 45°C pour obtenir des extraits bruts.

Le choix de la technique d'extraction est crucial. En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité d'extraire les principes actifs à partir des produits naturels. Parmi ces facteurs, il y a la méthode d'extraction, la durée, la température, la nature du solvant…etc. La technique de macération utilisée au cours de ce travail consiste à faire tremper une matrice solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles dans l'éthanol. Ce dernier reste sous l'état liquide pendant toute l'extraction et les composés diffusent de façon passive de la phase solide vers la phase liquide. C'est une technique simple, moins coûteuse et évite l'altération des composés chimiques organiques qui peuvent se dégrader à température élevée. De plus, la durée du protocole est courte et efficace. Yeo et al. (2014) ont optimisé la période de macération pour avoir la meilleure activité biologique et ils ont démontré qu'une macération pendant 6h donne une activité antimicrobienne plus importante que celle de 12h, 24h et 48h. Concernant la nature de solvant, nous avons choisi l'éthanol dans le but d'obtenir un large éventail de composés, notamment ceux polaires et non polaires, pour effectuer ensuite un fractionnement chromatographique avec des solvants permettant une division plus efficace en fractions de polarité différente.

III. Criblage biologique

Les extraits éthanoliques ont été soumis à des tests biologiques afin de sélectionner ceux présentant un potentiel bioactif important.

III.1. Activité antistaphylococcique

III.1.1. Souches bactériennes

Il existe une multitude de souches de *Staphylococcus aureus*, chaque souche possède des caractéristiques spécifiques. Il s'avère donc nécessaire de rattacher chaque souche choisie à des effets bien définis. Les souches sélectionnées pour la présente étude se caractérisent par des propriétés variantes en tenant compte de la communauté d'obtention, le profil antibiogramme et le caractère porteur ou non du gène LPV qui est une toxine responsable de nécrose cellulaire donnant en cas d'une infection cutanée presque le même aspect qu'une infestation de la leishmaniose cutanée. De ce fait, quatre souches ont été choisies : trois d'origine hospitalière nommées : *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Staphylococcus aureus* (SARM348), *Staphylococcus aureus* LPV (*Sa*LPV+) et une souche de référence résistante à la méthicilline (SARM (ATCC29213)). Toutes les souches dont le profil antibiogramme a été vérifié (Annexes 2 et 3) sont résistantes à la méthicilline sauf la souche toxinogène (*Sa*LPV+) qui est sensible.

III.1.2. Test biologique

L'efficacité des antimicrobiens naturels est liés aux techniques de la mise en œuvre de l'activité *in vitro* et qui doivent être suffisamment sensibles pour détecter de petites quantités de produits chimiques biologiquement actifs dans un extrait complexe en composés (Das et al., 2010). Par conséquent, l'utilisation des tests standardisés sont essentiels pour le criblage des extraits bruts. Dans le présent travail, l'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée en combinant des méthodes de diffusion et de dilution. Après avoir évalué la sensibilité des souches vis-à-vis de DMSO, les quinze extraits éthanoliques ont été préalablement dissous à la concentration de 50 mg/ml dans le DMSO à 2% (v/v), pour être criblés contre les quatre souches de *S. aureus* précédemment décrites.

En effet, toute évaluation de l'activité antibactérienne commence par la revivification des bactéries, celle-ci a été réalisée en repiquant la surface de gélose LB (Luria-Bertani ; composé de 10 g/l de peptone, 5 g/l d'extrait de levures, 10 g/l de NaCl et de 20g d'agar) préalablement coulée dans des boîtes de Pétri et incubée à 37°C pendant 18 à 24h. L'inoculum bactérien de chaque souche a été obtenu à partir de colonies fraîches en phase de croissance exponentielle par

suspension directe des colonies dans une solution saline stérile (NaCl 0,9%) et ajustement à une échelle de 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml).

Pour les tests qualitatifs de sensibilité aux extraits de plantes, la méthode de diffusion par puits sur gélose est la méthode la plus recommandée en comparaison avec celle sur disque qui ne peut être utilisée que pour des substances pures, car lorsqu'elle est appliquée à des mélanges qui contiennent des constituants présentant des vitesses de diffusion différentes, les résultats peuvent être peu fiables (Silva et al., 2005). Par conséquent, le criblage préliminaire de différents extraits dans la présente étude a été réalisé par la méthode de diffusion par puits telle que décrite par Balouiri et al. (2016). Pour ce faire, la surface de gélose a été inoculée par inondation de l'inoculum bactérien et a été laissée sécher 30 min à température ambiante afin d'assurer la diffusion de la souche. Un trou circulaire vertical d'un diamètre de 6 mm a été creusé de manière aseptique, puis un volume de 80 à 100 µl de chaque extrait a été introduit dans chaque puits et les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C (Figure II.3).

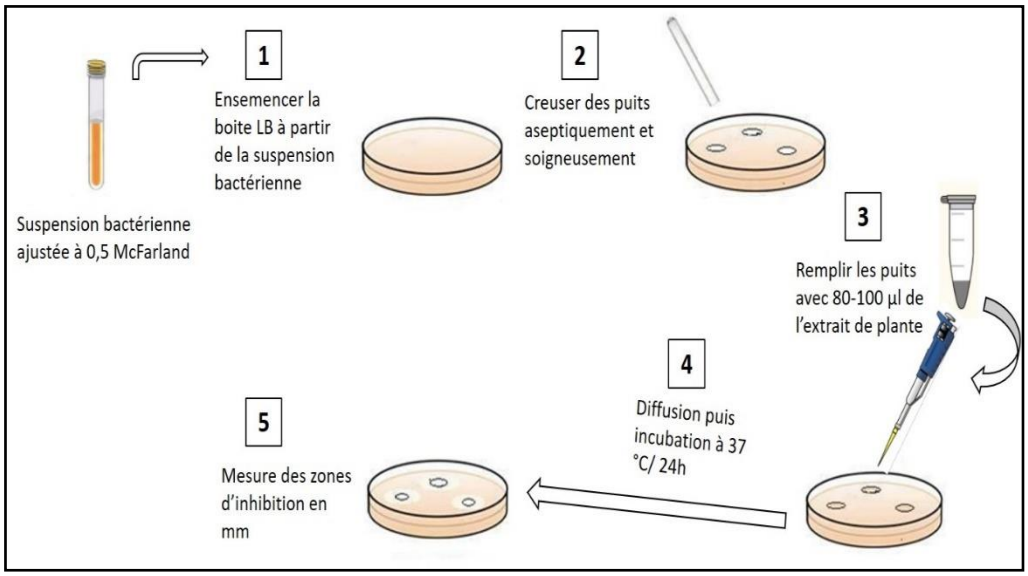


Figure II.3. Protocol de diffusion sur puits utilisé dans le criblage qualitatif des extraits bruts (par Zeouk, 2021)

Néanmoins, cette technique ne peut pas quantifier la bioactivité, c'est pourquoi les extraits ayant présenté une zone d'inhibition importante ont été sélectionnés pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus faible concentration en extrait pour laquelle aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée (CLSI, 2015). Elle a été déterminée par la méthode de macrodilution en milieu solide décrite par Balouiri et al. (2016) avec certaines modifications. Cette méthode consiste à incorporer l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification (50°C). Ainsi, une gamme de concentration de l'extrait brut a été préparée dans le DMSO dilué, ensuite 1 ml de chaque dilution a été incorporé

dans 9 ml de milieu de culture LB stérile et molle pour avoir une série finale de 16 à 0,5 mg/ml par un facteur de 2. Aussitôt, le mélange a été bien agité et réparti dans des boites de Pétri. Après la solidification du milieu, l'ensemencement a été effectué par des spots de 5 µl à l'aide d'une micropipette à partir de la suspension correspondante à une concentration de 10^5 UFC/ml. Les boites ont été incubées pendant 24h à 37°C. Un témoin de croissance a été réalisé sans extrait (Figure II.4).

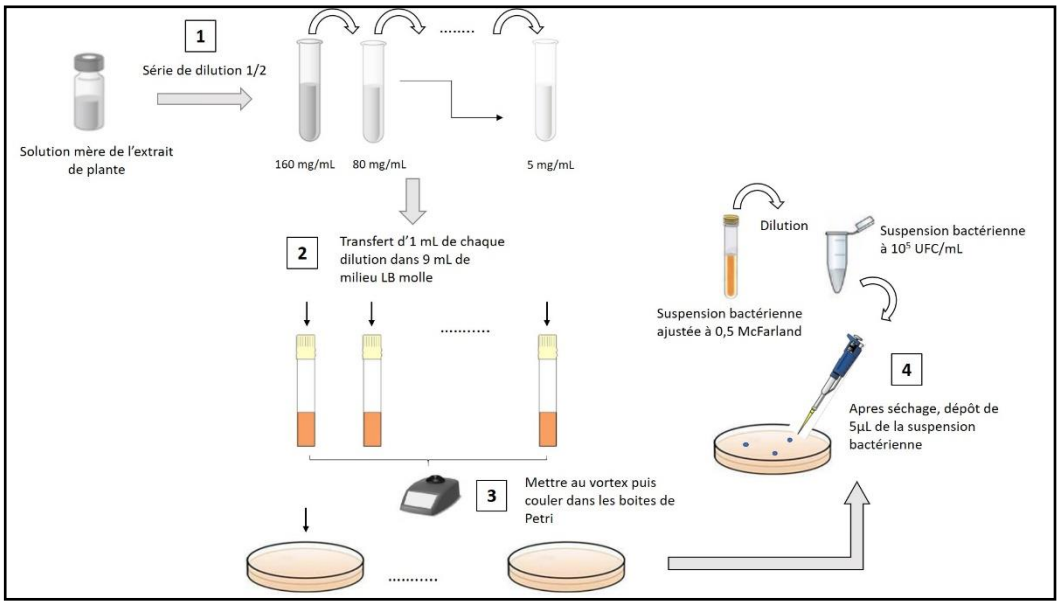


Figure II.4. Protocol de macrodilution en milieu solide utilisé pour le criblage quantitatif des extraits bruts (par Zeouk, 2021)

Certes, plusieurs techniques sont systématiquement disponibles pour la détermination de la CMI, mais le choix de la méthode la plus efficace dépend de l'objectif de l'étude et la nature de l'échantillon biologique et végétal étudié. Nous avons choisi la macrodilution en milieu solide car les extraits testés sont de couleurs différentes et ils peuvent masquer la détection de la croissance bactérienne dans le milieu liquide ainsi qu'une interférence avec les réactifs colorimétriques utilisés est possible. De plus, Silva et al. (2005) lors d'une étude comparative des techniques d'évaluation des activités antimicrobiennes ont confirmé que la technique de dilution sur gélose est la plus performante. Toutefois, la quantité de l'échantillon à tester peut exiger le choix de la technique de microdilution en milieu liquide lorsqu'il s'agit des fractions et des composés purs dont le rendement est faible en comparaison avec l'extrait brut.

En effet, dans la présente étude les tests de criblage des différents extraits par macrodilution ont permis de sélectionner la plante la plus efficace contre les quatre souches de staphylocoques pour faire objet des séparations chromatographiques ultérieures afin de caractériser les composés actifs. En vue de leurs faibles rendements, les valeurs de CMI de l'ensemble des fractions, sous fractions

et composés purs obtenus lors du processus de fractionnement ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide modifiée conformément aux recommandations publiées par « Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) » pour l'évaluation efficace de l'activité antimicrobienne des produits naturels (CLSI, 2009). Cette méthode permet non seulement la détermination de la CMI mais aussi la CMB. Tout d'abord, les échantillons obtenus du fractionnement et à des concentrations de 10 mg/ml ont été dissous dans du DMSO à 2% du volume final. Dans des microplaques de 96 puits, une gamme de dilution ½ des fractions, sous fractions (0,78125-500 µg/ml), et de composés purs (0,48827-250 µg/ml) a été réalisée. Ensuite, les microplaques ont été inoculées avec 50 µl de la suspension bactérienne ajustée à une densité de 10^6 UFC/ml. Un control positif a été réalisé en mettant 50 µl de suspension bactérienne dans 50 µl du milieu de culture, alors que le contrôle négatif contenait 100 µL de milieu LB. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les valeurs de CMI ont été déterminées après l'addition de 10 µl de résazurine à 0,015% (p/v) à chaque puits et la microplaque a été réincubée à 37°C pendant 2h (Figure II.5).

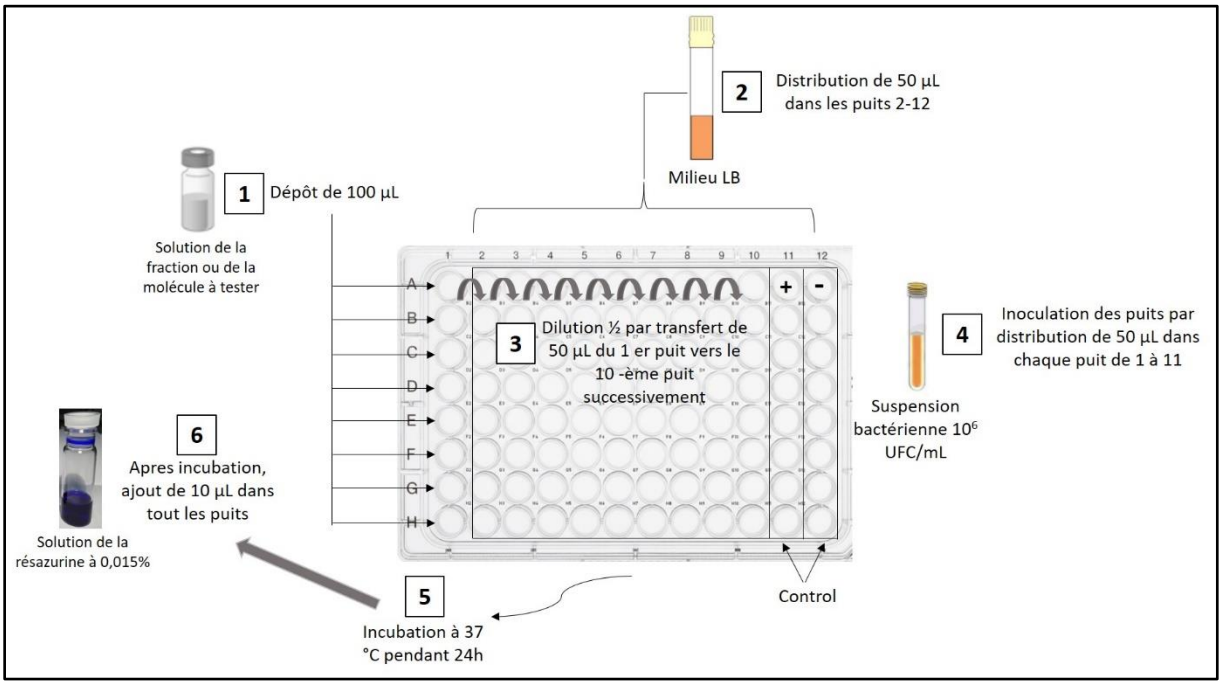


Figure II.5. Protocol de la microdilution sur microplaque de 96 puits utilisé pour la détermination de la CMI et la CMB des fractions et des composés purs (par Zeouk, 2021)

A partir des puits qui n'ont pas démontré une croissance bactérienne, des spots de 10 µl ont été déposés sur des boites contenant la gélose LB pour être incubées à 37°C pendant 24h, puis les concentrations minimales bactéricides (CMBs), définies comme la plus faible concentration à effet biocide de l'agent testé, ont été déterminées.

III.2. Activité antileishmanienne

III.2.1. Matériel biologique

L'évaluation de l'activité anti-leishmanies *in vitro* dans un premier temps a été réalisée sur deux souches appartenant à deux espèces de *Leishmania* maintenues en culture au laboratoire d'accueil en Espagne à savoir *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) responsable de la leishmaniose cutanée et mucocutanée et *L. donovani* (MHOM/IN/90/GE1F8R) responsable de la forme viscérale (kala-azar) et de la leishmaniose cutanée post kala-azar. En fait, les résultats pourront être utilisés pour d'autres espèces (voir perspectives). Le choix du modèle parasitaire pour le test leishmanicide est judicieux. En effet, les leishmanies évoluent en deux formes, le test *in vitro* peut être effectué avec des promastigotes ou des amastigotes intracellulaires (Kloehn et al., 2015). Certes, les promastigotes sont plus faciles à maintenir en culture que les amastigotes (Fumarola et al., 2004 ; Vermeersch et al., 2009), cependant la forme promastigote n'existe que chez l'insecte vecteur, ainsi la réponse de susceptibilité des parasites vis-à-vis des composés testés à chaque stade pourrait être différente. De ce fait et pour valider l'activité antileishmanienne *in vitro*, les tests ont été réalisés sur les deux formes promastigote et amastigote dans le cas de *L. amazonensis* alors que pour *L. donovani* seule les promastigotes ont été testés vu que la forme amastigote s'est avérée difficile à obtenir en culture.

III.2.2.Test biologique

L'évaluation de l'activité antileishmanienne des produits naturels ou composés chimiques peut se faire par différentes approches et qui comprennent les dosages colorimétriques, la microscopie quantitative, les nucléotides radioactifs, et les dosages basés sur les gènes rapporteurs (Fumarola et al., 2004). Or, les essais colorimétriques par indicateurs d'oxydoréduction sont les plus utilisés en vue de leur efficacité, simplicité et facilité à mettre en œuvre (Phumee et al., 2020).

En se basant sur l'ensemble de ces données, dans une première étape, les extraits éthanoliques ont été criblés contre la forme promastigote, puis les composés purifiés ont été testés sur les amastigotes intra-macrophagiques en utilisant la méthode colorimétrique par le réactif AlamarBlue.

III.2.2.1. Activité anti-promastigote

Les leishmanies sous leur forme promastigote ont été cultivés à 26°C dans le milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) contenant 0,5% de phénol et 10% de sérum de veau fœtal (RPMI 1640 modified medium (Gibco, Grand Island, US)). L'activité antiparasitaire contre *L. amazonensis* et *L. donovani* a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Cabrera-Serra et al. (2007). Tout d'abord, les extraits éthanoliques ont été dissous dans du DMSO à 1% de la concentration finale. Dans une microplaque de 96 puits, une série de dilution d'ordre ½ a été effectuée dans le milieu RPMI 1640. Ensuite, les promastigotes de chaque souche cible en phase logarithmique ont été dénombrés à l'aide d'un cytomètre (Tali™ Image-Based Cytometer) et 100 µl de chaque culture ont été distribués à une concentration de 10^6 parasite/ml dans la microplaque précédemment préparée pour donner un volume final de 200 µl par puits. La miltéfosine a été utilisée comme témoin positif, l'extrait dans le milieu de culture comme témoin négatif tandis que la souche dans le milieu de culture comme témoin de croissance. Finalement, un volume de 20 µl du réactif AlamarBlue (Invitrogen, USA) a été ajouté à chaque puits et les microplaques ont été incubées sous agitation à 26°C. Après 72h d'incubation, l'absorbance de chaque microplaque a été mesurée à 570 nm et 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (PerkinElmer, MA, USA). Les valeurs des CI_{50s} (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) ont été déterminées graphiquement par des régressions linéaires en utilisant un logiciel statistique (Sigma Plot 12.0) (Figure II.6).

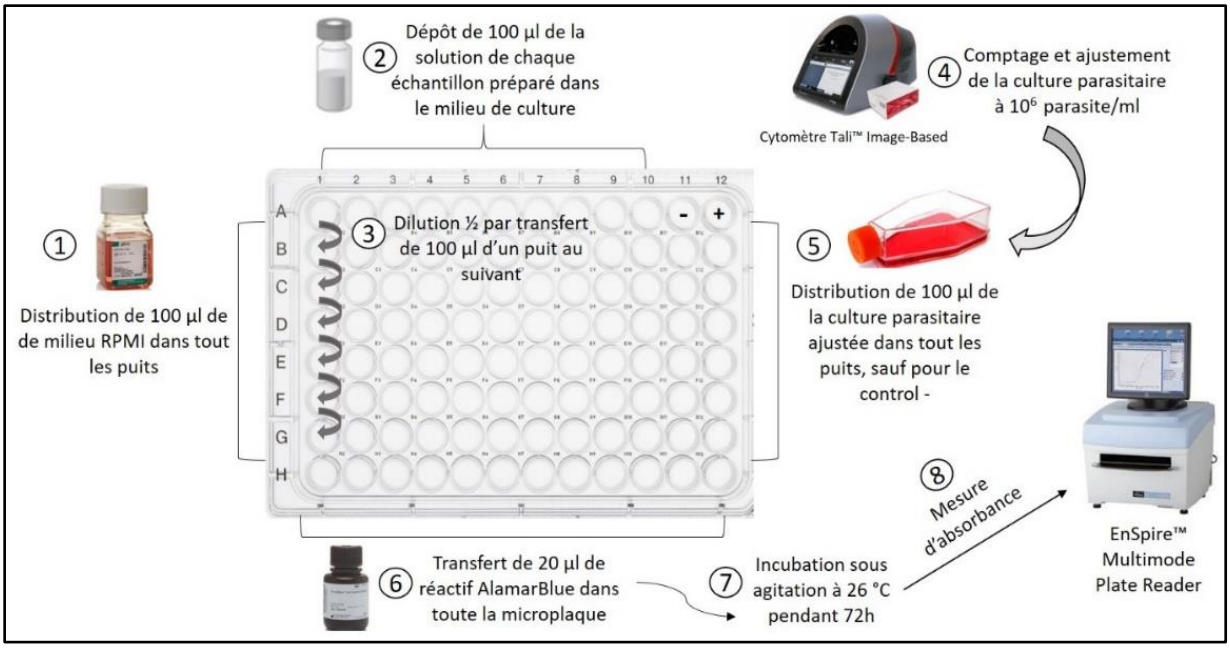


Figure II.6. Protocol du criblage leishmanicide des extraits bruts, fractions, sous fractions et composés purs contre la forme promastigote de *Leishmania* spp. (par Zeouk, 2021)

Après sélection de l'extrait le plus actif et son fractionnement, l'activité antileishmanienne des fractions, sous fractions et composés purs a été performée en suivant le même protocole décrit ci-dessus.

III.2.2.2. Activité anti-amastigote

Les composés purifiés qui ont démontré une activité importante sur les promastigotes ont été testés par la suite contre le stade intra-macrophagique de *L. amazonensis* selon les étapes suivantes (López-Arencibia et al., 2017) :

- **Préparation de la forme infestante des promastigotes**

La forme métacyclique des leishmanies est la forme infestante. De ce fait, elle a été utilisée pour la préparation des amastigotes. Pour permettre l'évolution des promastigotes en forme métacyclique, les promastigotes de *L. amazonensis* ont été cultivés à 26°C dans le milieu Schneider (Schneider's Insect Medium). Ensuite, la culture a été maintenue 7 jours.

- **Préparation des macrophages**

Dans une microplaque de 96 puits, les macrophages de la lignée cellulaire J774A.1 ont été cultivés à une densité de 2×10^5 cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 additionné de 10% de sérum bovin fœtal et incubés pendant 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 pour permettre la différenciation cellulaire.

- **Infestation des macrophages par les promastigotes métacycliques**

Après 24h d'incubation de la microplaque des macrophages, chaque puits a été rincé doucement deux fois avec 100 µl de RPMI supplémenté avec 10% de SVF puis les macrophages ont été infestés en ajoutant 100 µl de la suspension des promastigotes de *L. amazonensis* dans leur phase stationnaire de la culture de 7 jours avec un rapport de 1:10 (macrophage/parasite) à une concentration de 2×10^6 cellules/ml. Les cultures ont été réincubées à 37°C, 5% CO_2 pendant 24h permettant aux parasites d'infester les cellules différenciées. Après cette incubation, les puits ont été lavés soigneusement pendant au moins 3 fois avec le milieu de culture afin d'éliminer les promastigotes non phagocytés, puis 100 µl de milieu de culture (RPMI 1640 avec 10% de SVF) ont été ajoutés à chaque puits.

- **Test anti-amastigote**

Dans une autre microplaque de 96 puits, une gamme de dilution des composés d'essai a été réalisé dans le même milieu de culture. Ensuite, 100 µl de chaque dilution ont été rajoutés à chaque puits pour être incubés à 37°C, 5% de CO_2. Après 24h d'incubation, le milieu a été soigneusement enlevé pour être remplacé par 30 µl de SDS à 0,05% et la microplaque a été agitée pendant 30

secondes afin de lyser les cellules. Ensuite, 170 µl de milieu Schneider ont été ajoutés à chaque puits donnant un volume final de 200 µl. Enfin, 20 µL d'AlamarBlue ont été ajoutés à la microplaque pour être incubée à 26°C pendant 72h pour donner suffisamment de temps à la transformation des promastigotes en amastigotes. Après 72h d'incubation, l'analyse des plaques et la détermination des CI_{50s} ont été performées de la même manière que le test des promastigotes.

Pour l'ensemble des tests biologiques réalisés dans la présente étude, la résazurine est la molécule de base des réactifs utilisés, c'est une substance bleue et faiblement fluorescente. En présence des cellules vivantes, son principe de fonctionnement repose sur la réaction d'oxydo-réduction où la résazurine est réduite de manière irréversible en résorufine de couleur rose et très fluorescente (Figure II.7). Plusieurs études ont montré la sensibilité des *Staphylococcus aureus* et *Leishmania* spp. aux agents antimicrobiens *in vitro* en utilisant le test à base de résazurine ou AlamarBlue, qui est un test cellulaire non toxique et faisable avec de longues périodes d'incubation (Bouhdid et al., 2009 ; Andrade et al., 2019 ; López-Arencibia et al., 2020).

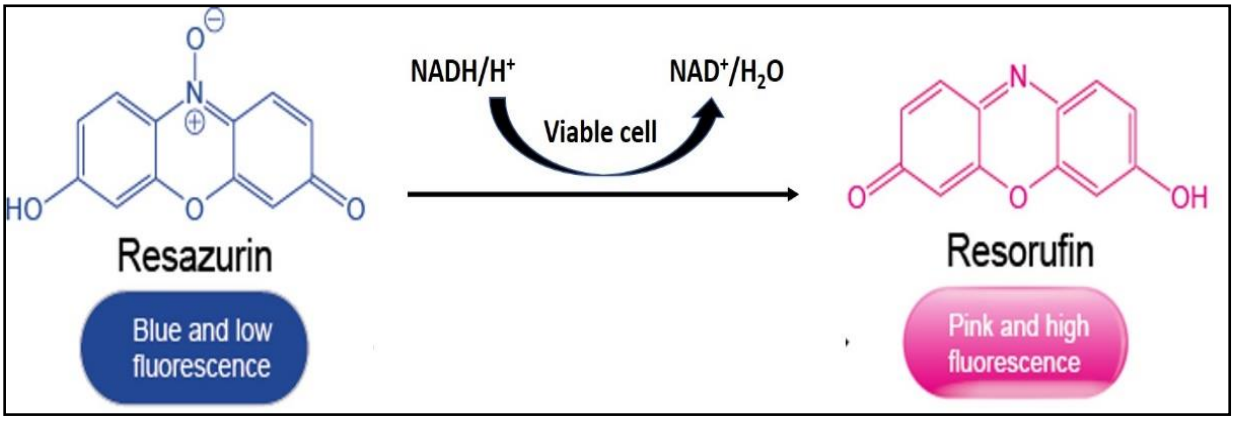


Figure II.7. Réduction de résazurine en résorufine en présence des cellules vivantes

IV. Fractionnement chimique et identification des composés purs

Au cours de cette partie, nous nous sommes attachés à caractériser les composés responsables de la bioactivité. Les extraits de plantes les plus actifs ont été sélectionnés pour de plus amples essais visant l'identification de leurs principes actifs. Plusieurs méthodes peuvent être employées pour la recherche et l'identification des principes actifs en se basant sur l'approche bioguidée. De ce fait, différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques ont été appliquées selon les cas, dans un fractionnement antibactérien ou dans un fractionnement antiparasitaire.

IV.1. Fractionnement bioguidé antibactérien

Tout d'abord, une étude préliminaire a été réalisée afin d'optimiser le système éluant qui donne la meilleure séparation de l'extrait actif sélectionné. Pour ce faire, la technique de la chromatographie sur couche mince (CCM) analytique a été performée en utilisant des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (F_{254}, Merck). Après dépôt de l'extrait et élution dans les différents mélanges de solvants, les chromatogrammes ont été observés sous lumière UV à 254 et 365 nm pour rechercher les conditions donnant une séparation optimale. Après sélection de la phase mobile adéquate qui est l'acétate d'éthyle-méthanol-eau distillée (8 :1 :1), des techniques associées à des tests biologiques ont été effectuées. En plus de son utilisation dans l'optimisation de la phase mobile, la CCM analytique a été utilisée également lors des étapes de la séparation et de la purification des différents composés, suivi toujours d'une révélation réalisée par une solution d'oléum et un chauffage pendant quelques minutes sous la hotte de révélation afin de visualiser les taches.

IV.1.1. Bioautographie d'immersion

La bioautographie est une technique semi-quantitative simple, rapide et non coûteuse qui permet de détecter les spots des composés antimicrobiens au sein d'un extrait brut (Abedini, 2013), son principe se base sur la migration des composés de la plaque CCM vers le milieu de culture contenant les microorganismes testés (Amandine, 2015). Il existe trois types de la bioautographie ; directe, de contact et d'immersion (Choma et Grzelak, 2011). La technique d'immersion dite « Agar overlay » a été utilisée dans notre étude, elle est considérée comme un hybride des deux autres bioautographies. Pour ce faire, l'extrait brut a été solubilisé dans l'éthanol à une concentration de 1 mg/ml. Puis 50 µl ont été déposés sur CCM (12x5 cm). Après migration dans le système éluant choisi, les chromatogrammes ont été soigneusement séchés à température ambiante et sous la hotte afin d'éliminer toute trace de solvant, puis ils ont été déposés dans des boites de Pétri stériles. Ensuite, la suspension bactérienne de chaque souche testée a été préparée

dans le milieu LB à une densité finale de 10^7 UFC/ml, 15 ml de ces préparations ont été coulés délicatement sous forme d'une couche fine sur chaque chromatogramme. Après solidification du milieu, les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les bioautogrammes ont été visualisés afin de localiser les zones claires d'inhibition indice de l'activité antibactérienne sur les quatre souches de *S. aureus*. En plus de sa simplicité et sa reproductibilité, cette technique a donné des résultats plus satisfaisants que ceux obtenus par bioautographie directe dans la mise en évidence des principes actifs contre *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* (Rahalison et al., 1991).

IV.1.2. Séparation et purification des fractions actives

Afin d'isoler les composés actifs détectés par bioautographie contre les quatre souches cibles de *S. aureus*, l'extrait a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice. Pour cela, 8 g de l'extrait brut ont été solubilisés dans l'éthanol absolu et mixés avec du gel de silice 60 (FlukaChemika, Switzerland), puis le mélange a été mis au rotavapeur afin d'éliminer le solvant. Par la suite, l'extrait a été déplacé dans la colonne chromatographique éluée avec différents gradients des solvants sélectionnés auparavant (Acétate d'éthyle-méthanol-eau distillée (80 :10 :10, 1L)). Les fractions ont été collectées, combinées selon leurs profils CCM et testées contre les souches de *S. aureus*. Les sous-fractions les plus actives ont fait l'objet d'une deuxième chromatographie sur colonne de silice éluée avec un mélange de dichlorométhane/Acétone (CH_2Cl_2/ Me_2CO) de polarité croissante. Le processus de ce fractionnement bioguidé est illustré dans la Figure II.8.

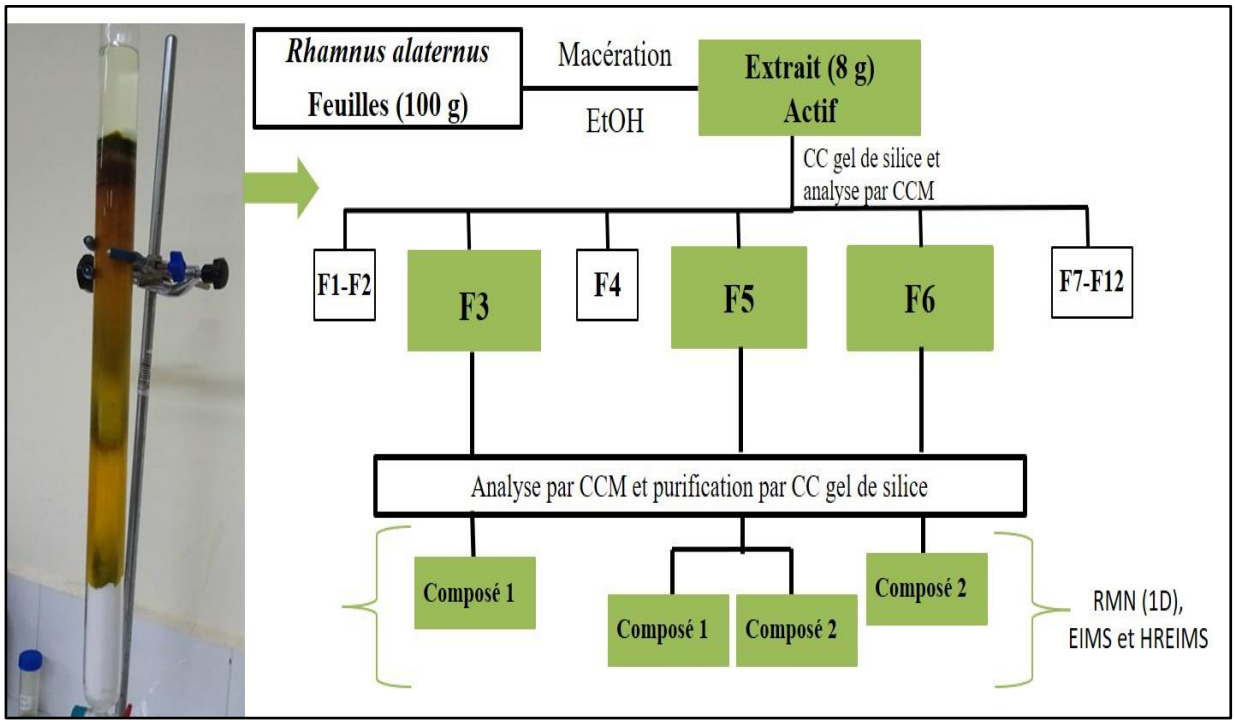


Figure II.8. Processus du fractionnement bioguidé utilisé contre *S. aureus*

IV.1.3. Caractérisation des structures des composés antistaphylocoques

Les différentes étapes de séparation et de purification chromatographiques ont conduit à l'isolement des composés naturels purs. Des échantillons à partir de ces composés ont été solubilisés dans les solvants deutérés appropriés dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre pour être analysés par résonnance magnétique nucléaire (RMN) du proton (RMN-^{1}H) et du carbone (RMN-^{13}C). En fait, le spectre RMN-^{1}H renseigne sur le nombre et le type du proton présent dans l'échantillon, alors que le spectre RMN-^{13}C donne des informations sur le nombre et le type du carbone. La RMN est une technique biophysique de référence, elle est pratique, reproductible et permet d'obtenir des informations structurales des biomolécules et de leurs complexes à partir directement d'une solution sur des échelles de temps courtes. Cependant, la taille, l'hétérogénéité et les quantités de l'échantillon imposées par les analyses de la RMN peuvent constituer un écueil à son application (Stojko, 2016). De ce fait, la RMN doit être complétée par d'autres techniques afin de confirmer les structures recherchées.

En effet, la spectrométrie de masse (SM) est une technique largement recommandée dans la caractérisation des produits de composition et de taille variable. Son principe repose sur la séparation des molécules en fonction de leur rapport masse/charge (*m/z*) et la détermination de leurs structures chimiques sous forme de fragments bien déterminés (Palma et al., 2011). Son couplage à une source d'ionisation permet de préserver l'intégrité de l'échantillon jusqu'en phase gazeuse (Stojko, 2016).

Par conséquent, dans notre étude, les analyses de RMN ont été complétées par la SM. En effet, les spectres de RMN ont été enregistrés avec un spectromètre de type Brüker Avance 600 (fréquence de 600.13 MHz (^{1}H) et 150.25 MHz (^{13}C)), puis analysés par un logiciel de traitement des données Topspin 2.1. De plus, les analyses par spectrométrie de masse et qui sont MS à ionisation électrique (EIMS) et MS à impact électronique à haute résolution (HREIMS) ont été réalisées à l'aide d'un "Micromass Autospec Spectrometer".

De nombreuses études phytochimiques ont montré que ce système de RMN en plus d'EIMS et HREIMS a donné des résultats pertinents dans la caractérisation et la confirmation des structures chimiques de différents composés isolés à partir des extraits de plantes (Flores et al., 2009 ; Flores et al., 2019). De plus, Yosefdad et al. (2020) ont démontré l'efficacité de la RMN-^{1}H, la RMN-^{13}C et l'EIMS dans la caractérisation et la synthèse chimique des composés organiques.

IV.2. Fractionnement bioguidé antiparasitaire

En amont de ce fractionnement, le système éluant a été optimisé par CCM analytique comme décrit précédemment. Ensuite, 5 g de l'extrait éthanolique actif ont été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice 60 (Macherey-Nagel, 63-200 µm) éluée avec des mélanges de l'hexane et l'acétate d'éthyle (hexane-EtOAc) (100:0 à 0:100, 0,5 L chacun) de polarité croissante. Les fractions obtenues dont les profils chromatographiques voisins ont été rassemblées. Ensuite, un test d'activité antileishmanienne a été réalisé sur ces fractions afin de cibler les plus actives pour un fractionnement plus poussé. En effet, la nature de l'échantillon à séparer, le profil CCM, la quantité ainsi que la complexité de séparation constituent des facteurs décisifs du choix de la technique chromatographique adéquate pour un fractionnement de deuxième intention à savoir :

IV.2.1. Chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® LH-20

Après fractionnement principal de l'extrait actif et récupération des fractions, la chromatographie d'exclusion sur gel a été réalisée dans le but de séparer les composés de masses distinctes à partir des fractions actives. Techniquement, chaque colonne a été remplie par la phase stationnaire constituée d'un polymère poreux qui est le gel de Sephadex® LH-20 (Pharmacia Biotech), puis imprégné par la phase mobile mise au point sur CCM jusqu'à stabilisation immédiate de la colonne. Par la suite, la fraction que l'on souhaite séparer a été solubilisée dans la phase mobile, filtrée si nécessaire et injectée soigneusement en tête de la colonne puis l'élution par le système approprié a été démarrée.

Le principe de cette chromatographie repose sur la séparation des molécules en fonction de leur taille et donc de leur masse moléculaire. En utilisant un gel donné à un domaine de fractionnement spécifique, les molécules plus grosses que la limite supérieure de fractionnement, la limite d'exclusion, éluent en premier. Dans notre cas, le gel Sephadex® LH-20 a été utilisé car il est stable en présence des solvants organiques constituant la phase mobile. La chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex® LH-20 est une technique précieuse. Parmi ses avantages, elle pourrait être utilisée pour des mélanges biologiques souvent sensibles à la dénaturation et à la dégradation (Barth et al., 1981). De plus, de nombreuses études ont démontré l'efficacité de la colonne de Sephadex LH-20 dans l'extraction des composés bioactifs à partir des plantes (Toro-Uribe et al., 2020 ; Mottaghipicheh et Iriti, 2020) et particulièrement les composés phénoliques (Amarowicz et al., 2003). Néanmoins, c'est l'une des techniques de chromatographie les plus difficiles à maitriser techniquement. Son montage nécessite une stabilisation de la colonne ainsi

qu'une précaution afin d'éviter toutes fissures possibles ou hétérogénéité car une fois la colonne est laissée à sec, une détérioration est fortement possible.

IV.2.2. Chromatographie sur colonne (CC) humide

Après la chromatographie sur colonne de Sephadex, les sous fractions obtenues des fractions actives ont été purifiées en utilisant une succession des colonnes humides sur gel de silice Macherey-Nagel 60 (15-40 et 63-200 mm) réalisées dans des colonnes en verre et éluées par les phases mobiles adéquates. Les dimensions de la colonne ont été choisies en fonction de la quantité de l'échantillon à purifier. En effet, le principe de la CC par voie humide est le même que celui par voie sèche précédemment décrite. Pour ce faire, la colonne a été remplie par le système éluant, puis l'échantillon à purifier a été solubilisé dans ce même système pour être injecté soigneusement sur les parois de la colonne avant de lancer l'élution.

IV.2.3. Chromatographie centrifuge sur couche mince : Chromatotron

Les étapes de purification ont inclus également la chromatographie centrifuge dite radiale. Il s'agit d'une technique chromatographique préparative qui permet la purification des mélanges chimiques, dont le dispositif utilisé est un Chromatotron (Figure II.9).

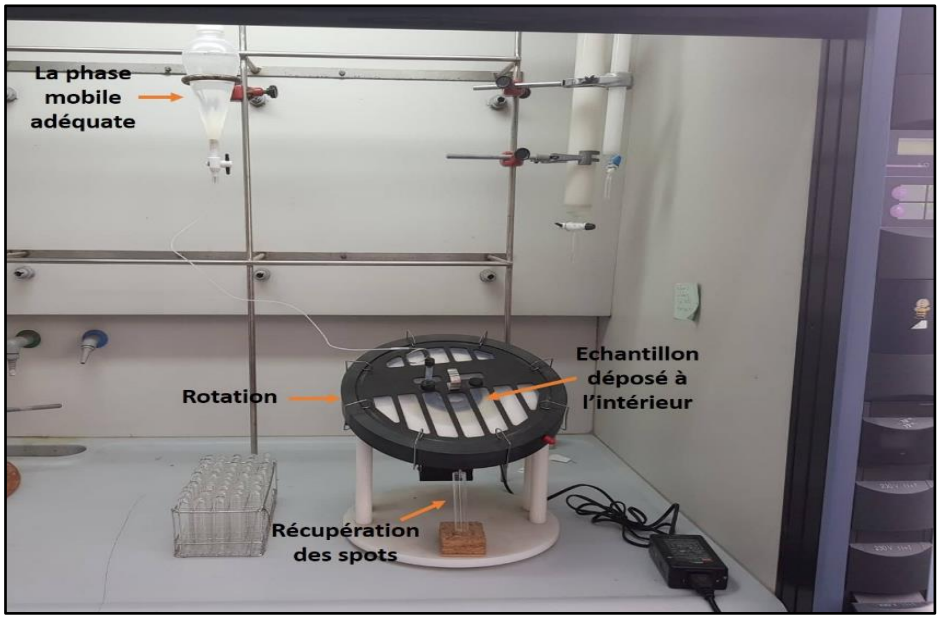


Figure II.9. Protocol de la chromatographie radiale à couche mince en utilisant un « Chromatotron »

Le principe de fonctionnement du Chromatotron consiste à séparer un mélange par un chromatographe radial à couche mince (Harrison Research Inc. model 7924 T) qui utilise la force centrifuge générée lors d'une rotation de la couche mince autour de son axe. Techniquement, des disques de gel de silice (60 PF254) dont l'épaisseur varie de 1 à 4 mm selon la quantité de l'échantillon à purifier ont été introduit dans le Chromatotron, après mise en rotation du disque

de silice avec un débit de 2 à 4 ml/min, la sous fraction à purifier a été solubilisée dans le solvant adéquat puis injectée rapidement dans la zone centrale du disque. Par la suite, le système éluant convenable a été injecté de façon continue par une ampoule. Cette élution forme des bandes circulaires des composés séparés et grâce à la force centrifuge, ces composés vont migrer vers l'extérieur du disque pour être collectés dans plusieurs tubes à essais. L'ensemble de ce dispositif doit être maintenu couvert afin d'éviter l'évaporation du solvant, tout en développant un chromatogramme. Ce système présente plusieurs avantages, les séparations se réalisent rapidement dans habituellement 20 min tout en observant directement les composés absorbant les UV (Ultra-violet) ou colorés pendant la séparation à l'aide d'un couvercle transparent aux UV. En revanche, les disques de différentes épaisseurs donnent une capacité d'utilisation élevée en plus de la possibilité de recyclage pour réutilisation.

IV.2.4. Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative

Parmi les autres étapes de purification, la CCM préparative a été réalisée sur une plaque (20 x 20 cm) recouverte de gel de silice (60 F_{254}, Macherey-Nagel) (Figure II.10, A). Pour ce faire, l'échantillon à séparer a été déposé manuellement sous forme d'une bande concentrée. Après séchage, la plaque a été développée dans la phase mobile appropriée. Ensuite, toutes les bandes ont été grattées à l'aide d'une spatule et chaque bande a été placé dans un entonnoir filtrant sous vide élué par l'acétate d'éthyle afin de séparer la silice du composé cherché (Figure II.10, B), puis le solvant a été évaporé à sec. L'avantage de cette technique réside dans sa simplicité, sa rapidité et sa capacité à purifier des échantillons de petites quantités.

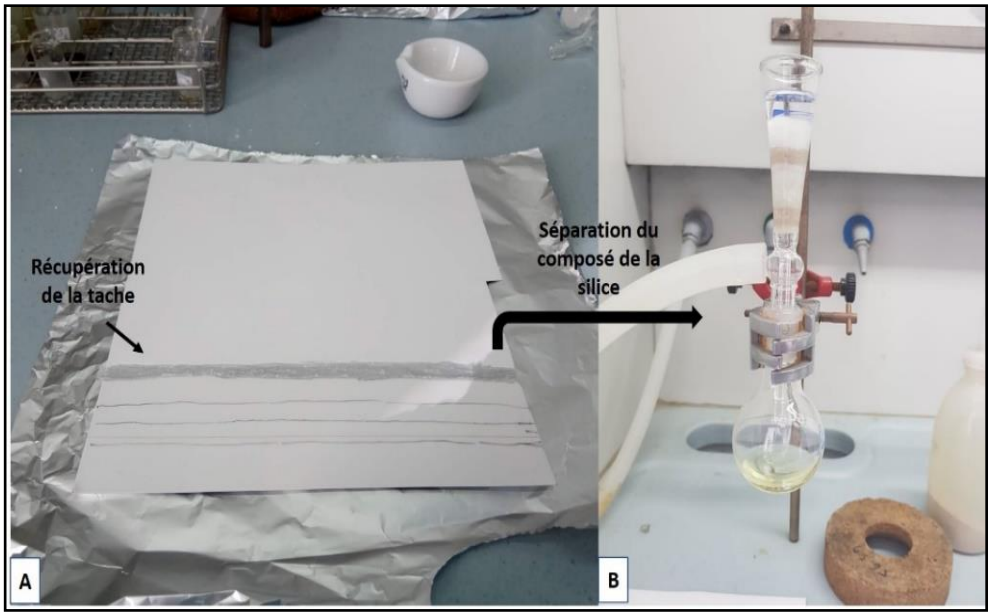


Figure II.10. Protocol utilisé pour la CCM préparative : A, Couche mince de silice contenant le composé à purifier ; B, Entonnoir filtrant

Les différentes techniques utilisées dans cette partie de fractionnement ont été utilisées successivement avec une adaptation du support ou du système éluant afin d'atteindre un niveau de séparation optimal. En revanche, la combinaison de ces différentes méthodes produit des composés plus purs, ce qui facilite par la suite l'élucidation de leurs structures. Par conséquent, nous pouvons faire un récapitulatif de ce fractionnement comme suit :

Après séparation de l'extrait brut, la recherche bioguidée a été focalisée sur les fractions actives qui ont été soumises à une chromatographie sur colonne de sephadex LH-20 en utilisant un système éluant composé de MeOH-$CHCl_3$ (1:1, 2 L). Les sous fractions ont été ensuite combinées selon leurs profils CCM. Par la suite, les sous-fractions ayant montré une activité prometteuse contre les souches leishmaniennes testées ont été soumises à plusieurs étapes chromatographiques sur gel de silice, des chromatographies centrifuges et des CCM préparatives en utilisant différents mélanges d'hexane-EtOAc, d'hexane-Et2O, de CH_2Cl_2-EtOAc et de CH_2Cl_2-acétone comme système éluant choisi selon le cas et le profil CCM. Le processus de ce fractionnement bioguidé est illustré dans la figure II.11.

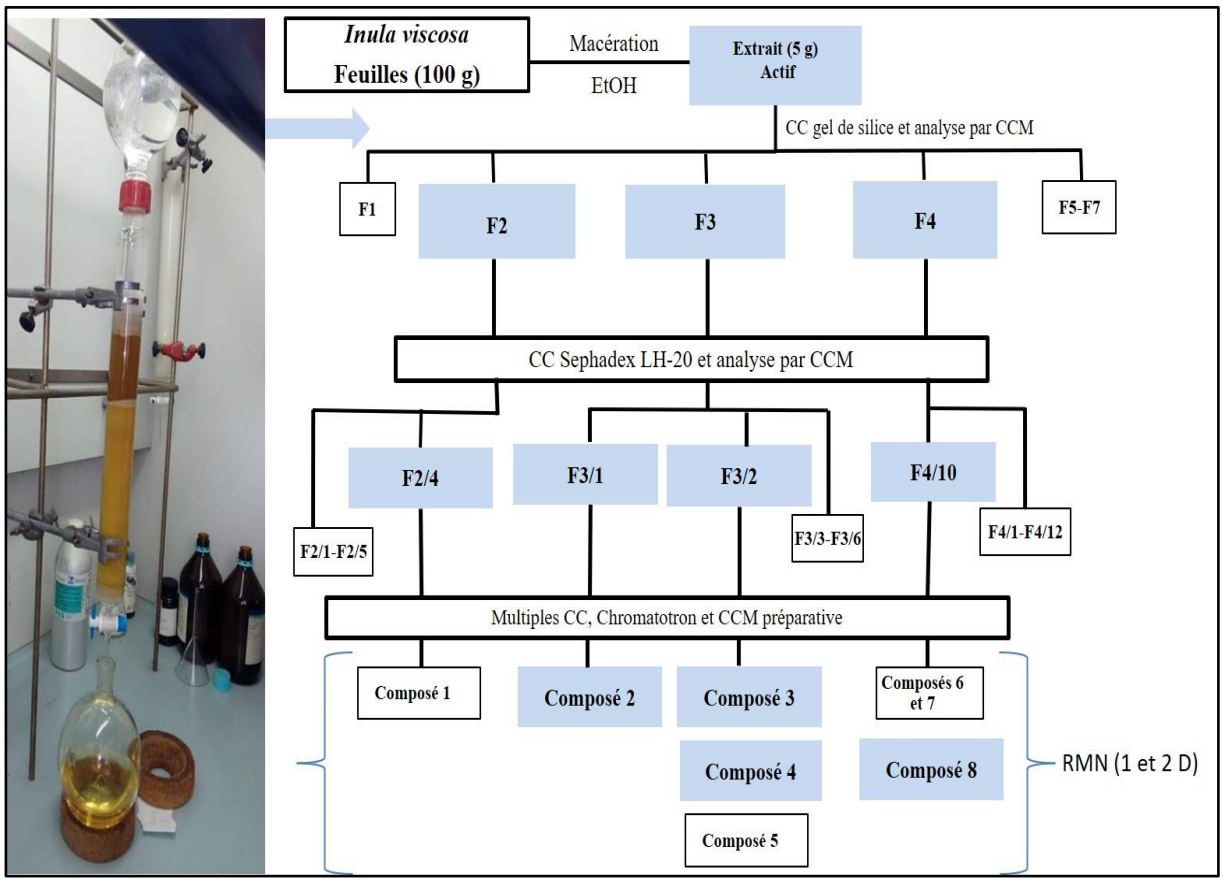


Figure II.11. Processus du fractionnement bioguidé utilisé contre *Leishmania* spp.

IV.2.5. Identification des structures des composés antileishmaniens

Le fractionnement bioguidé de l'extrait actif contre les souches de *Leishmania* spp. nous a permis d'isoler des composés purs dont l'identification structurale a été effectuée par RMN-^{1}H, et à chaque fois que nécessaire, par RMN-^{13}C. Pour ce faire, les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés adéquats dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Par la suite, selon la quantité du composé à analyser et la résolution souhaitée, les spectres 1D ont été enregistrés soit avec un spectromètre de type Brüker Avance 500 (fréquence de 500.13 MHz (^{1}H) et 125.25 MHz (^{13}C)) ou avec Brüker Avance 600 (fréquence de 600.13 MHz (^{1}H) et 150.25 MHz (^{13}C)). Les structures obtenues ont été analysées par le logiciel de traitement des données Topspin 2.1, et appuyées par des expérimentations de corrélation de RMN bidimensionnelles (RMN-2D) notamment HMBC, HSQC et ROESY (réalisées sur le même spectromètre Brüker Avance). Ces techniques permettent la visualisation et l'analyse des corrélations existantes entre les différents signaux donnés pour la structure d'une molécule. Selon Liu et Tomi (2008), l'expérience HMBC s'avère d'une grande utilité pour indiquer la corrélation entre un atome de carbone et un proton situé à plusieurs liaisons de distance, alors que l'expérience HSQC montre exactement quel proton est directement lié à quel carbone. Quant à ROESY, c'est une expérience qui mit en évidence les interactions dipolaires de deux atomes hydrogènes. Grâce au couplage RMN mono- et bidimensionnels, de nombreuses études ont pu déterminé avec certitude la structure chimique des composés isolés à partir des extraits de plantes médicinales (Hermoso et al., 2003 ; Reyes et al., 2006 ; Sun et al., 2020).

V. Détermination du mécanisme d'action des composés leishmanicides

Différentes techniques permettent d'observer et de quantifier des phénomènes spécifiques de l'apoptose. En effet, l'apoptose se caractérise par des modifications morphologiques et biochimiques. Elle débute par la condensation du cytoplasme avec une diminution importante du volume cellulaire menant à un changement de la taille et de la forme des cellules. Les mitochondries des cellules apoptotiques présentent de nombreuses modifications dont celle principale est la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale (Wang et Youle, 2009). Un autre évènement couplé à l'apoptose est celui de la condensation de la chromatine nucléaire, puis le clivage internucléosomique de l'ADN génomique. Cependant, malgré tous ces changements, l'intégrité structurelle des organelles reste intacte, au moins pendant les phases initiales ce qui joint l'altération de la perméabilité membranaire à la liste des évènements typiques de l'apoptose (Zhang et al., 2018).

Dans notre étude, la détection des évènements typiques de l'apoptose a été réalisée par différents marqueurs allant de la perméabilité membranaire du parasite jusqu'à son matériel génétique. Pour ce faire, dans un premier temps, une étape commune a été réalisée dans laquelle les promastigotes ont été traités par les CI_{90} des différents composés actifs. Après 24h d'incubation, les cellules traitées ont été récupérées à partir des puits et centrifugées à 1500 tpm pendant 10 min. Ensuite, le culot a été solubilisé soigneusement dans 50 µl du tampon avant d'être incubé avec le réactif approprié pour chaque test du marquage (kit) décrit ci-dessous. Au fur et à mesure, un contrôle négatif (cellules non traitées) a été préparé dans les mêmes conditions. Après les différentes incubations avec les réactifs spécifiques à chaque mécanisme, les suspensions cellulaires traitées ont été transférées à une plaque de 96 puits, puis les cellules ont été analysées par un microscope confocale au laser (40x et 100x) (EVOS FL Cell Imaging System AMF4300, Life Technologies, Madrid, Spain).

V.1. Détection de l'altération de la perméabilité membranaire

Pour détecter la perméabilité de la membrane plasmique des parasites, le kit SYTOX Green a été utilisé. Le principe de cette méthode se base sur l'intégrité membranaire des cellules. Le SYTOX Green est une molécule de très forte affinité pour les acides nucléiques, son intensité de fluorescence est multipliée par 500 fois lorsqu'elle se lie à l'ADN. C'est une molécule imperméable aux cellules dont les membranes sont intactes. Par conséquent, les cellules mortes ou non saines peuvent être facilement distinguées des cellules vivantes par l'augmentation du signal fluorescent. Pour ce faire, les parasites traités ont été incubés avec SYTOX Green à une concentration finale de 1 µM pendant 15 min dans l'obscurité (López-Arencibia et al., 2019).

V.2. Analyse du potentiel de la membrane mitochondriale

Le kit JC-1 (JC-1 Mitochondrial Membrane, Potential Assay Kit, Cayman Chemical) est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'analyse du potentiel de la membrane mitochondriale. Il s'agit d'un fluorochrome sous forme d'un cation lipophile sensible au voltage s'accumulant sélectivement dans les mitochondries. Normalement les cellules saines ont un potentiel mitochondrial élevé, le JC-1 du fait de sa charge positive, il s'accumule et forme des complexes dites J-agrégats caractérisés par une fluorescence rouge intense. Cependant, dans le cas des cellules apoptotiques à faible potentiel, le JC-1 reste dans le cytosol sous forme de monomère montrant une fluorescence verte. La fluorescence obtenue est proportionnelle au potentiel de la membrane mitochondriale. Autrement dit, plus ce dernier est élevé, plus le JC-1 s'accumule dans

la mitochondrie. Pour ce faire, les promastigotes traités comme décrit ci-dessus ont été incubés avec la sonde JC-1 (1 :10 v/v) à 26°C pendant 30 min (Cartuche et al., 2019).

V.3. Dosage de la production d'ATP

Le dysfonctionnement de la mitochondrie se confirme également par le dosage d'ATP produite par les promastigotes traités par les composés bioactifs. Cette quantification a été performée en utilisant la méthode luminescente par le kit Cell Titer-Glo® (Luminescent Cell Viability Assay (Promega)). Le principe de cette méthode se base principalement sur l'émission de la lumière lors de l'oxygénation du d-Luciférine en Oxyluciférine. Ceci implique la présence de la luciférine, la luciférase et de l'oxygène, mais aussi de l'ATP et de l'ion Mg^{++}. Pour ce faire, les parasites traités ont été transférés dans une plaque 96 puits. Par la suite, 100 µl du réactif ont été ajoutés à chaque puits, la plaque a été agitée pendant 2 min et incubée à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min afin de stabiliser le signal luminescent. Le contrôle négatif a été préparé dans les mêmes conditions sans traitement (Cartuche et al., 2019). Après incubation, l'intensité de la luminescence a été mesurée par le lecteur de microplaque Enspire (PerkinElmer, Massachusetts, USA). Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (100% de production d'ATP) et positif (la miltéfosine).

V.4. Evaluation de la condensation de la chromatine nucléaire

Le kit de détection d'apoptose à double coloration (Hoechst 33342 / PI) (Life Technologies) a été utilisé afin d'analyser l'état de la chromatine au sein des cellules. C'est un kit qui contient deux colorants qui diffèrent par leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer dans la cellule. Hoechst 33342 est un colorant à fluorescence bleue, alors que l'iodure de propidium (PI) est un colorant à fluorescence rouge. Les propriétés de ce test permettent de distinguer les cellules normales, apoptotiques et mortes. Après excitation, Hoechst 33342 colore la chromatine condensée dans les cellules apoptotiques plus brillamment que la chromatine dans les cellules normales, tandis que, l'iodure de propidium qui est un agent intercalant de l'ADN, n'est perméable qu'aux cellules mortes en les colorant en rouge. De ce fait, le protocol utilisé consiste à incuber les promastigotes traités avec Hoechst 33342 à 5 µg / ml et PI à 1 µg / ml pendant 15 min à 26°C (Sifaoui et al., 2018).

V.5. Marquage des espèces réactives de l'oxygène

Afin de compléter le chemin des évènements spécifiques de l'apoptose induite par les composés actifs, le marquage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'avère nécessaire, car sous stress, le parasite régénère les ROS comme réponse à un agent antimicrobien. Le kit CellROX (Thermo

Fisher Scientific), une sonde fluorogène, a été utilisé pour mesurer le stress oxydatif dans les cellules traitées. Il s'agit d'un colorant perméable aux cellules, et non fluorescent à l'état réduit. Cependant, lors de l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), il présente une fluorescence brillante intense. La mise en évidence des ROS implique l'incubation des parasites traités avec 5 µM du réactif CellROX pendant 30 min à 26°C (Sifaoui et al., 2019).

L'ensemble de ces tests a été performé selon les recommandations du fabriquant (Figure II.12). L'utilisation des kits pour la détection de l'apoptose présente de nombreux avantages. Elle est rapide, pratique et fiable. Plusieurs études ont détecté l'apoptose induite par différents agents antimicrobiens chez les amibes et les parasites en suivant le même protocol (López-Arencibia et al., 2019 ; Cartuche et al., 2020 ; Sifaoui et al., 2020 ; Rizo-Liendo et al., 2020).

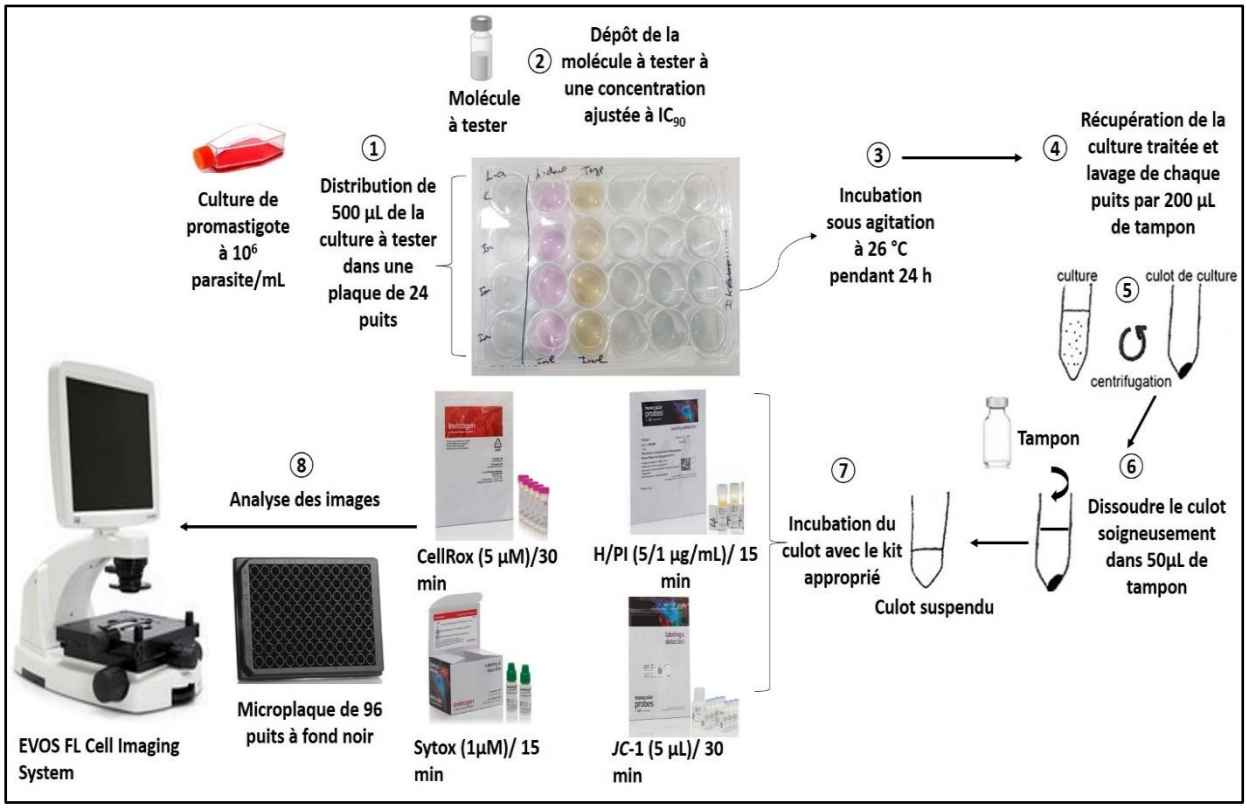


Figure II.12. Protocol suivi pour l'élucidation du mécanisme d'action des composés purs sur la forme promastigote de *L. donovani* et *L. amazonensis* (par Zeouk, 2021)

VI. Test de cytotoxicité des composés actifs sur les macrophages

La cytotoxicité est l'un des indicateurs les plus importants dans les études biologiques et spécialement dans la découverte de nouveaux agents antimicrobiens. Les tests de cytotoxicité permettent d'observer la croissance cellulaire, la viabilité et les effets morphologiques des molécules *in vitro*. En revanche, un large spectre de tests de cytotoxicité est actuellement utilisé dans les domaines de toxicologie et de pharmacologie, et donc le choix de la méthode appropriée est crucial pour obtenir des résultats précis et fiables. Dans la présente étude nous avons choisi le dosage fluorométrique par le réactif AlamarBlue. Il a été rapporté que les dosages fluorométriques offrent de nombreux avantages par rapport aux tests traditionnels. Ils sont faciles à réaliser, sensibles et applicables pour les lignées cellulaires en suspension ou adhérentes (Aslantürk, 2018) comme le cas des macrophages. De ce fait, la cytotoxicité des composés purs isolés à partir des deux plantes (objet de cette thèse) a été évaluée sur la lignée cellulaire J774 des macrophages murins selon le protocol suivi par Sifaoui et al. (2017). Pour ce faire, les macrophages ont été ensemencés dans une microplaque de 96 puits pendant 2h et ont été mis dans l'incubateur pendant 2h (37°C, 5% CO_2) pour permettre l'adhésion des cellules. La concentration des cellules dans les puits a été de 2×10^5 dans le milieu de culture RPMI enrichi de 10% de SVF. Entretemps, des dilutions en série (100-1,5625 µg/ml) de chaque composé ont été préparées dans un « Deepwell ». Par la suite, chaque ligne de dilution a été transférée à la microplaque contenant la culture des macrophages pour donner un volume final de 100 µL. Enfin, la microplaque a été réincubée pendant 24h à 37°C (5% CO_2). Le pourcentage de viabilité cellulaire a été évalué par ajout du réactif AlamarBlue (10%). Les courbes dose-réponse ont été tracées et les valeurs des CC_{50} ont été calculées.

Partie III
Résultats et Discussion

CHAPITRE 1. Séléction des plantes anti-*Leishmania* et anti-*Staphylococcus aureus*

I. Introduction

Partout dans le monde, la découverte des médicaments et le traitement de plusieurs maladies ont commencé avec l'utilisation des plantes et leurs dérivés (Salim et al., 2008). Le Maroc offre une gamme variée de bioclimats méditerranéens permettant une grande richesse en biodiversité florale avec plus de 4200 espèces de plantes (El Meskaoui A. et al, 2008). Les espèces à intérêt aromatique et/ou médicinal sont estimées à 500-600 espèces, dont un grand nombre sont endémiques (Neffati et Sghaier, 2014). D'ailleurs, le Maroc est un fournisseur traditionnel du marché mondial en plantes aromatiques et médicinales (PAM), avec une centaine de plantes exportées (Zrira, 2003). De plus, le pays dispose d'un savoir-faire ancestral marqué par le nombre important des herboristes distribués dans différentes villes. Cependant, cette richesse florale reste peu exploitée et plus particulièrement au centre du Maroc alors que c'est une zone connue par une grande diversité géographique et climatique. De ce fait, les connaissances traditionnelles peuvent servir de moteur de recherche puissant pour la mise en évidence de la richesse végétale de cette zone ce qui facilitera la découverte de médicaments à partir de produits naturels intentionnels, ciblés et sûrs.

C'est dans cet optique que ce chapitre s'est consacré à répertorier, d'après une étude ethnobotanique menée dans la région de Fès-Meknès, les plantes utilisées par la population locale dans le traitement des infections cutanées qui sont un symptôme commun entre le type d'infections causées par les deux germes de cette étude, *Leishmania* et *S. aureus*.

Dans la première partie, nous exposerons l'inventaire des plantes citées par les herboristes, les familles phytochimiques, les noms vernaculaires, les parties utilisées, les modes de préparation et d'administration, ainsi que le calcul des indices de fréquence de citation (IF).

Dans la deuxième partie, une sélection des plantes les plus citées est accomplie en se basant sur l'IF calculé pour chaque espèce ainsi que sur l'apport de la littérature.

II. Inventaire des plantes utilisées

Dans le présent travail, l'étude ethnobotanique a été réalisée en utilisant un questionnaire fondé sur différentes informations à propos des plantes anti-éruptions cutanées prescrites par les herboristes, sachant que l'éruption cutanée peut être dues à des virus, des champignons, des allergènes, des parasites comme les espèces du genre *Leishmania* ou à des bactéries comme *Staphylococcus aureus* ou à des surinfections microbiennes. Pour des raisons géographiques, épidémiologiques (foyers de leishmaniose prouvés) ainsi que l'effectif élevé des herboristes dans chaque ville de la région de Fès-Meknès, quatre villes ont été prises en considération dans cette étude à savoir Fès, Meknès, Taounate, et Sefrou. Afin de documenter les connaissances locales dans ces villes, un entretien d'environ 45 min a été mené auprès des herboristes locaux distribués dans chaque ville. Un total de 107 herboristes et guérisseurs traditionnels (n=107) a été interrogé. Selon la disponibilité et la possibilité d'accès aux informations, les informateurs ont été répartis comme suit : 63 informateurs à Fès, 14 à Meknès, 14 à Taounate et 16 à Sefrou. Cette enquête nous a permis d'inventorier les plantes réputées efficaces dans le traitement des infections cutanées qui ont été exposées aux participants à l'étude ethnobotanique sous forme des images montrant des éruptions cutanées causées par *Leishmania* spp. et *S. aureus*. 64 espèces végétales reparties en 35 familles ont été mentionnées (Tableau III.1). Les résultats de l'enquête concernant les familles des plantes recommandées ont montré que la famille des Lamiaceae a été la plus représentative (17,19%) avec 11 espèces, suivies des Apiaceae (9,38%) avec 6 espèces, puis des Asteraceae (6,25%) avec 4 espèces, alors que plusieurs autres familles ont été représentées mais avec au moins une seule espèce (Figure III.1). L'enquête a également révélé que les feuilles ont été la partie la plus fréquemment citée pour préparer les remèdes avec 43,3%, suivies des fleurs (13,3%), puis des racines (12,2%) (Figure III.2). Ces remèdes ont été préparés dans la plupart du temps par des décoctions dans de l'eau comme solvant (52%) (Figure III.3). La majorité de ces préparations ont été administrées par voie externe (73%) contre 27% seulement par voie orale (Figure III.4).

Tableau III.1. Inventaire des plantes utilisées dans le traitement des infections cutanées dans les villes de Fès, Meknès, Taounate et Sefrou.

Espèce	Nom vernaculaire	Famille	Partie utilisée	Mode de preparation	Voie d'administartion	Ville de citation et FI (%)
Allium ampeloprasum (= Allium porrum)	El Kerrat	Alliaceae	Feuilles Fleurs	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Aloe vera	Alovera	Aloeaceae	Feuilles	Cataplasme Décoction Infusion	Cutanée	Taounate 0,93
Ammi majus	Trillan/ Tlilan	Apiaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès et Taounate 3,74
Ammi visnaga	El khellabariya/ Bechnikha/ Kessiba	Apiaceae	Feuilles Racines	Cataplasme Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Artemisia herba alba	Chih	Asteraceae	Feuilles	Cataplasme	Cutanée	Fès, Meknès, Taounate 3,74
Alkkanna tinctoria	Taymant	Boraginaceae	Racines	Cataplasme	Cutanée	Meknès 3,74
Aquilaria malaccensis	Oud Aghris	Thymelaeaceae	Racines	Cataplasme	Cutanée	Meknès 2,80
Berberis hispanica	Azirki Berztam	Berberidaceae	Racines	Cataplasme Décoction	Cutanée	Fès Meknès Taounate Sefrou 19,62
Carlina/Atractylis gummifera	Addad	Asteraceae	Racines	Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93
Chamaemelum nobile	Babounj	Asteraceae	Feuilles	Infusion	Orale	Fès, Taounate 1,87
Cicer arietinum	Hemmes	Fabaceae	Fruit	Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93

Crocus sativus	Zaafrane	Iridaceae	Stigmate	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Citrus aurantium	Renj	Rutaceae	Fruit	Décoction	Orale Cutanée	Fès 0,93
Crataegus monogyna (= *Crataegus oxyacantha*)	Zaarour	Rosaceae	Feuilles, Fleurs Partie aérienne Fruit	Décoction Infusion	Cutanée	Fès, Meknès, Sefrou 14,01
Curcuma longa	Kharqoum	Zingiberaceae	Racines	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Cistus salviifolius	Tarahla	Cistaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Sefrou 13,08
Cinnamomum spp.	Dar Sini/ Karfa	Lauraceae	Bois	Décoction	Orale	Sefrou 5,60
Daucus carota	Khizzo	Apiaceae	Plante entière Fruits	Décoction Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93
Dittrichia viscosa (= *Inula viscosa*)	Magraman/ Bayraman	Asteraceae	Feuilles Plante entière	Cataplasme	Cutanée	Fès, Meknès, Taounate, Sefrou 25,23
Ephedra altissima	DilEloud	Ephedraceae	Racines	Décoction	Orale	Sefrou 11,21
Eruca sativa	Jerjir	Brassicaceae	Fleurs Graines	Décoction	Orale	Fès 2,80
Eucalyptus globulus	Eucalyptus	Myrtaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Ferula assa-foetida	Elwachk	Apiaceae	Feuilles Fleurs	Cataplasme Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Foeniculum vulgare	Chemmar/ besbas	Apiaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Glycyrrhiza glabra	Erk sous	Fabaceae	Racines	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Globularia alypum	Ain larnab/ Tasalgha	Plantaginaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès Taounate 3,74
Hibiscus sabdiriffa	Karkadiya	Malvaceae	Fleurs	Decoction	Orale	Sefrou 0,93

Illicium verum	Badiyan	Illiciaceae	Plante entière Graines	Infusion Cataplasme	Orale Cutanée	Fès 0,93
Juniperus oxycedrus	Taqqa	Cupressaceae	Graines	Décoction Cataplasme	Cutanée	Fès Taounate 3,74
Juniperus phoenicea	Laararlfinikiya	Cupressaceae	Fleurs	Décoction	Cutanée	Sefrou 1,86
Juncus rigidus/ arabicus	Oud Semmar	Juncaceae	Racines	Cataplasme	Cutanée	Taounate 0,93
Lavandula dentata	Lakhzama/ Khiyata	Lamiaceae	Feuilles Fleurs Plante entière	Infusion	Orale Cutanée	Fès Meknès Taounate Sefrou 18,69
Lavandula angustifolia	LaKhzama	Lamiaceae	Feuilles Fleurs Plante entière	Infusion	Orale Cutanée	Meknès, Sefrou 2,80
Lepidium sativum	Heb errchad	Brassicaceae	Graines	Décoction Cataplasme	Orale Cutanée	Taounate, Meknès, Sefrou 2,80
Lawsonia inermis	EL Henna	Lythraceae	Feuilles	Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93
Laurus nobilis	Elghar/ Chajratsidna Moussa	Lauraceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Linum usitatissimum	Zeriiet El kettan	Linaceae	Graines	Cataplasme	Cutanée	Sefrou 0,93
Marrubium vulgare	Meriwta/ Merriwa	Lamiaceae	Feuilles Fleurs Plante entière	Décoction	Cutanée	Meknès 0,93
Mentha piperita	NaânaâElfolfoli/Naânaâ El Âbdi	Lamiaceae	Feuilles	Infusion	Orale Cutanée	Fès 0,93
Melissa officinalis	Milissa/ Hmmida	Lamiaceae	Feuilles	Infusion	Cutanée	Sefrou 1,87
Myrtus communis	Rayhan	Myrtaceae	Feuilles	Décoction	Orale	Sefrou

						3,74
Nerium oleander	Defla	Apocynaceae	Feuilles Plante entière Partie aérienne	Cataplasme	Cutanée	Fès 3,74
Nigella sativa	Sanouj	Ranunculaceae	Graines	Infusion	Orale	Sefrou 5,61
Ocimum canum	Errayhan el kafouri	Lamiaceae	Feuilles	Décoction	Orale	Fès 0,93
Origanum majorana	Merdedouch/ Berkdouch	Lamiaceae	Feuilles Plante entière	Décoction	Cutanée	Fès Taounate 2,80
Olea europea	Zitoun	Oleaceae	Feuilles Fruit	Décoction Cataplasme	Cutanée	Fès 3,74
Oenothera spp.	Akhdariya	Onagraceae	Feuilles Fleurs	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Petroselinum crispum	Maadnous	Apiaceae	Feuilles	Infusion Décoction	Orale	Fès 0,93
Pelargonium graveolens	Laatercha	Geraniaceae	Feuilles Fleurs	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Punica granatum	Remman	Lythraceae	Ecorce	Décoction	Cutanée	Fès Meknès 4,67
Plantago major	Lsanlhamal/ Aslouj	Plantaginaceae	Feuilles	Décoction	Cutanée	Fès 0,93
Rhamnus alaternus	Amlilis	Rhamnaceae	Feuilles	Décoction Cataplasme	Cutanée	Fès Meknès Taounate 9,35
Ricinus communis	El Kharwaae	Euphorbiaceae	Feuilles	Cataplasme Décoction	Cutanée	Taounate 0,93
Rosmarinus officinalis	Azir	Lamiaceae	Feuilles Fleurs	Infusion Décoction	Orale Cutanée	Fès Sefrou 11,21
Rubia tinctorum	Elfowa	Rubiaceae	Racines	Décoction	Cutanée	FèsMeknès Taounate 9,35
Salvia officinalis	Salmiya	Lamiaceae	Feuilles	Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93

Salvadora persica	Swak	Salvadoraceae	Racines	Cataplasme	Cutanée	Meknès 0,93
Syzygium aromaticum	Kranfel/ Oud nowar	Myrtaceae	Clou	Infusion Décoction	Orale Cutanée	Fès Sefrou 1,87
Tetraclinis articulata	Aarâar	Cupressaceae	Feuilles	Infusion	Orale	Fès Meknès 3,74
Thymus algeriensis	Zâatar	Lamiaceae	Plante entière Feuilles	Infusion Décoction	Orale	Fès Meknès Taounate Sefrou 12,15
Thymus atlanticus	Zîitra	Lamiaceae	Feuilles	Décoction Cataplasme	Orale Cutanée	Fès 0,93
Thymelaea tartonraira	El matnan Talazazt	Thymelaeaceae	Feuilles	Cataplasme	Cutanée	Taounate 2,80
Urtica dioica	Herriga/ Herricha	Urticaceae	Feuilles Fleurs Plante entière	Décoction	Cutanée	Fès Meknès Taounate 3,74
Zizyphus lotus	Nbeg	Rhamnaceae	Feuilles Fruit	Décoction Cataplasme	Cutanée	Fès 0,93

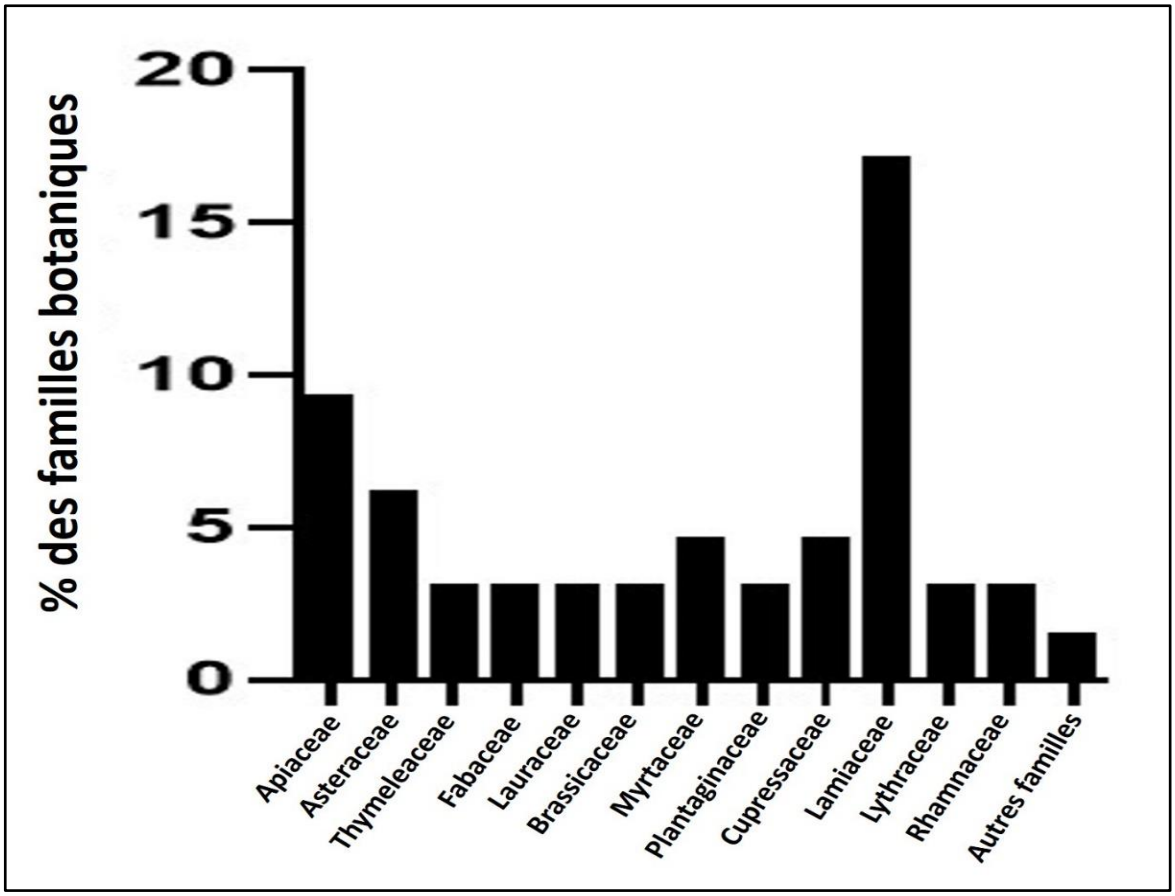


Figure III.1. Familles botaniques inventoriées lors de l'étude ethnobotanique dans les quatre villes de la région Fès- Meknès

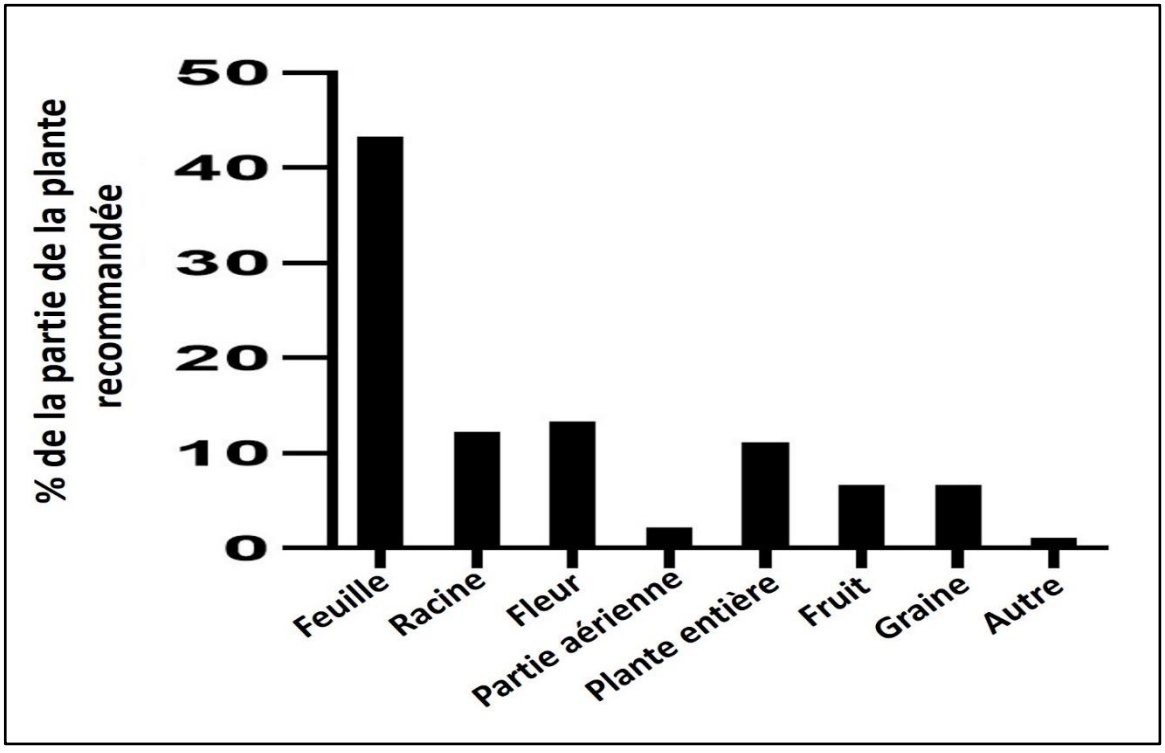


Figure III.2. Parties utilisées dans la préparation des remèdes

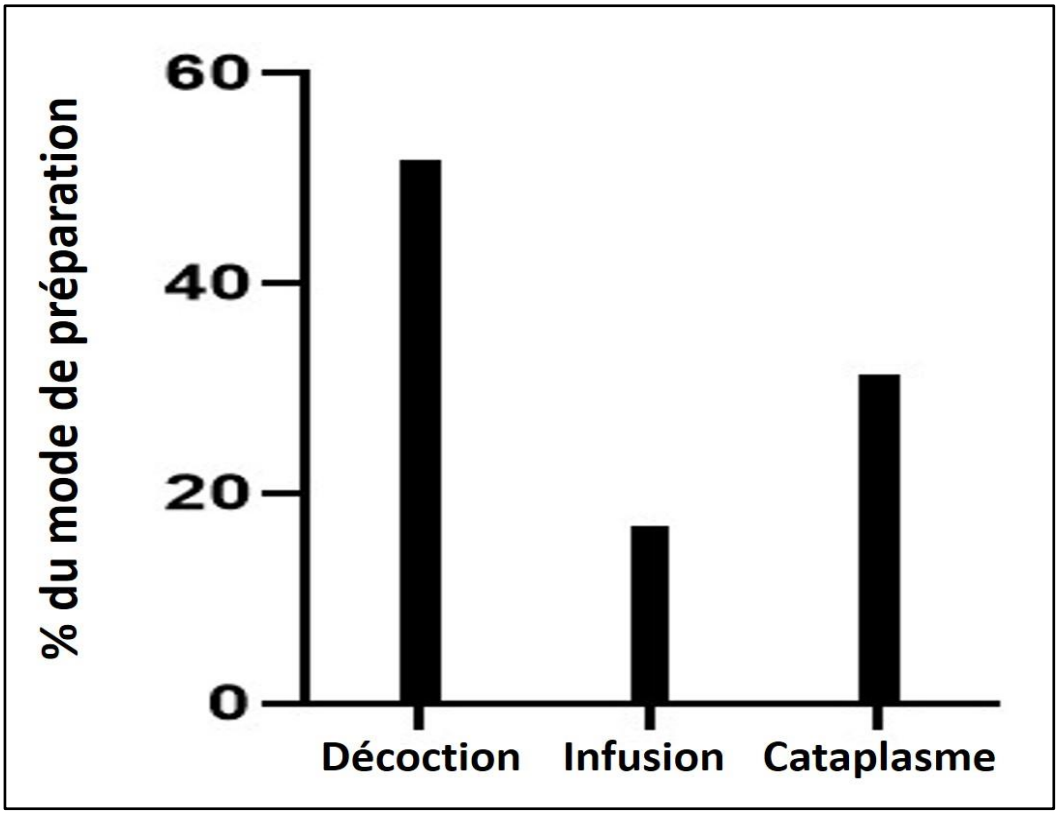


Figure III.3. Mode de préparation des remèdes prescrits par les herboristes de la région étudiée

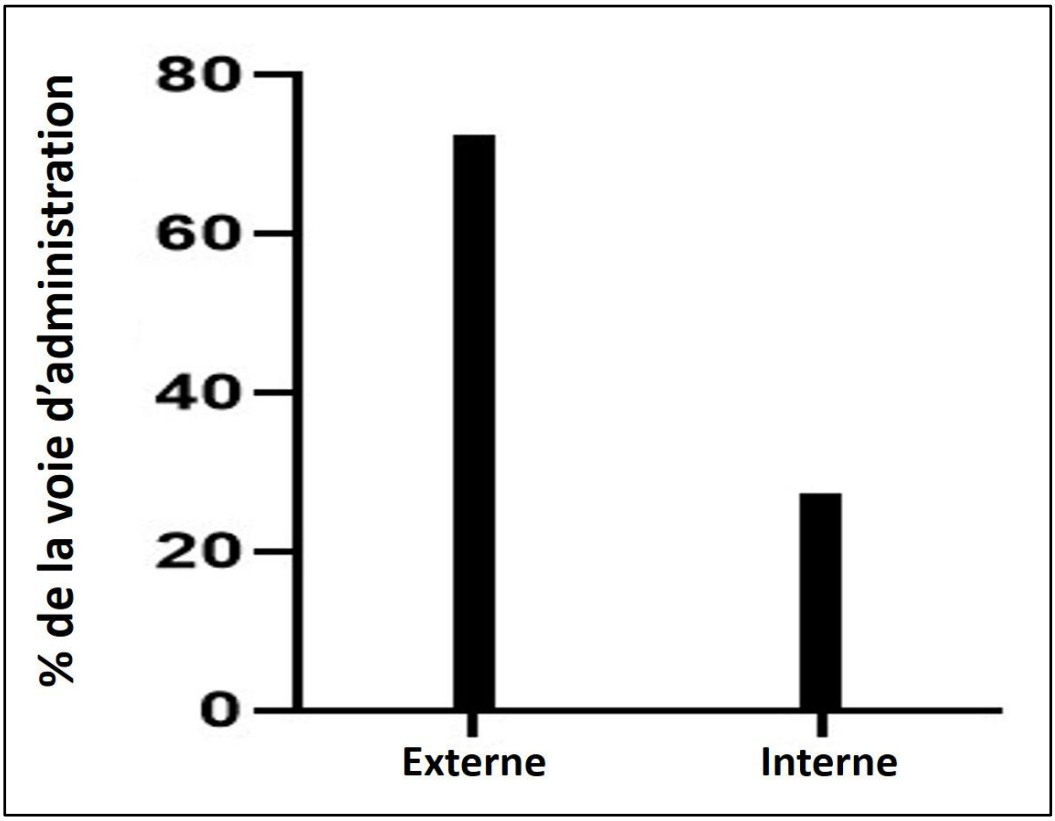


Figure III.4. Voies d'administration des remèdes préparés prescrits par les herboristes dans les villes de la région de Fès-Meknès

III. Sélection des plantes

Selon Coulerie (2012), un certain nombre de critères peuvent être pris en considération pour le choix des plantes à partir des études ethnobotaniques. Dans notre étude, la sélection des plantes a été basée dans un premier temps sur l'indice de fréquence de citation (IF) et l'origine géographique, puis une recherche bibliographique a été menée sur les plantes à IF élevé afin de ne garder que les espèces les moins étudiées vis-à-vis de nos germes cibles et de combler un manque de potentialités biologiques contre *Leishmania* et *S. aureus*.

Les résultats ont montré que les valeurs de l'IF ont varié entre 0,93 et 25,23 (Tableau III.1). Les plantes citées au moins quatre fois (IF $\geq$ 3,74) ont été retenues. Par conséquent, parmi les 64 plantes, 23 espèces ont été considérées comme les plus fréquemment citées dans les quatre zones étudiées. A l'aide d'une analyse bibliographique, nous avons développé plus en détails ces plantes. Ceci nous a mené à éliminer les espèces largement étudiées contre les deux germes à savoir *Thymus algeriensis*, *Rosmarinus officinalis, Tetraclinis articulata*, *Nigella sativa*, *Cinnamomum* spp., *Olea europea* et *Myrtus communis*. De plus, *Artemisia herba alba* a été écartée du criblage anti-*Leishmania* spp., tandis que *Punica granatum* a été éliminée du criblage anti-*S. aureus*.

Seize plantes ont été alors retenues pour le criblage biologique à savoir *Inula viscosa* (25,23%), *Berberis hispanica* (19,62%), *Lavandula dentata* (18,69%), *Crataegus oxyacantha* (14,01%), *Cistus salviifolius* (13,08%), *Ephedra altissima* (11,21%), *Rhamnus alaternus* et *Rubia tinctorum* (9,35%), *Punica granatum* (4,67%), *Juniperus oxycedrus*, *Urtica dioica*, *Nerium oleander*, *Globularia alypum*, *Alkkanna tinctoria*, *Artemisia herba alba* et *Ammi majus* (3,74%) (Tableau III.2).

Tableau III.2. Plantes sélectionnées pour étude.

Espèce	Famille botanique	Partie utilisée
Alkkanna tinctoria	Boraginaceae	Racine
Ammi majus	Apiaceae	Feuille
Artemisia herba alba	Asteraceae	Feuille
Berberis hispanica	Berberidaceae	Racine
Cistus salviifolius	Cistaceae	Feuille
Crataegus oxyacantha	Rosaceae	Partie aérienne
Ephedra altissima	Ephedraceae	Racine
Globularia alypum	Plantaginaceae	Feuille
Inula viscosa	Asteraceae	Feuille
Juniperus oxycedrus	Cupressaceae	Graine
Lavandula dentata	Lamiaceae	Feuille
Neriumo leander	Apocynaceae	Feuille
Punica granatum	Lythraceae	Ecorce
Rhamnus alaternus	Rhamnaceae	Feuille
Rubia tinctorum	Rubiaceae	Racine
Urtica dioica	Urticaceae	Partie aérienne

IV. Discussion

Au Maroc, plusieurs études ethnobotaniques ont été entreprises dans diverses régions afin d'exploiter et de valoriser la diversité végétale inconcevable du pays. Dans la région de Rif occidental, Rhattas et al. (2016) ont montré que la famille des Lamiaceae est la plus utilisée par la population locale, et les espèces les plus utilisées incluent *Cistus varius*, *Marrubium vulgare*, et *Mentha pulegium*. Dans le moyen Atlas central, Daoudi et al. (2015) ont recensé 125 plantes médicinales réparties dans les différentes villes de la région à savoir Meknès, Elhajeb, Azrou, Ifrane, Khénifra, Mrirt et Timehdit. Ces plantes appartiennent à 50 familles et 111 genres. Les plantes les plus utilisées sont essentiellement *Anacyclus pyrethrum* (Akirkarha, 4,41%), *Aristolochi alonga* L. (Bereztam, 3,07 %), *Urtica* spp. (Hariga, 2,97%), et *Corrigiola telephiifolia* L. (Serguina, 2,87%).

Dans la région d'Ain Leuh, Akdime et al. (2015) ont recensé 139 plantes reparties en 53 familles. Les premiers rangs sont occupés par les Lamiaceae (11,4%), Rosaceae (8,94%), et Asteraceae (8,13%). Dans la région de Mechraâ Bel Ksiri, Benkhnigue et al. (2010) ont répertorié dans un catalogue à usage thérapeutique, 149 plantes médicinales appartenant à 127 genres et 52 familles dont les plus abondantes sont respectivement les Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, Poaceae, Solanaceae et Fabaceae. Dans la région de Zaër, un catalogue de plantes médicinales a été mis en œuvre, il couvre 228 espèces végétales réparties en 223 genres et 79 familles avec une prédominance des Asteraceae, Leguminoseae, Apiaceae, Lamiaceae, Poaceae et Solanaceae. Parmi les espèces les plus utilisées par la population de cette région, se trouvent *Origanum compactum* L. (l'origan) et *Mentha pulegium* L. (la menthe pouliot) (Lahsissene et al., 2009). Dans la province de Settat, 90 espèces appartenant à 83 genres et à 44 familles ont été répertoriées, les familles les plus représentées sont les Lamiaceae (17,58%), suivie des Apiaceae (9,89%) et des Asteraceae (6,59%). La plupart de ces plantes sont utilisées dans le traitement des problèmes digestifs, respiratoires et hépatiques (Tahri et al., 2014). De plus, dans la ville de Kenitra, Salhi et al. (2010) ont inventorié 62 espèces appartenant à 58 genres et 34 familles, dont la plus représentative est la famille des Lamiaceae. Récemment, Zougagh et al. (2019) ont mené une étude ethnobotanique dans la ville de Casablanca sur les plantes utilisées dans le traitement des pathologies orales. Ils ont mis en œuvre une richesse remarquable avec 46 espèces appartenant à 22 familles, dont la famille des Juglandaceae est la plus représentée et l'espèce *Syzygium aromaticum* (Krounfel) est la plus utilisée. Skalli et al. (2019) ont été intéressés par les plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la ville de Rabat. Ils ont inventorié 18 familles botaniques incluant 30 espèces, parmi lesquelles *Trigonella foenum graecum* L. (Helba, 15,4%), *Salvia officinalis* L. (Salmia, 13,3%) et *Olea europaea* L. (Zaytoun, 10,8%) ont été les plus citées.

Néanmoins, il y a eu un manque d'attention ethnobotanique dans le centre du Maroc et surtout celle accordée à l'utilisation des plantes dans le traitement des infections cutanées. C'est dans ce cadre que la présente étude a été menée dans le centre Nord du Maroc et a mis en lumière une large gamme de plantes utilisées par la population de Fès, Meknès, Taounate et Sefrou pour soigner les éruptions cutanées qui peuvent être causées par *S. aureus* ou *Leishmania* spp. Nous rappelons qu'un total de 64 espèces végétales appartenant à 35 familles a été prescrit par les herboristes et les guérisseurs traditionnels. Les familles de Lamiaceae, Apiaceae et Asteraceae ont été les plus représentées. En effet, ces familles engendrent d'importantes plantes utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne, ainsi que dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Nieto, 2017 ; Kostić et al., 2020 ; Arana-Argáez et al., 2021). La diversité des espèces appartenant

à ces familles botaniques peut expliquer leur utilisation intense par les populations locales et dont la dominance pourrait être attribuée à leur abondance dans la flore des zones d'étude. De nombreuses études ethnobotaniques ont confirmé la prédominance de ces familles dans le traitement de différentes maladies et infections. Dans l'Anti-Atlas occidental du Maroc, une enquête ethnobotanique a souligné la prépondérance des Lamiaceae (8 espèces), Asteraceae et Apiaceae (5 espèces chacune) dans le traitement traditionnel du diabète (Barkaoui et al., 2017). Salhi et al. (2019) ont entrepris une étude ethnopharmacologique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des brûlures cutanées au Maroc occidental dans laquelle ils ont démontré que les Lamiaceae et les Asteraceae sont les familles les plus recommandées par les herboristes. De plus, ces deux familles ont été les plus représentatives pour le traitement des maladies du système nerveux dans le Rif du Maroc avec 5 espèces chacune (Chaachouay et al., 2020). En revanche, Omwenga et al. (2015) ont mené une étude ethnobotanique dans la communauté de Kenya afin de documenter l'utilisation de plantes médicinales pour le traitement des infections cutanées en plus d'autres pathologies comme les infections des voies urinaires, de cavité buccale, et du système gastro-intestinal. De même, ils ont révélé que les Lamiaceae et les Asteraceae ont été les plus mentionnées avec 3 espèces chacune (12%). Dans le Sud-Est du Maroc, une enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertension et du diabète a confirmé la prédominance des Lamiaceae et des Apiaceae avec une mise en évidence de plusieurs espèces en commun avec notre étude, ce qui montre que ces espèces à usage cutané peuvent avoir un large spectre d'utilisation (Tahraoui et al., 2007). Cependant, dans l'Ouest du Madhya Pradesh en Inde, Wagh et Jain (2018) ont montré que c'est la famille des Euphorbiaceae (12 espèces) qui a été la plus abondante dans le traitement des troubles dermatologiques. Contrairement à notre étude, cette famille a été représentée par une seule espèce.

A partir de cette gamme de plantes, les résultats obtenus ont également montré que les feuilles ont été la partie la plus utilisée dans la préparation des remèdes. Des études antérieures ont rapporté un large éventail de taux d'utilisation des feuilles. Cette utilisation intensive pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. En effet, les feuilles constituent un site principal de la photosynthèse et jouent un rôle important dans la vie des plantes. Elles peuvent également être utilisées comme organe synthétique et de stockage pour les métabolites secondaires (Li et al., 2020). De nombreuses études ont montré l'accumulation et la biosynthèse de diverses composés dans les feuilles tels que les sesquiterpènes, les flavonoïdes et d'autres (Henz Ryen et al., 2020 ; Noriega et al., 2020 ; Yang et al., 2020 ; Lama-Muñoz et al., 2020). Cependant, les facteurs développementaux et environnementaux peuvent affecter la teneur en métabolites secondaires des

feuilles de plantes médicinales (Li et al., 2016) tels que, par exemple, la saison de récolte, l'âge des feuilles et l'exposition ou non au soleil (Vázquez-León et al., 2017 ; Gomes et al., 2019). De plus, le mode d'extraction de ces métabolites influence également la teneur, le rendement et l'efficacité pour les deux usages, traditionnels et modernes. La prépondérance de la méthode de décoction pour préparer les remèdes a été largement rapportée ce qui corrobore notre résultat. Cette méthode a été la plus recommandée par les herboristes et ceci semble avoir un certain nombre d'avantages comme l'extraction d'une large gamme de substances végétales actives et solubles dans de l'eau bouillante tout en facilitant leur absorption par le corps (Bouasla et Bouasla, 2017).

Contrairement aux infections internes, en dermatologie la voie d'administration est majoritairement externe car le patient peut soit appliquer un cataplasme direct, soit un rinçage des éruptions en utilisant les décoctions et les infusions préparées. Autrement dit, l'utilisation interne des plantes médicinales est destinée le plus souvent aux troubles digestifs, maux d'estomac, diabète, troubles neurologiques, ou douleurs rhumatismales. Dans une étude menée par Al-Qura'n (2008), l'utilisation externe des remèdes à Jordan a été liée principalement aux cas des inflammations et des irritations de la peau (fissures, ecchymoses, gelures, piqûres de scorpion et piqûres d'insectes) et aux infections des muqueuses (irritations et infections de la bouche et des gencives, et les hémorroïdes).

V. Conclusion

De nombreuses études ethnobotaniques et ethnopharmacologiques ont été menées afin de créer le catalogue des plantes médicinales dans une région donnée, ou bien afin de documenter l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans le traitement d'une large liste des infections telles que, entre autres, le diabète, les maladies respiratoires, gastro-intestinales et neurologiques. Cependant, il y a eu un manque d'attention ethnobotanique accordée à l'utilisation des plantes pour des troubles dermatologiques au Maroc ainsi qu'à l'échelle internationale.

A partir de l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- La région de Fès- Meknès est douée d'une richesse florale prometteuse. L'étude ethnobotanique dans les villes de Fès, Meknès, Taounate et Sefrou a permis d'inventorier 64 espèces appartenant à 35 familles botaniques utilisées dans le traitement des infections cutanées.

- Les Lamiaceae, Apiaceae et Asteraceae ont été les familles les plus abondantes dans la région de Fès- Meknès.
- Les remèdes traditionnels à application externe ont été préparés dans le plus souvent par des décoctions dans de l'eau bouillante en utilisant les feuilles.
- Les études ethnobotaniques doivent se compléter par une sélection rigoureuse en se basant sur différents critères tels que l'originalité, l'origine géographique et la fréquence de citation.
- Parmi les 64 plantes mentionnées, le calcul de l'indice de fréquence de citation ainsi que l'apport de la bibliographie nous a permis de retenir 16 espèces pour faire objet des criblages biologiques à savoir *Inula viscosa*, *Berberis hispanica*, *Lavandula dentata*, *Crataegus oxyacantha*, *Cistus salviifolius*, *Ephedra altissima*, *Rhamnus alaternus*, *Rubia tinctorum*, *Punica granatum*, *Juniperus oxycedrus*, *Urtica dioica*, *Nerium oleander*, *Globularia alypum*, *Alkkanna tinctoria*, *Artemisia herba alba* et *Ammi majus*.

CHAPITRE 2. Activité antistaphylococcique

I. Introduction

Le présent chapitre vise la recherche des composés bioactifs à effet antistaphylococcique en exploitant les résultats de l'étude ethnobotanique dans la région de Fès- Meknès. La première partie a été consacrée au criblage de quinze extraits éthanoliques, préparés à partir des plantes sélectionnées (résultats chapitre 1) contre les quatre souches cibles de *S. aureus*. Ces extrais ont été préparés à partir des parties prescrites par les herboristes à savoir les racines d'*A. tintoria*, *B. hispanica*, *E. altissima* et *R. tinctorium*; les parties aériennes de *C. oxyacantha* et *U. dioica*; les feuilles d'*A. majus*, *A. herba alba*, *G. alypum*, *C. salviifolius*, *I. viscosa*, *L. dentata*, *N. oleander*, et *R. alaternus* ; et les graines de *J. oxycedrus*. Le criblage a été débuté par des tests qualitatifs, suivi des tests quantitatifs. A partir des résultats obtenus, la deuxième partie a été consacrée à la sélection de l'extrait le plus actif et la description de la plante retenue pour la poursuite des essais feront objet de la troisième partie qui a eu pour objectif le fractionnement bioguidé et l'identification des composés isolés. Par la suite, le profil cytotoxique du composé actif a été évalué sur une ligné cellulaire des macrophages murins.

II. Criblage antistaphylococcique

Dans un premier temps, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée par la méthode de diffusion par puits sur des souches cliniques et de référence de *S. aureus* ayant des caractéristiques distinctes et des profils antibiogrammes différents. Les diamètres des zones d'inhibition, lorsqu'elles existent, ont été mesurés (en mm). Les résultats obtenus ont montré que parmi les quinze extraits éthanoliques testés, six extraits ont été actifs contre les souches cibles, mais avec des zones d'inhibition différentes. Du point de vue qualitatif, les extraits éthanoliques de *B. hispanica* et *R. alaternus* ont montré la meilleure activité contre toutes les souches, avec une sensibilité plus remarquable de *Sa* et SARM (ATCC29213) par rapport à *Sa*LPV+ et SARM348 (Tableau III.3).

Tableau III.3. Zones d'inhibition des extraits éthanoliques des quinze plantes contre les souches de *S. aureus*.

Extraits éthanoliques	Souches de *S. aureus*			
	***Sa*LPV+**	**SARM348**	***Sa***	**SARM (ATCC29213)**
R. alaternus	14 ± 1,00	15 ± 1,00	25,50 ± 1,5	25,00 ± 1,00
I. viscosa	12 ± 1,00	12 ± 0,81	13,66 ± 1,88	13,00 ± 0,81
C. oxyacantha	11± 0,5	14 ± 0,5	12,33 ± 1,88	11,66 ± 1,24
R. tinctorium	10 ± 0,5	20 ± 0,5	10,33 ± 0,47	12,50 ± 0,50
A. herba alba	13 ± 1,88	10 ± 0,0	14,50 ± 2,12	13,00 ± 0,70
B. hispanica	15 ± 0,0	20 ± 1,0	26,00 ± 1,00	24,00 ± 1,00
E. altissima	NA	NA	NA	NA
L. dentata	NA	NA	NA	NA
C. salviifolius	NA	NA	NA	NA
N. oleander	NA	NA	NA	NA
A. tinctoria	NA	NA	NA	NA
J. oxycedrus	NA	NA	NA	NA
U. dioica	NA	NA	NA	NA
G. alypum	NA	NA	NA	NA
A. majus	NA	NA	NA	NA

Diamètre des zones d'inhibition (mm) incluant le disque 6 mm ; NA : Non actif

Dans un deuxième temps, les six extraits qui ont montré une zone d'inhibition ont fait l'objet de la détermination de la CMI par la méthode de macrodilution en milieu solide en utilisant une large gamme de concentration allant de 16 à 0,25 mg/ml. Selon les résultats présentés dans le Tableau III.4, les extraits ont montré des activités de degrés variables contre les différentes souches de *S. aureus*. L'extrait de *R. alaternus* a montré le meilleur effet inhibiteur avec une CMI de 0,5 mg/ml contre *Sa* et SARM (ATCC29213), et de 1,0 mg/ml contre *Sa*LPV+ et SARM348. Les autres extraits ont montré des CMIs entre 4 et 16 mg/ml.

Tableau III.4. Concentrations minimales inhibitrices des extraits éthanoliques des six plantes sélectionnées par le test qualitatif contre les souches de *S. aureus*.

Extraits éthanoliques	**CMI (mg/ml)**			
	***Sa*LPV+**	**SARM348**	***Sa***	**SARM (ATCC 29213)**
A. herba alba	>16	16	8	8
B. hispanica	>16	16	16	16
C. oxyacantha	16	16	16	16
I. viscosa	8	4	4	4
R. alaternus	1,0	1,0	0,5	0,5
R. tinctorium	>16	8	16	16

La gamme des dilutions allant de 16 à 0,25 mg/ml ; un control positif (spots de 5µl de la suspension bactérienne sur la gélose) a montré une croissance normale.

À partir des résultats de tests qualitatifs et quantitatifs, le meilleur effet antistaphylococcique a été obtenu par l'extrait de *R. alaternus*. De ce fait, cette plante a été retenue pour la poursuite des travaux de recherche visant l'isolement et l'identification des composés responsables de cette activité.

III. Description de la plante active sélectionnée

Selon la classification botanique, l'espèce *Rhamnus alaternus* est classée comme suit (Figure III.5) (Annexe 4) :



Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	*Rhamnus*
Espèce	*R. alaternus* L.
Nom vernaculaire	Amliless

Figure III.5. L'espèce *Rhamnus alaternus* et sa classification botanique

R. alaternus est un arbrisseau dioïque pérenne de 1 à 5 mètres de haut, à feuillage persistant, qui pousse dans la région méditerranéenne (Ammar et al., 2005). C'est une espèce tolérante et peut occuper différentes zones telles que les lisières de forêt, les rochers nus, et les cours d'eau (Longo et al., 2005). *R. alaternus* est reconnue comme l'une des espèces dotées d'une grande diversité génétique impliquée dans son adaptation et sa tolérance à différentes conditions environnementales (El Aou-Ouad et al., 2015).

La littérature ethnobotanique a révélé que *R. alaternus* a été principalement utilisée dans le traitement traditionnel des infections internes. Le décocté de sa partie aérienne a été utilisé par la population locale en Navarre-Espagne en tant qu'agent antihypertenseur, tandis que l'infusion de la même partie a été utilisée pour traiter l'hypercholestérolémie (Akerreta et al., 2007). En médecine traditionnelle du Sud-Ouest algérien, la décoction des feuilles de *R. alaternus* a constitué un remède efficace pour le traitement des troubles gastro-intestinaux (Djidel et al., 2010) et de l'hépatite (Benarba, 2016). Dans le même sens, Boudjelal et al. (2013) ont confirmé l'utilisation de *R. alaternus* pour soigner les maladies hépatiques. Au centre-ville de Tlemcen-Algérie, l'infusion des feuilles de *R. alaternus* a été utilisée pour traiter l'ictère (Elyebdri et al., 2017), alors que la décoction préparée à partir des branches a été prise par voie orale à jeun dans les cas de troubles musculosquelettiques (Cavero et Calvo, 2015). Cependant, il n'y a eu qu'une seule enquête ethnobotanique qui a démontré l'utilisation externe de *R. alaternus* au Nord-Est de l'Algérie où Chermat et Gharzouli (2015) ont rapporté l'utilisation des feuilles et des fruits dans le traitement des maladies de la peau et de l'amygdalite. Par conséquent, nous pouvons conclure que *R. alaternus* est une espèce largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour soigner une large liste des maladies surtout dans les pays arabes.

Selon la littérature pharmacologique, de nombreuses études scientifiques ont confirmé l'efficacité traditionnelle de *R. alaternus*. En effet, c'est une plante médicinale très reconnue par son excellent pouvoir antioxydant, en plus d'autres propriétés biologiques telles que les activités anti-génotoxiques, antimutagènes, anti-hyperlipidémies, et antimicrobiennes (Ammar et al., 2008 ; Bhouri et al., 2011 ; Kosalec et al., 2013 ; Tacherfiout et al., 2018) en raison de sa richesse en composés bioactifs qui appartiennent à différentes familles phytochimiques tels que les anthraquinones, les flavonoïdes et les anthocyanines (Longo et al., 2005 ; Cuoco et al., 2014 ; Ammar et al., 2019). Cependant, malgré la popularité de *R. alaternus*, l'activité antibactérienne n'a pas été largement rapportée, un nombre très limité d'investigations a décrit le pouvoir antibactérien contre certaines souches sans identifier les composés bioactifs (Ammar et al., 2007 ; Kosalec et al., 2013).

IV. Fractionnement bioguidé et identification des composés actifs

Dans le but d'isoler les composés responsables de l'activité honorable de *R. alaternus* contre *S. aureus*, l'extrait éthanolique a subi un fractionnement bioguidé en alternant des essais chimiques et biologiques, suivi de plusieurs étapes de séparation et de purification chromatographiques à savoir des colonnes de gel de silice éluées par différents solvants selon la nature de la fraction/sous fraction à purifier. Comme résultat, quarante-six fractions ont été collectées, combinées selon leurs profils CCM en douze fractions (F1-F12) et testées sur les souches de *S. aureus*. La détermination de la CMI des fractions et sous fractions obtenues a été effectuée par la méthode de la microdilution en utilisant la résazurine comme indicateur de viabilité staphylococcique à une gamme de concentration allant de 500 à 0,7812 µg/ml.

Les résultats obtenus lors de la détermination des CMIs sont présentés dans le Tableau III.5. Comme il a été prévu à partir des résultats préliminaires de la bioautographie qui a montré des zones d'inhibition optimales, les fractions F3 (175,9 mg), F5 (37,6 mg) et F6 (31,5 mg) ont été les plus actives en inhibant la croissance des souches de *S. aureus* avec des CMIs entre 31,5 et 200 µg/ml. Par ailleurs, *Sa*LPV+, SARM348 et SARM (ATCC29213) ont montré le même spectre de sensibilité vis-à-vis des trois fractions, tandis que, *Sa* a été la plus sensible à F3 avec une CMI de 31,5 µg/ml, mais la moins sensible à F6 avec une CMI de 200 µg/ml.

Tableau III.5. Concentrations minimales inhibitrices des fractions de *R. alaternus* contre les quatre souches de *S. aureus.*

Souches	***Sa*LPV+**	**SARM348**	***Sa***	**SARM (ATCC 29213)**
R. alaternus		**CMI (µg/ml)**		
Extrait brut	1000	1000	500	500
F1-F2	NA	NA	NA	NA
F3	125	125	31,5	125
F4	NA	NA	NA	NA
F5	50	50	100	50
F6	50	50	200	50
F7-F12	>1000	>1000	>1000	>1000
Control +	CN	CN	CN	CN
Control -	CN	CN	CN	CN

Control + : souche et milieu LB ; Control - : souche et DMSO à 2% ; CN : croissance normale. CMB des fractions actives > 500 µg/ml.

En se basant sur les résultats des CMIs obtenues, seules les fractions actives (F3, F5 et F6) ont été retenues pour la poursuite des purifications à l'aide d'autres colonnes chromatographiques de gel de silice conduisant à l'isolement de 2 composés naturels purs. La sous-fraction de F3 a donné le composé **1** (2,5 mg), et la purification de F6 a donné le composé **2** (16,6 mg). Cependant, l'analyse chimique de la fraction F5 a permis de conclure que cette fraction est constituée des deux composés **1** et **2**.

Les analyses RMN (^{1}H et ^{13}C) de ces composés ont conduit à l'identification de l'émodine (**1**) de F3 et le kaempférol (**2**) de F6 (Figure III.6.). Ces données spectroscopiques issues de l'analyse des spectres de RMN (Annexes 5 et 6) corroborent celles précédemment rapportées dans la littérature (Mari et al., 2019 ; Demmak et al., 2019). De plus, des analyses de la spectrométrie de masse ont été réalisées afin de confirmer les structures obtenues (Annexes 7,8,9 et 10).

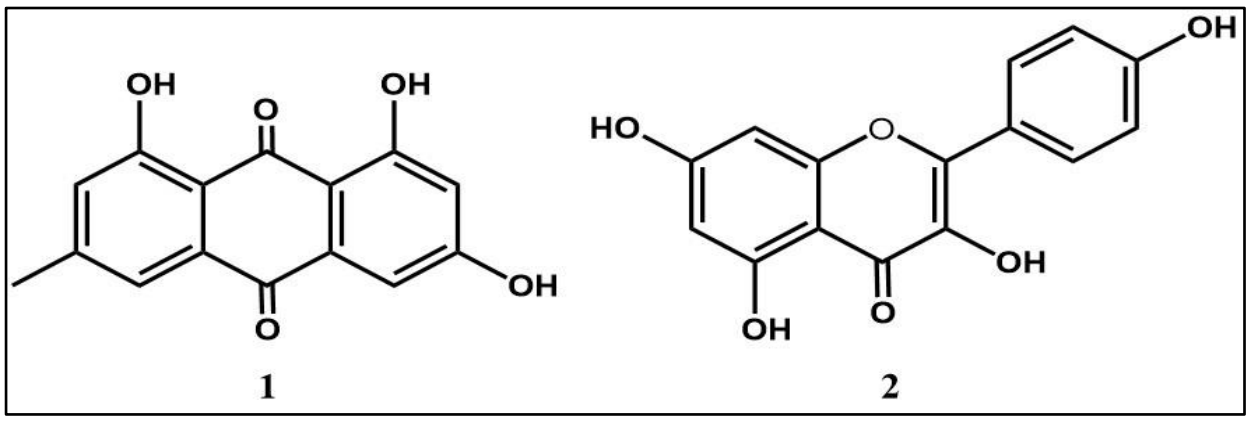


Figure III.6. Structures des composés purifiés de l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* : Emodine (**1**), Kaempférol (**2**)

Après la confirmation des structures chimiques des deux composés, la détermination des CMIs et CMBs a été effectuée par la méthode de la microdilution en utilisant toujours la résazurine comme indicateur de viabilité staphylococcique à une gamme de concentration allant de 250-0,4882 µg/ml. De plus, le profil cytotoxique du composé actif a été évalué en utilisant l'AlamarBlue comme indicateur de viabilité des macrophages murins (Tableau III.6).

Tableau III.6. Concentrations minimales inhibitrices des composés purs isolés des fractions de *R. alaternus* contre les quatre souches de *S. aureus*, test de cytotoxicité et indice de selectivité vis à vis des macrophages murins.

Composés/ Souches	***Sa*LPV+**		**SARM348**		***Sa***		**SARM (ATCC29213)**		**Macrophages murins**
	CMI (µg/ml)	**IS**	**CMI (µg/ml)**	**IS**	**CMI (µg/ml)**	**IS**	**CMI (µg/ml)**	**IS**	**CC_{50} (µg/ml)**
Emodine	15,63	>6,4	15,63	>6,4	1,95	>51,28	15,63	>6,4	>100
Kaempférol	>250	-	>250		>250	-	>250	-	-
Control +	CN		CN		CN		CN		
Control -	CN		CN		CN		CN		

Control + : souche et milieu LB ; Control - : souche et DMSO à 2% ; CN : croissance normale.
CMB de l'émodine> 250 µg/ml.
CMI : Concentration minimale inhibitrice.
CC_{50} : Concentration cytotoxique qui réduit 50% de la viabilité des macrophages murins
IS : CC_{50}/CMI.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons noter que l'émodine a inhibé fortement la croissance des souches testées avec une CMI de 15,63 µg/ml contre *Sa*LPV+, SARM348 et SARM (ATCC29213), et une CMI beaucoup plus faible contre *Sa* (1,93 µg/ml). Cependant, le kaempférol n'a pas été actif à la concentration testée (>250 µg/ml).

La cytotoxicité *in vitro* de l'émodine comme étant le composé actif a été évaluée en calculant le pourcentage des cellules vivantes des macrophages en fonction de différentes concentrations du composé à tester. Par la suite, la courbe obtenue permet de calculer les CC_{50s} correspondant à la concentration du composé pour laquelle il y a une réduction de 50% de la viabilité cellulaire par rapport aux macrophages non traités. La détermination des CC_{50} permet de calculer l'indice de sélectivité. Par ailleurs, le rapport cytotoxicité/activité nous renseigne sur la sélectivité du composé testé vis-à-vis de l'activité antistaphylococcique. Les résultats ont montré que l'émodine n'a pas été toxique à de fortes concentrations pour la lignée cellulaire J774A.1 des macrophages (CC_{50}>100 µg/ml).

V. Discussion

S. aureus est l'un des agents pathogènes responsables d'un large spectre clinique. L'émergence des souches multirésistantes et toxinogènes pose un réel problème de santé publique en vue des séquelles lourdes de mortalité et de morbidité dues à une recrudescence alarmante, en particulier, des souches résistantes à la méthicilline et/ou productrices de la toxine LPV. De ce fait, un intérêt tout particulier a été porté à la recherche de nouveaux composés d'origine naturelle. Dans le présent travail, des tests de criblage sur différentes souches de *S. aureus* ont montré que parmi quinze extraits éthanoliques préparés à partir de diverses espèces végétales, l'extrait éthanolique de *R. alaternus* a été le plus actif contre les quatre souches cibles de *S. aureus*. Ces résultats peuvent être expliqués, d'une part, par les différences de perméabilité des parois cellulaires aux métabolites secondaires, et d'autre part, par les différences en composition chimique des plantes conduisant à un mécanisme d'action diffèrent. Autrement dit, l'extrait peut contenir un ou des composés spécifiquement plus efficaces contre les différentes souches de *S. aureus*.

Malgré l'efficacité antibactérienne de *R. alaternus* dans la présente étude, un nombre très limité de données sont disponibles dans la littérature concernant son activité antimicrobienne, en particulier l'activité antistaphylococcique. Il a été rapporté que l'évaluation de l'activité antibactérienne de neuf extraits et fractions des feuilles de *R. alaternus* a montré que cette espèce présente un pouvoir antibactérien à spectre varié contre une large liste de pathogènes y compris une souche de référence de *S. aureus* (ATCC25923). Seuls les extraits de l'acétate d'éthyle, des oligomères flavonoïques totaux, et la fraction de l'acétate d'éthyle obtenue de la lyophilisation de l'extrait aqueux ont démontré une activité antibiotique contre *S. aureus* avec des valeurs de CMI allant de 70 à 150 µg/ml, le criblage phytochimique de ces extraits de polarité intermédiaire a révélé leur richesse en flavonoïdes et composés phénoliques (Ammar et al., 2007). En revanche, Kosalec et al. (2013) ont évalué le potentiel antimicrobien des extraits méthanoliques d'écorce de quatre espèces du genre *Rhamnus* contre plusieurs bactéries, dermatophytes et levures. Ils ont démontré que l'extrait de *R. alaternus* a inhibé la croissance de *S. aureus* mais avec une CMI plus grande (2,5 mg/ml) que les autres espèces de *Rhamnus*, ce qui a été expliqué par l'analyse du profil des anthraquinones qui a révélé la présence de chrysophanol, de l'émodine et de physion avec une abondance bien notée de chrysophanol dans *R. alaternus*.

Certes, dans ces études, les feuilles et l'écorce de *R. alaternus* ont inhibé la croissance de *S. aureus*, mais dans les deux études la caractérisation et la purification des composés bioactifs impliqués dans l'activité n'ont pas été achevées, ainsi l'évaluation du pouvoir antibactérien n'a

été effectuée que sur des souches de référence qui ne reflètent vraiment pas la réalité des souches cliniques.

Contrairement aux activités antibactériennes, la littérature s'est concentrée beaucoup plus sur d'autres propriétés pharmacologiques de *R. alaternus* précédemment documentées. Ces études ont permis la caractérisation d'une large liste de composés bioactifs mais surtout les antioxydants. Les procèdes de purification ont mis en évidence la présence des flavonols tels que le kaempférol, la rhamnétine et la rhamnocitrine (Cuoco et al., 2014), d'anthocyanes (Longo et al., 2005) et d'anthraquinones telle que l'émodine (Izhaki et al., 2002 ; Ammar et al., 2019). La recherche des composés responsables de l'activité antistaphylococcique au cours de ce travail a été effectuée par un fractionnement bioguidé qui a mis en œuvre trois fractions actives dont l'analyse chimique a confirmé la présence des anthraquinones et des flavonoïdes. Notre processus de purification a permis d'identifier l'émodine de la famille des anthraquinones et le kaempférol appartenant à la famille des flavonoïdes, ce qui est en accord avec la littérature. Par la suite, nous avons montré que l'émodine est le composé responsable du pouvoir antibactérien de *R. alaternus* en démontrant une activité très puissante (CMI allant jusqu'à 1,95 µg/ml) à une concentration non toxique vis-à-vis des macrophages murins. En effet, l'émodine est un métabolite secondaire doté d'une large gamme de propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo* : anticancéreuses, antioxydantes, antiinflammatoires, antivirales, antiallergiques, antibactériennes, etc (Dong et al., 2016). Certes, notre étude est la première qui rapporte l'effet antibactérien de l'émodine isolé de *R. alaternus*, mais ce composé est très reconnu par son potentiel antistaphylococcique lorsqu'il a été isolé à partir d'autres plantes. Basu et al. (2005) ont illustré que l'émodine isolée de l'écorce de *Ventilago madraspatana* a été active contre *S. aureus* avec une CMI de 90 µg/ml élevée par rapport à la valeur rapportée dans notre étude. Chukwujekwu et al. (2006) ont également isolé l'émodine mais à partir des racines de *Cassia occidentalis,* ce composé a été identifié comme étant le responsable de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique spécialement contre *S. aureus* avec une CMI de 3,9 µg/ml soulignant un effet plus intéressant que l'antibiotique de référence, la néomycine. En revanche, il a été démontré que l'émodine purifiée des racines et des rhizomes de *Rheum officinale* a affecté les courbes thermogéniques de la croissance de *S. aureus* en améliorant l'effet antimicrobien (Yanwen et al., 2005). Des effets similaires ont été notés contre SARM et MSSA, Cao et al. (2015) ont identifié l'émodine comme étant le composé actif dans l'extrait de *Polygoni cuspidati*, parmi 7 composés majeurs purifiés, seule l'émodine a démontré une activité significative contre une souche clinique de SARM tout en provoquant des altérations morphologiques de la paroi cellulaire. Ji et al. (2017) ont mené une étude protéomique pour

comparer l'effet de l'émodine sur des souches de SARM et MSSA. Ils ont démontré qu'après le traitement des deux souches par l'émodine, les niveaux d'expression des protéines ont été modifiés par de multiples mécanismes d'action similaires chez SARM que chez MSSA à savoir l'induction du déséquilibre de la voie du pyruvate, l'inhibition de la synthèse des protéines et la suppression de la synthèse de l'ADN, en plus des altérations de la membrane. En fait, ces mécanismes d'action exercés par l'émodine ont été largement confirmés dans la littérature (Liu et al., 2015 ; Yan et al., 2017 ; Hou et al., 2017).

Par l'analyse croisée des données biologiques et phytochimiques, nous pouvons émettre des hypothèses concernant la nature chimique du composé bioactif dans la présente étude, l'activité et la sélectivité de l'émodine vis-à-vis des souches de *S. aureus* peuvent être liées, par exemple, aux groupes fonctionnels sur le cycle phényle du composé. Ces constatations ont été confirmées par les chercheurs. Une étude de relation structure-activité (Structure-activity relationship, SAR) a indiqué que les groupes hydroxyle et le groupe méthyle dans le squelette de l'émodine ont été cruciaux pour l'activité anti-SARM et la présence d'un atome d'iode ou d'un groupe éthylamine sur le cycle aromatique a amélioré l'activité avec des indices de sélectivité plus élevés (Chalothorn et al., 2019). En outre, une autre étude a démontré que la structure de l'émodine a été fortement impliquée dans l'activité antimicrobienne, la substitution en position 2 de l'émodine a été préjudiciable à l'activité antibactérienne, tandis que l'insaturation du substitut a été importante pour l'activité. Ainsi, l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique du groupement méthoxyle en position 3 augmente la lipophilie du composé, ce qui augmente sa capacité à intégrer la paroi cellulaire bactérienne qui devient perméable (Kemegne et al., 2017).

Néanmoins, la faible solubilité de l'émodine, sa pauvre biodisponibilité et absorption orale limite son développement en un produit pharmaceutique. C'est dans cet optique que plusieurs chercheurs ont mené des essais *in vivo* sur la pharmacocinétique de l'émodine afin d'améliorer sa solubilité et sa biodisponibilité orale en suivant différentes approches telles que l'inhibition de la cristallisation, de la glucuronoconjugaison et l'ajout des agents améliorateurs de solubilité comme le cyclodextrine A et les nanoparticules ou bien la combinaison de l'émodine avec d'autres molécules comme la pipérine et les antibiotiques (Lee et al., 2010 ; Shi et al., 2015 ; Di et al., 2015 ; Li et al., 2017 ; Ban et al., 2020 ; Wang et al., 2020).

Dans la présente partie, nous avons montré également que le kaempférol n'a pas été actif à la concentration testée, ce qui corrobore l'étude rapportée par Falcão-Silva et al. (2009) où ils ont indiqué que le kaempférol glycoside isolé à partir de *Herissantia tiubae* n'a pas montré une activité pertinente contre *S. aureus* (CMI = 256 µg/ml), mais ce composé a plutôt modulé l'activité

des antibiotiques, qui en association avec des antibiotiques, il a réduit les valeurs de CMI en améliorant l'effet inhibiteur putatif de la pompe à efflux chez la bactérie. Ceci pourrait expliquer notre résultat à propos de l'activité intéressante de la fraction F5 contre les souches de *S. aureus* et dont l'analyse RMN a révélé un mélange complexe du kaempférol avec l'émodine. L'explication du détail de cette hypothèse dans notre étude a fait l'objet d'un brevet.

VI. Conclusion

En se basant sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Parmi les quinze espèces de plantes criblées pour leur pouvoir antibactérien contre quatre souches de *S. aureus*, *Rhamnus alaternus* a montré l'activité la plus élevée en utilisant les techniques de diffusion par puits et de macrodilution sur milieu solide.
- Le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique des feuilles de *R. alaternus* a mis en évidence deux fractions actives dont la purification par une série de colonnes chromatographiques nous a permis d'isoler deux composés naturels purs, les techniques spectroscopique et spectrométrique (RMN, EIMS et HREIMS) ont identifié ces composés comme étant l'émodine de la famille des anthraquinones et le kaempférol de la famille des flavonoïdes.
- Les résultats du test biologique par microdilution ont montré que l'émodine est le composé dominant dans l'activité antistaphylococcique avec des CMIs de 1,93 et 15,63 µg/ml contre la souche de *Sa* et les trois souches *Sa*PVL+, SARM348 et SARM (ATCC29213) respectivement.
- L'émodine n'a pas montré une toxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire des macrophages murins (CC_{50}> 100 µg/ml).

CHAPITRE 3. Activité leishmanicide

I. Introduction

Dans le présent chapitre, nous avons entamé la recherche des composés leishmanicides en exploitant les résultats de l'étude ethnobotanique (résultats chapitre 1). Pour ce faire, la première partie a été consacrée au criblage de quinze extraits éthanoliques préparés à partir des plantes les plus recommandées contre le stade promastigote des souches cibles de *Leishmania* spp. La deuxième partie a visé la sélection de l'extrait le plus actif et la description de la plante retenue pour la poursuite des travaux de recherche. La troisième partie a eu pour objectif le fractionnement de l'extrait sélectionné et l'identification des composés isolés selon une approche bioguidée sur les promastigotes. Par la suite, dans le but de confirmer l'activité leishmanicide, nous avons testé les composés actifs sur la forme amastigote intracellulaire, puis nous avons évalué le profil cytotoxique vis-à-vis d'une ligné cellulaire des macrophages murins. Enfin, dans le dernier volet, nous nous sommes intéressé à la compréhension et l'élucidation du mode d'action des composés sur les promastigotes des parasites cibles en utilisant différentes techniques permettant la détection de la mort cellulaire programmée via apoptose.

II. Criblage antiparasitaire

L'évaluation de l'activité leishmanicide des extraits éthanoliques préparés à partir des racines d'*A. tintoria, B. hispanica, E. altissima* et *R. tinctorium*; des parties aériennes de *C. oxyacantha* et *U. dioica*; des feuilles d'*A. majus, G. alypum, C. salviifolius, I. viscosa, L. dentata, N. oleander*, et *R. alaternus*; des graines de *J. oxycedrus* et des écorces de *P. granatum*, a été effectuée sur deux souches de *Leishmania* à savoir *L. amazonensis* et *L. donovani*. Afin de sélectionner la meilleure plante, les extraits ont été testés dans un premier temps à 400, 200, 100, et 50 µg/ml contre le stade promastigote des deux parasites. Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait éthanolique d'*I. viscosa* a montré l'activité la plus intéressante contre les souches cibles (Tableau III.7). Par conséquent, l'extrait de cette plante a été retenu pour la poursuite des travaux de recherche.

Tableau III.7. Criblage des extraits éthanoliques des quinze plantes sélectionnées de l'étude ethnobotanique dans la région de Fès-Meknès contre le stade promastigote.

Extraits/ souches	Concentrations de criblage en µg/ml							
	L. donovani				*L. amazonensis*			
	400	**200**	**100**	**50**	**400**	**200**	**100**	**50**
A. majus	+	-	-	-	+	+	-	-
A. tintoria	-	-	-	-	+	-	-	-
B. hispanica	-	-	-	-	-	-	-	-
C. salviifolius	-	-	-	-	-	-	-	-
C. oxyacantha	-	-	-	-	-	-	-	-
E. altissima	-	-	-	-	+	+	+	-
G. alypum	-	-	-	-	+	-	-	-
I. viscosa	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**
J. oxycedrus	+	-	-	-	+	+	-	-
L. dentata	-	-	-	-	+	+	-	-
N. oleander	+	+	-	-	+	+	-	-
P. granatum	-	-	-	-	-	-	-	-
R. alaternus	+	-	-	-	+	+	-	-
R. tinctorium	+	+	-	-	+	-	-	-
U. dioica	-	-	-	-	+	-	-	-

+ : extrait actif, - : extrait non actif ; résultats observés sous microscope confocal.

III. Description de la plante active sélectionnée

Parmi les 15 espèces végétales, *Inula viscosa* a montré la meilleure activité. C'est une plante qui a été classée comme suit (Figure III.7) (Annexe 11) :



Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	*Inula/Dittrichia*
Espèce	*I. viscosa* L.
Nom vernaculaire	Magraman

Figure III.7. L'espèce *Inula viscosa* et sa classification botanique

Dittrichia viscosa communément connue comme *Inula viscosa* est une plante annuelle, herbacée, vivace, appartenant à la famille des Asteraceae, répandue sur les pentes de toutes les régions côtières méditerranéennes (Seca et al., 2014). La médecine traditionnelle a mis en évidence sa capacité à exercer différents effets bénéfiques pour la santé, et les préparations à base d'*I. viscosa* ont été largement rapportées comme des remèdes efficaces et précieux. La décoction des racines et des feuilles d'*I. viscosa* a été utilisée pour traiter les irritations cutanées d'origine allergique (Passalacqua et al., 2007), l'hypertension et le diabète (Tahraoui et al., 2007), les pneumonies et la tuberculose (ElAmri et al., 2014). Depuis l'antiquité, les feuilles de cette plante ont été largement utilisées en Algérie comme décoction pour le traitement de diverses maladies telles que le paludisme, la bronchite, le diabète, la toux, la tuberculose et l'anémie, comme cataplasme pour le traitement des blessures et des douleurs rhumatismales (Boulus, 1983), et comme fumigation pour le traitement des maladies cardiaques (Boughrara et Belgacem, 2016). Dans une étude ethnopharmacologique à Jordan, les guérisseurs traditionnels ont utilisé l'infusion de la plante entière d'*I. viscosa* pour traiter les maladies respiratoires et parasitaires (Al-Qura'n, 2009). En Palestine, l'infusion des feuilles de cette espèce a été utilisée dans le traitement des maladies cutanées inflammatoires comme le psoriasis (Ali-Shtayeh et al., 2000 ; Shawahna et Jaradat, 2017), alors que la décoction a été utilisée pour traiter la diarrhée (Jaradat et al., 2016).

En revanche, dans une étude discutant l'importance de l'ethnobotanique et l'utilisation traditionnelle des plantes de la flore sicilienne dans la recherche scientifique, Lentini (2000) a souligné qu'une attention particulière a été accordée à *I. viscosa,* largement utilisée en médecine populaire dans le traitement des blessures.

En raison des utilisations en ethnomédecine, plusieurs études expérimentales ont été menées sur *I. viscosa*, ce qui a montré que cette plante est riche en métabolites secondaires à savoir, entre autres, les flavonoïdes, les sesquiterpènes, et les acides phénoliques (Grande et al., 1985 ; Kheyar-Kraouche et al., 2018 ; Moeini et al., 2020). Beaucoup de ces composés phytochimiques sont dotés de diverses propriétés antiinflammatoires, antimicrobiennes, antioxydantes, hypoglycémiques, et antihypertensives (Seca et al., 2014).

IV. Fractionnement bioguidé et identification des composés actifs

Suite au criblage préliminaire réalisé, l'extrait éthanolique d'*I. viscosa* a été sélectionné pour un fractionnement bioguidé afin d'isoler les composés impliqués dans son potentiel leishmanicide en utilisant une succession de séparations et de purifications chromatographiques telles que des colonnes sèches et humides sur gel de silice, et gel de Sephadex, en plus des chromatographies préparatives sur couche mince et centrifuges par Chromatotron. Les fractions et sous fractions obtenues ont été testées sur les promastigotes de *L. amazonensis* et *L. donovani* en utilisant le réactif AlamarBlue comme indicateur de viabilité parasitaire. Par la suite, les échantillons qui ont conduit à un pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire supérieur à 50% ont été évalués à différentes concentrations pour déterminer la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) inhibant 50% de la croissance parasitaire, et ont été classés comme très actifs (CI_{50}<25 µg/ml), actifs (25 <CI_{50}<50 µg/ml), modérément actifs (50 <CI_{50}<100 µg/ ml) et inactifs lorsque CI_{50}> 100 µg/ml. Les résultats du fractionnement chimique et les profils CCM ont permis de collecter sept fractions (F1 à F7) qui ont été testées sur les souches cibles de *Leishmania* spp. Les valeurs des CI_{50s} ont varié selon les fractions et les souches des parasites cibles montrant différentes amplitudes du potentiel inhibiteur. Les activités les plus importantes ont été observées avec les fractions F2 (valeurs CI_{50} de 31,07 et 35,66 µg/ml), F3 (valeurs CI_{50} de 3,80 et 4,48 µg/ml) et F4 (valeurs CI_{50} de 3,63 et 27,12 µg/ml) qui ont présenté une activité similaire au médicament de référence, la miltefosine, utilisé à des fins comparatives. La miltefosine a montré des CI_{50s} de 2,64 µg/ml et 1,35 µg/ml contre *L. amazonensis* et *L. donovani*, respectivement (Tableau III.8).

Par la suite, ces fractions actives F2 (670,6 mg), F3 (871,5 mg) et F4 (1, 7155 g) ont été chromatographiées encore une fois sur une colonne de sephadex LH-20 pour obtenir entre quarante et cinquante-six sous-fractions qui ont été ensuite combinées selon leurs profils CCM

donnant cinq (F2/1 à F2/5), six (F3/1 à F3/6) et dix sous-fractions (F4/1 à F4/12), respectivement, et qui ont été testées sur les deux parasites. À partir de F2, F2/4 a présenté un effet remarquable sur *L. amazonensis* (CI_{50} 15,95 µg/ml). À partir de la fraction F3, les sous-fractions F3/1 et F3/2 ont été les plus actives, montrant des CI_{50s} comprises entre 6,44 et 12,72 µg/ml pour *L. amazonensis* et *L. donovani*, respectivement. Alors qu'à partir de la fraction F4, les sous-fractions F4/3, F4/4, F4/5, F4/6, et F4/7-9 ont été les plus actives présentant des CI_{50s} entre 6,6 et 19,6 µg/ml pour *L. amazonensis* et *L. donovani*, respectivement (Tableau III.8). Toutefois, dans certains cas, les valeurs des CI_{50s} ont été plus élevées que l'extrait brut, ce qui pourrait être expliqué par une synergie possible entre les composants d'*I. viscosa* puisque les mélanges complexes des composés phytochimiques peuvent fournir des résultats différents : un effet additif, synergique ou antagoniste (Sifaoui et al., 2014 ; Ouedrhiri et al., 2016 ; Hajaji et al., 2018).

Tableau III.8. Activité leishmanicide de l'extrait éthanolique, fractions et sous fractions d'*I. viscosa* contre les promastigotes de *L. amazonensis* et *L. donovani*.

I. viscosa	***L. amazonensis*** **CI_{50} (µg/mL)**	***L. donovani*** **CI_{50} (µg/mL)**
Extrait brut	18,10 ± 2,08	10,87 ± 2,11
F2	35,66 ± 1,78	31,07 ± 2,17
F2/4	15,95 ± 0,80	52,95 ± 3,18
F3	3,80 ± 0,23	4,48 ± 0,15
F3/1	6,44 ± 0,02	7,71 ± 2,46
F3/2	12,72 ± 1,27	10,66 ± 2,35
F4	3,63 ± 0,14	27,12 ± 01,27
F4/3	15,46 ± 0,75	12,52 ± 0,42
F4/4	17,85 ± 0,85	6,6 ± 1,22
F4/5	12,77 ± 0,05	9,08 ± 0,66
F4/6	19,60 ± 2,65	18,01 ± 0,90
F4/7-9	13,03 ± 1,11	10,76 ± 2,90
F4/10	32,17 ± 1,93	36,62 ± 1,46
F4/10/1	7,64 ± 0,86	7,93 ± 0,15
Miltefosine	2,64 ± 0,10	1,35 ± 0,11

CI_{50}: Concentration inhibitrice qui inhibe 50% de la croissance des parasites testés.
CI_{50}: Moyennes ± Ecart type.
Fractions et sous-fractions qui ont montré des CI_{50}> 100 µg/mL ont été exclue.

Ensuite, les sous fractions les plus actives F2/4 (39,2 mg), F3/1 (638,84 mg), F3/2 (103,56 mg) et F4/10 (974,4 mg) ont été soumises à plusieurs étapes de purification donnant les composés **1** (3,3 mg) et **3** à partir de F2/4, le composé **3** (1,78 mg) de F3/1, les composés **4** (38,5 mg), **5** (3,6 mg) et **7** (1,95 mg) issus de F3/2, et les composés **2** (8,5 mg), **6** (28,5 mg) et **8** (5,4 mg) à partir de F4/10 (Figure III.8).

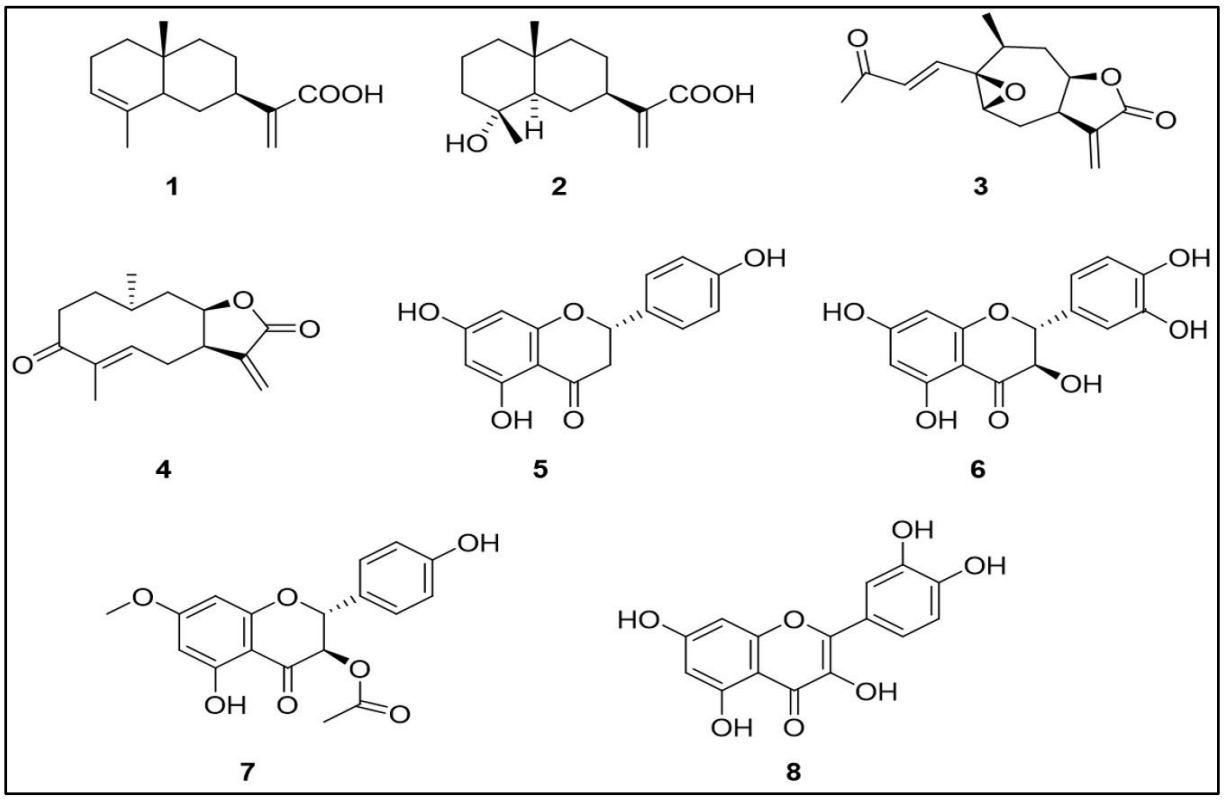


Figure III.8. Structures des composés (1-8) isolés de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Inula viscosa.*

Les analyses spectrométriques et spectroscopiques, y compris des expériences de la RMN (1D, 2D) couplées aux données de la littérature ont permis d'identifier les structures chimiques des composés (**1-8**) comme étant l'acide isocostique (**1**) (Zdero et Bohlmann, 1989), l'acide ilicique (**2**) (Máñez et al., 1999), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**) (Bohlmann et Abraham, 1981), l'inuloxin A (**4**) (Andolfi et al., 2012), la sakuranétine (**5**) (Asahina, 1908), la taxifoline (**6**) (Grande et al., 1985), 3-O-acétyl-7-O-méthylaromadendrine (**7**) (Grande et al., 1985) et la quercétine (**8**) (Mabry et al., 1970) (Annexes 12,13,14,15,16, 17, 18 et 19).

Ensuite, ces composés ont été évalués pour leur activité antiparasitaire contre les deux souches. De plus, la cytotoxicité sur une lignée cellulaire des macrophages murins a également été évaluée dans le but de chercher la sélectivité des composés isolés vis-à-vis des souches cibles. Les résultats, sur le stade promastigote de *Leishmania*, ont montré que les sesquiterpénoïdes **3** et **4** ont présenté une activité puissante, légèrement moins active que le médicament de référence.

Concernant l'indice de sélectivité (IS) vis-à-vis des macrophages (Tableau III.9), ces composés ont montré un profil cytotoxique modéré sur *L. amazonensis* et *L. donovani* (valeurs de SI allant de 1,66 à 3,50).

Table III.9. Activité leishmanicide, cytotoxicité et indice de sélectivité des composés purifiés de l'extrait d'*I. viscosa* sur les promastigotes de *Leishmania* spp. et les macrophages murins.

Composés	*L. amazonensis*		*L. donovani*		Macrophages murins
	CI_{50} (µM)	**IS**	**CI_{50} (µM)**	**IS**	**CC_{50} (µM)**
3	9,53 ± 2,44	1,92	11,06 ± 2,33	1,66	18,44 ± 1,30
4	12,12 ± 0,64	3,50	14,26 ± 1,69	2,97	42,36 ± 2,54
5	81,08 ± 3,24	1,18	86,45 ± 2,60	1,11	95,93 ±0,50
6	44,86 ± 2,95	>7,73	54,46 ± 2,36	>6,3	>100
Miltefosine	6,48 ± 0,24	11,14	3,31 ± 0,27	21,79	72,18 ± 1,25

CI_{50} : Concentration inhibitrice qui inhibe 50% de croissance des parasites testés.
CI_{50} : Moyennes ± Ecart type.
CC_{50} : Concentration cytotoxique qui réduit 50% de la viabilité des macrophages murins.
IS : Indice de sélectivité (CC_{50} /CI_{50}).
Les composés qui montré une CI_{50}> 100 µM ont été exclus.

En se basant sur l'ensemble des résultats *in vitro* sur les formes promastigotes de *L. amazonensis* et *L. donovani*, les composés **3-6** ont été sélectionnés pour être évalués contre la forme amastigote intracellulaire de *L. amazonensis* comme étant le modèle infestant. Les résultats ont révélé que les composés (**4-6**) ont présenté une activité plus élevée que la miltefosine (CI_{50} 3,11 µM), montrant des valeurs CI_{50} de 0,64 à 2,13 µM. Ces trois composés ont montré un indice de sélectivité plus élevé que la miltefosine, mettant en évidence le composé **6** avec un IS de 181,81 contre 23,16 pour la miltefosine. De plus, la sesquiterpène lactone **4** a été 4,8 fois plus active que le médicament de référence (Tableau III.10).

Tableau III.10. Activité leishmanicide et indice de sélectivité des composés actifs contre le stade amastigote de *L. amazonensis*.

Composés	*L. amazonensis* CI_{50} (µM)	IS^a
3	6,98 ± 0,42	2,63
4	0,64 ± 0,08	65,75
5	2,13 ± 1,21	45,00
6	1,91 ± 0,83	>181,81
Miltefosine	3,11 ± 0,29	23,16

CI_{50} : Concentration inhibitrice qui inhibe 50% de croissance des parasites testés.
CI_{50} : Moyennes ± Ecart type.
CC_{50} : Concentration cytotoxique qui réduit 50% de la viabilité des macrophages murins.
IS^a : Indice de sélectivité (amastigotes) (CC_{50} /CI_{50}).

V. Détermination du mécanisme d'action

L'ensemble des résultats obtenus à partir des activités *in vitro* et des indices de sélectivité des composés isolés vis-à-vis des souches de *Leishmania* spp. a été encourageant pour l'analyse du mécanisme d'action. En effet, la mort cellulaire des différents stades de développement chez les kinétoplastidés comme le genre *Leishmania* a été largement couplée au déclenchement d'événements typiques de l'apoptose (Deponte, 2008). Parmi les phénotypes apoptotiques les plus spécifiques à *Leishmania*, il y a la fragmentation de l'ADN, le rétrécissement cellulaire, les modifications de la membrane plasmique et la dépolarisation mitochondriale (Basmaciyan et Casanova, 2019 ; Rodríguez-Hernández et al., 2020). De ce fait, dans le présent travail, différents essais expérimentaux ont été performés afin de vérifier si la mort cellulaire programmée a été induite via apoptose chez *L. amazonensis* et *L. donovani* lors du traitement par les CI_{90} des quatre composés actifs (**3-6**) isolés d'*I. viscosa* (Tableau III.11). L'évaluation de ces événements a été analysée par un microscope confocale au laser (x40 et x100) (EVOS FL Cell Imaging System AMF4300, Life Technologies, Madrid, Spain).

Tableau III.11. Les CI_{90} des composés actifs pour l'étude du mécanisme d'action.

Composés	CI_{90} (µM)	
	L. donovani	***L. amazonensis***
3	76,25 ± 3,05	12,85 ± 1,07
4	94,23 ± 0,57	48,53 ± 0,18
5	107,66 ± 1,76	322,42 ± 0,97
6	135,57 ± 0,20	158,23 ± 3,37
Miltefosine	5,15 ± 0,50	9,63 ± 0,50

CI_{90}: Concentration qui inhibe 90% de la croissance des parasites testés.
CI_{90}: Moyennes ± Ecart type.

V.1. Altération de la perméabilité membranaire

Tout d'abord, nous avons analysé la perméabilité de la membrane plasmique des parasites cibles en utilisant le kit SYTOX Green. En effet, le SYTOX Green est une molécule de très forte affinité pour les acides nucléiques, son intensité de fluorescence est multipliée par 500 fois lorsqu'elle se lie à l'ADN. C'est une molécule imperméable aux cellules dont les membranes sont intactes ce qui facilite la distinction des cellules mortes ou altérées de celles vivantes ou saines suite à une augmentation du signal fluorescent. Les figures III.9 et III.10 montrent l'effet des composés (**3-6**) sur les membranes cellulaires de *L. amazonensis* et *L. donovani* pendant une incubation de 24h. A partir de ces figures, nous pouvons constater que le traitement des deux parasites a provoqué une augmentation significative de l'intensité de la fluorescence verte en comparaison avec le contrôle indiquant une altération remarquable de la membrane cellulaire des deux parasites ($p<0,05$) (Annexes 20 et 21).

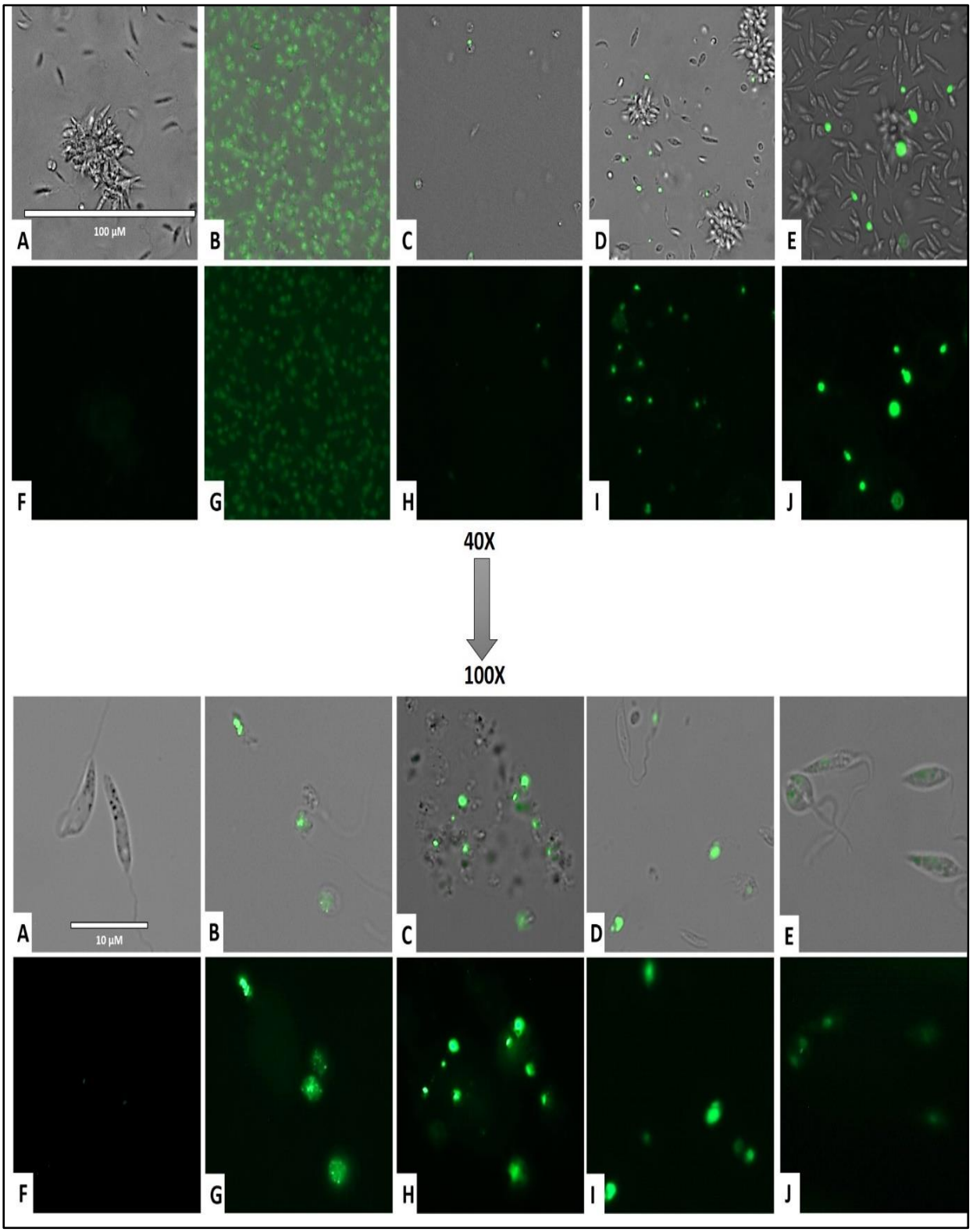


Figure III.9. Les images (40X et 100X) présentent les effets de la concentration CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des promastigotes de *L. amazonensis* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été obtenues en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (**A, F**).

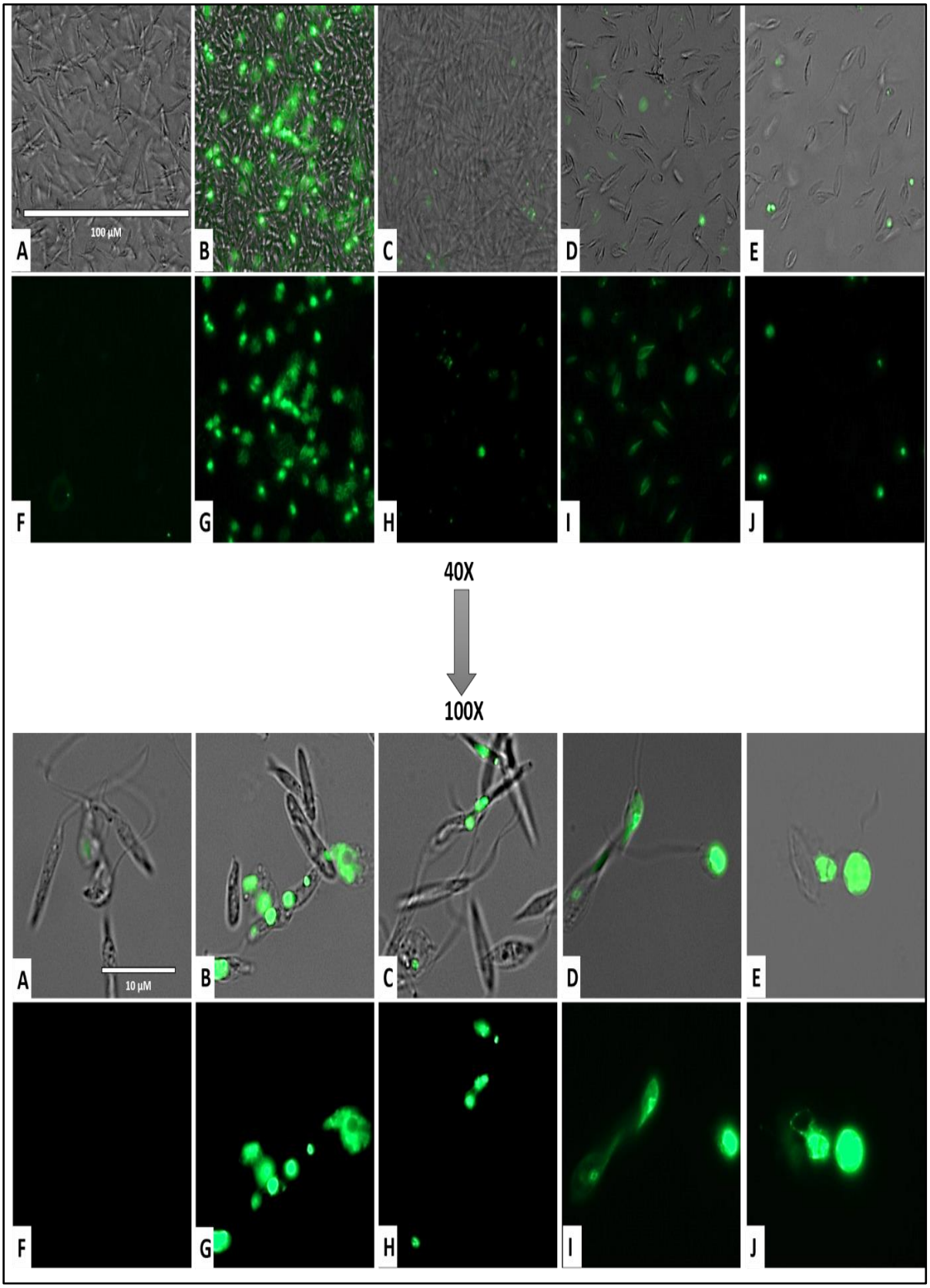


Figure III.10. Les images représentatives (40X et 100X) des promastigotes de *L. donovani* marqués avec le SYTOX Green. Les parasites ont été incubés pendant 24h avec les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**). Un contrôle négatif (souches non traitées) a été utilisé (**A, F**). L'effet sur la perméabilité de la membrane plasmique a été observé en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL.

V.2. Condensation de la chromatine nucléaire

L'analyse de l'état de la chromatine au sein des cellules de *L. amazonensis* et *L. donovani* a été performée par le kit de détection d'apoptose à double coloration (Hoechst 33342/PI). En fait, Hoechst 33342 est un colorant à fluorescence bleue capable de colorer la chromatine condensée dans les cellules apoptotiques plus brillamment que la chromatine dans les cellules normales, alors que l'iodure de propidium (PI) est un agent intercalant de l'ADN à fluorescence rouge qui n'émet un signal que dans les cellules mortes, ce qui permet de distinguer les cellules normales, apoptotiques et mortes. Les résultats obtenus après 24h d'incubation des deux parasites avec les quatre composés sont présentés dans les Figures III.11 et III.12.

Après excitation, les images obtenues ont montré qu'en comparaison avec le témoin ($p<0,05$) (Annexes 22 et 23), Hoechst 33342 a émis une fluorescence bleue et brillante très remarquable chez *L. amazonensis* après le traitement par les composés **3-6**, ce qui reflète une condensation de la chromatine chez les cellules traitées. Concernant le PI, il a émis un signal rouge intense indiquant que les cellules de *L. amazonensis* sont mortes ce qui a permis au PI de traverser les membranes cellulaires (Figure III.11). Cependant, les cellules de *L. donovani* traitées par les composés **3,5,6** contrairement au composé **4** ont pu exclure le PI mais non pas le Hoechst tout en confirmant un événement de type apoptotique (Figure III.12).

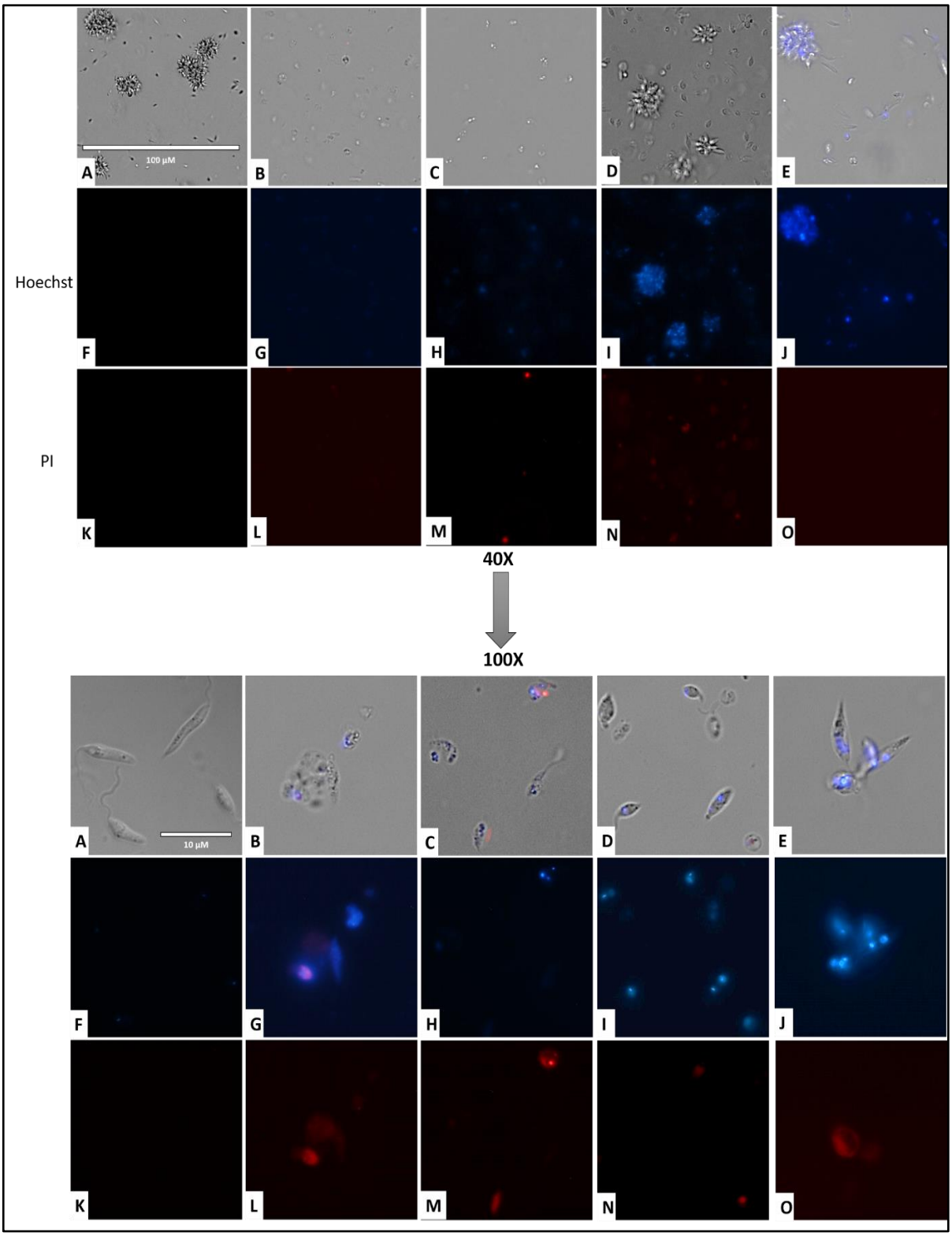


Figure III.11. Les promastigotes de *L. amazonensis* incubés avec les CI_{90} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Les images (40X et 100X) sont représentatives de la population cellulaire observée dans les expériences réalisées en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL AMF4300, Life Technologies, USA. La coloration Hoechst est différente lorsque on compare le contrôle négatif (**A, F, K**) avec des cellules traitées où les noyaux sont marqués en bleu brillant. La fluorescence rouge correspond à la coloration par l'iodure de propidium (PI). Marquage Hoechst (**F-J**), marquage à l'iodure de propidium (**K-O**).

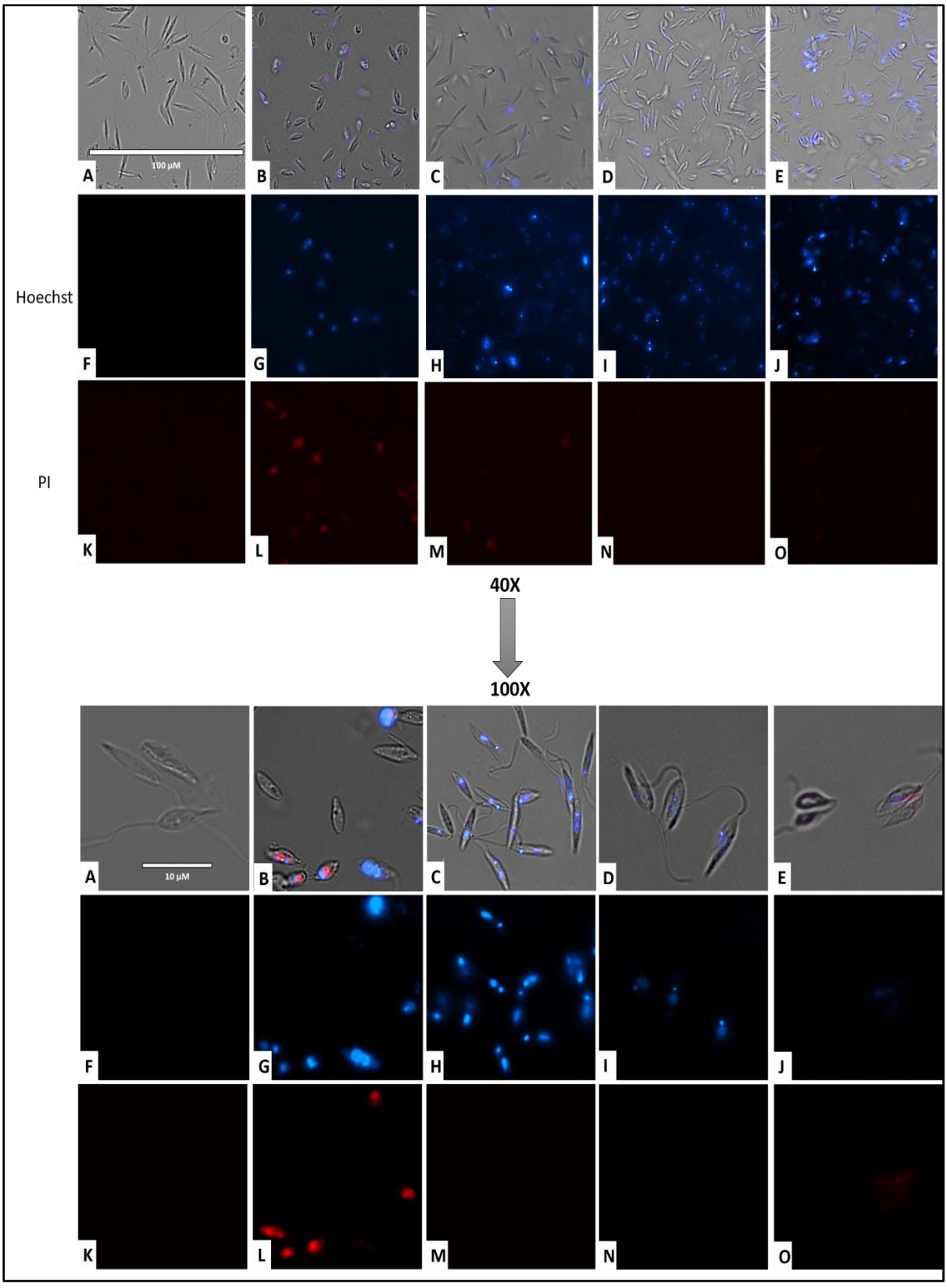


Figure III.12. Les images (40X et 100X) obtenues à partir du système d'imagerie cellulaire EVOS FL montrent l'intensité de la fluorescence lorsque les promastigotes de *L. donovani* ont été incubés avec les CI_{90} des quatre composés testés pendant 24h : Inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Hoechst correspond à la condensation de la chromatine (bleue) dans les cellules traitées. La fluorescence rouge correspond à la coloration par PI. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, F, K**).

V.3. Dépolarisation du potentiel de la membrane mitochondriale

Chez les kinétoplastidés, les évènements de type apoptotiques ont également impliqué la voie intrinsèque via les mitochondries (Gannavaram et Debrabant, 2012 ; Menna-Barreto, 2019), un processus clé pour la survie des parasites. L'effet des composés **(3-6)** sur le potentiel de la membrane mitochondriale (ΔΨm) de *L. amazonensis* et *L. donovani* a été déterminé par mesure de la fluorescence émise par la sonde JC-1 qui est capable de s'agréger dans les mitochondries des cellules saines à haut potentiel mitochondrial et d'enregistrer une fluorescence rouge intense. Cependant, dans les cellules apoptotiques à faible potentiel, JC-1 ne peut pas s'accumuler dans les mitochondries et reste dans la zone du cytosol sous forme de monomère, à cause de sa charge positive, montrant une fluorescence verte. L'analyse des images enregistrées a indiqué que les composés **(3-6)** ont pu diminuer le ΔΨm chez *L. amazonensis* en émettant une fluorescence verte bien remarquable par rapport aux parasites non traités ($p<0,05$) (Annexe 24) (Figure III.13). Quant à *L. donovani*, les résultats ont montré que les composés **3** et **6** ont été incapables d'interrompre le fonctionnement de la membrane mitochondriale, tandis que les composés **4** et **5** ont provoqué une dépolarisation significative ($p <0,05$) (Annexe 25) (Figure III.14).

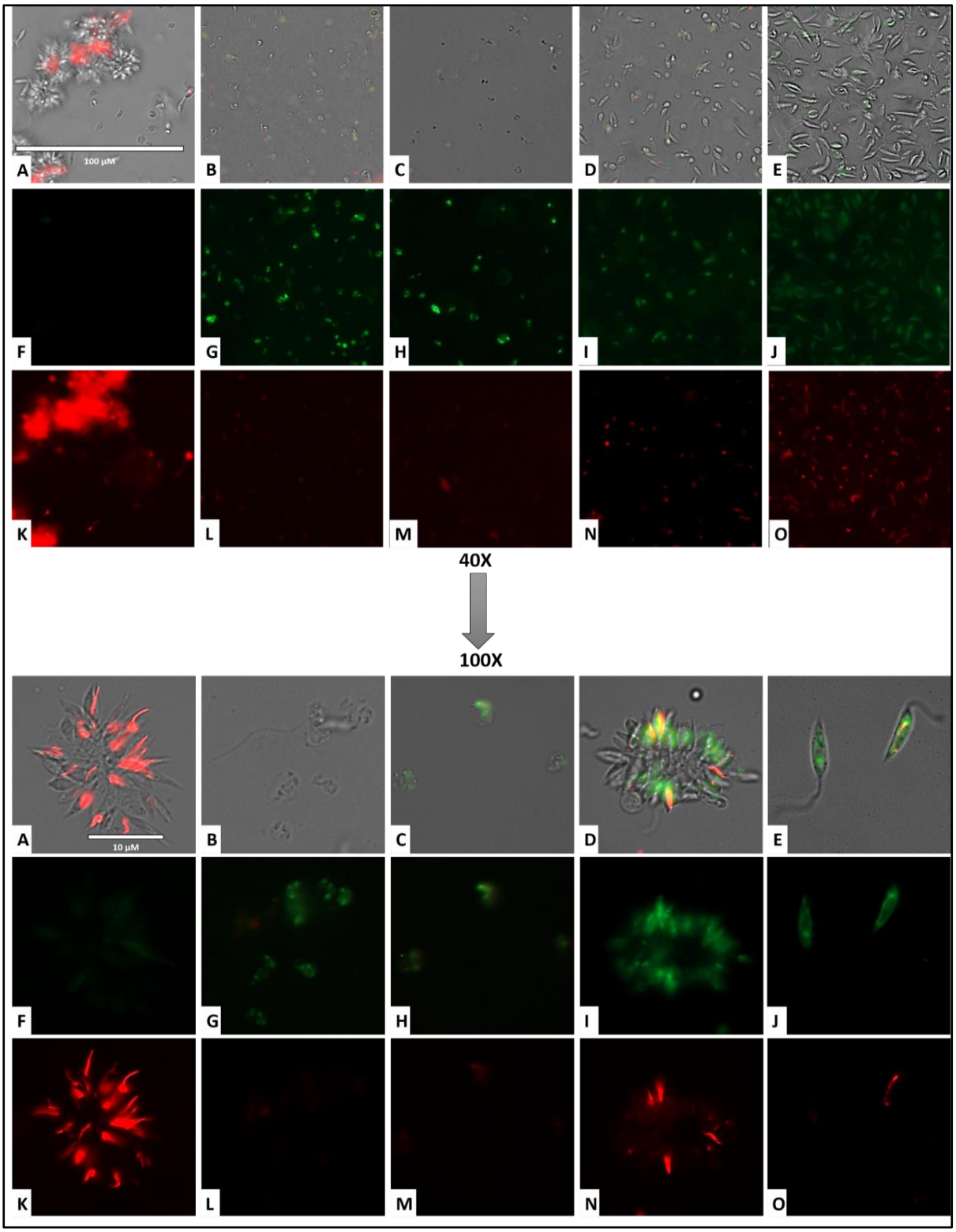


Figure III.13. Les effets de l'inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline **(E, J, O)** sur le potentiel de la membrane mitochondrial de *L. amazonensis* par rapport au contrôle (**A, F, K**). Le réactif JC-1 s'accumule dans les mitochondries des cellules saines sous forme d'agrégats (fluorescence rouge). Cependant, dans les cellules traitées avec les CI_{90} des composés pendant 24h, JC-1 reste dans le cytoplasme sous sa forme monomère en émettant une fluorescence verte à cause de la diminution du potentiel de la membrane mitochondriale. Les images (40X et 100X) sont représentatives des parasites observés dans les expériences réalisées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL.

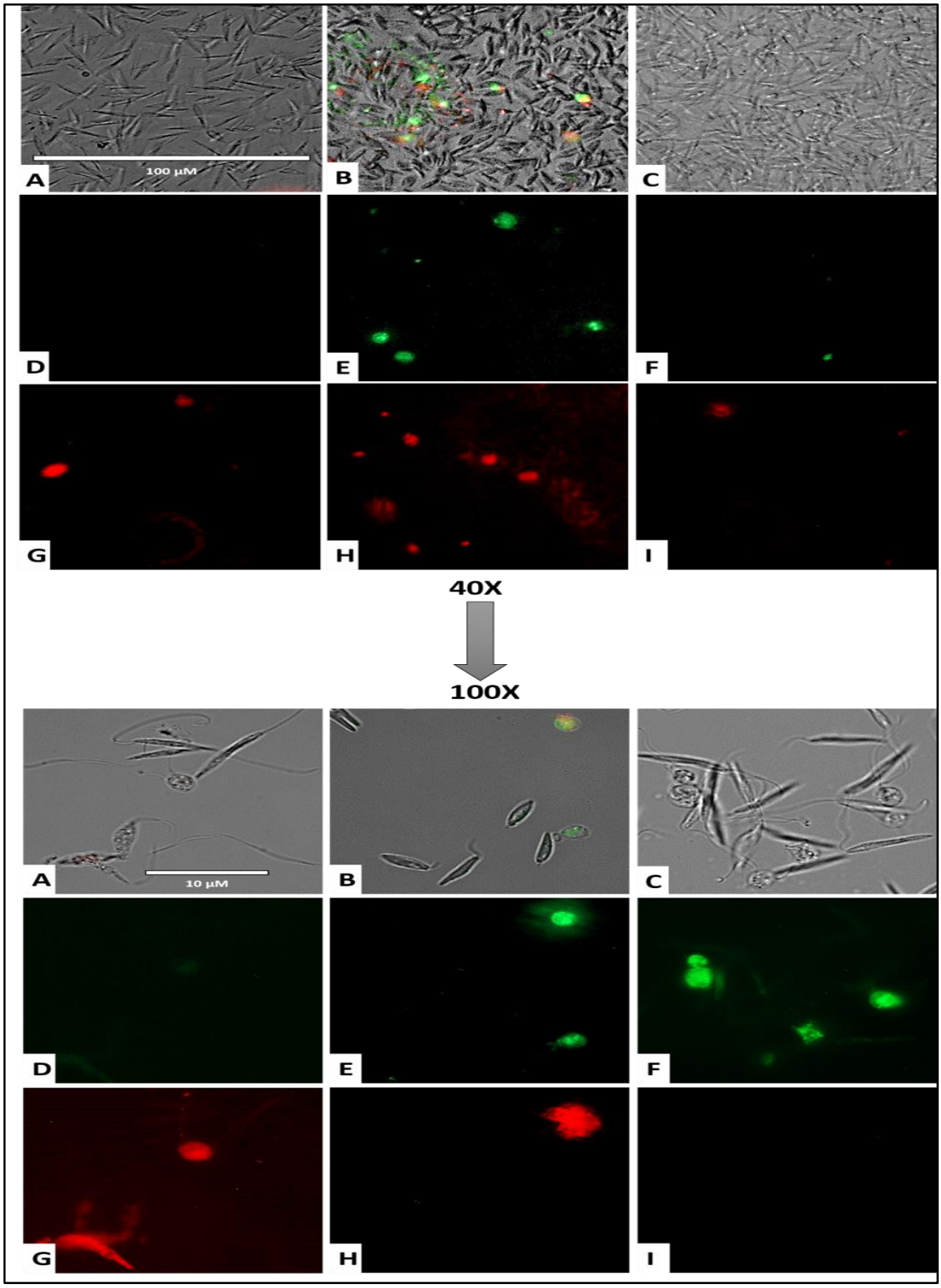


Figure III.14. Les promastigotes de *L. donovani* marqués avec le JC-1 après 24h d'incubation avec les CI_{90} d'inuloxin A (**B, E, H**) et sakuranétine (**C, F, I**). Les images (40X et 100X) sont représentatives de l'effet sur le potentiel mitochondrial des parasites, et sont observées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, D, G**).

V.4. Production d'ATP

La production de l'ATP est parmi les fonctions principales de la mitochondrie. L'altération du ΔΨm perturbera sans doute la synthèse de l'ATP (Joshi et Bakowska, 2011). Par conséquent, le dysfonctionnement de la mitochondrie a été confirmé par le dosage de l'ATP produite par *L. amazonensis* et *L. donovani* lors du traitement par les composés testés pendant 24h. Cette quantification a été performée en utilisant la méthode luminescente par le kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). En comparaison avec les contrôles positifs et négatifs, il a été observé que l'incubation de *L. amazonensis* avec les composés **4** et **5** a provoqué une diminution significative de la teneur en ATP ($p<0,05$) (Figure III.15, A). L'effet de ces deux composés a été modéré chez *L. donovani* (Figure III.15, B). Cependant, l'inhibition de la production d'ATP chez les deux parasites lors du traitement par les composés **3** et **6** a été plus faible par rapport aux composés **4** et **5**. Lors du traitement de *L. amazonensis* et *L. donovani* par la miltéfosine, les deux parasites ont produit 25% et 55% d'ATP respectivement, tandis que sans traitement, ils ont regénéré 100%.

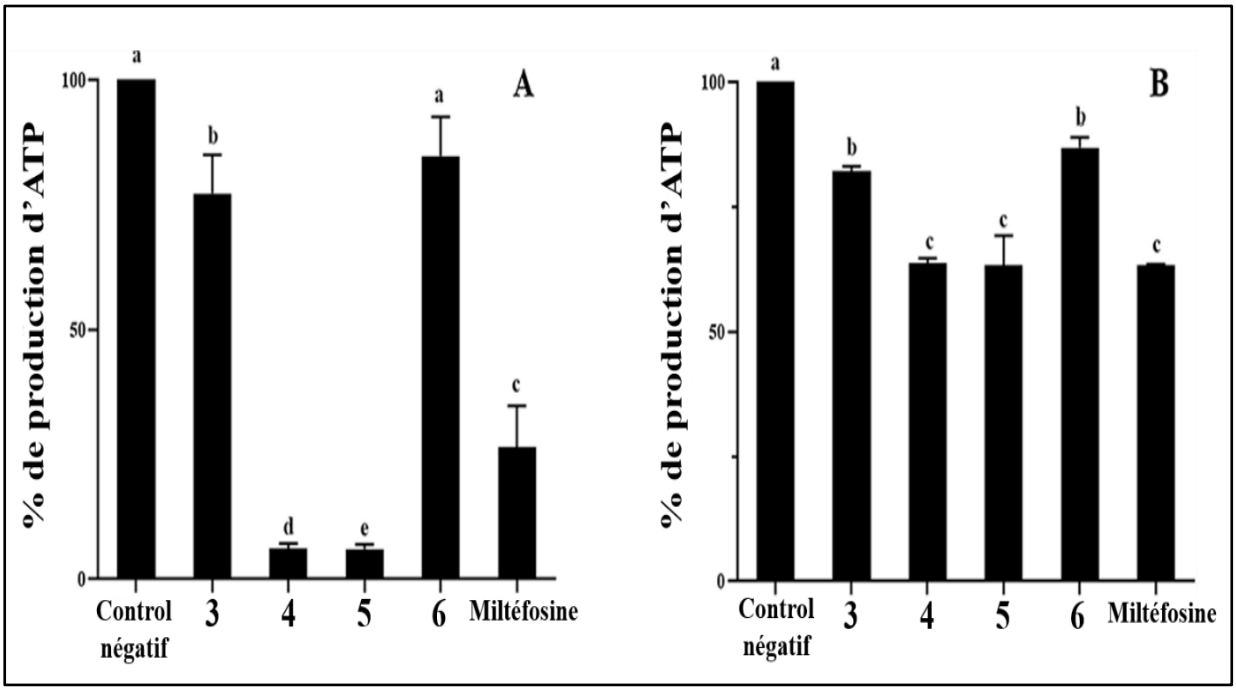


Figure III.15. L'effet de 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**), de l'inuloxin A (**4**), de la sakuranétine (**5**) et de la taxifoline (**6**) sur la production d'ATP par *L. amazonensis* (A), et *L. donovani* (B) en utilisant le test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo Luminescent. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif. Les cellules ont été traitées par la concentration CI_{90} pendant 24h.

V.5. Regénération des ROS

La régulation du stress oxydatif est cruciale pour la survie des parasites et complète le chemin des évènements spécifiques de l'apoptose par production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le marquage des ROS a été performé par le kit CellROX qui est un colorant fluorogène perméable aux cellules et non fluorescent à son état réduit. Cependant, en présence des ROS, son oxydation permet d'émettre une fluorescence rouge et brillante. Les résultats obtenus lors de l'analyse de cet évènement sont présentés dans les Figures III.16. A partir de ces images, il est très clair que les composés **(3-6)** ont déclenché une production importante des ROS traduite par l'émission d'une fluorescence rouge intense chez *L. amazonensis* en comparaison avec le contrôle ($p<0,05$) (Annexe 26). Cependant, chez *L. donovani* nous n'avons observé aucune accumulation des ROS dans le parasite.

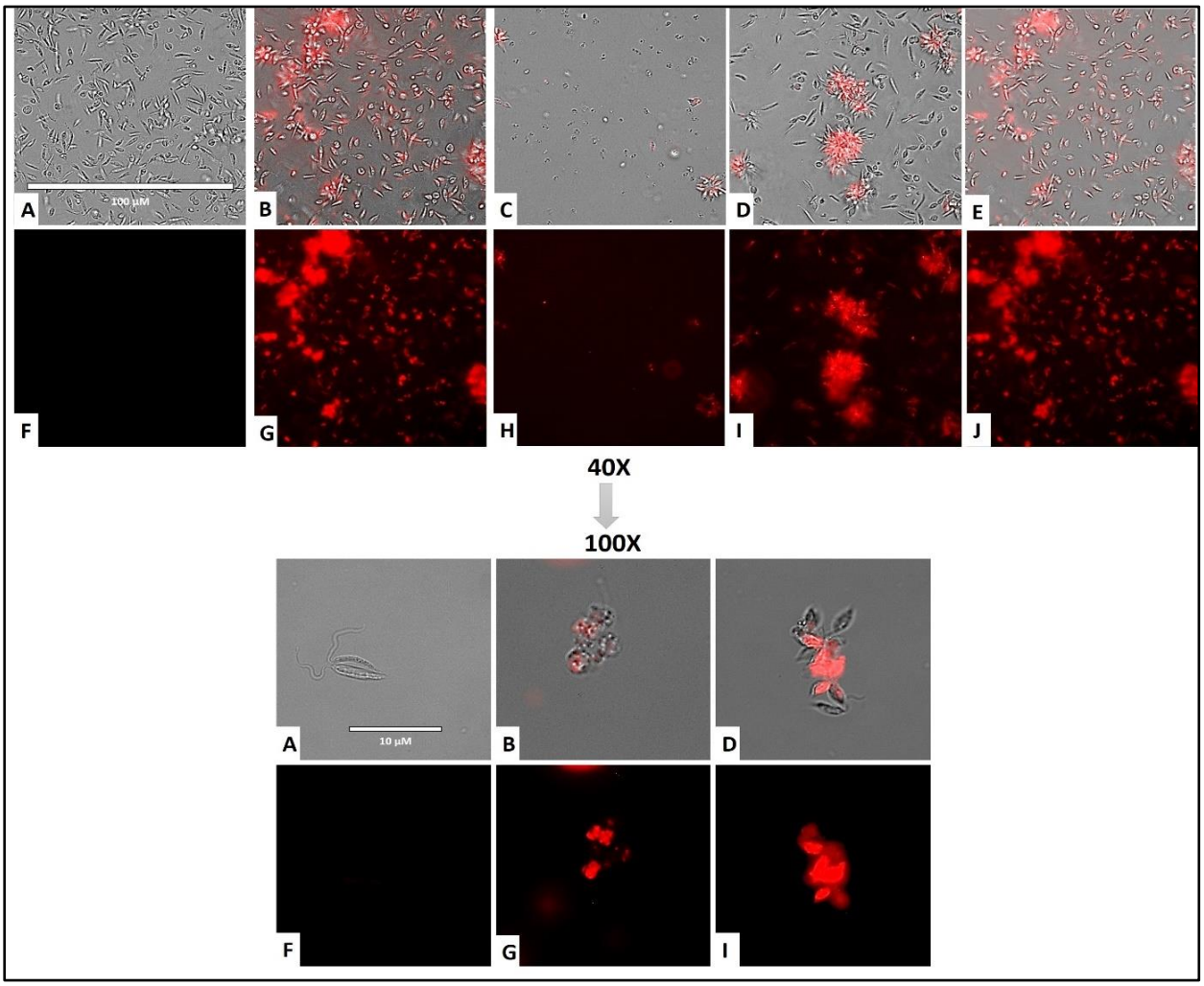


Figure III.16. Augmentation du niveau de production de ROS chez les promastigotes de *L. amazonensis* après traitement par les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) pendant 24h. Après marquage par CellROX Deep Red, des images (40X et 100X) ont été obtenues en utilisant un système EVOS FL Cell Imaging. Les résultats ont été analysés par rapport au contrôle négatif (**A, F**).

VI. Discussion

La recherche des agents leishmanicides a été notablement intensifiée au cours de ces dernières années par l'exploitation de produits naturels issus des plantes médicinales (Zulfiqar et al., 2017 ; Steverding et al., 2020). L'efficacité leishmanicide des extraits de plantes a été attribuée à plusieurs composés appartenant à différentes familles chimiques telles que les monoterpènes, les triterpènes, les alcaloïdes, les lignanes et les flavonoïdes (Da Silva et al., 2019 ; Christopher et al., 2020 ; Santana et al., 2020). D'une manière plus spécifique, les sesquiterpénoïdes et les flavonoïdes isolés de diverses espèces de plantes ont largement montré une activité leishmanicide prometteuse (Herrera-Acevedo et al., 2020 ; Naddaf et Haddad, 2020). Dans le présent travail, les extraits éthanoliques de quinze plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le centre Nord du Maroc ont été criblés pour leur pouvoir antileishmanien contre *L. amazonensis* responsable de la leishmaniose cutanée chronique et *L. donovani* impliquée dans la leishmaniose viscérale et post kala-azar. L'extrait d'*I. viscosa* a exhibé la meilleure activité contre les souches cibles, son criblage bioguidé a permis d'isoler et d'identifier des composés bioactifs de la famille des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes, en plus des acides phénoliques non actifs. De nombreuses études phytochimiques sur les feuilles d'*I. viscosa* ont conduit à la caractérisation d'une large variété de composés dotés de différentes propriétés pharmacologiques. Kheyar-Kraouche et al. (2018) ont révélé la présence de 51 composés dans l'extrait éthanolique de cette espèce avec une prédominance notée des flavonoïdes. Dans le même sens, Mohti et al. (2019) ont analysé le profil phytochimique d'*I. viscosa* marocaine et ont confirmé la présence des acides phénoliques, des lactones et des flavonoïdes y compris l'identification pour la première fois des polyphénols dont l'hexoside d'hispiduline, la patulétine et la spinacétine. La plupart de ces familles et des composés identifiés sont en accord avec nos résultats et avec des études précédentes sur les feuilles et les parties aériennes d'*I. viscosa* dans lesquelles un mélange complexe de métabolites secondaires a été identifié, tels que les sesquiterpènes lactones et les acides (inuloxin et ses dérivés, inuviscolide, acide ilicique, acide costique et ses dérivés), les dérivés des acides phénoliques (acide caféoylquinique, acide dicaféoylquinique et ses dérivés), et les flavonoïdes (sakuranétine, 7-O-méthylaromadendrine et 3-O-acétylpadmatine) (Hernández et al., 2007 ; Rozenblat et al., 2008 ; Danino et al., 2009 ; Avolio et al., 2014). Cependant, le sesquiterpénoïde **3** (8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide) isolé d'*I. viscosa* dans notre étude n'a pas été identifié auparavant et lorsqu'il est isolé d'autres espèces végétales, il a été décrit comme le plus actif contre *L. donovani* (Vasas et Hohmann, 2011). De plus, les résultats obtenus dans la présente étude confirment l'activité leishmanicide remarquable de sakuranétine (**5**) et taxifoline (**6**), deux

flavonoïdes couramment identifiés chez *I. viscosa* (Tasdemir et al., 2006). En outre, au meilleur de notre connaissance, une seule étude dans la littérature qui a rapporté l'effet leishmanicide d'*I. viscosa* où une série de dérivés d'inuloxin a été évaluée contre les promastigotes de *L. donovani* sans évaluer le stade amastigote, les autres espèces de *Leishmania* spp. ni le mécanisme d'action. Pareil à notre résultat, l'inuloxin A (**4**) a montré une activité antiparasitaire importante (6,89 µM) (Avolio et al., 2014).

L'activité leishmanicide des sesquiterpénoïdes **3** et **4**, et les flavonoïdes **5** et **6** dans la présente étude peut être liée à la structure de ces composés par rapport aux autres composés non actifs (**1,2,7** et **8**). En effet, l'influence de la substitution du squelette des sesquiterpènes et des flavonoïdes sur l'activité antiparasitaire a été étudiée, mettant en évidence des tendances préliminaires sur la relation structure-activité (SAR). D'une part, le cycle lactone (**3** et **4** contre **1** et **2**) est un groupe fonctionnel critique pour l'activité biologique et peut être impliqué dans l'effet antiparasitaire des sesquiterpènes, des études précédentes ont confirmé la fonction essentielle de l'anneau furanone dans l'activité (Schmidt, 2006 ; Avolio et al., 2014).

D'autre part, l'analyse de SAR des flavonoïdes a montré que le niveau global d'oxydation est l'un des tendances importantes de ce groupe phytochimique, le composé **6** contenant cinq positions oxygénées a exhibé un potentiel antileishmanien plus remarquable par rapport aux « composés parents » **5** et **8**. De plus, en comparant l'effet du composé **6** à celui du composé **7,** nous pouvons suggérer que l'acétylation et la méthylation ont provoqué des effets préjudiciables sur l'activité, alors que le meilleur groupe fonctionnel est l'hydroxyle qui peut agir comme un donneur de la liaison hydrogène en améliorant l'hydrophilie du composé, ce qui augmente son activité. Cette hypothèse a été confirmée par des études antérieures qui ont démontré que le caractère hydrophobe des composés diminue la perméabilité cellulaire du microorganisme cible, ce qui se traduit par une faible activité biologique (Pereira et al., 2010). Dans cette optique, il a été proposé que l'association d'un groupe hydroxyle en C-4' associé à un groupe méthoxyle en C-7 dans le composé **5** a été nécessaire pour avoir un effet antiparasitaire (Grecco et al., 2012). De ce fait, la présence de tels groupements pourrait constituer des sites intéressants d'interaction et/ou de réaction liée à l'activité antiparasitaire.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré également que le mode d'action possible des sesquiterpénoïdes (**3** et **4)**, et des flavonoïdes (**5** et **6**) vis-à-vis de *L. amazonensis* et *L. donovani* est la mort cellulaire programmée via apoptose. En outre, plusieurs travaux ont rapporté l'effet apoptotique et pro-apoptotique des extraits et des composés isolés à partir d'*I. viscosa* sur différentes lignées cellulaires du cancer colorectal (Bar-Shalom et al., 2019) et du lymphome

(Virdis et al., 2020). De plus, Rozenblat et al. (2008) ont montré que le traitement des lignés cellulaires du mélanome humain par des sesquiterpènes lactones (Tomentosin et Inuviscolide) purifiées des feuilles d'*I. viscosa* a inhibé la prolifération des cellules par l'induction de l'apoptose dont les aspects impliqués ont inclus un changement dans le potentiel de la membrane mitochondriale, une activation de la caspase-3, et des dommages à l'ADN. Talib et al. (2012) ont confirmé l'effet apoptotique des composés isolés d'*I. viscosa* sur la prolifération des cellules cancéreuses traitées par 3,3′-di-OMéthylquercétine et 3-O-méthylquercétine, deux flavonoïdes qui ont exercé leur effet par fragmentation de l'ADN, condensation de la chromatine nucléaire et formation des corps apoptotiques. Cependant le processus d'apoptose induite par cette espèce chez *Leishmania* spp. n'a été jamais élucidé. Ceci nous mène à émettre des hypothèses en croisant les propriétés physico-chimiques et la nature chimique des composés avec la morphologie des souches cibles, étant donné que ce type d'interaction influence l'affinité de l'agent antimicrobien vis-à-vis des cellules cibles. Dans ce sens, il a été rapporté que le groupe des sesquiterpènes lactones a exhibé un potentiel leishmanicide significatif suite aux interactions chimiques qui caractérisent leurs structures. Selon Schmidt (2006), les activités antiparasitaires des sesquiterpènes lactones sont en corrélation avec leurs cytotoxicités favorisées par une réaction d'addition de type Michael entre les groupes thiol libres des protéines et les carbonyles α,β-insaturés du groupe α-méthylène-γ-lactone. De Toledo et al. (2014) ont confirmé que le groupe carbonyle α,β-insaturé est impliqué dans l'effet inhibiteur mais aussi dans la cytotoxicité, ce qui est en accord avec nos résultats dans le cas du composé **3** qui a montré un indice de sélectivité plus faible vis-à-vis des macrophages. De plus, Barrera et al. (2013) ont suggéré que les sesquiterpènes lactones sont capables de réagir avec les groupes sulfhydryles intracellulaires, et dont le groupe fonctionnel est α-méthylène-γ-lactone responsable de la régénération des ROS impliquée dans le stress oxydatif des parasites en inhibant les enzymes protectrices contre ce stress (Chadwick et al., 2013), ce qui pourrait expliquer la régénération des ROS par les promastigotes de *L. amazonensis* lors du traitement par les sesquiterpénoïdes **3** et **4** dans notre étude. En effet, la régénération des ROS chez les promastigotes de *L. amazonensis* traités par des composés d'origine naturelle a été souligné dans la littérature (Da Silva et al., 2016).

En revanche, comme ces lactones sont des composés non polaires, elles peuvent facilement traverser la membrane du parasite. De ce fait, il est plus probable que les sesquiterpénoïdes **3** et **4** ont interféré avec la membrane des souches traitées ce qui a facilité leur perméabilité membranaire comme il a été clairement observé lors de l'essai expérimental du SYTOX Green pour *L. amazonensis* et *L. donovani*.

Concernant le groupe de flavonoïdes présenté par les composés **5** et **6**, nous suggérons que leur mécanisme d'action est probablement lié à leur caractère de lipophilie, ce qui a facilité leur absorption et distribution dans les parasites tout en altérant l'ADN et les organites cellulaires, dont la mitochondrie. En effet, l'implication de la lipophilie dans l'amélioration des activités biologiques a été mathématiquement démontrée (Kubinyi, 1979). De plus, selon les données de la littérature, la lipophilie est un facteur important dans l'activité antiparasitaire et le composé le plus lipophile est le plus actif contre les amastigotes et les promastigotes de *L. amazonensis* en raison de la présence des groupements prényles (Pereira et al., 2010 ; Gontijo et al., 2012). Certaines études ont montré que le mode d'action du composé **6** a reposé principalement sur l'inhibition de la trypanothione réductase chez *L. infantum* (Kumar et al., 2017) et de l'arginase chez *L. amazonensis* (Silva et al., 2019), ce qui pourrait expliquer la production d'ATP par les parasites cibles dans notre étude, ainsi que le fonctionnement normal des mitochondries ce qui nous laisse suggérer que l'apoptose a été induite par voie extrinsèque surtout chez *L. donovani*. Compte tenu des effets observés, les différents aspects d'apoptose élucidés dans la présente étude peuvent interférer. A titre d'exemple, l'oxydation des protéines et des lipides, causée par les ROS a été largement impliquée dans le dysfonctionnement mitochondrial par augmentation de la perméabilité des protons, et diminution du niveau d'ATP (Rodríguez-Hernández et al., 2020). Fonseca-Silva et al. (2011) ont montré que l'altération de la mitochondrie et la production de ROS sont liés et cruciaux pour inhiber la croissance de *L. amazonensis*, ce qui est en accord avec nos résultats, les composés (**3**-**6**) n'ont pas réussi à générer les ROS, ou bloquer la production d'ATP, ni à diminuer le potentiel de la membrane mitochondriale chez *L. donovani*, en particulier dans le cas des composés **3** et **6**. Ce résultat pourrait être expliqué par l'étude de McCall et Matlashewski (2012) dans laquelle ils ont révélé que *L. donovani* a développé différents mécanismes de défense afin de neutraliser la réponse de l'hôte à savoir les protéines A2 qui protègent le parasite contre le stress oxydatif. En réalisant une étude comparative entre le niveau normal et faible d'expression de A2, ils ont conclu que A2 a été impliquée dans la pathogénicité et la résistance de *L. donovani*. Cependant, d'autres études ont corroboré nos résultats en confirmant la fragmentation d'ADN et l'altération de la perméabilité membranaire des souches de *Leishmania* spp. traitées avec des sesquiterpènes lactones (Barrera et al., 2008 ; Sülsen et al., 2016).

VII. Conclusion

En se basant sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Parmi les quinze espèces de plantes criblées pour leur pouvoir leishmanicide par microdilution contre *Leishmania* spp., *Inula viscosa* a montré l'activité la plus prometteuse.
- Le fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique des feuilles d'*I. viscosa* par de multiples étapes chromatographiques impliquant des colonnes sur gel de silice et de sephadex LH-20, des chromatographies centrifuges planaires et préparatives a permis d'identifier à l'aide des techniques spectroscopiques et de corrélation (RMN, HMBC, HSQC et ROESY) huit composés à savoir l'acide isocostique, l'acide ilicique, 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide, l'inuloxin A, la sakuranétine, la taxifoline, 3-O-acétyl-7-O-méthylaromadendrine et la quercétine.
- Le test biologique par microdilution en utilisant le réactif AlamarBlue a permis de noter que parmi les huit composés isolés, les sesquiterpénoïdes (8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide et inuloxin A) et les flavonoïdes (sakuranétine et taxifoline) ont été caractérisés comme les principes actifs contre *Leishmania amazonensis* et *Leishmania donovani* avec des CI_{50}s entre 9,53 et 86,45 µM pour les promastigotes, et entre 0,64 et 6,98 µM pour les amastigotes.
- Les sesquiterpénoïdes et flavonoïdes d'*I. viscosa* ont montré une activité importante sans toxicité sur les macrophages murins performée en utilisant le dosage fluorométrique par le réactif AlamarBlue.
- L'analyse de la relation structure-activité nous a permis de suggérer que la lactonisation ou l'oxydation des sesquiterpénoïdes (8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide et inuloxin A) et des flavonoïdes (sakuranétine et taxifoline) a amélioré leur profil biologique.
- En utilisant les kits de viabilité cellulaire et de détection des évènements typiques de l'apoptose. Les essais expérimentaux ont montré que ces composés semblent induire une mort cellulaire programmée via apoptose chez *L. amazonensis* et *L. donovani* en causant une altération de la perméabilité membranaire (kit SYTOX Green), une condensation de la chromatine (double kit Hoechst 33342/PI), une perturbation du fonctionnement de la mitochondrie (sonde JC-1), et une réduction des niveaux de production de l'ATP (CellTiter-Glo) en plus d'une régénération des ROS (kit CellROX) chez *L. amazonensis*.

Valorisation du spectre d'action des composés bioactifs d'*I.viscosa*

Introduction

Nous venons de démontrer que la région de Fès-Meknès est riche en plantes médicinales dont les substances antimicrobiennes produites possèdent un spectre d'action élargie car agissent sur des microorganismes de deux phylums différents, les bactéries SARM et les protozoaires leishmanies. Cependant et afin de mieux apprécier ce spectre d'action, des tests d'activité biocide des composés isolés d'*I. viscosa* sont réalisés contre d'autres germes pathogènes qui font l'objet des travaux au laboratoire d'accueil (laboratoire 11-12 de parasitologie à l'institut Universitaire des Maladies Tropicales et de la Santé Publique, Iles des Canaries-Espagne) à savoir ***Trypanozoma cruzi*** un flagellé trypanosomatidé et ***Naegleria fowleri*** une amibe flagellée. Les deux espèces font partie des germes pathogènes négligés à cause du manque de soutien financier pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments (Chatelain et Ioset, 2011) alors que le taux de pathogénicité et de virulence causée par ces germes est assez élevé. En effet, environ un milliard de personnes dans le monde sont touchées par les maladies tropicales négligées (MTNs) (Peeling et al., 2017). Les produits pour le traitement des MTNs sont en générale limités sachant que le traitement de l'infestation par *N. fowleri* repose sur l'amphotéricine B et la miltefosine et celui pour *T. cruzi* repose sur la benznidazole et le nifurtimox (WHO, 2020).

I. Evaluation de l'activité biocide sur *Trypanosoma cruzi*

I.1. Introduction

Le protozoaire hémoflagellé *T. cruzi* est l'agent étiologique responsable de la maladie de Chagas ou la trypanosomiase américaine. C'est une maladie tropicale négligée potentiellement mortelle, elle sevit dans la région des Amériques et principalement l'Amérique latine (WHO, 2018). Cependant, cette parasitose s'est propagée à d'autres continents à savoir les États-Unis d'Amérique, Canada, nombreux pays d'Europe et certains pays du Pacifique occidental (de Jesus et al., 2021). Selon les estimations de l'OMS, 6 à 7 millions de personnes dans le monde sont infestées par *T. cruzi* causant plus de 10 000 décès par an (WHO, 2020).

En effet, *T. cruzi* est transmis principalement par des insectes vecteurs hémiptères hématophages, les triatomes qui sont une variété de punaises (Tyler et Engman, 2001). Lors du repas sanguin, les formes trypomastigotes métacycliques infestantes sont libérées avec les déjections des insectes et

pénètrent dans la circulation sanguine de l'hôte mammifère via le site de la piqûre où le parasite est capable d'infester les cellules nucléées et se transformer en forme amastigote (Tyler et al., 2003). En plus de ce cycle, d'autres modes de transmission ont également été signalés comme par exemple la voie congénitale, l'ingestion des aliments contaminés et la transfusion sanguine (WHO 2020 ; Colombo et al., 2021).

La maladie de Chagas est caractérisée par des phases d'infestation aiguës et chroniques qui se présentent sous différentes formes cliniques. Bien que l'infestation puisse rester asymptomatique pendant de nombreuses années, jusqu'à 30% des personnes infestées de façon chronique peuvent développer des troubles cardiaques, et jusqu'à 10% des troubles digestifs et/ ou neurologiques (WHO, 2020). Après la première description de la maladie, plusieurs composés ont été évalués comme agents thérapeutiques tels que l'arsenic, la fuchsine, l'émétique tartrate et le chlorure de mercure. Cependant, aucun de ces agents n'a été satisfaisant (Ribeiro et al., 2020). Actuellement, le traitement de cette parasitose ne comprend que deux médicaments, le benznidazole et le nifurtimox, qui sont efficaces pour traiter uniquement la phase aiguë de la maladie, mais présentent des effets indésirables graves (Pecoul et al., 2016 ; Sales et al., 2017).

I.2. Activité antitrypanosomale et détermination des composés actifs

Appartenant à la même famille que *Leishmania*, *T. cruzi* a été traité par les composés isolés d'*I. viscosa*, la seule plante qui a montré une activité antitrypanosomale lors du criblage des quinze plantes. Pour ce faire, les composés ont été testés sur le stade epimastigote de *T. cruzi* (Y strain). Techniquement, les composés (**3-6**) ont été solubilisés dans le DMSO et dilués en série dans 100 µl de milieu de culture LIT complété avec 10% de SBF dans des microplaques de 96 puits. Par la suite, les parasites en phase de croissance logarithmique ont été dénombrés, ajustés à 5×10^5 cellules/ml, et 100 µl de la suspension parasitaire ont été distribués dans la microplaque préalablement préparée pour avoir un volume final de 200 µl par puits. Le benznidazole a été utilisé comme témoin positif. Finalement, un volume de 20 µl du réactif AlamarBlue (Invitrogen, USA) a été ajouté à chaque puits et les microplaques ont été incubées sous agitation à 26°C pendant 72h. Après l'incubation, les microplaques ont été observées au microscope et analysées statistiquement de la même manière que le test leishmanicide.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'*I. viscosa* a exhibé un pouvoir inhibiteur important contre les epimastigotes de *T. cruzi*. La caractérisation chimique nous a permis de mettre en évidence une inhibition la plus élevée exercée par les composés (**3**) et (**4**). De plus, comparés aux médicaments de référence, les résultats ont montré que ces deux composés ont présenté une

activité proche de celle du benznidazole (6,95 µM). En revanche, le test de cytotoxicité des macrophages murins performé par la méthode du réactif AlamarBlue a révélé que le benznidazole a montré une CC_{50} de 399,91 µM. Selon les valeurs de CC_{50}, 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**) et l'inuloxin A (**4**) ont montré un profil de cytotoxicité modéré, tandis que la sakuranétine (**5**) et la taxifoline (**6**) ont présenté un profil cytotoxique faible (Tableau IV.1).

Tableau IV.1. Activité antitrypanosomale, cytotoxicité et indice de sélectivité des composés purifiés de l'extrait d'*I. viscosa* sur les epimastigotes de *T. cruzi*. et les macrophages murins.

Composés	*T. cruzi*			Macrophages murins
	CI_{50} (µM)	**CI_{90} (µM)**	**IS**	**CC_{50} (µM)**
3	4,99 ± 0,04	17 ± 0,33	3,67	18,44 ± 1,30
4	12,52 ± 0,16	22,11 ± 0,30	3,38	42,36 ± 2.54
5	36,17 ± 2,17	191,68 ± 0,77	2,65	95,93 ±0,5
6	82,95 ± 1,65	173,45 ± 0,61	>4,18	>100
Benznidazole	6,95 ± 1,92	25,59 ± 2,72	57,51	399,91 ± 1,04

CI_{50} : Concentration inhibitrice qui inhibe 50% de croissance des parasites testés.
CI_{50} : Moyennes ± Ecart type.
CI_{90} : Concentration inhibitrice qui inhibe 90% de croissance des parasites testés
CC_{50} : Concentration cytotoxique qui réduit 50% de la viabilité des macrophages murins.
IS : Indice de sélectivité (CC_{50} /CI_{50}).
Les composés qui ont montré une CI_{50}> 100 µM ont été exclus.

I.3. Mécanisme d'action des composés actifs

De la même manière que l'activité leishmanicide, nous avons analysé la perméabilité de la membrane plasmique des parasites cibles en utilisant le kit SYTOX Green. La figure IV.1 montre l'effet des composés (**3-6**) sur les membranes cellulaires de *T. cruzi* pendant une incubation de 24h. A partir de ces figures, nous pouvons constater que le traitement des epimastigotes a provoqué une augmentation significative de l'intensité de la fluorescence verte en comparaison avec le contrôle indiquant une altération remarquable de la perméabilité de la membrane cellulaire.

L'analyse de l'état de la chromatine au sein des cellules de *T. cruzi* a été performée par le kit de détection d'apoptose à double coloration (Hoechst 33342/PI). Les résultats obtenus après 24h d'incubation avec les quatre composés sont présentés dans la figure IV.2.

Après excitation, les images obtenues ont montré qu'en comparaison avec le témoin, Hoechst 33342 a émis une fluorescence bleue et brillante très remarquable après le traitement par les composés **3-6**, ce qui reflète une condensation de la chromatine chez les cellules traitées. Concernant le PI, les cellules ont pu exclure ce dernier mais pas le Hoechst lors de l'incubation des parasites avec les composés **3,4** et **6** (Figure IV.2).

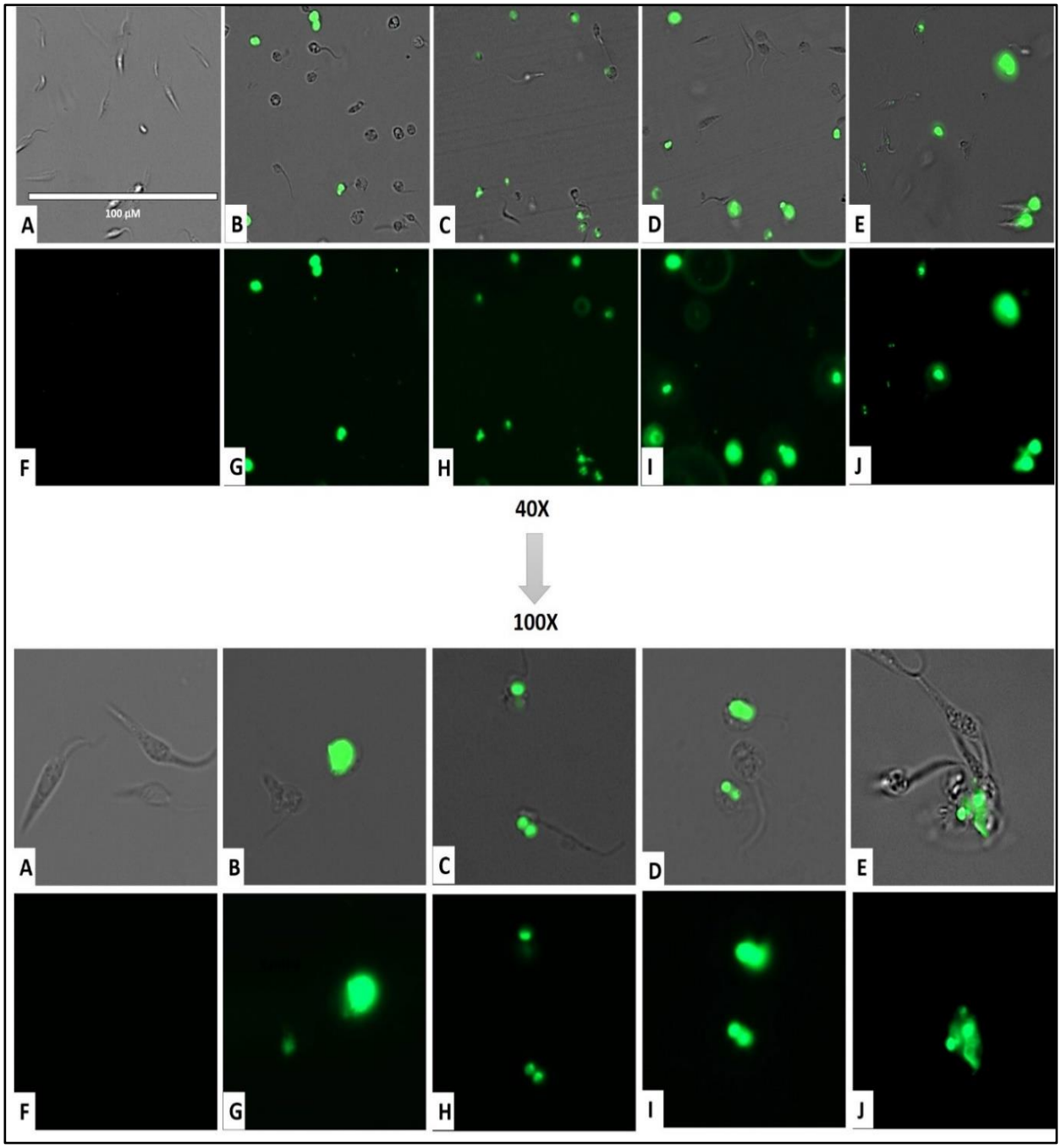


Figure IV.1. Les images (40X et 100X) présentent les effets de la concentration CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des epimastigotes de *T. cruzi* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été obtenues en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (**A, F**).

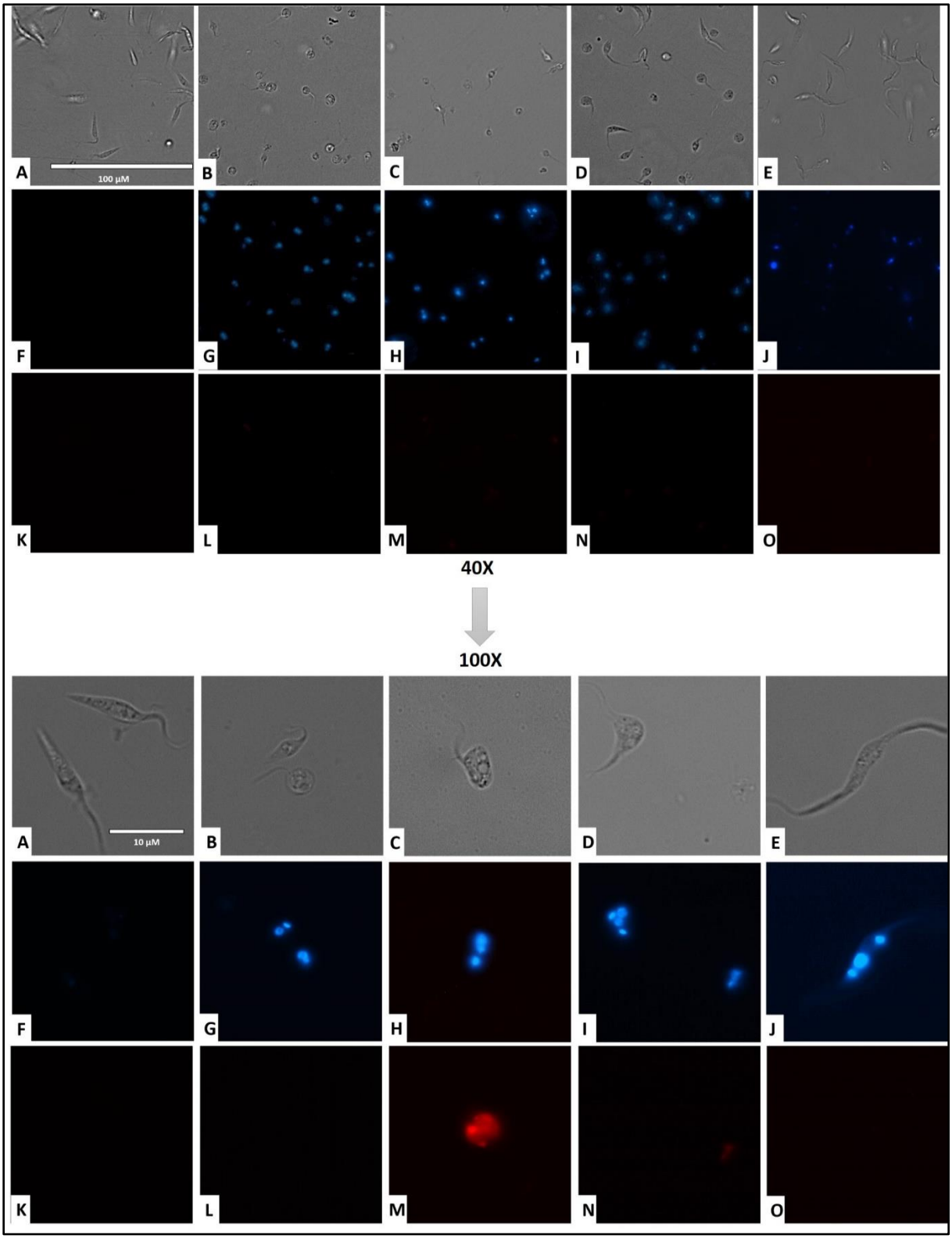


Figure IV.2. Les images (40X et 100X) obtenues à partir du système d'imagerie cellulaire EVOS FL montrent l'intensité de la fluorescence lorsque les epimastigotes de *T. cruzi* ont été incubés avec les CI_{90} des quatre composés testés pendant 24h: Inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline (**E, J, O**). Hoechst correspond à la condensation de la chromatine (bleue) dans les cellules traitées. La fluorescence rouge correspond à la coloration par PI. Un contrôle sans traitement a été utilisé (**A, F, K**).

L'effet des composés **(3-6)** sur le potentiel de la membrane mitochondriale (ΔΨm) de *T. cruzi* a été déterminé par mesure de la fluorescence émise par la sonde JC-1. L'analyse des images enregistrées a indiqué que les composés **(3-6)** ont pu diminué le ΔΨm chez les epimastigotes en émettant une fluorescence verte bien remarquable par rapport aux parasites non traités (Figure IV.3). En effet, le dysfonctionnement de la mitochondrie a été confirmé par le dosage de l'ATP produite par *T. cruzi* lors du traitement par les composés testés pendant 24h. Cette quantification a été performée en utilisant la méthode luminescente par le kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). En comparaison avec les contrôles positifs et négatifs, il a été observé que l'incubation de *T. cruzi* avec les composés **4**-**6** a provoqué une diminution modérée de la teneur en ATP, tandis que cette teneur a été très légèrement altérée lors du traitement par le composé **3** (Figure IV.4).

Le marquage des ROS a été performé par le kit CellROX. Les résultats obtenus lors de l'analyse de cet évènement sont présentés dans la figure IV.5. A partir de ces images, il est très clair que les composés **(3-6)** ont déclenché une production importante des ROS traduite par l'émission d'une fluorescence rouge intense chez *T. cruzi* en comparaison avec le contrôle.

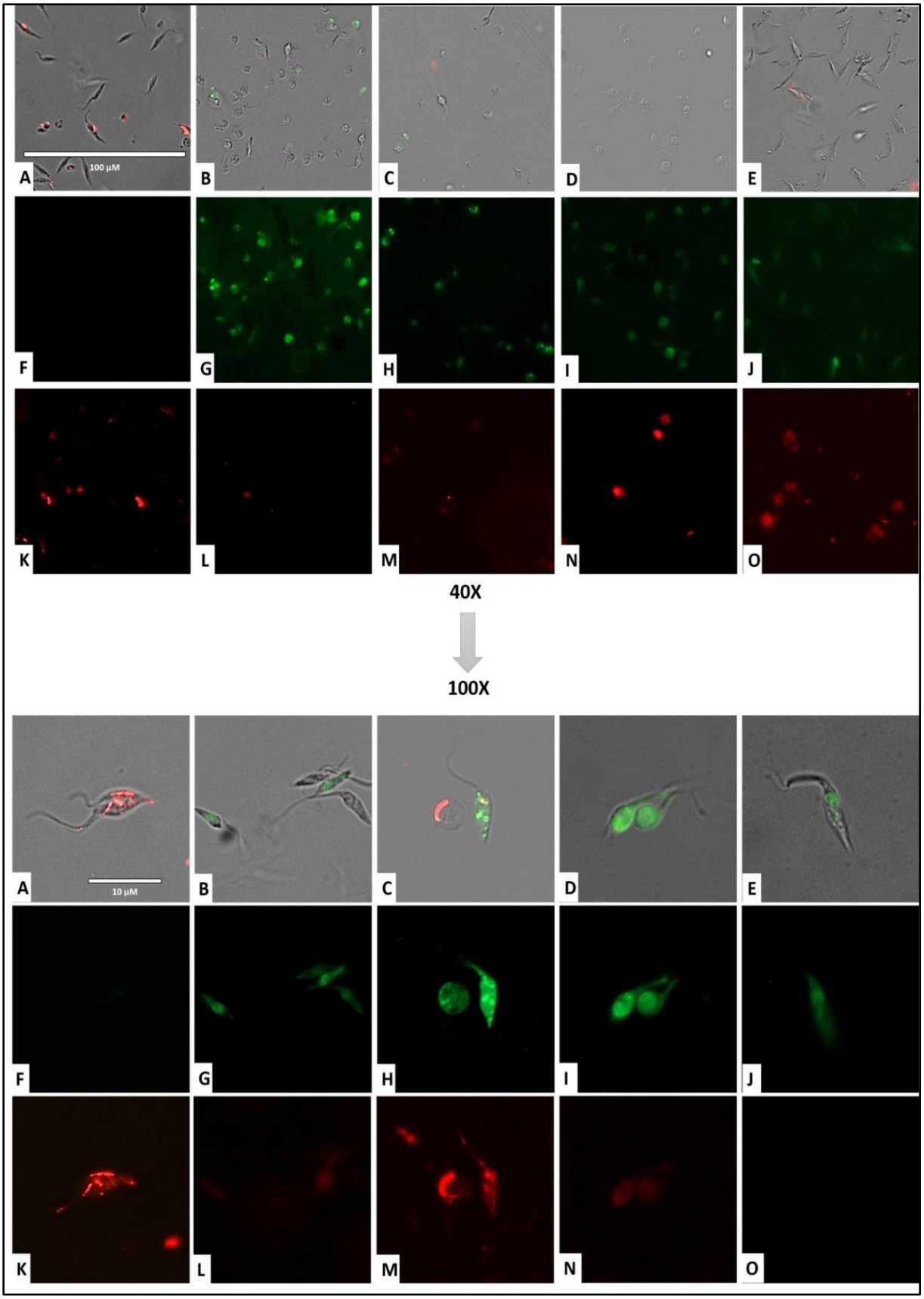


Figure IV.3. Les effets de l'inuloxin A (**B, G, L**), sakuranétine (**C, H, M**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I, N**), taxifoline **(E, J, O)** sur le potentiel de la membrane mitochondrial de *T. cruzi* par rapport au contrôle (**A, F, K**). Les images (40X et 100X) sont représentatives des parasites observés dans les expériences réalisées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL.

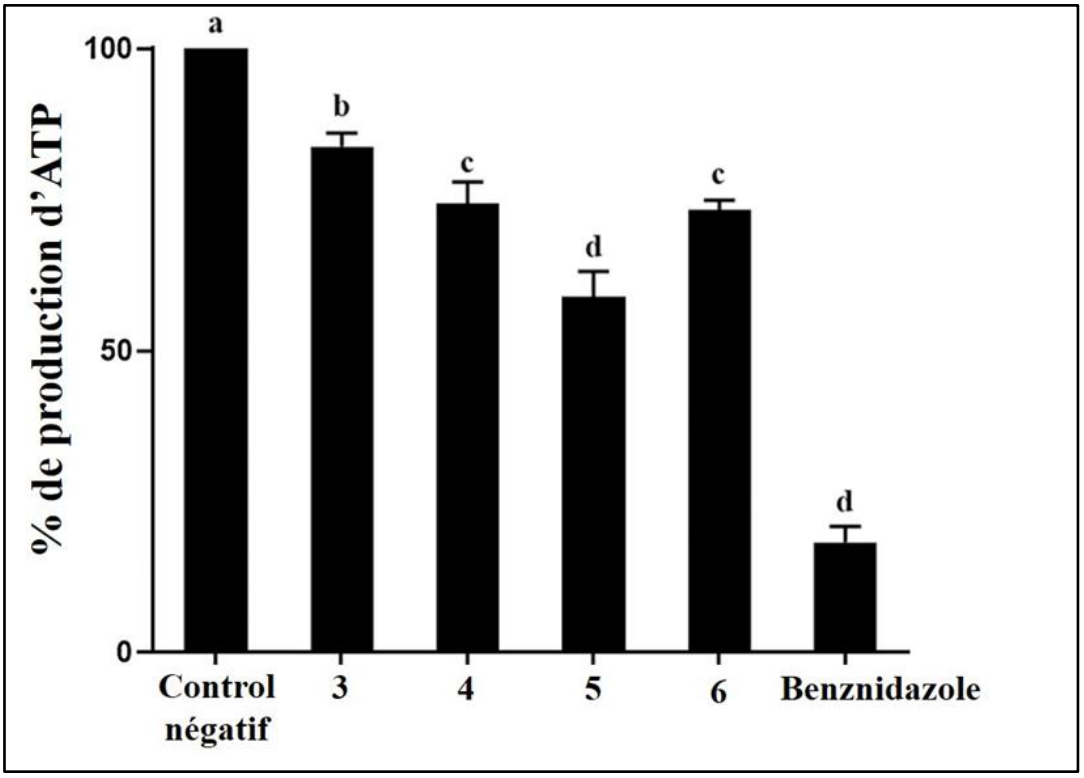


Figure IV.4. L'effet de 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**3**), de l'inuloxin A (**4**), de la sakuranétine (**5**) et de la taxifoline (**6**) sur la production d'ATP par *T. cruzi* en utilisant le test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo Luminescent. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif. Les cellules ont été traitées par la concentration CI_{90} pendant 24h.

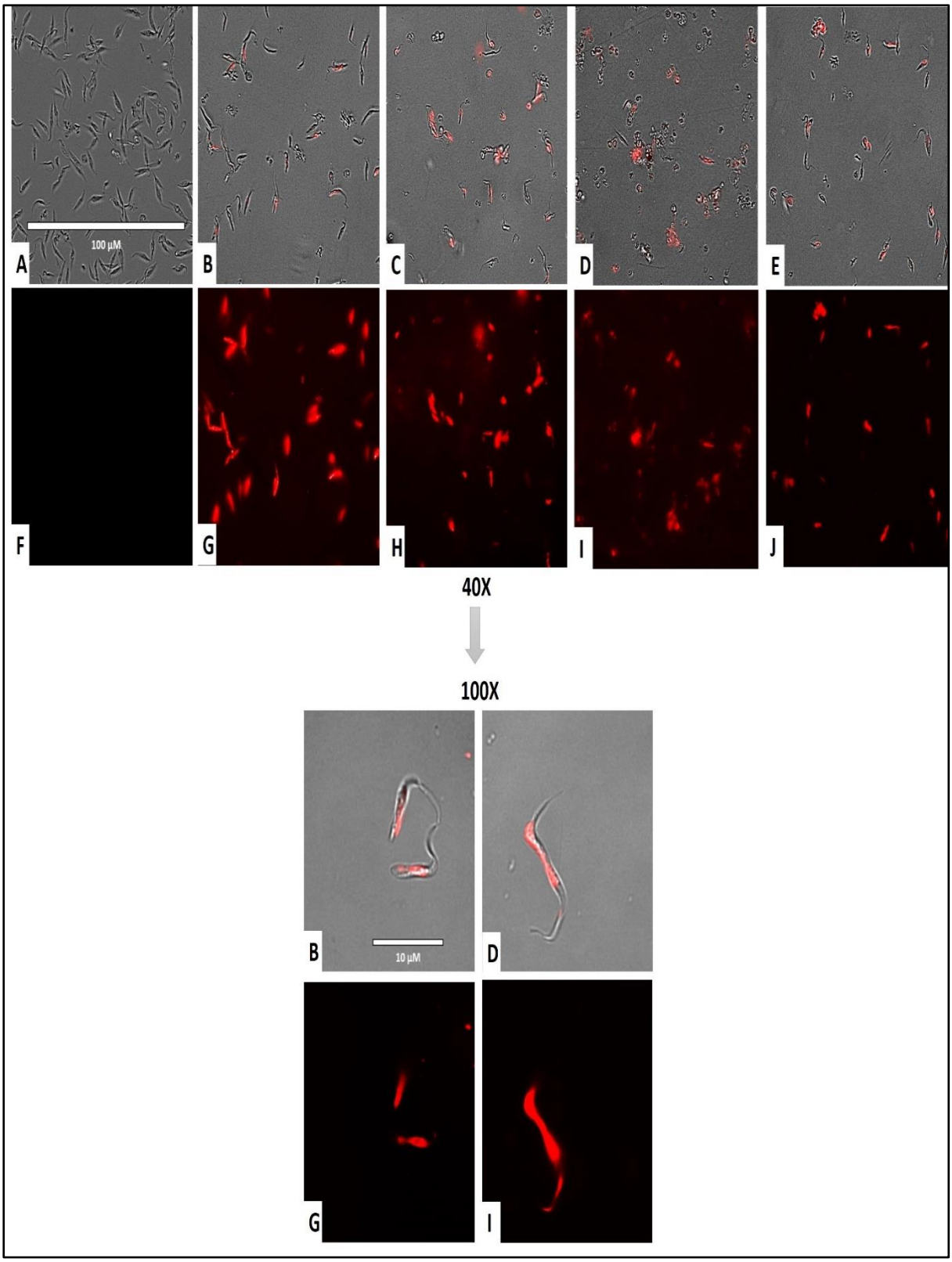


Figure IV.5. Augmentation du niveau de production de ROS chez les epimastigotes de *T. cruzi* après traitement par les CI_{90} d'inuloxin A (**B, G**), sakuranétine (**C, H**), 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide (**D, I**) et taxifoline (**E, J**) pendant 24h. Après marquage par CellROX Deep Red, des images (40X et 100X) ont été obtenues en utilisant un système EVOS FL Cell Imaging. Les résultats ont été analysés par rapport au contrôle négatif (**A, F**).

I.4. Discussion

Dans la présente partie, nous avons évalué l'activité antitrypanosomale de l'extrait éthanolique d'*I. viscosa* et ses composés sur les epimastigotes de *T. cruzi*. Les résultats obtenus ont montré que les composés (**3-6**) actifs sur *Leishmania* spp. sont les mêmes actifs sur *T. cruzi* appartenant à la même famille des kinétoplastidés. Ceci nous a mené à élucider le mécanisme d'action de ces composés vis-à-vis des epimastigotes. Nos résultats ont confirmé que les composés (**3-6**) ont déclenché des évènements spécifiques à la PCD via apoptose en combinant différentes caractéristiques allant de la membrane plasmique jusqu'aux organites cellulaires et matériel génétique.

En effet, les sesquiterpénoïdes et les flavonoïdes isolés de diverses plantes ont largement montré une activité trypanocide importante (Sosa et al., 2020 ; Armenio et al., 2020 ; Florencio et al., 2020). A l'exception de l'inuloxin A **(4)**, l'activité antitrypanosomale *in vitro* a été prouvée pour les composés **3**,**5** et **6**. Nour et al. (2009) ont montré que le composé 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide **(3)** isolé de la plante soudanaise *Xanthium brasilicum* est un métabolite terpénoïde qui a été le plus actif *in vitro* contre les trypomastigotes de *T. cruzi* avec une CI_{50} de 11,3 µM. Grecco et al. (2012) ont rapporté que la sakuranétine (**5**) a présenté une activité remarquable contre les trypomastigotes de *T. cruzi* avec une CI_{50} faible et deux fois plus efficace que le benznidazole, ce flavonoïde a été capable de tuer 100% des parasites après 24h d'incubation. Par la suite, les auteurs de la même étude ont indiqué que la présence d'un groupe hydroxyle en C-4' associé à un groupe méthoxyle en C-7 dans les flavonoïdes est importante pour l'activité antiparasitaire. En outre, Leite et al. (2010) ont démontré que la taxifoline **(6)** a exhibé une faible activité antitrypanosomale en comparaison avec d'autres flavonoïdes ce qui a été confirmé auparavant dans l'étude menée par Tasdemir et al. (2006) sur les trypomastigotes de *T. cruzi* en corroborant notre résultat.

Néanmoins, dans la biobibliographie aucune étude n'a rapporté le mécanisme d'action exercé par ces composés sur *T. cruzi*. Pourtant, la PCD induite via apoptose lors du traitement par les composés naturels a été démontrée chez *T. cruzi* (Menna-Barreto et al., 2009). Lors du traitement de *Trypanosoma* spp. par les sesquiterpènes lactones, une fragmentation de l'ADN a été observée (Sülsen et al., 2016). De plus, l'altération de la perméabilité membranaire causée par les métabolites isolés des plantes médicinales a été largement documentée (Chiquero et al., 1998 ; Pinto et al., 2013 ; Rea et al., 2013). D'autres études ont décrit l'augmentation de la régénération des ROS par les epimastigotes, les trypomastigotes et les amastigotes de *T. cruzi* lors du traitement par des sesquiterpénoïdes isolés de plusieurs plantes (Bombaça et al., 2018).

En revanche, il a été noté que le dysfonctionnement mitochondrial et la production de ROS sont liés et cruciaux pour le potentiel inhibiteur de *T. cruzi* (Bombaça et al., 2019). Cependant, selon Florencio et al. (2020) il y a peu d'études sur les effets des flavonoïdes contre *T. cruzi* qui manquent d'analyse des altérations morphologiques du parasite.

I.5. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les sesquiterpénoïdes (8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide et inuloxin A) et les flavonoïdes (sakuranétine et taxifoline) ont exhibé une activité antitrypanosomale prometteuse contre les epimastigotes de *T. cruzi*.
- Ces composés ont montré une activité importante avec un profil cytotoxique faible sur les macrophages murins.
- Les essais expérimentaux du mécanisme d'action ont montré que ces composés semblent induire de la mort cellulaire programmée via apoptose chez les cellules traitées de *T. cruzi*.

II. Evaluation de l'effet biocide sur *Naegleria fowleri*

II.1. Introduction

Naegleria fowleri dite « amibe mangeuse de cerveau » est une amibe libre responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) qui est une maladie rare mortelle imputable à cette amibe. *N. fowleri* a été découverte en 1899, et le premier cas de MEAP a été décrit en Australie en 1965 par Fowler et Carter (Fowler et Carter, 1965). Cette amibe est classée comme pathogène prioritaire de catégorie B par le NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) (Barrett et al., 2020). L'incidence des cas de MEAP rapportés est devient de plus en plus importante dans diverses parties du monde avec des taux de mortalité très élevés avoisinant 95% (Wagner et al., 2017 ; Maciver et al., 2020). Récemment, plus de cas ont été déclarés en Philippines, au Sud du Brésil, à Pakistan, aux États-Unis et dans les pays asiatiques (Chomba et al., 2017 ; Milanez et al., 2017 ; Anser et al., 2018 ; Henker et al., 2019 ; Ali et al., 2020), ce qui a mené les chercheurs à qualifier la MEAP comme une maladie infectieuse émergente car il semble inévitable que son incidence réelle augmente en raison du changement climatique (Maciver et al., 2020). En effet, *N. fowleri* est un organisme environnemental et bien que l'eau soit la principale voie de transmission, l'infection par le sol et la poussière est une voie alternative possible (Grace et al., 2015). *N. fowleri* a été principalement isolé des sources naturelles d'eau, à

savoir l'eau douce chaude, l'eau du robinet et la source d'eau chaude (De Jonckheere, 2011; Siddiqui et al., 2016 ; Cooper et al., 2019). Lorsque l'eau contaminée est inhalée, les espèces pathogènes de *N. fowleri* développent la pathologie dans la cavité nasale entraînant une destruction des neurones (Jahangeer et al., 2020) dont les symptômes sont des maux de tête, mal de gorge, nez bouché, fièvre, nausées, altération du goût et de l'odorat et photophobie (Siddiqui et Khan, 2014).

Les médicaments de choix, la MF et l'Amp B, sont associés à des effets indésirables graves lorsqu'ils sont administrés seuls ou en association avec des antibiotiques tels que la rifampicine et le miconazole (Ondarza et al., 2006 ; Vargas-Zepeda et al., 2005). En effet, l'Amp B est connu pour sa néphrotoxicité et ses réactions aiguës liées à la perfusion (Laniado-Laborín et Cabrales-Vargas, 2009). De plus, le traitement clinique a échoué, sur un total de 36 patients traités par l'Amp B, seuls 8% ont récupéré à cause de son incapacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (Capewell et al., 2015).

Les études portant sur la pathogénicité de *N. fowleri* ont occupé une place de plus en plus importante et se sont concentrées sur de nombreux aspects dont la biologie de cette amibe et ses facteurs de virulence tels que la membrane plasmique comme étant un déterminant essentiel de la pathogénicité de différents microorganismes. Toutefois, le mécanisme de cette pathogénicité reste mal connu. Des protéines membranaires telles que 23 kDa (Nf23) et Mp2CL5 ont été détectées spécifiquement dans des souches pathogènes de *N. fowleri* (Reveiller et al., 2001 ; Flores-Huerta et al., 2020). De plus, l'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène est un autre mécanisme pathogène critique de cette amibe, il a été démontré que le gène de la nfactine surexprimé est de nature contact-dépendant ce qui augmente la cytotoxicité et favorise la phagocytose par *N. fowleri* (Sohn et al., 2019).

II.2. Activité biologique et détermination du composé actif

En raison de la pathogénicité de l'espèce étudiée *N. fowleri* (ATCC30808) et selon les directives espagnoles de biosécurité, la souche a été conservée et manipulée dans les installations de sécurité biologique de niveau 3 de l'institut. Pour ce faire, l'activité *in vitro* a été performée en utilisant les trophozoïtes de *N. fowleri* en phase logarithmique de croissance dans le milieu de culture bactocasitone. 50 µl de la suspension cellulaire à une concentration finale de 10^5 cellules/ml ont été distribués dans chaque puits de la microplaque de 96 puits. L'essai implique l'incubation des trophozoïtes avec de différentes concentrations des composés isolés d'*I. viscosa*. Tout d'abord, des dilutions en série de chaque échantillon ont été préparées dans le milieu de culture

bactocasitone, puis 50 µl de chaque dilution ont été transférés à la microplaque contenant la suspension cellulaire. L'Amp B et la MF ont été utilisés comme médicaments de référence, ainsi qu'un témoin négatif a été préparé. Par la suite, le réactif AlamarBlue a été ajouté dans tous les puits (10%), puis les microplaques ont été incubées avec une légère agitation pendant 48h à 37°C.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'*I. viscosa* a exhibé un pouvoir inhibiteur important contre les trophozoïtes de *N. fowleri*. La caractérisation chimique nous a permis de mettre en évidence une inhibition la plus élevée exercée par l'inuloxin A (CI_{50} = 21,27 µM), tandis que la sakuranétine a montré une activité modérée (CI_{50} = 74,83 µM). Cependant, comparés aux médicaments de référence, les résultats ont montré que l'inuloxin A a présenté une activité plus puissante que la MF (21,27 contre 38,74 µM) mais moins importante que l'Amp B (0,12 µM).

En revanche, le test de cytotoxicité des macrophages murins performé par la méthode du réactif AlamarBlue a révélé que la MF a montré une CC_{50} de 127,88 ± 8,85 µM, tandis que l'Amp B a montré une CC_{50}> 200 µM. L'inuloxin A a présenté un indice de sélectivité similaire à celui de la MF avec plus de sélectivité vis-à-vis de *N. fowleri* que la sakuranétine, mais moins de sélectivité que l'Amp B (Tableau IV.2).

Tableau IV.2. Activité antiamibienne, cytotoxicité et indice de sélectivité contre les trophozoïtes de *N. fowleri* et la lignée cellulaire des macrophages des composés isolés d' *I. viscosa*.

Composés	***N. fowleri***	***N. fowleri***	**Murine macrophages**	**IS**
	CI_{50} (µM)	**CI_{90} (µM)**	**CC_{50} (µM)**	
Inuloxin A	21,27 ± 2,25	70,47 ± 6,04	42,32 ± 0,07	2
Sakuranétine	74,83 ± 1,84	-	95,93 ± 1,84	1,28
Amp B	0,12 ± 0,03	-	> 200	>_1652,893
Miltéfosine	38,74 ± 4,23	-	127,88 ± 8,85	3,30

CI_{50} : Concentration inhibitrice qui inhibe 50% de croissance des parasites testés.
CI_{50} : Moyennes ± Ecart type.
CI_{90} : Concentration inhibitrice qui inhibe 90% de croissance des parasites testés
CC_{50} : Concentration cytotoxique qui réduit 50% de la viabilité des macrophages murins.
IS : Indice de sélectivité (CC_{50} /CI_{50}) ; Les composés qui ont montré une CI_{50}> 100 µM ont été exclus.

II.3. Mécanisme d'action du composé actif

Pour examiner le mécanisme de la mort cellulaire induite par l'inuloxin A, des événements indiquant le type de la voie de la PCD ont été mis en évidence et les résultats sont présentés dans les figures IV.6, IV.7, IV.8, et IV.9. Il est à noter que les aspects spécifiques de l'apoptose ont été

caractérisés chez les cellules traitées avec les CI_{90} de l'inuloxin A avec des différences significatives en comparaison avec le témoin. D'après la figure IV.6, l'inuloxin A a provoqué une altération remarquable de la perméabilité membranaire par rapport aux cellules non traitées.

L'état de la chromatine des trophozoïtes de *N. fowleri* traités a été vérifié en utilisant le kit à double coloration Hoechst/PI. En comparaison avec le contrôle de croissance, les cellules traitées ont émis une forte fluorescence bleue indiquant un événement de type apoptotique bien remarquable (Figures IV.7).

En ce qui concerne le métabolisme énergétique, une diminution notable du potentiel de la membrane mitochondriale a été enregistrée (Figure IV.8) en rappelant que le kit JC-1 est une sonde capable de s'agréger dans les mitochondries et d'émettre une fluorescence rouge lorsque le $\Delta\Psi m$ est plus élevé alors que dans du $\Delta\Psi m$ inférieur, le JC-1 se trouve incapable de s'accumuler dans les mitochondries en émettant une fluorescence verte car il reste dans la zone du cytosol sous sa forme de monomères. Pour vérifier si la production d'ATP a été affectée par la perte de $\Delta\Psi m$, le niveau d'ATP généré pendant 24h a été quantifié. Le traitement de *N. fowleri* par l'inuloxin A a provoqué une diminution significative du taux d'ATP total avec une production de 18% seulement par les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées qui produisent spontanément 100% d'ATP.

De plus, l'inuloxin A a favorisé l'accumulation des ROS dans les cellules traitées tout en enregistrant une intensité élevée de la fluorescence rouge en comparaison avec celle du contrôle de croissance (Figure IV.9).

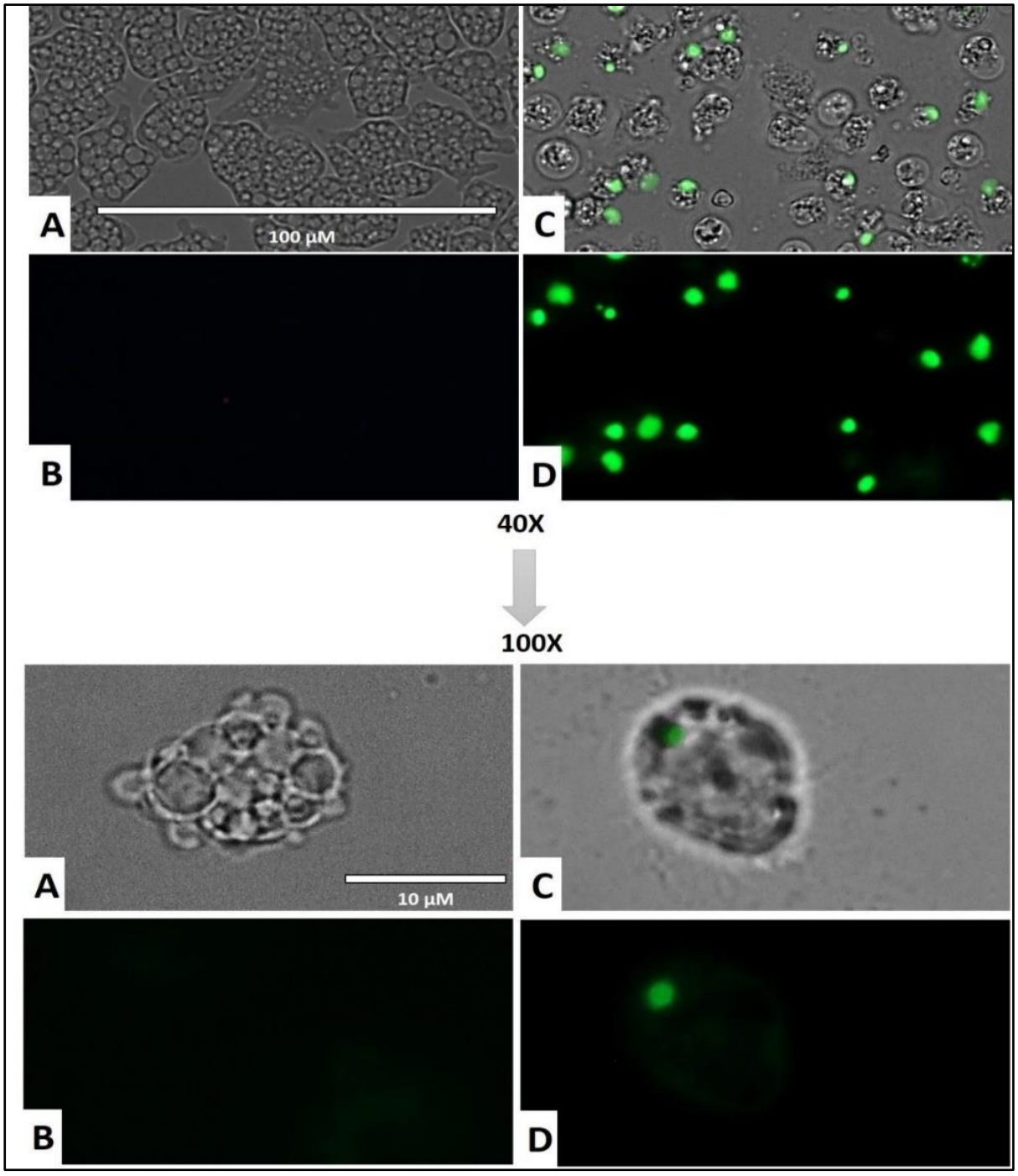


Figure IV.6. Les images présentant les effets de la concentration CI_{90} de l'inuloxin A (**C**, **D**) sur la perméabilité de la membrane plasmique des trophozoïtes de *N. fowleri* après 24h d'incubation. Les cellules ont été marquées avec SYTOX Green. Les images ont été analysées en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Des souches non traitées ont été utilisées comme contrôle de croissance (**A**, **B**).

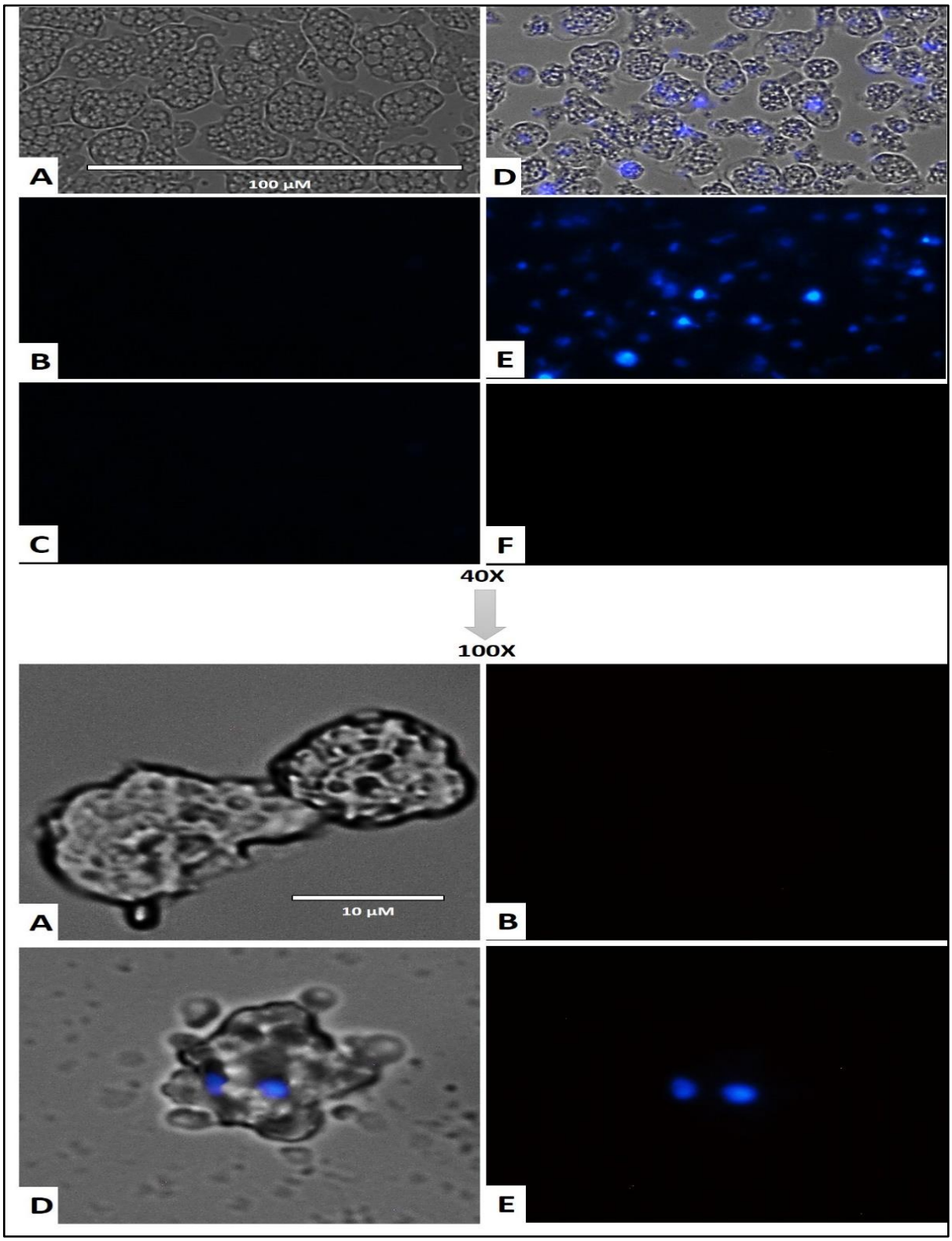


Figure IV.7. Les trophozoïtes de *N. fowleri* incubés avec la CI_{90} de l'inuloxin A (**D**, **E**, **F**) pendant 24h. Les images sont représentatives de la population cellulaire à l'aide d'un EVOS FL Cell Imaging System. La coloration Hoechst est différente lors de la comparaison du contrôle négatif (**A**, **B**, **C**) avec les cellules traitées où les noyaux sont marqués en bleu brillant. La fluorescence rouge correspond à la coloration à l'iodure de propidium (PI). Hoechst (**B**, **E**), l'iodure de propidium (**C**, **F**).

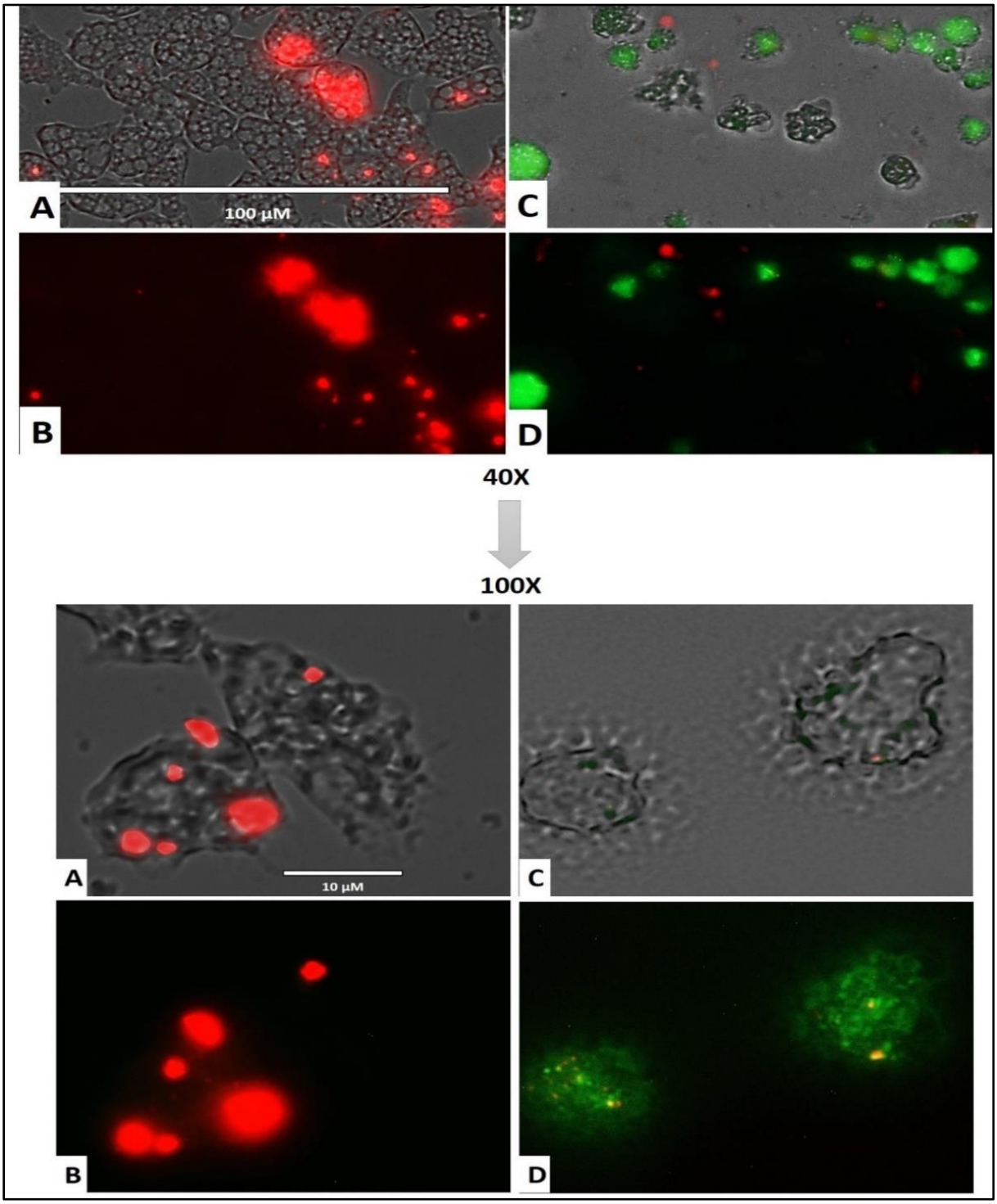


Figure IV.8. Les cellules de *N. fowleri* colorées avec le kit JC-1 après 24h d'incubation des trophozoïtes avec la CI_{90} de l'inuloxin A (C, D). Les images sont représentatives de l'effet sur le potentiel mitochondrial des amibes et observées à l'aide d'un système d'imagerie cellulaire EVOS FL. Un contrôle sans traitement a été utilisé (A, B).

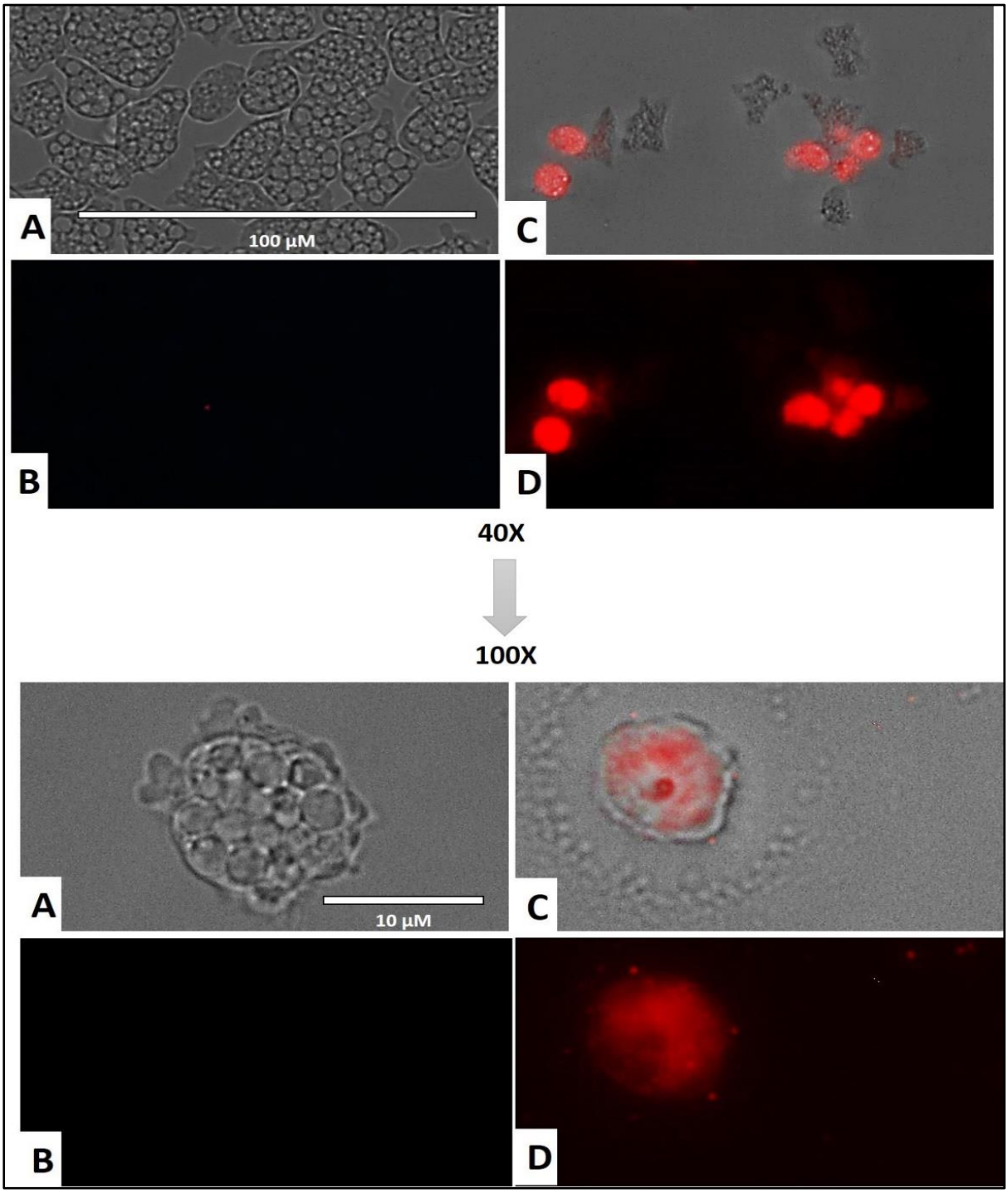


Figure IV.9. Les images sont représentatives du marquage des trophozoïtes de *N. fowleri* avec le kit CellROX Deep Red après traitement par la CI_{90} de l'inuloxin A (**C**, **D**) pendant 24h. Les images ont été obtenues en utilisant un système d'imagerie cellulaire EVOS FL et comparées au contrôle de croissance (**A**, **B**).

II.4. Discussion

Dans le présent chapitre, nous avons évalué l'activité amoebicide de l'extrait éthanolique d'*I. viscosa* et ses composés sur les trophozoïtes de *N. fowleri*. Nous avons également étudié le mécanisme d'action du composé actif. Les résultats ont montré que l'inuloxin A a été le composé responsable de l'activité de cette plante et à de faibles concentrations. La spécificité de ce composé vis-à-vis de la souche étudiée nous a mené à élucider son mécanisme d'action et à discuter la relation structure-activité. En effet, la PCD a été largement rapportée chez les organismes unicellulaires et multicellulaires. Cependant, ce processus n'est pas bien connu chez le genre *Naegleria*. Nos résultats ont révélé pour la première fois que l'inuloxin A a déclenché des évènements spécifiques à la PCD via apoptose en combinant de différentes caractéristiques.

En effet, la membrane plasmique est impliquée dans la pathogénicité de différents microorganismes mais rarement étudiée chez les amibes. Récemment, Flores-Huerta et al. (2020) ont mené une étude comparative où ils ont détecté l'expression d'une protéine de 23 kDa (Nf23) avec des niveaux plus élevés dans la membrane de *N. fowleri* par rapport aux membranes des espèces non-pathogènes comme *N. lovaniensis* et *N. gruberi*. De plus, Reveiller et al. (2001) ont identifié une protéine Mp2CL5 qui a été abondante dans la membrane des trophozoïtes pathogènes mais absente chez les autres espèces de *Naegleria*, ce qui a mené les auteurs à caractériser cette protéine comme étant le facteur spécifique de la pathogénicité de *N. fowleri*. De ce fait, nous pouvons suggérer que le caractère non polaire de l'inuloxin A par rapport au sakuranétine a facilité son passage via la membrane, puis ce composé a probablement inhibé la synthèse des protéines membranaires, car les composés de la famille des sesquiterpénoïdes caractérisés par le α, β carbonyle insaturé ont montré des effets inhibiteurs des protéines impliquées dans la multirésistance (Wortelboer et al., 2005).

Dans la littérature, le mécanisme d'action de l'inuloxin A sur les amibes est encore inconnu. Cependant, il a été signalé que chez les champignons, les sesquiterpènes ont inhibé la biosynthèse des stérols (Siwen et al., 2017) qui constituent un facteur clé de la croissance de *N. fowleri* (Zhou et al., 2018). Effectivement, dans cette étude nous avons montré que l'inuloxin A a favorisé la production de ROS qui devrait être normalement inhibée par la présence des stérols (Galea et Brown, 2009). De plus, l'interférence entre la régénération des ROS, le dysfonctionnement des mitochondries, la diminution de la production d'ATP et la condensation de l'ADN chez *N. fowleri* a déjà été rapportée par Rizo-liendo et al. (2020) ce qui pourrait confirmer les résultats de la présente étude.

Nous avons montré également que l'Amp B a été plus actif et moins toxique que l'inuloxin A et la MF. De plus, plusieurs études ont rapporté l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de ce médicament (Goswick et Brenner, 2003 ; Rizo-Liendo et al., 2020 a). Cependant, le traitement par l'Amp B a échoué dans de nombreux essais cliniques, sur un total de 36 patients, seuls 8% ont récupéré (Capewell et al., 2015). Ceci a été expliqué par son incapacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Pyrgos et al., 2010 ; Ashley, 2019). Par conséquent, le caractère non polaire de l'inuloxin A pourrait favoriser son utilisation dans le futur.

II.5. Conclusion

En se basant sur l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- L'inuloxin A a été caractérisé comme le principe actif dans l'extrait d'*I. viscosa* contre les trophozoïtes de *N. fowleri*.
- L'analyse de la relation structure-activité nous a permis de suggérer que le caractère non polaire de ce composé a amélioré son profil biologique.
- Les essais expérimentaux de la détection de la mort cellulaire programmée ont montré que l'inuloxin A semble induire de l'apoptose chez *N. fowleri.*

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif principal de ce projet de thèse a été dans un premier temps focalisé sur la recherche des composés bioactifs dotés de propriétés antimicrobiennes contre le protozoaire parasite *Leishmania* et la bactérie opportuniste *S. aureus*. Les deux germes peuvent être responsables des infections suppuratives superficielles et profondes et dont le traitement est parfois difficile à cause de l'installation de la biorésistance. L'exploitation de la richesse florale de la région de Fès-Meknès intéressante par son passé épidémiologique et ses caractères géographiques nous a permis d'isoler des composés bioactifs qui pourraient être des candidats possibles de substances thérapeutiques antimicrobiennes vu que le test biocide a concerné dans un deuxième temps d'autres germes pathogénes.

Les travaux entrepris dans cette thèse, au caractère interdisciplinaire comprenaient trois axes majeurs :

Le premier axe est une étude ethnobotanique menée auprès des herboristes de la région afin d'inventorier les plantes utilisées par la population locale pour le traitement des infections cutanées, un symptôme commun entre les deux germes cibles, *Leishmania* et *Staphylococcus aureus*. Ce volet de recherche nous a conduit à la sélection de 64 espèces végétales appartenant à 35 familles phytochimiques avec une prédominance de la famille des Lamiaceae. Le calcul de l'indice de fréquence de citation a révélé 16 plantes comme étant les plus recommandées par l'ensemble des herboristes. Ces plantes sont *Inula viscosa* (25,23%), *Berberis hispanica* (19,62%), *Lavandula dentata* (18,69%), *Crataegus oxyacantha* (14,01%), *Cistus salviifolius* (13,08%), *Ephedra altissima* (11,21%), *Rhamnus alaternus* et *Rubia tinctorum* (9,35%), *Punica granatum* (4,67%), *Juniperus oxycedrus*, *Urtica dioica*, *Nerium oleander*, *Globularia alypum*, *Alkkanna tinctoria*, *Artemisia herba alba* et *Ammi majus* (3,74%). A noter également que ce sont les feuilles qui sont les plus utilisées dans la préparation des décoctés à usage externe.

Le deuxième axe est interdisciplinaire, il combinait la chimie et la biologie, et il consistait à réaliser des extractions éthanoliques des plantes sélectionnées, tester leur activité antimicrobienne vis-à-vis des leishmanies et des staphylocoques, retenir l'extrait le plus actif pour chaque souche et lui faire subir un ensemble de fractionnements bioguidés pour ne garder que les factions les plus actives pour chaque germe et qui feront par la suite l'objet d'identification structurale.

- Le criblage antistaphylococcique a conduit à la sélection de l'extrait de *Rhamnus alaternus* comme étant le plus actif. Le fractionnement bioguidé en utilisant plusieurs étapes de fractionnements successifs à l'aide de différentes méthodes chromatographiques, la purification des fractions les plus actives et la caractérisation structurale à l'aide de techniques spectroscopiques et spectrométriques (RMN, EIMS et HREIMS) a permis l'isolement de 2 composés appartenant à 2 familles : L'**émodine** de la famille des anthraquinones et le **kaempférol** de la famille des flavonoïdes. Toutefois c'est le composé émodine qui s'est avéré le plus actif avec une activité antistaphylococcique élevée affichant des valeurs CMIs de 1,93 et 15,63 µg/ml et des valeurs CC_{50}>100 µg/ml témoignant la non-toxicité de ce composé.
- Le criblage anti-*Leishmania* a conduit à la sélection de l'extrait d'*Inula viscosa* comme étant le plus actif. Le fractionnement bioguidé de cet extrait par de multiples étapes chromatographiques impliquant des colonnes sur gel de silice et de sephadex LH-20, des chromatographies centrifuges planaires et préparatives a permis d'identifier à l'aide des techniques spectroscopiques et de corrélation (RMN, HMBC, HSQC et ROESY) huit composés (acide isocostique, acide ilicique, 8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide, inuloxin A, sakuranétine, taxifoline, 3- O-acétyl-7-O-méthylaromadendrine et quercétine). Toutefois ce sont les composés **sesquiterpénoïdes** (**8-epixanthatin-1β, 5β-epoxide et inuloxin A**) et les **flavonoïdes** (**sakuranétine et taxifoline**) qui se sont révélés les plus actifs contre les espèces cibles : *Leishmania amazonensis* et *Leishmania donovani* avec des CI_{50}s entre 9,53 et 86,45 µM pour les promastigotes, et entre 0,64 et 6,98 µM pour les amastigotes. Les quatre composés ont été évalués pour leur cytotoxicité sur une lignée cellulaire des macrophages murins (J774A.1) et le dosage fluorométrique par le réactif AlamarBlue a montré que les composés ne sont pas toxiques à la dose testée.

Pour la valorisation de ces composés anti-*Leishmania,* leur spectre d'action a été testé sur un flagellé Trypanosomatidae de la même famille que *Leishmania* et qui est *Trypanosoma cruzi* responsable de la maladie de Chagas et l'amibe flagellée *Naegleria fowleri* responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive. Il en résulte que les quatre composés actifs sur *Leishmania* sont aussi actifs sur *T. cruzi* alors que seul l'inuloxin A est actif sur *N. fowleri*.

Dans le troisième axe, les quatre composés découverts actifs sur les protozoaires parasites et l'amibe flagellée vont faire pour la première fois l'objet d'étude du mécanisme d'action en utilisant les kits de viabilité cellulaire et de détection des évènements typiques de l'apoptose. Les résultats obtenus ont montré que ces composés ont déclenché des évènements de types

apoptotiques chez les parasites traités à savoir l'altération de la perméabilité membranaire, la condensation de la chromatine, la perturbation du fonctionnement de la mitochondrie, la réduction des niveaux de production de l'ATP et la régénération des ROS.

Au regard des résultats obtenus au cours de nos travaux, ce travail de thèse constitue une première base de données consacrée aux stratégies d'exploitation de la diversité des composés naturels à partir des plantes aromatiques et médicinales. Cependant, des essais complémentaires ouvrant plusieurs pistes de recherches sont nécessaires pour une réelle valorisation des composés bioactifs isolés.

- La création des catalogues des plantes médicinales destinées aux traitements des infections cutanées dans d'autres régions du Maroc, surtout dans les foyers de leishmaniose.
- Le fractionnement chimique et la caractérisation des composés actifs des autres extraits qui ont montré une activité modérée dans le but d'éliminer les antagonismes.
- L'évaluation de l'activité antileishmanienne des composés antistaphylococciques.
- L'évaluation de l'activité antistaphylococcique des composés antileishmaniens.
- L'évaluation de l'activité leishmanicide des composés identifiés sur des souches de *Leishmania* circulantes au Maroc à savoir *L. tropica*, *L. major* et *L. infantum*.
- L'évaluation de la cytotoxicité des composés isolés sur d'autres lignées cellulaires.
- L'étude des interactions hôte-pathogène est d'une importance primordiale, de ce fait il serait nécessaire de réaliser des tests *in vivo* en utilisant les différents composés isolés ainsi que leurs combinaisons.
- L'analyse des combinaisons selon l'approche de la thérapie combinée *in vitro* et *in vivo* à savoir l'étude de mélange entre :
    - ✓ Les composés leishmanicides.
    - ✓ Les composés antibactériens et antileishmaniens.
- Le développement d'un produit fini à base des formules développées.
- La synthèse chimique des composés bioactifs afin de préserver la nature et réduire les coûts.
- L'étude de la relation activité-structure en testant différents analogues.
- La quantification du mécanisme d'action des composés leishmanicides à savoir le dosage de cytochrome c, des débris de l'ADN, des ROS produits, des corps apoptotiques…
- La réalisation des analyses protéomiques afin d'identifier les protéines et les enzymes impliquées dans le mécanisme d'action des composés leishmanicides.

Références bibliographiques

Abedini, A., 2013. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atrorubens Poit. (Lamiaceae) par un criblage d'extraits de 42 plantes. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II.

Abongomera, C., van Henten, S., Vogt, F., Buyze, J., Verdonck, K., van Griensven, J., 2020. Prognostic factors for mortality among patients with visceral leishmaniasis in East Africa: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008319

Accarias, S., 2014. Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bio-ingénieries. Université Paul Sabatier Toulouse III.

Achan, J., Talisuna, A.O., A., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., et al., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. Malar. J. 10, 1–12.

Afrin, F., Chouhan, G., Islamuddin, M., Want, M.Y., Ozbak, H.A., Hemeg, H.A., 2019. *Cinnamomum cassia* exhibits antileishmanial activity against *Leishmania donovani* infection *in vitro* and *in vivo*. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007227

Aguilar, J., Urday-Cornejo, V., Donabedian, S., Perri, M., Tibbetts, R., Zervos, M., 2010. *Staphylococcus aureus* meningitis case series and literature review. Medicine (Baltimore). 89, 117–125. https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181d5453d

Ahmad, S., Raqeeb, A., Ali, F., Hameed, M.S., Anwar, M., 2018. Characterization of Novel Antibiotic Resistance Genes in Staphylococcal aureus. J. Bacteriol. Mycol. Open Access 6, 11–13. https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00167

Akdime, H., Smahane, B., Latifa, E.M., Amal Hamsas, E., Bousta, D., 2015. Ethnobotanical Study and Traditional Knowledge of Medicinal Plants in Ain Leuh Region (Middle-Atlas of Morocco). Am. J. Adv. Drug Deliv. 3, 248–263.

Akerreta, S., Cavero, R.Y., López, V., Calvo, M.I., 2007. Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. J. Ethnobiol. Ethnomed. 3, 1–18. https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-16

Al-bayati, A., Alshami, A., AlAzzawi, M., Al Hillan, A., Hossain, M., 2020. Metastatic Osteoarticular Infective Endocarditis by Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Cureus 12. https://doi.org/10.7759/cureus.8124

Al-Qura'n, S., 2009. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. J. Ethnopharmacol.123, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.031

Al-Qura'n, S., 2008. Taxonomical and Pharmacological Survey of Therapeutic Plants in Jordan. J. Nat. Prod.1, 10–26.

Ali-Shtayeh, M.S., Yaniv, Z., Mahajna, J., 2000. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: A classification of the healing potential of medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 73, 221–232. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00316-0

Ali, M., Jamal, S.B., Farhat, S.M., 2020. *Naegleria fowleri* in Pakistan. Lancet Infect. Dis. 20, 27–28. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30675-9

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., de Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

Amandine, D., 2015. Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs. Biologie moléculaire. Université de Limoges.

Amarowicz, R., Kolodziejczyk, P.P., Pegg, R.B., 2003. Chromatographic separation of phenolic compounds from rapeseed by a Sephadex LH-20 column with ethanol as the mobile phase. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26, 2157–2165. https://doi.org/10.1081/JLC-120022400

Amberpet, R., Sistla, S., Sugumar, M., Nagasundaram, N., Manoharan, M., Parija, S.C., 2019. Detection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: A preliminary report from south India. Indian J. Med. Res. 150, 194–198. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR

Ammar, R. Ben, Kilani, S., Abdelwahed, A., N.Hayder, Mahmoud, A., Chibani, J., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2005. *In vitro* Mutagenicity, Antimutagenicity and Free Radical Scavenging Activities of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) Extracts. Pakistan J. Biol. Sci. 8, 439–445. https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.439.445

Ammar, R. Ben, Kilani, S., Bouhlel, I., Ezzi, L., Skandrani, I., Boubaker, J., Sghaier, M. Ben, Naffeti, A., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2008. Antiproliferative, antioxidant, and antimutagenic activities of flavonoid-enriched extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L.: Combination with the phytochemical composition. Drug Chem. Toxicol. 31, 61–80. https://doi.org/10.1080/01480540701688725

Ammar, R. Ben, Kilani, S., Bouhlel, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., Ben Sghaier, M., Bhouri, W., Mahmoud, A., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2007. Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). Ann. Microbiol. 57, 453–460. https://doi.org/10.1007/BF03175089

Ammar, R. Ben, Miyamoto, T., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Lacaille-Dubois, M.A., 2019. Isolation and identification of new anthraquinones from *Rhamnus alaternus* L and evaluation of their free radical scavenging activity. Nat. Prod. Res. 33, 280–286. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446135

Andersen, M.H., Holle, S.L.K., Klein, C.F., Bruun, N.E., Arpi, M., Bundgaard, H., Tønder, N., Iversen, K.K., 2020. Risk for infective endocarditis in bacteremia with Gram positive cocci. Infection 48, 905–912. https://doi.org/10.1007/s15010-020-01504-6

Andolfi, A., Zermane, N., Cimmino, A., Avolio, F., Boari, A., Vurro, M., Evidente, A., 2012. Inuloxins A-D, phytotoxic bi-and tri-cyclic sesquiterpene lactones produced by Inula viscosa: Potential for broomrapes and field dodder management. Phytochemistry 86, 112–120. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.003

Andrade, J., Da Silva, A., Dos Santos, A., Freitas, M., De Matos, Y., Braga, M., Bezerra, C., Pereira Gonçalo, M., Vega Gomez, M., Rolóm, M., Coronel, C., Vasconcelos Ribeiro, P., De Brito, E., Melo Coutinho, H., 2019. Chemical composition, antiparasitic and cytotoxic activities of aqueous extracts of Ziziphus joazeiro Mart. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 9, 222–226. https://doi.org/10.4103/2221-1691.259003

Anser, H., khatoon, H., khan, S.S., imam, S., Hasan, A., 2018. A Review on Global Distribution of Primary Amoebic Meningoencephalitis (PAM) Caused By *Naegleria Fowleri*- The Brain Eating Amoeba. RADS J. Pharm. Pharm. Sci. 6, 95–99.

Arana-Argáez, V., Alonso-Castro, A.J., Yáñez-Barrientos, E., Euan-Canto, A., Torres-Romero, J.C., Isiordia-Espinoza, M.A., Brennan-Bourdon, L.M., Juárez-Vázquez, M. del C., González-Ibarra, A.A., 2021. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of an ethanol extract from the aerial parts of Eryngium carlinae F. Delaroche (Apiaceae). J. Ethnopharmacol. 266. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113406

Arango Duque, G., Jardim, A., Gagnon, É., Fukuda, M., Descoteaux, A., 2019. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. PLoS Pathog. 15, 1–25. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007982

Archer, G.L., 1998. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. Clin. Infect. Dis. 26, 1179–1181. https://doi.org/10.1086/520289

Armenio, A.A., de Sousa, E.A., Alves Veras, M.D., Araújo, B.Q., Thevenard, F., Lago, J.H.G., Costa-Silva, T.A., Tempone, A.G., Chaves, M.H., 2020. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation of sesquiterpenes from the branches of *Oxandra sessiliflora*. Phytochem. Lett. 37, 59–62. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.04.005

Asahina, Y., 1908. Ueber das Sakuranin , ein neues Glykosid der Rinde. Arch Pharm 246, 259–272. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ardp.19082460404

Ashley, E.D., 2019. Antifungal drugs: Special problems treating central nervous system infections. J. Fungi 5, 1–8. https://doi.org/10.3390/jof5040097

Ashu, F.A., Na-Iya, J., Wamba, B.E.N., Kamga, J., Nayim, P., Ngameni, B., Beng, V.P., Ngadjui, B.T., Kuete, V., 2020. Antistaphylococcal Activity of Extracts, Fractions, and Compounds of *Acacia polyacantha* Wild (Fabaceae). Evidence-based Complement. Altern. Med. 2020, 1–10. https://doi.org/10.1155/2020/2654247

Aslantürk, Ö.S., 2018. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World. pp. 1–18. https://doi.org/10.5772/intechopen.71923

Avolio, F., Rimando, A.M., Cimmino, A., Andolfi, A., Jain, S., Tekwani, B.L., Evidente, A., 2014. Inuloxins A-D and derivatives as antileishmanial agents: Structure-activity relationship study. J. Antibiot. (Tokyo). 67, 597–601. https://doi.org/10.1038/ja.2014.47

Azevedo, L.G., De Queiroz, A.T.L., Barral, A., Santos, L.A., Ramos, P.I.P., 2020. Proteins involved in the biosynthesis of lipophosphoglycan in Leishmania: A comparative genomic and evolutionary analysis. Parasites and Vectors 13, 1–14. https://doi.org/10.1186/s13071-020-3914-9

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6, 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Ban, E., An, S.H., Park, B., Park, M., Yoon, N.E., Jung, B.H., Kim, A., 2020. Improved Solubility and Oral Absorption of Emodin-Nicotinamide Cocrystal Over Emodin with PVP as a Solubility Enhancer and Crystallization Inhibitor. J. Pharm. Sci. 109, 3660–3667. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.09.030

Bansal, R., Sen, S.S., Muthuswami, R., Madhubala, R., 2020. Stigmasterol as a potential biomarker for amphotericin B resistance in *Leishmania donovani*. J. Antimicrob. Chemother. 75, 942–950. https://doi.org/10.1093/jac/dkz515

Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Adv. Parasitol. 64, 1–109. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3

Bar-Shalom, R., Bergman, M., Grossman, S., Azzam, N., Sharvit, L., Fares, F., 2019. *Inula viscosa* Extract Inhibits Growth of Colorectal Cancer Cells *in vitro* and *in vivo* through Induction of Apoptosis. Front. Oncol. 9, 1–14. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00227

Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., Msanda, F., 2017. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. J. Ethnopharmacol. 198, 338–350. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.023

Barrera, P., Sülsen, V.P., Lozano, E., Rivera, M., Beer, M.F., Tonn, C., Martino, V.S., Sosa, M.A., 2013. Natural sesquiterpene lactones induce oxidative stress in *Leishmania* mexicana. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013, 1–6. https://doi.org/10.1155/2013/163404

Barrera, P.A., Jimenez-Ortiz, V., Tonn, C., Giordano, O., Galanti, N., Sosa, M.A., 2008. Natural Sesquiterpene Lactones are Active Against *Leishmania mexicana*. J. Parasitol. 94, 1143–1149. https://doi.org/10.1645/ge-1501.1

Barrett, K., Tillery, L., Goldstein, J., Lassner, J.W., Osterhout, B., Xu, L., Young, R.M., et al., 2020. *Naegleria fowleri*: protein structures to facilitate drug discovery for the deadly, pathogenic free-living amoeba. bioRxiv 2020.10.20.327296.

Barth, T., Tjessem, K., Aaberg, A., 1981. Fractionation of polar organic constituents in environmental samples using the lipophilic dextran gels Sephadex LH-20 and Sephasorb HP Ultrafine. Application to a weathered Ekofisk crude oil. J. Chromatogr. A 214, 83–93. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80902-4

Baselga, R., Albizu, I., De la Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B., 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: Implications in colonization and virulence. Infect. Immun. 61, 4857–4862. https://doi.org/10.1128/iai.61.11.4857–4862.1993

Basile, G., Cristofaro, G., Locatello, L.G., Vellere, I., Piccica, M., Bresci, S., Maggiore, G., et al., 2020. Refractory mucocutaneous leishmaniasis resolved with combination treatment based on intravenous pentamidine, oral azole, aerosolized liposomal amphotericin B, and intralesional meglumine antimoniate. Int. J. Infect. Dis. 97, 204–207. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.003

Basmaciyan, L., Azas, N., Casanova, M., 2018. Different apoptosis pathways in Leishmania parasites. Cell Death Discov. 4, 4–6. https://doi.org/10.1038/s41420-018-0092-z

Basmaciyan, L., Casanova, M., 2019. Cell death in *Leishmania*. Parasite 26, 71. https://doi.org/10.1051/parasite/2019071

Basu, S., Ghosh, A., Hazra, B., 2005. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn., and *Lantana camara* Linn.: Isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. Phyther. Res. 19, 888–894. https://doi.org/10.1002/ptr.1752

Bawazir, Y.M., Mustafa, M.A., 2020. Acute Esophageal Necrosis Associated With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Septicemia: A Case Report. Cureus 12. https://doi.org/10.7759/cureus.8720

Belaz, S., 2017. Dérivés furanosidiques à visée thérapeutique dans la leishmaniose : caractérisation des effets et mode d'action. Médecine humaine et pathologie. Université Rennes 1.

Benarba, B., 2016. Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. J. Intercult. Ethnopharmacol. 5, 320–330. https://doi.org/10.5455/jice.20160814115725

Benkhnigue, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A., Douira, A., 2010. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). Acta Bot. Barcinonensia 53, 191–216.

Bennett, M.R., Thomsen, I.P., 2020. Epidemiological and clinical evidence for the role of toxins in *S. aureus* human disease. Toxins (Basel). 12, 1–19. https://doi.org/10.3390/toxins12060408

Berman, J.D., Waddel, D., Hanson, B.D., 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. Antimicrob. Agents Chemother. 27, 916–920. https://doi.org/10.1128/AAC.27.6.916

Bernuci, K.Z., Iwanaga, C.C., Fernandez-Andrade, C.M.M., Lorenzetti, F.B., Torres-Santos, E.C., Faiões, V.D.S., et al., 2016. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. Molecules 21. https://doi.org/10.3390/molecules21121698

Bérubé-Gagnon, J., 2006. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Chimie. Université de Québec.

Bezerra, J.W.A., Coronel, C., Gomez, M.C.V., Rolón, M., Nunez, C. V., da Silva, D.R., da Silva, L.A., et al., 2019. Evaluation of antiparasitary, cytotoxic and antioxidant activity and chemical analysis of Tarenaya spinosa (Jacq.) Raf. (Cleomaceae). South African J. Bot. 124, 546–555. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.025

Bhouri, W., Sghaier, M. Ben, Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Ghedira, L.C., 2011. Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-β-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-β-isorhamninoside. Food Chem. Toxicol. 49, 1167–1173. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.011

Bispo, A.J.B., Almeida, M.L.D., de Almeida, R.P., Neto, J.B., de Oliveira Brito, A.V., França, C.M., 2020. Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation. PLoS One 15, 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228176

Bodhale, N., Ohms, M., Ferreira, C., Mesquita, I., Mukherjee, A., André, S., Sarkar, A., Estaquier, J., Laskay, T., Saha, B., Silvestre, R., 2020. Cytokines and metabolic regulation: A framework of bidirectional influences affecting *Leishmania* infection. Cytokine 155267. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155267

Bohlmann, F., Abraham, W.R., 1981. Aplotaxene epoxide from Cirsium hypoleucum. Phytochemistry 20, 855–856. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85199-0

Bombaça, A.C.S., Viana, P.G., Santos, A.C.C., Silva, T.L., Rodrigues, A.B.M., Guimarães, A.C.R., et al., 2019. Mitochondrial disfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β-lapachone-derived naphthoimidazoles. Free Radic. Biol. Med. 130, 408–418. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.012

Bombaça, A.C.S., Von Dossow, D., Barbosa, J.M.C., Paz, C., Burgos, V., Menna-Barreto, R.F.S., 2018. Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in *Trypanosoma cruzi*. Molecules 23, 1–14. https://doi.org/10.3390/molecules23112800

Borbón, T.Y., Scorza, B.M., Clay, G.M., Nobre de Queiroz, F.L., Sariol, A.J., Bowen, J.L., et al., 2019. Coinfection with *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, 1–27. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007247

Bouasla, A., Bouasla, I., 2017. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. Phytomedicine 36, 68–81. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.007

Bouchiat, C., Moreau, K., Devillard, S., Rasigade, J.P., Mosnier, A., Geissmann, T., et al., 2015. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis versus bacteremia strains: Subtle genetic differences at stake. Infect. Genet. Evol. 36, 524–530. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.029

Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. J. Ethnopharmacol. 148, 395–402. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.082

Boughrara, B., Belgacem, L., 2016. Ethnobotanical study close to the population of the extreme north east of Algeria: The municipalities of El Kala National Park (EKNP). Ind. Crops Prod. 88, 2–7. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.009

Bouhdid, S., Abrini, J., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. J. Appl. Microbiol. 106, 1558–1568. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04124.x

Le Floch E. Boulos, L., 1983. Medicinal plants for North Africa. Reference Publications Inc. 218 St. Clair River Drive, Box 344. Algonac, Michigan 48001. In : Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 31e année, bulletin n°1-2, Janvier-juin 1984. p. 127. https://www.persee.fr/docAsPDF/jatba_01835173_1984_num_31_1_3914_t1_0127_0000_1.pdf

Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. Lancet 392, 951–970. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2

Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. J. Nat. Prod. 67,

2141–2153. https://doi.org/10.1021/np040106y

Butrico, C.E., Cassat, J.E., 2020. Quorum sensing and toxin production in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: Pathogenesis and paradox. Toxins (Basel). 12, 1–22. https://doi.org/10.3390/toxins12080516

Cabanillas Billy, J., 2011. Caractérisation de principes actifs antileishmaniens isolés de Piperaceae et Zingiberaceae médicinales péruviennes. Science de la matiére. Université Paul Sabatier Toulouse III.

Cabrera-Serra, M.G., Lorenzo-Morales, J., Romero, M., Valladares, B., Piñero, J.E., 2007. *In vitro* activity of perifosine: A novel alkylphospholipid against the promastigote stage of Leishmania species. Parasitol. Res. 100, 1155–1157. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0408-4

Cao, F., Peng, W., Li, X., Liu, M., Li, B., Qin, R., Jiang, W., Cen, Y., Pan, X., Yan, Z., Xiao, K., Zhou, H., 2015. Emodin is identified as the active component of ether extracts from Rhizoma Polygoni Cuspidati, for anti-MRSA activity. Can. J. Physiol. Pharmacol. 93, 1–9. https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0465

Capewell, L.G., Harris, A.M., Yoder, J.S., Cope, J.R., Eddy, B.A., Roy, S.L., Visvesvara, G.S., Fox, L.A.M., Beach, M.J., 2015. Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. J. Pediatric Infect. Dis. Soc. 4, 68–75. https://doi.org/10.1093/jpids/piu103

Cartuche, L., Sifaoui, I., Cruz, D., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Javier Fernández, J., Díaz-Marrero, A.R., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2019. Staurosporine from *Streptomyces sanyensis* activates Programmed Cell Death in *Acanthamoeba* via the mitochondrial pathway and presents low in vitro cytotoxicity levels in a macrophage cell line. Sci. Rep. 9, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48261-7

Cartuche, L., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Bethencourt-Estrella, C.J., Nicolás-Hernández, D.S., Lorenzo-Morales, J., Piñero, J.E., Díaz-Marrero, A.R., Fernández, J.J., 2020. Antikinetoplastid activity of indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis*. Biomolecules 10, 1–14. https://doi.org/10.3390/biom10040657

Cavero, R.Y., Calvo, M.I., 2015. Medicinal plants used for musculoskeletal disorders in Navarra and their pharmacological validation. J. Ethnopharmacol. 168, 255–259. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.078

CDC, 2019. Antibiotic resistance threats in the United states, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532.

Chaachouay, N., Benkhnigue, O., Zidane, L., 2020. Ethnobotanical Study Aimed at Investigating the Use of Medicinal Plants to Treat Nervous System Diseases in the Rif of Morocco. J. Chiropr. Med. 19, 70–81. https://doi.org/10.1016/j.jcm.2020.02.004

Chabán, M.F., Karagianni, C., Joray, M.B., Toumpa, D., Sola, C., Crespo, M.I., Palacios, S.M., Athanassopoulos, C.M., Carpinella, M.C., 2019. Antibacterial effects of extracts obtained from plants of Argentina: Bioguided isolation of compounds from the anti-infectious medicinal plant *Lepechinia meyenii*. J. Ethnopharmacol. 239, 111930. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111930

Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., Wagstaff, C., 2013. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. Int. J. Mol. Sci. 14, 12780–12805. https://doi.org/10.3390/ijms140612780

Chakraborty, A.K., Majumder, H.K., 1988. Mode of action of pentavalent antimonials: Specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152, 605–611. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80081-0

Chakravarty, J., Sundar, S., 2019. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. Expert Opin. Pharmacother. 20, 1251–1265. https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940

Chalothorn, T., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Pannara, S., Tansakul, C., 2019. Synthesis and antibacterial activity of emodin and its derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Tetrahedron Lett. 60, 151004. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151004

Chanyalew, M., Abebe, M., Endale, B., Girma, S., Tasew, G., van Zandbergen, G., Ritter, U., Gadisa, E., Aseffa, A., Laskay, T., 2020. Enhanced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines in Ethiopian cutaneous leishmaniasis upon exposure to *Leishmania aethiopica*. Cytokine 155289. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155289

Chaparro, V., Leroux, L.-P., Zimmermann, A., Jardim, A., Johnston, B., Descoteaux, A., Jaramillo, M., 2019. *Leishmania donovani* Lipophosphoglycan Increases Macrophage-Dependent Chemotaxis of CXCR6-Expressing Cells via CXCL16 Induction. Infect. Immun. 87, 1–14.

Chaplin, S., 2020. NICE on antimicrobial prescribing for impetigo. Prescriber 31, 24–26. https://doi.org/10.1002/psb.1850

Chatelain, E., Ioset, J.R., 2011. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. Drug Des. Devel. Ther. 175–181. https://doi.org/10.2147/DDDT.S16381

Chermat, S., Gharzouli, R., 2015. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdimm (Setif). J. Mater. Sci. Eng. A 5, 50–59. https://doi.org/10.17265/2161-6213/2015.1-2.007

Chiang, T.C., Huang, M.S., Lu, P.L., Huang, S. Te, Lin, Y.C., 2020. The effect of oral care intervention on pneumonia hospitalization, *Staphylococcus aureus* distribution, and salivary bacterial concentration in Taiwan nursing home residents: A pilot study. BMC Infect. Dis. 20, 1–11. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05061-z

Chiquero, M.J., Pérez-Victoria, J.M., O'Valle, F., González-Ros, J.M., Del Moral, R.G., Ferragut, J.A., Castanys, S., Gamarro, F., 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant Leishmania tropica line. Biochem. Pharmacol. 55, 131–139. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00385-7

Choma, I.M., Grzelak, E.M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. J. Chromatogr. A 1218, 2684–2691. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069

Chomba, M., Mucheleng'anga, L.A., Fwoloshi, S., Ngulube, J., Mutengo, M.M., 2017. A case report: Primary amoebic meningoencephalitis in a young Zambian adult. BMC Infect. Dis. 17, 1–5. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2638-8

Chow, A., Htun, H.L., Hon, P.Y., Ang, B., Kanagasabai, K., Koh, J., Holden, M.T.G., Hsu, L.Y., 2020. Comparative epidemiology and factors associated with major healthcare-

associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among interconnected acute-, intermediate- and long-term healthcare facilities in Singapore. Clin. Microbiol. Infect. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.034

Christopher, R., Mgani, Q.A., Nyandoro, S.S., Rousseau, A.L., Isaacs, M., Hoppe, H.C., 2020. A new indole alkaloid and other constituents from Monodora minor and Uvaria tanzaniae: their antitrypanosomal and antiplasmodial evaluation. Nat. Prod. Res.1–8. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1710705

Chukwujekwu, J.C., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., van Staden, J., 2006. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of Cassia occidentalis. South African J. Bot. 72, 295–297. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.08.003

CLSI, 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, *10th* ed., CLSI document M07-A10, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

CLSI, 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, *8th* ed., CLSI document M07-A8, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Cohen, B.E., 2016. The role of signaling via aqueous pore formation in resistance responses to amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 5122–5129. https://doi.org/10.1128/AAC.00878-16

Cojean, S., Nicolas, V., Moal, V.L. Le, 2020. The macrophage microtubule network acts as a key cellular controller of the intracellular fate of leishmania infantum. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, 1–28. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008396

Colombo, V., Giacomelli, A., Casazza, G., Galimberti, L., Bonazzetti, C., Sabaini, F., Ridolfo, A.L., Antinori, S., 2021. *Trypanosoma cruzi* infection in Latin American pregnant women living outside endemic countries and frequency of congenital transmission: a systematic review and meta-analysis. J. Travel Med. 28. https://doi.org/10.1093/jtm/taaa170

Comai, G., Mistral De Pascali, A., Busutti, M., Morini, S., Ortalli, M., Conte, D., Re, M.C., La Manna, G., Varani, S., 2020. Screening strategies for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania* infection in dialysis patients as a model for kidney transplant candidates. J. Nephrol. 1–5. https://doi.org/10.1007/s40620-020-00705-4

Conradt, B., 2009. Genetic control of programmed cell death during animal development. Annu. Rev. Genet. 43, 493–523. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091533

Cooper, A.M., Aouthmany, S., Shah, K., Rega, P.P., 2019. Killer amoebas: Primary amoebic meningoencephalitis in a changing climate. J. Am. Acad. Physician Assist. 32, 30–35. https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000558238.99250.4a

Coulerie, P., 2012. Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Chimie thérapeutique. Université de la Nouvelle-Calédonie.

Crentsil, J.A., Yamthe, L.R.T., Anibea, B.Z., Broni, E., Kwofie, S.K., Tetteh, J.K.A., Osei-Safo, D., 2020. Leishmanicidal Potential of Hardwickiic Acid Isolated From *Croton sylvaticus*. Front. Pharmacol. 11, 1–15. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00753

Crupi, R., Gugliandolo, E., Siracusa, R., Impellizzeri, D., Cordaro, M., Di Paola, R., Britti, D., Cuzzocrea, S., 2020. N-acetyl-L-cysteine reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in BALB/c mice. BMC Vet. Res. 16, 1–12. https://doi.org/10.1186/s12917-020-2234-9

Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H., 1995. Trypanothione Reductase from *Leishmania donovani* Purification, Characterisation and Inhibition by Trivalent Antimonials. Eur. J. Biochem. 230, 460–468. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20583.x

Cuoco, G., Mathe, C., Vieillescazes, C., 2014. Liquid chromatographic analysis of flavonol compounds in green fruits of three *Rhamnus* species used in Stil de grain. Microchem. J. 115, 130–137. https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.03.006

Da Silva, B.J.M., Da Silva, R.R.P., Rodrigues, A.P.D., Farias, L.H.S., Do Nascimento, J.L.M., Silva, E.O., 2016. Physalis angulata induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. Micron 82, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.12.001

Da Silva, L.A.L., De Moraes, M.H., Scotti, M.T., Scotti, L., De Jesus Souza, R., Nantchouang Ouete, J.L., Biavatti, M.W., Steindel, M., Sandjo, L.P., 2019. Antiprotozoal investigation of 20 plant metabolites on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* amastigotes. Atalantoflavone alters the mitochondrial membrane potential. Parasitology 146, 849–856. https://doi.org/10.1017/S0031182019000052

Danino, O., Gottlieb, H.E., Grossman, S., Bergman, M., 2009. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. Food Res. Int. 42, 1273–1280. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.023

Daoudi, A., Lamiae, B., Mohamed, B., Jamal, I., Laila, N., 2015. Etude Ethnobotanique Au Moyen Atlas Central. Eur. Sci. J. 11, 226–242.

Das, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. J. Med. Plants Res. 4, 104–111. https://doi.org/10.5897/JMPR09.030

de Jesus, S.M., Pinto, L., de Lima Moreira, F., Nardotto, G.H.B., Cristofoletti, R., Perin, L., da Silva Fonseca, K., Barbêdo, P., Bandeira, L.C., de Abreu Vieira, P.M., Carneiro, C.M., 2021. Pharmacokinetics of benznidazole in experimental chronic chagas disease using the swiss mouse-berenice-78 *Trypanosoma cruzi* strain model. Antimicrob. Agents Chemother. 65. https://doi.org/10.1128/AAC.01383-20

De Jonckheere, J.F., 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri.* Infect. Genet. Evol. 11, 1520–1528. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.023

de Souza, M.L., Gonzaga da Costa, L.A., Silva, E. de O., de Sousa, A.L.M.D., dos Santos, W.M., Rolim Neto, P.J., 2020. Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. Drug Dev. Res. 81, 803–814. https://doi.org/10.1002/ddr.21684

De Toledo, J.S., Ambrósio, S.R., Borges, C.H.G., Manfrim, V., Cerri, D.G., Cruz, A.K., Da Costa, F.B., 2014. In Vitro leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. Molecules 19, 6070–6079. https://doi.org/10.3390/molecules19056070

Del Giudice, P., 2020. Skin infections caused by *Staphylococcus aureus*. Acta Derm. Venereol. 100, 208–215. https://doi.org/10.2340/00015555-3466

Delekta, P.C., Shook, J.C., Lydic, T.A., Mulks, M.H., 2018. *Staphylococcus aureus* utilizes host-derived lipoprotein particles as sources of fatty acids. J Bacteriol 200:e00728-17. https://doi.org/10.1128/JB.00728-17.

Demmak, R.G., Bordage, S., Bensegueni, A., Boutaghane, N., Hennebelle, T., Mokrani, E.H., Sahpaz, S., 2019. Chemical constituents from solenostemma argel and their cholinesterase inhibitory activity. Nat. Prod. Sci. 25, 115–121. https://doi.org/10.20307/nps.2019.25.2.115

Den Boer, M., Das, A.K., Akhter, F., Burza, S., Ramesh, V., Ahmed, B.N., Zijlstra, E.E., Ritmeijer, K., 2018. Safety and Effectiveness of Short-Course AmBisome in the Treatment of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Prospective Cohort Study in Bangladesh. Clin. Infect. Dis. 67, 667–675. https://doi.org/10.1093/cid/ciy172

Deponte, M., 2008. Programmed cell death in protists. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1783, 1396–1405. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.018

Di, X., Wang, X., Liu, Y., 2015. Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. J. Pharm. Biomed. Anal. 115, 144–149. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.027

Diaz, R., Afreixo, V., Ramalheira, E., Rodrigues, C., Gago, B., 2017. Evaluation of vancomycin MIC creep in methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections-a systematic review and meta-analysis. Clin. Microbiol. Infect. 24, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.017

Diep, B.A., Chan, L., Tattevin, P., Kajikawa, O., Martin, T.R., Basuino, L., et al., 2010. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 5587–5592. https://doi.org/10.1073/pnas.0912403107

Direction Générale des Collectivité Locales (DGCL), 2015. Monographie générale, Région de Fès-Meknès. http://www.pncl.gov.ma/fr/LesCollectivit%C3%A9sterritoriales/LaR%C3%A9gion/Pages/Monographie-des-r%C3%A9gions-.aspx

Djidel, S., Khennouf, S., Baghiani, A., Harzallah, D., Arrar, L., 2010. Medicinal plants used traditionally in the algerian folk medicine for gastrointestinal disorders and hypertension: Total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. Acta Hortic. 854, 59–66. https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.854.6

Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., Huyiligequi, Ni, J., 2016. Emodin: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. Phyther. Res. 30, 1207–1218. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173124

Đukanović, S., Cvetković, S., Lončarević, B., Lješević, M., Nikolić, B., Simin, N., Bekvalac, K., Kekić, D., Mitić-Ćulafić, D., 2020. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of *Frangula alnus* bark ethyl-acetate extract. Ind. Crops Prod. 158. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113013

Duployez, C., Guern, R. Le, Tinez, C., Lejeune, A., Robriquet, L., Six, S., Loïez, C., Wallet, F., 2020. Panton-Valentine Leukocidin–Secreting. Emerg. Infect. Dis. 26, 1939–1941.

El Aou-Ouad, H., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., Medrano, H., Gulías, J., 2015. Trade-offs between seedling growth, plant respiration and water-use efficiency in two Mediterranean shrubs *Rhamnus alaternus* and *Rhamnus ludovici-salvatoris*. Photosynthetica 53, 537–546. https://doi.org/10.1007/s11099-015-0141-2

El Meskaoui A. et al, 2008. Plantes médicinales et aromatiques marocaines: opportunités et défis. Rev. AFN Maroc 74–87. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12943184.v1

ElAmri, J., ELBadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., Alaoui, T.E., 2014. Ethnobotanical study of medicinal plants in the region El Hajeb (central Morocco). J. Res. Biol. 4, 1568–1580.

Elia, J., 2019. Fractionnement bioguidé de *Laurencia papillosa* de la côte libanaise : identification du cholest-4-èn-3-one, un nouvel agoniste de LXR cytotoxique pour les cellules du cancer du sein. Sciences de la Mer et du littoral. Université de Nantes.

Elisabeth, M.H., 2014. Identification des Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* capables d'activer les mastocytes humains cutanés.Biologie médicale. Université de Claude Bernard - Lyon 1.

Elyebdri, N., Boumediou, A., Addoun, S., 2017. Ethnobotanical Study on the Usage of Toxic Plants in Traditional Medicine in the City Center of Tlemcen ,. Int. Sch. Sci. Res. Innov. 11, 642–646.

Endris, M., Takele, Y., Woldeyohannes, D., Tiruneh, M., Mohammed, R., Moges, F., et al., 2014. Bacterial sepsis in patients with visceral leishmaniasis in Northwest Ethiopia. Biomed Res. Int. vol 2014, 1–7 https://doi.org/10.1155/2014/361058

Esfandiari, F., Motazedian, M.H., Asgari, Q., Morowvat, M.H., Molaei, M., Heli, H., 2019. Erratum: Paromomycin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and targeted drug delivery against leishmaniasis. Acta Trop. 197, 105072. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105072

Estevez, Y., 2009. Activité leishmanicide de plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Péruvienne et de molécules de synthèse; étude relation structure activité. Sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier - Toulouse III.

EUR-RC, 2011. European strategic action plan on antibiotic resistance. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf

Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. Environ. Health Perspect. 109, 69. https://doi.org/10.2307/3434847

Fadel, H., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., Hajaji, S., Chiboub, O., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Lorenzo-Morales, J., Benayache, S., Piñero, J.E., 2018. Assessment of the antiprotozoal activity of *Pulicaria inuloides* extracts, an Algerian medicinal plant: leishmanicidal bioguided fractionation. Parasitol. Res. 117, 531–537. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5731-4

Falcão-Silva, V.S., Silva, D.A., Souza, M. de F. V., Siqueira-Junior, J.P., 2009. Modulation of Drug Resistance in Staphylococcus aureus by a Kaempferol Glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae) 1367. Phyther. Res. 23, 1367–1370. https://doi.org/10.1002/ptr

Falugi, F., Kim, H.K., Missiakas, D.M., Schneewind, O., 2013. Role of protein a in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. MBio 4, 1–9.

https://doi.org/10.1128/mBio.00575-13

Farhi, M., Marhevka, E., Ben-Ari, J., Algamas-Dimantov, A., Liang, Z., Zeevi, V., Edelbaum, O., Spitzer-Rimon, B., Abeliovich, H., Schwartz, B., Tzfira, T., Vainstein, A., 2011. Generation of the potent anti-malarial drug artemisinin in tobacco. Nat. Biotechnol. 29, 1072–1074. https://doi.org/10.1038/nbt.2054

Florencio, M., Tomás Nery, E., Rosa, D., Auxiliadora Nascimento Ribeiro, T., de Brito Braz Moraes, J., Araujo Zuma, A., et al., 2020. The effect of the biflavonoid 2″,3″-dihydroochnaflavone on *Trypanosoma cruzi* Y strain. Parasitol. Int. 79, 102180. https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102180

Flores-Huerta, N., Sánchez-Monroy, V., Rodríguez, M.A., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., 2020. A comparative study of the membrane proteins from *Naegleria* species: A 23-kDa protein participates in the virulence of *Naegleria fowleri*. Eur. J. Protistol. 72, 125640. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2019.125640

Flores, N., Jiménez, I.A., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., Bazzocchi, I.L., 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. Phytochemistry 70, 621–627. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.03.010

Flores, N., Ticona, J.C., Bilbao-Ramos, P., Dea-Ayuela, M.A., Ruiz Macedo, J.C., Bazzocchi, I.L., Bolás-Fernández, F., Jiménez, I.A., 2019. An unprecedented chlorine-containing piperamide from *Piper pseudoarboreum* as potential leishmanicidal agent. Fitoterapia 134, 340–345. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.004

Fonseca-Silva, F., Inacio, J.D.F., Canto-Cavalheiro, M.M., Almeida-Amaral, E.E., 2011. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PLoS One 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666

Fowler, M., Carter, R.F., 1965. Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: A Preliminary Report. Br. Med. J. 2, 734–742. https://doi.org/10.1136/bmj.2.5464.734-a

Freeman-Cook, L., Cook, K.F., 2006. *Staphylococcus aureus* infections, In : Deadly Diseases and Epidemics. Chelsea House Publishers-182 pp.

Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R.R., 2009. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. Molecules 14, 2317–2336. https://doi.org/10.3390/molecules14072317

Fumarola, L., Spinelli, R., Brandonisio, O., 2004. In vitro assays for evaluation of drug activity against Leishmania spp. Res. Microbiol. 155, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.001

Gajdács, M., 2019. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 8. https://doi.org/10.3390/antibiotics8020052

Galea, A.M., Brown, A.J., 2009. Special relationship between sterols and oxygen: Were sterols an adaptation to aerobic life? Free Radic. Biol. Med. 47, 880–889. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.027

Gannavaram, S., Debrabant, A., 2012. Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2, 95. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00095

Garg, G., Ali, V., Singh, K., Gupta, P., Ganguly, A., Sahasrabuddhe, A.A., Das, P., 2019. Quantitative secretome analysis unravels new secreted proteins in Amphotericin B resistant *Leishmania donovani*. J. Proteomics 207, 103464. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103464

Gedda, M.R., Singh, B., Kumar, D., Singh, A.K., Madhukar, P., Upadhyay, S., Singh, O.P., Sundar, S., 2020. Post kala-azar dermal leishmaniasis: A threat to elimination program. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, 1–25. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008221

Gershell, L.J., Atkins, J.H., 2003. A brief history of novel drug discovery technologies. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 321–327. https://doi.org/10.1038/nrd1064

Gomes, F.J., Pedreira, C.G.S., Bosi, C., Cavalli, J., Holschuch, S.G., Mourão, G.B., Pereira, D.H., Pedreira, B.C., 2019. Shading effects on marandu palisadegrass in a silvopastoral system: Plant morphological and physiological responses. Agron. J. 111, 2332–2340. https://doi.org/10.2134/agronj2019.01.0052

Gómez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., Prince, A., 2004. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat. Med. 10, 842–848. https://doi.org/10.1038/nm1079

Gontijo, V.S., Judice, W.A.S., Codonho, B., Pereira, I.O., Assis, D.M., Januário, J.P., et al., 2012. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. Eur. J. Med. Chem. 58, 613–623. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.021

Gonzalez, C.D., Ledo, C., Cela, E., Stella, I., Xu, C., Ojeda, D.S., Frenette, P.S., Gómez, M.I., 2019. The good side of inflammation: *Staphylococcus aureus* proteins SpA and Sbi contribute to proper abscess formation and wound healing during skin and soft tissue infections. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1865, 2657–2670. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.004

Goswick, S.M., Brenner, G.M., 2003. Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri in vitro* and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. J. Parasitol. 89, 837–842. https://doi.org/10.1645/GE-87R

Goyal, V., Das, V.N.R., Singh, S.N., Singh, R.S., Pandey, K., Verma, N., et al., 2020. Long-term incidence of relapse and post-kala-azar dermal leishmaniasis after three different visceral leishmaniasis treatment regimens in Bihar, India. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008429

Grace, E., Asbill, S., Virga, K., 2015. *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6677–6681. https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1571904

Grande, M., Piera, F., Cuenca, A., 1985. Flavonoids from *Inula viscosa*. Planta Med. NO. 5, 414–919. https://doi.org/10.1055/s-2007-969536

Grecco, S. dos S., Reimão, J.Q., Tempone, A.G., Sartorelli, P., Cunha, R.L.O.R., Romoff, P., Ferreira, M.J.P., Fávero, O.A., Lago, J.H.G., 2012. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). Exp. Parasitol. 130, 141–145. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.002

Grillo, S., Cuervo, G., Carratalà, J., Grau, I., Llaberia, M., Aguado, J.M., et al., 2020. Characteristics and outcomes of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection

originating from the urinary tract: A multicenter cohort study. Open Forum Infect. Dis. 7, 1–8. https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa216

Grousd, J.A., Rich, H.E., Alcorn, J.F., 2019. Host-pathogen interactions in Gram-positive bacterial pneumonia. Clin. Microbiol. Rev. 32, 1–22. https://doi.org/10.1128/CMR.00107-18

Guidi, A.C., de Paula, M.N., Mosela, M., Delanora, L.A., Soares, G.C.A., de Morais, G.R., et al., 2020. Stem bark extract of *Poincianella pluviosa* incorporated in polymer film: Evaluation of wound healing and anti-staphylococcal activities. Injury 51, 840–849. https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.02.027

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y., 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 1–11. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107

Gurel, M.S., Tekin, B., Uzun, S., 2020. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. Clin. Dermatol. 38, 140–151. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.10.008

Hajaji, S., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Valladares, B., Akkari, H., Lorenzo-Morales, J., Piñero, J.E., 2018. Leishmanicidal activity of α-bisabolol from Tunisian chamomile essential oil. Parasitol. Res. 117, 2855–2867. https://doi.org/10.1007/s00436-018-5975-7

HCP, 2019. Direction Régionale Fès-Meknès, Annuaire statistique régional . https://www.hcp.ma/region-fes/Annuaires-et-Monographies_r2.html

Helel, K. Ben, Rejeb, M. Ben, Habboul, Z., Khattat, N., Mejaouel, H., Said-Latiri, H., Kaabi, B., Zhioua, E., 2017. Risk factors for mortality of children with zoonotic visceral leishmaniasis in Central Tunisia. PLoS One 12, 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189725

Henker, L.C., Cruz, R.A.S. da, Silva, F.S. da, Driemeier, D., Sonne, L., Uzal, F.A., Pavarini, S.P., 2019. Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in cattle in southern brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 28, 514–517. https://doi.org/10.1590/s1984-29612019021

Henz Ryen, A., Göls, T., Steinmetz, J., Tahir, A., Jakobsson, P.J., Backlund, A., Urban, E., Glasl, S., 2020. Bisabolane sesquiterpenes from the leaves of *Lindera benzoin* reduce prostaglandin E2 formation in A549 cells. Phytochem. Lett. 38, 6–11. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.04.015

Hermoso, A., Jiménez, I.A., Mamani, Z.A., Bazzocchi, I.L., Piñero, J.E., Ravelo, A.G., Valladares, B., 2003. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. Bioorganic Med. Chem. 11, 3975–3980. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00406-1

Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Ríos, J.L., 2007. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. Life Sci. 81, 480–488. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.006

Herrera-Acevedo, C., Dos Santos Maia, M., Cavalcanti, É.B.V.S., Coy-Barrera, E., Scotti, L., Scotti, M.T., 2020. Selection of antileishmanial sesquiterpene lactones from SistematX database using a combined ligand-/structure-based virtual screening approach. Mol. Divers. https://doi.org/10.1007/s11030-020-10139-6

Hide, M., 2004. Variabilité pathogénique du complexe *Leishmania (Leishmania) donovani*, agent de la leishmaniose viscérale. Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et d'expression génique. Parasitologie. Université de Montpellier 2.

Hiron, A., 2007. Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Microbiologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement de Paris.

Hmamouch, A., El Alem, M.M., Hakkour, M., Amarir, F., Daghbach, H., Habbari, K., Fellah, H., Bekhti, K., Sebti, F., 2017. Circulating species of *Leishmania* at microclimate area of Boulemane Province, Morocco: impact of environmental and human factors. Parasites and Vectors 10, 1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2032-9

Hmamouch, A., 2017. Etude epidémiologique et moléculaire de leishmaniose cutanée au niveau de la région Fés-Meknés. Biotechnologie. Université Sidi Mohamed Ben Abdelah.

Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., Fraunholz, M., 2017. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. Int. J. Med. Microbiol. 308, 607–624. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009

Hou, X., Wei, W., Fan, Y., Zhang, J., Zhu, N., Hong, H., Wang, C., 2017. Study on synthesis and bioactivity of biotinylated emodin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 5259–5266. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8243-3

Huang, J., Zhang, T., Zou, X., Wu, S., Zhu, J., 2020. Panton-valentine leucocidin carrying *Staphylococcus aureus* causing necrotizing pneumonia inactivates the JAK/STAT signaling pathway and increases the expression of inflammatory cytokines, Infection, Genetics and Evolution. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104582

Ibarra-Meneses, A. V., Moreno, J., Carrillo, E., 2020. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. Trends Parasitol. 36, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.005

Ismail, H., Govender, N.P., Singh-Moodley, A., Van Schalkwyk, E., Shuping, L., Moema, I., et al., 2020. An outbreak of cutaneous abscesses caused by Panton-Valentine leukocidin-producing methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* among gold mine workers, South Africa. BMC Infect. Dis. 20, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05352-5

Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2, 72. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072

Iwi, M.M., Wootton, J., 2002. Ethnomedicine and Drug Discovery vol 1, *1 st* ed., In : Advances in Phytomedicine 1. Elsevier, 344 pp.

Izhaki, I., Tsahar, E., Paluy, I., Friedman, J., 2002. Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. New Phytol. 156, 217–223. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00515.x

Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. e. A., Tahir, I.M., Akram, M., Ali Shah, S.M., Zulfqar, A., Zainab, R., 2020. *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13192

Jaradat, N.A., Ayesh, O.I., Anderson, C., 2016. Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine. J. Ethnopharmacol. 182, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.013

Jenul, C., Horswill, A.R., 2019. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. Microbiol. Spectr. 7. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018

Jesus-Santos, F.H., Lobo-Silva, J., Ramos, P.I.P., Descoteaux, A., Lima, J.B., Borges, V.M., Farias, L.P., 2020. LPG2 Gene Duplication in *Leishmania infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 1–11. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00408

Ji, X., Liu, X., Peng, Y., Zhan, R., Xu, H., Ge, X., 2017. Comparative analysis of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* exposed to emodin based on proteomic profiling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 494, 318–324. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.033

Joshi, D.C., Bakowska, J.C., 2011. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. J. Vis. Exp. 2–5. https://doi.org/10.3791/2704

Joshi, P.B., Kelly, B.L., Kamhawi, S., Sacks, D.L., McMaster, W.R., 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. Mol. Biochem. Parasitol. 120, 33–40. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00432-7

Josse, J., Laurent, F., Diot, A., 2017. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. Front. Microbiol. 8, 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02433

Juárez-Vázquez, M. del C., A. Siordia-Reyes, G., Z. Pérez-González, M., A. Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M.V., et al., 2020. Leishmanicidal and anti-inflammatory activities of Lupeol Acetate isolated from *Cnidoscolus tehuacanensis* Breckon. Med. Aromat. Plants 9, 1–11. https://doi.org/10.35248/2167-0412.20.9.347

Kemegne, G.A., Mkounga, P., Essia Ngang, J.J., Sado Kamdem, S.L., Nkengfack, A.E., 2017. Antimicrobial structure activity relationship of five anthraquinones of emodine type isolated from *Vismia laurentii*. BMC Microbiol. 17, 1–8. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0954-1

Khan, M., Ali, M., Shah, W., Shah, A., Yasinzai, M.M., 2019. Curcumin-loaded self-emulsifying drug delivery system (cu-SEDDS): a promising approach for the control of primary pathogen and secondary bacterial infections in cutaneous leishmaniasis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103, 7481–7490. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09990-x

Kheyar-Kraouche, N., da Silva, A.B., Serra, A.T., Bedjou, F., Bronze, M.R., 2018. Characterization by liquid chromatography–mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. J. Pharm. Biomed. Anal. 156, 297–306. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.047

Khoshnood, S., Heidary, M., Asadi, A., Soleimani, S., Motahar, M., Savari, M., Saki, M., Abdi, M., 2019. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. Biomed. Pharmacother. 109, 1809–1818. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.131

Kielian, T., Mayes, P., Kielian, M., 2002. Characterization of microglial responses to Staphylococcus aureus: Effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. J. Neuroimmunol. 130, 86–99. https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00216-3

Kloehn, J., Saunders, E.C., O'Callaghan, S., Dagley, M.J., McConville, M.J., 2015. Characterization of Metabolically Quiescent *Leishmania* Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. PLoS Pathog. 11, 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004683

Kobayashi, S.D., Malachowa, N., Deleo, F.R., 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. Am. J. Pathol. 185, 1518–1527. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030

Kok, E.Y., Vallejo, J.G., Sommer, L.M., Rosas, L., Kaplan, S.L., Hulten, K.G., Chase McNeil, J., 2018. Association of vancomycin mic and molecular characteristics with clinical outcomes in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* acute hematogenous osteoarticular infections in children. Antimicrob. Agents Chemother. 62. https://doi.org/10.1128/AAC.00084-18

Kosaka, A., Sakamoto, N., Hikone, M., Imai, K., Ota, M., Washino, T., Maeda, T., Iwabuchi, S., 2020. Failure of Liposomal-amphotericin B Treatment for New World Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. Intern. Med. 59, 1227–1230. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.4096-19

Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., Zovko Končić, M., 2013. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. Food Chem. 136, 335–341. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.026

Kostić, A., Janaćković, P., Kolašinac, S.M., Dajić Stevanović, Z.P., 2020. Balkans' Asteraceae Species as a Source of Biologically Active Compounds for the Pharmaceutical and Food Industry. Chem. Biodivers. 17, 1–37. https://doi.org/10.1002/cbdv.202000097

Kubinyi, H., 1979. Lipophilicity and drug activity., Progress in Drug Research. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7105-1_5

Kumar, A., Saha, B., Singh, S., 2017. Dataset generated for Dissection of mechanisms of Trypanothione Reductase and Tryparedoxin Peroxidase through dynamic network analysis and simulations in leishmaniasis. Data Br. 15, 757–769. https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.10.031

Kumar Singh, P., Gorain, B., Choudhury, H., Kumar Singh, S., Whadwa, P., Shilpa, Sahu, S., Gulati, M., Kesharwani, P., 2020. Macrophage targeted amphotericin B nanodelivery systems against visceral leishmaniasis. Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol. 258, 114571. https://doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114571

Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M., Hseini, S., 2009. Catalogue Des Plantes Medicinales Utilisées Dans La Région De Zaër (Maroc Occidental). Lejeunia, Rev. Bot. 186, 1–27.

Lai, C.C., Lee, C.M., Chiang, H.T., Lu, M.C., Wang, L.F., Tsai, T.L., Kang, M.Y., Jan, Y.N., Lo, Y.T., Ko, W.C., Tseng, S.H., Hsueh, P.R., 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 45 with high rates of ciprofloxacin and tetracycline resistance in the residents and environments of long-term care facilities in Taiwan. J.

Infect. 76, 305–307. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.11.003

Lama-Muñoz, A., Contreras, M. del M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E., 2020. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. Food Chem. 320, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626

Landrum, M.L., Neumann, C., Cook, C., Chukwuma, U., Ellis, M.W., Hospenthal, D.R., Murray, C.K., 2012. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US Military Health System, 2005-2010. JAMA - J. Am. Med. Assoc. 308, 50–59. https://doi.org/10.1001/jama.2012.7139

Laniado-Laborín, R., Cabrales-Vargas, M.N., 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev. Iberoam. Micol. 26, 223–227. https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003

Lanza, J.S., Pomel, S., Loiseau, P.M., Frézard, F., 2019. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniases. Expert Opin. Drug Deliv. 16, 1063–1079. https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1659243

Laranjeira-Silva, M.F., Hamza, I., Pérez-Victoria, J.M., 2020. Iron and Heme Metabolism at the Leishmania–Host Interface. Trends Parasitol. 36, 279–289. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.010

Lawrence, H.S., Nopper, A.J., 2012. Superficial Bacterial Skin Infections and Cellulitis, *4th* ed., In : Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases Part II. Elsevier Inc, pp. 427-435. https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2702-9.00070-2

Le Rutte, E.A., Zijlstra, E.E., de Vlas, S.J., 2019. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis as a Reservoir for Visceral Leishmaniasis Transmission. Trends Parasitol. 35, 590–592. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.007

Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., Nakhasi, H.L., 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. Cell Death Differ. 9, 53–64. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400952

Lee, Y.S., Kang, O.H., Choi, J.G., Oh, Y.C., Keum, J.H., Kim, S.B., Jeong, G.S., Kim, Y.C., Shin, D.W., Kwon, D.Y., 2010. Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharm. Biol. 48, 1285–1290. https://doi.org/10.3109/13880201003770150

Leemans, J.C., Heikens, M., Van Kessel, K.P.M., Florquin, S., Van der Poll, T., 2003. Lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 950–953. https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.950-953.2003

Lehman, M.K., Nuxoll, A.S., Yamada, K.J., Kielian, T., Carson, S.D., Fey, P.D., 2019. Protease-Mediated Growth of *Staphylococcus aureus* on Host Proteins Is opp3 Dependent. MBio 10, 1–17.

Leite, A.C., Neto, A.P., Ambrozin, A.R.P., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., da Silva, M.F. da. G.F., de Albuquerque, S., 2010. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from myrsinaceae and meliaceae active plant extracts. Brazilian J. Pharmacogn. 20, 1–6. https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010000100002

Lentini, F., 2000. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. Fitoterapia 71, 83–88. https://doi.org/10.1016/S0367-

326X(00)00179-9

León, B., López-Bravo, M., Ardavín, C., 2007. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. Immunity 26, 519–531. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017

Li, H., Yang, T., Zhou, H., Du, J., Zhu, B., Sun, Z., 2017. Emodin combined with nanosilver inhibited sepsis by anti-inflammatory protection. Front. Pharmacol. 7. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00536

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., Wu, H., 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiol. Biochem. 148, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006

Li, Y., Kong, D., Lin, X., Xie, Z., Bai, M., Huang, S., Nian, H., Wu, H., 2016. Quality Evaluation for Essential Oil of *Cinnamomum verum* Leaves at Different Growth Stages Based on GC–MS, FTIR and Microscopy. Food Anal. Methods 9, 202–212. https://doi.org/10.1007/s12161-015-0187-6

Lima, J.B., Araújo-Santos, T., Lázaro-Souza, M., Carneiro, A.B., Ibraim, I.C., Jesus-Santos, F.H., Luz, N.F., Pontes, S.D.M., Entringer, P.F., Descoteaux, A., Bozza, P.T., Soares, R.P., Borges, V.M., 2017. *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR-γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. Sci. Rep. 7, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14229-8

Lipinska, U., Hermans, K., Meulemans, L., Dumitrescu, O., Badiou, C., Duchateau, L., Haesebrouck, F., Etienne, J., Lina, G., 2011. Panton-Valentine leukocidin does play a role in the early stage of *Staphylococcus aureus* skin infections: A rabbit model. PLoS One 6, 4–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022864

Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., Sacks, D., 1999. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala- azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. J. Infect. Dis. 180, 564–567. https://doi.org/10.1086/314896

Liu, K., Tomi, F., 2008. La RMN du carbone-13, outil d'analyse . Etude phytochimique de *Clinipodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica*. Chimie. Université de Corse.

Liu, M., Peng, W., Qin, R., Yan, Z., Cen, Y., Zheng, X., Pan, X., Jiang, W., Li, B., Li, X., Zhou, H., 2015. The direct anti-MRSA effect of emodin via damaging cell membrane. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 7699–7709. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6657-3

Longo, L., Vasapollo, G., Rescio, L., 2005. Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. J. Agric. Food Chem. 53, 1723–1727. https://doi.org/10.1021/jf048253p

López-Arencibia, A., Bethencourt-Estrella, C.J., Freijo, M.B., Reyes-Batlle, M., Sifaoui, I., Nicolás-Hernández, D.S., et al., 2020. New phenalenone analogues with improved activity against *Leishmania* species. Biomed. Pharmacother. 132, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110814

López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Wagner, C., Lorenzo-Morales, J., Maciver, S.K., Piñero, J.E., 2017. Perifosine mechanisms of action in

Leishmania species. Antimicrob. Agents Chemother. 61. https://doi.org/10.1128/AAC.02127-16

López-Arencibia, A., Nicolás-Hernández, D.S., Bethencourt-Estrella, C.J., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Rodríguez-Expósito, R.L., et al., 2019. Withanolides from *Withania aristata* as antikinetoplastid agents through induction of programmed cell death. Pathogens 8. https://doi.org/10.3390/pathogens8040172

Lopez, M.S., Tan, I.S., Yan, D., Kang, J., McCreary, M., Modrusan, Z., Austin, C.D., Xu, M., Brown, E.J., 2017. Host-derived fatty acids activate type VII secretion in *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 11223–11228. https://doi.org/10.1073/pnas.1700627114

Loría-Cervera, E.N., Andrade-Narvaez, F., 2020. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. Acta Trop. 207. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105456

Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 111, 1265–1273. https://doi.org/10.1172/JCI200318535.

Lucero, E., Collin, S.M., Gomes, S., Akter, F., Asad, A., Kumar Das, A., Ritmeijer, K., 2015. Effectiveness and Safety of Short Course Liposomal Amphotericin B (AmBisome) as First Line Treatment for Visceral Leishmaniasis in Bangladesh. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003699

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols, In : The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 41–164. https://doi.org/10.1007/978-3-642-88458-0_5

Macêdo, C.G., Fonseca, M.Y.N., Caldeira, A.D., Castro, S.P., Pacienza-Lima, W., Borsodi, M.P.G., et., 2020. Leishmanicidal activity of *Piper marginatum* Jacq. from Santarém-PA against *Leishmania amazonensis*. Exp. Parasitol. 210, 107847. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107847

Maciver, S.K., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2020. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? Trends Parasitol. 36, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.008

Madikizela, B., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2012. Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhoea. J. Ethnopharmacol. 141, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.053

Mahwasane, S.T., Middleton, L., Boaduo, N., 2013. An ethnobotanical survey of indigenous knowledge on medicinal plants used by the traditional healers of the Lwamondo area, Limpopo province, South Africa. South African J. Bot. 88, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.05.004

Mandell, G.L., 1975. Catalase , Superoxide Dismutase , and Virulence of *Staphylococcus aureus* on Staphylococcal-leukocyte interaction. J. Clin. Invest. 55, 561–566.

Máñez, S., Del Carmen Recio, M., Gil, I., Gómez, C., Giner, R.M., Waterman, P.G., Ríos, J.L., 1999. A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. J. Nat. Prod. 62, 601–604. https://doi.org/10.1021/np980132u

Manilal, A., Sabu, K.R., Shewangizaw, M., Aklilu, A., Seid, M., Merdikios, B., Tsegaye, B., 2020. *In vitro* antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. Heliyon 6. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03303

Mari, S.H., Varras, P.C., Atia-Tul-Wahab, Choudhary, I.M., Siskos, M.G., Gerothanassis, I.P., 2019. Solvent-dependent structures of natural products based on the combined use of DFT calculations and 1H-NMR chemical shifts. Molecules 24, 1–19. https://doi.org/10.3390/molecules24122290

McCall, L.I., Matlashewski, G., 2012. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. Exp. Parasitol. 132, 109–115. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.001

McConville, M.J., Naderer, T., 2011. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. Annu. Rev. Microbiol. 65, 543–561. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102913

Menna-Barreto, R.F.S., 2019. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill. Cell Death Dis. 10. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2

Menna-Barreto, R.F.S., Salomão, K., Dantas, A.P., Santa-Rita, R.M., Soares, M.J., Barbosa, H.S., de Castro, S.L., 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. Micron 40, 157–168. https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.08.003

Miguel, D.C., Flannery, A.R., Mittra, B., Andrews, N.W., 2013. Heme uptake mediated by lhr1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence. Infect. Immun. 81, 3620–3626. https://doi.org/10.1128/IAI.00687-13

Milanez, G.D., Masangkay, F.R., Thomas, R.C., Ordona, M.O.G.O., Bernales, G.Q., Corpuz, V.C.M., et al., 2017. Molecular identification of *Vermamoeba vermiformis* from freshwater fish in lake Taal, Philippines. Exp. Parasitol. 183, 201–206. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.009

Milano, S., Di Bella, G., D'Agostino, P., Barbera, C., Caruso, R., La Rosa, M., et al., 2002. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Clin. Exp. Immunol. 127, 360–365. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01749.x

Moeini, A., van Reenen, A., Van Otterlo, W., Cimmino, A., Masi, M., Lavermicocca, P., et al., 2020. α-costic acid, a plant sesquiterpenoid from *Dittrichia viscosa*, as modifier of Poly (lactic acid) properties: a novel exploitation of the autochthone biomass metabolite for a wholly biodegradable system. Ind. Crops Prod. 146, 112134. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112134

Mohti, H., Taviano, M.F., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Marino, A., et al., 2019. *Inula viscosa* (L.) Aiton leaves and flower buds: Effect of extraction solvent/technique on their antioxidant ability, antimicrobial properties and phenolic profile. Nat. Prod. Res. 34, 46–52. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1569659

Mondal, D., Bern, C., Ghosh, D., Rashid, M., Molina, R., Chowdhury, R., et al., 2019. Quantifying the infectiousness of post-kala-azar dermal leishmaniasis toward sand flies. Clin. Infect. Dis. 69, 251–258. https://doi.org/10.1093/cid/ciy891

Moran, G.J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B.,

Talan, D.A., 2006. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. N. Engl. J. Med. 355, 666–674.

Moreira, W., 2011. Stress oxydatif, differentiation et mort cellulaire chez le parasite *Leishmania*.Microbiologie-Immunologie. Université Laval de Québec.

Mottaghipicheh, J., Iriti, M., 2020. Sephadex® LH-20, Isolation, and Purification of Flavonoids from Plant Species: A Comprehensive Review. Molecules 25, 1–19.

Mule, S.N., Saad, J.S., Fernandes, L.R., Stolf, B.S., Cortez, M., Palmisano, G., 2020. Protein glycosylation in: *Leishmania* spp. Mol. Omi. 16, 407–424. https://doi.org/10.1039/d0mo00043d

Mulzer, J., Bohlman, R., 2000. The Role of Natural Products in Drug Discovery *1st* ed., In: Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings. pp. 351. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Murray, R.J., 2005. *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: Diagnosis and management guidelines. Intern. Med. J. 35, 16–29. https://doi.org/10.1111/j.1444-0903.2005.00978.x

Naddaf, N., Haddad, S., 2020. Apigenin effect against *Leishmania tropica* amastigotes in vitro. J. Parasit. Dis. 44, 574–578. https://doi.org/10.1007/s12639-020-01230-8

Naderer, T., McConville, M.J., 2008. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. Cell. Microbiol. 10, 301–308. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x

Nakaminami, H., Ozawa, K., Sasai, N., Ikeda, M., Nemoto, O., Baba, N., et al., 2020. Current status of Panton–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with skin and soft tissue infections in Japan. J. Dermatol. 47, 1280–1286. https://doi.org/10.1111/1346-8138.15506

Neffati, M., Sghaier, M., 2014. Developpement et valorisation des plantes aromatiques et medicinales (PAM) au niveau des zones desertiques de la région Mena (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie), Projet MENA-DELP, Observatoire du Sahara et du Sahel.

Neuenschwander, A., Rocha, V.P.C., Bastos, T.M., Marcourt, L., Morin, H., da Rocha, C.Q., et al., 2020. Production of highly active antiparasitic compounds from the controlled halogenation of the *Arrabidaea brachypoda* crude plant extract. J. Nat. Prod. 83, 2631–2640. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00433

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79, 629–661. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055

Nieto, G., 2017. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. Medicines 4, 63. https://doi.org/10.3390/medicines4030063

Nilforoushzadeh, M.A., Heidari-Kharaji, M., Zare, M., Torkamaniha, E., Rafati, S., 2019. Novel Strategies and Pharmaceutical Agents for the Treatment of Leishmaniasis: A Review. Anti-Infective Agents 18, 89–100. https://doi.org/10.2174/2211352517666190123113843

Nogueira, P.M., de Menezes-Neto, A., Borges, V.M., Descoteaux, A., Torrecilhas, A.C., Xander, P., et al., 2020. Immunomodulatory Properties of *Leishmania* Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF-κB Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. Front. Cell. Infect. Microbiol.

10, 1–9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00380

Norbury, C.J., Hickson, I.D., 2001. Cellular responses to DNA damage. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 41, 367–401.

Noriega, P., Ballesteros, J., De la Cruz, A., Veloz, T., 2020. Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from piper barbatum kunth leaves. Plants 9, 1–9. https://doi.org/10.3390/plants9020211

Nour, A.M.M., Khalid, S.A., Kaiser, M., Brun, R., Abdallah, W.E., Schmidt, T.J., 2009. The antiprotozoal activity of sixteen asteraceae species native to Sudan and bioactivity-guided isolation of xanthanolides from *Xanthium brasilicum*. Planta Med. 75, 1363–1368. https://doi.org/10.1055/s-0029-1185676

O'Neill, J., 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. In: The Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Collection. London.

Ogden, G., Melby, P., 2009. *Leishmania*, in: Encyclopedia of Microbiology. pp. 663–673.

Oghumu, S., Natarajan, G., Satoskar, A.R., 2015. Pathogenesis of Leishmaniasis in Humans. Hum. Emerg. Re-emerging Infect. I, 337–348. https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch18

Oliveira, I.H.R., Figueiredo, H.C.P., Rezende, C.P., Verano-Braga, T., Melo-Braga, M.N., Reis Cunha, J.L., de Andrade, H.M., 2020. Assessing the composition of the plasma membrane of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *L. (L.) amazonensis* using label-free proteomics. Exp. Parasitol. 218. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107964

Omwenga, E.O., Hensel, A., Shitandi, A., Goycoolea, F.M., 2015. Ethnobotanical survey of traditionally used medicinal plants for infections of skin, gastrointestinal tract, urinary tract and the oral cavity in Borabu sub-county, Nyamira county, Kenya. J. Ethnopharmacol. 176, 508–514. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.032

Ondarza, R.N., Iturbe, A., Hernández, E., 2006. *In vitro* Antiproliferative Effects of Neuroleptics, Antimycotics and Antibiotics on the Human Pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. Arch. Med. Res. 37, 723–729. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.02.007

Ortalli, M., De Pascali, A.M., Longo, S., Pascarelli, N., Porcellini, A., Ruggeri, D., Randi, V., Procopio, A., Re, M.C., Varani, S., 2020. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in blood donors living in an endemic area, northeastern Italy. J. Infect. 80, 116–120. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.09.019

Oualha, R., Barhoumi, M., Marzouki, S., Harigua-Souiai, E., Ahmed, M. Ben, Guizani, I., 2019. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9, 1–16. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00153

Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F.O., Taleb, M., Greche, H., 2016. Mixture design of *Origanum compactum, Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. Ind. Crops Prod. 89, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.049

Özbilgin, A., Çavuş, İ., Kaya, T., Yıldırım, A., Harman, M., 2020. Comparison of in vitro Resistance of Wild *Leishmania* İsolates, Which are Resistant to Pentavalent Antimonial Compounds, Against Drugs Used in the Treatment of Leishmaniasis. Turkiye

parazitolojii Derg. 44, 12–16. https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6661

PAHO, 2017. Leishmaniasis - Neglected Infectious Diseases. Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022. PAHO/WHO. www.paho.org/leishmaniasis

Palma, P., Famiglini, G., Trufelli, H., Pierini, E., Termopoli, V., Cappiello, A., 2011. Electron ionization in LC-MS: Recent developments and applications of the direct-EI LC-MS interface. Anal. Bioanal. Chem. 399, 2683–2693. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4637-0

Palmqvist, N., Foster, T., Tarkowski, A., Josefsson, E., 2002. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. Microb. Pathog. 33, 239–249. https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0533

Parvez, S., Yadagiri, G., Gedda, M.R., Singh, A., Singh, O.P., Verma, A., Sundar, S., Mudavath, S.L., 2020. Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with Amphotericin B and Paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis. Sci. Rep. 10, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69276-5

Passalacqua, N.G., Guarrera, P.M., De Fine, G., 2007. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). Fitoterapia 78, 52–68. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.005

Paterson, G.K., Harrison, E.M., Holmes, M.A., 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 22, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003

Patou, J., Gevaert, P., Van Zele, T., Holtappels, G., van Cauwenberge, P., Bachert, C., 2008. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. J. Allergy Clin. Immunol. 121, 110–115. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.059

Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., et al., 2016. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 2–5. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004343

Peeling, R.W., Boeras, D.I., Nkengasong, J., 2017. Re-imagining the future of diagnosis of Neglected Tropical Diseases. Comput. Struct. Biotechnol. J. 15, 271–274. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.02.003

Pereira, I.O., Marques, M.J., Pavan, A.L.R., Codonho, B.S., Barbiéri, C.L., Beijo, L.A., Doriguetto, A.C., Costa, D.D.M., dos Santos, M.H., 2010. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. Phytomedicine 17, 339–345. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.020

Pérez-Cutillas, P., Muñoz, C., Martínez-De La Puente, J., Figuerola, J., Navarro, R., Ortuño, M., Bernal, L.J., et al., 2020. A spatial ecology study in a high-diversity host community to understand blood-feeding behaviour in Phlebotomus sandfly vectors of *Leishmania*. Med. Vet. Entomol. 34, 164–174. https://doi.org/10.1111/mve.12427

Pérez Martín, J.M., 2008. Programmed Cell Death in Protozoa, Molecular biology. In: Biomedical and Life Sciences. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76717-8

Petraitiene, B., Conejo, P.R., Jankauskaite, L., Kevalas, R., Trumpulyte, G., Snipaitiene, A., Vitkauskiene, A., Gurskis, V., 2020. Prevalence, clinical expression, invasiveness and outcome of Staphylococcus aureus containing Panton-Valentine leukocidin in children treated in a university hospital of Lithuania. Infect. Dis. (Auckl). 52, 464–472. https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1752395

Phumee, A., Jariyapan, N., Chusri, S., Hortiwakul, T., Mouri, O., Gay, F., Limpanasithikul, W., Siriyasatien, P., 2020. Determination of anti-leishmanial drugs efficacy against *Leishmania martiniquensis* using a colorimetric assay. Parasite Epidemiol. Control 9, e00143. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00143

Pinto, E.G., Pimenta, D.C., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Tempone, A.G., 2013. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 135, 655–660. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.016

Podinovskaia, M., Descoteaux, A., 2015. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. Future Microbiol. 10, 111–129. https://doi.org/10.2217/fmb.14.103

Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.C., Barrett, M.P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., et al., 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052

Ponte-Sucre, A., Padron-Nieves, M., 2013. Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments *1st* ed. In: Drug resistance in *Leishmania* parasites. Springer-Verlag Wien. pp.462. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4_3

Postigo, J.A.R., 2010. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. Int. J. Antimicrob. Agents 36, 62–65. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.023

Potter, A.D., Butrico, C.E., Ford, C.A., Curry, J.M., Trenary, I.A., Tummarakota, S.S., Hendrix, A.S., Young, J.D., Cassat, J.E., 2020. Host nutrient milieu drives an essential role for aspartate biosynthesis during invasive *Staphylococcus aureus* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117, 12394–12401. https://doi.org/10.1073/pnas.1922211117

Pottinger, P.S., 2013. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Med. Clin. North Am. 97, 601–619. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.02.005

Pyrgos, V., Mickiene, D., Sein, T., Cotton, M., Fransesconi, A., Mizrahi, I., et al., 2010. Effects of immunomodulatory and organism-associated molecules on the permeability of an *In vitro* blood-brain barrier model to amphotericin B and fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 1305–1310. https://doi.org/10.1128/AAC.01263-09

Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochem. Anal. 2, 199–203. https://doi.org/10.1002/pca.2800020503

Rai, R., 2016. Mechanisms underlying *Leishmania* parasites survival and dissemination at late stage of infection in human macrophages. Chemistry.University of Greenwich.

Ramesh, V., Dixit, K.K., Sharma, N., Singh, R., Salotra, P., 2020. Assessing the Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B and Miltefosine in Combination for Treatment of Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. J. Infect. Dis. 221, 608–617.

https://doi.org/10.1093/infdis/jiz486

Rea, A., Tempone, A.G., Pinto, E.G., Mesquita, J.T., Rodrigues, E., Silva, L.G.M., Sartorelli, P., Lago, J.H.G., 2013. Soulamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Induces Plasma Membrane Permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and Mytochondrial Dysfunction. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002556

Ready, P.D., 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin. Epidemiol. 6, 147–154. https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267

Real, F., Mortara, R.A., 2012. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. PLoS Negl. Trop. Dis. 6. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001518

Reimão, J.Q., Pita Pedro, D.P., Coelho, A.C., 2020. The preclinical discovery and development of oral miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis: a case history. Expert Opin. Drug Discov. 15, 647–658. https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1743674

Reveiller, F.L., Suh;, S., Sullivan, K., Marciano-Cabral, P.-A.C. and F., 2001. Isolation of a Unique Membrane Protein from *Naegleria fowleri*. J. Eukaryot Microbiol 48, 676–682.

Reyes, C.P., Núñez, M.J., Jiménez, I.A., Busserolles, J., Alcaraz, M.J., Bazzocchi, I.L., 2006. Activity of lupane triterpenoids from Maytenus species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. Bioorganic Med. Chem. 14, 1573–1579. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.063

Rhattas, M., Douira, A., Zidane, L., 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). J. Appl. Biosci. 97, 9187. https://doi.org/10.4314/jab.v97i1.5

Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Pratesi, R., Hecht, M., 2020. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 12, 7–17. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004

Ridder, M.J., Daly, S.M., Triplett, K.D., Seawell, N.A., Hall, P.R., Bose, J.L., 2020. *Staphylococcus aureus* fatty acid kinase faka modulates pathogenesis during skin infection via proteases. Infect. Immun. 88. https://doi.org/10.1128/IAI.00163-20

Rizo-liendo, A., Sifaoui, I., Arberas-jiménez, I., Reyes-batlle, M., 2020. Fluvastatin and atorvastatin induce programmed cell death in the brain eating amoeba *Naegleria fowleri*. Biomed. Pharmacother. 130, 110583. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110583

Rizo-Liendo, A., Sifaoui, I., Cartuche, L., Arberas-Jiménez, I., Reyes-Batlle, M., Fernández, J.J., Piñero, J.E., Díaz-Marrero, A.R., Lorenzo-Morales, J., 2020a. Evaluation of indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis* as a novel source of therapeutic agents against the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri*. Microorganisms 8, 1–15. https://doi.org/10.3390/microorganisms8050789

Roatt, B.M., de Oliveira Cardoso, J.M., De Brito, R.C.F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Reis, A.B., 2020. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104, 8965–8977. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w

Robinson, A.D.M., Dexter, F., Renkor, V., Reddy, S., Loftus, R.W., 2019. Operating room PathTrac analysis of current intraoperative *Staphylococcus aureus* transmission

dynamics. Am. J. Infect. Control 47, 1240–1247. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.03.028

Roch, M., Gagetti, P., Davis, J., Ceriana, P., Errecalde, L., Corso, A., Rosato, A.E., 2017. Daptomycin resistance in clinical MRSA strains is associated with a high biological fitness cost. Front. Microbiol. 8, 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02303

Rochet, N.M., González-Barreto, R.M., Martín, R.F., 2020. Characterization of pathogens isolated from cutaneous abscesses in patients evaluated by the dermatology service at an emergency department. P. R. Health Sci. J. 39, 260–263. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.05.312

Rockel, C., Hartung, T., Hermann, C., 2011. Different *Staphylococcus aureus* whole bacteria mutated in putative pro-inflammatory membrane components have similar cytokine inducing activity. Immunobiology 216, 316–321. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.08.001

Rodríguez-Hernández, K.D., Martínez, I., Reyes-Chilpa, R., Espinoza, B., 2020. Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. Bioorg. Chem. 100, 103894. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894

Rouard, C., Garnier, F., Leraut, J., Lepainteur, M., Rahajamananav, L., Languepin, J., Ploy, M.C., Bourgeois-Nicolaos, N., Doucet-Populaire, F., 2018. Emergence and within-host genetic evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to linezolid in a cystic fibrosis patient. Antimicrob. Agents Chemother. 62, 1–11. https://doi.org/10.1128/AAC.00720-18

Rozenblat, S., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Cohen, Y., Dovrat, S., 2008. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. Biochem. Pharmacol. 75, 369–382. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.024

Sales, P.A., Molina, I., Murta, S.M.F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, C.M., 2017. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. Am. J. Trop. Med. Hyg. 97, 1289–1303. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761

Salhi, N., Bouyahya, A., Fettach, S., Zellou, A., Cherrah, Y., 2019. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of skin burns in occidental Morocco (area of Rabat). South African J. Bot. 121, 128–142. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.038

Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L., Douira, A., 2010. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). Lazaroa 31, 133–146. https://doi.org/10.5209/rev

Salim, A., Chin, Y., Kinghorn, A., 2008. Drug Discovery from Plants *1 st* ed., In : Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1–379.

Santana, R.C., Rosa, S., Matheus, M.H., Soares, C., Atella, G., Guimarães, A.C., Carlos, A., Ramos, M.F.S., Saraiva, E.M., Pinto-da-silva, L.H., 2020. *In vitro* leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. J. Ethnopharmacol. 259, 112981. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112981

Sarker, S.D., Nahar, L., 2012. Methods in Molecular Biology. In : Natural Products Isolation *3^d* ed. Humana Press-Springer Science+Business Media, LLC. pp. 1–588.

Schmidt, T.J., 2006. Structure-activity and activity-activity relationships of sesquiterpene lactones. Sesquiterpene Lact. Adv. their Chem. Biol. Asp. 33, 309–392. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78274-4_15

Scudiero, O., Brancaccio, M., Mennitti, C., Laneri, S., Lombardo, B., De Biasi, M.G., et al., 2020. Human defensins: A novel approach in the fight against skin colonizing *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 9, 1–16. https://doi.org/10.3390/antibiotics9040198

Seca, A.M.L., Grigore, A., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2014. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. J. Ethnopharmacol. 154, 286–310. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.010

Seifert, K., Croft, S.L., 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 73–79. https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.73-79.2006

Selk, A., Wood, S., 2019. Folliculitis. In : Vulvar Disease. Springer, Cham. pp. 215–218. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61621-6

Selton-Suty, C., Célard, M., Le Moing, V., Doco-Lecompte, T., Chirouze, C., Iung, B., et al., 2012. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: A 1-year population-based survey. Clin. Infect. Dis. 54, 1230–1239. https://doi.org/10.1093/cid/cis199

Shawahna, R., Jaradat, N.A., 2017. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by patients with psoriasis in the West Bank of Palestine. BMC Complement. Altern. Med. 17, 1–9. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1503-4

Shi, Y., Li, Huili, Li, J., Zhi, D., Zhang, X., Liu, H., Wang, H., Li, Hongyu, 2015. Development, optimization and evaluation of emodin loaded nanoemulsion prepared by ultrasonic emulsification. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 27, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.04.003

Siddiqui, R., Ali, I.K.M., Cope, J.R., Khan, N.A., 2016. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. Acta Trop. 164, 375–394. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.009

Siddiqui, R., Khan, N.A., 2014. Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: An Old Enemy Presenting New Challenges. PLoS Negl. Trop. Dis. 8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003017

Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C.M., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., Valladares, B., et al., 2017. Selective activity of oleanolic and maslinic acids on the amastigote form of *Leishmania* spp. Iran. J. Pharm. Res. 16, 1192–1195. https://doi.org/10.22037/ijpr.2017.2070

Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C.M., Ticona, J.C., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., et al., 2014. *In vitro* effects of triterpenic acids from olive leaf extracts on the mitochondrial membrane potential of promastigote stage of *Leishmania* spp. Phytomedicine 21, 1689–1694. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.004

Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Chiboub, O., Rodríguez-Martín, J., Rocha-Cabrera, P., et al., 2018. Toxic effects of selected proprietary dry eye drops on

Acanthamoeba. Sci. Rep. 8, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26914-3

Sifaoui, I., Rodríguez-Expósito, R.L., Reyes-Batlle, M., Rizo-Liendo, A., Piñero, J.E., Bazzocchi, I.L., Lorenzo-Morales, J., Jiménez, I.A., 2019. Ursolic acid derivatives as potential agents against *Acanthamoeba* spp. Pathogens 8, 1–14. https://doi.org/10.3390/pathogens8030130

Sifaoui, I., Rodríguez-Talavera, I., Reyes-Batlle, M., Rodríguez-Expósito, R.L., Rocha-Cabrera, P., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2020. *In vitro* evaluation of commercial foam Belcils® on Acanthamoeba spp. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 14, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.10.002

Silago, V., Mushi, M.F., Remi, B.A., Mwayi, A., Swetala, S., Mtemisika, C.I., Mshana, S.E., 2020. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing osteomyelitis in a tertiary hospital, Mwanza, Tanzania. J. Orthop. Surg. Res. 15, 1–6. https://doi.org/10.1186/s13018-020-01618-5

Silva, E.R. da, Brogi, S., Lucon-Júnior, J.F., Campiani, G., Gemma, S., Maquiaveli, C.D.C., 2019. Dietary polyphenols rutin, taxifolin and quercetin related compounds target: *Leishmania amazonensis* arginase. Food Funct. 10, 3172–3180. https://doi.org/10.1039/c9fo00265k

Silva, M.T.G., Simas, S.M., Batista, T.G., Cardarelli, P., Tomassini, T.C.B., 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 779–782. https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018

Siwen, L., Shi, H., Chang, W., Li, Y., Zhang, M., Qiao, Y., Lou, H., 2017. Eudesmane sesquiterpenes from Chinese liverwort are substrates of Cdrs and display antifungal activity by targeting Erg6 and Erg11 of *Candida albicans*. Bioorganic Med. Chem. 25, 5764–5771. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.001

Skalli, S., Hassikou, R., Arahou, M., 2019. An ethnobotanical survey of medicinal plants used for diabetes treatment in Rabat, Morocco. Heliyon 5, e01421. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01421

Sohn, H.J., Song, K.J., Kang, H., Ham, A.J., Lee, J.H., Chwae, Y.J., et al., 2019. Cellular characterization of actin gene concerned with contact-dependent mechanisms in *Naegleria fowleri*. Parasite Immunol. 41, 1–7. https://doi.org/10.1111/pim.12631

Solomon, M., Schwartz, E., Pavlotsky, F., Sakka, N., Barzilai, A., Greenberger, S., 2014. *Leishmania tropica* in children: A retrospective study. J. Am. Acad. Dermatol. 71, 271–277. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.047

Sosa, A., Salamanca Capusiri, E., Amaya, S., Bardón, A., Giménez-Turba, A., Vera, N., Borkosky, S., 2020. Trypanocidal activity of South American Vernonieae (Asteraceae) extracts and its sesquiterpene lactones. Nat. Prod. Res. 0, 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1739682

Sosa, A.M., Amaya, S., Salamanca Capusiri, E., Gilabert, M., Bardón, A., Giménez, A., Vera, N.R., Borkosky, S.A., 2016. Active sesquiterpene lactones against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. Nat. Prod. Res. 30, 2611–2615. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1126260

Spaan, A.N., Schiepers, A., de Haas, C.J.C., van Hooijdonk, D.D.J.J., Badiou, C., Contamin, H., et al., 2015. Differential Interaction of the Staphylococcal Toxins Panton–Valentine Leukocidin and γ-Hemolysin CB with Human C5a Receptors. J. Immunol. 195, 1034–1043. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500604

Späth, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 9536–9541. https://doi.org/10.1073/pnas.1530604100

Steverding, D., Sidjui, L.S., Ferreira, É.R., Ngameni, B., Folefoc, G.N., Mahiou-Leddet, V., et al., 2020. Trypanocidal and leishmanicidal activity of six limonoids. J. Nat. Med. 74, 606–611. https://doi.org/10.1007/s11418-020-01408-7

Stojko, J., 2016. Nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse native et mobilité ionique pour la caractérisation structurale de macrobiomolécules et de leurs complexes associés. Chimie analytique. Université de Strasbourg.

Sülsen, V.P., Puente, V., Papademetrio, D., Batlle, A., Martino, V.S., Frank, F.M., Lombardo, M.E., 2016. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. PLoS One 11, 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150526

Sun, H., Tan, J., Lv, W., Li, J., Wu, J., Xu, J., et al., 2020. Hypoglycemic triterpenoid glycosides from *Cyclocarya paliurus* (Sweet Tea Tree). Bioorg. Chem. 95, 103493. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103493

Sundar, S., More, D.K., Singh, M.K., Singh, V.P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P.C.K., Murray, H.W., 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. Clin. Infect. Dis. 31, 1104–1107. https://doi.org/10.1086/318121

Sundar, S., Olliaro, P.L., 2007. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Ther. Clin. Risk Manag. 3, 733–740.

Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 951–958. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002

Sundar, S., Singh, A., 2018. Chemotherapeutics of Visceral Leishmaniasis: present and future developments. Parasitology 145, 481–489. https://doi.org/10.1017/S0031182017002116.Chemotherapeutics

Tacherfiout, M., Petrov, P.D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M.L., Khettal, B., 2018. Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract in Triton-induced hyperlipidemic rats and human HepG2 cells. Biomed. Pharmacother. 101, 501–509. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.106

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J. Ethnopharmacol. 110, 105–117. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.011

Tahri, N., Basti, A.E.L., Zidane, L., Rochdi, A., Douira, A., 2014. Etude Ethnobotanique Des Plantes Medicinales Dans La Province De Settat (Maroc). Kastamonu Univ. J. For. Fac. 2, 192–208.

Talib, W.H., Abu Zarga, M.H., Mahasneh, A.M., 2012. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. Molecules 17, 3291–3303. https://doi.org/10.3390/molecules17033291

Tam, K., Torres, V.J., 2018. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. Microbiol. Spectr. 7. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0039-2018

Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P., 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1352–1364. https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006

Taylor, A.R., 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Prim. Care - Clin. Off. Pract. 40, 637–654. https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.002

Taylor, S.D., Palmer, M., 2016. The action mechanism of daptomycin. Bioorganic Med. Chem. 24, 6253–6268. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.052

Tegasne, C., Kapche, G.D.W.F., Mawabo, I.K., Talla, R.M., Jouda, J.B., Happi, G.M., et al., 2020. Bioguided chemical study of *Boswellia dalzielii* Hutch. (Burseraceae) for antibacterial agents and a new glucopyranoxylmethoxybenzyle. Nat. Prod. Res. 1–10. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1794863

Thi, E.P., Lambertz, U., Reiner, N.E., 2012. Sleeping with the enemy: How intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. PLoS Pathog. 8, 1–4. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002551

Tittikpina, N.K., Nana, F., Fontanay, S., Philippot, S., Batawila, K., Akpagana, K., et al., 2018. Antibacterial activity and cytotoxicity of *Pterocarpus erinaceus* Poir extracts, fractions and isolated compounds. J. Ethnopharmacol. 212, 200–207. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.020

Toro-Uribe, S., Herrero, M., Decker, E.A., López-Giraldo, L.J., Ibáñez, E., 2020. Preparative Separation of Procyanidins from *Cocoa Polyphenolic* Extract: Comparative Study of Different Fractionation Techniques. Molecules 25, 8–11. https://doi.org/10.3390/molecules25122842

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R., 2017. Leishmaniasis: A review. F1000Research 6, 1–15. https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1

Treffon, J., Chaves-Moreno, D., Niemann, S., Pieper, D.H., Vogl, T., Roth, J., Kahl, B.C., 2020. Importance of superoxide dismutases A and M for protection of *Staphylococcus aureus* in the oxidative stressful environment of cystic fibrosis airways. Cell. Microbiol. 22, 1–14. https://doi.org/10.1111/cmi.13158

Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R.C., Ferraro, M.J., 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet 358, 207–208. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05410-1

Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol. 31, 472–481. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9

Tyler K.M., Olson C.L., Engman D.M., 2003. The Life Cycle of *Trypanosoma Cruzi*. In: Tyler K.M., Miles M.A. (eds) American Trypanosomiasis. World Class Parasites, vol 7. Springer, Boston, MA. pp. 1–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9206-2_1

Urish, K.L., Cassat, J.E., 2020. *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. Infect. Immun. 88. https://doi.org/10.1128/IAI.00932-19

Valério-Bolas, A., Pereira, M., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D., Rodrigues, A., Rafael-Fernandes, M., et al., 2019. Intracellular and extracellular effector activity of mouse neutrophils in response to cutaneous and visceral *Leishmania* parasites. Cell. Immunol. 335, 76–84. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.11.003

van Griensven, J., Diro, E., 2019. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. Infect. Dis. Clin. North Am. 33, 79–99. https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005

Varela, M.T., Dias, R.Z., Martins, L.F., Ferreira, D.D., Tempone, A.G., Ueno, A.K., Lago, J.H.G., Fernandes, J.P.S., 2016. Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents - Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. Bioorganic Med. Chem. Lett. 26, 1180–1183. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.040

Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A. V., Vázquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F., Lares-Villa, F., 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. Arch. Med. Res. 36, 83–86. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.11.003

Vasas, A., Hohmann, J., 2011. Xanthane sesquiterpenoids: Structure, synthesis and biological activity. Nat. Prod. Rep. 28, 824–842. https://doi.org/10.1039/c0np00011f

Vázquez-León, L.A., Páramo-Calderón, D.E., Robles-Olvera, V.J., Valdés-Rodríguez, O.A., Pérez-Vázquez, A., García-Alvarado, M.A., Rodríguez-Jimenes, G.C., 2017. Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. Eur. Food Res. Technol. 243, 1593–1608. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2868-4

Verma, N.K., Dey, C.S., 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3010–3015. https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004

Verma, N.K., Singh, G., Dey, C.S., 2007. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. Exp. Parasitol. 116, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.10.007

Vermeersch, M., Da Luz, R.I., Toté, K., Timmermans, J.P., Cos, P., Maes, L., 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 3855–3859. https://doi.org/10.1128/AAC.00548-09

Vestergaard, M., Frees, D., Ingmer, H., 2019. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. In: Gram-Positive Pathogens. Wiley Online Library. pp. 747–765. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018

Viegas, F.P.D., Espuri, P.F., Oliver, J.C., Silva, N.C., Dias, A.L.T., Marques, M.J., Soares, M.G., 2019. Leishmanicidal and antimicrobial activity of primin and primin-containing extracts from *Miconia willdenowii*. Fitoterapia 138, 104297.

https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104297

Vincenot, F., Saleh, M., Prévost, G., 2008. *Staphylococcus aureus* virulence factors. Rev. Francoph. des Lab. 38, 61–69. https://doi.org/10.1016/s1773-035x(08)74868-8

Virdis, P., Migheli, R., Galleri, G., Fancello, S., Cadoni, M.P.L., Pintore, G., et al., 2020. Antiproliferative and proapoptotic effects of *Inula viscosa* extract on Burkitt lymphoma cell line. Tumor Biol. 42, 1–9. https://doi.org/10.1177/1010428319901061

Vivarini, A. de C., Lopes, U.G., 2020. The Potential Role of Nrf2 Signaling in *Leishmania* Infection Outcomes. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00453

vom Berg, J., Vrohlings, M., Haller, S., Haimovici, A., Kulig, P., Sledzinska, A., Weller, M., Becher, B., 2013. Intratumoral IL-12 combined with CTLA-4 blockade elicits T cell-mediated glioma rejection. J. Exp. Med. 210, 2803–2811. https://doi.org/10.1084/jem.20130678

Vouldoukis, I., Bécherel, P.A., Riveros-Moreno, V., Arock, M., Da Silva, O., Debré, P., Mazier, D., Mossalayi, M.D., 1997. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. Eur. J. Immunol. 27, 860–865. https://doi.org/10.1002/eji.1830270409

Wagh, V. V., Jain, A.K., 2018. Ethnopharmacological survey of plants used by the Bhil and Bhilala ethnic community in dermatological disorders in Western Madhya Pradesh, India. J. Herb. Med. 19. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.005

Wagner, C., Vethencourt Ysea, M.A., Galindo, M. V., Guzmán De Rondón, C., Nessi Paduani, A.J., Reyes-Batlle, M., et al., 2017. Isolation of *Naegleria fowleri* from a domestic water tank associated with a fatal encephalitis in a 4 month-old Venezuelan child. Trop. Biomed. 34, 332–337.

Walker, J., Saravia, N.G., 2004. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. J. Parasitol. 90, 1155–1162. https://doi.org/10.1645/GE-3347

Wang, C., Youle, R.J., 2009. The role of mitochondria in apoptosis induced in vitro. Annu. Rev. Genet. 43, 95–118. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850.

Wang, D., Sun, M., Zhang, Y., Chen, Z., Zang, S., Li, Genyun, Li, Gao, Clark, A.R., Huang, J., Si, L., 2020. Enhanced therapeutic efficacy of a novel colon-specific nanosystem loading emodin on DSS-induced experimental colitis. Phytomedicine 78, 153293. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153293

Wang, Z.M., Liu, C., Dziarski, R., 2000. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. J. Biol. Chem. 275, 20260–20267. https://doi.org/10.1074/jbc.M909168199

Weiss, L., Lansell, A., Figueroa, J., Suchdev, P.S., Kirpalani, A., 2020. Declining prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* septic arthritis and osteomyelitis in children: Implications for treatment. Antibiotics 9. https://doi.org/10.3390/antibiotics9030101

WHO, 2002. WHO launches the first global strategy on traditional and alternative medicine. https://www.who.int/mediacentre/news/releases/release38/en/

WHO, 2010. Leishmaniasis (cutaneous, mucosal and visceral forms).
https://www.who.int/ith/diseases/leishmaniasis/en/

WHO, 2014. Antimicrobial resistance : Global Report on Surveillance. https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/

WHO, 2016. Assemblée mondiale de la Santé. Stratégie et plan d'action mondiaux sur le vieillissement et la santé 2016-2020 : vers un monde où chacun puisse vivre longtemps et en bonne santé. https://apps.who.int/iris/handle/10665/252981

WHO, 2016. Leishmaniasis. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

WHO, 2020. Antimicrobial resistance. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.

WHO, 2020. Bulletin of the World Health Organization, Priority pathogens and the antibiotic pipeline: an update. https://www.who.int/bulletin/volumes/98/3/20-251751/en/

WHO, 2020. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).
https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)

WHO, 2020. Leishmaniasis. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis

Wortelboer, H.M., Usta, M., Van Zanden, J.J., Van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.C.M., Cnubben, N.H.P., 2005. Inhibition of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 by a series of α,β-unsaturated carbonyl compounds. Biochem. Pharmacol. 69, 1879–1890. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.001

Wu, Y., Chen, Jingbo, Sun, Y., Dong, X., Wang, Z., Chen, Juncai, Dong, G., 2020. PGN and LTA from *Staphylococcus aureus* Induced Inflammation and Decreased Lactation through Regulating DNA Methylation and Histone H3 Acetylation in Bovine Mammary Epithelial Cells. Toxins (Basel). 12. https://doi.org/10.3390/toxins12040238

Wulsten, I.F., Costa-Silva, T.A., Mesquita, J.T., Lima, M.L., Galuppo, M.K., Taniwaki, N.N., et al., 2017. Investigation of the anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones. Molecules 22. https://doi.org/10.3390/molecules22050685

Yamashita, Y., Nagaoka, K., Kimura, H., Suzuki, M., Konno, S., Fukumoto, T., et al., 2019. Efficacy of Azithromycin in a Mouse Pneumonia Model against Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 63, 1–12.

Yan, X., Gu, S., Shi, Y., Cui, X., Wen, S., Ge, J., 2017. The effect of emodin on Staphylococcus aureus strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. Arch. Microbiol. 199, 1267–1275. https://doi.org/10.1007/s00203-017-1396-8

Yang, S. xiang, Liu, B., Tang, M., Yang, J., Kuang, Y., Zhang, M. zhe, et al., 2020. Extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Juglandaceae) leaves using ethanol/salt aqueous two-phase system coupled with ultrasonic. J. Food Process. Preserv. 44, 1–12. https://doi.org/10.1111/jfpp.14469

Yanwen, W., Wenyuan, G., Xiaohe, X., Yi, L., 2005. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in Rheum officinale Baill on *Staphylococcus aureus* growth. Thermochim. Acta 429, 167–170. https://doi.org/10.1016/j.tca.2005.03.008

Yardley, V., Croft, S.L., 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. Int. J. Antimicrob. Agents 13, 243–248. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00133-8

Yeo, Y.L., Chia, Y.Y., Lee, C.H., Sheng Sow, H., Sum Yap, W., 2014. Effectiveness of Maceration Periods with Different Extraction Solvents on in-vitro Antimicrobial Activity from Fruit of *Momordica charantia* L. J. Appl. Pharm. Sci. 4, 16–23. https://doi.org/10.7324/japs.2014.401004

Yoong, P., Pier, G.B., 2012. Immune-activating properties of panton-valentine leukocidin improve the outcome in a model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. Infect. Immun. 80, 2894–2904. https://doi.org/10.1128/IAI.06360-11

Yosefdad, S., Valadbeigi, Y., Bayat, M., 2020. Effect of hydration and structure on the fragmentation of 2,2-(propane-1,3-diyl)bis(isoindoline-1,3-dione) and 2,2-(ethane-1,2-diyl)bis(isoindoline-1,3-dione) in electron impact ionization-mass spectrometry: A theoretical and experimental study. J. Mol. Struct. 1200, 127105. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127105

Yuan, W., Yuk, H.G., 2018. Antimicrobial efficacy of *Syzygium antisepticum* plant extract against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* and its application potential with cooked chicken. Food Microbiol. 72, 176–184. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.002

Zaki, A.A., Ashour, A.A., Qiu, L., 2020. New sesquiterpene glycoside ester with antiprotozoal activity from the flowers of *Calendula officinalis* L. Nat. Prod. Res. 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1747457

Zdero, C., Bohlmann, F., 1989. Furoeudesmanes and other constituents from representatives of the Pluchea group. Phytochemistry 28, 3097–3100. https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80287-0

Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., Han, J., 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. Cell Res. 28, 9–21. https://doi.org/10.1038/cr.2017.133

Zheng, D., Zhang, H., Jiang, J.M., Chen, Y.Y., Wan, S.J., Lin, Z.X., Xu, H.X., 2019. Prenylated xanthones and biphenyls from Garcinia esculenta with antistaphylococcal activity. Nat. Prod. Res. 1–8. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1663511

Zhou, W., Debnath, A., Jennings, G., Hahn, H.J., Vanderloop, B.H., Chaudhuri, M., Nes, W.D., Podust, L.M., 2018. Enzymatic chokepoints and synergistic drug targets in the sterol biosynthesis pathway of *Naegleria fowleri*. PLoS Pathog. 14, 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007245

Ziaei, H., Sadeghian, G., Hejazi, S.H., 2008. Distribution frequency of pathogenic bacteria isolated from cutaneus leishmaniasis lesions. Korean J. Parasitol. 46, 191–193. https://doi.org/10.3347/kjp.2008.46.3.191

Zijlstra, E.E., Kumar, A., Sharma, A., Rijal, S., Mondal, D., Routray, S., 2020. Report of the Fifth Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Consortium Meeting, Colombo, Sri Lanka, 14-16 May 2018. Parasites and Vectors 13, 1–14. https://doi.org/10.1186/s13071-020-

04011-7

Zougagh, S., Belghiti, A., Rochd, T., Zerdani, I., Mouslim, J., 2019. Medicinal and Aromatic Plants Used in Traditional Treatment of the Oral Pathology: The Ethnobotanical Survey in the Economic Capital Casablanca, Morocco (North Africa). Nat. Products Bioprospect. 9, 35–48. https://doi.org/10.1007/s13659-018-0194-6

Zrira, S., 2003. Le marché des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. IAV Hassan II. Institut Rabat. http://www.ceddem.org/maj/upload/publications/fichier_6.pdf

Zulfiqar, B., Jones, A.J., Sykes, M.L., Shelper, T.B., Davis, R.A., Avery, V.M., 2017. Screening a natural product-based library against kinetoplastid parasites. Molecules 22, 1–19. https://doi.org/10.3390/molecules22101715

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire utilisé dans l'étude ethnobotanique.

Modèle-Questionnaire d'enquête ethnobotanique sur les plantes utilisées dans le cas des éruptions cutanées

Fiche N°…….
Date……

Renseignement sur l'informateur

Age : ……

Sexe : Masculin □ Féminin □

Niveau d'étude : Analphabète □ Primaire □ Secondaire □ Universitaire □

Commune……. **Province**……

Type de Commune : Urbaine □ Rurale □

Renseignement sur le matériel végétal

Nom vernaculaire : ……...

Nom scientifique : ……

Origine : ……

Période de récolte : ……...

Partie utilisée : Feuille □ Fleur □ Fruit □ Partie aérienne □
Racine □ Tige □ Ecorce □
Graine □ Rhizome □ Plante entière □
Autre □

Mode de préparation : Infusion □ Décoction □ Cataplasme □
Autres □

Recette **:** Huile essentielle □ Extrait liquide □ Poudre de plante □
Huile végétale □ Autre □

Mode d'administration : Oral □ Cutané □

Plante est utilisée seule ou associée à autre chose ? Seule □ Associée □
Si elle est associée, cité les plantes ou autres……
……

Y a-t-il d'autres utilisations internes de cette plante ? Oui □ Non □
Si oui lesquelles ?.....
……

Y a-t-il des effets secondaires de la plante ? Oui □ Non □

Si oui, quels sont ces effets ?.....

Annexe 2 : Profil d'antibiogramme des souches cibles de *S. aureus* (*Sa* et SARM (ATCC 29213)).

Familles des antibiotiques	Antibiotiques	Dose par disque (µg)	Souches de *S. aureus*	
			Sa	SARM (ATCC 29213)
Pénicillines	Pénicilline	10 unités	Résistant	Résistant
	Ampicilline	10	Résistant	Résistant
	Amoxicilline	20	Résistant	Résistant
	Oxacilline	1	Résistant	Résistant
	Méthicilline	5	Résistant	Résistant
Combinaison de pénicilline	Acide clavulanique+amoxicilline	10/20	Résistant	Résistant
Céphalosporines	Céftriaxone	30	Résistant	Résistant
	Céftazidime	30	Résistant	Résistant
Glycopeptides	Vancomycine	30	Sensible	Sensible
	Teicoplanine	30	Sensible	Sensible
Macrolides	Erythromycine	15	Résistant	Résistant
	Spiramycine	15	Résistant	Résistant
Tétracyclines	Tétracycline	30	Sensible	Sensible
Polypeptides	Colistine	10	Résistant	Résistant
Autres	Acide fusidique	10	Résistant	Résistant
	Pristinamycine	10	Sensible	Sensible

Annexe 3 : Profil d'antibiogramme et caractéristiques des souches cibles de *S. aureus* (SARM348 et *Sa*LPV+).

Familles des antibiotiques	Antibiotiques	Souches de *S. aureus*	
		SARM348	*Sa*LPV+
Aminoglycosides	Gentamicine	Résistant	Sensible
Aminosides	Tobramycine	Résistant	Sensible
Pénicillines	Pénicilline	Résistant	Résistant
	Méthicilline	Résistant	Sensible
Céphamycines	Céfoxitine	Résistant	Sensible
Macrolides	Erythromycine	Résistant	Sensible
Tetracyclines	Tétracycline	Résistant	Sensible
Quinolones	Norfloxacine	Résistant	Sensible
Rifamycines	Rifampicine	Sensible	Sensible
Autres	Acide fusidique	Résistant	Sensible
	Clindamycine	Sensible	Sensible
	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Résistant	Sensible

SARM348 : absence de gène PVL ; *Sa*LPV+ : porteur de gène PVL.

Annexe 4 : Echantillon de *Rhamnus alaternus* déposé à l'institut scientifique de Rabat.



Spécimen de référence : **RAB107343**

Coordonnées géographiques :

Latitude : N 34°1'8

Longitude : W 5°0'26

Orientation : 358°N

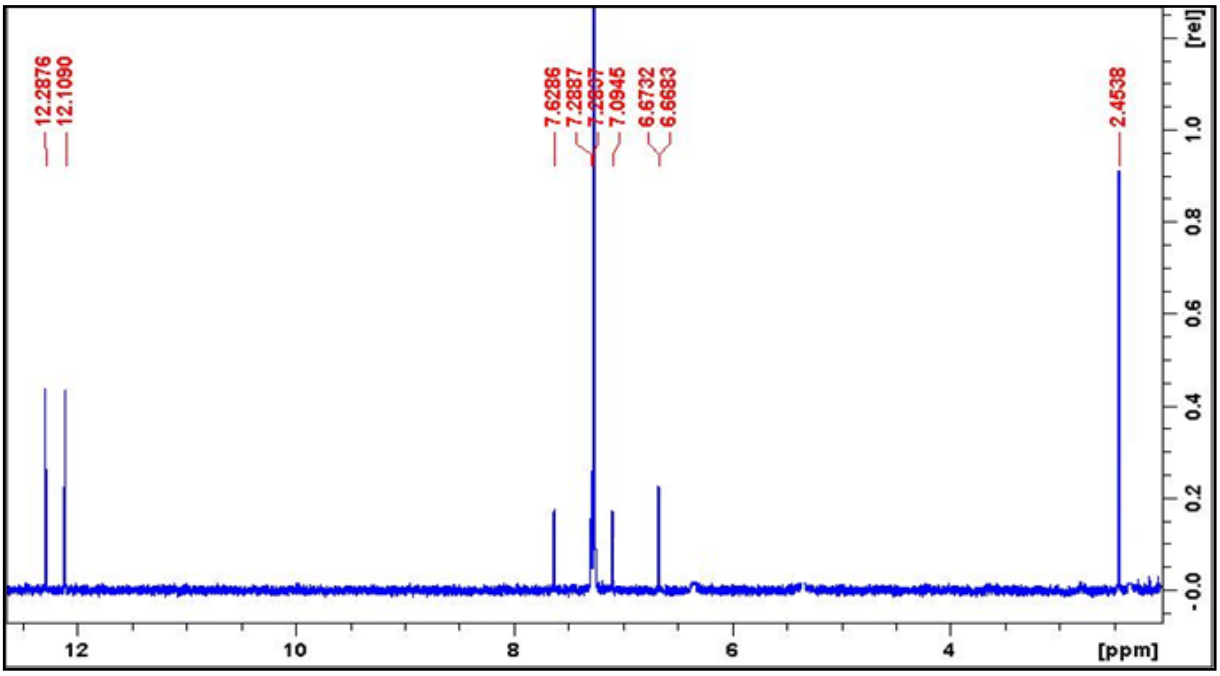
Altitude : 800

Mois de récolte : Septembre

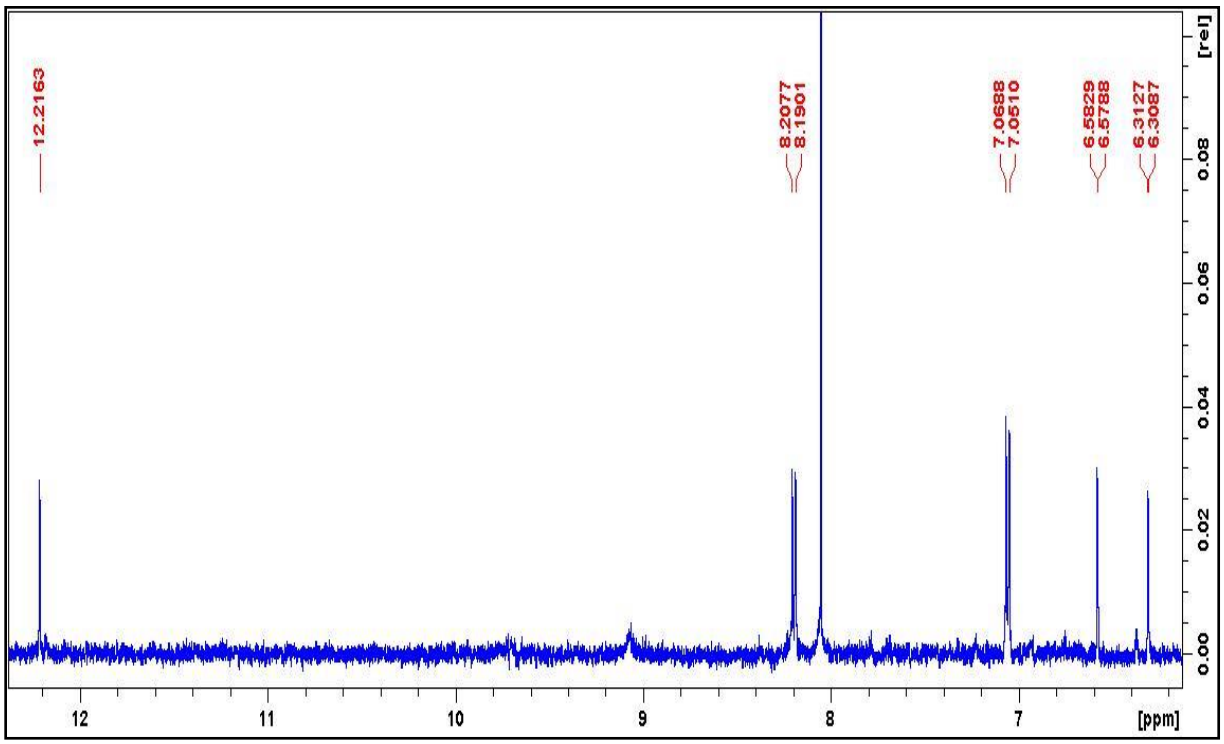
T° : 22

Localisation : Ait Saleh, Immouzer-Atlas

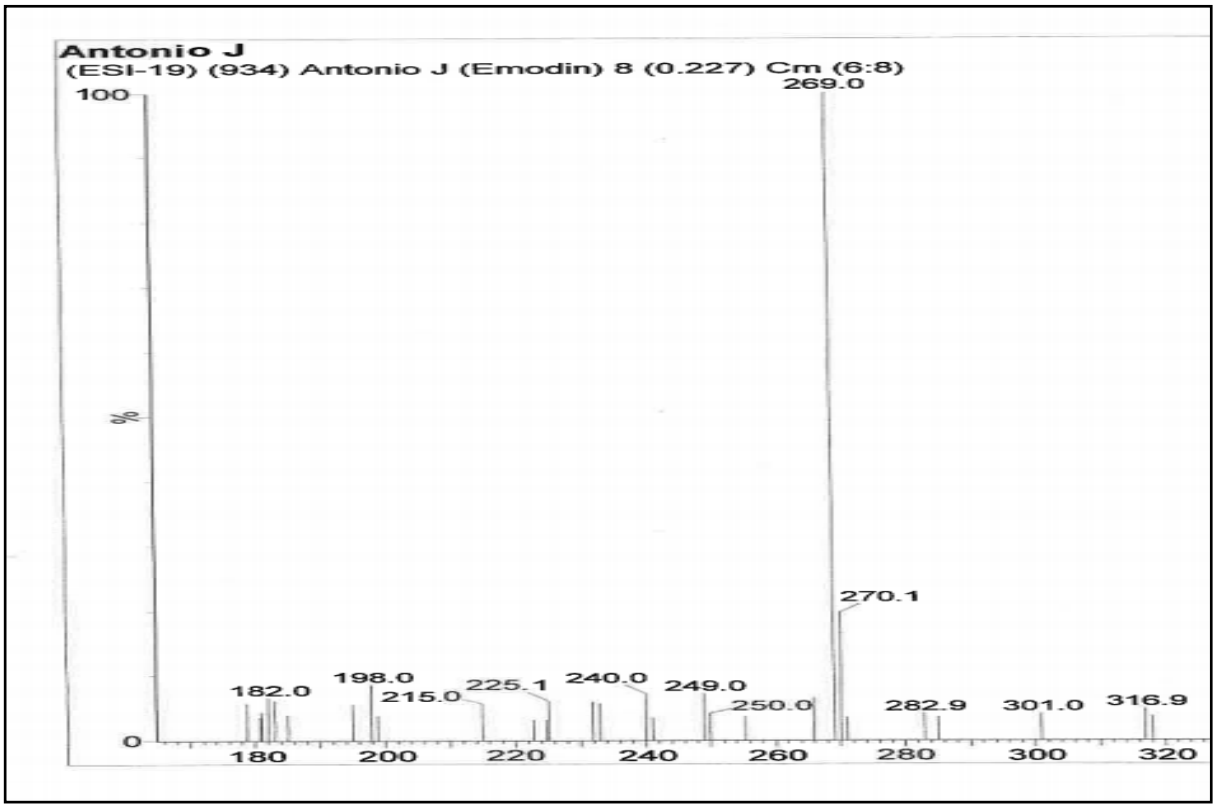
Annexe 5 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de l'**émodine** (600 MHz, $CDCl_3$) isolé de *Rhamnus alaternus*.



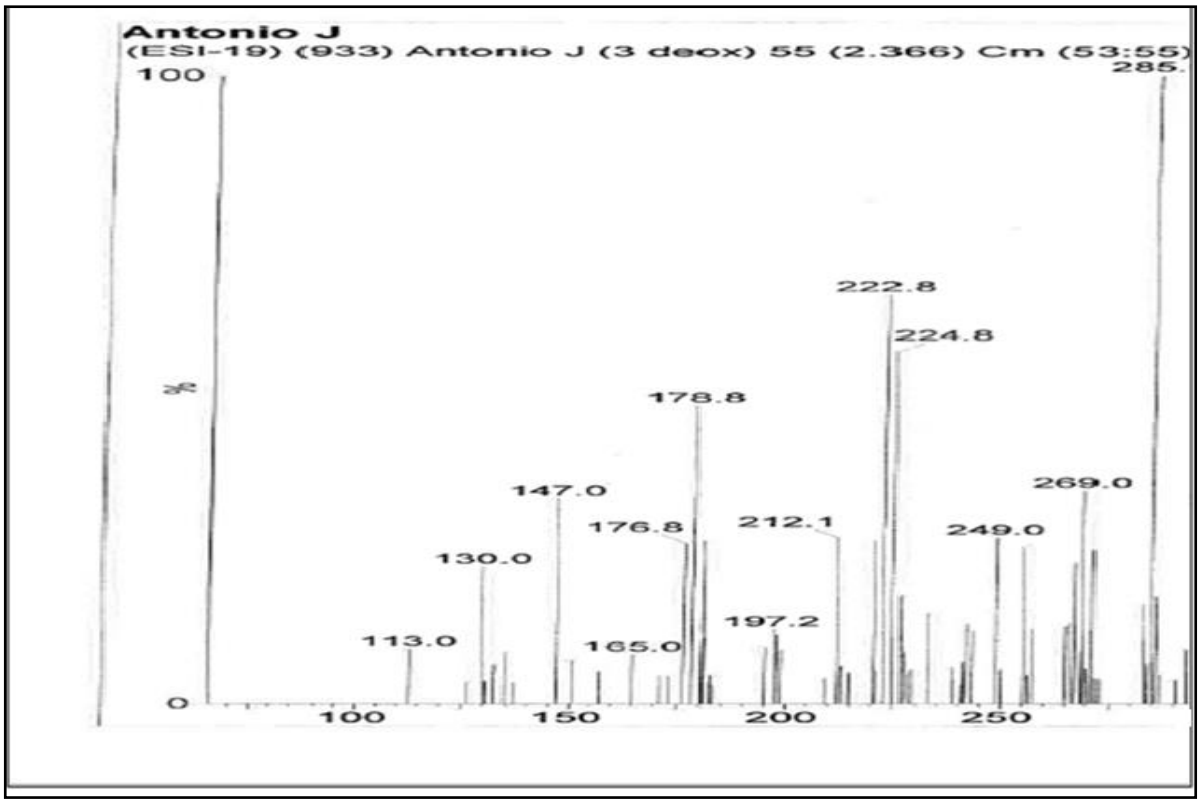
Annexe 6 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) du **kaempférol** (600 MHz, C_3H_6O) isolé de *Rhamnus alaternus*.



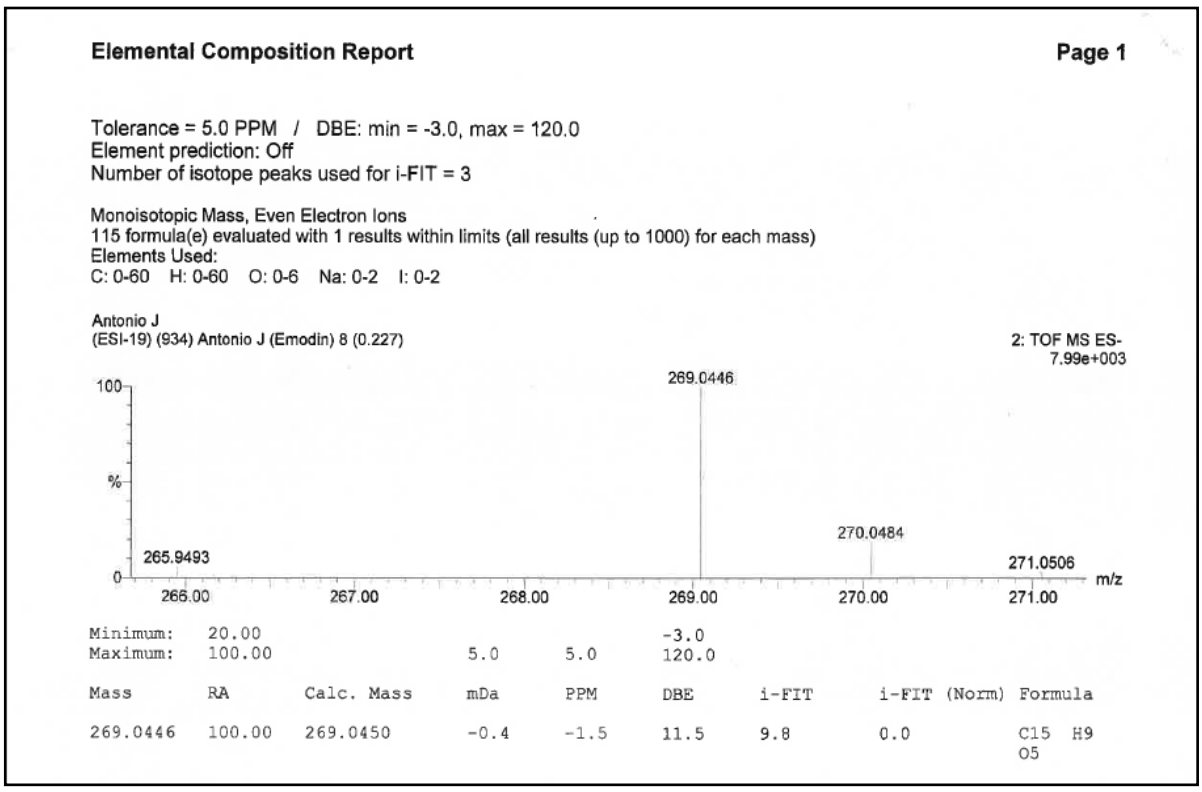
Annexe 7 : Spectre de la spectrométrie de masse à ionisation électronique (EIMS) de l'**émodine** isolé à partir de *Rhamnus alaternus.*



Annexe 8 : Spectre de la spectrométrie de masse à ionisation électronique (EIMS) du **kaempférol** isolé à partir de *Rhamnus alaternus.*



Annexe 9 : Spectre à impact électronique à haute résolution (HREIMS) de l'**émodine** isolé de *Rhamnus alaternus*



Elemental Composition Report Page 1

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -3.0, max = 120.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

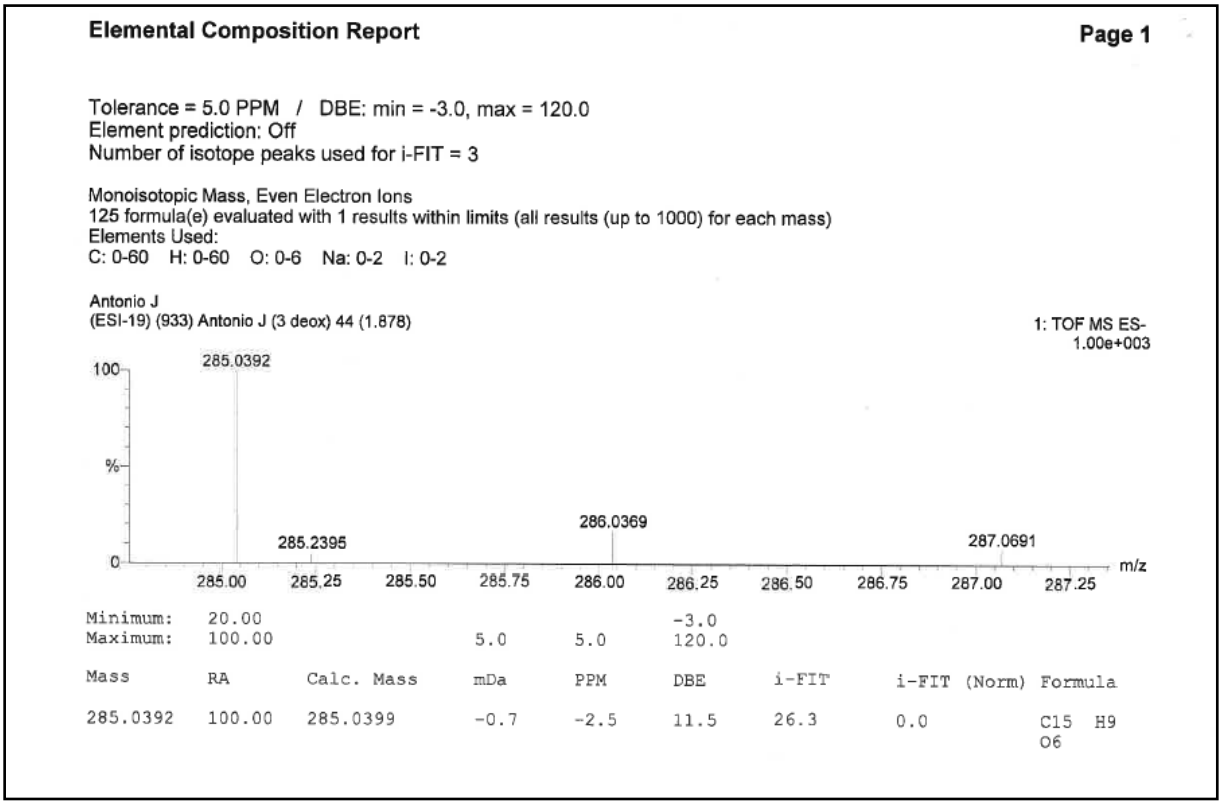
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
115 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
Elements Used:
C: 0-60 H: 0-60 O: 0-6 Na: 0-2 I: 0-2

Antonio J
(ESI-19) (934) Antonio J (Emodin) 8 (0.227)

2: TOF MS ES-
7.99e+003

Minimum:	20.00				-3.0			
Maximum:	100.00		5.0	5.0	120.0			
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
269.0446	100.00	269.0450	-0.4	-1.5	11.5	9.8	0.0	C15 H9 O5

Annexe 10 : Spectre à impact électronique à haute résolution (HREIMS) du **kaempférol** isolé de *Rhamnus alaternus.*



Elemental Composition Report Page 1

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -3.0, max = 120.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

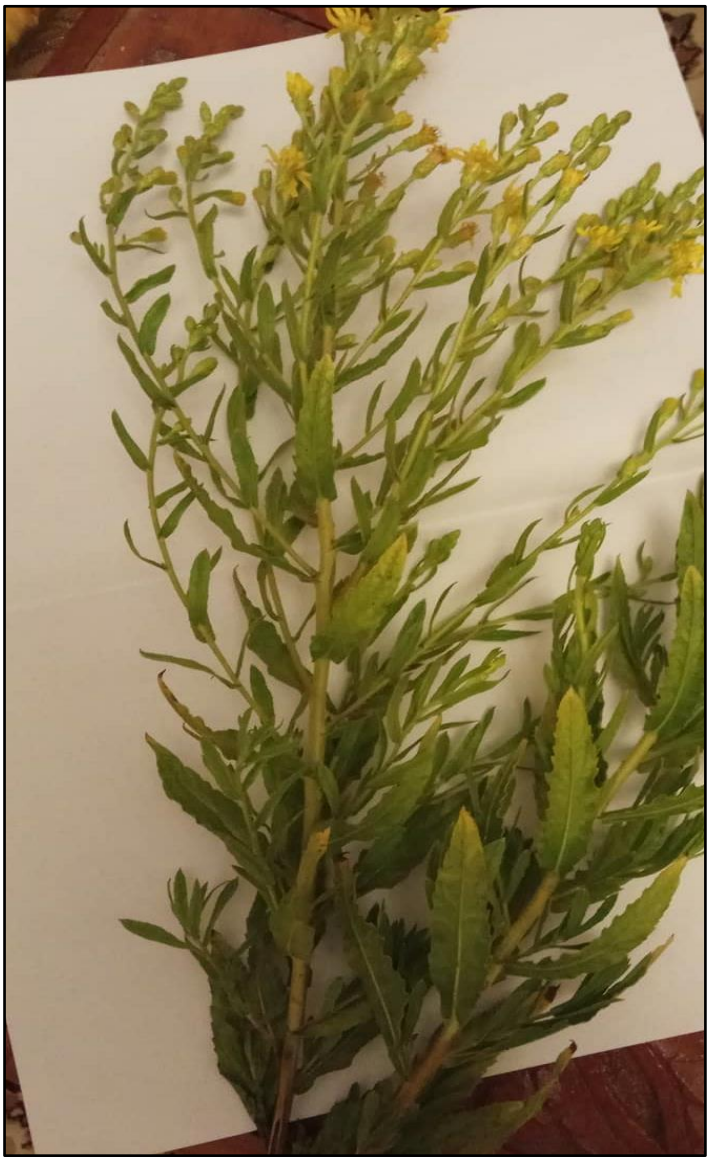
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
125 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
Elements Used:
C: 0-60 H: 0-60 O: 0-6 Na: 0-2 I: 0-2

Antonio J
(ESI-19) (933) Antonio J (3 deox) 44 (1.878)

1: TOF MS ES-
1.00e+003

Minimum:	20.00				-3.0			
Maximum:	100.00		5.0	5.0	120.0			
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
285.0392	100.00	285.0399	-0.7	-2.5	11.5	26.3	0.0	C15 H9 O6

Annexe 11 : Echantillon d'*Inula viscosa* déposé à l'institut scientifique de Rabat.



Spécimen de référence : **RAB107342**

Coordonnées géographiques :

Latitude : N 33°55' 37

Longitude : W 5°2'50

Orientation : 312°NW

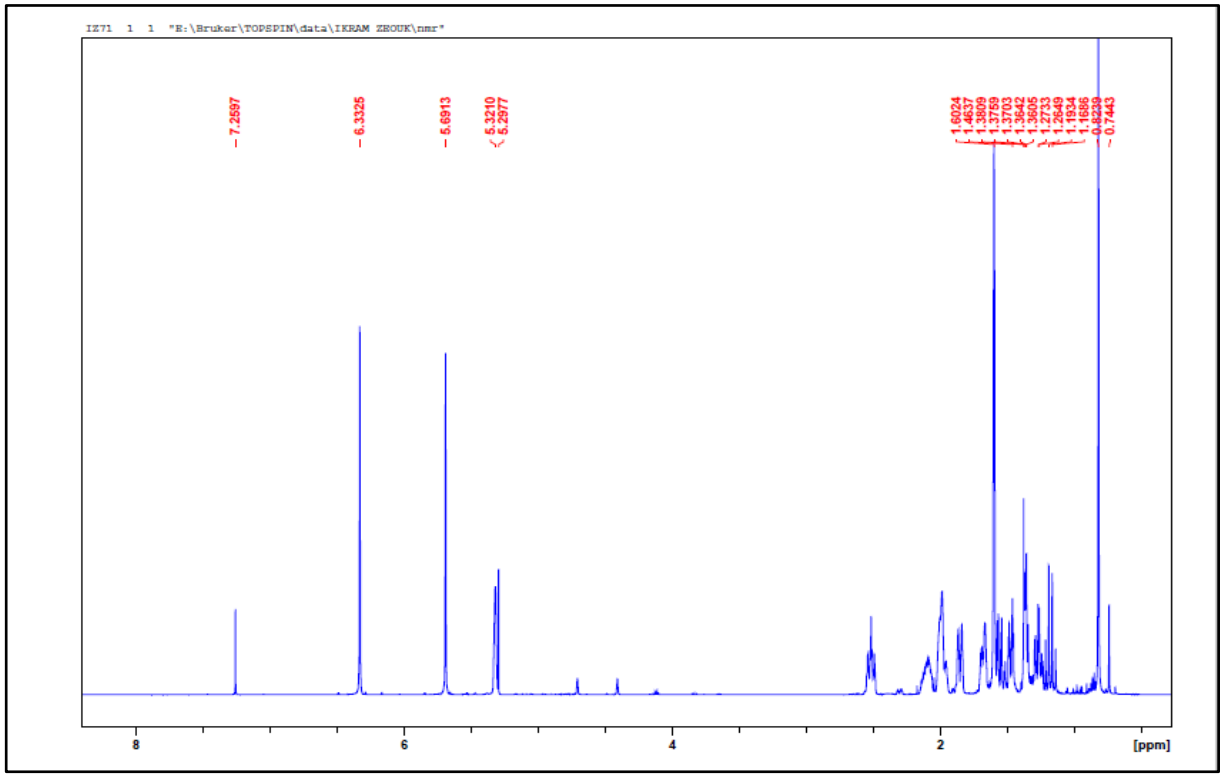
Altitude : 800

Mois de récolte : Septembre

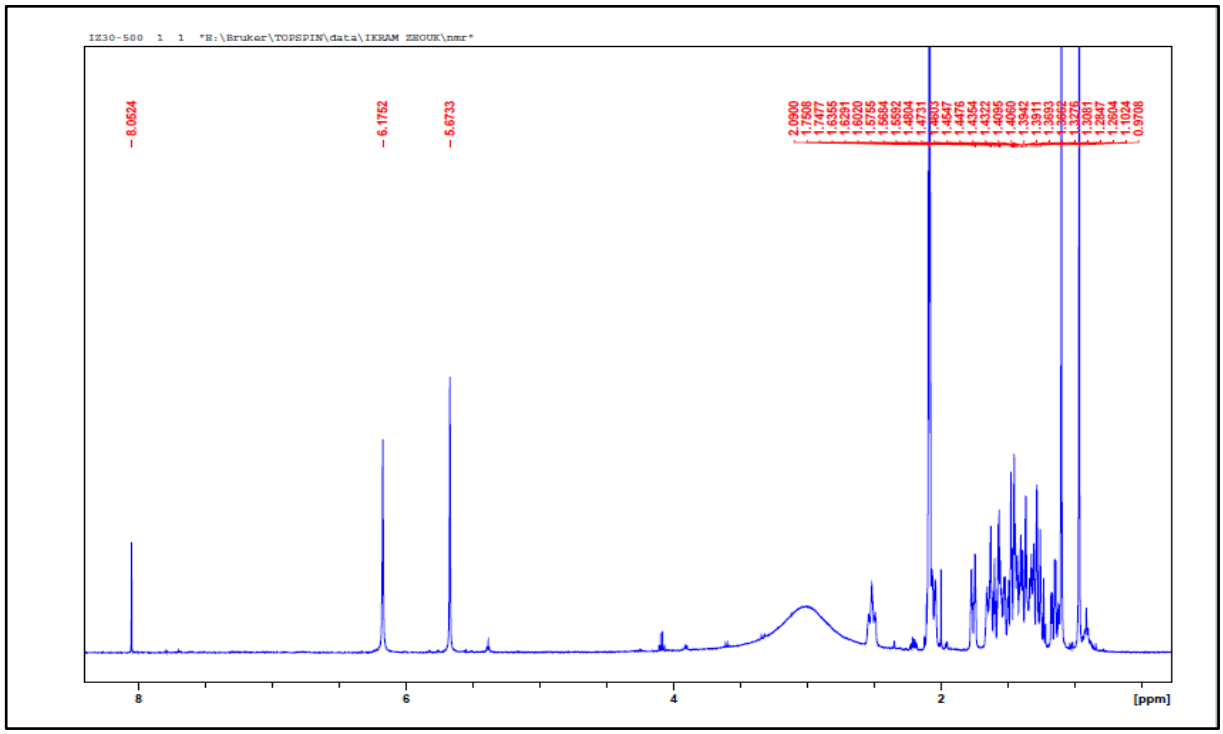
T° : 23

Localisation : Ait Saleh, Immouzer-Atlas

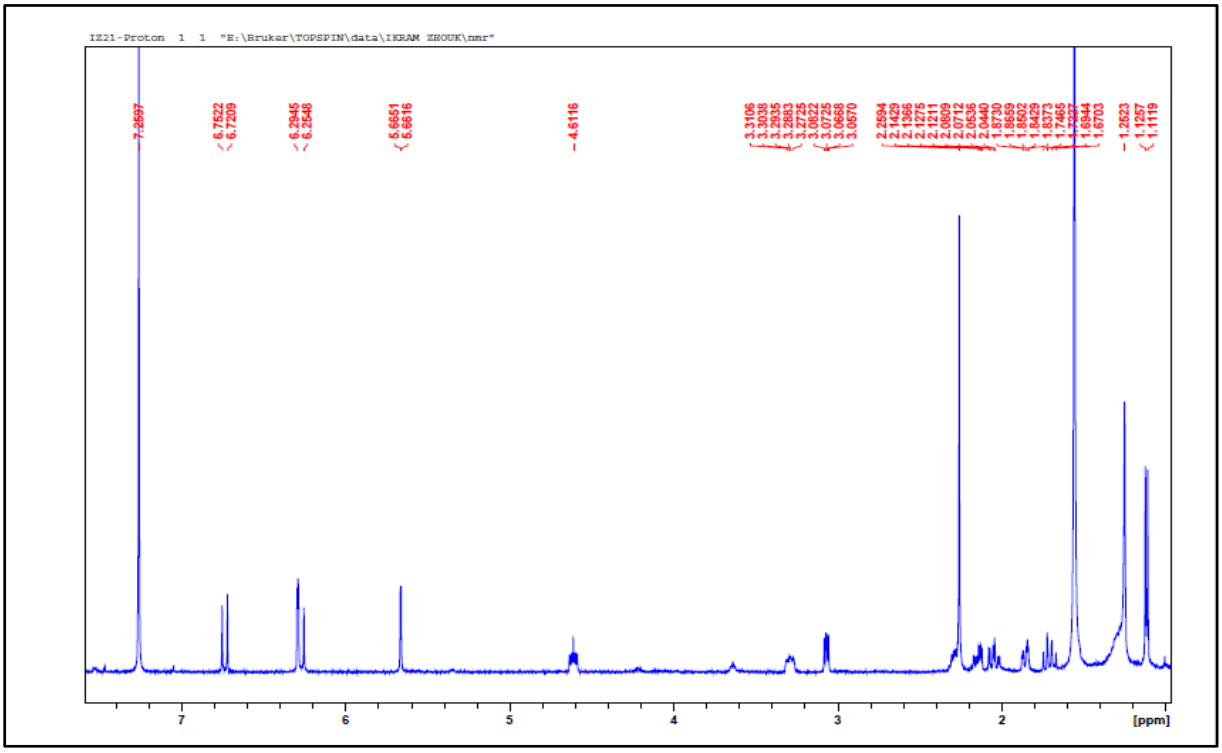
Annexe 12 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de l'**acide isocostique** isolé d'*Inula viscosa*.



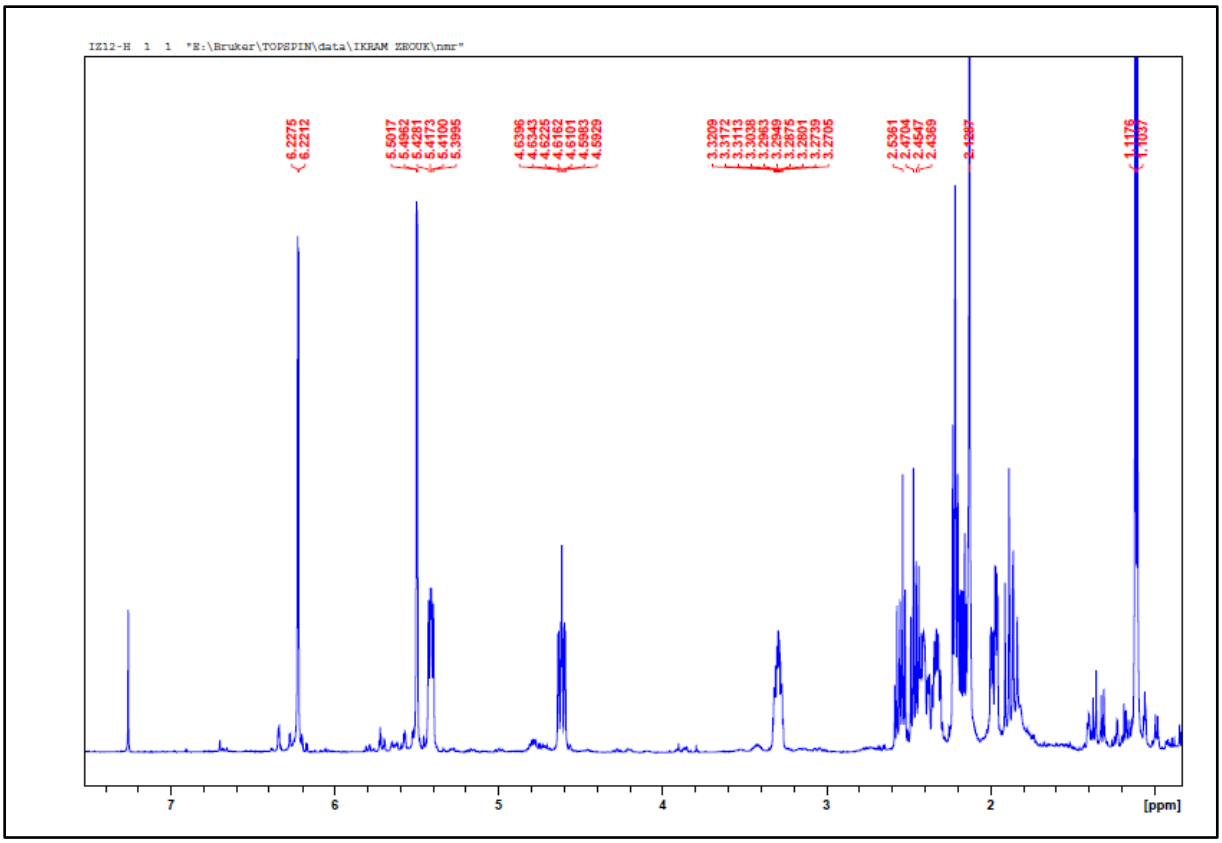
Annexe 13 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de l'**acide ilicique** isolé d'*Inula viscosa*.



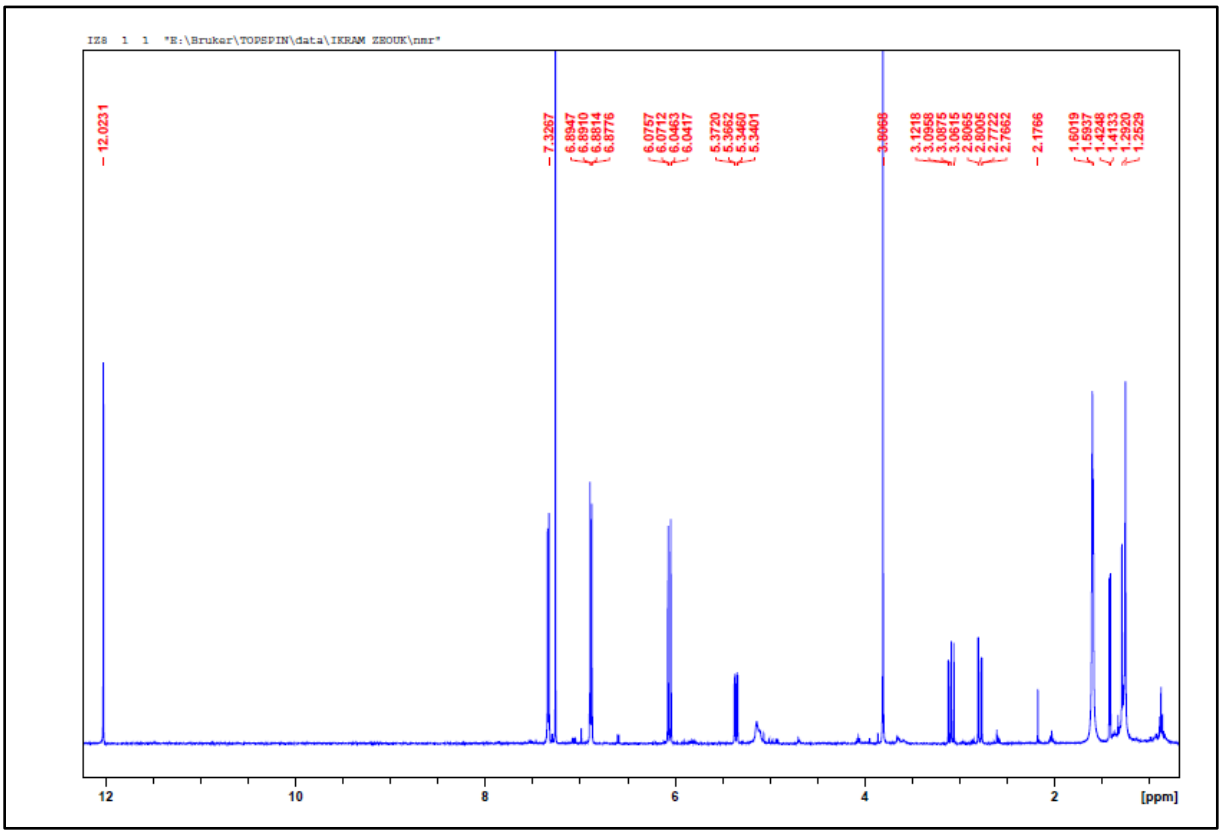
Annexe 14 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de **8-epi-xanthatin-1β,5β-epoxide** isolé d'*Inula viscosa*.



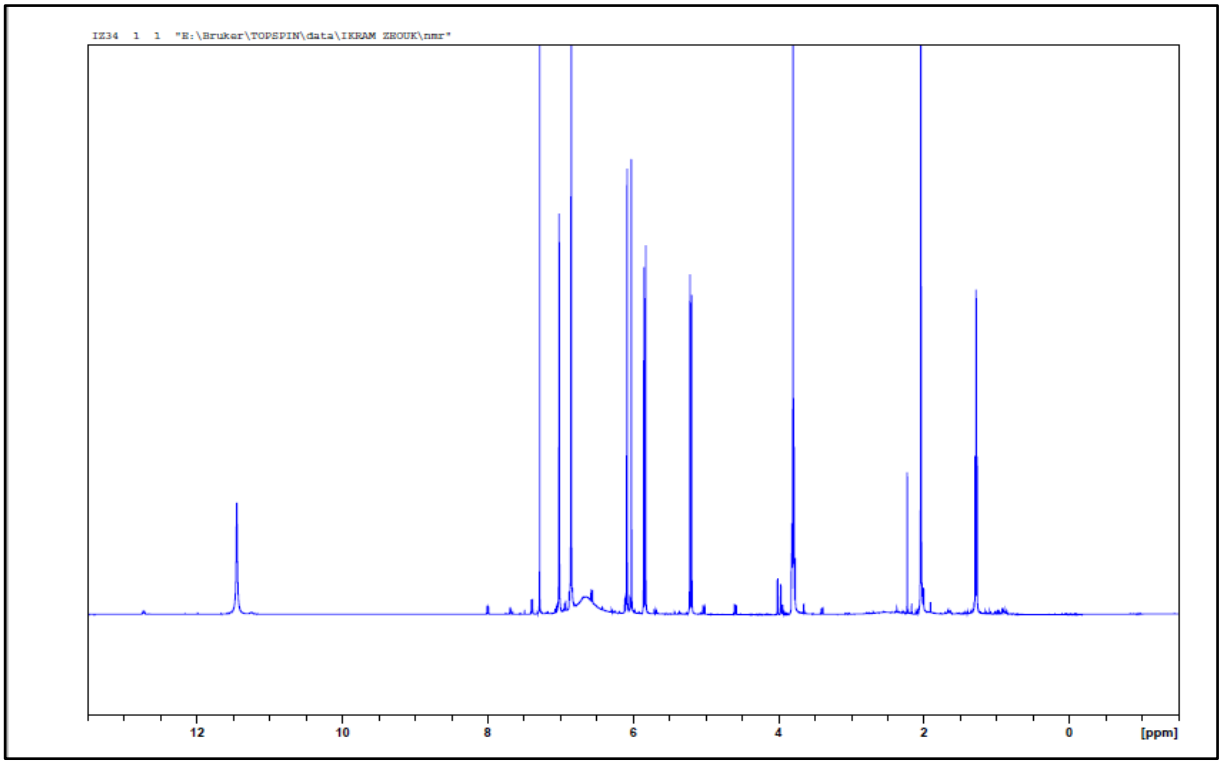
Annexe 15 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de l'**inuloxin A** isolé d'*Inula viscosa*.



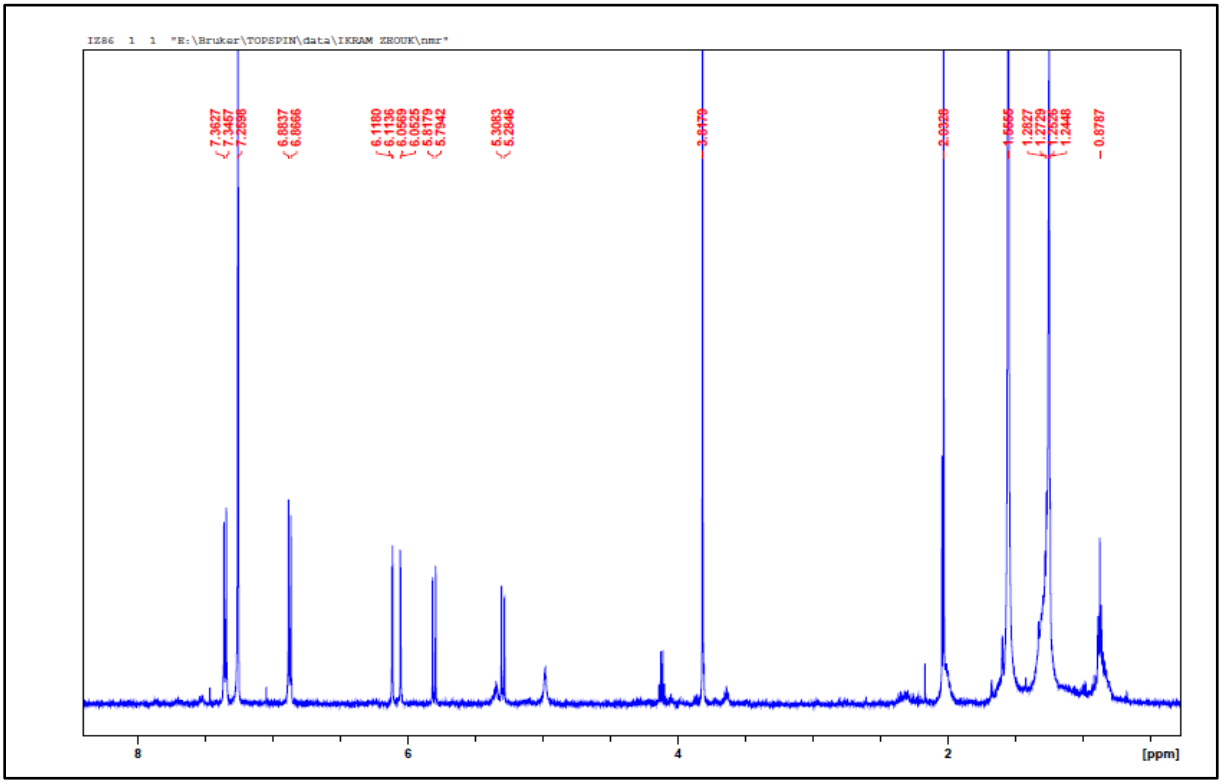
Annexe 16 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de la **sakuranétine** isolée d'*Inula viscosa*.



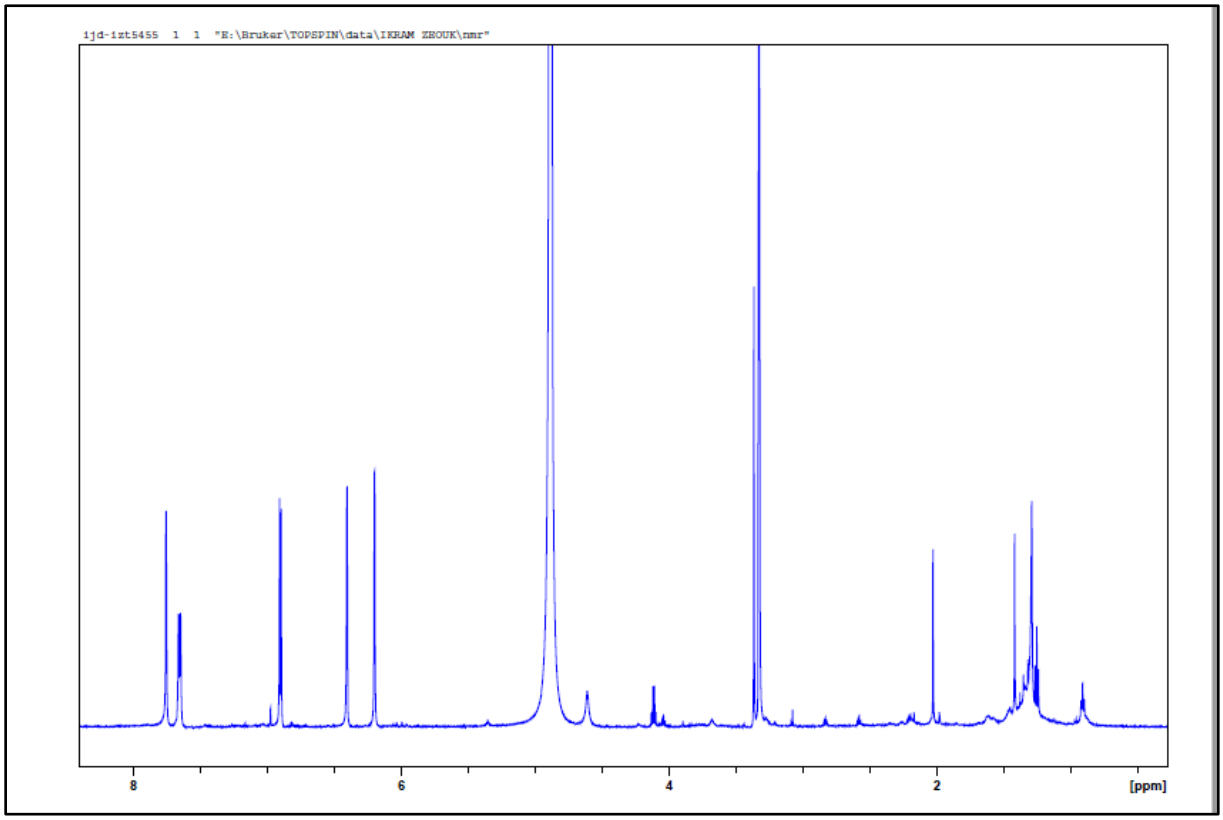
Annexe 17 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de la **taxifoline** isolée d'*Inula viscosa*.



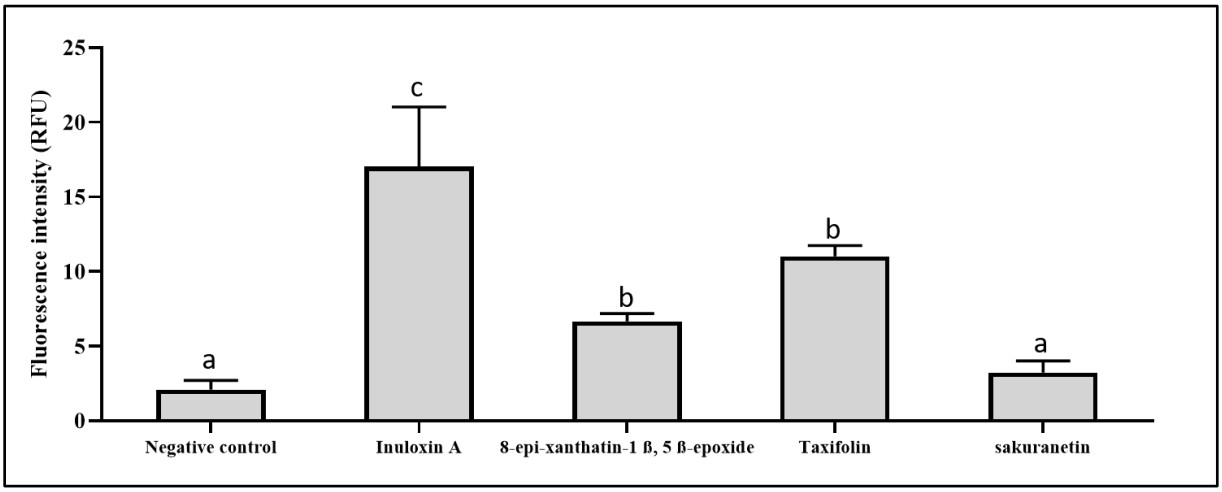
Annexe 18 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de **3-O-acetyl-7-O-methylaromadendrin** isolé d'*Inula viscosa*



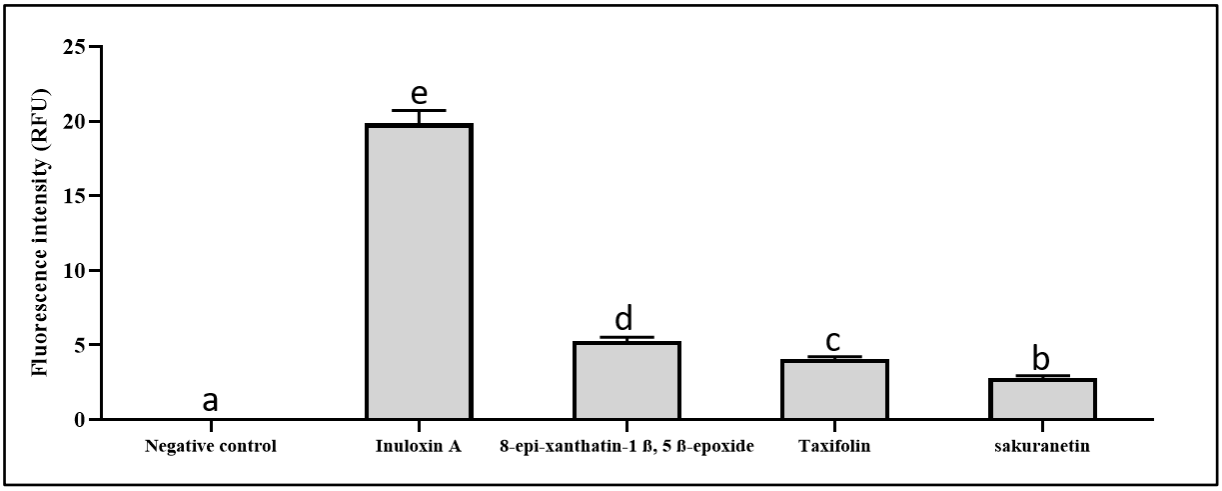
Annexe 19 : Spectre de la résonance magnétique nucléaire (1H-RMN) de la **quercétine** isolée d'*Inula viscosa*



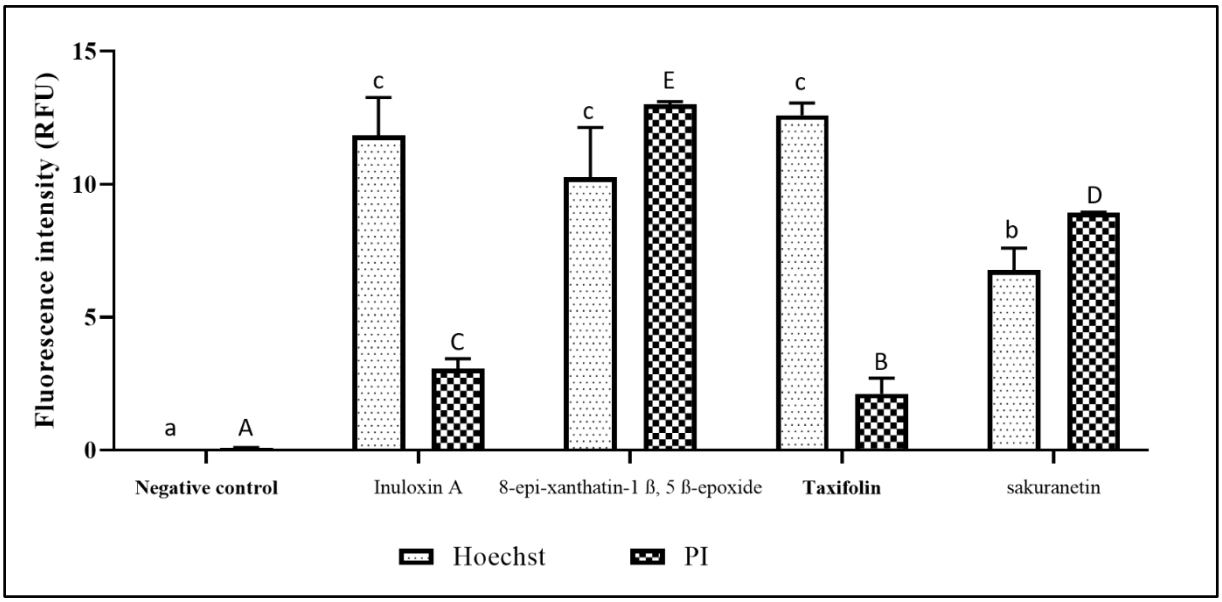
Annexe 20 : Analyse statistique lors du kit **SYTOX Green** des promastigotes de *Leishmania amazonensis* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



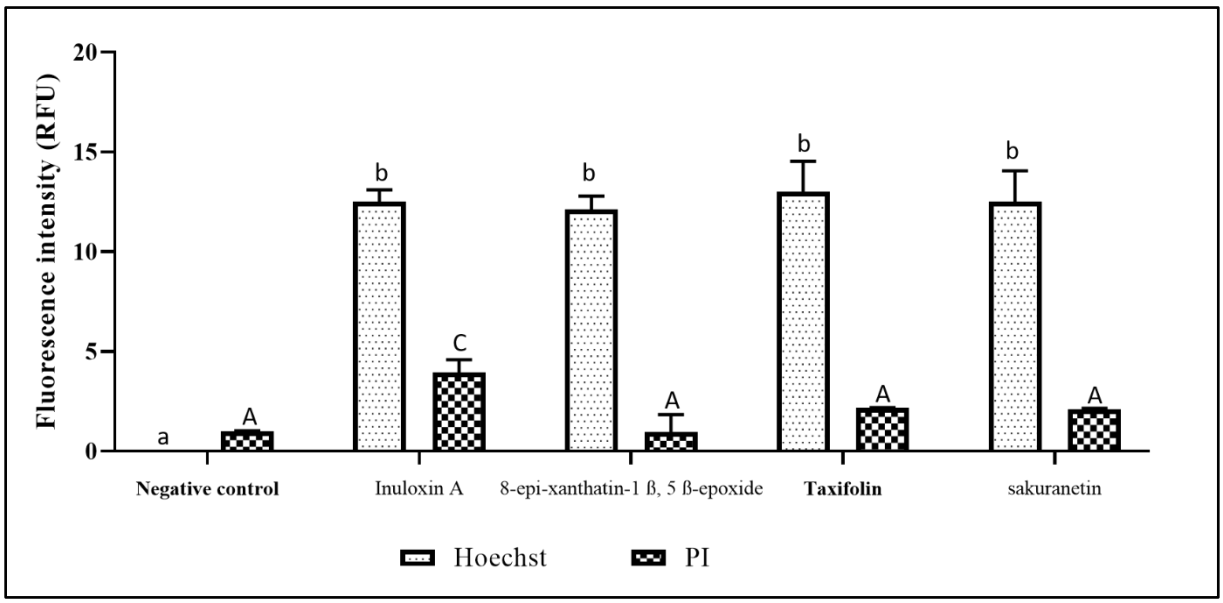
Annexe 21 : Analyse statistique lors du kit **SYTOX Green** des promastigotes de *Leishmania donovani* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



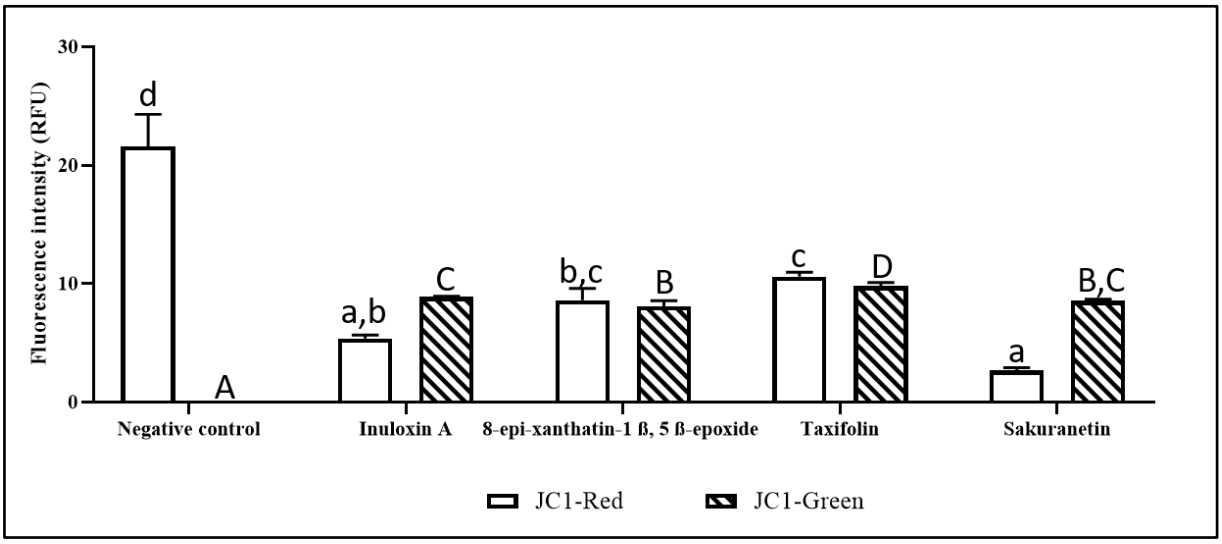
Annexe 22 : Analyse statistique lors du kit **Hoechst/PI** des promastigotes de *Leishmania amazonensis* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



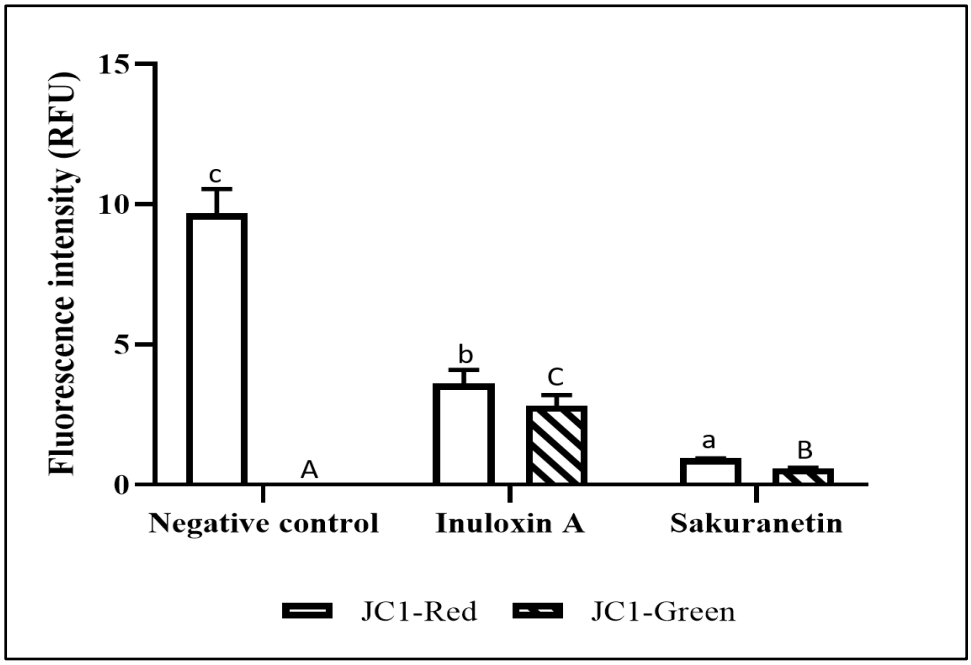
Annexe 23 : Analyse statistique lors du kit **Hoechst/PI** des promastigotes de *Leishmania donovani* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



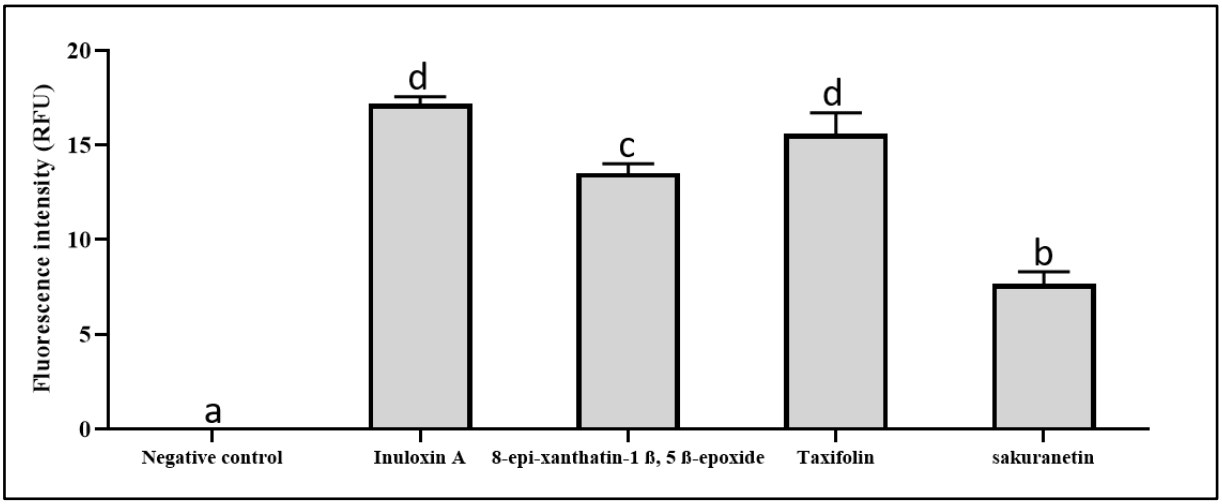
Annexe 24 : Analyse statistique lors du kit **JC-1** des promastigotes de *Leishmania amazonensis* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



Annexe 25 : Analyse statistique lors du kit **Hoechst/PI** des promastigotes de *Leishmania donovani* incubés avec les IC_{90s} de l'inuloxin A et la sakuranétine pendant 24h. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n=3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



Annexe 26 : Analyse statistique lors du kit **CELLROS** des promastigotes de *Leishmania amazonensis* incubés avec les IC_{90s} des quatre composés actifs pendant 24h : Inuloxin A, sakuranétine, 8-epi-xanthatine-1β, 5β-epoxide et taxifoline. Les valeurs sont données sous forme de moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs sont données selon RFU a-e : les moyennes dont les composés avec des lettres différentes sont significativement différentes (p <0,05).



Les résultats sont la moyenne de trois expériences. L'analyse statistique des courbes d'inhibition obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc.). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du GraphPad Prism 8.0.2. L'intensité de fluorescence (RFU) a été mesurée à l'aide du logiciel Image J en comparaison avec le control négatif. Les différences entre les valeurs ont été évaluées par l'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type et p <0,05 a été considéré comme statistiquement significatif.

Travaux de thèse publiés

Le travail de cette thèse avec **Ikrame Zeouk** en premier auteur a donné lieu à un brevet ; des publications dans des journaux internationaux indexés Scopus ; et des communications dans des congrès scientifiques.

Brevet

Khadija Bekhti, Ikrame Zeouk, Wessal Ouedrhiri, Ignacio A. Jiménez, Jacob Lorenzo-Morales, José E. Piñero.

Titre de brevet : Formulation médicale contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et responsable des infections invasives. Sous le N° de dépôt : 51937.

Publications scientifiques

- **Ikrame Zeouk**, Sifaoui I, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Bethencourt-Estrella CJ, Bazzocchi IL, Bekhti K, Lorenzo-Morales J, Jiménez IA, Piñero JE. Sesquiterpenoids and flavonoids from *Inula viscosa* induce programmed cell death in kinetoplastids. ***Biomedicine and Pharmacotherapy***, 130:110518. 2020.
- **Ikrame Zeouk**, Wessal Ouedrhiri, Ignacio A. Jiménez, Jacob Lorenzo-Morales, Isabel L. Bazzocchi, Khadija Bekhti, Intra-combined antioxidant activity and chemical characterization of three fractions from *Rhamnus alaternus* extract: Mixture design, ***Industrial Crops and Products***, 144, 112054, ISSN 0926-6690. 2020.
- **Ikrame Zeouk**, Ines Sifaoui, Aitor Rizo-Liendo, Iñigo Arberas-Jiménez, María Reyes-Batlle, Isabel L. Bazzocchi, Khadija Bekhti, José E. Piñero, Ignacio A. Jiménez, and Jacob Lorenzo-Morales. Exploring the Anti-Infective Value of Inuloxin A Isolated from *Inula viscosa* against the Brain-Eating Amoeba (*Naegleria fowleri*) by Activation of Programmed Cell Death. ***ACS Chemical Neuroscience***, In press 2020.
- **Ikrame Zeouk**, Bekhti, K. A critical overview of the traditional, phytochemical and pharmacological aspects of *Rhamnus alaternus*: a Mediterranean shrub. ***Advances in Traditional Medicine,*** 20: 1-11. 2020.
- **Ikrame Zeouk**, EL ouali lalami A, Bekhti K. *In vitro* antibacterial activity of medicinal plants in the central north of Morocco: a possible source of alternative drugs against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. ***Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research***, 12 (3): 285-92. 2019.

- **Ikrame Zeouk**, Balouiri M, Bekhti K. Antistaphylococcal activity and phytochemical analysis of crude extracts of five medicinal plants used in the center of Morocco against dermatitis. ***International Journal of Microbiology***, 1803102. 2019.
- **Ikrame Zeouk**, Et-Touys A, Balouiri M, et al. Leishmanicidal activity of plant extracts from Sefrou, a Moroccan focus of Leishmaniasis, against various *Leishmania* parasites in the promastigote stage. ***Phytothérapie***, 17 (2): 83-89. 2019.
- **Ikrame Zeouk**; Lalami, A.E.O.; Ezzoubi, Y.; Derraz, K.; Balouiri, M.; Bekhti, K. Cutaneous Leishmaniasis: Medicinal Plants Used in Sefrou City (Center of Morocco), a Focus of Leishmaniasis. ***Phytothérapie,*** 18 (3-4): 187-194. 2018.

Communications Scientifiques

Communication orale

- Le 3-ème Congrès international de « Biotechnologie au service de la société », 27-29 Février 2020, **Maroc.**
- The XVIIIth International Meeting on «The Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae», 18-22 Novembre 2019, **San José de Costa Rica**.
- XXI Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), eIntereuropeo, 3-5 Juillet 2019, **Vigo- Espagne**.
- Le 1er Forum National de « Biotechnologie Environnementale : Une voie vers le développement durable », 22 Novembre 2016, **Maroc.**

Communication affichée

- XXIII SemanaCientifica Antonio Gonzalez, 1-4 Octobre 2019, **La Laguna-Espagne**.
- Congrès international de « Biotechnologie au service de la société », 12-13 Décembre 2017, **Maroc**.
- La 2-ème Journée Scientifique du Doctorant en Biologie, 10 Mai 2017, **Maroc**.
- Le 1er Forum National sur « Biodiversité et Ressources Naturelles », 12-13 Décembre 2017, **Maroc**.
- La Rencontre Nationale sur les « Molécules Bioactives et Matériaux organiques », 27 Mars 2016, **Maroc**.
- Le 1er Forum National de « Biotechnologie Environnementale : Une voie vers le développement durable », 22 novembre2016, **Maroc**.
- Le 3-ème congrès international « Biotechnologies microbiennes au service du développement », 24-26 Octobre2016, **Maroc**.

- La Journée « Impact des changements climatiques sur le fonctionnement des écosystèmes », 2 Novembre 2016, **Maroc**.
- La 3-ème Journée doctorale du laboratoire de Biotechnologie Microbienne, 17 Décembre 2016, **Maroc**.